



HAL
open science

Détection, caractérisation et mesure d'un nouveau dommage radio-induit de l'ADN isolé et cellulaire

Peggy Regulus

► **To cite this version:**

Peggy Regulus. Détection, caractérisation et mesure d'un nouveau dommage radio-induit de l'ADN isolé et cellulaire. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00134380

HAL Id: tel-00134380

<https://theses.hal.science/tel-00134380>

Submitted on 1 Mar 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Présentée par

Peggy REGULUS

Pour obtenir le titre de
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER -
GRENOBLE I**

Ecole doctorale « Chimie et Sciences du Vivant »
Discipline : Chimie - Biologie

**Détection, caractérisation et mesure d'un nouveau
dommage radio-induit de l'ADN isolé et cellulaire**

Directeur de thèse : Dr. Jean-Luc RAVANAT

Date de soutenance : 09 octobre 2006

Jury :

Pr. Chantal HOUEE-LEVIN	Professeur à l'université Paris Sud, Orsay (Rapporteur)
Dr. Dietrich AVERBECK	Directeur de recherches à l'institut Curie, Paris (Rapporteur)
Pr. Jacques BALOSSO	Professeur à l'université Joseph Fourier, Grenoble
Dr. Jean CADET	Conseiller scientifique au CEA, Grenoble
Dr. Jean-Luc RAVANAT	Ingénieur de recherches au CEA, Grenoble

Thèse préparée au sein du laboratoire « Lésions des Acides Nucléiques »
DRFMC/SCIB/UMR E n°3 CEA-UJF - Grenoble

THESE

Présentée par

Peggy REGULUS

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER -
GRENOBLE I

Ecole doctorale « Chimie et Sciences du Vivant »
Discipline : Chimie - Biologie

**Détection, caractérisation et mesure d'un nouveau
dommage radio-induit de l'ADN isolé et cellulaire**

Directeur de thèse : Dr. Jean-Luc RAVANAT

Date de soutenance : 09 octobre 2006

Jury :

Pr. Chantal HOUEE-LEVIN	Professeur à l'université Paris Sud, Orsay (Rapporteur)
Dr. Dietrich AVERBECK	Directeur de recherches à l'institut Curie, Paris (Rapporteur)
Pr. Jacques BALOSSO	Professeur à l'université Joseph Fourier, Grenoble
Dr. Jean CADET	Conseiller scientifique au CEA, Grenoble
Dr. Jean-Luc RAVANAT	Ingénieur de recherches au CEA, Grenoble

Thèse préparée au sein du laboratoire « Lésions des Acides Nucléiques »
DRFMC/SCIB/UMR E n°3 CEA-UJF - Grenoble

Ayen san penn, sé zyé ki capon.
Proverbe créole (Persévérance est mère de victoire).

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à **Jean-Luc RAVANAT**, l'initiateur de ce projet, qui m'a encadrée, conseillée et supportée durant ces 3 années. Je remercie **Alain FAVIER** de m'avoir si chaleureusement accueillie au sein du LAN et **Jean CADET** pour les nombreuses discussions scientifiques.

Je suis reconnaissante à **Jacques BALOSSO**, président du jury, **Chantal HOUEE-LEVIN** et **Dietrich AVERBECK** pour avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime toute ma gratitude à **Thierry DOUKI** pour ses nombreux conseils et sa charmante compagnie en congrès.

Je remercie également **Sylvie SAUVAIGO** d'avoir accepté de relire cette thèse.

J'adresse de profonds remerciements à **Lucie MOLLARD** et **Benoît DUROUX** qui ont été des stagiaires très efficaces !

Merci à **Pierre-Alain BAYLE** et **Colette LEBRUN** pour les nombreuses analyses par RMN et spectrométrie de masse.

Merci à **Sophie BELLON** pour la préparation des extraits nucléaires CHO...et pour tous les fous rires avec la Kike.

J'adresse mes remerciements à **Peter DEDON** pour la préparation d'échantillons traités avec des agents radiomimétiques ainsi qu'à **Jörg HAU** pour les analyses de spectrométrie de masse haute résolution.

Je remercie **Francette ODIN** pour m'avoir tant appris sur la culture cellulaire et pour m'avoir préparé des centaines de milliards de THP1.

Comment ne pas remercier toute la jeunesse du LAN :

- **Jean-François MILLAU**, mon compagnon de galère avec qui je suis devenue une professionnelle de *Word* et de ses sommaires automatiques. Et un grand merci pour m'avoir fait découvrir Metal Slug.

- **Sylvain CAILLAT**, mon informateur au labo. Merci pour les après-midi piscine, les Lost, les Prison Break et autres séries.

- **Caroline MARIE, Olivier FALLETTI**. Avec vous, la relève est assurée. Merci de m'avoir fait découvrir tes talents d'acteur Olivier, et merci pour tous les bons moments passés à AITAP, Caro (et en dehors aussi d'ailleurs...).

Je remercie également les anciennes JJMS, **Séverine DEVERGNAS, Sophie COURDAVAULT et Delphine RAPIN**, pour leurs conseils, leur soutien et leur agréable compagnie au labo comme en dehors.

Toute ma gratitude va en direction de **Zohra TERMACHE** pour sa formidable efficacité à résoudre les problèmes même les plus insolubles. Super Zozotte !

Je tiens à remercier tout particulièrement **Christine SAINT-PIERRE** pour sa bonne humeur, son soutien permanent et son aide dans des moments aussi délicats que l'impression de mon manuscrit. Merci Kike pour ta joie de vivre et ta gentillesse.

Merci à Nintendo d'avoir inventé la DS. Sans cette console et les moments de décompression qu'elle m'a procurés, je ne sais pas si j'aurais été nerveusement capable d'aller jusqu'au bout de cette thèse.

Merci donc à **Vincent MEYER** de m'avoir offert ma Nintendo DS et de m'avoir soutenue et réconfortée dans les moments de doute.

Enfin, je remercie **ma mère** sans qui rien de tout cela n'aurait été possible (et pour cause...), ainsi que **Schoup** pour leur amour et leurs encouragements.

A la mémoire de mon père tant aimé

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES.....	7
CHAPITRE I: CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	11
I. Le rayonnement ionisant.....	13
II. Les effets du rayonnement ionisant.....	19
III. La réponse de la cellule face aux dommages de l'ADN	36
IV. La mesure des dommages de l'ADN.....	50
CHAPITRE II: OBJECTIFS DE L'ETUDE	59
RESULTATS	63
CHAPITRE III: DETECTION DE NOUVELLES LESIONS DE L'ADN PAR CLHP-SM/SM	65
I. Les différents modes d'utilisation de la CLHP-SM/SM	67
II. Utilisation du mode « perte de neutre » pour rechercher de nouvelles lésions dans l'ADN exposé au rayonnement γ	71
III. Mise au point d'une méthode de détection plus sensible	73
IV. Discussion	76
CHAPITRE IV: CARACTERISATION D'UNE NOUVELLE LESION RADIO-INDUITE DE L'ADN	79
I. Origine de la lésion	81
II. Structure de la dCyd341.....	82
III. Mécanisme de formation de la dCyd341.....	97
IV. Oxygène et dCyd341	105
V. Discussion	110
CHAPITRE V: ANALYSES QUANTITATIVES DANS LES ADN ISOLE ET CELLULAIRE	115
I. Quantification de la dCyd341	117
II. Quantification de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde	121

III.	Conclusion	127
CHAPITRE VI: COMMENT LA DCYD341 EST-ELLE PRISE EN CHARGE PAR LES CELLULES ?		
129		
I.	Excision <i>in vitro</i> par des glycosylases	131
II.	Excision <i>in vitro</i> par des extraits nucléaires.....	132
III.	Réparation <i>in cellulo</i>	133
IV.	Discussion	136
CHAPITRE VII: CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....		
139		
CHAPITRE VIII: CONDITIONS EXPERIMENTALES.....		
145		
I.	Lignée et culture cellulaire.....	147
II.	Irradiations γ	147
III.	Méthode d'extraction chaotropique au NaI de l'ADN cellulaire.....	148
IV.	Digestions enzymatiques de l'ADN.....	149
V.	Traitement d'ADN par des agents exogènes.....	149
VI.	Préparation de solutions d'ADN sous différentes conditions.....	150
VII.	Analyses par CLHP-SM/SM.....	151
VIII.	Production et purification de la dCyd341 à partir d'ADN irradié.....	152
IX.	Réparation des lésions	153
X.	Synthèses chimiques de la dCyd341 et de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde	155
XI.	Analyses par RMN.....	160
XII.	Analyses de masse exacte	160
LISTE DES PUBLICATIONS, PRIX ET COMMUNICATIONS.....		
161		
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		
165		
ANNEXES		
181		
TABLE DES MATIERES.....		
189		

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

Liste des abréviations utilisées

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP	Site abasique
CDB	Cassure double brin
CIPR	Commission internationale de protection radiologique
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CLHP-DEC	Chromatographie liquide haute performance couplée à une détection électrochimique
CLHP-SM	Chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse
CLHP-SM/SM	Chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en mode tandem
CPD	Dimère cyclobutane de pyrimidines
CSB	Cassure simple brin
dAdo	2'-désoxyadénosine
dCMP3'	2'-désoxycytidine -3'-monophosphate
dCMP5'	2'-désoxycytidine -5'-monophosphate
dCyd	2'-désoxycytidine
dGuo	2'-désoxyguanosine
DHU	Dihydrouracile
DMTr	Diméthoxytrityl
dR	2-désoxyribose
Endo III	Endonucléase III
FapyAde	4,6-diamino-5-formamidopyrimidine
FapydAdo	4,6-diamino-5-formamidopyrimidine 2'-désoxyadénosine
FapydGuo	2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine 2'-désoxyguanosine
FapyGua	2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine
FordUrd	5-formyl-2'-désoxyuridine
Fpg	Formamidopyrimidine glycosylase
HmdUrd	5-(hydroxyméthyl)-2'-désoxyuridine
4-HNE	4-hydroxynonanal
MDA	Malondialdéhyde

Liste des abréviations utilisées

MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium
MX	Méthoxyamine
NHEJ	Suture non homologue des cassures de l'ADN
5-OHdUrd	5-hydroxy-2'-désoxyuridine
8-oxo-Ade	8-oxo-7,8-dihydro-adénine
8-oxo-dAdo	8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyadénosine
8-oxo-dGuo	8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine
8-oxo-Gua	8-oxo-7,8-dihydroguanine
PBS	Tampon phosphate salin
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
pdCp	2'-désoxycytidine-3',5'-diphosphate
(6-4)PP	Photoproduit (6-4) de pyrimidines
pTp	Thymidine-3',5'-diphosphate
RCT	Réparation couplée à la transcription
REB	Réparation par excision de bases
REN	Réparation par excision de nucléotides
RGG	Réparation globale du génome
STL	Synthèse translésionnelle
TLE	Transfert linéique d'énergie
TMP3'	Thymidine-3'-monophosphate
uma	Unité de masse atomique
UV	Ultraviolet
XP	Xeroderma pigmentosum

CHAPITRE I: CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE RAYONNEMENT IONISANT

A. Définition et notions de radioactivité

1. Qu'est-ce qu'un rayonnement ionisant ?

La réponse à cette question s'avère indispensable compte tenu de la thématique de notre étude.

Toute radiation capable d'arracher un ou plusieurs électrons à la matière appartient à la catégorie des rayonnements ionisants. L'atome le plus facilement ionisable est le potassium, avec une énergie de 4,3 eV ; tout rayonnement ayant une énergie supérieure (ce qui correspond à une longueur d'onde de 288 nm) pourrait donc être considéré comme ionisant. Toutefois, lors de l'interaction du rayonnement avec la matière, la totalité de l'énergie n'est pas déposée sur une cible unique. Des phénomènes d'excitation de la matière ont lieu, conduisant à une perte d'énergie du rayonnement incident. On considère donc qu'il faut 35 eV pour ioniser la matière, ce qui correspond à un rayonnement de longueur d'onde inférieure à 35,4 nm.

Un rayonnement ionisant peut être particulaire (particules α ou β , ions) ou électromagnétique (rayons X ou γ). Les rayonnements ionisants peuvent être produits dans des accélérateurs de particules, grands instruments utilisant des champs électriques et/ou magnétiques pour amener des particules à des vitesses (et donc des énergies) élevées. On peut ainsi citer les accélérateurs d'ions lourds ($^{12}\text{C}^{6+}$, $^{36}\text{Ar}^{18+}$ par exemple) : lorsque ces ions passent à proximité d'un électron, de l'énergie est transférée de l'ion vers l'électron. La perte d'énergie est infime pour l'ion incident, mais pour l'atome touché, ce gain d'énergie provoque l'ionisation, si l'énergie gagnée est supérieure à l'énergie de liaison de l'électron.

Les rayonnements ionisants peuvent également être issus d'un phénomène physique appelé radioactivité. La radioactivité est une propriété propre aux noyaux cherchant à revenir vers un état stable. La stabilité d'un noyau est fonction du rapport existant entre les nombres de neutrons et de protons. Cette notion peut être portée sur un diagramme représentant le nombre de neutrons (N) en fonction du nombre de protons (Z) (**Figure 1**). Ce diagramme de stabilité β fait apparaître l'existence d'une zone de stabilité en fonction du rapport N/Z. Tout noyau en dehors de cette zone de stabilité tend à devenir stable par un mode ou un autre de désintégration radioactive. Le type de désintégration (β^- , β^+ ou α) sera fonction de la nature de

l'instabilité (excès de neutrons, de protons ou des deux) et donc de la position du noyau sur le diagramme.

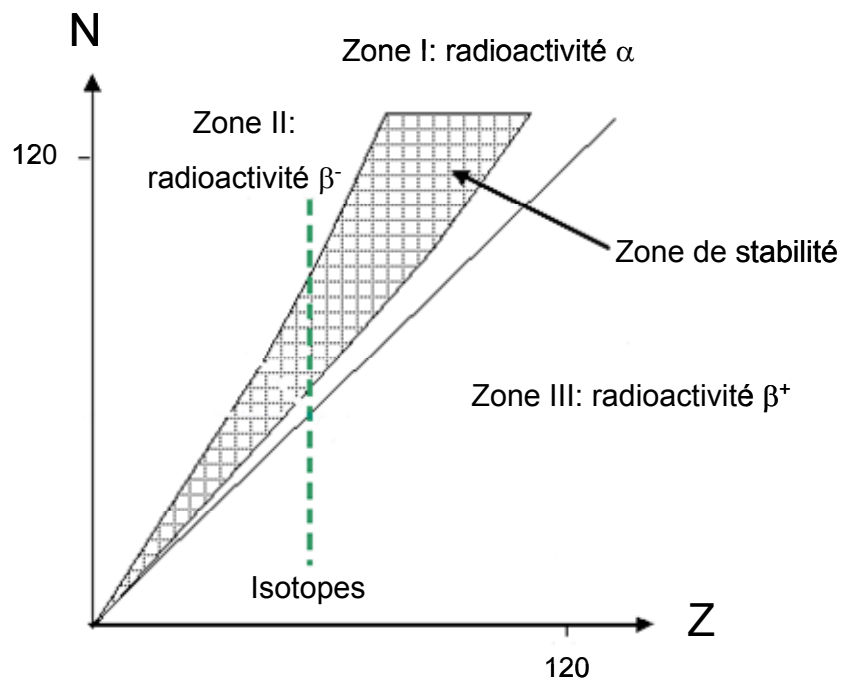


Figure 1. Stabilité des noyaux en fonction du rapport N/Z : diagramme de stabilité β .

2. Les rayonnements ionisants du ^{60}Co

Dans le cadre de notre étude, les rayonnements ionisants utilisés proviennent de la désintégration radioactive d'une source de ^{60}Co . Le schéma de désintégration du ^{60}Co est présenté en **Figure 2**. Le ^{60}Co a un numéro atomique de 27, et un nombre de masse de 60, il possède ainsi 33 neutrons. Pour pallier à son excès de neutrons, il émet un rayonnement β^- . Il se transforme ainsi en nickel 60 (^{60}Ni), possédant 28 protons et 32 neutrons. Mais ce noyau est dans un état excité et, pour retourner vers son état fondamental, il va céder 2 photons γ de 1,17 et 1,33 MeV, éliminant ainsi son excès d'énergie. Ce mode de désintégration se produit dans 99,8 % des cas. Une infime fraction des désintégrations correspond à l'émission d'un rayonnement β^- plus énergétique suivie de celle d'un unique photon γ de 1,33 MeV.

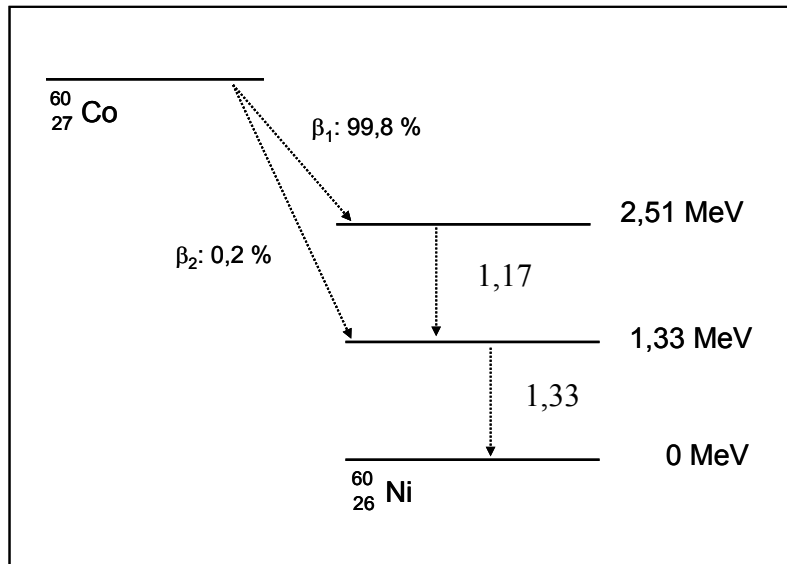


Figure 2. Schéma de désintégration du ^{60}Co .

Notons que les rayonnements X correspondent à un type de rayonnement ionisant proches des rayonnements γ . Mais le photon est dans ce cas émis par l'enveloppe électronique de l'atome et non par le noyau.

3. Spectre électromagnétique

Pour tout rayonnement électromagnétique, il existe une relation inversement proportionnelle entre son énergie et sa longueur d'onde :

$$E = h c / \lambda$$

Où E représente l'énergie du rayonnement en J,

λ , sa longueur d'onde en m

h, la constante de Planck ($6,62 \cdot 10^{-34}$ J.s)

c, la célérité dans le vide ($3 \cdot 10^8$ m.s $^{-1}$)

En vertu de cette relation, les rayonnements les plus énergétiques sont ceux ayant les longueurs d'onde les plus faibles. On trouvera donc les rayonnements ionisants de nature électromagnétique dans la partie du spectre correspondant aux faibles longueurs d'onde (**Figure 3**). Les photons X et γ sont ainsi très énergétiques (jusqu'à plusieurs centaines de MeV) comparés aux photons de la lumière visible (3 eV pour les plus énergétiques situés dans le violet), et même de la lumière UV (moins de 100 eV).

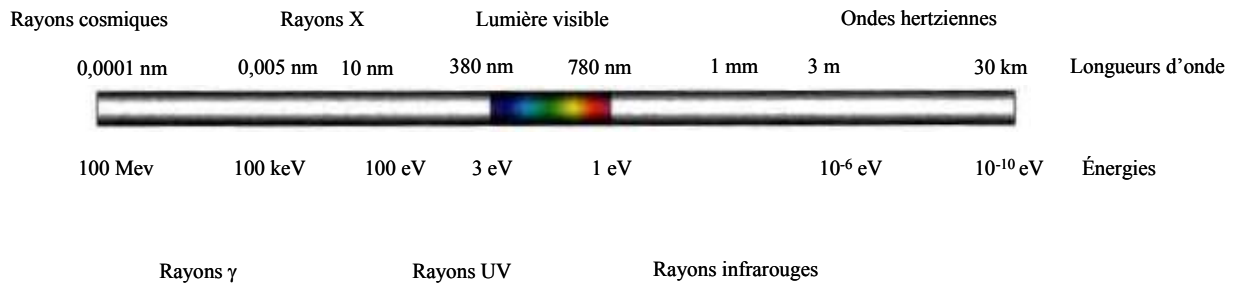


Figure 3. Spectre électromagnétique

B. Quelques notions de dosimétrie

Il paraît à ce niveau judicieux d'introduire quelques notions de nomenclature dosimétrique.

Evoquons tout d'abord le pouvoir de pénétration des rayonnements. Cette notion revêt une importance particulière en radioprotection lorsqu'il est question de déterminer les conditions nécessaires pour se protéger d'un rayonnement. Le pouvoir de pénétration est fonction de la nature du rayonnement. Ainsi, les rayons α ont une pénétration très faible dans l'air et sont arrêtés par une feuille de papier. Les rayonnements β^- ont une pénétration faible de quelques mètres dans l'air, ils sont arrêtés par quelques millimètres d'aluminium. Les rayonnements X et γ ainsi que les neutrons ont un très fort pouvoir de pénétration. Une forte épaisseur de béton, de plomb ou d'eau est nécessaire pour atténuer la quasi-totalité des photons X et γ . Les neutrons sont arrêtés par une forte épaisseur d'eau, de béton ou de paraffine.

Lorsqu'un rayonnement ionisant pénètre dans la matière, il lui transfère son énergie. Le transfert linéique d'énergie (TLE) traduit l'énergie moyenne transférée par la particule ou le photon, par unité de longueur de la trajectoire parcourue, au milieu qu'elle traverse. Ainsi, plus le TLE est grand, plus l'énergie cédée localement par le photon ou la particule est grande. Les rayonnements γ du ^{60}Co ont un faible TLE de 0,2 keV/ μM , à la différence du rayonnement émis par des faisceaux d'ions lourds. Le TLE de tels faisceaux dépend de l'énergie cinétique des ions. Les faisceaux d'ions $^{12}\text{C}^{6+}$ et $^{36}\text{Ar}^{18+}$ du Grand Accélérateur National d'Ions Lourds (GANIL) de Caen ont un TLE moyen de 24,5 et 250 keV/ μM respectivement. Cette notion est de plus compliquée par le fait que les rayonnements déposent dans la matière une quantité d'énergie qui varie avec la distance parcourue. Dans le cas des

ions, le dépôt d'énergie est maximal en fin de parcours : c'est le pic de Bragg (**Figure 4**). Cette propriété est utilisée en radiothérapie (protonthérapie, hadronthérapie) pour concentrer les effets d'un faisceau de particules au niveau de la tumeur et minimiser les effets aux tissus sains environnants.

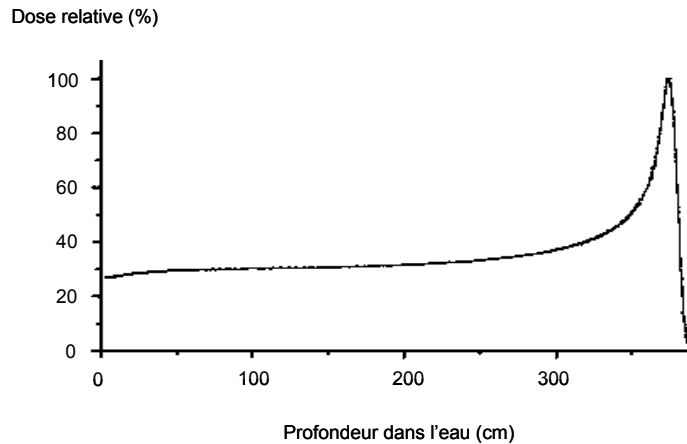


Figure 4. Pic de Bragg d'un faisceau de protons de 250 MeV dans l'eau.

La dose absorbée correspond à l'énergie que dépose un rayonnement dans la matière. Cette dose s'exprime en Grays (Gy), un Gray correspondant à un joule par kilogramme de matière. De façon à pouvoir comparer entre eux les effets biologiques de plusieurs rayonnements, la notion de dose équivalente est souvent employée. En effet, la dose absorbée ne reflète pas la différence d'effets biologiques que peuvent provoquer des mêmes doses de rayonnements de nature différente. La dose équivalente est une pondération de la dose absorbée (D) par un facteur de pondération radiologique (W_R) propre à chaque rayonnement. Le facteur de pondération radiologique traduit la nocivité d'un rayonnement. Sa valeur augmente avec celle du TLE. Ce facteur est de 1 pour les photons X et γ ainsi que pour les particules β , de 10 pour les neutrons d'énergie inférieure à 100 keV et de 20 pour les particules α et les neutrons de plus de 100 keV (ICRP, 1991). La dose équivalente (H) s'exprime en Sieverts (Sv) et on peut écrire la relation suivante :

$$H = D \times W_R$$

Il est également possible d'introduire un facteur de pondération tissulaire (W_t) qui reflète la sensibilité du tissu considéré face aux radiations ionisantes. En pondérant la dose équivalente par ce facteur de pondération tissulaire, on obtient la dose efficace E :

$$E = D \times W_r \times W_t$$

La somme des doses efficaces de l'ensemble des tissus ou organes correspond à la dose efficace de l'organisme entier. Le

Tableau 1 regroupe les facteurs de pondération tissulaire de quelques organes. Comme il est possible de le constater, les gonades constituent l'organe le plus sensible du corps humain.

Tableau 1. Valeurs du facteur de pondération tissulaire (d'après ICRP, 1991).

Organe	Facteur de pondération tissulaire (Wt)
Gonades	0,20
Seins	0,05
Moelle osseuse	0,12
Colon	0,12
Poumons	0,12
Estomac	0,12
Vessie	0,05
Foie	0,05
Oesophage	0,05
Thyroïde	0,05
Os	0,01
Peau	0,01
Reste de l'organisme	0,05
Total	1

C. Les différentes sources d'exposition au rayonnement ionisant

Le rayonnement ionisant auquel peuvent être exposées les populations provient essentiellement de la radioactivité. La dose annuelle totale de radioactivité reçue par un Homme est d'environ 3,5 mSv, dans les pays dits « développés ». Comme il est possible de le voir sur la **Figure 5**, plus des 2/3 de cette radioactivité sont d'origine naturelle. En effet, certains radionucléides sont naturellement présents dans l'eau, l'alimentation ou l'air. C'est

ainsi le cas du potassium 40 ingéré ou du radon et ses descendants inhalés. Ces radioéléments absorbés ou ingérés constituent la composante principale de la radioactivité naturelle. Le rayonnement cosmique provenant de l'espace ou de la surface du Soleil (la dose reçue par ce type de rayonnement variant avec l'altitude à laquelle se trouvent les individus) ou le rayonnement d'éléments radioactifs situés dans la croûte terrestre sont deux autres composantes de la radioactivité naturelle. Une autre source d'exposition au rayonnement ionisant est artificielle et provient principalement des applications médicales comme les rayons X utilisés en radiologie et les rayons γ ou les faisceaux de particules utilisés lors de radiothérapies. Les retombées radioactives causées par les essais atmosphériques des armes nucléaires effectués antérieurement et les émissions d'exploitation normale des centrales nucléaires contribuent également à l'exposition de la population au rayonnement ionisant. Cette exposition aux rayonnements ionisants créés par l'Homme représente en moyenne 1/3 de l'exposition totale moyenne dans les pays « développés ».

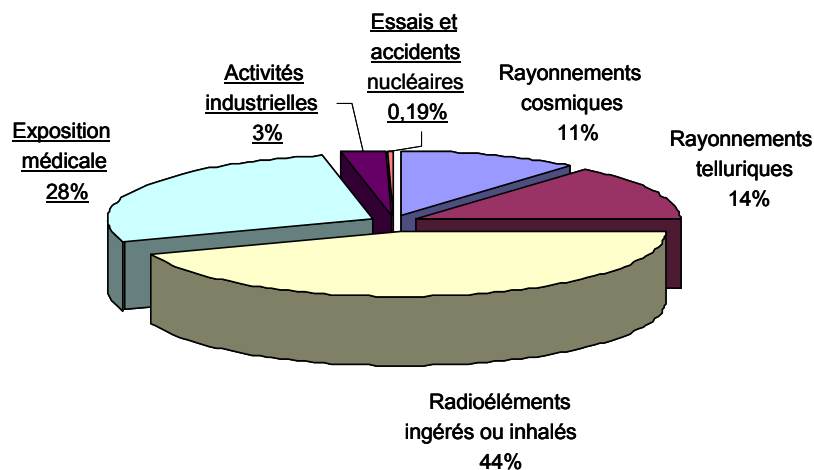


Figure 5. Répartition des différentes origines de la dose moyenne annuelle de rayonnement ionisant reçue par habitant en France, d'après (UNSCEAR, 2000). Les rayonnements soulignés correspondent aux sources d'exposition artificielle.

II. LES EFFETS DU RAYONNEMENT IONISANT

A. A l'échelle de l'organisme entier

Les conséquences que peuvent entraîner les rayonnements ionisants à l'échelle de l'organisme entier sont fonction de la dose équivalente d'irradiation reçue. Une distinction est faite entre faible dose d'irradiation et forte dose d'irradiation.

1. Effet des fortes doses

L'ensemble de ces effets est regroupé sous le terme d'effets déterministes car ils se manifestent toujours, au dessus d'un certain seuil d'exposition. Ce sont donc des effets à seuil, c'est-à-dire qu'en dessous d'une dose dépendant du type d'effet biologique, cet effet ne sera pas observé.

Lorsque l'exposition homogène du corps aux rayonnements ionisants dépasse 500 mSv, la dose est considérée comme forte. Il en résulte la mort d'un très grand nombre de cellules et des troubles pouvant entraîner la mort de l'individu exposé en quelques heures. Ce syndrome d'irradiation aiguë se décompose en plusieurs phases :

- Une première phase, le prodrome, est caractérisée par des vomissements et diarrhées, des nausées et de l'anorexie.

- Au cours de la seconde phase, une disparition ou régression des symptômes est observée. Il s'agit de la phase de latence.

- Puis, les signes cliniques réapparaissent au cours de la troisième phase ou phase critique. Il est possible de distinguer trois syndromes en fonction des symptômes apparaissant lors de cette phase :

- Le syndrome hématopoïétique est observé à partir de 0,5 à 1 Sv. L'un des premiers signes observés est une diminution du nombre de cellules sanguines circulantes. Lorsque les doses d'irradiation sont plus élevées, une disparition de la totalité ou d'une partie des cellules de la moelle osseuse est observée (aplasie ou hypoplasie médullaire).

- Le syndrome gastro-intestinal est observé à partir de 4-5 Sv et s'ajoute au syndrome hématopoïétique. Des troubles intestinaux résultant de la destruction de la muqueuse digestive apparaissent. Les chances de survie dépendent de la dose de rayonnement reçue et du traitement administré.

- Le syndrome neurovasculaire apparaît pour une dose supérieure à 50 Sv et entraîne la mort en 2 à 3 jours. La phase latente est dans ce cas très courte et les symptômes nerveux apparaissent avec une grande gravité conduisant au coma et à la mort. De plus, la destruction des endothéliums vasculaires est à l'origine d'une augmentation de la perméabilité capillaire entraînant une fuite des liquides dans l'espace extracellulaire. Dans le cas de doses massives, les autres syndromes n'ont pas le temps de se développer.

Depuis 1945, d'après l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN), 180 décès consécutifs à un syndrome d'irradiation aiguë ont été répertoriés dans le monde.

Dans le cas d'une irradiation externe localisée, le pronostic vital n'est généralement pas engagé. Les mains, les pieds et les jambes sont les plus souvent touchés, suite à un contact avec une source radioactive. La peau est donc le premier tissu cible et, après une période de latence d'autant plus courte que la dose est élevée, différentes manifestations allant de la dépilation simple et transitoire pour des doses de 4 à 5 Sv, à une nécrose tissulaire pour des doses supérieures à 20-25 Sv, peuvent être observées. Un syndrome cutané grave nécessite des soins dans un service de grands brûlés. Une greffe de peau peut être indiquée et dans les cas extrêmes, une amputation doit parfois être envisagée.

2. Effet des faibles doses

Les faibles doses s'étalent de la gamme du rayonnement naturel (le rayonnement naturel n'est pas inoffensif comme le précise la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) (ICRP, 1991)) jusqu'à des doses de l'ordre de 500 mSv. A l'inverse de l'effet des fortes doses, les conséquences cliniques des faibles doses sont insidieuses car elles s'observent le plus souvent très longtemps après l'exposition (parfois plusieurs dizaines d'années). Ces effets sont aléatoires au sein d'une population : on parle d'effets stochastiques. Contrairement aux effets déterministes, la gravité de ces effets demeure similaire, quelque soit la dose d'irradiation, mais c'est leur probabilité d'apparition qui est fonction de la dose. Les principales caractéristiques des effets stochastiques et déterministes sont regroupées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Principales caractéristiques des effets déterministes et stochastiques.

Effets déterministes	Effets stochastiques
Dose seuil d'apparition	Pas de dose seuil
Obligatoires : ils apparaissent toujours au dessus de la dose seuil d'irradiation	Aléatoires : leur apparition varie d'un individu à l'autre
Manifestation précoce	Phase de latence longue pouvant atteindre plusieurs dizaines d'années
Gravité dépendante de la dose	Gravité indépendante de la dose mais probabilité d'apparition dépendante de la dose.

Trois types d'effets stochastiques peuvent être envisagés. Nous parlerons tout d'abord de l'apparition de cancers radio-induits. La CIPR mentionne que la probabilité d'apparition d'un cancer radio-induit mortel est directement proportionnelle à la dose reçue (ICRP, 1991). Cependant, il est très difficile d'estimer le risque d'apparition d'un cancer lié à l'exposition aux faibles doses de rayonnement ionisant. A l'heure actuelle, les normes de protection contre les faibles doses reposent sur l'extrapolation linéaire des risques quantifiés pour les fortes doses d'exposition. Or la linéarité de la courbe effet/dose est contestée. Les études épidémiologiques sont le plus souvent inexploitable pour les faibles doses. En effet, la taille de l'échantillon étudié est bien souvent largement en deçà du minimum requis pour obtenir suffisamment de précision et de puissance statistique. Comme il est possible de le voir sur la **Figure 6**, la taille minimale de la cohorte nécessaire à l'obtention d'une puissance statistique convenable augmente à mesure que la dose étudiée décroît (Brenner *et al.*, 2003). Les cancers radio-induits, et, de façon générale tous les effets stochastiques posent donc un problème majeur de radioprotection puisqu'il est très difficile d'établir une relation fiable entre l'exposition aux faibles doses et les effets qui en résultent.

L'irradiation d'un sujet peut également provoquer des mutations génétiques affectant sa descendance, dans le cas où les cellules concernées sont les cellules germinales.

Les faibles doses de rayonnements ionisants peuvent de plus, avoir un effet direct sur l'embryon et le fœtus. L'œuf fécondé est très sensible aux radiations avant le neuvième jour. Une exposition durant cette période peut entraîner la perte de l'œuf, qui passe le plus souvent inaperçue. C'est la « loi du tout ou rien » : soit il se produit un avortement précoce, soit la grossesse se poursuit normalement. Pendant la phase de développement de l'embryon, la mort ou la mutation d'une cellule peut entraîner un défaut dans l'organogenèse et être à l'origine de malformations. De plus, le risque de cancer et de leucémie est plus élevé chez les enfants ayant été exposés *in utero* aux rayonnements ionisants.

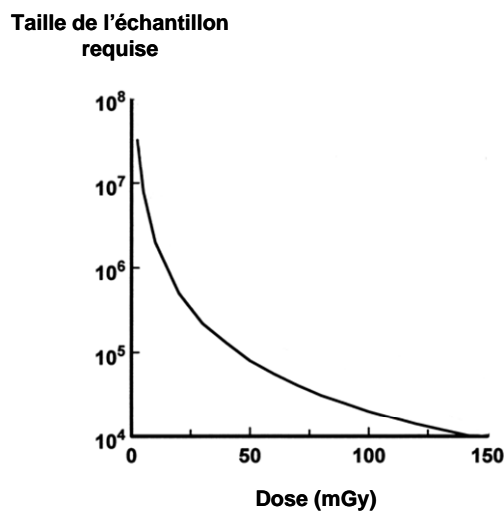


Figure 6. Relation entre la dose de rayonnement ionisant étudiée et la taille de la cohorte nécessaire pour évaluer le risque d'apparition d'un cancer radio-induit, d'après Brenner et al., 2003.

B. A l'échelle moléculaire

Toute molécule biologique est susceptible d'être endommagée par les réactions d'oxydation radio-induites. Il est admis que les rayonnements ionisants peuvent agir selon deux modes principaux: un effet direct et un effet indirect.

1. Effet direct et effet indirect

L'effet du rayonnement ionisant peut résulter d'une interaction directe entre le photon ou la particule incidente et la molécule cible, conduisant à son excitation ou son ionisation. Cet effet direct s'oppose à l'effet indirect au cours duquel l'énergie du rayonnement ionisant est reçue par le solvant. Il en résulte, en quelques nanosecondes, un ensemble de processus de décomposition de la molécule de solvant appelé radiolyse. L'eau est le solvant présent dans les cellules et sa radiolyse joue un rôle majeur en radiobiologie. La radiolyse de l'eau résulte de l'excitation et de l'arrachement d'un électron à la molécule. La cascade d'évènements qui en découle est représentée sur la **Figure 7**. Des espèces ioniques et radicalaires sont générées par ces processus. Parmi ces espèces, les plus agressives sont les radicaux. Ils sont en effet très réactifs et responsables de nombreux processus d'oxydo-réduction. Les radicaux $\cdot\text{H}$ ainsi que l'électron aqueux sont des espèces à fort pouvoir réducteur tandis que les radicaux $\cdot\text{OH}$ possèdent un fort pouvoir oxydant. En ce qui concerne les radiations de faible TLE, comme les rayonnements γ , des mesures de survie cellulaire en

présence de piègeurs de radicaux $\cdot\text{OH}$ ont démontré que l'effet indirect serait majoritaire et serait responsable de 60 à 70 % des effets oxydatifs de ces rayonnements (Chapman *et al.*, 1973; Roots & Okada, 1975).

Les rayonnements ionisants sont donc responsables de l'induction de processus d'oxydation dans les cellules. Il faut cependant garder à l'esprit qu'en raison du métabolisme aérobie de la plupart des organismes, des réactions d'oxydation sont déjà présentes dans les cellules.

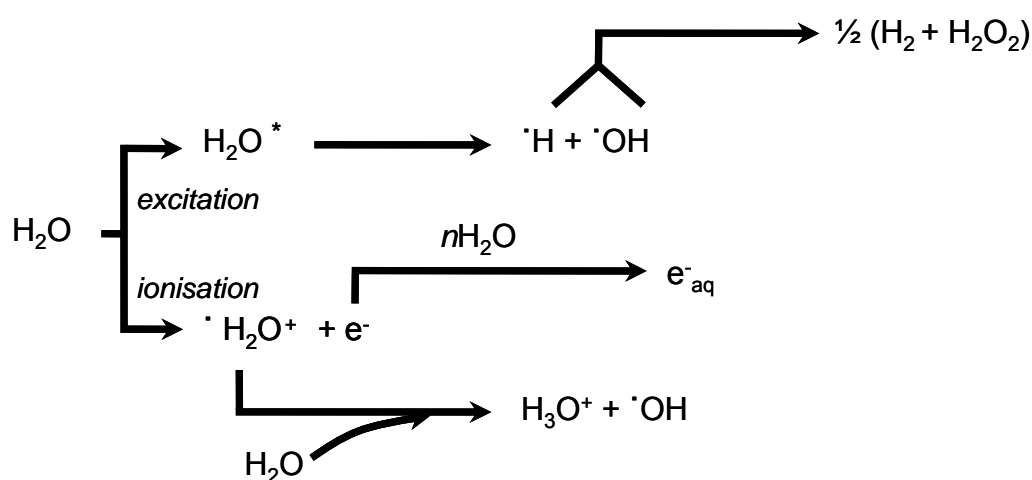


Figure 7. Schéma de la radiolyse de l'eau.

2. Oxydation des lipides et des protéines

Toute molécule biologique est donc une cible potentielle du rayonnement ionisant, notamment par son effet indirect. C'est ainsi le cas des lipides membranaires dont le processus d'oxydation porte le nom de peroxydation lipidique. Parmi les produits issus de la peroxydation lipidique, on trouve principalement des aldéhydes tels que le malondialdéhyde (MDA) ou les hydroxyalkenals dont le 4-hydroxynonanal (4-HNE).

De façon générale, les produits d'oxydation des phospholipides et du cholestérol sont des substances toxiques responsables de dysfonctionnements et d'altérations cellulaires. Ils sont également dotés d'activités de second messenger importantes dans la régulation de fonctions métaboliques, de l'expression de gènes et de la prolifération cellulaire (Delattre *et al.*, 2005). De nombreuses études se sont intéressées aux effets particuliers des produits issus de la peroxydation lipidique, notamment le 4-HNE. Il a ainsi été rapporté que, pour des concentrations de 4-HNE supérieures à 100 μM appliquées aux cellules, les effets engendrés

semblent peu spécifiques et conduisent à une mort cellulaire rapide. Pour des concentrations comprises entre 1 et 20 μM , le 4-HNE inhibe la synthèse de l'ADN et des protéines. Des doses inférieures à 0,1 μM correspondent à des situations physiologiques et les effets observés sont liés à des activités de second messenger conduisant à la modulation de fonctions enzymatiques (Esterbauer *et al.*, 1991).

Nous n'irons pas plus loin dans la description des effets des produits issus de la peroxydation lipidique, l'objectif étant de faire comprendre au lecteur que ces derniers sont complexes et partiellement connus, mais que la toxicité de l'oxydation des lipides est maintenant bien admise.

Les acides aminés et les protéines peuvent également être des cibles des rayonnements ionisants. Les chaînes latérales de tous les acides aminés peuvent être endommagées, toutefois les produits d'oxydation ne sont que partiellement identifiés. Les chaînes latérales des acides aminés soufrés (cystéine, méthionine), des acides aminés basiques (lysine, arginine) et des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) sont les plus sujettes à l'oxydation (Delattre *et al.*, 2005). Des réactions d'oxydation peuvent également toucher la chaîne polypeptidique conduisant à la formation de radicaux centrés sur le carbone en α de la liaison peptidique. Ce radical est formé par l'arrachement de l'atome d'hydrogène sur ce carbone via l'action des radicaux $\cdot\text{OH}$. Deux radicaux ainsi formés peuvent réagir entre eux, générant des liaisons intra ou inter-chaînes. Un radical centré sur le carbone peut également réagir avec une molécule d' O_2 , ce qui conduit à la formation d'un radical peroxy. A partir de ce radical, une série de réactions complexes aboutit à la fragmentation de la chaîne polypeptidique (Stadtman, 1993).

Il ne semble pas exister de système de réparation globale des protéines oxydées. Cependant, certaines protéines oxydées sont prises en charge par des réductases, telles que les thiols réductases. Dans les autres cas, le protéasome, complexe multienzymatique de dégradation protéolytique intervient (Arrigo *et al.*, 1988). Il a ainsi été démontré que des cellules ne possédant pas de protéasome (traitées par des oligonucléotides antisens) perdent leur capacité à dégrader les protéines oxydées (Grune & Davies, 1997). Au fur et à mesure des recherches, il a été montré que ce même complexe intervient dans l'élimination des protéines nouvellement synthétisées mais non fonctionnelles (Schubert *et al.*, 2000) ainsi qu'au niveau de plusieurs fonctions cellulaires : contrôle de la réponse inflammatoire (Chen *et al.*, 1995b), hydrolyse de protéines intracellulaires en petits peptides servant d'antigènes apprêtés à la surface des cellules (Goldberg & Rock, 1992; Goldberg *et al.*, 2002; Rock *et al.*, 2002)...

3. Dommmages à l'ADN

L'ADN est le support de l'information génétique des cellules. Il est donc important que son intégrité soit préservée tout au long de la vie de la cellule. Pourtant, la molécule d'ADN peut être altérée, notamment par le biais de processus d'oxydation. Les radicaux $\cdot\text{OH}$ issus de la radiolyse de l'eau sont en effet capables de réagir avec les bases et le groupement 2-désoxyribose (dR) de l'ADN. Il en résulte un certain nombre de modifications de la structure de la double hélice d'ADN qui peuvent être classées en 4 grands types :

- Les modifications du dR,
- Les modifications des bases,
- Les pontages entre l'ADN et les protéines,
- Les adduits exocycliques entre les bases de l'ADN et des aldéhydes réactifs.

a) Les produits de modification du 2-désoxyribose

L'oxydation du dR procède par arrachement d'un de ses 7 atomes d'hydrogène, par les radicaux $\cdot\text{OH}$ par exemple. Bien que la majorité de ces radicaux attaque les doubles liaisons des bases, il est estimé que jusqu'à 20 % des $\cdot\text{OH}$ réagissent sur le dR (Scholes *et al.*, 1969). Il a également été postulé que les radicaux issus des bases attaquées par $\cdot\text{OH}$ arrachent les hydrogènes du dR (Lemaire *et al.*, 1984). Statistiquement, tous les hydrogènes ne sont pas égaux face aux oxydations. En effet, de part leur plus grande accessibilité au solvant, dans la conformation B de la double hélice d'ADN, les hydrogènes des positions 5 et 4 sont préférentiellement arrachés (Balasubramanian *et al.*, 1998; Miaskiewicz & Osman, 1994). De nombreux efforts ont été effectués pour caractériser les mécanismes mis en jeu ainsi que les produits d'oxydation des différentes positions du dR. L'utilisation de drogues à action radiomimétique ou de nucléases artificielles, plus ou moins spécifiques pour une ou plusieurs positions du dR, a notamment contribué à l'identification de nombreux produits. Ainsi, l'oxydation radio-induite du dR génère des dérivés carbonylés, quelque soit la position concernée. De façon générale, l'arrachement d'un atome d'hydrogène conduit à la formation d'un radical centré sur le carbone attaqué. En présence d' O_2 , ce radical évolue vers un peroxyde puis un hydroperoxyde qui va subir différentes réactions pour donner lieu à différents produits de fragmentation. L' O_2 n'est pas toujours indispensable aux réactions et en son absence, le radical évolue différemment, souvent via une attaque par l'eau

pour former transitoirement un alcool. Différents modèles ont ainsi été présentés pour expliquer les mécanismes d'oxydation du dR. La **Figure 8** représente les produits de dégradation issus de l'oxydation du dR en position 4 d'après différents auteurs (Beesk *et al.*, 1979; Dizdaroglu *et al.*, 1975; Isildar *et al.*, 1981; Stelter *et al.*, 1974; von Sonntag, 1987).

La formation des produits de dégradation du dR s'accompagne d'une rupture de la chaîne d'ADN lorsque l'oxydation concerne les positions 3, 4, 5 et dans une moindre mesure 2. Dans des cellules de mammifères exposées à un rayonnement ionisant de faible TLE, le nombre de cassures simple brin (CSB) est estimé à 1000/Gy (Goodhead, 1994) mais elles sont peu létales car facilement réparées. Les cassures double brin (CDB) sont en revanche plus délétères. Il a en effet été rapporté que la formation d'une seule CDB dans des cellules de levure était un évènement léthal (Frankenberg-Schwager & Frankenberg, 1990). Elles correspondent à la formation de deux ruptures simples sur les brins opposés de l'ADN, espacées de moins d'une quinzaine de paires de bases. Il s'en forme 40/Gy de rayonnement de faible TLE dans des cellules de mammifères. Elles sont peu nombreuses au niveau basal et constituent une des signatures moléculaires de l'exposition de cellules aux rayonnements ionisants. Il existe une relation entre l'efficacité de réparation des CDB, qui peut être relativement longue, et la radiosensibilité des cellules (Radford, 1986).

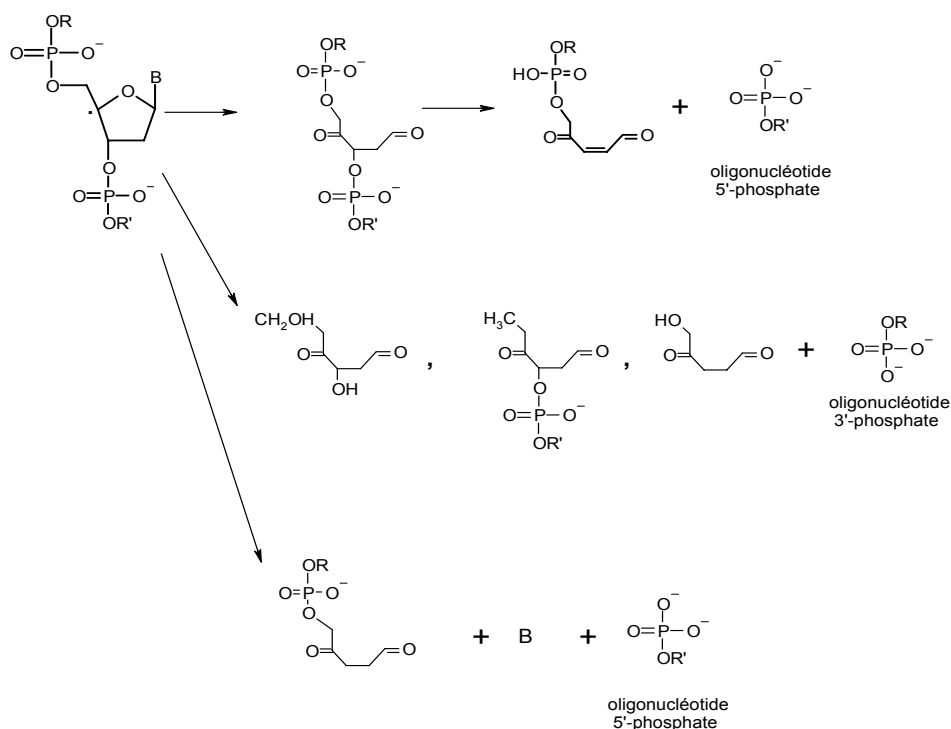


Figure 8. Produits de dégradation du dR obtenus par oxydation en position 4 en absence d'O₂, d'après Beesk *et al.*, 1979; Dizdaroglu *et al.*, 1975; Isildar *et al.*, 1981; Stelter *et al.*, 1974; von Sonntag, 1987. B représente une des 4 bases azotées de l'ADN.

Les sites abasiques résultent de l'arrachement d'un atome d'hydrogène en position 1 du dR. Il s'agit dans ce cas de sites abasiques oxydés correspondant à la 2'-désoxyribonolactone (Kotera *et al.*, 2000; Roupioz *et al.*, 2002). Cette lésion, dont la structure est présentée en **Figure 9**, est chimiquement très instable, même dans des conditions de neutralité de pH (Roupioz *et al.*, 2002). *In vitro*, des expériences réalisées en présence de 2'-désoxyribonolactone et de diverses enzymes de réparation ont permis de mettre en évidence la formation de pontages covalents entre cette lésion et l'endonucléase III (Endo III), l'endonucléase VIII, la formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) de *E.coli* ainsi que NEIL 1 (une ADN glycosylase de mammifères) et l'ADN polymérase β humaine (Barker *et al.*, 2005).

La 2'-désoxyribonolactone ne doit pas être confondue avec les sites abasiques non oxydés formés lors de l'excision des bases oxydées au cours des processus de réparation enzymatique, ou formés par hydrolyse de bases normales ou modifiées. La rupture de la liaison *N*-glycosidique affecte plus les purines que les pyrimidines, à l'état basal dans les cellules (Lindahl, 1993). Le nombre de bases purines ainsi hydrolysées chaque jour dans une cellule humaine est estimé entre 2000 et 10000. Mais les sites abasiques ainsi générés sont rapidement et efficacement réparés.

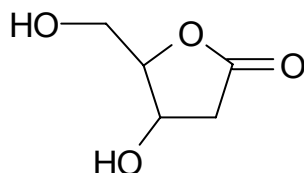


Figure 9. Structure de la 2'-désoxyribonolactone.

b) Les modifications des bases

Les produits d'oxydation des 4 bases des nucléosides de l'ADN (structures présentées en **Figure 10**) suscitent également depuis de nombreuses années l'intérêt des chercheurs, c'est pourquoi les connaissances à ce sujet sont très importantes. Les travaux sur des composés modèles tels que des nucléosides isolés exposés à des conditions de stress oxydant (rayonnement ionisant par exemple) ont en effet permis d'identifier et de caractériser environ 70 dommages des bases, diastéréoisomères compris. On peut toutefois

noter que seulement 8 de ces bases modifiées ont été correctement détectées dans l'ADN cellulaire (Cadet *et al.*, 2002).

Les 4 diastéréoisomères des diols de thymine sont les principales lésions de l'ADN formées après irradiation γ de cellules. Ils résultent de la réaction des radicaux $\cdot\text{OH}$ en position 5 ou 6 de la base thymine conduisant à la formation d'un radical centré en position 6 ou 5 (**Figure 11**). Il s'en suit une attaque rapide d'une molécule d' O_2 aboutissant à la formation d'un radical peroxyde qui peut évoluer vers les diols de thymine. Une autre possibilité est la formation d'un hydroperoxyde qui par réduction, conduit aux diols de thymine. Il existe de nombreux autres produits d'oxydation de la thymine qui ont été identifiés et caractérisés à partir du nucléoside isolé.

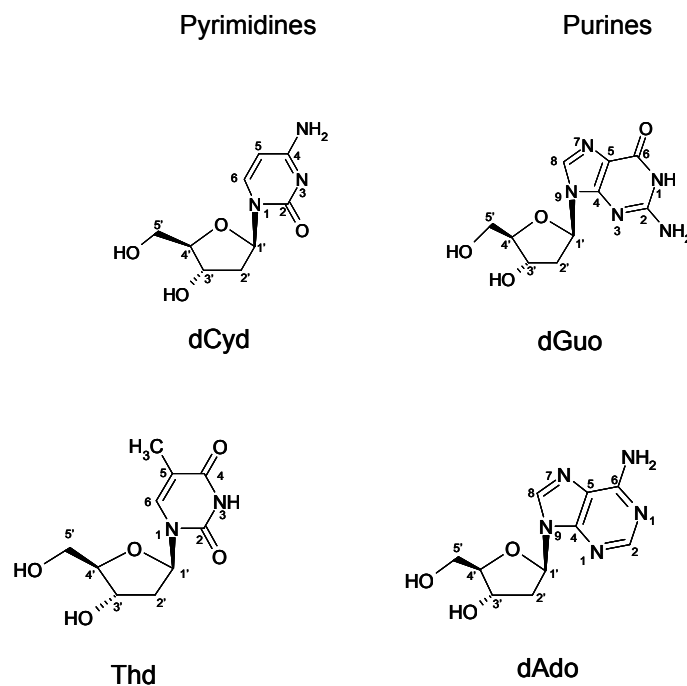


Figure 10. Structure des 4 nucléosides normaux constituant l'ADN.

Lorsque la thymine est présente au sein d'un ADN double brin, les diols de thymine, la 5-hydroxy-5-méthylhydantoïne (Teoule *et al.*, 1977), la 5-(hydroxyméthyl)-2'-désoxyuridine (HmdUrd) (Teebor *et al.*, 1987) et la 5-formyl-2'-désoxyuridine (FordUrd) (Kasai *et al.*, 1990) ont été détectés. Dans l'ADN cellulaire, la présence des diols de thymine, de l'HmdUrd et de la FordUrd (Cadet *et al.*, 2004) a été mise en évidence.

La chimie d'oxydation de la cytosine présente des similitudes avec celle de la thymine. Les produits majoritaires issus de l'oxydation de cette base pyrimidine sont la 5-hydroxyhydanthoïne, les diols d'uracile et la 5-hydroxycytosine (**Figure 12**).

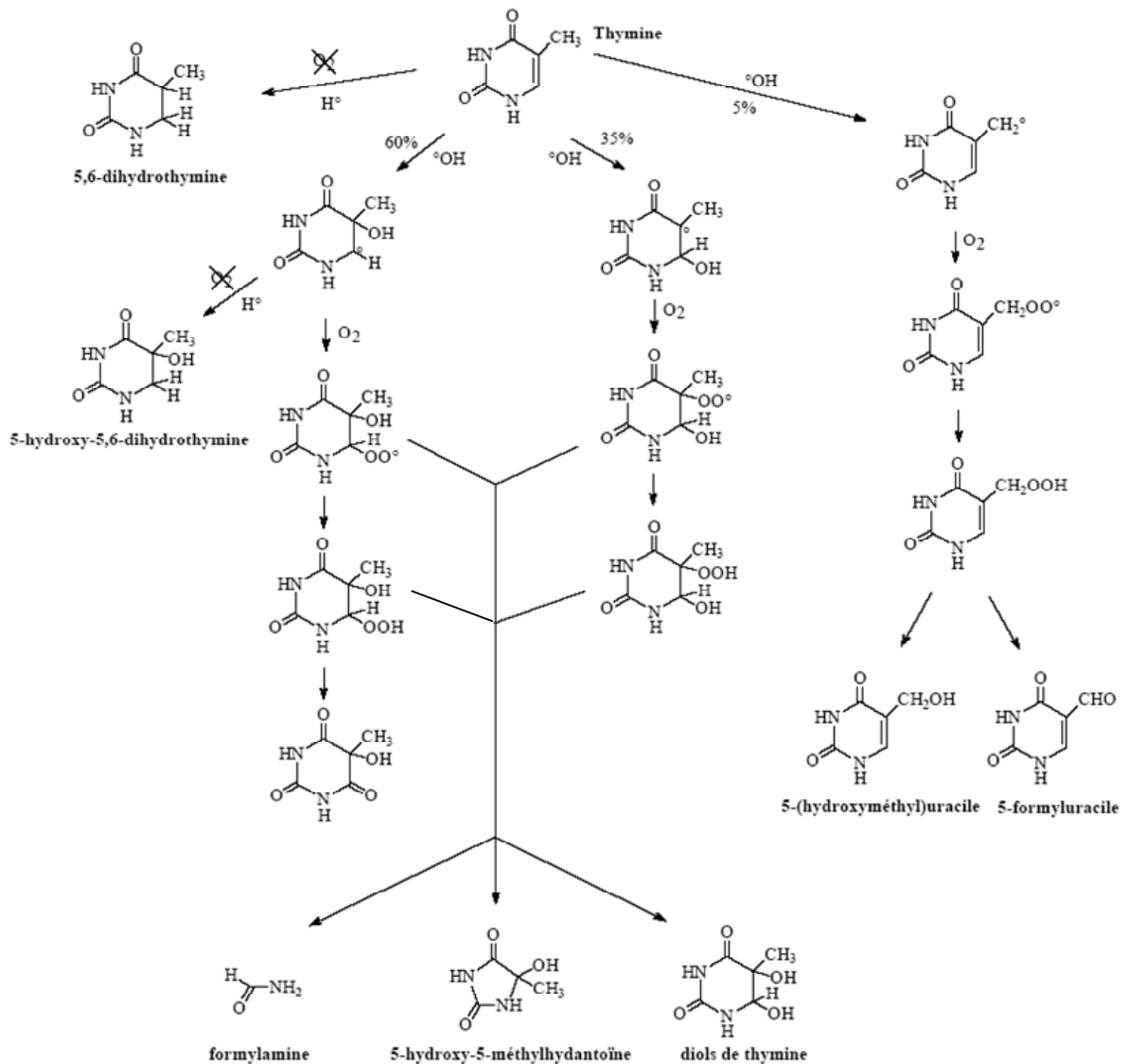


Figure 11. Produits d'oxydation générés par réaction du radical $^{\circ}\text{OH}$ sur la base thymine (d'après Cadet et al., 1997).

La 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxo-Gua) est une des lésions les plus étudiées. Il s'agit d'un produit d'oxydation de la guanine formé après addition d'un radical $^{\circ}\text{OH}$ en position 8 de la base, ce qui conduit à la formation d'un radical 8-hydroxyl-7,8-dihydroguanyl (**Figure 13**). Ce radical peut évoluer vers la 8-oxo-Gua en conditions oxydantes, ou vers la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua) en conditions réductrices. Les principaux produits d'oxydation du nucléoside isolé dGuo exposé aux radicaux $^{\circ}\text{OH}$ en

solution aqueuse aérée sont l'oxazolone et son précurseur l'imidazolone, issus de l'attaque du radical $\cdot\text{OH}$ en position 4 de la base. Toutefois, dans l'ADN, la réaction des radicaux $\cdot\text{OH}$ sur la dGuo donne lieu à la formation d'environ 50 % de 8-oxo-dGuo et 20 % de FapydGuo (Cadet *et al.*, 1999).

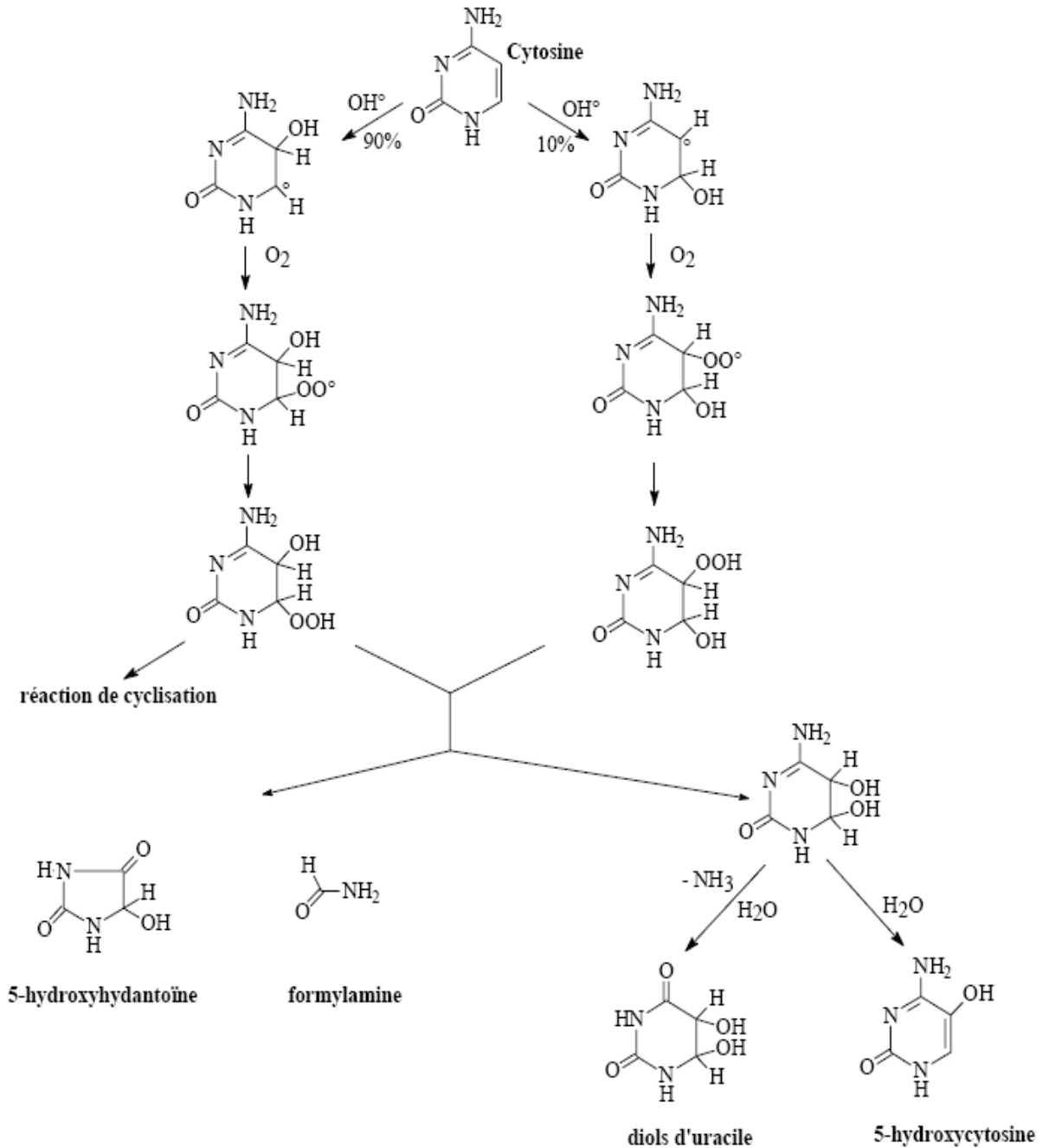


Figure 12. Produits d'oxydation générés par réaction du radical $\cdot\text{OH}$ sur la base cytosine (d'après Cadet *et al.*, 1997).

La 8-oxo-Gua est considérée comme un marqueur ubiquitaire de stress oxydant car elle est produite non seulement par l'action des radicaux $\cdot\text{OH}$ sur l'ADN, mais aussi par

l'action de l' $^1\text{O}_2$ (Cadet *et al.*, 1994; Floyd *et al.*, 1989; Ravanat *et al.*, 2000a; Sies & Menck, 1992), du peroxyxynitrite (Douki & Cadet, 1996) et d'oxydants à un électron (Kasai *et al.*, 1992).

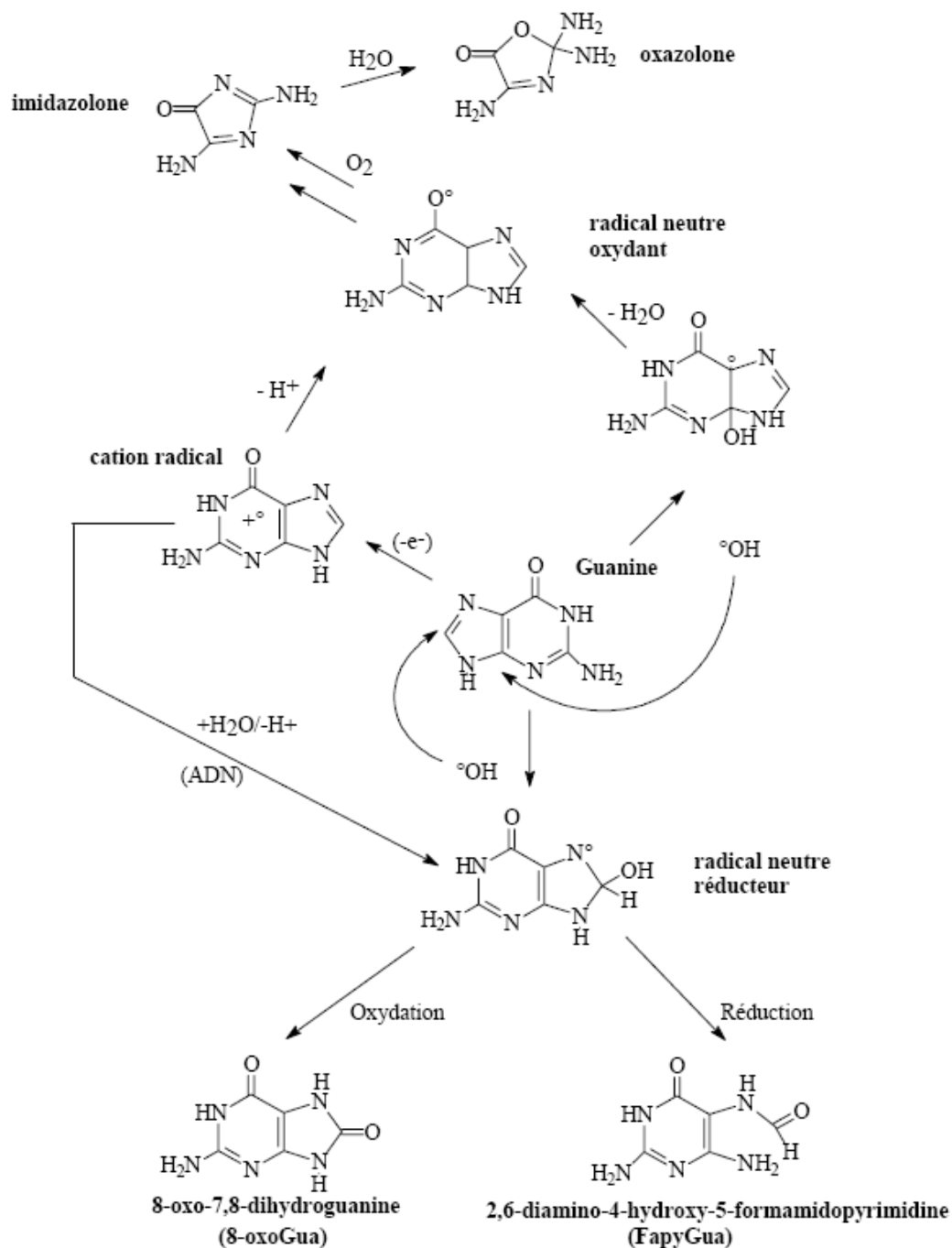


Figure 13. Produits d'oxydation générés par réaction du radical $^{\circ}\text{OH}$ sur la base guanine (d'après Cadet *et al.*, 1997).

L'oxydation radicalaire de l'adénine suit un schéma similaire à celui de la guanine, comme il est possible de le voir sur la **Figure 14**, conduisant majoritairement à la formation de 8-oxo-7,8-dihydro-8-oxo-adénine (8-oxo-Ade) et également de 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapyAde). Les produits issus de l'addition du radical $\cdot\text{OH}$ en position 4 ne sont pas caractérisés. La 8-oxo-Ade ainsi que la FapyAde sont détectables au niveau cellulaire.

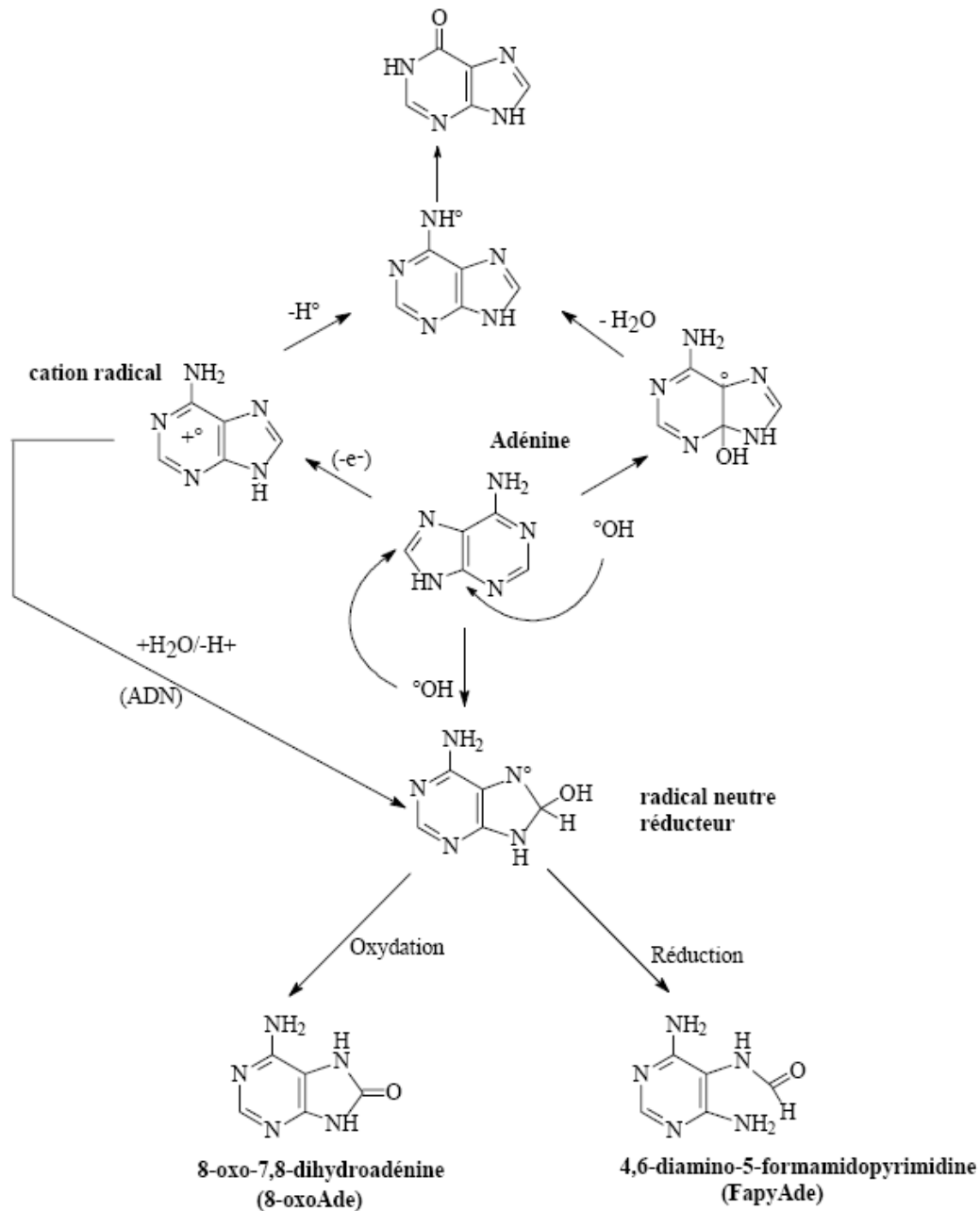


Figure 14. Produits d'oxydation générés par réaction du radical $\cdot\text{OH}$ sur la base adénine (d'après Cadet et al., 1997).

Ainsi, 8 dommages des bases ont été quantifiés dans l'ADN cellulaire, suite à une exposition aux rayonnements ionisants ; ils sont rapportés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3. Principales lésions formées dans l'ADN de cellules monocytaires humaines THP1 exposées à une irradiation γ (d'après (Pouget et al., 2002)).

Lésions	Rendement de formation (lésions/10 ⁹ bases/Gy)
Diols de Thd	97
FapydGuo	39
5-HmdUrd	29
5-FordUrd	22
8-oxo-dGuo	20
FapydAdo	5
8-oxo-dAdo	3
5-OH-dUrd	<0,2

c) Les pontages ADN-protéines

Le rayonnement ionisant peut aussi avoir pour effet de générer des adduits covalents entre l'ADN et les protéines environnantes. Il se forme environ 150 pontages ADN-protéines par cellule et par Gy de rayonnement de faible TLE (Goodhead, 1994). Ce type de lésions est formé en nombre plus important que les cassures double brin (40/Gy/cellule). Dans le cas des radiations ionisantes, les pontages identifiés sont des pontages directs entre ADN et protéines. Ainsi, plusieurs pontages entre la thymine et des acides aminés ont été identifiés, en conditions désaérées (Dizdaroglu, 1984; Dizdaroglu & Simic, 1985). Il a également été démontré que la suroxydation de la 8-oxo-dGuo peut engendrer un pontage spécifique entre la 8-oxo-dGuo et la lysine 142 de la protéine de réparation des dommages de l'ADN, Mut Y (Hickerson *et al.*, 1999). La caractérisation de ces adduits entre ADN et protéines est parfois difficile en raison de leur instabilité.

Il a été proposé que, dans les cellules, les histones soient impliquées dans la formation des pontages radio-induits entre l'ADN et les protéines. Toutefois, des résultats contradictoires ont été obtenus : certains permettent effectivement de conclure que les

histones sont les principales protéines impliquées dans ces pontages alors que d'autres travaux font apparaître que les pontages ADN-protéines font intervenir des protéines non histones. Ces données, apparemment divergentes, pourraient s'expliquer par l'utilisation de techniques d'extraction différentes (Barker *et al.*, 2005). D'autres protéines ayant été identifiées comme appartenant à des complexes covalents ADN-protéines sont les protéines de la réplication et de la réparation de l'ADN et les protéines de la matrice nucléaire telles que l'actine ou la vimentine.

Force est de constater que malgré l'intérêt croissant suscité par l'étude des pontages ADN-protéines, de nombreuses zones d'ombre persistent, notamment en ce qui concerne la nature des protéines impliquées ainsi que l'importance biologique de ces dommages qui sont plus importants, en nombre, que les CDB dans des cellules exposées à des rayonnements ionisants de faible TLE.

d) Les adduits bases-aldéhydes

Les derniers dommages que nous évoquons dans cette présentation non exhaustive sont les adduits exocycliques formés entre les bases de l'ADN et des dérivés aldéhydiques très réactifs. Ce dernier type de dommages a suscité un intérêt croissant ces dernières années. Les aldéhydes capables de réagir avec l'ADN peuvent être des produits issus de la peroxydation lipidique, tels que l'acroléine, le crotonaldéhyde, le 4-HNE, le malondialdéhyde (MDA) *etc* ou des produits de modification du dR. Différents types d'adduits ont été identifiés, caractérisés et dosés dans l'ADN humain en fonction de l'aldéhyde qui attaque l'ADN (Chung *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2000; De Bont & van Larebeke, 2004; Nair *et al.*, 1997; Nair *et al.*, 1999; Pan & Chung, 2002).

Le MDA réagit avec l'ADN pour former un adduit pyrimidopurine de la dGuo, le M1dGuo. Il a été démontré que les bases portant un fragment propenal, issues de l'oxydation du 2-désoxyribose en position 4 sont des sources d'adduit M1dGuo plus importantes que le MDA, probablement en raison de la proximité de ces propenals avec l'ADN (Dedon *et al.*, 1998). Ceci souligne l'importance des produits d'oxydation du 2'-désoxyribose, surtout lorsqu'il s'agit de composés aussi réactifs que des aldéhydes. Il a ainsi été démontré que le butènedialdéhyde, issu de l'oxydation du dR en position 5 (Chen *et al.*, 2004), peut réagir avec la dCyd, et dans une moindre mesure la dGuo et la dAdo, pour former des adduits (Bohnert *et al.*, 2004; Gingipalli & Dedon, 2001).

Les lésions de l'ADN que peut provoquer un rayonnement ionisant sont donc nombreuses et diverses. Toutefois, la cellule dispose d'un certain nombre de systèmes pour faire face à un ADN endommagé.

III. LA REPOSE DE LA CELLULE FACE AUX DOMMAGES DE L'ADN

Face à un ADN lésé, la cellule peut adopter plusieurs comportements.

A. L'arrêt du cycle cellulaire

La vie d'une cellule est organisée en un cycle constitué de 4 grandes phases, représenté en **Figure 15**. Avant l'entrée en cycle, la cellule quiescente est en phase G0. Durant la première phase du cycle cellulaire, la phase G1, la cellule synthétise des protéines et croît jusqu'à atteindre une taille suffisante lui permettant de rentrer dans la phase S au cours de laquelle l'ADN est répliqué. Puis, pendant la phase G2, la cellule contrôle la réplication de son ADN (réparation post-réplivative) avant d'entrer dans la phase M au cours de laquelle se produit la mitose ou division cellulaire. A l'issue de la mitose, les 2 cellules filles retournent en phase G1 ou quittent le cycle pour entrer en phase de latence (G0). La durée du cycle est fonction du type cellulaire ; la plupart des cellules de mammifères ont un cycle d'une durée de 10 à 30 heures.

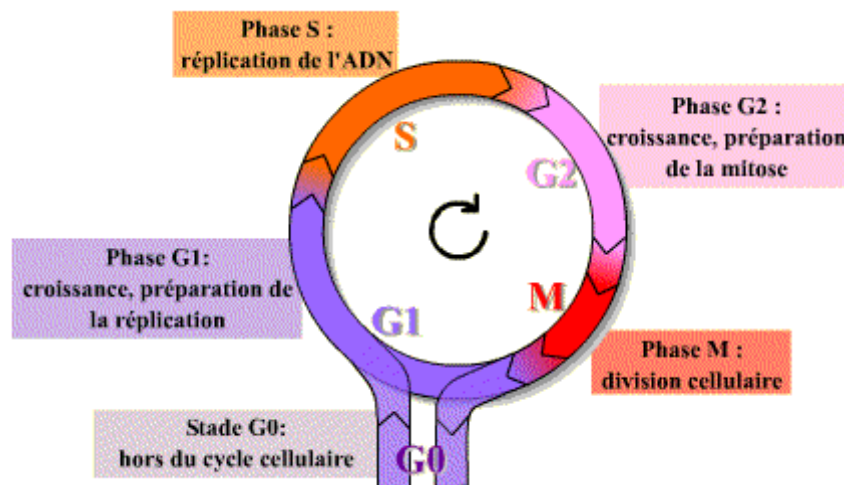


Figure 15. Cycle cellulaire.

Lorsque l'ADN est endommagé, la cellule s'arrête en phase G1, G2 ou S du cycle pour tenter de réparer les sites lésés ou s'engager vers un processus apoptotique si les dommages sont trop sévères. L'évènement initiateur de ce processus d'arrêt du cycle cellulaire est la reconnaissance du dommage. Cette étape n'est pas totalement connue mais les protéines impliquées dans la reconnaissance de l'ADN lésé pourraient, entre autres, inclure le complexe Rad1-Rad9-Hus1, Rad17, des protéines kinase dépendantes de l'ADN (DNA-PK), la protéine ATM qui est mutée dans l'ataxie télangiectasie...(Post *et al.*, 2001; Roos-Mattjus *et al.*, 2003; Weiss *et al.*, 2002). Cette maladie neuro-dégénérative se manifeste dès la petite enfance. En plus des troubles neuro-dégénératifs, elle se caractérise par d'autres symptômes dont une radiosensibilité accrue et une prédisposition pour certains cancers (pour revue McKinnon, 2004). Les cellules déficientes pour la protéine ATM ne réalisent pas les arrêts en phases G1 et S après une exposition aux radiations ionisantes (Barlow *et al.*, 1996; Barlow *et al.*, 1997; Westphal *et al.*, 1997).

Après la reconnaissance du dommage, une cascade d'évènements moléculaires se produit pour conduire à l'arrêt du cycle cellulaire, qui est donc un évènement actif. De nombreux senseurs peuvent intervenir au cours des voies de transduction du signal conduisant à un arrêt du cycle cellulaire. Le choix de ces senseurs semble être fonction du type de dommage présent dans l'ADN. La compréhension des mécanismes de transduction permettant à une cellule de retarder sa progression dans le cycle cellulaire évolue rapidement. Ainsi, une cascade d'évènements responsables de l'arrêt en phase G1 a été décrite (Bartek & Lukas, 2001). Afin de permettre au lecteur d'évaluer la complexité des mécanismes intervenant dans l'arrêt du cycle, nous détaillerons ici l'exemple de cette voie de transduction (**Figure 16**). L'évènement initial, la reconnaissance du dommage se fait soit par l'intermédiaire de la protéine ATM, dans le cas de dommages induits par les radiations ionisantes, soit par l'intermédiaire de la protéine ATR dans le cas de dommages induits par les rayonnements UV. Ces protéines activent respectivement les kinases Chk2 et Chk1 qui sont responsables de la phosphorylation de la protéine Cdc25A. La phosphorylation de cette phosphatase est un signal pour son ubiquitinylation, ce qui entraîne sa reconnaissance puis sa destruction par le protéasome. L'absence d'activité phosphatase de Cdc25A maintient la protéine Cdk2 sous sa forme inactive phosphorylée. Or Cdk2 a besoin d'être activée pour permettre le recrutement de la protéine Cdc45, elle-même responsable du recrutement des ADN polymérase de la réplication. Dans le cas contraire, la réplication de l'ADN ne peut pas avoir lieu et la cellule n'entre donc pas en phase S.

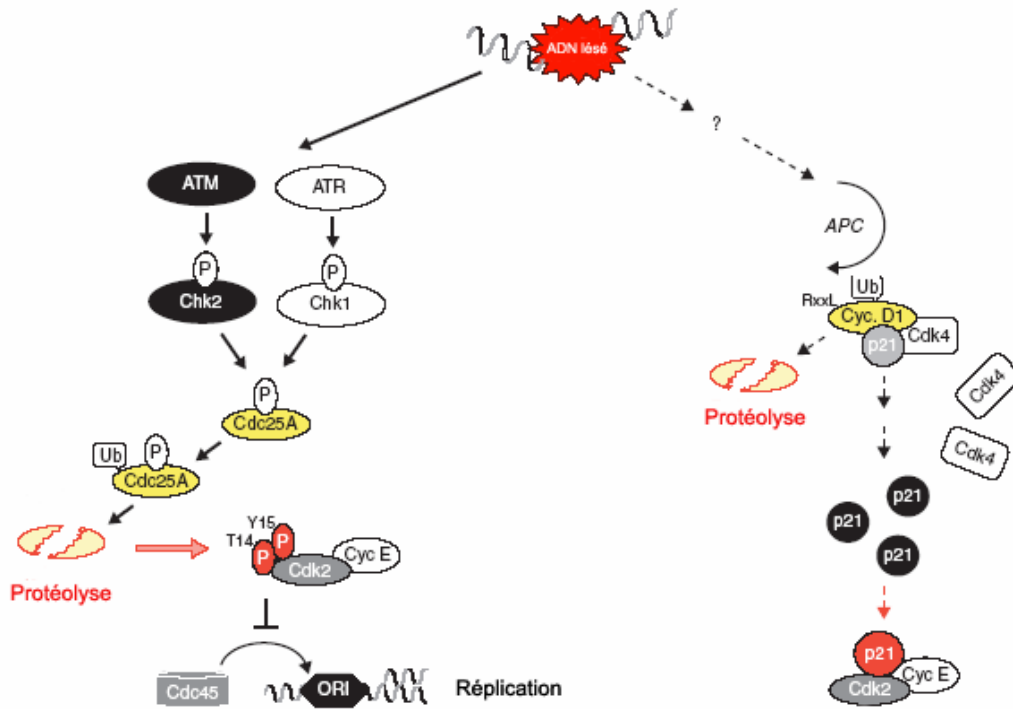


Figure 16. Une voie de transduction menant à l'arrêt d'une cellule en phase G1 du cycle cellulaire (Bartek & Lukas, 2001).

Dans certaines cellules, un autre mécanisme pourrait médier l'arrêt en phase G1. Cette autre voie ferait intervenir la protéine APC et entraînerait également l'inactivation de Cdc45. Les étapes initiales de cette voie, et notamment les protéines impliquées dans la reconnaissance du dommage, ne sont pas identifiées (Bartek & Lukas, 2001).

Il s'agit d'un exemple de cascades de signalisation permettant l'arrêt du cycle cellulaire. Chaque phase dans laquelle s'arrête la cellule fait intervenir des événements moléculaires différents et dans certains cas, un arrêt dans une même phase du cycle peut être médié par des événements différents. L'arrêt du cycle permet à la cellule de réparer les lésions de son ADN ou bien de s'engager vers une des voies de mort cellulaire.

B. Les systèmes de réparation des dommages de l'ADN

Lorsque l'ADN est endommagé, la cellule peut choisir de le réparer. Pour cela, il existe différents mécanismes ayant pour objectif l'élimination des lésions et la restauration de l'intégrité de l'ADN : la réparation par réversion directe, la recombinaison homologue ou non, la réparation des mésappariements, la réparation par excision de bases (REB), la

réparation par excision de nucléotides (REN). Le choix du système de réparation est généralement fonction du substrat, c'est-à-dire du type de dommage de l'ADN bien que, comme nous le verrons, certains dommages puissent être pris en charge par plusieurs systèmes de réparation. Tous ces mécanismes sont présents chez les procaryotes et les eucaryotes bien qu'ils soient souvent beaucoup mieux décrits chez les bactéries.

1. La réparation par réversion directe

Ce type de réparation ne concerne qu'un nombre limité de lésions. Il s'agit, pour une enzyme donnée, de directement restaurer la base d'origine à partir d'une lésion. Les enzymes connues capables d'agir de la sorte sont la photolyase permettant de réparer les dimères cyclobutane de pyrimidines induits par les rayonnements UVB (pour revue Sancar, 1994b) et la photolyase (6-4) capable de réverser les photoproduits pyrimidine(6-4)pyrimidone (Todo *et al.*, 1993). Dans les cellules humaines, aucune activité photolyase n'est détectée, ces dommages étant vraisemblablement uniquement pris en charge par la REN (Li *et al.*, 1993). On peut également citer les alkyltransférases qui sont capables de réverser plusieurs dommages alkylés de l'ADN. Ces enzymes ont un comportement suicidaire : après la réversion du dommage, le groupement alkyle reste lié à l'enzyme ce qui l'inactive (Lindahl *et al.*, 1982).

2. La recombinaison homologue

La recombinaison homologue est un processus permettant de réparer des cassures simple et double brin. De nombreuses protéines sont impliquées. Pour réparer les CSB et les CDB, une chromatide issue du chromosome homologue est utilisée comme matrice afin de synthétiser l'ADN manquant. Dans le cas de la réparation des CDB, ce mécanisme s'accompagne souvent d'un *crossing-over* c'est-à-dire d'un échange de chromatides sœurs entre les 2 chromosomes homologues.

3. La suture non homologue des cassures (NHEJ pour *Non Homologous End Joining*)

Dans certains cas, la réparation des CDB peut se faire sans utilisation du chromosome homologue. C'est le système NHEJ qui intervient. Les deux extrémités cassées sont directement religaturées, avec une possibilité de perte de matériel génétique. Un

rôle important est joué dans ce système par les protéines Ku (dans les cellules de mammifères), comme le montre la **Figure 17**. L'hétérodimère Ku70/80 est en effet une des sous-unités de la protéine kinase ADN-dépendante (DNA-PK) qui catalyse le recrutement des autres composantes du système NHEJ. Puis, l'étape de ligation est effectuée par un hétérodimère constitué de la ligase IV et de Xrcc4 (Belli *et al.*, 2002).

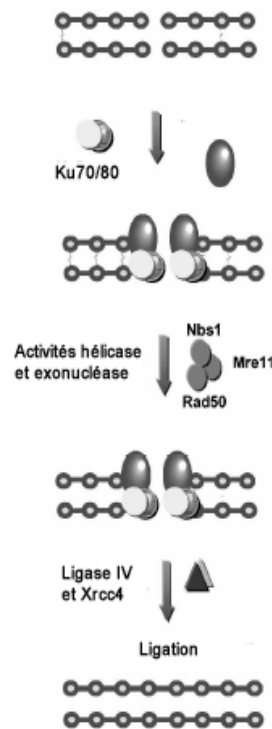


Figure 17. Réparation des CDB par le système NHEJ dans des cellules de mammifères (d'après Belli *et al.*, 2002).

4. La réparation des mésappariements

Ce système permet de corriger les mésappariements d'un seul nucléotide ainsi que les petites boucles (jusqu'à quatre nucléotides mésappariés). Ce système de réparation implique la reconnaissance d'un appariement n'obéissant pas aux règles de complémentarité définies par Watson et Crick, dû à l'incorporation d'une base erronée durant la réplication. Il procède par excision d'un long fragment d'ADN (de 100 à 1000 nucléotides) contenant la base à l'origine du mésappariement puis par resynthèse d'un autre fragment d'ADN. Ce système multienzymatique est très bien connu chez *E.coli* et fait intervenir plusieurs protéines que sont MutH, MutL, MutS, l'ADN-hélicaseII, la protéine SSB (pour *single-strand DNA binding protein*), l'ADN pol III, l'exonucléase I et une ADN ligase,

comme le montre la **Figure 18**. Un point important pour ce système de réparation réside dans l'identification du brin contenant la base erronée, puisque dans les 2 cas, il s'agit de bases normales. Chez *E.coli*, l'absence de méthylation de l'adénine au niveau des séquences GATC permet aux enzymes d'identifier le brin néo-synthétisé porteur de la base erronée.

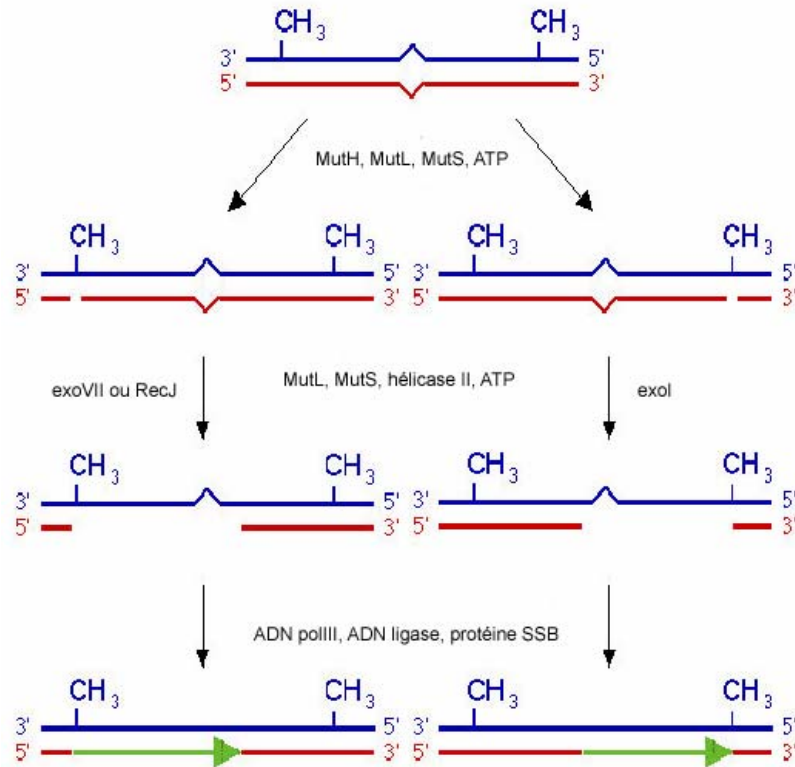


Figure 18. Réparation des mésappariements chez *E.coli*.

De même, un système de réparation des mésappariements faisant intervenir des protéines, pour certaines, homologues à celles de *E.coli*, a été mis en évidence chez l'Homme. Les premières étapes, qui sont bien connues, sont présentées dans la **Figure 19**. Les protéines homologues de MutS de *E.coli* reconnaissent la lésion dans l'ADN (Dantzer & de Murcia, 1998): ainsi, l'hétérodimère hMSH2/GTBP détecte la présence d'un mésappariement d'un nucléotide ou d'une boucle de 1-2 nucléotides alors que l'hétérodimère hMSH2/hMSH3 reconnaît une boucle de plus de 2 nucléotides. Il a été proposé que le signal permettant de distinguer le brin néo-synthétisé soit la méthylation des cytosines au niveau des îlots CpG (Hare & Taylor, 1985). Mais ce modèle a été remis en question (Drummond & Bellacosa, 2001) et le débat sur la nature de ce signal reste ouvert. Après la reconnaissance du dommage, le complexe ADN/hMutS est reconnu à son tour par un autre hétérodimère composé de

protéines homologues de MutL de *E.coli*: hMLH1/hPMS2. L'élimination du brin incorrect est effectuée par une exonucléase qui peut être la DNase IV/FEN1 préalablement à une étape de resynthèse/ligation. De plus, il semble que le *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) et l'ADN polymérase δ interviennent dans l'étape de resynthèse. L'importance du système de réparation des mésappariements est clairement démontrée chez l'Homme pour éviter l'apparition de mutations conduisant à la transformation des cellules. En effet, les gènes hMSH2 et hMLH1 mutés sont responsables du syndrome HNPCC (pour *hereditary non polyposis colon cancer*) caractérisé par un risque élevé de développer des tumeurs du colon.

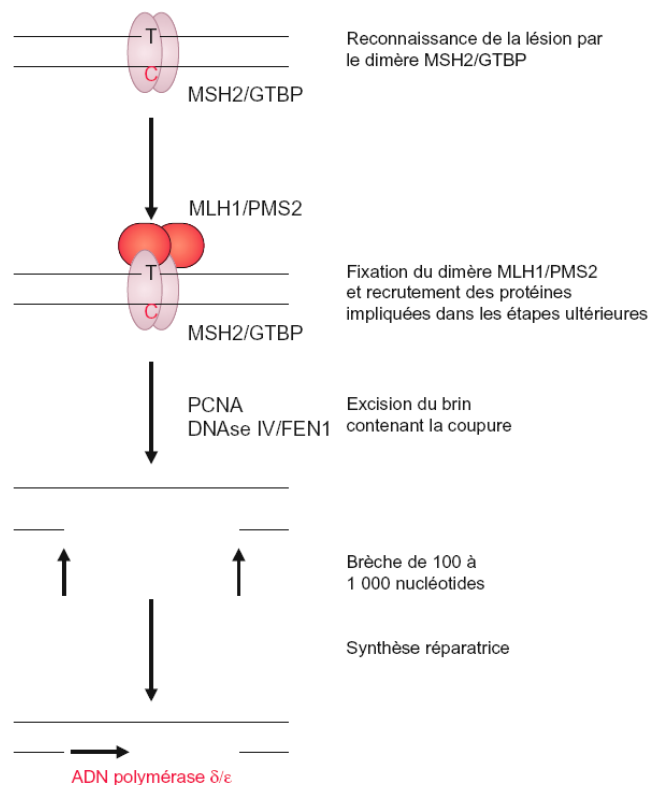


Figure 19. Réparation des mésappariements chez l'Homme (d'après Dantzer & de Murcia, 1998).

5. La réparation par excision de bases (REB)

La REB est également un processus multi-enzymatique. L'idée classiquement admise est que cette réparation est associée aux dommages n'entraînant pas de modifications importantes dans la conformation de la double hélice d'ADN. Elle concerne ainsi les bases oxydées, alkylées, fragmentées et les sites abasiques (Wallace, 1994; Wallace, 1998). Ce système peut être décrit en quatre étapes. La première étape est la reconnaissance et

l'élimination du dommage par une enzyme spécifique de ce dommage. Cette enzyme est une ADN *N*-glycosylase capable d'éliminer la base modifiée. Il existe plusieurs ADN *N*-glycosylases présentant chacune une spécificité de substrat plus ou moins large. La multiplicité de ces enzymes permet la réparation d'une grande variété de dommages. De plus, toutes les ADN *N*-glycosylases n'ont pas la même activité : certaines sont capables de simplement exciser la base par coupure de la liaison *N*-glycosidique, ce qui conduit à la formation d'un site abasique (AP). Certaines sont également capables de réaliser la deuxième étape de ce processus de réparation, c'est-à-dire la coupure de la liaison phosphodiester en 3' ou en 5' du site AP. C'est le cas de la formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) de *E.coli*, bien connue pour son activité d'excision de la 8-oxo-Gua, mais également capable de reconnaître la FapyGua et la FapyAde, et qui présente une activité 3' et 5' endonucléase. Lorsque la glycosylase ne catalyse pas l'élimination du site AP, comme c'est le cas pour la 3-méthyladénine-ADN glycosylase de *E.coli* qui excise la 3-méthyladénine et la 3-méthylguanine, une AP-endonucléase comme HAP-1 chez l'Homme prend le relais. Deux voies différentes existent en fonction de la taille du fragment d'ADN excisé. Ces deux voies sont schématisées sur la **Figure 20**. Lorsque l'AP-endonucléase n'excise qu'un seul nucléotide, c'est la voie dite « brèche courte » qui est activée. Dans ce cas, il y a intervention de la protéine PARP qui joue un rôle de senseur du site AP incisé et de recruteuse des autres protéines. Parmi les protéines recrutées, XRCC1 stabilise le complexe en interagissant avec les autres protéines qui le composent (Caldecott *et al.*, 1996 ; Masson *et al.*, 1998). La dernière étape de synthèse et ligation fait intervenir l'ADN polymérase β et l'ADN ligase III (Sobol *et al.*, 1996). La polymérase β peut également catalyser l'excision du résidu 2-désoxyribose-phosphate subsistant en 5' après l'action de l'AP endonucléase (Matsumoto & Kim, 1995). Lorsque l'AP endonucléase excise un fragment de 6 à 13 nucléotides, c'est la voie dite « brèche longue » qui est activée. La polymérase δ ou ϵ incorpore plusieurs nucléotides lors de l'étape de resynthèse, tout en déplaçant les nucléotides initiaux. Il faut alors l'intervention de la DNase IV et de son activité 5'-3' exonucléase pour exciser ces nucléotides déplacés. Le facteur de transcription PCNA est requis pour activer la polymérase δ et la DNase IV (Karmakar *et al.*, 2001).

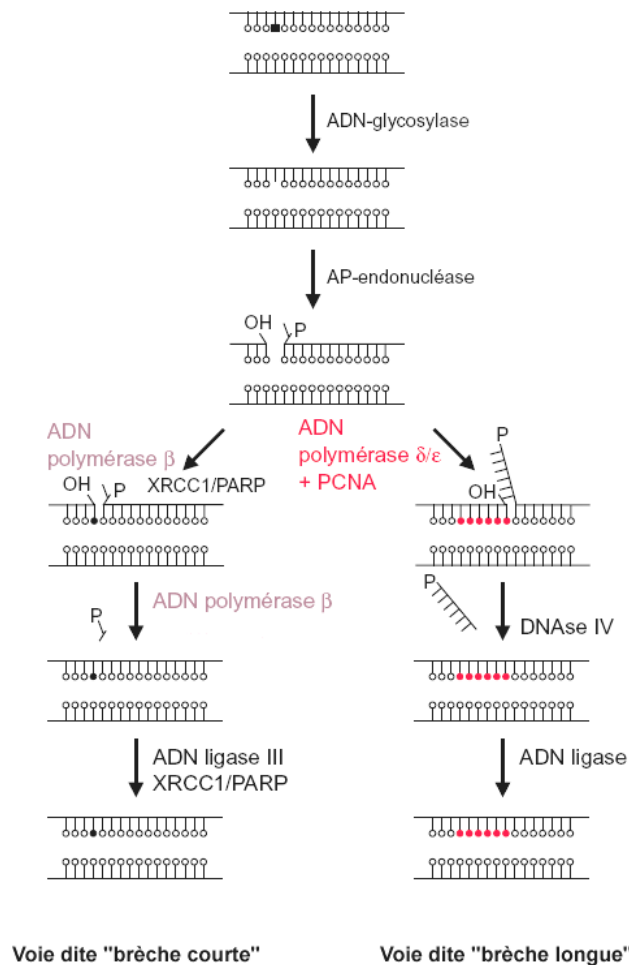


Figure 20. Les deux voies de la REB chez l'Homme (d'après Dantzer & de Murcia, 1998).

6. La réparation par excision de nucléotides (REN)

Contrairement à la REB, il est admis que la REN concerne plus particulièrement les lésions encombrantes ou provoquant une forte distorsion de la double hélice d'ADN. Les dommages concernés incluent les photoproduits dimériques générés par les rayonnements UV (Naegeli, 1995), les pontages ADN-protéines (Barker *et al.*, 2005), les adduits générés par des agents chimiques exogènes tels que le benzo[a]pyrène, les psoralènes ou le cis-platine (Huang *et al.*, 1994) (Mu *et al.*, 1997; Sancar, 1994a). Cependant, il existe des recouvrements dans la spécificité de substrat des systèmes de réparation. Ainsi, certains dommages alkylés ou oxydatifs n'entraînant pas de fortes distorsions dans la double hélice d'ADN, peuvent tout de même être pris en charge par la REN. La REN est considérée comme

le système de réparation des lésions de l'ADN le plus ubiquitaire car il est capable d'éliminer des lésions complètement différentes les unes des autres, en termes de structure.

Le système de REN est à nouveau un système multi-enzymatique mais faisant cette fois intervenir une trentaine de protéines (Costa *et al.*, 2003; de Boer & Hoeijmakers, 2000). L'ensemble des protéines impliquées chez *E.coli* définit le système UvrABC. Son fonctionnement est très bien décrit. Chez l'Homme, les protéines des familles XP et CS sont impliquées. Les modèles proposés sont en constante évolution. On peut distinguer deux sous-systèmes de la REN : la réparation couplée à la transcription (RCT) et la réparation globale du génome (RGG). Les gènes activement transcrits sont plus rapidement réparés par la RCT que les régions non transcrites par la RGG (Cleaver, 2005). Dans les deux cas, on peut distinguer 4 étapes :

- reconnaissance de la lésion,
- excision d'un fragment d'ADN contenant la lésion,
- synthèse d'ADN en utilisant le brin complémentaire comme matrice,
- ligation.

Comme il est possible de le voir sur la **Figure 21**, les deux sous-systèmes de la REN se distinguent principalement par les protéines impliquées lors de la première étape de reconnaissance du dommage. Dans le cas de la RGG, cette étape est effectuée par le complexe XPC/HHR23B (de Boer & Hoeijmakers, 2000). Plus récemment, James Cleaver a décrit un modèle faisant également intervenir la protéine XPE dans cette étape (Cleaver, 2005). Dans le cas de la RCT, la reconnaissance du dommage se fait par le biais de l'ARN polymérase II et de la protéine CSB. Là encore, le modèle décrit par James Cleaver est légèrement différent puisqu'il fait intervenir la protéine CSA en plus des deux précédentes. Un oligonucléotide de 24 à 32 mers contenant la lésion est ensuite excisé par les endonucléases XPG (en 3' de la lésion) et ERCC1/XPF (en 5'). D'après des expériences effectuées *in vitro*, l'étape de synthèse ferait intervenir les facteurs de réplication RPA, RF-C et PCNA ainsi que les ADN polymérases δ et ϵ (Shivji *et al.*, 1995).

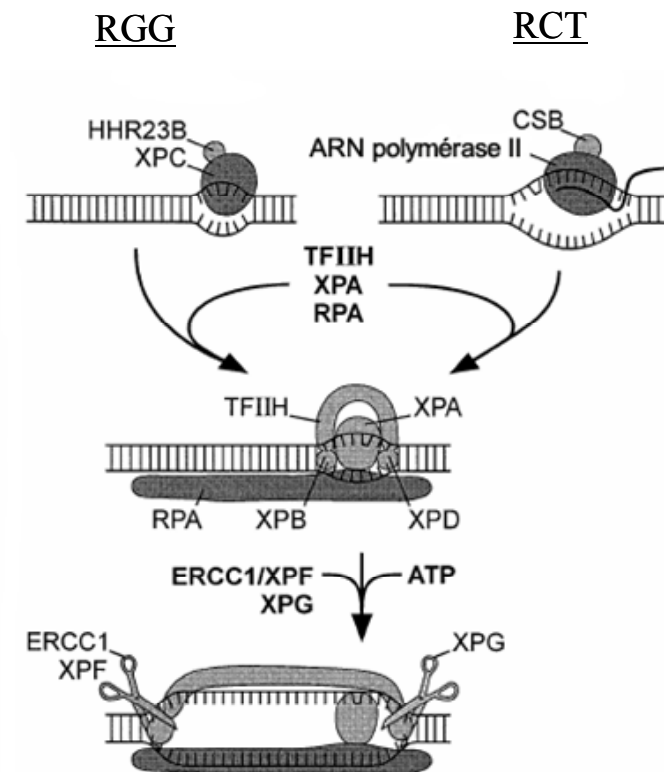


Figure 21. *Modèle de réparation par excision de nucléotides chez les eucaryotes proposé par de Boer et Hoeijmakers .*

C. La mort cellulaire

Malgré l'existence de différents systèmes de réparation, la cellule peut, si les dommages portés à son ADN sont trop nombreux et/ou trop sévères, ne pas réussir à les réparer. Dans ce cas, la mort de la cellule peut se produire pour éviter des conséquences délétères à long terme. Traditionnellement, deux types de mort cellulaire ont été distingués : la nécrose et l'apoptose. Le processus de sénescence sera également mentionné.

1. La nécrose

La nécrose se produit en réponse à une agression aiguë dont la sévérité est telle que la survie cellulaire est d'emblée impossible. Cette mort cellulaire se produit rapidement et est incontrôlée. Un des premiers sites lésés est la membrane plasmique qui perd sa capacité à réguler l'équilibre osmotique. La cellule gonfle alors par entrée d'eau, la membrane éclate (choc osmotique), libérant le contenu cellulaire, riche en médiateurs de

l'inflammation, dans le tissu environnant. Ce phénomène est à l'origine d'une réaction inflammatoire locale (Poirier *et al.*, 1997).

2. L'apoptose

A la différence de la nécrose, l'apoptose est une mort cellulaire programmée génétiquement. En effet au cours de ce processus, de nombreux gènes s'inhibent ou s'activent entre eux. Il s'agit donc d'un phénomène actif, plus lent que la nécrose et qui se produit après l'arrêt du cycle cellulaire. Il s'agit d'un phénomène présent à l'état physiologique (Ellis *et al.*, 1991), et qui peut être induit par des situations pathogènes, telles que les stress provoquant des dommages à l'ADN (Enoch & Norbury, 1995). On assiste alors à une diminution du volume cellulaire, une rupture des jonctions intercellulaires et une fragmentation de l'ADN sous l'action d'endonucléases. La membrane plasmique bourgeonne et la cellule se fragmente en corps apoptotiques qui ne provoquent pas d'inflammation (Poirier *et al.*, 1997).

3. La sénescence

La sénescence est un processus de vieillissement lié à un phénomène touchant les extrémités des chromosomes, les télomères, et entraînant une altération de leur structure et de leur fonction. La sénescence se caractérise par des modifications morphologiques, un arrêt prolongé et irréversible de la croissance cellulaire, une sécrétion importante de protéines notamment la β -galactosidase. La mesure de l'activité de cette enzyme est d'ailleurs souvent utilisée comme marqueur de sénescence. Il faut toutefois distinguer la sénescence répllicative, processus touchant les cellules en culture au bout d'un certain nombre de divisions, et la sénescence prématurément induite par un stress. La sénescence répllicative est due à un raccourcissement des télomères au cours des réplifications successives. La télomérase est l'enzyme responsable de la réplification de ces régions particulières du génome. La stimulation de son activité prévient de la sénescence répllicative mais pas de la sénescence prématurément induite par un stress, ce qui suggère qu'une désorganisation des télomères est sans doute à l'origine de ce second mode de sénescence.

D. Propriétés mutagènes des lésions de l'ADN

Malgré la diversité et l'efficacité des systèmes de réparation, il arrive que des lésions persistent dans l'ADN, sans nécessairement provoquer la mort de la cellule. Plusieurs cas de figure peuvent alors se présenter en fonction de la nature de la lésion. Elle peut se comporter de la même façon que la base dont elle est issue. C'est ainsi le cas de la 5,6-dihydrothymidine en face de laquelle une dAdo est incorporée au cours de la réplication (Ide *et al.*, 1991). Certaines lésions, comme les diols de Thd, bloquent l'action de l'ADN polymérase au cours de la réplication, et entraînent des coupures dans l'ADN néo-synthétisé (Ide *et al.*, 1985). Ceci se traduit par une forte létalité cellulaire (Rouet & Essigmann, 1985). Enfin, certaines lésions sont directement mutagènes, c'est-à-dire qu'elles conduisent à l'incorporation, sur le brin opposé, d'une base non complémentaire à la base normale à l'origine de la lésion. C'est ainsi le cas de la 8-oxo-dGuo, en face de laquelle de la dCyd ou de la dAdo est incorporée en fonction de la séquence environnante. Dans le cas où c'est de la dCyd qui est incorporée, cela n'aura aucun effet, mais dans le cas de l'incorporation d'une dAdo, la mutation résultante sera une transversion G:C → T:A (Shibutani *et al.*, 1991).

Les mutations ainsi fixées dans le génome peuvent avoir des conséquences plus ou moins graves :

- Elles peuvent être muettes du fait de la dégénérescence du code génétique ou entraîner la modification, au niveau protéique, d'un acide aminé non essentiel sans effet sur le fonctionnement de la protéine. De plus, dans de nombreux cas, les mutations surviennent dans des parties non codantes du génome et n'entraîneront pas d'effet majeur sur le fonctionnement de la cellule.
- Les mutations peuvent être responsables de processus évolutifs lorsqu'elles confèrent à la cellule un gain de fonction ou un avantage en ce qui concerne la survie de l'espèce.
- Les mutations peuvent être à l'origine du développement de cancers, lorsqu'elles surviennent au niveau de gènes codant pour des protéines contrôlant la stabilité génétique et cellulaire (activation de proto-oncogènes ou inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs).

E. La synthèse translésionnelle (STL)

Nous avons évoqué l'existence de lésions pouvant bloquer l'ADN polymérase au cours de la réplication. En 1999, la découverte d'une nouvelle ADN polymérase eucaryote, la pol η , a permis d'entrevoir de nouvelles perspectives pour ces lésions bloquantes (Johnson *et al.*, 1999; Masutani *et al.*, 1999). Le gène codant pour cette enzyme a été isolé à partir de cellules XP variant (XPV), dans lesquelles il est muté. Le xeroderma pigmentosum (XP) est une maladie génétique caractérisée par une extrême sensibilité de la peau aux rayonnements UV et une très forte probabilité de cancers de la peau. Dans 80 % des cas, ces symptômes sont dus à un défaut de la REN, mais pour 20 % des patients, constituant le groupe XP variant, la REN n'est pas affectée, et un défaut de la réplication de l'ADN contenant des dommages induits par les rayonnements UV est observé (Lehman *et al.*, 1975). Ce défaut est attribuable à une mutation du gène codant pour la pol η . Cette enzyme est capable de répliquer avec une grande efficacité (en insérant les bases correctes en face de la plupart des lésions), un ADN contenant des CPD. La synthèse translésionnelle (STL) est donc la capacité, que possède certaines ADN polymérases, à répliquer l'ADN contenant des lésions, lésions qui bloquent la pol δ , responsable de la réplication à l'état physiologique. Plusieurs ADN polymérases sont capables de réaliser la STL, elles possèdent un site actif plus ouvert que les ADN polymérases habituelles, qui peut ainsi prendre en charge des dommages. Parmi ces ADN polymérases spécifiques, peuvent être citées la pol η , la pol ι , la pol κ et Rev 1. La pol η est celle dont le mode d'action est le mieux compris à ce jour. Elle est donc capable de réaliser la STL des CPD, mais aussi d'autres dommages incluant des analogues de sites AP (3-hydroxy-2-(hydroxyméthyl)tetrahydrofuran), des pontages intra-brin induits par le cisplatine entre 2 guanines...(Masutani *et al.*, 2000). De plus, il a été montré chez les eucaryotes, que la pol η est capable de médier la STL de dommages oxydatifs tels que les diols de Thd et la 8-oxo-dGuo (Kusumoto *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2000).

Un point important est la façon dont s'opère, au cours de la réplication, le changement entre la pol δ et une polymérase spécifique de la STL. Un modèle faisant intervenir le PCNA a été proposé pour le recrutement de la pol η dans les cellules de mammifères (Kannouche *et al.*, 2004 et pour revue Lehmann, 2005):

- La présence d'un CPD bloque la fourche de réplication.

- Il y a alors intervention des protéines Rad 18 et Rad 6 responsables de l'ubiquitinylation du PCNA. Le PCNA monoubiquitinylé présente une affinité accrue pour la pol η (Kannouche *et al.*, 2004).
- Pol η est alors recrutée et déplace pol δ . La STL du CPD peut avoir lieu.
- Une fois cette opération réalisée, pol η se dissocie de la fourche, et pol δ , plus processive reprend sa place.

De nombreuses interrogations persistent au sujet de la STL, notamment en ce qui concerne le mode d'action d'autres ADN polymérase que la pol η .

IV. LA MESURE DES DOMMAGES DE L'ADN

Nous avons vu, au cours des sections précédentes, qu'un stress tel qu'une exposition à des rayonnements ionisants, peut générer des dommages au sein de l'ADN, et que suite à ces dommages, la cellule peut adopter différents comportements. Un élément important pour la compréhension de ces réponses est la détermination de la fréquence des dommages de l'ADN, notamment au niveau cellulaire. Différentes techniques permettent de mesurer la formation des dommages de l'ADN. On peut noter que chacune d'entre elles présente des avantages et des inconvénients. Durant ces dernières années, des progrès considérables ont été réalisés dans la mesure de la formation des lésions de l'ADN, notamment en termes de sensibilité et de spécificité.

A. Les méthodes non chromatographiques

1. Les techniques immunologiques

Ces méthodes sont basées sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre des nucléosides ou des bases modifié(e)s. Un des avantages de ces techniques est la possibilité de les mettre en œuvre pour rechercher des lésions dans l'ADN total, non hydrolysé. Cependant, ces techniques souffrent en général du manque de spécificité des anticorps employés. En effet, des réactions croisées entre les anticorps et les nucléosides normaux, majoritaires au sein de l'ADN, se produisent. Ceci est notamment le cas pour les anticorps mono- et polyclonaux dirigés contre la 8-oxo-dGuo, qui présentent une réactivité croisée avec la dGuo (Degan *et al.*,

1991; Girault *et al.*, 1996; Kennedy *et al.*, 1997; Mitchell *et al.*, 2002; Park *et al.*, 1992; Yin *et al.*, 1995). Ceci conduit donc à une surestimation du niveau de 8-oxo-dGuo mesuré au sein d'un ADN cellulaire (Musarrat & Wani, 1994). Ces techniques sont pourtant très utilisées comme en témoignent le nombreuses données disponibles dans la littérature, concernant la détection de la 8-oxo-dGuo, des diols de Thd ou de la 5-hydroxycytosine par exemple (Girault *et al.*, 1996; Hattori *et al.*, 1996; Le *et al.*, 1998; Toyokuni *et al.*, 1997; Weinfeld *et al.*, 2002).

2. Les méthodes enzymatiques

Deux méthodes principales sont couramment utilisées : l'élution alcaline et l'électrophorèse sur gel d'agarose de cellules isolées aussi appelée « méthode des comètes ». Ces méthodes, initialement développées pour mesurer le niveau de cassures de l'ADN et de sites alcali-labiles, permettent de visualiser et de quantifier des lésions dans l'ADN des cellules sans qu'aucune étape d'extraction ou de digestion de cet ADN ne soit nécessaire.

L'élution alcaline fut originellement développée par Kohn *et al.* en 1976 (Kohn *et al.*, 1976). Il s'agit de lyser les cellules sur des membranes filtrantes. Les constituants cellulaires sont élués avec le tampon de lyse à l'exception de l'ADN. Il est alors élué dans des conditions alcalines causant, d'une part, une séparation des brins, et d'autre part des CSB aux sites dits alcali-labiles (les sites AP sont des exemples de sites alcali-labiles). La vitesse d'élution des molécules d'ADN à travers les pores est inversement proportionnelle à la taille de ces molécules. Une version modifiée de cette méthode fait intervenir l'incubation préalable de l'ADN avec une ADN-*N* glycosylase, les lésions reconnues par cette enzyme étant converties en CSB. Il est alors possible de mesurer en plus du niveau des CSB, CDB et sites alcali-labiles, celui des lésions reconnues par l'ADN-*N* glycosylase. En effet, la vitesse d'élution peut, dans ce cas, être reliée au nombre de sites alcali-labiles et de sites sensibles à l'enzyme utilisée (Pflaum *et al.*, 1997).

La méthode des comètes fait également intervenir la lyse de cellules dans un gel d'agarose déposé sur une lame de microscope, en présence de fortes concentrations en sels. Initialement, cette méthode fut décrite par Ostling et Johanson en 1984 (Ostling & Johanson, 1984). Après la lyse des cellules, seul l'ADN reste présent dans le gel, sous forme d'une structure compacte appelée nucléoïde. Dans cette structure, l'ADN est super-enroulé, ce qui limite sa migration électrophorétique. Si l'ADN contient des CSB, le relâchement d'une boucle peut se produire, permettant sa dissociation du nucléoïde. On peut ainsi visualiser au

microscope, après une coloration adéquate de l'ADN (au bromure d'éthidium ou à l'acridine orange par exemple) et après une migration électrophorétique, une structure ressemblant à une comète dont la tête serait le nucléoïde et la queue serait l'ADN relâché ayant migré hors du nucléoïde, comme le montre la **Figure 22**.

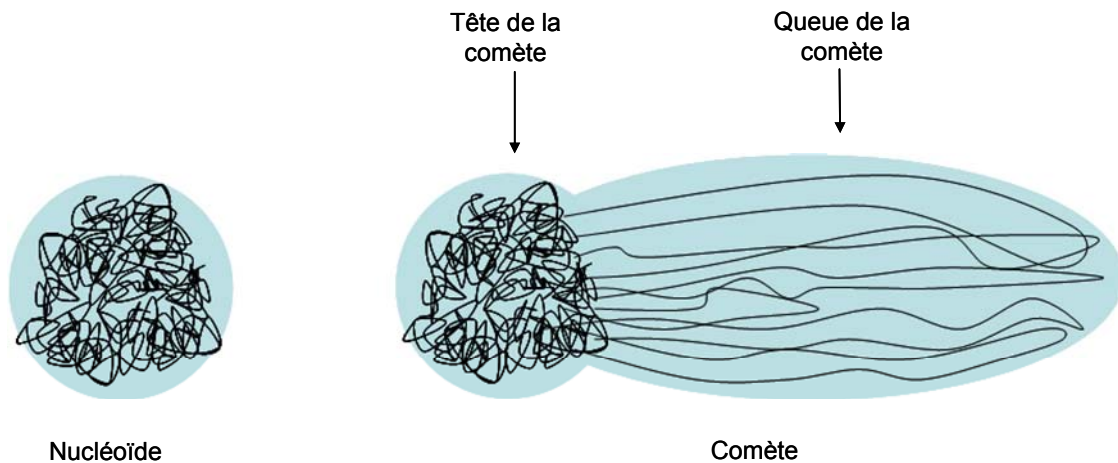


Figure 22. Représentation schématique du nucléoïde et d'une comète visualisés par la technique d'électrophorèse sur gel de cellules isolées.

Tout comme pour la méthode d'éluion alcaline, des CSB (et des CDB) surviennent, en plus des cassures directes, du fait des conditions de pH basique de la technique des comètes. Il est également possible d'incuber l'ADN avec des ADN-*N* glycosylases telles que Fpg et Endo III de façon à convertir certains dommages de l'ADN en CSB. L'analyse des comètes se fait en mesurant des paramètres tels que la taille de la queue ou le pourcentage d'ADN présent dans la queue. Une augmentation des dommages se traduit par une augmentation de la quantité d'ADN, sous forme de fragments, dans la queue de la comète.

L'avantage notable de ces 2 méthodes est leur grande sensibilité. La version originale de la méthode des comètes permet, par exemple, de détecter un accroissement du nombre de l'ensemble des cassures de brin après exposition de cellules à une dose de rayonnement ionisant aussi faible que 0,05 Gy (Vijayalaxmi *et al.*, 1993). Ces méthodes nécessitent 10000 à 20000 cellules par lame, ce qui correspond approximativement à une quantité d'ADN 1000 fois plus faible que les méthodes chromatographiques. En revanche, les techniques faisant appel à des enzymes souffrent d'un manque de spécificité puisque l'utilisation des ADN-*N* glycosylases ne permet pas de quantifier un dommage précis, mais un ensemble de dommages reconnus par ces enzymes. En outre, la spécificité de ces enzymes est depuis longtemps un

sujet de débat, et l'hypothèse de l'existence de lésions non identifiées susceptibles d'être reconnues par une ADN-*N* glycosylase donnée ne peut pas être exclue (Collins *et al.*, 1997). On peut également se poser la question de l'efficacité des ADN-*N* glycosylases, en particulier pour la méthode des comètes, où elles doivent agir dans un gel : il est ainsi possible que l'excision des sites sensibles à ces enzymes soit partielle, conduisant à une sous-estimation du niveau de dommages. Soulignons également qu'il manque une véritable calibration lors de l'utilisation de ces méthodes, la plupart des calibrations reposant sur l'idée acceptée qu'une dose de 1 Gy de rayonnement ionisant génère 1000 cassures de brins dans l'ADN cellulaire.

Un autre avantage déjà mentionné de ces méthodes est, qu'à la différence des mesures chromatographiques qui seront détaillées dans le paragraphe suivant, elles ne font pas intervenir d'étape d'extraction ou d'hydrolyse de l'ADN. Cela limite donc le risque de surestimation des lésions due à une oxydation artéfactuelle des nucléosides normaux.

B. Les méthodes chromatographiques

On regroupe derrière cette appellation, l'ensemble des méthodes faisant intervenir une étape de séparation par chromatographie.

1. Le post-marquage

La technique de post-marquage dans sa version de base fut décrite par Randerath et ses collaborateurs en 1981 (Randerath *et al.*, 1981) pour détecter des adduits volumineux des bases de l'ADN. L'ADN à analyser est digéré en un mélange de nucléosides-3'-monophosphate ou dinucléosides-3'-monophosphate selon la structure des lésions. Ces nucléotides, sous l'action de la T4 polynucléotide kinase et en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, sont ensuite marqués en 5' au ^{32}P et la nucléase P1 est utilisée pour hydrolyser le groupement phosphate froid en 3'. Le mélange de nucléosides et dinucléosides-5'-monophosphate est alors analysé par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle et visualisé par autoradiographie. Les dommages peuvent être quantifiés par comptage radioactif. Cette méthode est extrêmement sensible en raison de la forte activité de l'ATP radioactif. Il est ainsi possible de détecter jusqu'à 1 lésion pour 10^9 nucléosides normaux dans des échantillons de quelques microgrammes d'ADN. Mais cette version de l'essai souffre d'un sérieux inconvénient : le faible rendement de la réaction de phosphorylation radioactive des mono ou

dinucléotides lésés, présents à l'état de traces. Il est donc possible d'ajouter une étape de pré-purification au protocole initial. Elle permet d'éliminer les nucléotides normaux présents en large excès, avant l'étape de phosphorylation. De plus, cette étape supplémentaire limite la possibilité d'oxydation des nucléotides normaux par autoradiolyse due au rayonnement β du ^{32}P , ce qui est un autre inconvénient majeur de la technique (Moller & Hofer, 1997).

Cette méthode est longue et fastidieuse, ce qui explique en partie le fait qu'elle soit, en pratique, moins utilisée que les techniques que nous allons décrire par la suite.

2. La chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse (CG-SM)

Cette technique, décrite dès le début des années 1980 (Dizdaroglu, 1984; Dizdaroglu, 1985) implique une étape d'hydrolyse de l'ADN, il s'agit le plus souvent d'une hydrolyse acide permettant d'obtenir un mélange de bases. Les composés présents dans ce mélange sont soumis à une réaction de dérivation afin de les rendre volatiles. Durant cette étape, qui est souvent une silylation, survient une forte oxydation des bases normales conduisant à une surestimation des dommages oxydatifs. En effet, la silylation implique un chauffage prolongé des échantillons (en moyenne 140 °C pendant 30 minutes). Pendant une quinzaine d'années, ce problème a été ignoré et les nombreuses études réalisées par CG-SM entre 1985 et 2000 sont à considérer avec précaution. A titre d'exemple, des taux de 8-oxo-Gua de l'ordre de 1 lésion pour 10^4 bases normales ont été mesurés dans l'ADN cellulaire (Jaruga *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995). La technique a plus récemment été améliorée par l'introduction d'une étape de purification par CLHP avant la silylation (Ravanat *et al.*, 1995). Les bases oxydées sont ainsi séparées des bases normales. Il est dans ce cas indispensable d'introduire des standards internes des lésions (molécules enrichies isotopiquement) le plus tôt possible dans l'analyse, de préférence avant l'hydrolyse ou la digestion. Cette étape de dilution isotopique permet notamment de prendre en compte les pertes de produit survenant au cours de la CLHP ou de la dérivation qui peut ne pas être totale. Enfin, un dernier inconvénient de cette technique concerne la stabilité des bases modifiées en conditions d'hydrolyse acide. En effet, plusieurs études ont mis en évidence la dégradation de certains dommages en fonction des conditions d'hydrolyse acide utilisées (Douki *et al.*, 1996) (Swarts *et al.*, 1996). Ainsi, la stabilité de chaque lésion à détecter doit être vérifiée avant toute analyse.

3. La chromatographie liquide haute performance couplée à une détection électrochimique (CLHP-DEC)

Cette méthode analytique, à la fois simple à mettre en œuvre et sensible a été proposée dès le milieu des années 1980 (Floyd *et al.*, 1986). Le principe repose sur la mesure du courant entre deux électrodes, ce courant étant créé par l'oxydation des molécules, si le potentiel appliqué est suffisant. Les bases ou nucléosides pouvant être détectés par cette méthode sont donc ceux présentant un faible potentiel d'oxydation. La 8-oxo-dGuo est particulièrement adaptée à une détection par CLHP-DEC. Ainsi, les niveaux mesurés de cette lésion à l'état basal dans des cellules monocytaires humaines sont inférieurs à 1 par million de bases normales (Pouget *et al.*, 2000). Force est de constater que ces valeurs sont 100 fois plus basses que celles obtenues par CG-SM. D'autres lésions peuvent également être détectées par cette technique telles que la 5-hydroxy-2'-désoxycytidine, la 5-hydroxy-2'-désoxyuridine et la 5,6-dihydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxyuridine par exemple (Wagner *et al.*, 1992). Contrairement à la CG-SM et à la CLHP-SM/SM, la CLHP-DEC est donc dépendante des propriétés chimiques des composés.

4. La chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en mode tandem (CLHP-SM/SM)

Cette méthode s'est révélée extrêmement spécifique et sensible pour la détection de nombreuses lésions oxydatives de l'ADN (Pouget *et al.*, 2002), après avoir initialement fait ses preuves pour la détection de la 8-oxo-dGuo (Frelon *et al.*, 2000; Ravanat *et al.*, 1998). En ce qui concerne la mesure du niveau de cette lésion, la méthode est 5 à 10 fois plus sensible que la CLHP-DEC (Delattre *et al.*, 2005). Le principe en est le suivant : après une séparation chromatographique des produits d'intérêt, ils sont dirigés vers le spectromètre de masse. Il est à ce niveau intéressant de détailler le fonctionnement d'un spectromètre de masse car nous avons grandement utilisé cet outil durant notre étude.

Un spectromètre de masse se compose de 4 parties : la source d'ionisation, l'analyseur, le détecteur d'ions et le système de traitement des données. Le rôle de la source d'ionisation, est comme son nom l'indique, de générer des espèces ioniques à partir des composés non ioniques sortant de la colonne chromatographique. L'analyseur permet la sélection des ions en fonction de leur rapport masse/charge. Enfin, le détecteur d'ions et le

système de traitement des données permettent d'enregistrer et de convertir les signaux en données interprétables (spectres de masse, chromatogrammes...). Dans le cas de notre étude, nous avons utilisé un système composé d'une source d'ionisation de type électrospray et d'un analyseur triple quadripolaire, c'est-à-dire constitué de 3 quadripôles placés en série.

L'ionisation par électrospray se fait à pression atmosphérique. Les composés sortant de la colonne chromatographique arrivent en solution au niveau de la source où un courant électrique est appliqué en présence d'un gaz nébulisateur. Il en résulte un spray constitué de gouttes contenant des ions. A mesure que le solvant s'évapore, la taille des gouttes diminue, le champ électrique appliqué à chaque goutte augmente et les ions migrent en surface de la goutte. A un certain champ, la goutte explose, émettant les ions.

Un analyseur quadripolaire est constitué de 4 barreaux cylindriques entre lesquels 2 champs électriques se superposent : un champ électrique oscillant (tension alternative V) et un champ électrique fixe (tension continue V_0), comme le montre la **Figure 23**. Suivant les valeurs de V et V_0 , les ions d'un certain rapport masse/charge auront une trajectoire sinusoïdale stable dans le quadripôle et en ressortiront pour se diriger vers le quadripôle suivant ou vers le collecteur d'ions, les autres seront défocalisés et se perdront dans le quadripôle.

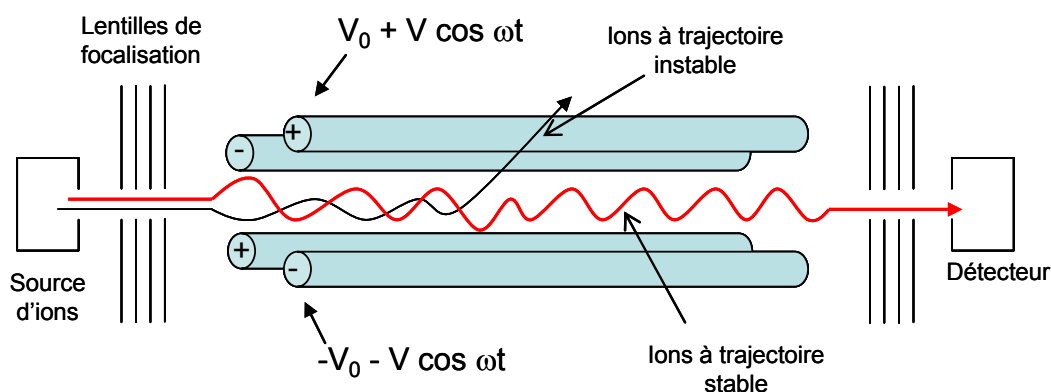


Figure 23. Représentation schématique d'un analyseur de type quadripolaire.

Les quadripôles peuvent être utilisés suivant différents modes, le mode le plus fréquemment utilisé étant le mode « MRM » pour *Multiple Reaction Monitoring*. Dans ce cas, le premier quadripôle sert à sélectionner un ion parent de rapport masse/charge donné, le second le fragmente par collision avec un gaz inerte (azote ou argon en général) et le

troisième sélectionne un ion fils issu de cette fragmentation, toujours en fonction de son rapport masse/charge.

La CLHP-SM/SM, tout comme les autres techniques chromatographiques, nécessite au préalable la digestion de l'ADN en un mélange de nucléosides. Des standards internes peuvent également être utilisés afin d'augmenter la précision de la mesure.

Cette méthode présente une très grande spécificité puisque la détection d'une molécule s'appuie à la fois sur son rapport masse/charge, mais également sur la façon dont se fragmente la molécule et sur le rapport masse/charge des ions fils engendrés. La CLHP-SM/SM est également très sensible. Plus le bruit de fond est faible, plus la sensibilité de la méthode est élevée. Dans le cas de cette technique, le bruit de fond est réduit par la sélection effectuée au niveau des quadripôles.

CHAPITRE II: OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les rayonnements ionisants causent de nombreux types de dommages sur l'ADN. Cette molécule étant le support de l'information génétique, toute altération ainsi créée peut engendrer des conséquences délétères pour les cellules concernées ainsi que pour leur descendance. C'est pourquoi l'étude des dommages de l'ADN et de leurs effets biologiques est depuis longtemps un sujet d'intérêt pour de nombreux chercheurs. Les rayonnements ionisants engendrent principalement des dommages de type oxydatif, soit par ionisation directe de la molécule d'ADN soit par le biais des radicaux issus de la radiolyse du solvant. Environ 70 dommages oxydatifs des bases de l'ADN ont à ce jour été identifiés et seulement une dizaine a été correctement mesurée à l'échelle cellulaire.

La stratégie habituellement employée pour identifier les lésions de l'ADN consiste à exposer des composés au stress d'intérêt (rayonnements ionisants, réaction de Fenton, drogues à action radiomimétique...). Ces composés modèles peuvent être de courts oligonucléotides, des nucléotides ou le plus souvent des nucléosides. Or, dans certains cas, les résultats obtenus à l'échelle du nucléoside ne peuvent pas être extrapolés à l'échelle de l'ADN. Ceci témoigne d'une différence de réactivité de la molécule d'ADN vis-à-vis des radicaux, par rapport aux nucléosides isolés. A l'inverse, l'hypothèse selon laquelle des produits d'oxydation seraient formés de manière notable dans l'ADN mais peu ou pas au niveau du nucléoside isolé, ne peut pas être exclue. On ne peut pas écarter la possibilité de chemins réactionnels spécifiques de l'ADN ou du nucléoside isolé. Notre étude repose sur ces hypothèses de travail, **le premier objectif étant de rechercher des lésions radio-induites de l'ADN qui n'auraient jamais été détectées car peu ou pas formées au niveau du nucléoside isolé**. Nous avons pour cela bénéficié des progrès considérables réalisés au niveau des outils analytiques. La chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en mode tandem (CLHP-SM/SM) allie spécificité et sensibilité. Un avantage intéressant de la CLHP-SM/SM est qu'elle nous a permis d'analyser des échantillons d'ADN, et non pas uniquement des composés modèles.

De nouvelles lésions radio-induites de l'ADN ont ainsi été détectées et nous nous sommes intéressés à **l'isolement et à la caractérisation structurale d'un de ces nouveaux dommages**. La synthèse chimique de la lésion a été effectuée en vue de la caractériser, notamment par résonance magnétique nucléaire (RMN). La masse exacte du dommage a également été déterminée afin d'avoir accès à sa formule brute. Dans le cadre de ce travail, un mécanisme de formation a été proposé pour la nouvelle lésion. Une série d'expériences ont alors été réalisées dans le but de confirmer le mécanisme, étape par étape. Cela nous a amené

à nous intéresser aux réactions survenant entre les produits d'oxydation du 2-désoxyribose et les bases de l'ADN, un tel mécanisme étant envisagé pour la nouvelle lésion.

Nous avons également cherché à **évaluer l'importance quantitative de la formation de cette nouvelle lésion par rapport à des lésions bien connues, tant dans l'ADN isolé que dans l'ADN cellulaire**. Pour cela, la mise au point d'une méthode de détection suffisamment sensible ainsi que l'élaboration de solutions calibrées de la lésion purifiée se sont avérées nécessaires.

Aucune donnée n'étant disponible au sujet de la nouvelle lésion, il nous a semblé intéressant d'**appréhender sa prise en charge au niveau biologique**. Ainsi, un travail préliminaire sur la réparation de la lésion a été effectué, des expériences ayant été réalisées *in vitro* à l'aide de glycosylases et d'extraits nucléaires, et *in cellulo*.

RESULTATS

**CHAPITRE III: DETECTION DE
NOUVELLES LESIONS DE L'ADN PAR
CLHP-SM/SM**

I. LES DIFFERENTS MODES D'UTILISATION DE LA CLHP-SM/SM

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, la CLHP-SM/SM est un outil très sensible et très spécifique pour la quantification des dommages de l'ADN. Un autre avantage de la CLHP-SM/SM est la possibilité de pouvoir l'utiliser selon différents modes. De façon générale, il est nécessaire de bien comprendre les principes, avantages et inconvénients de chaque mode afin de définir lequel est le plus adapté à l'étude que l'on veut effectuer.

Rappelons préalablement que l'appareil que nous utilisons dispose d'une source électrospray permettant l'ionisation des molécules à pression atmosphérique. Il s'agit d'une technique d'ionisation dite « douce », qui permet de limiter la décomposition du composé pendant l'étape d'ionisation. L'ionisation par électrospray permet d'obtenir, à partir d'une solution, des ions en phase gazeuse, par application d'un champ électrique et sous l'action d'un gaz nébulisateur (dans notre cas l'azote). Après ionisation, les molécules sont dirigées, à l'aide de lentilles de focalisation, vers l'analyseur triple quadripolaire (**Figure 24**). Les différents modes possibles d'utilisation de ce dernier sont ici présentés.

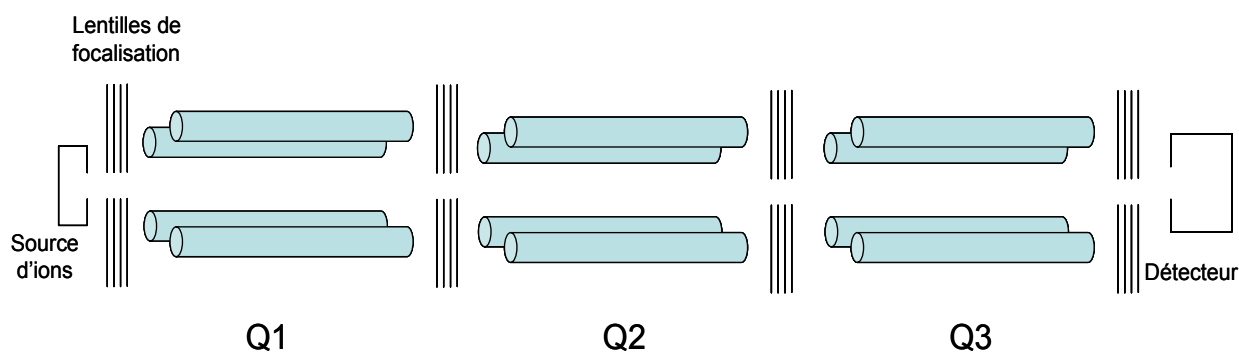


Figure 24. Représentation d'un analyseur triple quadripolaire.

A. Le mode «Q1 scan»

Dans ce mode, seul le premier quadripôle Q1 est utilisé ce qui revient à travailler en chromatographie liquide haute performance avec une détection par spectrométrie de masse simple (CLHP-SM), comme cela est représenté sur la **Figure 25**. Au sortir de la colonne chromatographique, les composés sont dirigés vers Q1 où un balayage est réalisé, dans une gamme de valeurs de rapport masse/charge (m/z) choisies par l'utilisateur, de façon

à détecter toutes les molécules s'ionisant dans le mode d'ionisation étudié (positif ou négatif). Toutes les molécules ionisables présentes dans l'échantillon analysé étant détectées, le bruit de fond est élevé avec cette voie de détection. La sensibilité, liée au rapport signal/bruit de fond, est donc limitée.

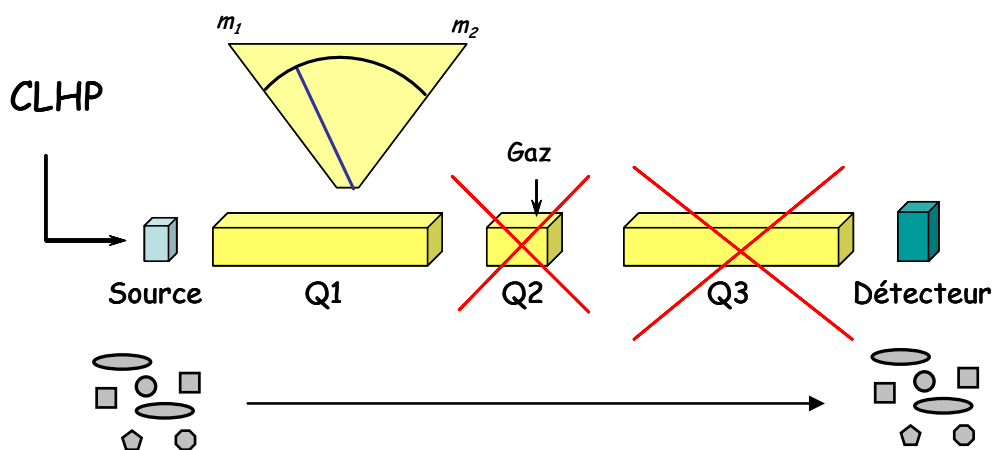


Figure 25. Représentation schématique du mode «Q1 scan» d'un analyseur triple quadripolaire.

B. Le mode « SIM »

Le mode « SIM », pour *Single Ion Monitoring*, requiert également l'utilisation unique du premier quadripôle, mais cette fois-ci, ce n'est pas un balayage qui est effectué. Le quadripôle filtre sélectivement une molécule de rapport m/z donné. La spécificité de cette méthode est relative puisque, bien que ce phénomène soit rare, il est possible que 2 molécules différentes aient le même rapport m/z et arrivent donc toutes les deux au niveau du détecteur. La sensibilité est améliorée par rapport au mode « Q1 scan ».

C. Le mode « Product Ion Scan »

Nous en arrivons maintenant à la description des modes CLHP-SM/SM à proprement parler, c'est-à-dire faisant appel à l'utilisation des trois quadripôles. Le mode « *Product Ion Scan* » permet de détecter tous les produits de fragmentation d'une molécule donnée. Comme on le voit sur la **Figure 26**, un ion de rapport m/z choisi est spécifiquement filtré en Q1. Cet ion est ensuite dirigé vers le second quadripôle Q2, dans lequel il est fragmenté par collision avec un gaz inerte, qui est, dans notre cas, l'azote. A ce niveau, différentes énergies de collision peuvent être appliquées, l'énergie de collision correspondant à l'énergie cinétique des ions entrant en Q2. Un autre paramètre entrant en compte au cours de

la fragmentation est la quantité d'azote (gaz de collision) présent en Q2. Les ions fils issus de cette fragmentation sont alors analysés dans le troisième quadripôle Q3. Q3 balaye une gamme de valeurs de m/z choisies par l'utilisateur. Cette technique est très utile pour obtenir des informations structurales sur un composé.

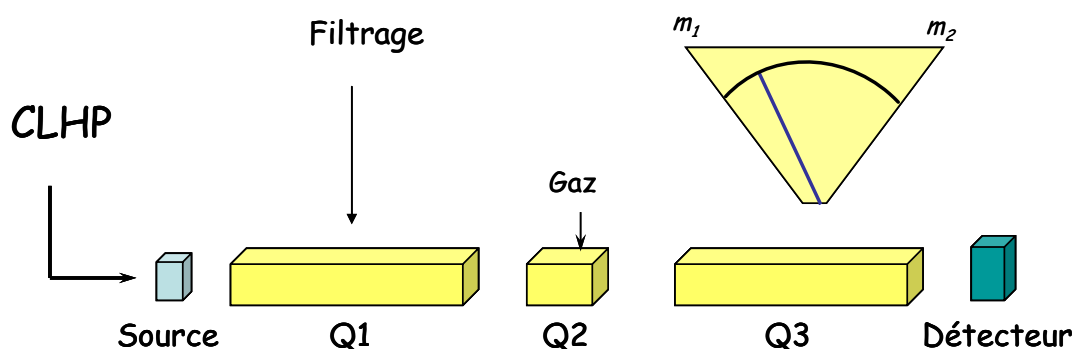


Figure 26. Représentation schématique du mode « Product Ion Scan » d'un analyseur triple quadripolaire.

D. Le mode « Parent Ion Scan »

Cette utilisation de la CLHP-SM/SM permet de déterminer l'origine d'un fragment. En effet, un seul ion de rapport m/z choisi est filtré en Q3, tandis qu'un balayage est réalisé en Q1. Ainsi, tous les ions analysés en Q1, fragmentés en Q2 et donnant un fragment de rapport m/z sélectionné en Q3, arriveront au niveau du détecteur.

Ce mode est généralement adapté à la recherche de métabolites possédant, tout comme la molécule parent, un ou plusieurs fragments caractéristiques.

E. Le mode « perte de neutre »

Le mode « perte de neutre » permet de détecter des molécules perdant un même fragment. Ainsi, un balayage est réalisé en Q1 et en Q3 mais dans des gammes de valeurs de m/z différentes. Au cours de ce balayage, la différence entre les m/z sélectionnés en Q1 et en Q3 est maintenue constante et égale à une valeur donnée x . Ainsi, seules les molécules ayant perdu un fragment non chargé et de masse x , au cours de leur passage en Q2, seront détectées (**Figure 27**). A la différence du mode « Parent Ion Scan », ce n'est pas le fragment perdu qui permet la détection mais le fragment résiduel. De plus, dans le cas du « Parent Ion Scan », le fragment commun est chargé tandis qu'en mode « perte de neutre », il s'agit d'un fragment neutre.

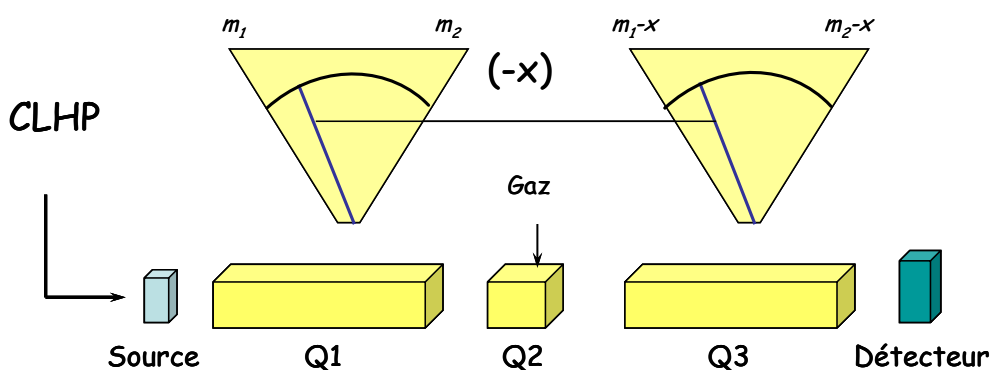


Figure 27. Représentation schématique du mode « perte de neutre » d'un analyseur triple quadripolaire.

F. Le mode « MRM »

Enfin, le mode « MRM » pour « Multiple Reaction Monitoring » est certainement le plus fréquemment utilisé au cours des analyses réalisées par CLHP-SM/SM. Il consiste à sélectionner en Q1 un ion d'une certaine valeur de rapport m/z , à le fragmenter et à sélectionner un Q3 un de ses ions fils d'une certaine valeur de m/z (**Figure 28**). La spécificité est donc meilleure qu'en mode « SIM » puisqu'un critère supplémentaire est introduit au cours de la détection de la molécule. De ce fait, le bruit de fond est également diminué, permettant d'augmenter la sensibilité (Ravanat *et al.*, 1998).

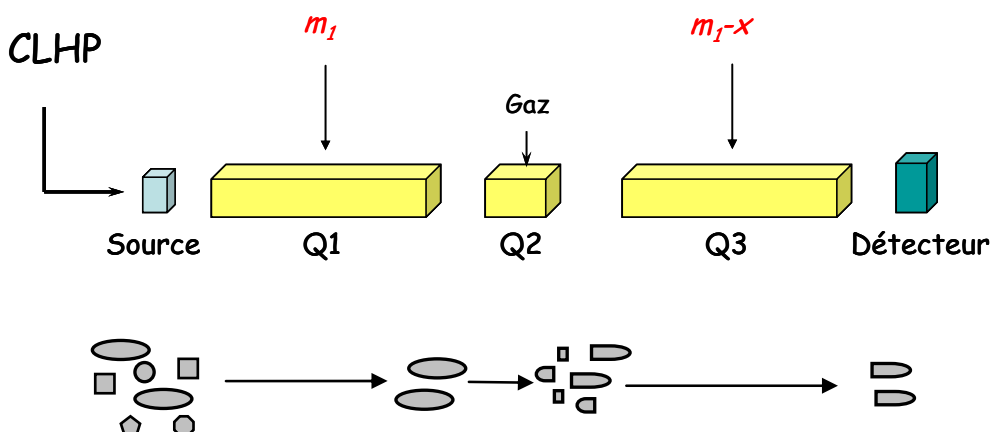


Figure 28. Représentation schématique du mode « MRM » d'un analyseur triple quadripolaire.

Il est à noter que dans le cas de la majorité des petites molécules telles que les nucléosides, la charge z des ions obtenus par ionisation électrospray est égale à 1 (-1 ou +1

selon que l'ionisation soit effectuée en mode positif ou en mode négatif). Ainsi le rapport m/z correspond à la masse de la molécule ionisée (protonée ou déprotonée).

II. UTILISATION DU MODE « PERTE DE NEUTRE » POUR RECHERCHER DE NOUVELLES LESIONS DANS L'ADN EXPOSE AU RAYONNEMENT γ

La plupart des nucléosides analysés par spectrométrie de masse en mode d'ionisation positif se fragmentent en perdant 116 uma (Hua *et al.*, 2001). Cette fragmentation correspond à la perte du résidu 2-désoxyribose. A titre d'exemple, la **Figure 29** représente le spectre de fragmentation de la 8-oxo-dGuo obtenu en mode d'ionisation positif. Nous avons utilisé cette caractéristique des nucléosides pour rechercher de nouvelles modifications des bases de l'ADN exposé aux rayonnements γ .

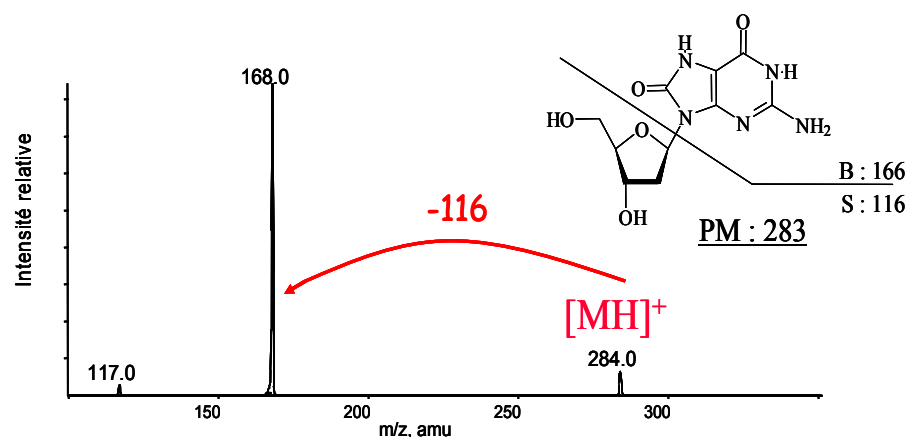


Figure 29. Spectre de fragmentation de la 8-oxo-dGuo en mode d'ionisation positif.

A. Mise au point de la méthode spectrométrique

Comme nous l'avons décrit précédemment, le mode « perte de neutre » du SM/SM permet de détecter toutes les molécules perdant un fragment neutre de même masse, dans le mode d'ionisation (positif ou négatif) étudié. Nous l'avons utilisé de façon à détecter, dans des échantillons d'ADN exposé au rayonnement γ et digéré en nucléosides, toutes les molécules ionisées perdant 116 uma en mode d'ionisation positif.

La mise en œuvre de la méthode « perte de 116 », qui est illustrée dans la **Figure 30**, s'accompagne d'un balayage en Q1 des ions de m/z compris entre 150 et 450 uma. Ils seront

détectés s'ils se fragmentent en perdant un fragment neutre de 116 uma. Cependant, les nucléosides normaux étant en large excès par rapport aux nucléosides modifiés, et ce même dans le cas où l'ADN est exposé à de fortes doses de rayonnement ionisant, leurs masses sont exclues de ce balayage afin de ne pas saturer le détecteur. Les nucléosides normaux sont analysés à l'aide d'un détecteur UV placée en amont du spectromètre de masse.

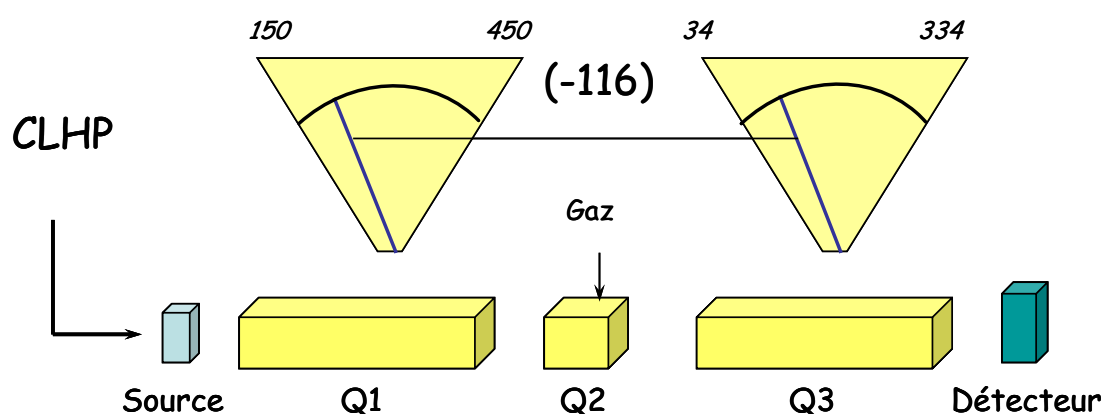


Figure 30. Représentation schématique de la méthode « perte de neutre » utilisée pour la recherche de nouvelles lésions radio-induites dans l'ADN isolé en solutions aqueuses aérées.

B. Détection de nouvelles lésions de l'ADN

Des solutions aqueuses aérées d'ADN isolé de thymus de veau sont analysées, après digestion enzymatique, à l'aide de la méthode « perte de 116 » précédemment décrite. Le chromatogramme obtenu à l'aide de la détection UV à 260 nm pour l'ADN témoin et représenté sur la **Figure 31**, fait état de 4 pics correspondant aux 4 nucléosides normaux : la 2'-désoxycytidine (dCyd), la 2'-désoxyguanosine (dGuo), la thymidine (Thd) et la 2'-désoxyadénosine (dAdo).

Le chromatogramme de l'ADN témoin obtenu en utilisant le spectromètre de masse comme détecteur avec la méthode « perte de 116 », comporte également 4 pics majoritaires. D'après leur temps de rétention et leur masse (qui est supérieure de 22 uma par rapport aux masses des nucléosides normaux), ces pics correspondent aux adduits sodium des 4 nucléosides normaux. En revanche, lorsque l'ADN en solutions aqueuses aérées est exposé à une dose de 500 Gy, d'autres produits sont détectés. L'un de ces pics d'élué correspond à la 8-oxo-dGuo (MM = 283), une des lésions les plus étudiées à ce jour, et qui est ici élue à proximité de la Thd. Mais d'autres pics sont présents et, compte tenu des masses et des temps

de rétention dans ces conditions chromatographiques, ils ne correspondent à aucune lésion connue. Les ions parents monochargés de ces molécules ont des masses de 342, 256 et 348.

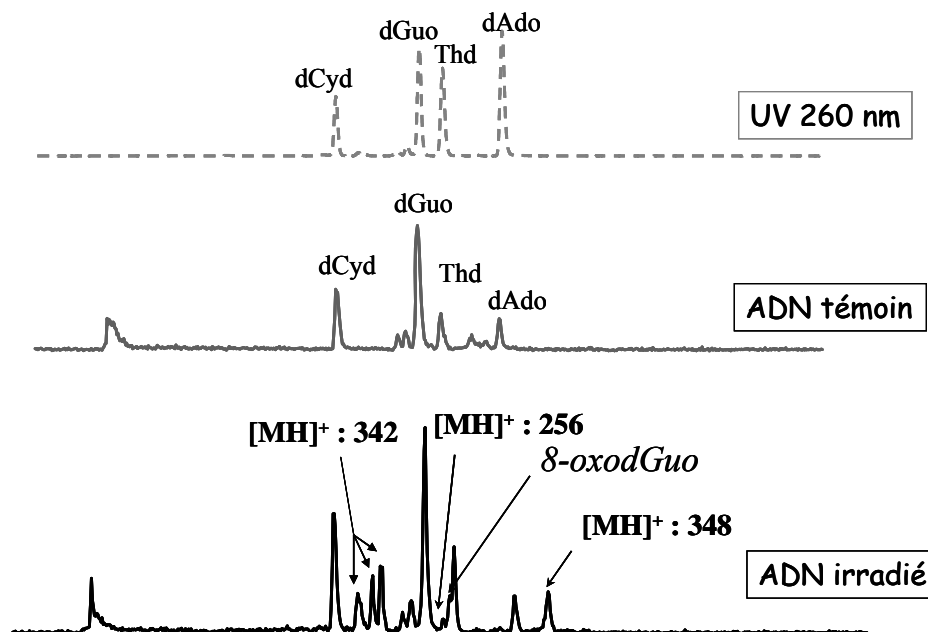


Figure 31. Chromatogrammes obtenus après digestion enzymatique et analyse de solutions d'ADN avec la méthode « perte de 116 ». Le panneau supérieur correspond à la détection UV de l'ADN témoin. Le panneau du milieu correspond à la détection par SM/SM de l'ADN témoin et le panneau du bas de l'ADN exposé à une dose de 500 Gy de rayonnement γ . Les conditions chromatographiques correspondent au gradient A.

Cependant, l'ADN ainsi analysé a été exposé à une très forte dose de rayonnement γ afin d'y détecter les lésions. A ce stade, il paraissait important d'améliorer la sensibilité de la méthode pour mesurer le niveau des lésions nouvellement détectées dans un ADN plus faiblement exposé et mettre en évidence un éventuel effet dose.

III. MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DETECTION PLUS SENSIBLE

A. Développement de la méthode

Comme nous l'avons précédemment décrit, un des moyens permettant de d'accroître la sensibilité de détection est d'utiliser une méthode « MRM ». Connaissant les masses ainsi que la principale fragmentation des lésions nouvellement détectées (perte de

116), nous pouvons donc mettre au point une méthode « MRM » spécifique de ces lésions. La méthode « MRM » ainsi développée comprend les transitions des nouvelles lésions (on parle de transition pour définir le passage de la masse de l'ion parent à celle de l'ion fils). La méthode a également été étendue à la détection de lésions déjà connues.

Tableau 4. Transitions utilisées dans la méthode « MRM ».

Lésions	Masses molaires	Modes d'ionisation	Transitions
Diols de Thd	276	-	275 → 116
8-oxo-dGuo	283	+	284 → 168
8-oxo-dAdo	267	+	268 → 152
Nouvelles lésions	341	+	342 → 226
	255	+	256 → 140
	347	+	348 → 232

Le **Tableau 4** regroupe les différentes lésions recherchées ainsi que le mode d'ionisation et les transitions associées. L'ADN isolé est alors analysé à l'aide de cette méthode « MRM », après digestion enzymatique. Les 4 nouvelles lésions sont détectables pour des doses d'irradiation bien inférieures à 500 Gy (**Figure 32**).

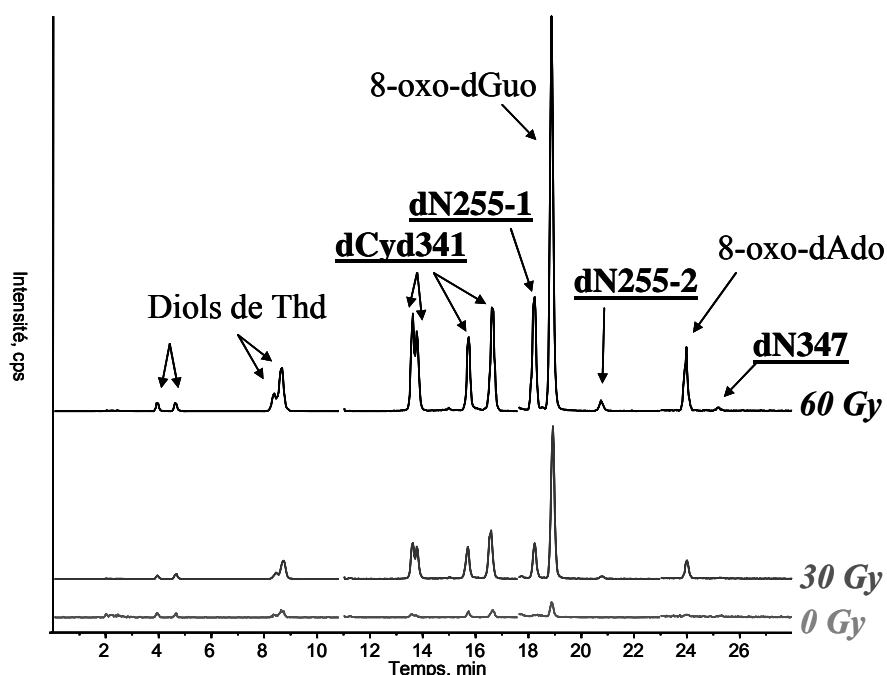


Figure 32. Chromatogrammes obtenus à l'aide de la méthode « MRM » appliquée à l'analyse de solutions aqueuses aérées à 1,5 mg/mL d'ADN isolé témoin ou exposé à une dose de 30 ou 60 Gy et digéré enzymatiquement (gradient B).

Les lésions déjà connues telles que les diols de Thd, la 8-oxo-dGuo et la 8-oxo-dAdo sont détectées et sont formées de façon proportionnelle à la dose d'irradiation, comme l'ont déjà démontré de précédentes études (Frelon *et al.*, 2000; Pouget *et al.*, 2002). En ce qui concerne les lésions nouvellement détectées, elles se forment également de façon dose-dépendante. Ces conditions chromatographiques (voir partie expérimentale pour plus de détails) font apparaître 4 pics d'élution correspondant à la nouvelle lésion nommée dCyd341, suggérant qu'elle existe sous la forme d'au moins 4 isomères. De plus, 2 pics d'élution sont maintenant détectés en utilisant la transition 256 → 140 (dN255-1 et dN255-2), l'un des produits étant élué avant la 8-oxo-dGuo et l'autre après.

B. Recherche des nouvelles lésions dans l'ADN cellulaire

Ayant gagné en sensibilité grâce à l'utilisation de la méthode « MRM », nous avons recherché les nouvelles lésions dans l'ADN cellulaire. A ces fins, des cellules monocytaires humaines de la lignée THP1 ont été exposées au rayonnement γ puis leur ADN a été extrait à l'aide d'un protocole minimisant les oxydations artificielles (Ravanat *et al.*, 2002). En effet, il est très important de ne pas oxyder l'ADN lors de son extraction, les taux de lésions au niveau cellulaire étant très faibles, cela conduirait à une nette surestimation du nombre de ces dommages. L'ADN a ensuite été digéré et analysé. Les résultats obtenus (

Figure 33), révèlent la présence dans l'ADN cellulaire de lésions déjà identifiées comme la 8-oxo-dGuo, mais également d'une des lésions nouvellement détectées, la dCyd341, à nouveau visible sous la forme de 4 pics d'élution. La dCyd341, tout comme la 8-oxo-dGuo, est présente dans les cellules non traitées, ce qui suggère qu'elle pourrait être formée dans des conditions physiologiques (tout comme la 8-oxo-dGuo est formée par le métabolisme oxydatif des cellules). N'ayant pas été en mesure de détecter les nouvelles lésions dN255-1, dN255-2 et dN347, nous ne pouvons pas conclure quant à la formation de ces lésions au niveau cellulaire. En effet, 2 possibilités sont envisageables : soit les lésions ne sont pas générées dans l'ADN cellulaire, soit elles le sont mais à des niveaux inférieurs aux seuils de détection de notre méthode.

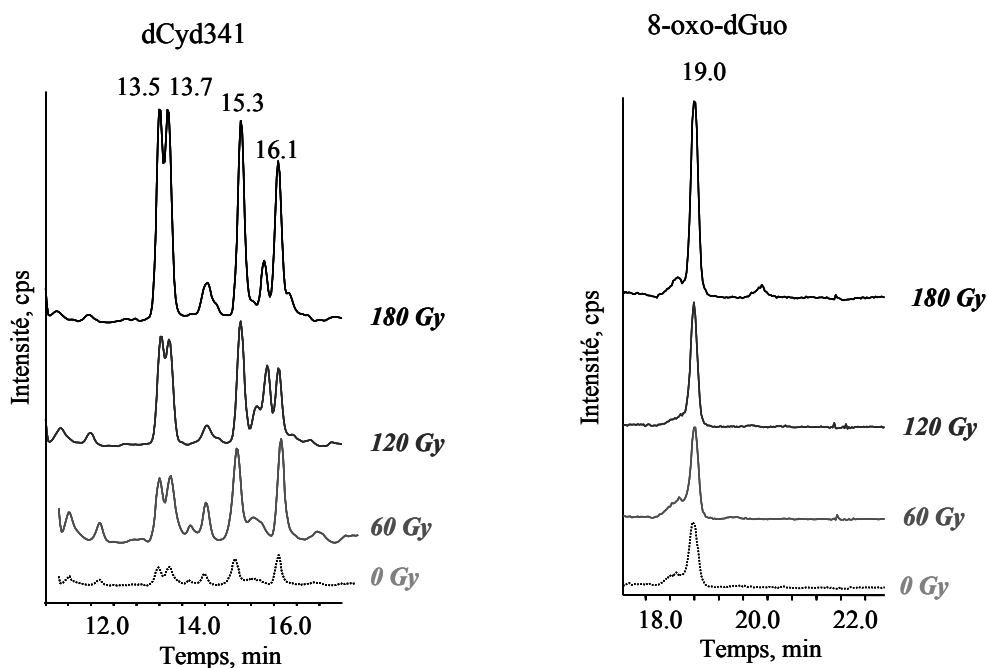


Figure 33. Chromatogrammes obtenus suite à l'analyse par CLHP-SM/SM de solutions aqueuses aérées d'ADN cellulaire non exposé ou exposé à des doses de 60, 120 ou 180 Gy de rayonnement γ puis extrait et digéré enzymatiquement. Le panneau de gauche représente la détection de la dCyd341 (transition 342 \rightarrow 226) et le panneau de droite la détection de la 8-oxo-dGuo (transition 284 \rightarrow 168).

IV. DISCUSSION

La CLHP-SM/SM représente actuellement l'un des outils analytiques les plus performants, alliant sensibilité et spécificité. Cette technique s'est révélée être un outil très efficace pour la détection de nouvelles lésions radio-induites de l'ADN. C'est cette approche qui nous a permis de détecter au moins 3 nucléosides modifiés générés par exposition de l'ADN à des rayonnements ionisants : dCyd341, dN255 et dN347. Parmi ces nucléosides modifiés, la dCyd341, présentant au moins 4 isomères, a non seulement été détectée dans de l'ADN isolé suite à une exposition aux rayonnements γ , mais également dans l'ADN de cellules non exposées, à l'aide de la méthode « MRM » développée. Cette lésion est formée de façon significative après exposition des cellules aux rayonnements γ (Regulus *et al.*, 2004). Ceci semble particulièrement intéressant puisque seulement une dizaine de lésions sur 70 sont à ce jour correctement mesurées au niveau cellulaire (Cadet *et al.*, 2002). De plus, la présence de la dCyd341 dans les cellules témoin nous met sur la voie d'un mécanisme de formation pouvant se produire à l'état physiologique dans les cellules, comme c'est le cas pour la 8-oxo-dGuo, formée dans les cellules sous l'action du stress oxydatif endogène.

Les masses de cette molécule dCyd341 et de la lésion dN347 sont bien supérieures à celles des nucléosides normaux. En effet, la dGuo, le plus lourd des nucléosides normaux a une masse de 267, soit plus de 50 uma de différence par rapport aux 2 lésions. Ceci laisse à penser que ces 2 altérations de l'ADN constituent de volumineux adduits.

La dCyd341 a particulièrement retenu notre attention durant la suite de cette étude. Sa caractérisation, notamment en termes de structure a constitué une part importante du travail.

CHAPITRE IV: CARACTERISATION D'UNE NOUVELLE LESION RADIO- INDUITE DE L'ADN

Le chapitre précédent a relaté la façon dont la dCyd341, nouvelle lésion, a été détectée dans l'ADN isolé et dans l'ADN cellulaire suite à une exposition aux rayonnements γ . Cependant, aucune information structurale n'a été obtenue avec le type d'approche utilisée. Les méthodes employées pour obtenir de telles informations sont décrites dans ce quatrième chapitre.

I. ORIGINE DE LA LESION

Afin de déterminer de quelle base normale de l'ADN provient la dCyd341, différents composés modèles ont été exposés aux rayonnements γ puis digérés enzymatiquement selon le protocole décrit dans la section « Matériels et Méthodes ». Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 5**. A titre de comparaison, la 8-oxo-dGuo, les diols de Thd et la 8-oxo-dAdo ont également été quantifiés. Comme il a été précédemment démontré, l'irradiation γ d'une solution aqueuse aérée d'ADN isolé génère ces 3 lésions ainsi que la dCyd341. En revanche, l'irradiation d'un mélange équimolaire des 4 nucléosides normaux n'entraîne pas la formation de la dCyd341. La dCyd341 est donc une lésion générée de façon significative au niveau de l'ADN mais qui n'est pas formée au niveau du nucléoside, conformément à notre hypothèse de départ. Ceci peut en partie expliquer pourquoi elle n'avait jamais été identifiée (puisque, rappelons le, la plupart des études portant sur les lésions oxydatives ont été réalisées sur des composés modèles qui sont le plus souvent des nucléosides).

L'irradiation de polynucléotides de composition différente révèle la formation de la dCyd341 uniquement dans ceux contenant de la 2'-désoxycytidine. La dCyd341 est donc un produit de modification de la base cytosine.

Nous avons également constaté que l'irradiation γ de 2'-désoxycytidine-3',5'-diphosphate (pdCp), permet de générer de la dCyd341, de même que l'irradiation de 2'-désoxycytidine -3'-monophosphate (dCMP3') suivie d'une digestion enzymatique. En revanche, la formation de dCyd341 n'est pas observée après irradiation de 2'-désoxycytidine -5'-monophosphate (dCMP5'). Ceci est un point intéressant dont l'explication nécessite la compréhension du mécanisme de formation de la lésion. Nous y reviendrons donc ultérieurement.

Tableau 5. Formation (+) ou non (-) de différentes lésions générées après exposition à des rayonnements γ de solutions aqueuses aérées d'ADN à 1,5 mg/ml, d'un mélange des 4 nucléosides à 0,5 mM ou de polynucléotides à 0,5 mM. Les échantillons ont été exposés à une dose de 45 Gy de rayonnement ionisant. Dans le cas de l'ADN, des polynucléotides, des nucléotides et de la pdCp, une digestion enzymatique est réalisée. Les nucléosides sont analysés directement après irradiation, sans digestion préalable.

	8-oxo-dGuo	Diols de Thd	8-oxo-dAdo	dCyd341
ADN	+	+	+	+
nucléosides	+	+	+	-
Poly(dG-dC)	+	-	-	+
Poly(dA-dT)	-	+	+	-
Poly(dC)	-	-	-	+
Poly(dA)	-	-	+	-
Poly(dT)	-	+	-	-
pdCp	-	-	-	+
dCMP3'	-	-	-	+
dCMP5'	-	-	-	-

II. STRUCTURE DE LA DCYD341

Après avoir démontré que la dCyd341 est un produit de modification de la cytosine, nous avons cherché à déterminer sa structure.

A. Structure hypothétique

Etant donnée la masse moléculaire élevée de la lésion par rapport aux nucléosides normaux, nous avons pensé qu'il devait s'agir d'un volumineux adduit de la dCyd. Cet adduit pourrait être formé par l'addition d'un composé aldéhydique, issu de l'oxydation du dR par les $\cdot\text{OH}$, sur la dCyd. Nous avons confirmé cette hypothèse au cours des expériences présentées par la suite. Une structure a été proposée (**Figure 34**), elle correspond bien à une molécule de 341 uma et la formule brute associée est $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7$.

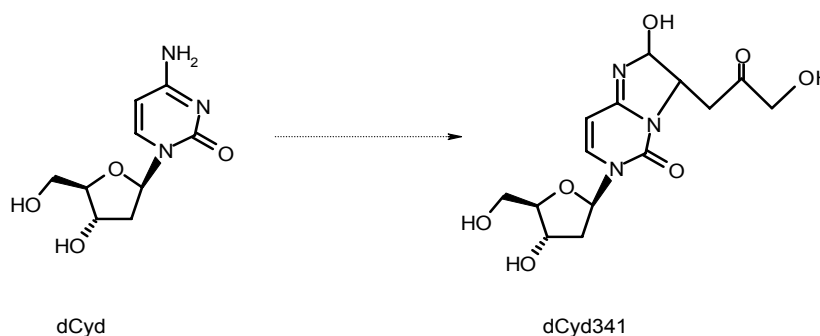


Figure 34. Structure hypothétique de la dCyd341, lésion formée à partir de la dCyd.

B. Détermination de la masse exacte de la lésion

1. Purification de dCyd341 à partir d'ADN exposé aux rayonnements γ

La détermination de la masse exacte d'une molécule permet d'avoir accès à sa formule brute. Dans le but de réaliser de telles analyses, la dCyd341 a été purifiée à partir de solutions aqueuses aérées d'ADN de thymus de veau. L'ADN a été exposé aux rayonnements γ puis digéré en un mélange de nucléosides. L'étape la plus importante et la plus délicate a consisté à purifier la dCyd341 à partir de ce mélange de nucléosides majoritairement constitué de nucléosides normaux mais contenant également une grande variété de nucléosides oxydés. Une purification par CLHP en utilisant le spectromètre de masse comme détecteur, en plus du détecteur UV, a été effectuée en 2 étapes, chaque étape faisant appel à des conditions chromatographiques différentes. Ce moyen supplémentaire de détection a été choisi en raison de sa plus grande sensibilité et de sa plus grande spécificité par rapport à un détecteur UV. En effet, du fait de la présence de nombreux nucléosides normaux et modifiés dans la solution d'ADN exposé aux rayonnements γ puis digéré, de nombreux pics d'absorption UV sont observables et saturent le détecteur. L'intensité des pics d'absorption UV correspondant à la dCyd341 est infime par rapport à ceux d'autres espèces ; l'augmentation de la sensibilité de la méthode était donc nécessaire. La spécificité de la détection par spectrométrie de masse nous permet de sélectivement collecter les fractions correspondant aux pics portant la transition caractéristique de la lésion. Un schéma du montage utilisé est présenté en **Figure 35**.

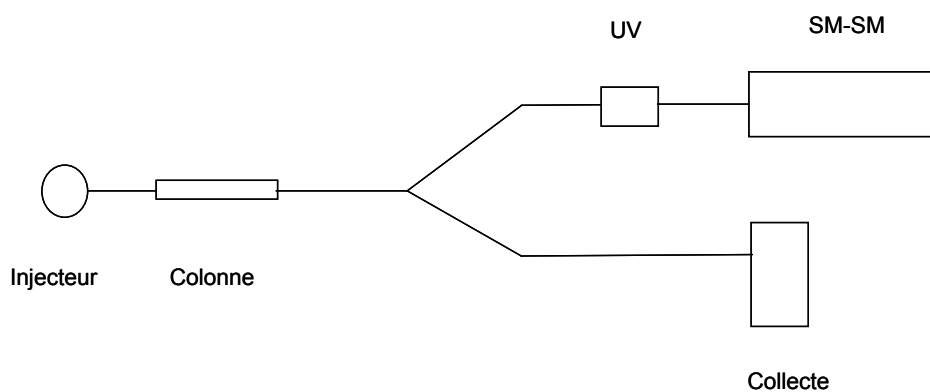


Figure 35. Montage utilisé pour la purification de dCyd341 à partir de solutions aqueuses aérées d'ADN exposé aux rayonnements γ puis digéré enzymatiquement.

Une dérivation a été installée en sortie de colonne chromatographique de façon à diriger une infime fraction de la solution analysée vers le détecteur UV et le spectromètre de masse, le restant étant collecté. Ainsi, le débit total est mesuré en sortie de colonne puis dans la fraction collectée, et la longueur des capillaires respectifs est ajustée de façon à ce que 10 % du débit soit dirigé vers le spectromètre de masse et 90 % vers la collecte. La boucle d'injection étant de 500 μ L, les injections sont répétées plusieurs fois.

La première étape de purification, effectuée sur une colonne à greffage octadecyl silyl (C18), permet de collecter séparément les isomères correspondant aux 4 pics d'élution de la dCyd341. Les 2 premiers pics d'élution sont très proches l'un de l'autre de telle sorte que les isomères de la dCyd341 sont légèrement « mélangés ». Les 2 derniers pics sont élués en même temps que la dGuo correspondant à un pic d'absorption UV très intense. Une seconde purification, utilisant des conditions chromatographiques différentes s'est alors imposée. Les différentes fractions collectées lors de la première purification ont été lyophilisées puis injectées sur une colonne Hypercab placée dans le même montage que pour la première purification. Ainsi, les isomères correspondant aux 2 premiers pics ont parfaitement pu être séparés. Malheureusement, les autres isomères n'ont pas pu être purifiés car ils sont élués à une trop grande proximité de la dGuo, même dans ces conditions.

2. Détermination de la masse exacte

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr Jörg Hau du centre de recherche Nestlé en Suisse, des analyses visant à déterminer la masse exacte des isomères correspondant aux deux premiers pics de la dCyd341 ont été réalisées, par spectrométrie de masse haute résolution sur la dCyd341 purifiée à partir d'ADN exposé aux rayonnements γ . La masse exacte mesurée de l'ion parent monochargé de la dCyd341 est de 342,1310. Ceci correspond, avec une différence de seulement 4 ppm, à la masse théorique (342,1296) d'une molécule de formule brute $C_{14}H_{19}N_3O_7$, ce qui, rappelons-le, est la formule brute de la dCyd341, d'après l'hypothèse de structure proposée. Dans la logique de notre hypothèse, puisque la formule brute de la dCyd est $C_9H_6N_3O_4$, celle de l'aldéhyde venu s'ajouter est $C_5H_6O_3$. Nous avons voulu vérifier que la dCyd341 est un adduit de cet aldéhyde.

C. Caractérisation par résonance magnétique nucléaire (RMN) de l'adduit formé entre la dCyd et l'aldéhyde

1. Synthèse chimique de cet adduit

Une approche efficace pour confirmer la structure d'une lésion consiste à synthétiser la molécule proposée et à finement la caractériser. La résonance magnétique nucléaire (RMN) est alors un outil de choix. Pour synthétiser la dCyd341 par voie chimique, une adaptation de la synthèse de la 6-(2-désoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3-(2-oxopropyl)imidazo[1,2c]pyrimidin-5(6H)-one (structure présentée en **Figure 36**), décrite par Rentel et ses collaborateurs (Rentel *et al.*, 2005), a été effectuée. Cette molécule ne diffère de la structure hypothétique de la dCyd341 que par la présence d'un groupement méthyle terminal à la place du groupement CH₂-OH de la dCyd341.

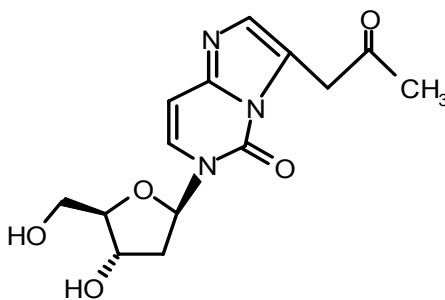


Figure 36. Structure de la 6-(2-désoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3-(2-oxopropyl)imidazo[1,2c]pyrimidin-5(6H)-one.

La synthèse consiste à élaborer un intermédiaire aldéhydique et à le faire réagir sur la dCyd. Dans le cas de la synthèse décrite par Rentel, l'aldéhyde réactif est le 4-oxo-2-penténal, formé à partir du 2-méthylfuran. Sa réaction avec la dCyd est présentée en **Figure 37 A**. Dans notre cas, un intermédiaire aldéhydique acétylé dont la formule brute sans le groupement acétyle est bien C₅H₆O₃, a été synthétisé à partir d'acétate de furfurylméthyle commercial. Puis, la réaction entre cet intermédiaire et la dCyd protégée par un groupement diméthoxytrityl a été effectuée **Figure 37 B**. La molécule résultante a alors été déprotégée en 2 étapes : la désacétylation en présence d'un mélange méthanol/ammoniaque et l'élimination du groupement DMTr par traitement à l'acide trifluoroacétique. Puis, le produit obtenu a été purifié par CLHP.

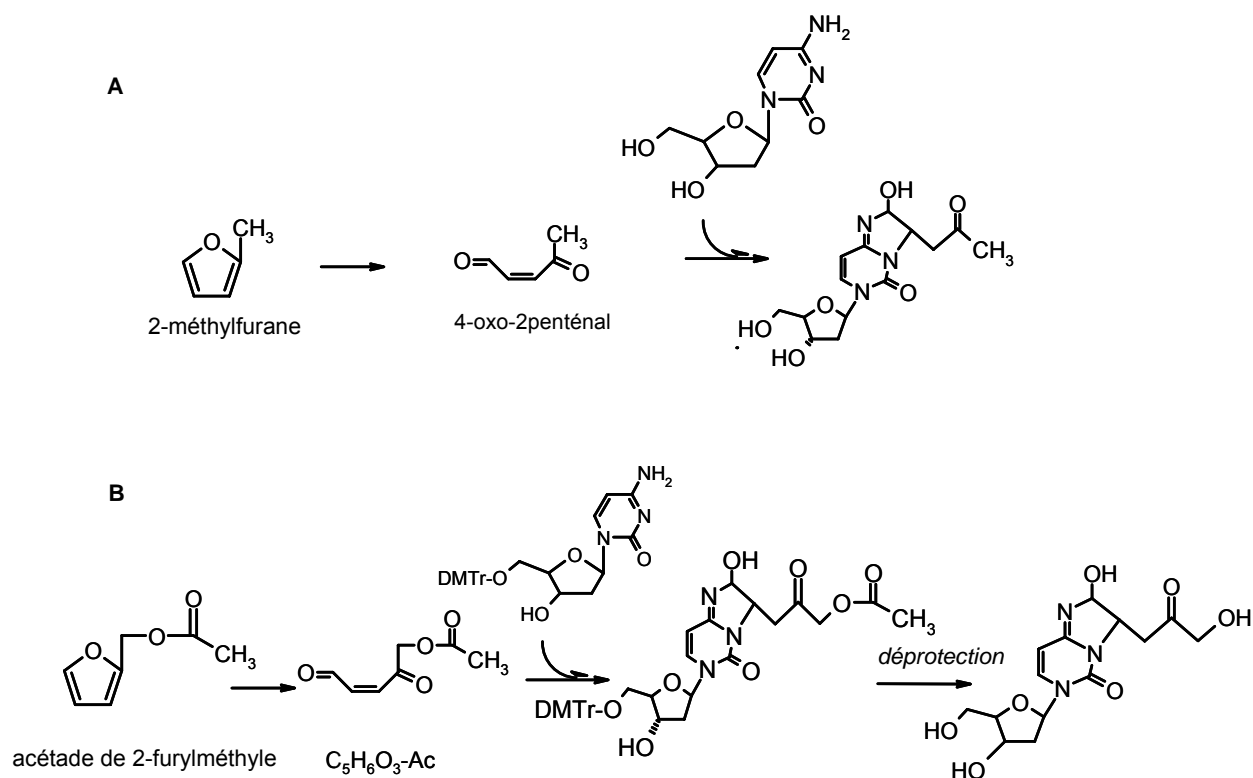


Figure 37. Réaction décrite par Rental (A) et adaptation de cette réaction à la synthèse de dCyd341 (B). DMTr représente le groupement protecteur diméthoxytrityl, et Ac le groupement acétyle.

La molécule ainsi synthétisée a été analysée par CLHP-SM/SM avec la méthode MRM de détection de la dCyd341. Comme il est possible de le voir sur la **Figure 38**, la lésion synthétisée est bien éluée sous la forme de 3 pics chromatographiques (les 2 premiers pics n'étant pas distinctement séparés) et la transition correspondant à ces pics est bien celle de la dCyd341 (342 → 226). Ainsi, la molécule synthétisée correspond bien à la dCyd341 isolée à partir d'ADN.

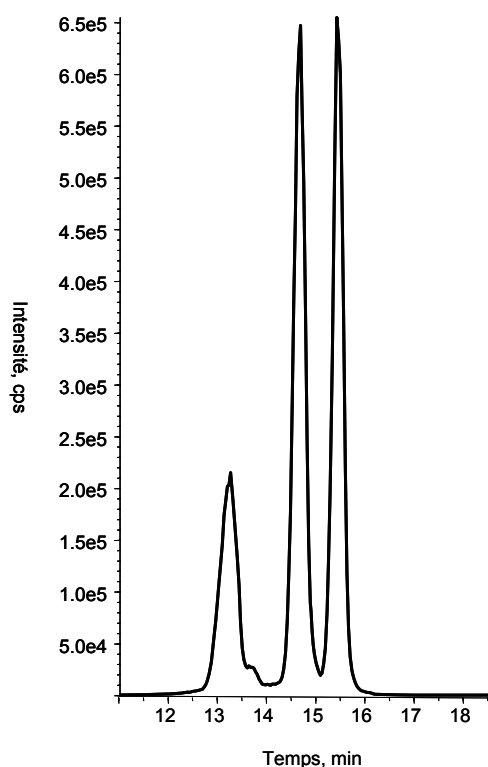


Figure 38. Chromatogramme correspond à l'analyse, à l'aide la méthode « MRM » de détection de la dCyd341, de la lésion synthétisée par voie chimique (gradient B).

2. Caractérisation de la dCyd341 par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La dCyd341 ainsi synthétisée a été analysée par RMN. Le spectre RMN 1D du proton correspondant est représenté en **Figure 39** pour le ou les isomère(s) correspondant au dernier pic chromatographique. Des spectres similaires ont été obtenus pour tous les autres isomères. L'attribution de tous les protons de la molécule est en accord avec la structure de la dCyd341. Le nom exact de la molécule est 6-(2-désoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-2-hydroxy-3-(3-hydroxy-2-oxopropyl)-2,6-dihydroimidazo[1,2-*c*]pyrimidin-5(3*H*)-one, mais par soucis de simplification, nous continuerons de parler de la dCyd341.

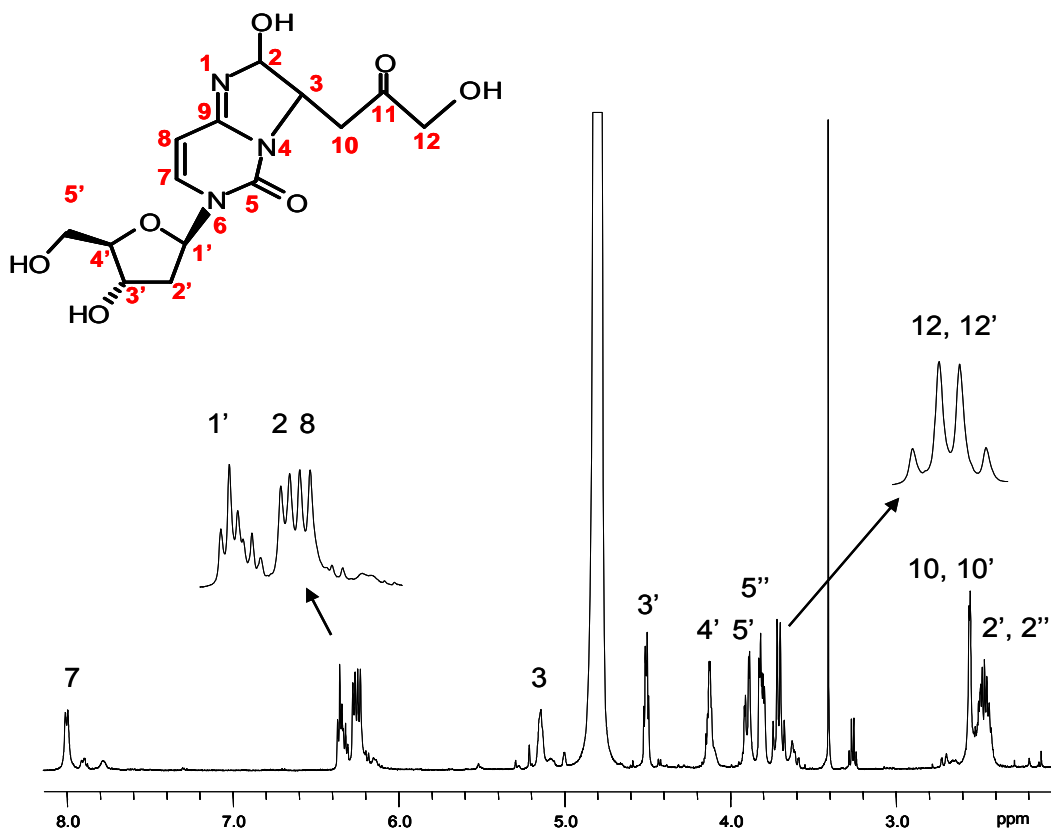


Figure 39. Spectre RMN 1D du ¹H du ou des isomères(s) correspondant au dernier pic d'éluion chromatographique de la dCyd341.

L'analyse par RMN-COSY (**Figure 40**) du même isomère de la dCyd31 permet de mettre en évidence les couplages scalaires entre les différents protons de la molécule. Ainsi, le proton 7 de la molécule est bien couplé avec le proton 8, et le proton 3 est bien couplé avec les protons 10/10' et 2.

L'ensemble de ces données valide l'hypothèse de structure émise pour la dCyd341.

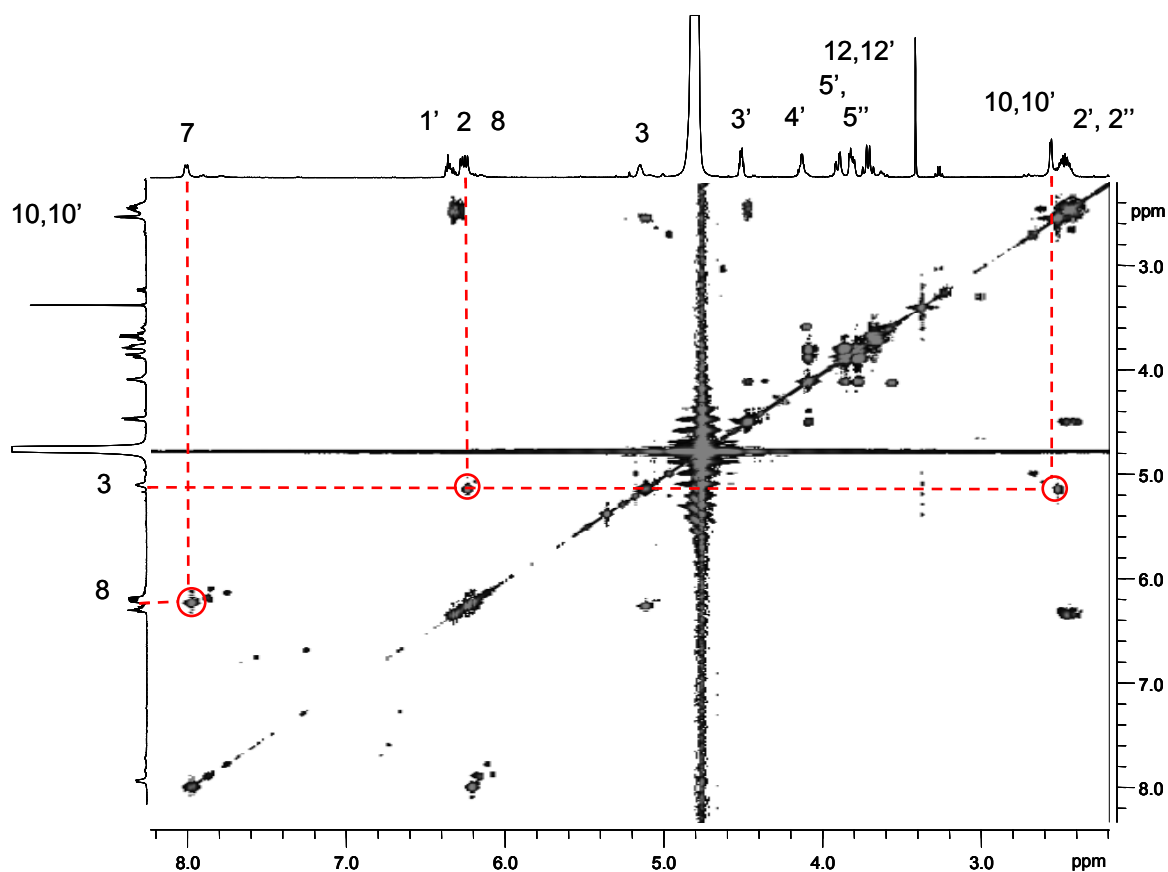


Figure 40. Spectre RMN-COSY du ou des isomères(s) correspondant au dernier pic d'élution chromatographique de la dCyd341.

D. Propriétés d'absorption UV de la dCyd341

1. Spectres UV

Pour aller plus loin dans la caractérisation de la dCyd341, ses propriétés d'absorption de la lumière UV ont été analysées. Les spectres UV de chaque isomère de la lésion ont été effectués (**Figure 41**). Ces spectres sont très proches de celui de la dCyd avec des maximums d'absorption situés autour de 280 nm et de légers épaulements dans la région des 210 nm, ce qui indique que l'aromaticité de la base n'est pas considérablement modifiée par la structure de la lésion.

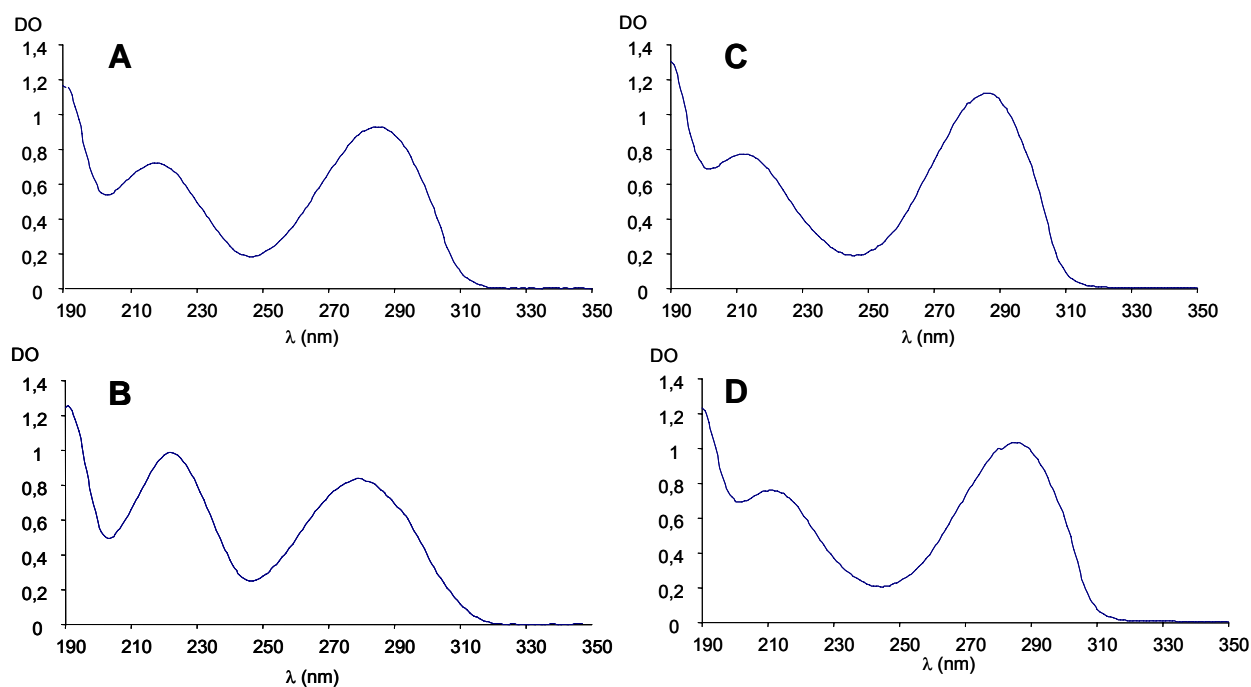


Figure 41. Spectres d'absorption UV des différents isomères de la dCyd341 (A, B, C, D : isomère(s) correspondant respectivement au 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} pics chromatographiques).

2. Détermination du coefficient d'extinction molaire de la dCyd341

En vue de calculer le coefficient d'extinction molaire ϵ de la dCyd341 à 280 nm, l'acquisition de données RMN pour la dCyd et la lésion a été réalisée simultanément en utilisant un tube de RMN muni d'un insert (**Figure 42**), de façon à ne pas mélanger les 2 solutions. Cette analyse de RMN a pour but de déterminer la concentration d'une solution de dCyd341 (l'aire des pics étant proportionnelle à la quantité de produit), pour pouvoir ensuite en déduire son ϵ , par l'application de la loi de Beer-Lambert. La quantité relative de lésion par rapport à la dCyd, tenant lieu de standard interne, a été calculée en utilisant le rapport des intégrations des pics correspondant aux protons 6 de la dCyd et 7 de la dCyd341. Une correction des résultats tenant compte du rapport volumique entre le tube et son insert (R_{ti}) est effectuée. Cette approche avait précédemment été utilisée pour la calibration de solutions d'oxazolone et de 4-hydroxy-8-oxo-4,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (Ravanat *et al.*, 2000b).

Une fois la concentration de la dCyd341 déterminée, un spectre UV de la même solution a été réalisé, et la loi de Beer-Lambert a permis de déterminer le ϵ de la lésion à partir de son absorbance UV à 280 nm :

$$A = \epsilon l c$$

Où A représente l'absorbance à une longueur d'onde donnée (ici 280 nm),

ϵ , le coefficient d'extinction molaire de la molécule à cette même longueur d'onde, en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$,

l , la profondeur de la cuve, qui est ici égale à 1 cm,

c , la concentration de la solution, en $mol.L^{-1}$.

La concentration d'une solution aqueuse de dCyd341 a ainsi été déterminée à 0,52 mM pour une absorbance à 280 nm de 0,69 dans le cas d'une solution diluée au 1/10. Le ϵ calculé est donc de $13270 L.mol^{-1}.cm^{-1}$. La connaissance du coefficient d'extinction molaire de la dCyd341 nous a permis de préparer des solutions calibrées de la lésion, qui ont été utiles pour la quantification de cette lésion dans l'ADN (calibration externe).

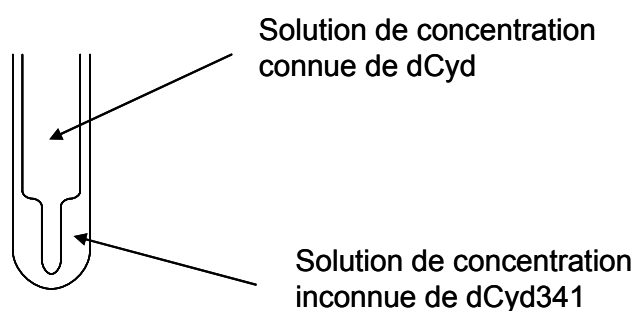


Figure 42. Montage utilisé pour la détermination du coefficient d'extinction molaire de la dCyd341.

E. Etude comparative entre la dCyd341 et l'adduit dCyd-butènedialdéhyde

La structure de la dCyd341 est très proche de celle de l'adduit formé entre la dCyd et le 2-butène-1,4-dialdéhyde (également appelé 1,4-dioxo-2-butène ou butènedialdéhyde), longuement étudié par le groupe de Peter Dedon (Bohnert *et al.*, 2004; Gingipalli & Dedon, 2001). Cet adduit est formé après attaque de l'amine exocyclique de la dCyd sur le butènedialdéhyde (**Figure 43**). L'adduit est en équilibre entre une forme ouverte et une forme fermée. Le butènedialdéhyde est également capable de réagir avec la dGuo et la dAdo (Byrns *et al.*, 2002).

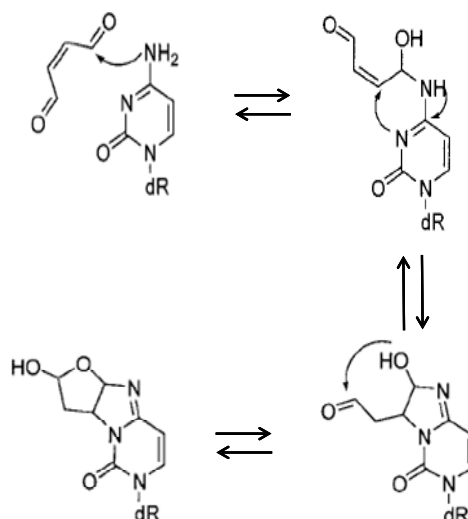


Figure 43. Mécanisme de formation de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde (d'après (Gingipalli & Dedon, 2001) et (Byrns *et al.*, 2002)). dR représente le résidu 2-désoxyribose.

Il nous a semblé intéressant de comparer certaines données concernant cet adduit avec celles que nous avons obtenues pour la dCyd341.

1. Synthèse chimique de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde

Dans un premier temps, la synthèse chimique de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde a été effectuée. L'adduit, qui peut être en équilibre entre une forme ouverte et une forme fermée (**Figure 44**), présente 4 diastéréoisomères dus à la présence de carbones asymétriques sur la molécule. La synthèse se fait en deux étapes : dans une première étape le trans-2-butène-1,4-dialdéhyde est synthétisé suivant le protocole décrit par Chen et ses collaborateurs ((Chen *et al.*, 1995a)) et dans une seconde étape ce composé est mis à réagir avec la dCyd de façon à former l'adduit. Des phases de purification sont nécessaires.

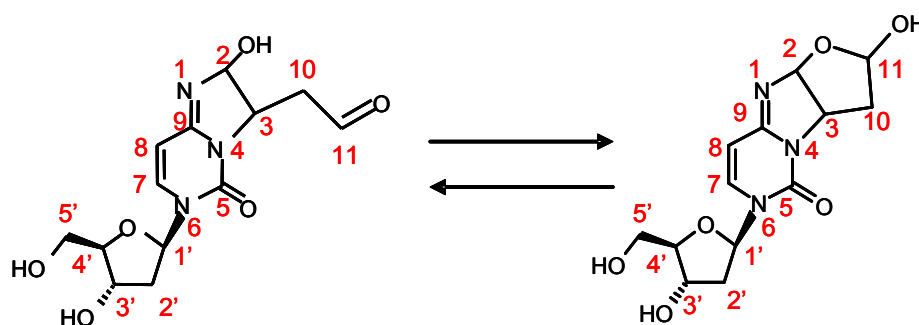


Figure 44. Équilibre entre les formes ouverte et fermée de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde.

2. Comparaison des données UV

Les conditions chromatographiques utilisées permettent d'obtenir 2 pics d'éluion, chacun correspondant à un mélange de 2 isomères. Ceci est en accord avec les synthèses et purifications réalisées précédemment par d'autres auteurs (Gingipalli & Dedon, 2001). Nous parlerons des isomères 1 et 2 pour qualifier les produits correspondant au premier pic d'éluion et des isomères 3 et 4 pour ceux correspondant au second pic. Les 4 isomères, purifiés 2 par 2, présentent des spectres UV tout à fait similaires représentés sur la **Figure 45**. De plus, ces profils d'absorption UV sont très proches de ceux observés pour la dCyd341 (**Figure 41**), ce qui est en accord avec l'idée que les 2 molécules ont des structures voisines. Les 2 molécules ne présentent pas de significative modification d'aromaticité par rapport à la dCyd.

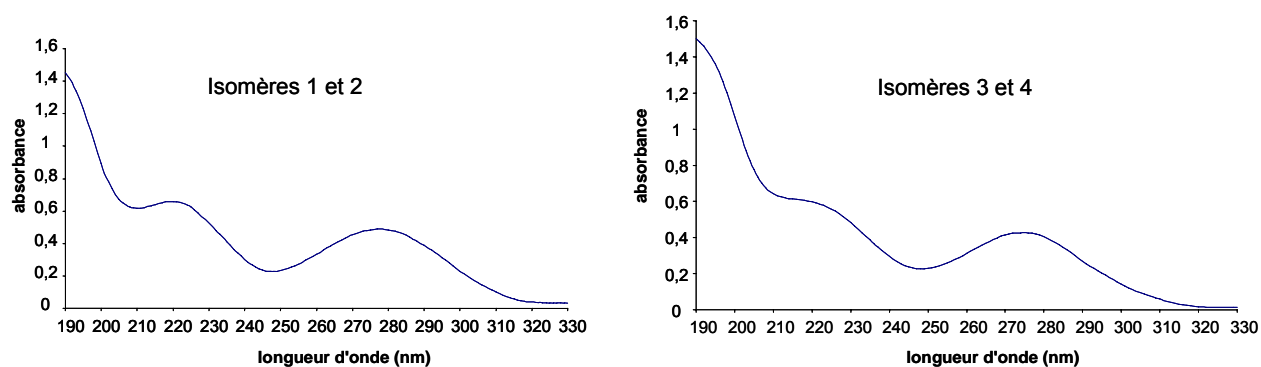


Figure 45. Spectres d'absorption UV des 4 isomères de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde.

3. Détermination du coefficient d'extinction molaire de l'adduit

Nous avons voulu savoir si les similitudes de structure entre la dCyd341 et l'adduit dCyd-butènedialdéhyde se traduisent par des valeurs voisines de leurs coefficients d'extinction moléculaire.

Le ϵ de l'adduit à 280 nm a donc été calculé par une approche analogue à celle employée pour la dCyd341. Nous avons obtenu une valeur de ϵ de 11500, relativement proche de la valeur de 13270 calculée pour la dCyd341.

4. Existe-t-il deux conformations de la dCyd341 ?

Tout comme pour l'adduit formé entre la dCyd et le butènedialdéhyde, il est possible d'envisager un équilibre entre une forme ouverte de la dCyd341 et une forme fermée (**Figure 46**), les spectres RMN du proton ne permettant pas de distinguer les 2 formes. Cependant, le carbone 11 de la dCyd341 correspond à une fonction cétone (due à la présence d'un CH₂-OH), tandis que dans le cas de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde, il s'agit d'une fonction aldéhyde. La réactivité d'une fonction cétone étant plus faible que celle d'une fonction aldéhyde, il est probable que dans le cas de la dCyd341 ce carbone réagisse peu, ce qui déplace l'équilibre vers la forme ouverte.

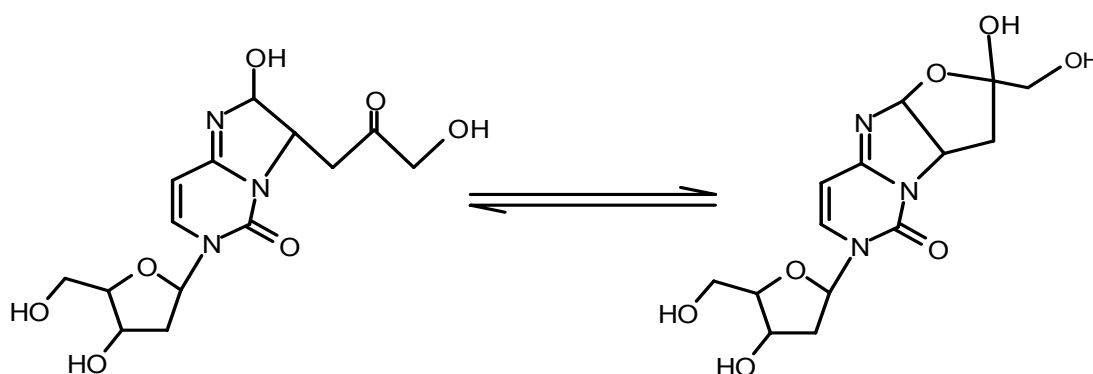


Figure 46. Possible équilibre entre 2 conformations de la dCyd341.

F. Etude de la fragmentation de la dCyd341 : amélioration de la méthode « MRM »

L'étude des caractéristiques de fragmentation de la dCyd341 a été effectuée en vue d'améliorer la méthode « MRM » de détection. En effet, la méthode « MRM » jusque là utilisée se base sur la seule fragmentation connue de la dCyd341, à savoir la perte du 2-désoxyribose de 116 uma, correspondant à la transition 342 → 226. Cette fragmentation se produit lorsque l'énergie de collision appliquée au niveau du quadripôle Q2 est de 15 eV. Nous avons voulu savoir si d'autres fragmentations se produisent à de plus fortes énergies de collision. Pour cela, le SM/SM a été utilisé en mode « *Product Ion Scan* » en sélectionnant en Q1 l'ion de masse 342 (**Figure 47**).

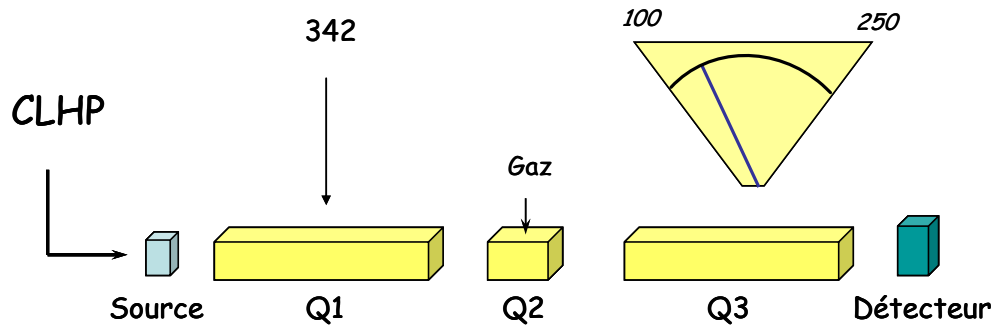


Figure 47. Recherche des produits de fragmentation de la dCyd341.

Lorsque l'énergie de collision est augmentée à 40 eV, des profils de fragmentation différents de celui observé à 15 eV sont obtenus, comme le montre la **Figure 48**.

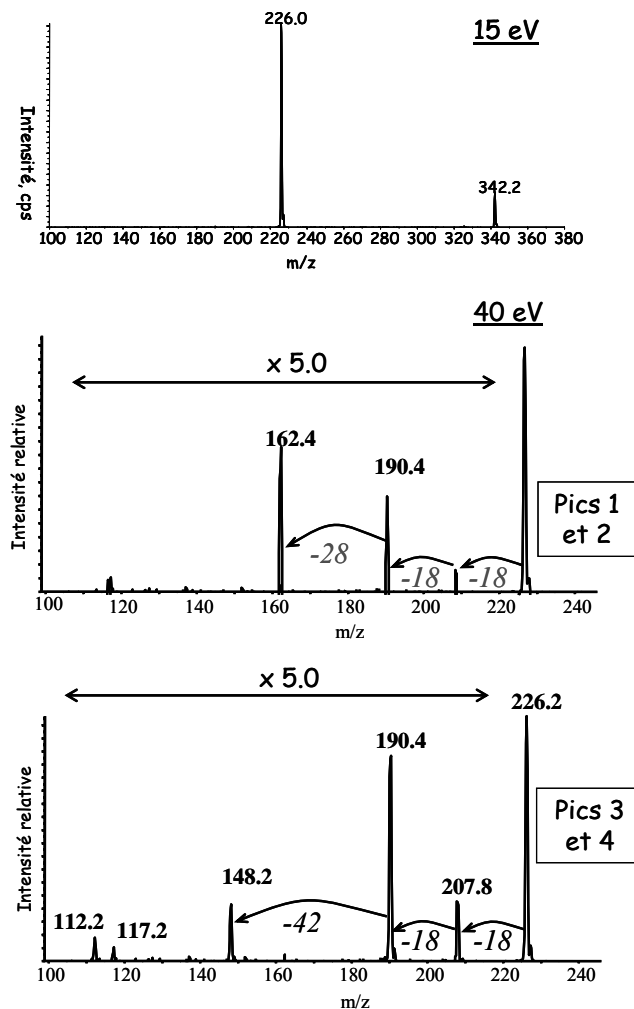


Figure 48. Spectres de fragmentation de l'ion parent protoné de dCyd341 en solution aqueuse. Le panneau supérieur est le spectre obtenu avec une énergie de collision de 15 eV, les 2 panneaux inférieurs correspondent à une énergie de 40 eV. Avec cette énergie, aucun fragment de m/z supérieur à 240 uma n'est détecté.

Les isomères correspondant aux 2 premiers pics élués ne se fragmentent pas de la même façon que ceux correspondant aux 2 pics plus tardivement élués. Le premier groupe d'isomères perd successivement deux fragments de 18 uma pouvant correspondre à deux molécules d'eau, pour donner un ion de 190 uma. La perte d'un fragment de 28 uma peut ensuite se produire. L'ion majoritairement obtenu, dans ce cas, a une masse de 162 uma. Quant au second groupe d'isomères, il perd également deux fragments de 18 uma conduisant à un ion majoritaire de 190 uma, avant de perdre un fragment de 42 uma, engendrant un ion minoritaire de 148 uma.

Nous disposons ainsi d'informations supplémentaires concernant la fragmentation de la molécule dCyd341. L'ajout de ces données au sein de la méthode « MRM » nous permet d'accroître la spécificité de détection. En effet, la probabilité de détecter un contaminant de même masse que la dCyd341 et se fragmentant de la même manière est d'autant plus réduite que le nombre de fragmentations spécifiques de la lésion est important. La méthode « MRM améliorée » prend donc en compte 4 transitions permettant de détecter la dCyd341 :

- Les transitions $342 \rightarrow 226$ et $342 \rightarrow 190$ sont caractéristiques de tous les isomères de la dCyd341.
- La transition $342 \rightarrow 162$ permet de détecter uniquement les isomères correspondant aux 2 premiers pics d'élution de la dCyd341.
- La transition $342 \rightarrow 148$ est retrouvée dans le cas des isomères correspondant aux 2 derniers pics.

Un exemple de chromatogramme obtenu avec la méthode de détection ainsi développée est donné en **Figure 49**.

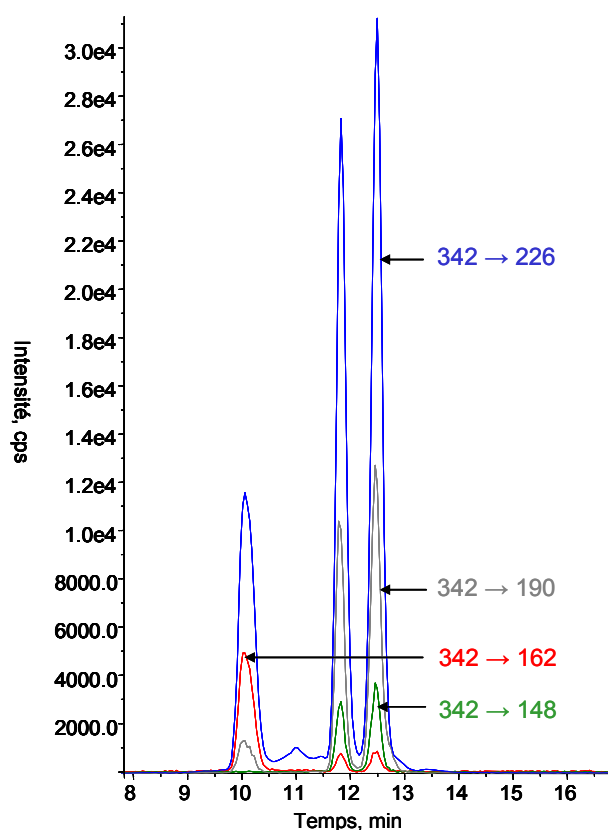


Figure 49. Solution aqueuse aérée d'ADN à 1,5 mg/mL exposée à une dose de 10 Gy rayonnement γ , digérée enzymatiquement et analysée en utilisant la méthode de détection « MRM améliorée » pour la mesure du niveau de dCyd341 (conditions chromatographiques correspondant au gradient C)

Durant toute la suite de l'étude, c'est cette méthode « MRM améliorée » qui est utilisée pour détecter la dCyd341.

III. MECANISME DE FORMATION DE LA DCYD341

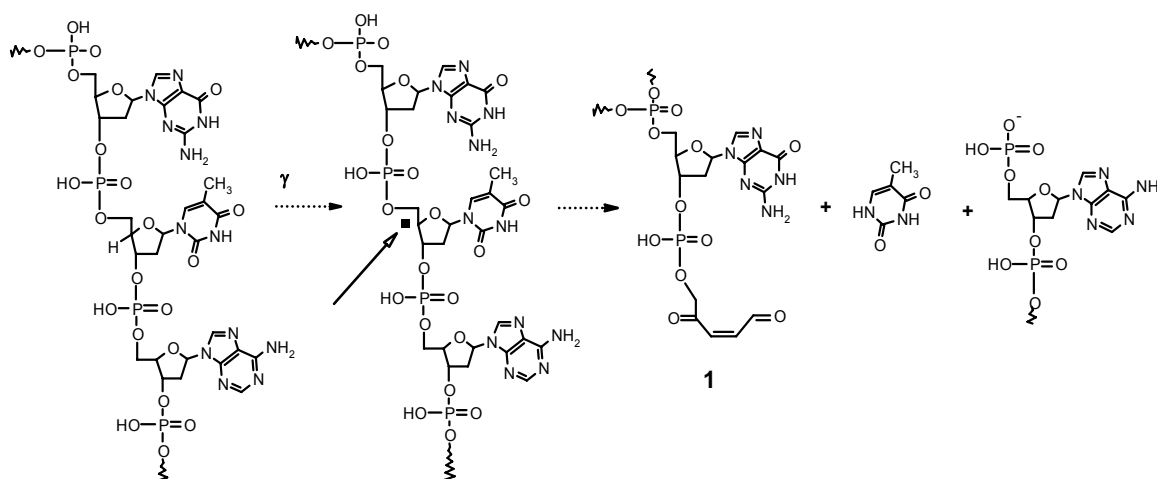
La connaissance de la structure de la dCyd341 nous a permis de proposer un mécanisme pouvant conduire à sa formation.

A. Schéma général du mécanisme de formation proposé

Le mécanisme proposé implique l'oxydation en position 4 d'un résidu 2-désoxyribose, conduisant à la formation d'un radical centré sur le carbone. Ce radical évolue pour former, entre autres composés, un intermédiaire aldéhydique 1 (**Figure 50 A**). De façon

similaire à la réaction du butènedialdéhyde, cet intermédiaire peut réagir avec une 2'-déoxycytidine voisine pour former un adduit, qui après digestion enzymatique possède une masse moléculaire de 341 uma et correspondrait à la lésion dCyd341 (**Figure 50 B**).

A



B

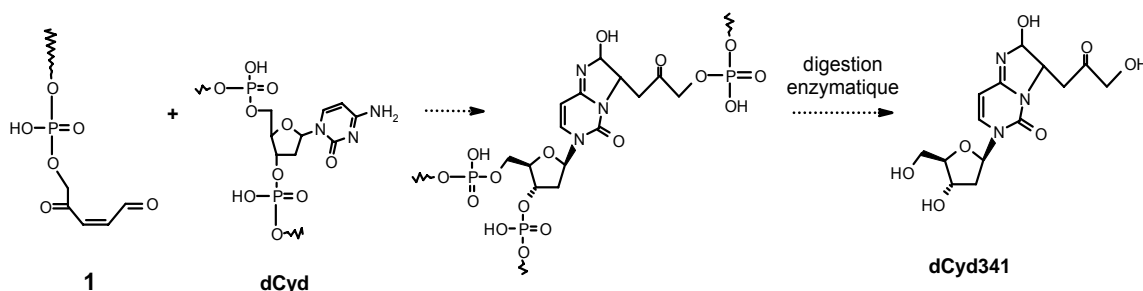


Figure 50. Mécanisme général proposé pour la formation radiolytique de la dCyd341. Le mécanisme A représente la formation de l'intermédiaire aldéhydique 1, via la formation d'un radical (fléché). Le mécanisme B représente la formation de la lésion à partir de la réaction entre 1 et une dCyd.

Le fait que l'aldéhyde 1 (présentant une certaine homologie de structure avec le butènedialdéhyde) ou un de ses précurseurs soit un produit de dégradation du 2-désoxyribose après oxydation en position 4, a été rapporté par plusieurs auteurs (Chen & Stubbe, 2004; Kim *et al.*, 2003; Pogozelski & Tullius, 1998; Worth *et al.*, 1993). De façon très intéressante, Bernt Giese et ses collaborateurs ont démontré que cet aldéhyde ne peut pas se former si la fonction 3'-OH du 2-désoxyribose n'est pas estérifiée (Giese *et al.*, 1995a). Cela explique pourquoi l'exposition aux rayonnements γ de nucléosides ou de dCMP5' ne conduit pas à la formation de dCyd341 (**Tableau 5**). En effet, si l'intermédiaire aldéhydique 1 n'est pas généré alors la dCyd341 ne peut pas se former.

B. Oxydation en position 4 du 2-désoxyribose

Le premier évènement du mécanisme proposé est l'oxydation en position 4 du 2-désoxyribose.

1. Oxydation en position 4 du 2-désoxyribose

Compte tenu du mécanisme proposé, toute molécule capable d'oxyder le 2-désoxyribose en position 4 est susceptible de générer de la dCyd341. Des composés de la famille des bléomycines, agents antitumoraux capables de spécifiquement oxyder le 2-désoxyribose à cette position (Stubbe & Kozarich, 1987; Dedon & Goldberg, 1992; Chen & Stubbe, 2005) ont été utilisés afin de vérifier la survenue d'un tel évènement dans la formation de la dCyd341.

Les bléomycines regroupent un ensemble de glycopeptides originellement isolés de *Streptomyces verticillus* (Umezawa *et al.*, 1966) et utilisés dans des protocoles de chimiothérapie notamment contre les cancers des testicules et certains types de lymphomes. Leur activité anti-tumorale est attribuée à leur capacité à dégrader l'ADN, les bléomycines engendrant des CSB et des CDB (Harsch *et al.*, 2000), ainsi que des aberrations chromosomiques (Yu *et al.*, 2002). Cette activité des bléomycines est médiée par la présence d'une molécule de dioxygène et d'un ion métallique. Trois domaines fonctionnels constituent les molécules de la famille des bléomycines (**Figure 51**): un domaine de liaison au métal, un domaine de liaison à l'ADN correspondant à une queue bithiazole avec une région riche en charges positives et un motif disaccharidique. La queue bithiazole a une structure différente d'une bléomycine à l'autre et agit en collaboration avec le groupement pyrimidine pour médier l'interaction avec l'ADN (Chen & Stubbe, 2005). Le rôle du motif disaccharidique, constitué d'un α -L-gulose et d'un α -D-mannose, n'est pas clairement défini. D'après certains auteurs, les déglycobléomycines ont une affinité réduite pour l'ADN et une efficacité moindre à générer des CDB (Tounekti *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1998). En revanche, d'autres auteurs rapportent que les activités de coupure de l'ADN, évaluées par la capacité des substances à relaxer un ADN plasmidique, de la déglycobléomycine A2 et de la molécule originale sont analogues (Leitheiser *et al.*, 2000). Nos expériences ont été réalisées à l'aide d'un mélange commercial de bléomycines constitué de 70 % environ de bléomycine A2 et 30 % de bléomycine B2. Ce mélange correspond à la forme administrée au cours des traitements cliniques et connue sous le nom de bleonoxane.

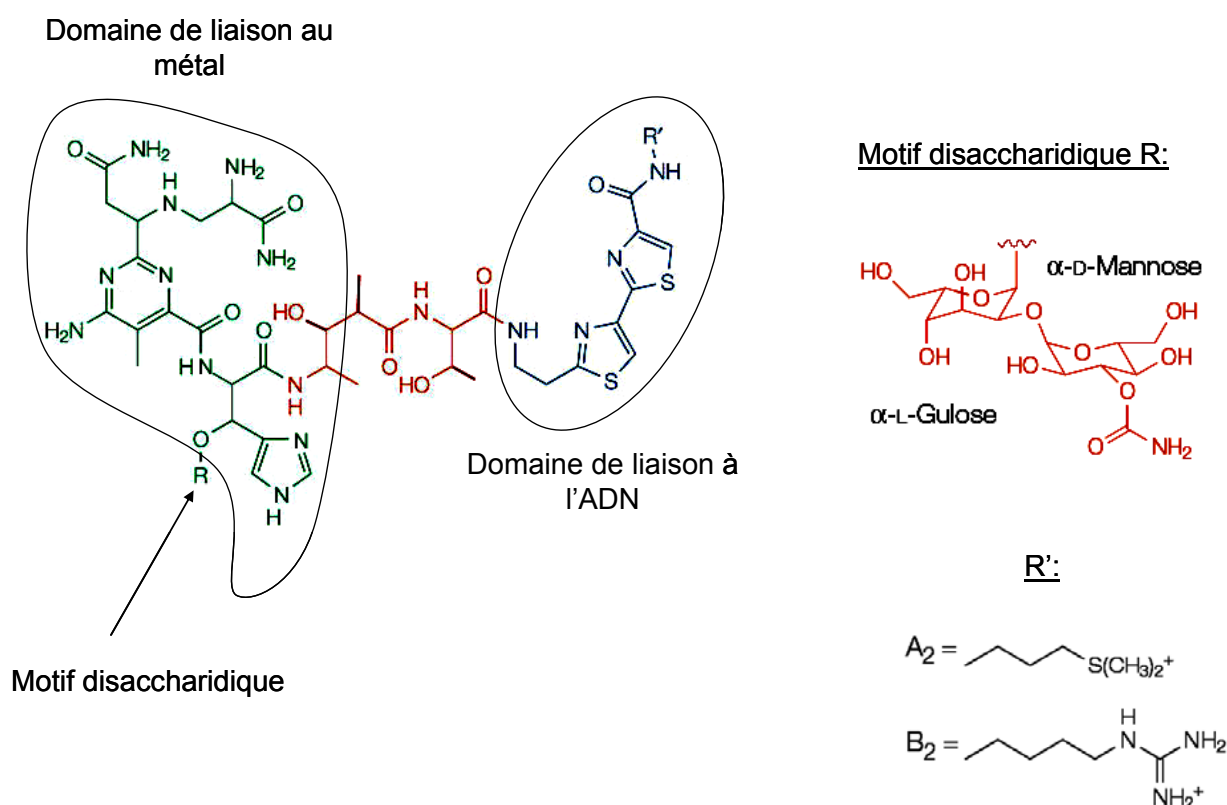


Figure 51. Structure des molécules de la famille des bléomycines. La structure des domaines R' des bléomycines A2 et B2 est également représentée.

Les bléomycines agissent sur l'ADN par oxydation du 2-désoxyribose en position 4 créant un radical centré sur le carbone, qui évolue pour donner une cassure de la chaîne d'ADN (CSB). Lors de ces processus, différents produits d'oxydation du 2-désoxyribose sont libérés, l'intermédiaire aldéhydique 1 en faisant partie (Stubbe & Kozarich, 1987). Ces mécanismes sont bien les mêmes que ceux engendrés par les radiations ionisantes puisque dans les 2 cas il y a formation d'un radical par arrachement de l'hydrogène en position 4 du 2-désoxyribose. D'après un modèle proposé par Stubbe et ses collaborateurs (Chen & Stubbe, 2005), une même molécule de bléomycine intercalée dans l'ADN est capable, après création d'une CSB, de se réactiver et d'attaquer le brin complémentaire. Il en résulte la formation d'une CDB.

Des cellules monocytaires humaines THP1 ont été incubées une heure à 37°C en présence de bléomycines, ces conditions étant celles utilisées dans de nombreuses études, permettent à la bléomycine de pénétrer jusqu'au noyau des cellules. Leur ADN a ensuite été extrait, digéré et analysé par CLHP-SM/SM dans le but d'y mesurer le niveau de dCyd341. La **Figure 52** permet d'observer la formation de la dCyd341 induite par la bléomycine dans

l'ADN cellulaire. La courbe de formation de la dCyd341 en fonction de la bléomycine se termine par un plateau. Il est fort possible que, pour les plus fortes doses de bléomycine appliquées, la quantité de Fe II « disponible » dans les cellules soit insuffisante pour activer toutes les molécules de bléomycine. Ainsi, c'est la quantité de fer qui est limitante dans ce processus. Le niveau de 8-oxo-dGuo a été mesuré et aucune variation n'a été observée avec le traitement à la bléomycine.

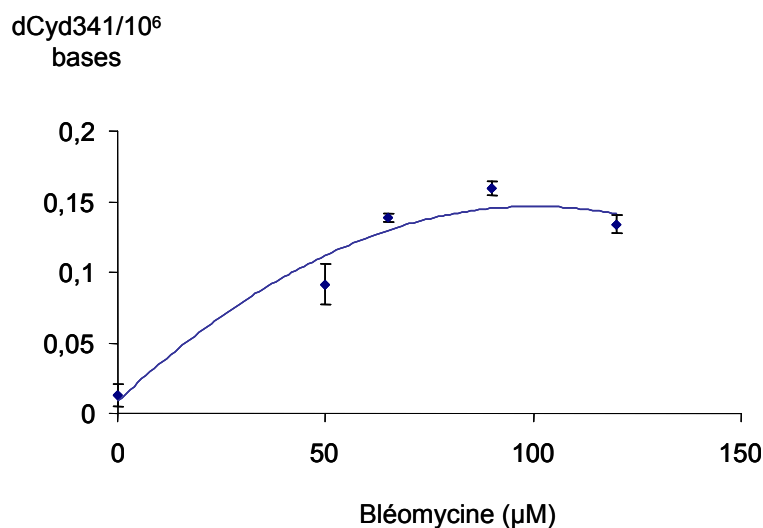


Figure 52. Formation de la dCyd341 après incubation de cellules THP1 en présence de concentrations croissantes de bléomycines pendant une heure à 37°C.

La formation de la dCyd341 dans ces cellules est en accord avec l'hypothèse de l'intervention d'un événement oxydatif en position 4 du 2-désoxyribose, dans le mécanisme de formation de la lésion.

2. Réaction d'un produit de dégradation du 2-désoxyribose sur la dCyd.

Dans un second temps, nous avons vérifié que la formation radiolytique de la lésion implique bien la réaction d'un produit de dégradation du 2-désoxyribose sur la dCyd. Cela signifie que le groupement 2-désoxyribose lié à n'importe quelle base est capable de s'oxyder conduisant à la formation de l'aldéhyde 1 et pouvant réagir avec la dCyd. Cependant parmi les 3 bases de l'ADN autres que la cytosine, l'adénine et la guanine sont porteuses de groupes nucléophiles pouvant éventuellement réagir avec l'aldéhyde 1 (tout comme ces 2 bases réagissent avec le butenedialdéhyde). La thymidine-

3',5'-diphosphate (pTp) a donc été utilisée pour générer le produit d'oxydation aldéhydique du 2-désoxyribose. A ces fins, la pTp a été exposée à des doses croissantes de rayonnement γ avant d'être incubée en présence de dCyd pendant une heure. Le mécanisme de la réaction résultante est présenté en **Figure 53**.

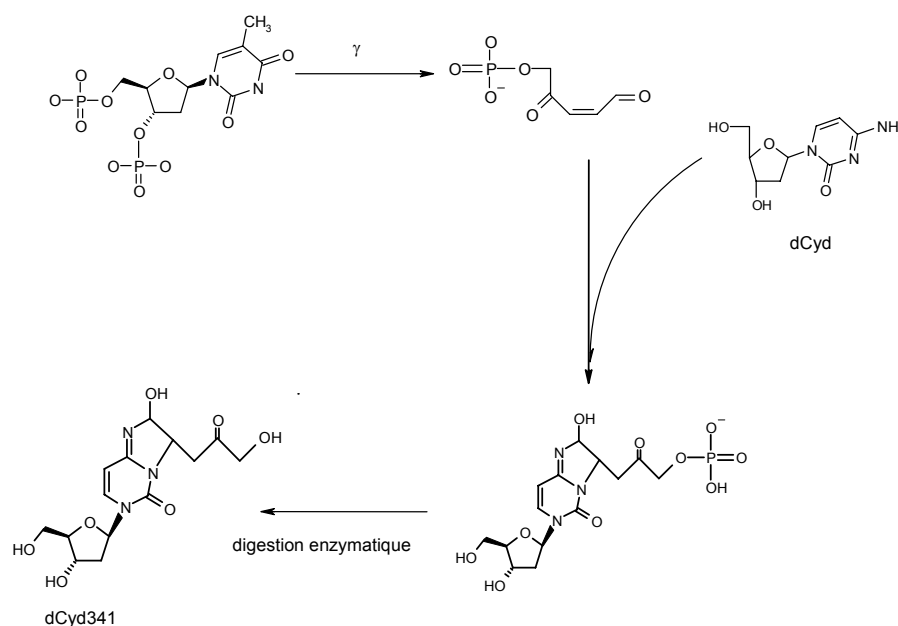


Figure 53. Schéma de la formation de la dCyd341 par réaction entre la dCyd et la pTp exposée aux rayonnements γ

Le brut de réaction a été digéré (afin d'éliminer l'unique groupement phosphate de la molécule) et analysé afin d'y rechercher la dCyd341. La **Figure 54** permet d'observer que la dCyd341 est effectivement formée par une telle réaction. Le rendement de la réaction est meilleur lorsque la dCyd et la pTp exposée aux rayonnements γ sont incubées à 37°C qu'à température ambiante, l'agitation thermique favorisant la probabilité de rencontre des molécules. La preuve de la réaction entre un produit de modification du 2-désoxyribose et la dCyd est apportée par cette expérience. Une autre information intéressante est fournie par cette manipulation : la pTp est exposée aux rayonnements γ et incubée avec la dCyd immédiatement après. Cependant, pour des raisons techniques, plusieurs dizaines de secondes s'écoulent entre la fin de l'irradiation et l'incubation. Ceci indique bien que ce n'est pas une espèce radicalaire (dont la durée de vie n'est que de quelques nanosecondes) qui réagit sur la dCyd.

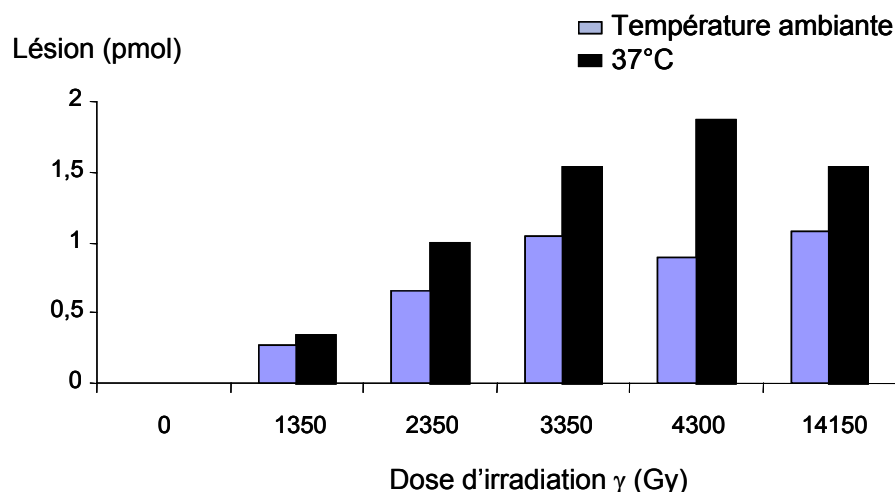


Figure 54. Formation de la dCyd341 par réaction entre la dCyd et la pTp exposée aux rayonnements γ .

C. Implication d'un aldéhyde dans la formation de la dCyd341

D'après le mécanisme proposé, le second événement faisant suite à l'oxydation du 2-désoxyribose en position 4, est donc la formation de l'intermédiaire aldéhydique. Afin de vérifier l'implication d'un aldéhyde dans ce mécanisme, la méthoxyamine (MX) a été utilisée. Cette molécule est capable de réagir avec les groupements aldéhydes pour former des dérivés oximes stables (Zhou *et al.*, 2005). L'utilisation de MX marquée radioactivement permet de quantifier les sites abasiques ou autres produits d'oxydation du 2-désoxyribose (Liuzzi & Talpaert-Borle, 1985; Talpaert-Borle & Liuzzi, 1983). La réaction susceptible de se produire entre la MX et l'aldéhyde 1 est représentée en **Figure 55**.

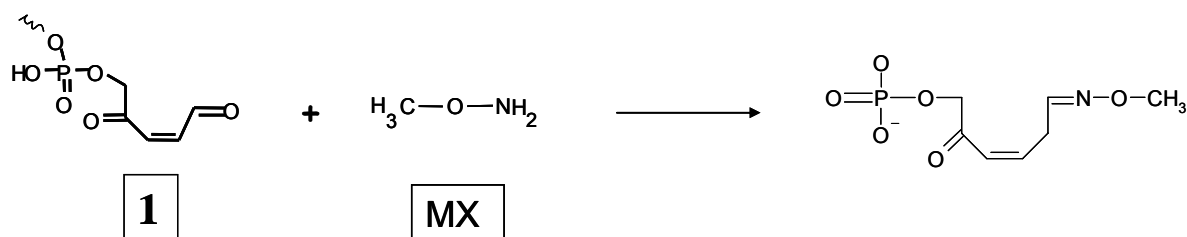


Figure 55. Réaction présumée entre la méthoxyamine et l'aldéhyde impliqué dans la formation de la dCyd341.

Des solutions aqueuses d'ADN isolé ont été exposées aux rayonnements γ en présence de MX afin d'observer l'influence de cette dernière sur le taux de dCyd341. Comme le montre la **Figure 56 A**, la dCyd341 se forme d'autant moins que la concentration de MX utilisée est importante. Ceci est en accord avec l'implication d'un intermédiaire aldéhydique

dans le mécanisme de formation de la lésion, la MX entrant en compétition avec la dCyd, pour réagir avec l'aldéhyde. Parallèlement, aucun effet de la MX n'a été observé sur le taux de 8-oxo-dGuo (**Figure 56 B**). La baisse du taux de dCyd341 ne peut donc pas être expliquée par un piégeage des $\cdot\text{OH}$ par la MX.

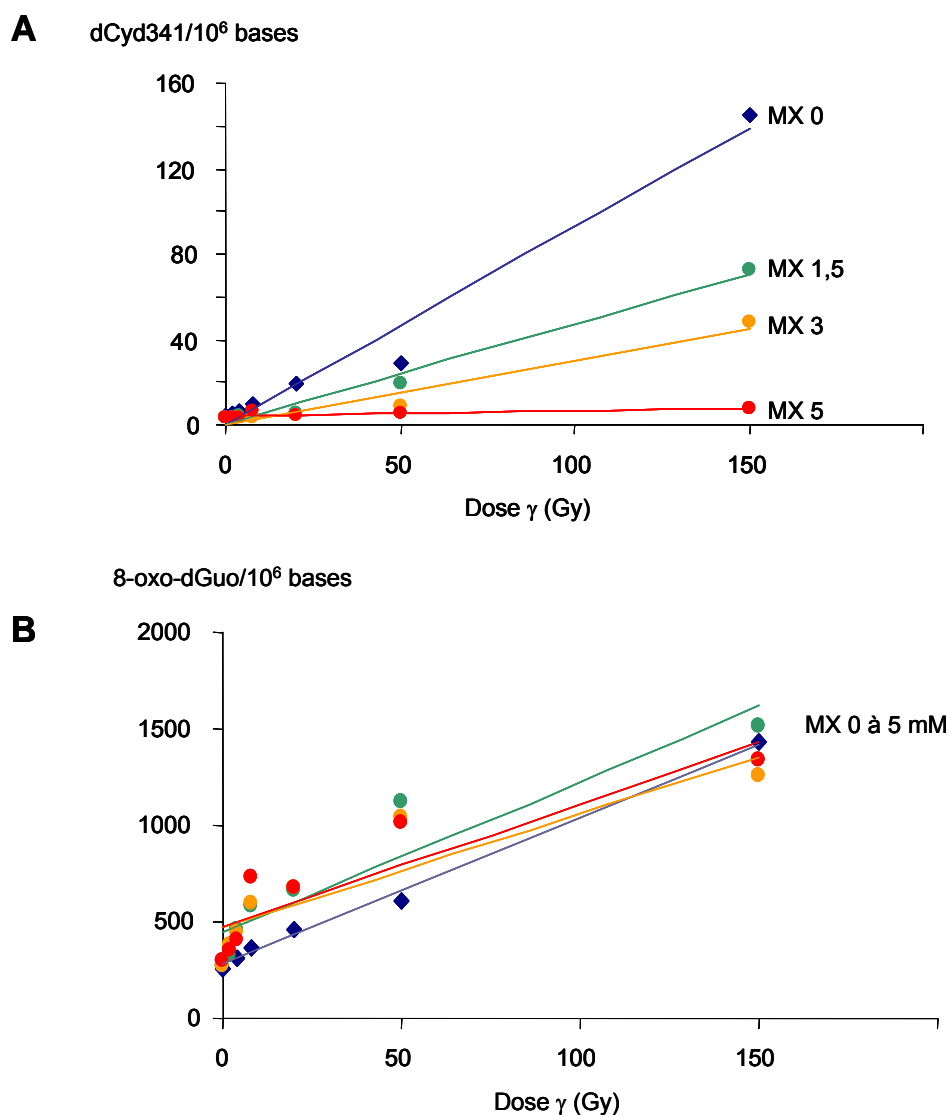


Figure 56. Effet de la MX sur la formation de la dCyd341 (A) et la 8-oxo-dGuo (B) dans des solutions aqueuses aérées d'ADN isolé à 1,5 mg/mL exposé aux rayonnements γ . Les concentrations de MX sont exprimées en mM.

Compte tenu de ces résultats et compte tenu de la structure de la dCyd341, une vérification s'imposait. En effet, cette dernière possède une fonction cétone. Or, d'après certains auteurs (Zhou *et al.*, 2005), les fonctions cétones peuvent réagir avec la MX. Cependant, leur réactivité est plus faible que celle des aldéhydes. D'ailleurs, la majorité des études utilisant la MX concerne des réactions avec les aldéhydes et non pas les cétones. Nous

avons vérifié que la diminution de formation de dCyd341 en présence de MX ne s'explique pas par la réaction de cette molécule avec la fonction cétone de la lésion. De la dCyd341 purifiée a été incubée pendant une heure à 37°C avec des concentrations croissantes et excédentaires de MX, puis le mélange a été analysé par CLHP-SM/SM, pour quantifier la dCyd341.

La dCyd341 intacte, c'est-à-dire ne réagissant pas avec la MX est quantifiée. La **Figure 57** permet d'observer que la dCyd341 a une faible réactivité vis-à-vis de la MX. En effet, lorsque cette dernière est utilisée à une concentration de 3 mM, plus de 80 % de la dCyd341 reste intacte. Il est important de rappeler que la réaction a en plus été réalisée dans des conditions favorables (1 h à 37°C) par rapport aux expériences réalisées sur l'ADN où ce dernier est incubé en présence de MX seulement quelques minutes et à température ambiante. Or, lorsque l'ADN est exposé aux rayonnements γ en présence de MX à 3 mM, la formation de la dCyd341 est réduite de 65 % (il ne reste que 35% de dCyd341 intacte). Cela suggère fortement que la diminution du taux de dCyd341 observée lors d'une irradiation d'ADN en présence de MX ne peut pas uniquement s'expliquer par la réaction de la dCyd341 avec la MX, mais bien par le piégeage d'un intermédiaire aldéhydique.

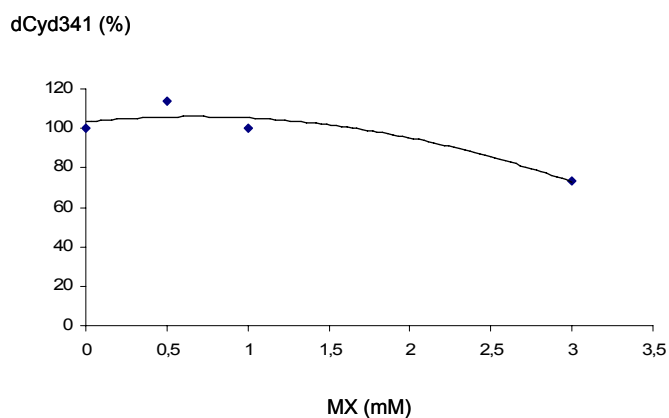


Figure 57. Etude de la réaction entre la dCyd341 (0,1 mM) et la méthoxyamine.

IV. OXYGENE ET DCYD341

D'après la structure proposée pour la dCyd341 (**Figure 34**), 3 atomes d'oxygène sont incorporés sur la dCyd initiale. Ces atomes proviennent de l'addition sur la dCyd de l'intermédiaire aldéhydique 1. Nous avons voulu déterminer l'origine de ces atomes

d'oxygène (O_2 ou H_2O) et le rôle joué par l'oxygène moléculaire O_2 dans la formation de la dCyd341.

A. Irradiation en conditions aérées ou désaérées

Une série d'expériences visant à déterminer si l'oxygène moléculaire est nécessaire à la formation de la dCyd341 a été réalisée. L'ADN a été exposé au rayonnement γ en présence ou en absence d'oxygène. La préparation des solutions d'ADN désaérées implique un bullage sous argon afin d'éliminer l' O_2 naturellement présent, puis une étape au cours de laquelle la solution est laissée sous agitation dans une boîte à gants à atmosphère dépourvue d' O_2 , et ce afin d'éliminer les dernières traces d' O_2 . Les rendements de formation des lésions ont été déterminés dans les 2 conditions de traitement. Ces rendements correspondent au taux de lésions formées par million de bases normales et par Gy. Puis le rapport entre le rendement en conditions désaérées et le rendement en conditions aérées a été calculé pour chaque lésion. D'après les résultats obtenus (**Figure 58**), en conditions désaérées le niveau des diols de Thd représente 20 % du niveau atteint en conditions aérées. Ce niveau devrait être nul, l'oxygène étant indispensable à la formation des diols de Thd. Il peut en partie refléter le fait que les solutions n'aient pas totalement été désaérées. Il peut également suggérer l'existence d'une autre voie de formation des diols de Thd que celle impliquant l' O_2 . Le taux de 8-oxo-dGuo est également diminué en conditions désaérées et représente 60 % du taux observé en présence d' O_2 . Ceci n'est pas surprenant puisque, privées d' O_2 , les solutions constituent un milieu moins oxydant qu'en conditions aérées; la formation de la 8-oxo-dGuo étant défavorisée par rapport à celle de la Fapy-dGuo (Cadet *et al.*, 2003).

Le taux de formation de la dCyd341 (toujours exprimé en nombre de lésions par million de bases normales) est diminué en absence d' O_2 : ce taux représente 20 % de ce qui est observé en présence d' O_2 . Ces résultats suggèrent que c'est en réalité l'intermédiaire 1 qui est moins formé en conditions désaérées, puisque son ajout sur la dCyd ne nécessite pas, *a priori*, la présence d' O_2 . L' O_2 est donc indispensable à la formation de la lésion. Mais y a-t-il incorporation d'un atome d'oxygène à partir de la molécule d' O_2 ?

Lésions formées en conditions
désaérées par rapport aux
conditions aérées (%)

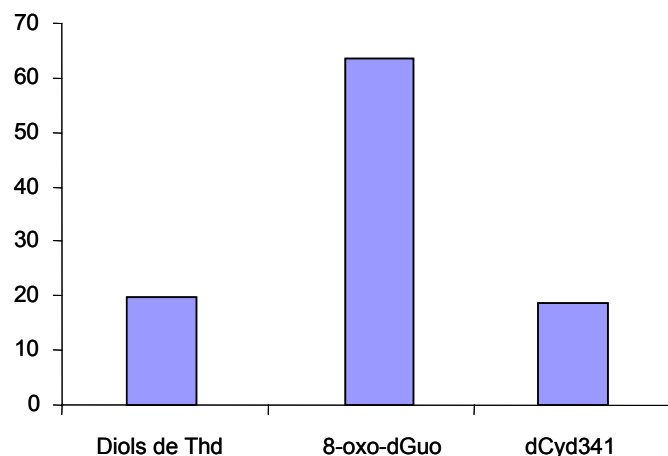


Figure 58. Rapport entre la formation de lésions oxydatives en conditions désaérées et aérées. Des solutions aqueuses d'ADN à 1 mg/ml aérées ou désaérées sont exposées à différentes doses de rayonnement γ (de 0 à 150 Gy). Les points sont réalisés en triple. Les résultats représentent le rapport entre le rendement de formation des lésions en conditions désaérées et celui des lésions en conditions aérées.

B. Irradiations en présence d' $^{18}\text{O}_2$ ou d' H^{18}O_2

Pour répondre à cette question, des irradiations d'ADN ont été réalisées en présence d' $^{18}\text{O}_2$ ou d' H_2^{18}O . Ainsi, si l'atome d'O incorporé est un ^{18}O , la dCyd341 sera enrichie isotopiquement. La préparation des solutions d'ADN sous $^{18}\text{O}_2$ suit les mêmes étapes que dans le cas des échantillons désaérés. Puis, immédiatement avant irradiation, un bullage d' $^{18}\text{O}_2$ est réalisé afin de saturer la solution en $^{18}\text{O}_2$. La préparation des solutions d'ADN dans l' H_2^{18}O nécessite plusieurs étapes de lyophilisation afin d'éliminer l' H_2^{16}O naturellement présente, puis la reprise des échantillons dans l' H_2^{18}O commerciale. Les diols de Thd sont utilisés comme témoins pour évaluer l'enrichissement isotopique dans les conditions d'irradiation.

Afin d'analyser les échantillons, la méthode « MRM » a du être modifiée par l'ajout de certaines transitions. Pour chaque composé, la molécule naturelle et la molécule enrichie isotopiquement sont recherchées. Dans le cas de l'incorporation d'un atome d' ^{18}O , la molécule concernée a un excès de masse de 2 unités par rapport à la molécule naturelle. De plus, selon la position d'incorporation de l' ^{18}O et selon la manière dont se fragmente la molécule, les ions fils auront ou non un excès de masse de 2 unités. Dans le cas des diols de

Thd par exemple, 2 atomes d'oxygène sont incorporés sur les résidus Thd, l'un provenant de l'O₂ et l'autre d'un radical ·OH, donc de l'H₂O (cf mécanisme de formation en **Figure 11** de la partie bibliographique).

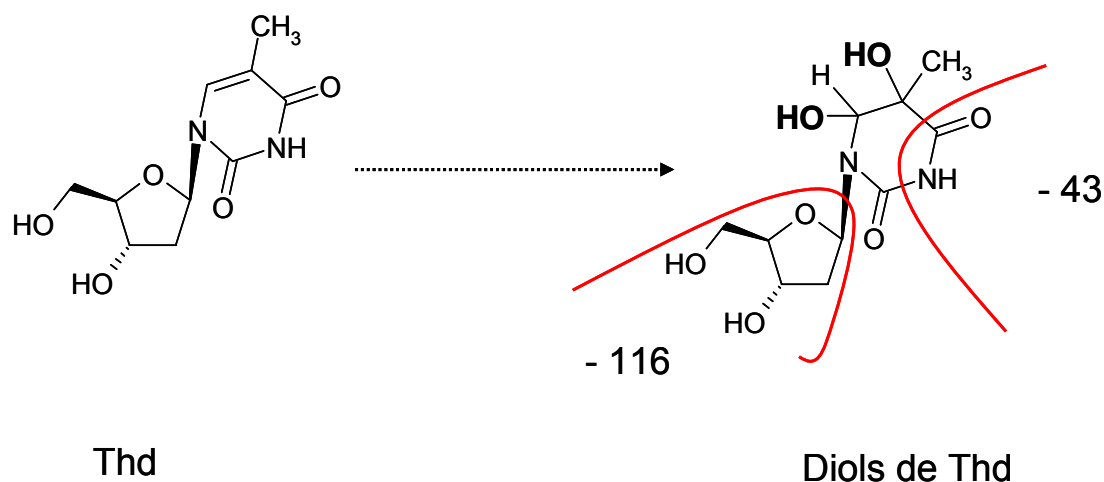


Figure 59. Fragmentation des diols de Thd au cours de leur détection par CLHP-SM/SM.

La détection des diols de Thd par SM/SM utilise 2 fragmentations simultanées de l'ion parent de masse 275 : la perte du 2-désoxyribose de 116 uma et la perte du groupement CO-NH de 43 uma (**Figure 59**). Le fragment résiduel a une masse de 116 uma. La transition caractéristique des diols de Thd est donc 275 → 116, comme nous l'avons mentionné dans le **Tableau 4**. Ce fragment résiduel contient les 2 oxygènes incorporés, et dans le cas d'expériences réalisées en présence d' H₂¹⁸O ou d' ¹⁸O₂ , il aura donc un excès de masse de 2 (un seul des 2 oxygènes incorporés est enrichi isotopiquement). La transition à rechercher pour visualiser l'incorporation d'un atome d'¹⁸O dans le cas des diols de Thd est donc 277 → 118. Dans le cas de la dCyd341, nous ne savons pas si les fragments obtenus conservent l'excès de masse ou non, exception faite de la transition 342 → 226. En effet, elle correspond à la perte du 2-désoxyribose, or les oxygènes incorporés sur la dCyd pour former la dCyd341 sont situés sur la base. Le fragment de 226 uma, qui correspond à la base, aura donc un excès de masse de 2, s'il y a incorporation d'un atome d'¹⁸O au sein de la dCyd341 et la transition à rechercher sera 344 → 228. En ce qui concerne les autres transitions, nous n'avons aucune certitude sur les fragments auxquels elles correspondent. Une méthode « MRM » prenant en compte toutes les possibilités (fragments conservant ou non l'excès de masse) est donc utilisée pour détecter la molécule enrichie isotopiquement. Ainsi, les transitions recherchées

sont : $344 \rightarrow 228$, $344 \rightarrow 190$ et $344 \rightarrow 192$, $344 \rightarrow 162$ et $344 \rightarrow 164$, $344 \rightarrow 148$ et $344 \rightarrow 150$.

Les résultats obtenus sur les diols de Thd font état de l'incorporation d'un atome d' ^{18}O provenant de l' H_2^{18}O sur près de 100 % des molécules, l'incorporation à partir de l' $^{18}\text{O}_2$ concernant 70 % des diols de Thd (**Figure 60**). Ceci implique que l'enrichissement isotopique est quasi-total en ce qui concerne l' H_2O , tandis que l' O_2 est enrichi à 70 %.

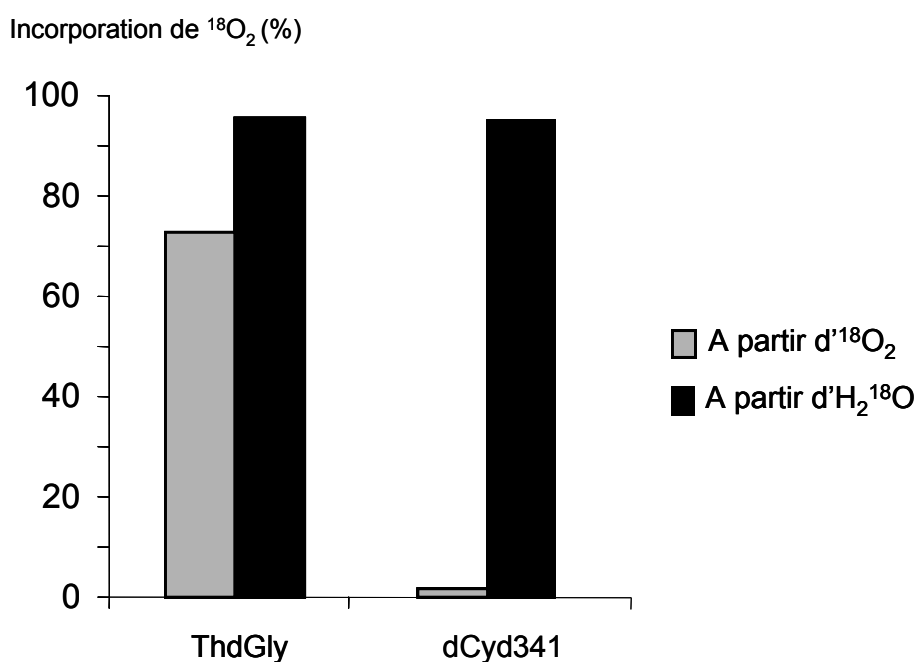


Figure 60. Pourcentage d'incorporation d' $^{18}\text{O}_2$ lors de la formation des diols de Thd et de la dCyd341 au cours d'une exposition aux rayonnements γ en présence d' H_2^{18}O ou d' $^{18}\text{O}_2$.

En ce qui concerne la dCyd341, les mesures ont révélé que 50 % des molécules effectuent la transition $344 \rightarrow 190$ et 50 % la transition $344 \rightarrow 192$. Cela signifie que durant cette fragmentation, qui correspond vraisemblablement à la perte de 2 molécules d'eau, la moitié des molécules de dCyd341 perd l'atome d'oxygène marqué. Il est difficile d'expliquer ce comportement impliquant que l'atome d'oxygène marqué ne soit pas situé à la même position sur toutes les molécules de dCyd341. En ce qui concerne les 2 autres fragmentations, le marquage est perdu et les transitions observées sont donc $344 \rightarrow 162$ et $344 \rightarrow 148$.

Les résultats, présentés en **Figure 60** révèlent que 95 % des molécules de dCyd341 incorporent un atome d'O provenant de l' H_2O , l'incorporation à partir de l' O_2 étant

négligeable. Bien que l'O₂ soit indispensable à la formation de la dCyd341, il ne s'ajoute donc pas sur la molécule finale.

V. DISCUSSION

Récemment, l'étude des dommages des bases de l'ADN a reçu une attention particulière, mais de nombreux travaux démontrent que les altérations des sucres jouent un important rôle dans la cytotoxicité des radiations ionisantes (Chen *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2005). La plupart des altérations du dR sont causées par des oxydations (abstraction de l'atome d'hydrogène) pouvant toucher chacune des positions. Les radiations ionisantes sont capables de provoquer de telles oxydations au niveau de tous les hydrogènes du sucre, mais les positions 5 et 4 sont préférentiellement touchées du fait de la forte accessibilité de ces positions pour les radicaux issus du solvant, dans la conformation B de l'ADN (Balasubramanian *et al.*, 1998). Le premier évènement dans le mécanisme de formation de la dCyd341, l'oxydation en position 4, n'est donc pas un évènement isolé au cours de l'exposition aux rayonnements γ de l'ADN. Il existe une grande diversité de produits d'oxydation, chaque position du 2-désoxyribose engendrant des produits différents. Cependant, toutes les oxydations, quelle que soit la position où elles ont lieu, génèrent des dérivés carbonylés, la majorité étant des aldéhydes. A titre d'exemple, les 3'-phosphoglycolaldéhydes sont produits par abstraction de l'hydrogène en C3, les bases propénals de l'hydrogène en position C4 et le trans-butènedialdéhyde de l'hydrogène en C5 (Chen *et al.*, 2004).

Les composés aldéhydes, en raison de leur caractère électrophile, sont capables de réagir avec les groupements nucléophiles de l'ADN, entraînant la formation d'adduits stables. Ainsi, le malondialdéhyde (MDA) forme des adduits avec l'adénine, la cytosine et la guanine (Marnett, 1999; Stone *et al.*, 1990). De même, les bases propénals qui présentent des homologies de structure avec la forme énol du MDA, réagissent également avec l'ADN (Plastaras *et al.*, 2002). La dCyd341 appartient à cette catégorie d'adduits. Les résultats obtenus suggèrent que cette lésion est issue de l'oxydation en C4 du 2-désoxyribose. Cet évènement aboutit à la création d'un intermédiaire aldéhydique capable de réagir sur la dCyd formant un adduit qui constitue la dCyd341.

Une discussion mérite d'être engagée au sujet de l'origine des atomes d'oxygène présents sur l'intermédiaire aldéhydique 1 et de ce fait incorporés sur la dCyd341. De

nombreux modèles ont été proposés pour expliquer la formation de cet aldéhyde (Frank *et al.*, 1991; Pogozelski & Tullius, 1998 pour revue; Stubbe & Kozarich, 1987). Les différents auteurs sont tous d'accord sur le fait que l'évènement initial est l'arrachement de l'H en position 4 du 2-désoxyribose (médié par la bléomycine ou autres drogues ou encore les rayonnements ionisants) conduisant à un radical centré sur le C4. Ce radical peut évoluer vers un hémiacétal (**Figure 61**) puis vers un céto-aldéhyde conduisant à l'intermédiaire 1 après attaque par une base. L'intermédiaire 1 est en équilibre avec une forme hydroxylée.

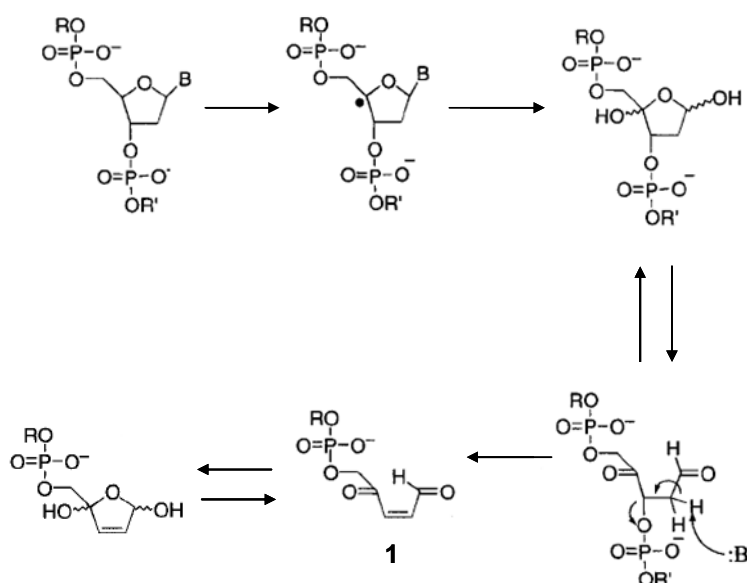


Figure 61. Formation de l'intermédiaire 1 (pour revue, voir Pogozelski & Tullius, 1998). *R* et *R'* représentent le reste de la molécule d'ADN, *B* une base de l'ADN et *:B* une espèce à caractère basique présente dans le milieu.

Parmi les différents modèles proposés pour la formation de l'aldéhyde 1, certains impliquent que les réactions aient lieu en conditions désaérées (Worth *et al.*, 1993), et d'autres modèles font intervenir l'O₂ (pour revue : Pogozelski & Tullius, 1998). Il existe donc des incertitudes concernant le ou les mécanisme(s) exact(s) de formation de cet intermédiaire aldéhydique. D'après les résultats que nous avons obtenus, l'O₂ est indispensable à la formation de cet intermédiaire 1, mais il n'y est pas ou peu incorporé.

La **Figure 62** représente de façon simplifiée le mécanisme de formation de la dCyd341.

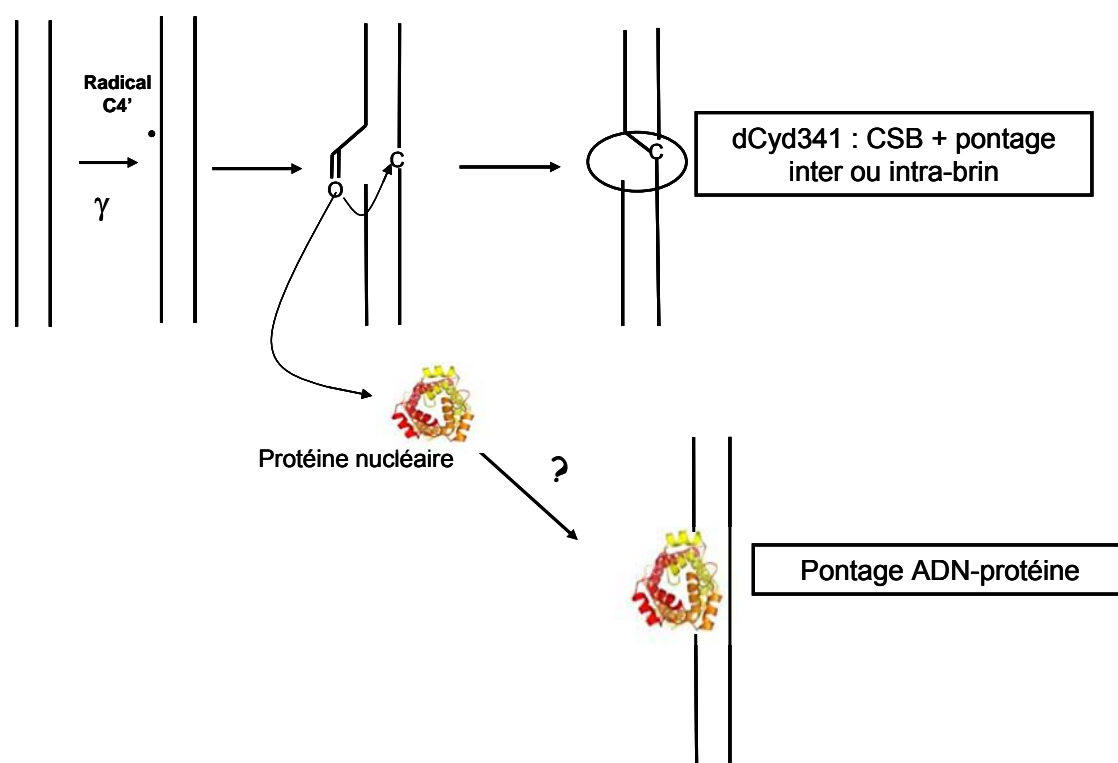


Figure 62. Schéma de formation de la dCyd341 : mécanisme simplifié

Cette lésion implique la formation d'une CSB (dont l'une des extrémités correspond à l'intermédiaire aldéhyde) et d'un pontage de brin. Selon que l'attaque de l'aldéhyde porte sur une dCyd du même brin ou du brin opposé le pontage sera intra ou inter-brin. Les résultats obtenus jusqu'à présent ne permettent pas de définir la nature de ce pontage. Il n'est pas exclu que les deux types de pontages existent conduisant tous deux à la même structure de la dCyd341. De plus, d'après les mécanismes présentés en **Figure 50** et en **Figure 61**, la formation de l'intermédiaire 1 s'accompagne de la libération d'une base de l'ADN, l'intermédiaire 1 constituant donc un site abasique. La dCyd341, impliquant une CSB, un site abasique et un pontage peut donc être considérée comme un site multilésé. Un site multilésé est en effet défini par 2 lésions élémentaires ou plus séparées par moins de deux tours d'hélices. Les CDB font partie de la famille des sites multilésés et représentent 20 % de ces dommages (Sutherland *et al.*, 2002a; Sutherland *et al.*, 2002b). Les 80 % restant regroupent des sites multilésés autres que les CDB, tels que des associations CSB + 8-oxo-dGuo, par exemple. Les sites multilésés constituent une signature des rayonnements ionisants (Gulston *et al.*, 2004). Cependant, les sites multilésés décrits dans la littérature sont issus de 2 événements radicalaires distincts. Or dans le cas de la dCyd341, un seul événement radicalaire donne lieu au dommage.

Il apparaît intéressant de comparer le niveau de formation de la dCyd341 à celui d'autres lésions radio-induites bien connues telles que les sites multilésés ou la 8-oxo-dGuo.

CHAPITRE V: ANALYSES QUANTITATIVES DANS LES ADN ISOLE ET CELLULAIRE

I. QUANTIFICATION DE LA DCYD341

A. Sensibilité de la méthode de détection de dCyd341

La sensibilité de la détection par spectrométrie de masse n'est pas nécessairement la même d'un produit à l'autre et la calibration du système est nécessaire pour chaque molécule à détecter. L'analyse de la dCyd341 dans des solutions de concentrations connues permet d'établir la relation existant entre l'aire des pics d'élution chromatographique et la quantité de lésion. Cette relation peut ensuite être appliquée à un échantillon d'ADN analysé afin d'y déterminer la quantité de dCyd341. Il s'agit d'une méthode de calibration externe.

Connaissant le coefficient d'extinction molaire ϵ de la dCyd341, il est possible de déterminer la concentration d'une solution donnée, après avoir réalisé un spectre UV (loi de Beer-Lambert) et de déterminer le seuil de sensibilité de la méthode de détection de la dCyd341. La sensibilité de la méthode est bien meilleure que dans le cas de la 8-oxo-dGuo détectée par CLHP-SM/SM. Comme il est possible de le voir sur la **Figure 63**, 27 femtomoles d'un mélange équimolaire des isomères correspondant aux deux premiers pics de dCyd341 sont très aisément détectées, comparativement à la 8-oxo-dGuo. Le seuil de sensibilité de la méthode, correspondant à la quantité minimale détectable avec un rapport signal sur bruit de fond supérieur à 3, est inférieur à 1,5 femtomoles. En effet, 1,5 femtomoles de dCyd341 sont détectées avec un rapport signal sur bruit de fond égal à 5,5 (**Figure 64**). Cette limite de sensibilité est quinze fois plus basse que dans le cas de la 8-oxo-dGuo, détectée par notre système de CLHP-SM/SM.

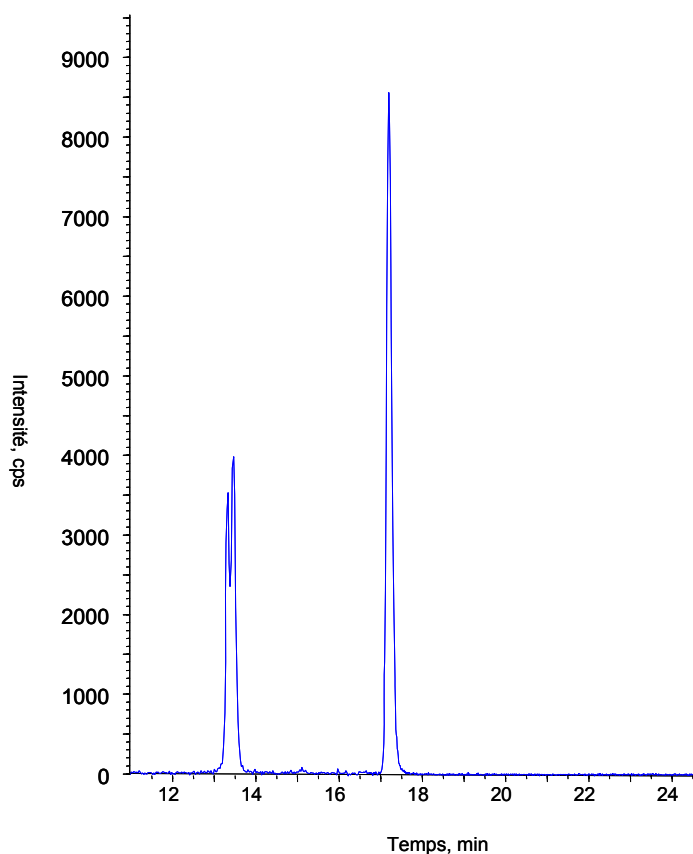


Figure 63. Chromatogramme correspondant à la détection par CLHP-SM/SM de 27 fmols de dCyd341 (mélange équimolaire des 2 premiers isomères), élue à 13,2 min et de 1 pmol de 8-oxo-dGuo, élue à 17,2 min. Les conditions chromatographiques correspondent au gradient B.

La quantité de dCyd341 a pu être estimée dans les échantillons d'ADN. Durant la suite de l'étude, nous raisonnerons toujours en termes de quantité totale de dCyd341, sans faire la distinction entre les 4 isomères.

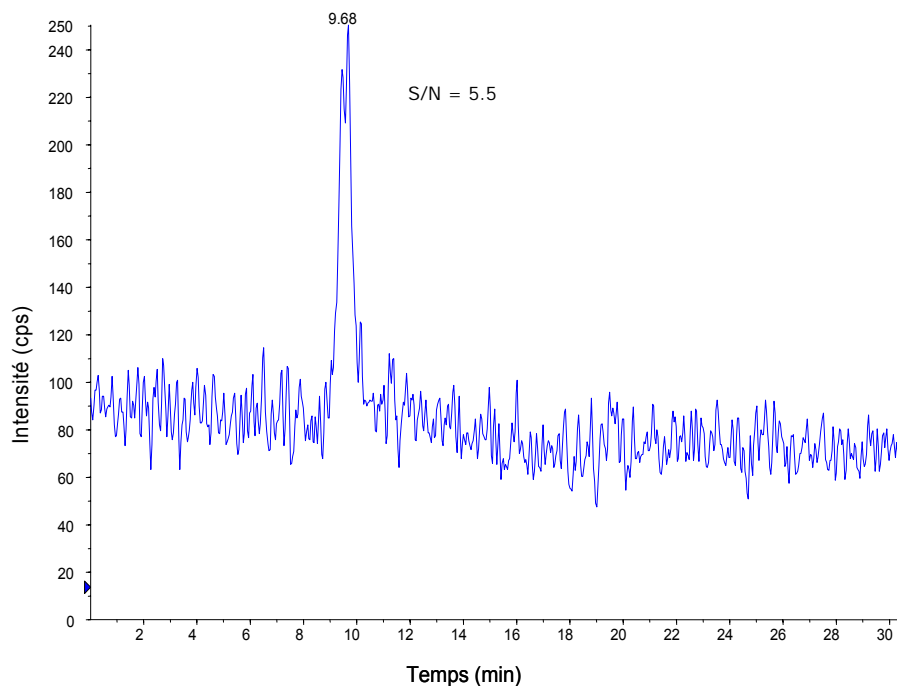


Figure 64. Détection par CLHP-SM/SM de 1,5 fmols d'un mélange équimolaire des isomères correspondant aux deux premiers pics de la dCyd341, dans les conditions de gradient C.

B. Quantification de la dCyd341 dans l'ADN isolé exposé aux rayonnements γ

Comme il est courant de le faire, la quantité de lésions dans les échantillons d'ADN a été estimée en nombre de lésions par millions de nucléosides normaux. Dans l'ADN isolé de thymus de veau exposé aux rayonnements γ , le rendement de formation de dCyd341 a pu être évalué. Ce rendement correspond à la pente de la droite représentant le nombre de lésions formées par millions de bases normales par rapport à la dose d'irradiation en Gy. Il s'exprime donc en nombre de lésions formées par millions de bases normales et par Gy. Dans le cas de solutions aqueuses aérées d'ADN de concentration 1,5 mg/ mL, le taux de formation de la 8-oxo-dGuo est de 13 lésions par million de bases normales et par Gy (**Figure 65**). En ce qui concerne la dCyd341, il s'en forme environ 0,7 par million de bases normales et par Gy.

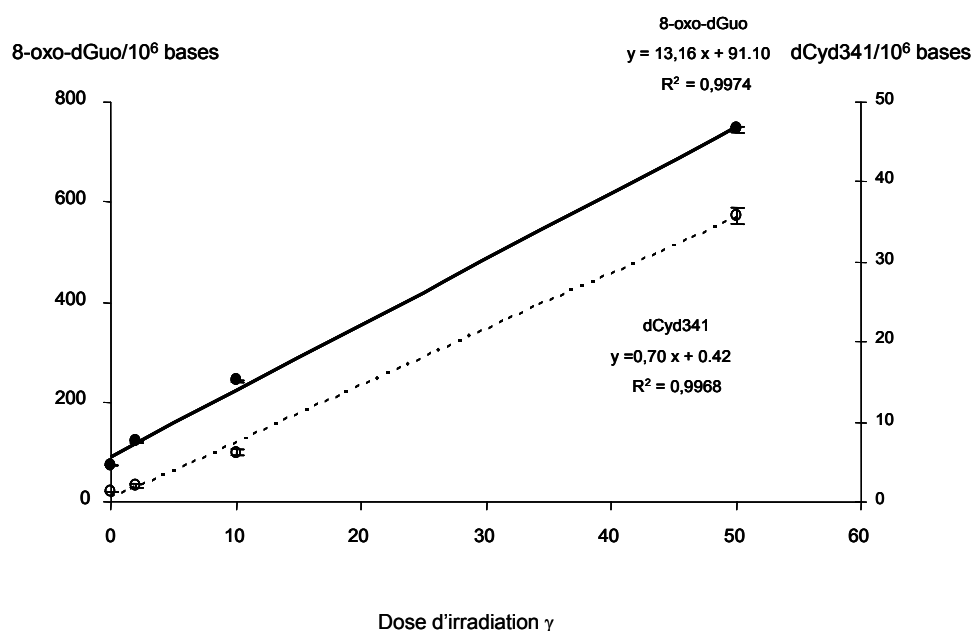


Figure 65. Formation de la 8-oxo-dGuo et de la dCyd341 dans l'ADN isolé exposé aux rayonnements γ .

Pour une même dose d'irradiation, il se forme donc dix-huit fois moins de dCyd341 que de 8-oxo-dGuo, ce qui ne représente pas une quantité négligeable.

C. Quantification de la dCyd341 dans l'ADN cellulaire exposé aux rayonnements γ

La dCyd341 et la 8-oxo-dGuo ont été quantifiées dans l'ADN de monocytes humains exposés aux rayonnements γ (**Figure 66**). Il se forme 0,0082 molécules de 8-oxo-dGuo par million de bases normales et par Gy. Cette valeur est inférieure aux résultats précédemment obtenus par Pouget et al. (Pouget *et al.*, 2002) avec le même outil analytique et les mêmes cellules (0,02 lésion par million de bases normales et par Gy). Ceci peut s'expliquer par l'utilisation de conditions expérimentales légèrement différentes, notamment en termes de nombre de cellules et de volume dans lequel sont irradiées ces cellules.

La dCyd341 est formée dans l'ADN cellulaire avec un rendement de $8 \cdot 10^{-5}$ lésion par million de bases normales et par Gy, ce qui est 100 fois moins que pour la 8-oxo-dGuo. Il peut sembler surprenant d'observer une telle variation de la quantité de dCyd341 formée relativement à la 8-oxo-dGuo entre l'ADN isolé et l'ADN cellulaire. Cependant, il faut garder à l'esprit que la réactivité de l'ADN en solution est différente de celle de l'ADN au sein d'une cellule où il est entouré de nombreux autres constituants. Ainsi, la lésion majoritairement formée après exposition aux rayonnements γ d'une solution aqueuse d'ADN isolé est la 8-

oxo-dGuo (Douki *et al.*, 1997). En revanche, dans les cellules exposées aux rayonnements γ , ce sont les diols de Thd qui sont majoritairement formés et leur rendement de formation est environ 5 fois supérieur à celui de la 8-oxo-dGuo. D'ailleurs, la HmdUrd, la FordUrd et même la FapyGua se forment d'avantage que la 8-oxo-dGuo dans l'ADN de cellules exposées aux rayonnement γ (Pouget *et al.*, 2002). De plus, nous avons évoqué la possibilité pour l'intermédiaire 1 intervenant dans la formation de la dCyd341, de réagir avec des protéines nucléaires. Ainsi, dans les cellules, la dCyd pourrait n'être qu'une cible de l'intermédiaire 1 parmi tant d'autres, ce qui expliquerait pourquoi le rendement de formation de la dCyd341 est largement inférieur à celui observé dans l'ADN en solution.

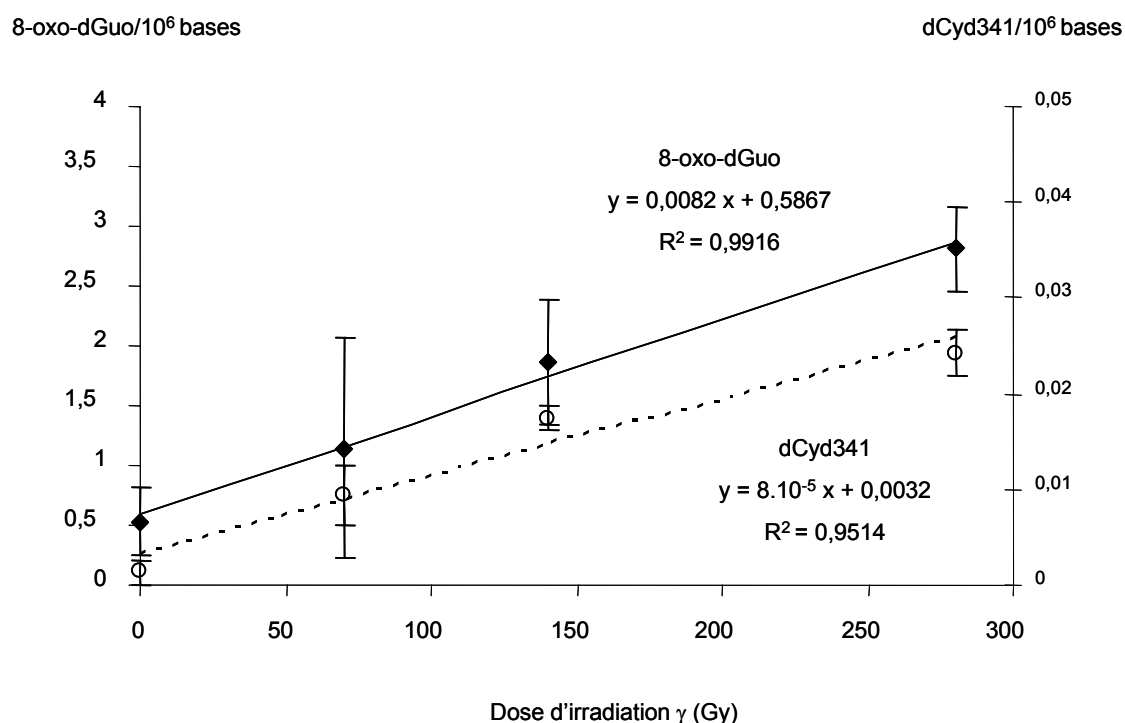


Figure 66. Formation de la 8-oxo-dGuo et de la dCyd341 dans l'ADN de cellules THP1 exposées au rayonnement γ .

II. QUANTIFICATION DE L'ADDUIT DCYD-BUTENEDIALDEHYDE

Le travail sur l'adduit a été étendu à sa détection dans l'ADN, d'une part à des fins de comparaison avec la dCyd341, et d'autre part en vue de confirmer une hypothèse émise par le groupe de Peter Dedon. En effet, ce dernier a démontré que le butenedialdéhyde est issu de l'oxydation du 2-désoxyribose en position 5 (Chen *et al.*, 2004). Les rayonnements γ étant

capables de médier ce type d'oxydation, l'adduit devrait être formé dans l'ADN irradié, au même titre que la dCyd341. Cependant, sa formation n'a jamais été observée dans ces conditions, probablement en raison de l'absence de méthode de détection suffisamment sensible.

A. Mise au point de la méthode de détection de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde

Puisque nous étions en possession d'une solution calibrée d'adduit dCyd-butènedialdéhyde (son coefficient d'extinction molaire ϵ étant connu), il a été possible de développer une méthode de CLHP-SM/SM afin de détecter cet adduit. Pour cela, l'injection de l'adduit pur est, dans un premier temps, effectuée directement dans le spectromètre de masse (on parle d'infusion) et les différents paramètres sont réglés de façon à obtenir la meilleure sensibilité possible. Plusieurs transitions caractéristiques de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde sont mesurées (**Figure 67**): la transition $312 \rightarrow 196$ correspondant à la perte du 2-désoxyribose, la transition $312 \rightarrow 178$ correspondant à la perte supplémentaire d'une molécule d'eau et la transition $312 \rightarrow 136$ correspondant à la perte supplémentaire d'un fragment de 42 uma, tout comme les isomères correspondant au deux derniers pics de la dCyd341.

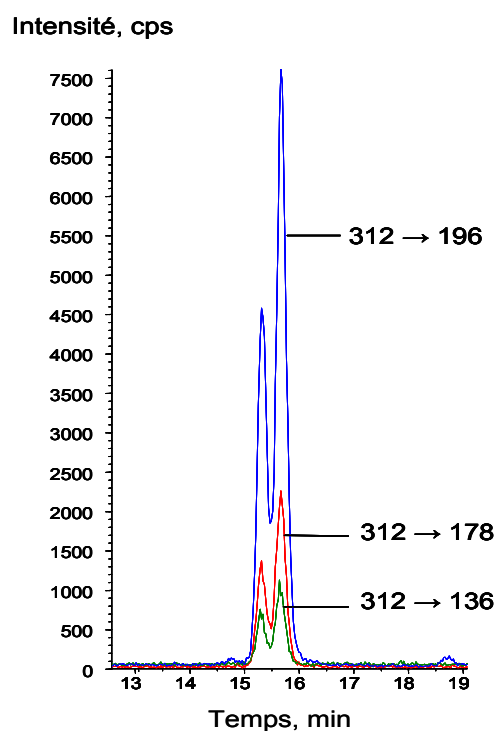


Figure 67. Chromatogramme caractéristique de la détection de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde. Les conditions chromatographiques utilisées correspondent au gradient B.

Afin de valider notre méthode de détection, des solutions aqueuses aérées d'ADN isolé à 1,5 mg/mL ont été incubées avec des concentrations croissantes de trans-butènedialdéhyde, et le niveau de l'adduit a été mesuré après digestion enzymatique. La quantification d'une molécule est habituellement effectuée en intégrant le pic correspondant à la transition la plus intense. Dans le cas présent, la détection et la quantification de l'adduit n'ont pas pu être effectuées à partir de la transition 312 → 196. En effet, une impureté, présente même dans les solutions d'ADN témoin, est éluée au même temps de rétention que l'adduit et affecte la transition 312 → 196. La transition 312 → 178 a donc été utilisée. Ceci rend la méthode de détection moins sensible mais résout le problème de spécificité posé par la transition principale. La limite de sensibilité de la méthode passe ainsi de 10 à 40 femtomoles. Les résultats, présentés en **Figure 68**, révèlent une formation de l'adduit qui augmente linéairement avec la concentration de butènedialdéhyde. Ces données sont à comparer avec celles obtenues par l'équipe de L.A Peterson (Byrns *et al.*, 2006) qui mesure des taux d'adduits d'environ $50/10^6$ bases normales après incubation de l'ADN avec 50 μ M de cis-butènedialdéhyde. Nos valeurs sont 5 fois plus élevées. Plusieurs explications possibles peuvent être avancées : la réactivité du trans-butènedialdéhyde que nous utilisons peut être différente de celle du cis-butènedialdéhyde utilisé par les autres auteurs. De plus, les

conditions expérimentales différent. En effet, nous avons travaillé avec de l'ADN à 1,5 mg/mL incubé avec le butènedialdéhyde 12 h à 37°C dans l'eau, tandis que les auteurs ont utilisé de l'ADN à 0,6 mg/mL incubé 6 h à 37 °C avec le butènedialdéhyde en tampon phosphate de potassium pH7. Enfin, ces derniers utilisent une méthode de détection basée sur la dérivation du composé par la *O*-benzyloxime. Comme les auteurs l'avancent eux-mêmes, il est fort probable que cette réaction de dérivation ne soit pas totale conduisant à une sous-estimation de la quantité d'adduit formé.

Avec les 2 méthodes, une relation linéaire est observée entre le taux d'adduits formés et la concentration de butènedialdéhyde utilisé.

Adduit / 10^6 bases

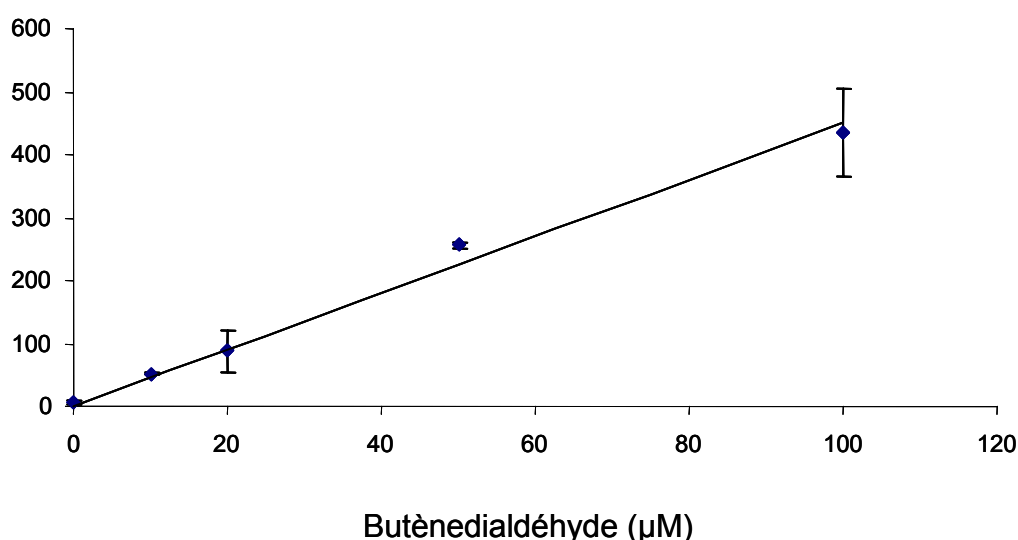


Figure 68. Formation de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde dans l'ADN isolé à 1,5 mg/mL en solutions aqueuses aérées traité au trans-butènedialdéhyde.

B. Détection de l'adduit dans l'ADN isolé

L'adduit dCyd-butènedialdéhyde a été recherché dans des solutions aqueuses aérées d'ADN isolé (1,5 mg/mL) exposées aux rayonnements γ . L'adduit dCyd-butènedialdéhyde est effectivement formé dans ces conditions, comme le montre la **Figure 69**. Le rendement de formation de l'adduit (0,80 lésion par million de bases normales et par Gy) est du même ordre de grandeur que celui de la dCyd341 (0,70 lésion par million de bases normales et par Gy).

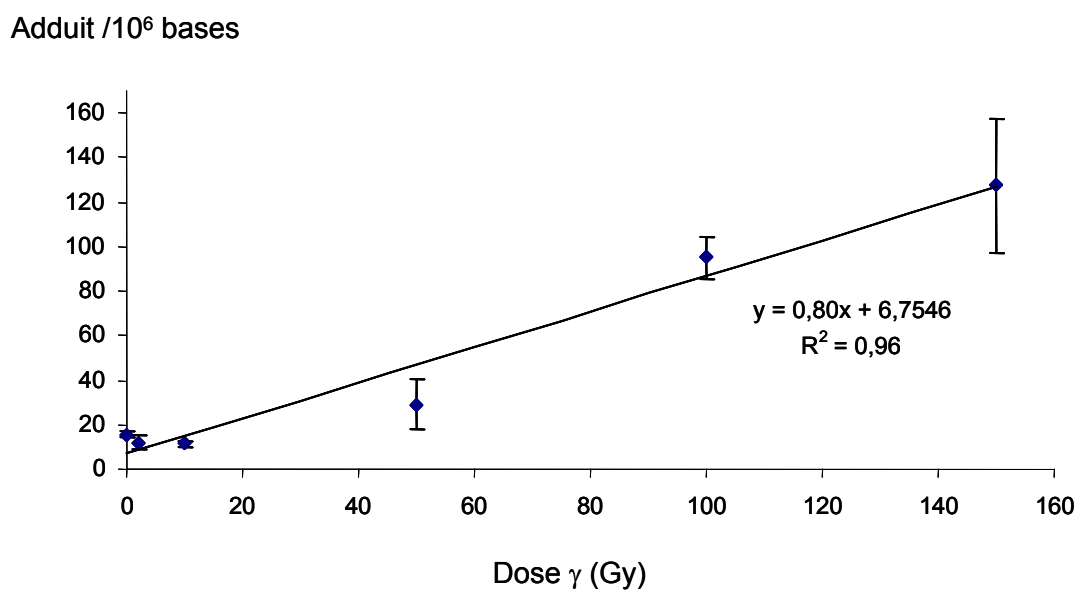
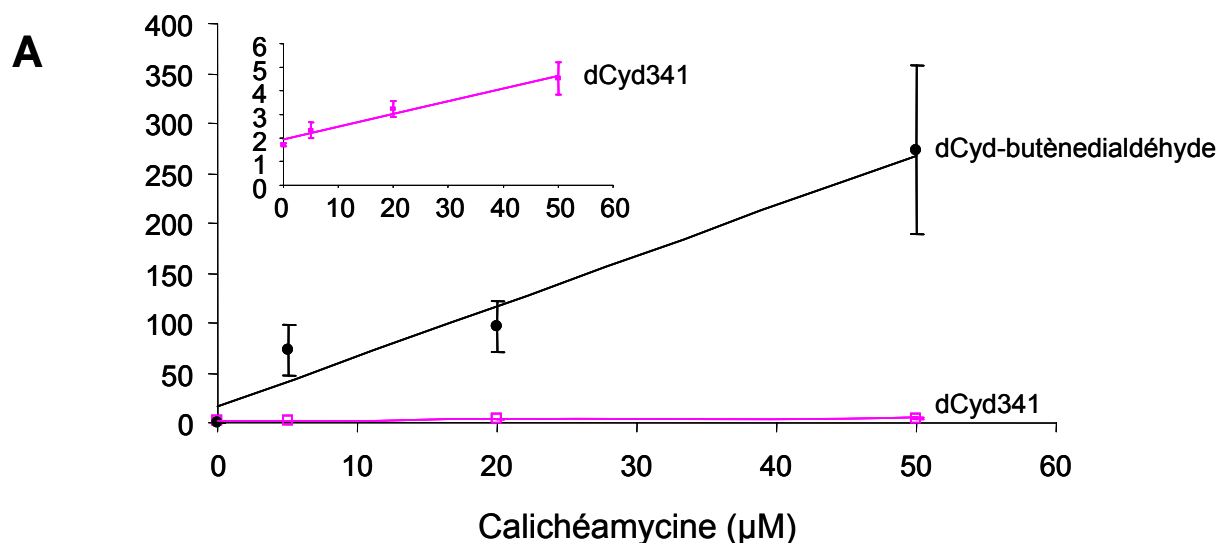


Figure 69. Formation de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde dans l'ADN isolé à 1,5 mg/mL en solutions aqueuses aérées et exposé aux rayonnements γ .

Nous ne sommes pas parvenus à détecter l'adduit dans l'ADN cellulaire exposé aux rayonnements γ .

Dans un soucis de comparaison avec la dCyd341, il nous a semblé intéressant de rechercher la formation de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde suite au traitement de l'ADN par 2 antibiotiques : l'un de la famille des bléomycines (responsables d'une oxydation en position 4 du 2-désoxyribose, comme nous l'avons déjà évoqué) et la calichéamycine γ 1, appartenant à la famille des enédyines et responsable d'oxydations en positions 4 et 5 du désoxyribose. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Peter Dedon du *Massachusetts Institut of Technology* (MIT). La bléomycine induit la formation de dCyd341 mais pas de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde, ce qui est en accord avec les mécanismes de formation respectifs des 2 molécules (**Figure 70**). La calichéamycine, est quant à elle, capable de générer la formation des 2 composés.

Lésions/10⁶ bases



Lésions/10⁶ bases

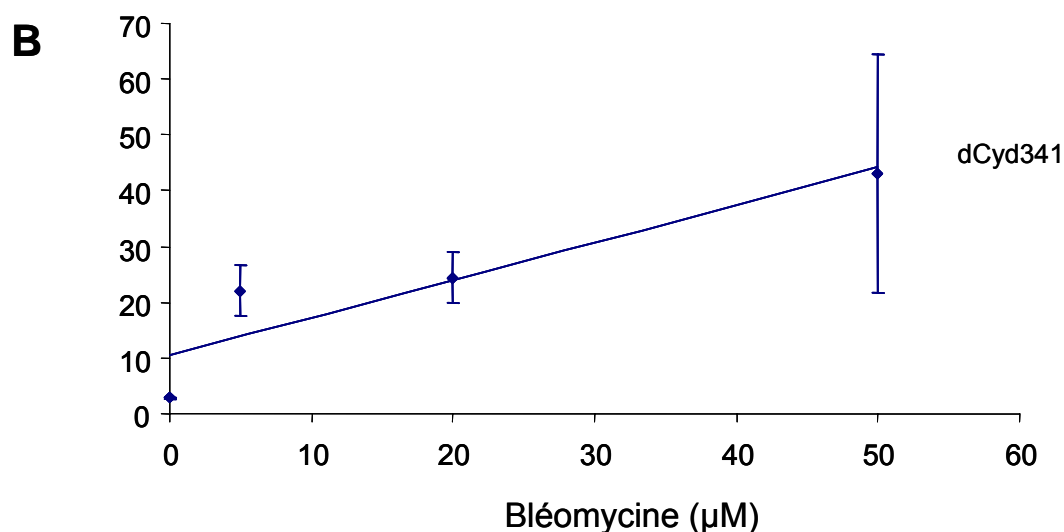


Figure 70. Formation de la dCyd341 et de l'adduit dCyd-butenedialdéhyde dans des solutions aqueuses aérées d'ADN à 1,5 mg/mL traité à la calichéamycine (A) ou à la bléomycine (B).

Il est intéressant de comparer les rendements de formation de la dCyd341 et de l'adduit dCyd-butenedialdéhyde induits par la calichéamycine. En effet, cette substance qui, tout comme la bléomycine, regroupe une famille de composés utilisés pour leurs propriétés antitumorales, est capable d'oxyder les positions 5 et 4 du 2-désoxyribose conduisant à des CSB et des CDB. Une seule molécule de calichéamycine peut causer une CDB en arrachant, dans un premier temps, l'hydrogène en position 5 d'un 2-désoxyribose, puis en s'attaquant dans un second temps au brin d'ADN opposé et en arrachant l'hydrogène en position 4 d'un

2-désoxyribose (Dedon & Goldberg, 1992). Les CSB médiées par la calichéamycine, résultent de la seule oxydation de l'hydrogène en position 5 d'un groupement dR. Il n'est donc pas étonnant d'observer un rendement de formation d'adduit dCyd-butènedialdéhyde plus important que celui de la dCyd341. De plus, le butènedialdéhyde possède 2 fonctions aldéhydes capables de réagir avec les espèces nucléophiles comme la dCyd, tandis que l'intermédiaire aldéhydique 1 n'en possède qu'une. Ce dernier peut de ce fait être moins réactif, générant, à concentrations égales, moins de dCyd341 que le butènedialdéhyde ne générerait d'adduit.

III. CONCLUSION

La détermination des taux de formation de la dCyd341 a révélé que cette lésion est formée de façon non négligeable dans l'ADN isolé. Dans l'ADN isolé exposé aux rayonnements γ , il se forme approximativement 18 fois moins de dCyd341 que de 8-oxo-dGuo, tandis que dans l'ADN cellulaire, ce rapport est de 100. Une explication de cette différence a été avancée par la compréhension du mécanisme de formation de la lésion : dans les cellules, l'intermédiaire aldéhydique 1 pourrait réagir avec d'autres espèces nucléophiles telles que certaines protéines nucléaires.

Ce mécanisme est à rapprocher de celui conduisant à la formation de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde, bien que le butènedialdéhyde provienne de l'oxydation en position 5 du 2-désoxyribose. La méthode « MRM » que nous avons développée a permis de le détecter dans l'ADN isolé, mais pas dans l'ADN cellulaire, même après une exposition aux rayonnements γ . Là encore, il est possible que le butènedialdéhyde réagisse avec d'autres composés dans les cellules, réduisant ainsi le niveau d'adduit formé avec la dCyd. Ce niveau pourrait donc être inférieur au seuil de détection de notre méthode qui est au moins 25 fois moins sensible que celle permettant la détection de la dCyd341.

Nous avons vu que la dCyd341 peut être classée dans la catégorie des sites multilésés. Or, il est postulé que les sites multilésés soient difficiles à réparer, au même titre que les CDB, représentant ainsi des lésions dangereuses pour la cellule (Sutherland *et al.*, 2002a). Des mesures *in vitro* ont permis de montrer que la réparation d'un site multilésé constitué d'une CSB et d'une 8-oxo-dGuo peut être partielle et aboutir à la formation d'une CDB (Harrison *et*

al., 1999), lésion potentiellement létale. Ceci est dû à l'inhibition de la réparation de la CSB par le clivage préalable de la 8-oxo-dGuo.

Il nous a paru pertinent de nous intéresser à la réparation de la dCyd341 afin d'évaluer son importance au niveau biologique.

CHAPITRE VI: COMMENT LA DCYD341 EST-ELLE PRISE EN CHARGE PAR LES CELLULES ?

I. EXCISION *IN VITRO* PAR DES GLYCOSYLASES

Comme nous l'avons évoqué dans la présentation bibliographique, toutes les lésions de l'ADN n'engendrent pas les mêmes conséquences. Il faut en effet tenir compte du niveau de formation de la lésion, de son pouvoir mutagène et de l'efficacité des systèmes de réparation à son égard. La notion de l'importance biologique d'une lésion de l'ADN est donc en partie liée à sa capacité à être réparée. L'existence de différents systèmes permettant à la cellule de réparer les dommages de l'ADN a été évoquée, la nature du système utilisé étant guidée par la nature du dommage. D'après l'idée classiquement admise selon laquelle les « petits » dommages de l'ADN seraient réparés par la REB, il est peu probable que la dCyd341 soit prise en charge par ce système. En effet, la structure de ce volumineux adduit et le fait qu'il s'agisse d'un site multilésé rendent difficilement envisageable sa réparation par la REB.

Des expériences préliminaires ont été effectuées à l'aide de 2 glycosylases bactériennes jouant un rôle fondamental dans la REB chez *E.coli* et présentant des spécificités de substrat différentes. La Fpg est connue pour notamment prendre en charge la réparation de bases puriques oxydées tandis que l'Endo III est impliquée dans les premières étapes de la REB en ce qui concerne des bases pyrimidiques oxydées (Dizdaroglu *et al.*, 1993; Tchou *et al.*, 1991).

Afin de tester leur aptitude à exciser la dCyd341, des solutions aqueuses aérées d'ADN à 1,5 mg/mL exposées à une dose de 35 Gy de rayonnement γ ont été incubées en présence de chacune des enzymes. L'ADN a ensuite été digéré et analysé par CLHP-SM/SM afin d'y mesurer le niveau de lésions non excisées. D'après la **Figure 71**, la Fpg est capable d'efficacement exciser la 8-oxo-dGuo de l'ADN, ce qui est en accord avec les données bibliographiques. Les niveaux de 8-oxo-dAdo et de diols de Thd ne sont pas affectés par la présence de l'enzyme. En ce qui concerne l'Endo III, les résultats confirment que cette glycosylase excise efficacement les diols de Thd et n'a pas d'efficacité sur la 8-oxo-dAdo et la 8-oxo-dGuo. La dCyd341 et l'adduit dCyd-butènedialdéhyde se comportent de la même façon face aux deux enzymes. En effet, ni l'une ni l'autre de ces lésions n'est excisée ni par la Fpg, ni par l'Endo III. Des profils similaires ont été obtenus avec 2,6 μ g de Fpg et 3,5 μ g d'Endo III. Comme nous l'avons précédemment mentionné, il serait surprenant que ces lésions soient prises en charge par les glycosylases de la REB. Mais ces expériences sont préliminaires dans le sens où de nombreuses autres glycosylases existent et nous ne pouvons

pas exclure la possibilité que l'une d'elles reconnaisse la dCyd341 ou l'adduit dCyd-butènedialdéhyde, bien que cela paraisse fort peu probable.

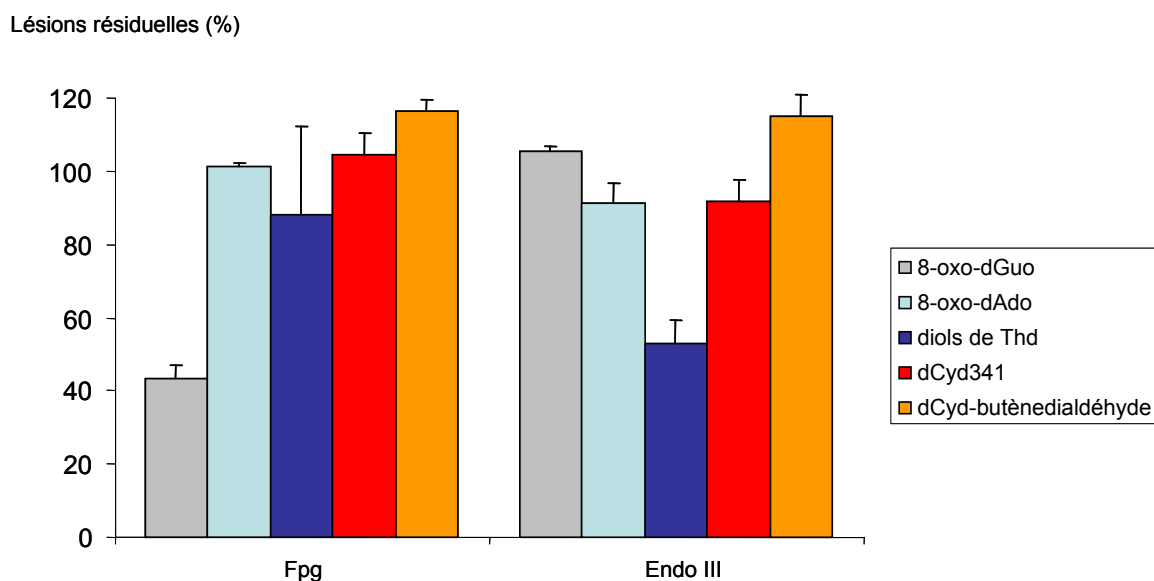


Figure 71. Activités d'excision des glycosylases Fpg (5,2 µg) et Endo III (7 µg) vis-à-vis de différentes lésions oxydatives de l'ADN. Les résultats sont exprimés en pourcentage du taux de lésions résiduelles par rapport au taux dans un ADN non incubé avec les enzymes.

II. EXCISION IN VITRO PAR DES EXTRAITS NUCLEAIRES

Les glycosylases testées ne permettent pas l'excision de la dCyd341. Afin d'évaluer si la cellule dispose d'un équipement enzymatique susceptible de mener à bien cette opération, l'aptitude et l'efficacité d'extraits nucléaires à exciser la lésion a été mesurée. Pour cela, nous avons disposé de cellules provenant d'ovaires de hamsters chinois déficientes pour la protéine Ku 80 (cellules CHO xrs5) fournies par le laboratoire du Pr. Peter O'Neill à Oxford. Cette protéine intervient dans la réparation des CDB par le système NHEJ. Dans un premier temps, il nous a semblé que l'absence de cette protéine ne devrait pas affecter la réparation de la dCyd341. Nous reviendrons sur cette notion au cours de la discussion de ce chapitre. Des solutions aqueuses aérées d'ADN, témoin et irradié, ont été incubées ou non avec les extraits nucléaires provenant de ces cellules. Les conditions utilisées permettent l'excision de 40 % des molécules de 8-oxo-dGuo générées par irradiation à 42 Gy (**Figure 72**). La dCyd341 est excisée avec une efficacité de 50 %. La capacité du matériel cellulaire à exciser la lésion est, dans ces conditions, proche de la capacité d'excision de la 8-oxo-dGuo. Les cellules disposent

donc de l'arsenal enzymatique nécessaire à la réparation de la dCyd341. La réparation de cette dernière dans des cellules monocytaires de la lignée THP1 a alors été évaluée.

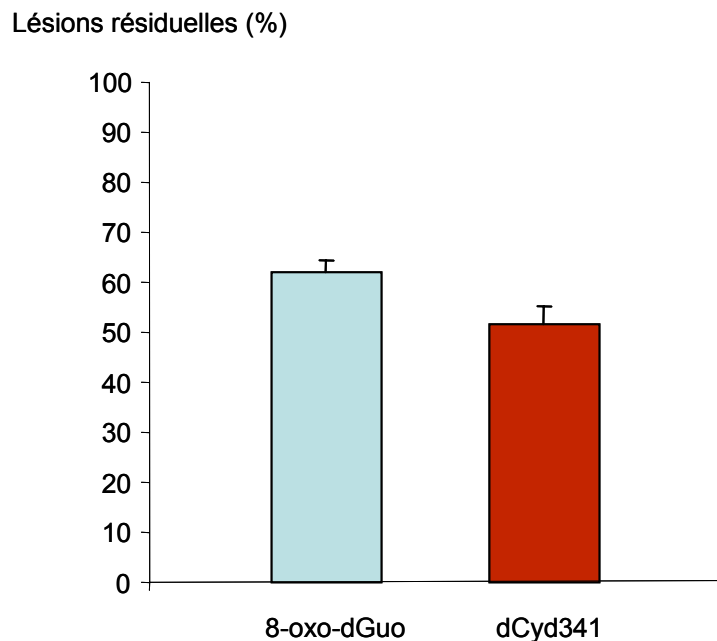


Figure 72. *Excision de la 8-oxo-dGuo et de la dCyd341 dans l'ADN isolé incubé avec des extraits totaux de cellules CHO xrs5 après une exposition à une dose de 42 Gy. Les résultats sont exprimés en pourcentage de lésions résiduelles par rapport aux lésions générées dans l'ADN non incubé avec les extraits, après normalisation à la quantité d'ADN. L'ADN est en solutions aqueuses aérées à une concentration de 1,5 mg/mL.*

III. REPARATION IN CELLULO

A. Choix du traitement

L'objectif de cette partie du travail est d'induire la formation de la lésion dans les cellules, puis de remettre ces dernières en culture pour leur laisser le temps d'éventuellement réparer la dCyd341. Le choix du traitement générant la dCyd341 est important. Il faut en effet créer suffisamment de lésions pour pouvoir les détecter après analyse de l'ADN cellulaire par spectrométrie de masse, mais il ne faut pas affecter la viabilité cellulaire de façon drastique. Ainsi, l'exposition aux rayonnements γ des cellules est tout à fait exclue pour ce type d'expériences. La sensibilité de la méthode de détection nous oblige à exposer les cellules à une dose de 30 Gy minimum pour pouvoir y mesurer la dCyd341. Or, d'après des mesures réalisées précédemment au laboratoire, les cellules monocytaires humaines de la lignée THP1 ont une survie de 50 %, 24 heures après une irradiation à 15 Gy. Un traitement engendrant la formation de la dCyd341, tout en maintenant

une meilleure viabilité cellulaire est nécessaire. Les substances de la famille des bléomycines ont retenu notre attention pour cette expérience puisque leur capacité à induire la formation de la dCyd41 au niveau cellulaire a précédemment été démontrée. Une étude de viabilité des cellules THP1 traitées aux bléomycines a donc été réalisée de façon à pouvoir déterminer si ces drogues peuvent être utilisées, et si oui, à quelle concentration.

B. Choix des conditions de traitement

La cytotoxicité des bléomycines a été évaluée dans les cellules à l'aide du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-tétrazolium (MTT). Le test au MTT repose sur la métabolisation par les cellules de ce composé qui est alors dégradé en un produit bleu insoluble. L'absorbance à 570 nm de ce produit est mesurée par un spectrophotomètre. Le résultat est exprimé en pourcentage de cellules viables (métaboliquement actives) par rapport au nombre total de cellules. Dans de nombreux cas, ce test est réalisé par une lecture en microplaques. Dans le cas des cellules THP1 et pour des raisons pratiques, cette étape a été réalisée manuellement. Les THP1 sont en effet des cellules non adhérentes, ce qui rend leur manipulation en microplaques délicate. Ceci est notamment vrai lors des étapes de rinçage des cellules, qui impliquent la centrifugation de la microplaque puis l'élimination du milieu ou du produit de rinçage. Mais dans le cas de ces cellules qui restent en suspension, même après centrifugation de la microplaque, la perte de cellules ne peut être évitée. Le fait de travailler avec des plus grands volumes de cellules permet de limiter ce problème.

La cytotoxicité des bléomycines vis-à-vis des THP1 (20 millions de cellules par point) est mesurée 12 h, 24 h et 48 h après traitement, pour des doses de bléomycine allant de 0 à 150 μ M. Les résultats, présentés en **Figure 73**, révèlent que pour la plus forte dose de bléomycine utilisée, environ 50 % des cellules sont viables 12 heures après traitement et cette viabilité augmente jusqu'à 80 % 24 h et 48 h après traitement. En effet, les cellules semblent récupérer du traitement. Cette récupération semble pourtant limitée, l'allure de la courbe de survie cellulaire à 48 h étant quasiment superposable à celle à 24 h.

Les bléomycines conviennent pour étudier la réparation *in cellulo* de la dCyd341 et leur utilisation à une concentration de 150 μ M semble être la mieux adaptée. En effet, d'après les résultats précédemment reportés en **Figure 52**, cette concentration est suffisamment élevée pour permettre la mesure du niveau de dCyd341.

Viabilité cellulaire

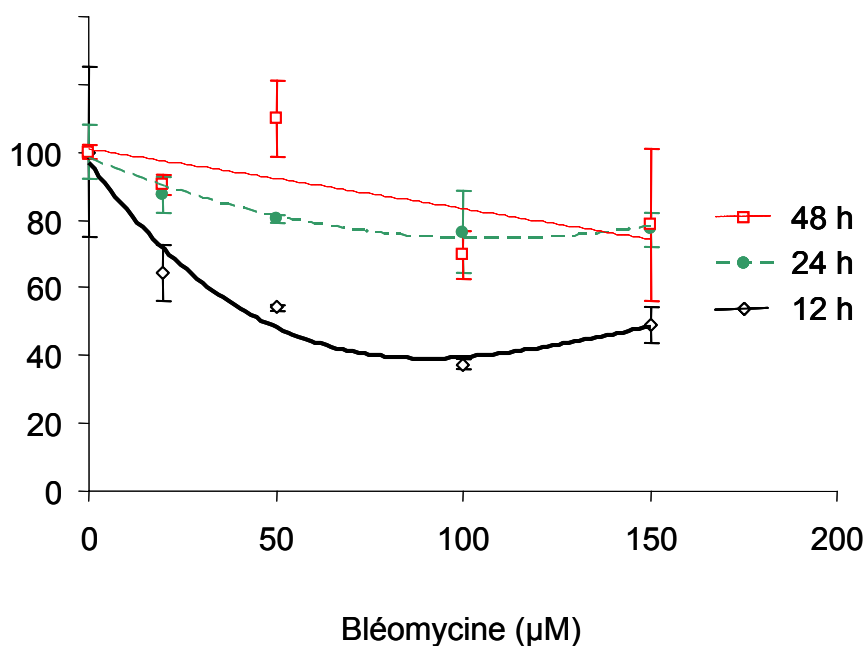


Figure 73. Viabilité des cellules THP1 traitées avec des concentrations croissantes de bléomycine.

C. Etude de la réparation de la dCyd341 par les cellules traitées à la bléomycine

Les cellules monocytaires humaines de la lignée THP1 (20 millions de cellules par point) sont donc traitées avec 150 µM de bléomycine, dans du PBS. Après traitement, les cellules sont remises en culture pendant différents temps avant que leur ADN soit extrait, digéré et analysé par CLHP-SM/SM. L'aptitude de ces cellules à exciser la dCyd341 est mise en évidence par les résultats présentés sur la **Figure 74**. En effet, le taux de dCyd341 restant dans l'ADN cellulaire après le traitement diminue avec la remise en culture des cellules. 10 h après traitement, près de 60 % de la quantité de dCyd341 générée est excisée. Le retour au niveau basal, correspondant approximativement à 0,01 lésion/10⁶ bases normales de dCyd341, est effectué 48 h après traitement.

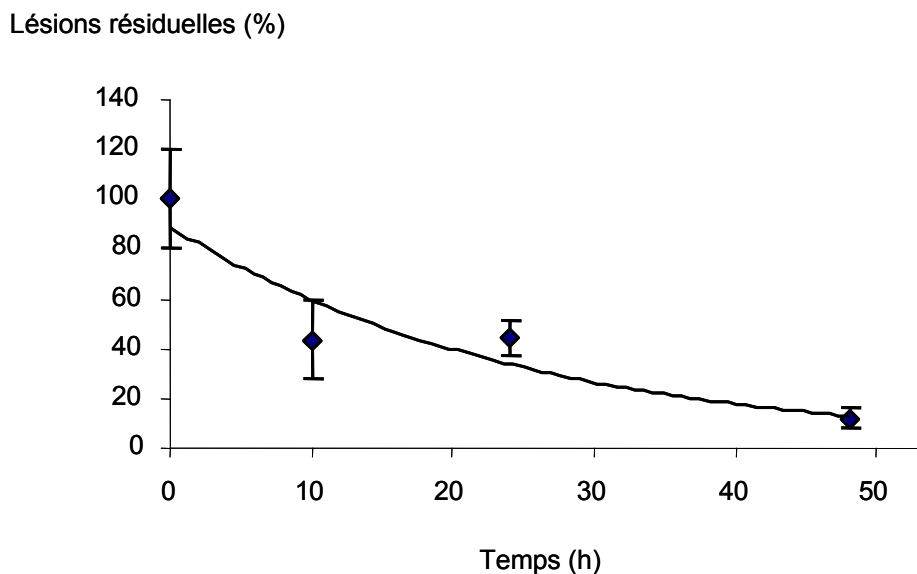


Figure 74. Suivi de l'excision de la dCyd341 dans les THP1 traitées avec 150 µM de bléomycine.

IV. DISCUSSION

Après avoir caractérisé la dCyd341 en termes de structure, il paraissait logique d'évaluer les conséquences biologiques que peut engendrer cette lésion dans la cellule. Un premier axe de recherche consiste à s'intéresser à sa prise en charge par les systèmes de réparation. Les résultats présentés, obtenus à l'aide d'extraits nucléaires ou dans les cellules, soulignent leur aptitude à efficacement exciser la dCyd341. Il paraît intéressant de comparer la cinétique d'excision de la dCyd341 avec la cinétique d'excision d'autres types de lésions réparées par la REN. Les dimères de pyrimidine générés par les rayonnements UVB ont retenu notre attention. Ces photoproduits peuvent être de 2 types :

- les dimères cyclobutane (CPD),
- les photoproduits (6-4) ((6-4) PP) qui peuvent être convertis en isomères de valence Dewar après absorption d'un photon UVB.

Les bases impliquées dans ces dimères peuvent être 2 thymines, 2 cytosines ou 1 thymine et 1 cytosine.

Les cinétiques d'excision de ces dommages dans l'ADN de fibroblastes ou de kératynocytes normaux humains diffèrent entre les CPD et les (6-4) PP (Courdavault *et al.*, 2005). En effet, les (6-4) PP sont rapidement excisés, leur niveau tombant approximativement à 20 % du niveau initial 4 h après une dose d'irradiation de 500 J.m⁻² (cette dose correspond à une survie cellulaire de 80 %, 24 h après irradiation). Leur réparation est quasiment totale 24

h après irradiation. En revanche, 70 % des CPD persistent même 72 h après irradiation. Ainsi, la réparation de la dCyd341 aurait une cinétique intermédiaire entre celles des (6-4) PP et des CPD.

Un autre point important à mentionner est que ces résultats renseignent sur l'excision de la dCyd341 sans pour autant donner d'informations sur la réparation de la CSB inhérente à cette lésion. Ainsi, si la dCyd341 implique un pontage inter-brin, son excision peut générer une CDB, au potentiel mutagène et létal élevé. Les CDB sont en effet considérées comme étant les principales lésions radio-induites responsables de la mort cellulaire. Paradoxalement, l'excision de la dCyd341 pourrait alors être néfaste à la cellule. Si la dCyd341 implique un pontage intra-brin, son excision peut générer 2 coupures proches et sur le même brin d'ADN.

Comme nous l'avons mentionné, une série d'expériences a été effectuée à l'aide d'extraits nucléaires de cellules CHO xrs5. La capacité de ces extraits à exciser la dCyd341 a ainsi été mise en évidence. Originellement, le choix d'extraits mutés pour la protéine Ku 80 ne nous semblait pas interférer dans la réparation de la dCyd341. Mais la question mérite d'être approfondie. En effet, des travaux ont démontré qu'en plus de son rôle dans la NHEJ, l'hétérodimère Ku (constitué des protéines Ku 70 et Ku 80), modulerait la réparation de sites multilésés contenant une CSB (Hashimoto *et al.*, 2001). Les auteurs rapportent ainsi 2 effets de l'hétérodimère Ku face à un site multilésé composé d'une dihydrouracile (DHU) et d'une CSB à proximité sur le brin opposé :

- Ku diminue l'activité d'excision d'Endo III vis-à-vis de la DHU.
- Lorsque l'Endo III parvient à exciser la DHU, Ku se lie à la CDB générée, vraisemblablement pour éviter la formation de phénomènes de recombinaison avec d'autres CDB.

Les auteurs proposent ainsi un modèle intéressant du rôle de Ku dans la réparation de sites multilésés (**Figure 75**). Ce modèle pourrait s'appliquer dans le cas de la dCyd341 et il est possible d'envisager un effet similaire de Ku sur la ou les protéine(s) impliquée(s) dans l'excision de la dCyd341. Si cet effet existe, il n'a pas pu être mesuré par nos expériences utilisant les extraits nucléaires déficients en Ku80. Il paraît donc indispensable de réaliser des expériences complémentaires à l'aide d'extraits nucléaires provenant de cellules CHO (non porteuses de la mutation).

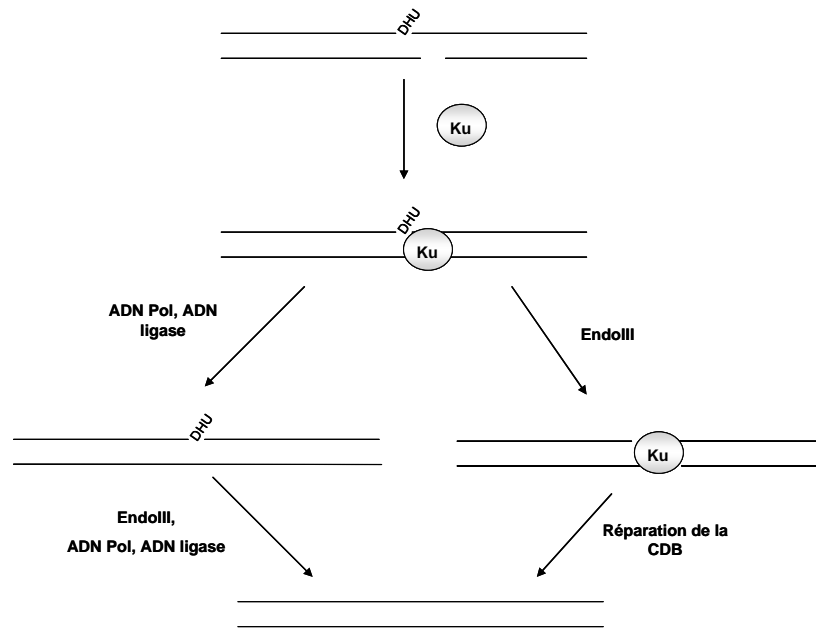


Figure 75. Rôle de l'hétérodimère Ku dans la réparation de sites multilésés. Modèle proposé par Hashimoto et al., 2001.

CHAPITRE VII: CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'ensemble de l'étude ici présentée a permis d'identifier et de caractériser une nouvelle lésion radio-induite de l'ADN.

Par une utilisation originale de la technique de CLHP-SM/SM, au moins 3 nouvelles modifications de l'ADN ont été détectées dans l'ADN isolé exposé aux rayonnements γ . Cette approche a consisté à utiliser le SM/SM en mode « perte de neutre » afin de détecter toute molécule perdant, au cours de son ionisation positive par électrospray, un fragment neutre de 116 uma, cette fragmentation étant caractéristique des nucléosides. D'après nos connaissances, les 3 lésions, dCyd341, dN255 et dN347, n'avaient jamais été décrites. Deux d'entre elles, de masses particulièrement élevées par rapport aux nucléosides normaux, correspondent vraisemblablement à de volumineux adduits. Le développement d'une méthode de détection « MRM » plus sensible, a permis de rechercher ces lésions dans l'ADN cellulaire et d'y détecter la dCyd341. Nos efforts se sont alors concentrés sur cette dernière. Nous avons pu déterminer qu'il s'agit d'une modification de la dCyd et émettre une hypothèse de structure. Cette structure a été confirmée par des analyses de masse exacte et par RMN ^1H , permettant d'affirmer que la lésion est la 6-(2-désoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-2-hydroxy-3-(3-hydroxy-2-oxopropyl)-2,6-dihydroimidazo[1,2-c]pyrimidin-5(3H)-one.

Des données quantitatives relatives à la formation de la dCyd341 dans l'ADN ont été obtenues. Ainsi, le niveau de cette lésion générée par une exposition aux rayonnements γ de solutions aqueuses aérées d'ADN isolé n'est pas négligeable puisqu'il représente approximativement 5 % du niveau de la 8-oxo-dGuo. Ce rapport est bien inférieur dans l'ADN cellulaire, le niveau de dCyd341 représentant 1 % du niveau de 8-oxo-dGuo. La compréhension du mécanisme de formation de la dCyd341 apporte un élément de réponse permettant d'expliquer cette différence. Issu de la radiolyse de l'eau, un radical $\cdot\text{OH}$ serait responsable de l'arrachement de l'atome d'H porté par le carbone en position 4 du 2-désoxyribose. Le radical carbo-centré ainsi généré évolue vers un aldéhydique réactif capable de réagir avec le NH_2 exocyclique d'une dCyd proche, de façon à générer un adduit correspondant à la dCyd341. Dans la cellule, le dérivé aldéhydique, très électrophile, peut réagir avec des espèces nucléophiles autres que la dCyd. Il a notamment été décrit que ce type d'intermédiaires (le butenedialdéhyde, par exemple) réagit avec des protéines nucléaires telles que les histones (Chen *et al.*, 1997). Voilà sans doute une des raisons expliquant le fait que la formation de la dCyd341 comparativement à celle de la 8-oxo-dGuo, soit bien inférieure dans l'ADN cellulaire que dans l'ADN isolé. De plus, nous avons mis en évidence que l' O_2 est

nécessaire à la formation de la dCyd341. La concentration en O₂ dans le noyau d'une cellule est inférieure à celle d'une solution d'ADN isolé. Cela peut également expliquer la différence du niveau de formation de la lésion entre ADN cellulaire et ADN isolé.

Le mécanisme de formation proposé a été vérifié par une série d'expériences. Dans un premier temps, la survenue d'un évènement oxydatif touchant le 2-désoxyribose en position 4 est confirmée par l'aptitude des bléomycines à générer la dCyd341. De plus, l'inhibition de la formation de la lésion par la méthoxyamine a confirmé l'implication d'un aldéhyde au cours de la formation de la lésion. L'intervention d'un produit de dégradation issu du 2-désoxyribose et réagissant sur la dCyd a également été démontré. Le mécanisme que nous proposons suggère que le produit de dégradation en question et l'intermédiaire aldéhydique ne sont qu'une seule et même molécule. Nous avons mis en relief les similitudes entre ce mécanisme et celui conduisant à la formation de l'adduit du butènedialdéhyde sur la dCyd. Ce dernier est un produit de l'oxydation du 2-désoxyribose en position 5. De façon intéressante, cet adduit est généré dans l'ADN isolé à des niveaux du même ordre que la dCyd341. En revanche, nous n'avons pas été en mesure de le détecter dans l'ADN cellulaire. Ceci peut s'expliquer par le fait que la méthode soit beaucoup moins sensible que celle permettant la détection de la dCyd341 (il existe un facteur 25 entre les deux seuils de sensibilité).

Le mécanisme ainsi proposé permet de classer la dCyd341 dans la catégorie des sites multilésés. En effet, sa formation implique la génération d'une CSB se produisant soit sur le même brin que la lésion elle-même, soit sur le brin opposé. Le premier cas de figure correspond à un pontage intra-brin entre l'aldéhyde et la dCyd tandis que le second mécanisme correspond à un pontage inter-brin. L'état actuel des recherches ne nous permet pas de trancher entre ces deux mécanismes. Un travail visant à synthétiser un précurseur photochimique de radical en position 4 du 2-désoxyribose, d'après une voie décrite par Bernt Giese (Giese *et al.*, 1995a; Giese *et al.*, 1995b), est à l'étude. Ce précurseur, incorporé dans un oligonucléotide, permettrait de générer la lésion. Il serait alors possible de placer des dCyd à différentes positions, sur le même brin ou sur le brin opposé au précurseur, afin d'étudier la formation de la lésion. Nous envisageons ainsi de déterminer si l'attaque est inter-brin, intra-brin ou si les 2 mécanismes coexistent.

Dans une dernière partie de l'étude, nous nous sommes intéressés à la prise en charge de la dCyd341 par les cellules. La capacité des cellules à exciser la lésion a ainsi été mise en

évidence, aussi bien par l'utilisation d'extraits nucléaires que par la réalisation d'expériences « *in cellulo* ». La vitesse d'excision est relativement lente puisque la dCyd341 ne revient à un niveau basal que 48 h après un traitement aux bléomycines, dans les conditions utilisées. Les expériences réalisées avec les glycosylases Fpg et Endo III ont montré leur incapacité à exciser la dCyd341, dans les conditions utilisées. L'obtention d'un oligonucléotide portant une dCyd341 par l'utilisation du précurseur photochimique du radical en position 4 permettra de mieux appréhender ces mécanismes. Ceci constituera un outil très intéressant pour réaliser des études de réparation *in vitro* et identifier les systèmes enzymatiques capables d'exciser la lésion. Ainsi, l'utilisation de différents extraits nucléaires provenant de cellules sauvages et mutées pour certaines enzymes de la réparation (cellules provenant de patients XP notamment) est envisagée.

CHAPITRE VIII: CONDITIONS EXPERIMENTALES

I. LIGNEE ET CULTURE CELLULAIRE

Les milieux et produits utilisés pour la culture cellulaire proviennent de Life Technologies Invitrogen (Cergy-Pontoise, France).

Une lignée monocyttaire tumorale THP1 originellement isolée du sang périphérique d'un jeune donneur atteint de leucémie (ATCC, Rockville, MD, USA) est cultivée dans une atmosphère enrichie à 5% en CO₂ et thermostatée à 37°C. Le milieu de culture utilisé est composé de RPMI-1640 avec glutamax auquel sont ajoutés 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté, 1 % d'un mélange d'acides aminés non essentiels 100 X (MEM) et 1 % d'un mélange de pénicilline à 5000 U / mL et de streptomycine à 5000 µg / mL.

Avant chaque expérience, un comptage des cellules au bleu de trypan est réalisé, de façon à travailler avec environ 20 millions de cellules vivantes par point expérimental. Le bleu de trypan est un colorant d'exclusion : il n'est pas internalisé par les cellules vivantes qui possèdent une barrière cytoplasmique active, contrairement aux cellules mortes. Ces dernières sont donc colorées en bleu, tandis que les cellules vivantes restent incolores. Le comptage est réalisé sur des lames à usage unique Kovas Slide provenant de chez Invitrogen (Cergy Pontoise, France), 10 µL de cellules diluées au 1/2 dans du bleu de trypan (solution à 0,4 % dans l'eau filtrée sur membrane Millipore de 0,22 µm) étant déposés.

II. IRRADIATIONS γ

Les irradiations sont effectuées à l'aide d'une source de ⁶⁰Co délivrant un débit de dose de 10 Gy/min, d'une source de débit 2 Gy/min ou d'une autre source de 5 kGy/h, immergées sous une hauteur d'eau de 3 m. Les irradiations sont réalisées à température ambiante.

Les solutions aqueuses d'ADN isolé exposées aux rayonnements γ sont préalablement préparées, à partir d'ADN isolé de thymus de veau provenant de Sigma Co (St Louis, MO, USA) à une concentration de 1,5 mg/mL. Les solutions aqueuses de nucléosides ou de nucléotides à irradier sont préparées à une concentration 0,5 mM.

Dans le cas de l'irradiation de pTp, cette dernière est irradiée à une concentration finale de 2,5 mM puis incubée pendant 1 heure avec de la dCyd (concentration final de 0,5 mM), soit à température ambiante, soit à 37°C.

Les cellules à irradier (20 millions de cellules par mL) sont récoltées dans du PBS, l'équivalent d'un flacon de culture de 50 mL étant repris dans 1 mL de tampon phosphate salin (PBS). Après irradiation, l'ADN des cellules est immédiatement extrait.

Dans toutes les expériences, chaque irradiation est réalisée en triple.

III. METHODE D'EXTRACTION CHAOTROPIQUE AU NAI DE L'ADN CELLULAIRE

L'ADN est extrait des cellules suivant le protocole décrit par Helbock H.J. et ses collaborateurs (Helbock *et al.*, 1998). Ce protocole minimise les oxydations artéfactuelles et se décline en plusieurs étapes :

- étape 1 : lyse de la membrane plasmique. Les culots cellulaires, récupérés après une centrifugation de 3 minutes à 260 g sont suspendus dans 1,5 mL de tampon de lyse A (320 mM de sucrose, 5 mM de MgCl₂, 10 mM de Tris-HCl et 0,1 mM de defferoxamine, 1 % de triton X-100, pH7.5) et centrifugés 5 minutes à 1500 g. Après élimination des surnageants, la même étape est répétée.

- étape 2 : lyse de la membrane nucléaire. Les culots nucléaires précédemment obtenus sont repris dans 600 µL de tampon de lyse B (5 mM de EDTA-Na₂, 10 mM de Tris-HCl, 0,15 mM de defferoxamine, pH 8) auxquels sont ajoutés 35 µL de SDS à 10 %.

- étape 3 : isolement et précipitation de l'ADN. Après ajout de 3 µL de RNase A à 100 mg/mL et de 7 µL de RNase T1 à 1 U/µL, les échantillons sont incubés à 50°C pendant 15 minutes. Puis 30 µL de protéase Qiagen à 20 mg/mL sont ajoutés et les échantillons sont placés 1 heure à 37°C. La précipitation de l'ADN est réalisée par ajout de 1,2 mL de solution de NaI (20 mM de EDTA-Na₂, 7,6 M de NaI, 40 mM de Tris-HCl, 0,3 mM de defferoxamine, pH 8) et 2 mL d'isopropanol à 100%. Après une agitation douce des tubes et une centrifugation 5 minutes à 5000 g, les culots sont repris dans 1 mL d'isopropanol à 40 % et à nouveau centrifugés 5 minutes à 5000 g. Ils sont alors remis en suspension dans 1 mL d'éthanol à 70 % et à nouveau centrifugés 5 minutes à 5000 g. Les culots finaux sont repris dans 100 µL d'une solution de defferoxamine à 0,1 mM.

Les enzymes utilisées lors de l'extraction proviennent de Sigma Co (St Louis, MO, USA) sauf la protéase provenant de Qiagen (Hilden, Allemagne) et la RNase T1 provenant de Roche Diagnostics (Manheim, Allemagne).

IV. DIGESTIONS ENZYMATIQUES DE L'ADN

Avant d'être analysés par CLHP-SM/SM, l'ADN isolé ainsi que l'ADN extrait des cellules sont digérés en mélanges de nucléosides. A l'ADN en solution dans 100 µL d'eau ou de defferoxamine, sont ajoutés :

- 5 µL de tampon MNSPDE (acide succinique à 200 mM, CaCl₂ à 100 mM, pH 6),
- 0,05 U de phosphodiesterase II,
- 5 U de DNase II,
- 1 U de nucléase P1.

Les échantillons sont incubés 2 h à 37°C avant l'ajout de :

- 12 µL de tampon de phosphatase alcaline (Tris-HCl à 500 mM, EDTA à 1 mM, pH 8),
- 0,03 U de phosphodiesterase I,
- 2 U de phosphatase alcaline.

Les échantillons sont à nouveau incubés 2 h à 37 °C. Puis 7 µL d'HCl à 0,1 N sont ajoutés et les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 5000 g. Les surnageants sont transvasés dans des vials pour l'analyse par CLHP-SM/SM.

Les enzymes utilisées lors des digestions proviennent de Sigma Co (St Louis, MO, USA) sauf la phosphodiesterase I provenant de USB Corporation (Cleveland, Ohio, USA).

V. TRAITEMENT D'ADN PAR DES AGENTS EXOGENES

A. Traitement d'ADN cellulaire à la bléomycine

Le mélange de bléomycines, constitué de 70 % de bléomycine A2 et de 30 % de bléomycine B2, provient de Sigma Co (St Louis, MO, USA). Pour être traitées, les cellules sont récoltées dans du PBS avec Ca²⁺/Mg²⁺, chaque point étant réalisé sur 20 millions de cellules environ réparties dans un volume de 1 mL de PBS. Les cellules sont traitées avec des concentrations de bléomycine allant de 0 à 150 µM pendant 1 heure et à 37°C. A l'issue de ce

traitement, elles sont centrifugées 5 minutes à 1200 g puis rincées avec du PBS neuf. L'extraction de l'ADN est immédiatement réalisée sur le culot final.

Chaque point de traitement est réalisé en triple.

B. Traitement d'ADN isolé irradié à la méthoxyamine

La méthoxyamine (MX) provient de Sigma Co (St Louis, MO, USA). Des concentrations croissantes de MX (0 à 5 mM) sont ajoutées aux solutions aqueuses d'ADN à 1,5 mg/mL, immédiatement avant leur exposition à des doses allant de 0 à 150 Gy. Après irradiation, l'ADN est précipité par ajout de 2,5 v d'éthanol à 100 % et 1/10 de NaCl 4 N. Après une centrifugation de 5 minutes à 5000 g, les culots sont resuspendus dans 50 µL d'eau, digérés et analysés par CLHP-SM/SM.

Les expériences sont réalisées en triple.

VI. PREPARATION DE SOLUTIONS D'ADN SOUS DIFFERENTES CONDITIONS

A. Solutions aqueuses d'ADN isolé en conditions désaérées

10 mL d'eau sont désaérés en y faisant buller de l'argon pendant 1h30. L'eau est ensuite placée sous agitation à l'intérieur d'une boîte à gants sous argon pendant 10 jours. Puis, en boîte à gants, 10 mg d'ADN sont mis en solution dans l'eau. Toujours en boîte à gants, la solution désaérée d'ADN est alors répartie dans des microtubes à vis (100 µL/tube) pour l'irradiation.

Les expériences sont réalisées en triple.

B. Solutions aqueuses d'ADN isolé en présence d'¹⁸O₂

Tout comme pour la préparation des échantillons en milieu désaéré, de l'argon est mis à buller dans de l'eau (contenue dans un ballon muni d'un bouchon à jupe) et cette eau est ensuite placée 10 jours sous la boîte à gants, sous agitation. Après ajout de l'ADN dans l'eau, toujours sous la boîte à gants et de façon à obtenir une solution à 1 mg/mL, de l'¹⁸O₂ est mis à buller dans la solution. Les irradiations sont effectuées dans le ballon. Après une durée d'exposition aux rayonnements γ correspondant à la dose voulue, 3 × 100 µL (les mesures

sont réalisées en triple) de la solution sont prélevés à la seringue (sans déboucher le ballon), le reste étant remis à irradier.

L' $^{18}\text{O}_2$ enrichi à 96,7% provient de Euriso-top (St Aubin, France).

C. Solutions d'ADN isolé en présence d' H_2^{18}O

Les échantillons d'ADN en solution aqueuse sont lyophilisés, repris dans de l'eau et rehyophilisés, avant d'être dissous dans de l' H_2^{18}O . La concentration des échantillons est toujours de 1 mg/mL et les irradiations sont réalisées en triple.

L' H_2^{18}O enrichie à 95,4 % provient de Euriso-top (St Aubin, France).

VII. ANALYSES PAR CLHP-SM/SM

A. Description du système

Le système utilisé est composé d'une part, du modèle de CLHP 1100 de chez Agilent (Massy, France) équipé d'un injecteur automatique thermostaté et relié à une pompe, et d'autre part d'un spectromètre de masse API 3000 (Sciex, Thornhill, Canada) ainsi que d'un détecteur UV permettant la détection des nucléosides normaux à 270 nm. Le spectromètre de masse API 3000 contient un analyseur triple quadripolaire. Le gaz de nébulisation, permettant l'ionisation des molécules en solution, en mode électrospray est de l'azote circulant à un débit de 1,23 L/min. Pour favoriser l'évaporation des solvants et ainsi accroître la sensibilité de l'analyse, un courant auxiliaire d'azote chauffé à 400 °C est utilisé à un débit de 8 L/min. L'analyse des données est effectuée à l'aide du logiciel Analyst 1.4.

B. Conditions chromatographiques

Les échantillons sont injectés sur le système de CLHP-SM/SM sous forme de solutions d'ADN digérés en nucléosides.

La séparation des composés associée à la détection en mode « perte de neutre » est réalisée en utilisant une colonne Alltima C18 sur gel de silice (ODS) (5 μm , 0,2 \times 25 cm) de chez Alltech (Tempemars, France). Un gradient de 5 % d'acétonitrile dans du formiate d'ammonium à 5 mM est réalisé en 25 minutes (gradient A).

La séparation des composés associée aux modes « MRM » et « *Product ion Scan* » est effectuée selon l'une ou l'autre des conditions suivantes. Soit une colonne Uptisphere-ODB

C18 (3 μm , 0,2 \times 15 cm) de chez Interchim (Montluçon, France) est utilisée (gradient B). Dans ce cas, un gradient d'acétonitrile atteignant 15 % en 25 minutes dans du formiate d'ammonium à 5 mM est réalisé. Soit une colonne Purospher STAR RP-18 (3 μm , 0,2 \times 12,5 cm) de chez Merck (Darmstadt, Allemagne) est utilisée. Dans ce cas, le gradient est de 10 % d'acétonitrile en 25 minutes, toujours dans du formiate d'ammonium à 5 mM (gradient C).

Dans le cas des trois gradients, un rinçage de la colonne avec 50 % d'acétonitrile dans l'eau est effectué pendant 10 minutes entre chaque échantillon.

C. Paramètres de la détection par spectrométrie de masse

Les paramètres de la méthode « MRM » permettant la détection des diols de Thd, de la 8-oxo-dGuo, de la 8-oxo-dAdo sont ceux décrits par Frelon S. et ses collaborateurs (Frelon *et al.*, 2000).

La dCyd341 et l'adduit dCyd-butènedialdéhyde sont détectés en mode d'ionisation positif avec les transitions 342 \rightarrow 226 à une énergie de collision de 15 eV, 342 \rightarrow 190, 342 \rightarrow 162 et 342 \rightarrow 148 à une énergie de collision de 40 eV pour la dCyd341, et 312 \rightarrow 196 à une énergie de collision de 15 eV, 312 \rightarrow 178 et 312 \rightarrow 136 à une énergie de collision de 40 eV pour l'adduit dCyd-butènedialdéhyde.

VIII. PRODUCTION ET PURIFICATION DE LA DCYD341 A PARTIR D'ADN IRRADIE

A. Irradiation de l'ADN

70 mL d'une solution aqueuse aérée d'ADN à 1,5 mL sont exposés à 2500 Gy de rayonnement γ puis digérées enzymatiquement en adaptant le protocole décrit plus haut. La première étape utilise 7 mL de tampon MNSPDE, 80 U de nucléase P1 et 0,4 U de phosphodiesterase II, et les échantillons sont incubés pendant 18 heures à 37 °C. Pour la 2^{ème} étape, sont ajoutés 7 mL de tampon de phosphatase alcaline, 0,04 U de phosphodiesterase I et 400 U de phosphatase alcaline. Les échantillons sont incubés pendant 4 heures à 37°C.

B. Purification de la lésion

La purification est effectuée par CLHP en utilisant un détecteur UV ainsi que le SM-SM comme second détecteur. Ainsi, une dérivation du système est effectuée en sortie

de colonne (**Figure 76**) de telle sorte que 90 % du débit soit collecté, les 10 % servant à la détection UV et par spectrométrie de masse.

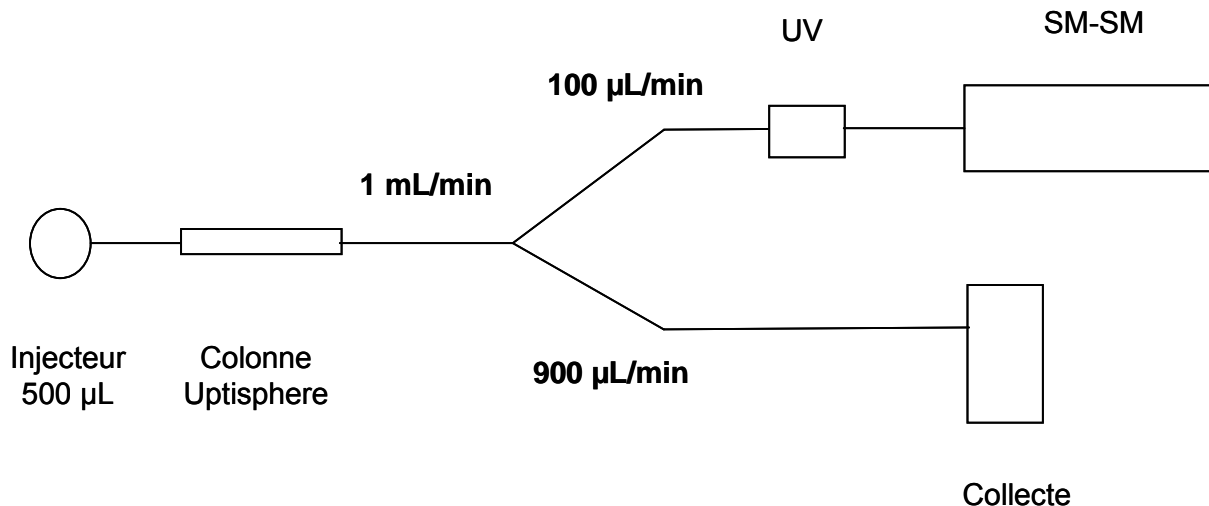


Figure 76. Montage utilisé pour purifier la dCyd341 à partir d'ADN exposé aux rayonnements γ (première purification). Dans le cas de la seconde purification, le montage est similaire avec une colonne Hypercarb, un débit sortant de la colonne de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$, un débit dirigé vers les détecteurs de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ et un débit de collecte de 450 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Deux conditions chromatographiques sont successivement utilisées. La première purification nécessite l'utilisation d'une colonne Uptisphere-ODB C18 (5 μm , 0,46 \times 25 cm) de chez Interchim (Montluçon, France). Le gradient est de 10 % d'acétonitrile en 45 minutes dans du formiate d'ammonium à 5 mM, le débit étant de 1 mL/min. Les fractions collectées contenant de la dCyd341 sont de nouveau purifiées au moyen d'une colonne Hypercarb (5 μm , 0,3 \times 10 cm) de chez Thermo Electron Corporation (Cheshire, UK) car elles contiennent des impuretés visibles par détection UV. Le gradient utilisé est de 50 % d'acétonitrile en 30 minutes dans du formiate d'ammonium à 5 mM et le débit est de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$.

IX. REPARATION DES LESIONS

L'excision de dommages oxydatifs de l'ADN est étudiée suivant plusieurs protocoles.

A. In vitro

30 μL de solutions aqueuses aérées d'ADN isolé à 1,5 mg/mL (30 μL), non exposées ou exposées à une dose de 35 Gy sont incubées en présence de 1 μL ou 2 μL des

glycosylases bactériennes Fpg ou Endo III, en présence de 10 μL de tampon 4X constitué de 0,1 M de KCl, de 0,5 mM d'EDTA et de 0,04 M de Tris, à pH 8. Après 2 heures à 37°C, l'ADN est précipité par ajout de 2,5 v d'éthanol à 100 %. Les culots obtenus après une centrifugation de 5 minutes à 5000 g sont repris dans 50 μL d'eau et digérés enzymatiquement pour être analysés par CLHP-SM/SM.

B. En utilisant des extraits nucléaires

Les extraits nucléaires proviennent de cellules CHO de la lignée xrs5. Il s'agit de cellules d'ovaires de hamsters chinois déficients pour la protéine Ku80. 20 μL d'ADN (exposé à 0 ou 42 Gy) à 1,5 mg/mL sont incubés avec 10 μL d'extraits nucléaires à 6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en présence de 30 μL de tampon d'excision CHO 2X. Le tampon d'excision CHO 2X est constitué de 20 mM d'HEPES à pH 7.9, de 100 mM de KCl, de 0,2 mM d'EDTA, de 0,5 mM de DTT, de 0,5 mM de PMSF et de 20 % de glycérol. Les échantillons sont ainsi incubés 4 heures à 37°C puis l'ADN est précipité par ajout de 2,5 v d'éthanol à 100 %. Le culot est repris dans 50 μL d'eau pour être digéré.

C. In cellulo

1. Evaluation de la cytotoxicité des bléomycines sur les cellules THP1

La survie des cellules est évaluée à l'aide du test MTT originellement décrit par Mosmann (Mosmann, 1983), adapté pour les cellules non adhérentes que sont les THP1. Il s'agit d'une mesure de l'activité métabolique des cellules. En effet, le sel de tetrazolium, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) est réduit en formazan bleu-violet insoluble. Cette réduction est notamment catalysée par des déshydrogénases mitochondriales.

Le test est réalisé à partir d'un nombre de cellules de 20 millions environ par flacon de culture de 75 cm^2 (50 mL). 10 mL de cellules sont récoltées dans 1 mL de PBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Les cellules sont ainsi incubées 1 h à 37°C en présence de 0 à 150 μM de bléomycine provenant de Sigma Chemical Co. (Saint-Louis, MO, USA). A l'issue du traitement, le PBS est éliminé après centrifugation 5 min à 1400 g, les cellules sont rincées dans du PBS neuf et reprises dans 6 mL de milieu. Elles sont alors remises en culture pendant 0, 10, 24 ou 48 heures. Le test MTT est réalisé sur 2 mL de culture par ajout de 200 μL de

MTT à 5 mg/mL préparé dans du PBS. Après une incubation de 2 h à 37°C et une centrifugation de 5 minutes à 5000 g pour récupérer le métabolite insoluble, les échantillons sont rincés par 1 mL de PBS. 3 mL de DMSO sont ajoutés au culot et l'ensemble est laissé 20 min à température ambiante avant lecture à 570 nm. Le témoin non traité représente le 100 % de viabilité et le blanc de lecture est réalisé avec du DMSO seul. La viabilité cellulaire, exprimée en pourcentage, est ainsi donnée par la relation :

$$\frac{A_e - A_0}{A_t - A_0}$$

Où A_e est l'absorbance de l'échantillon à 570 nm,

A_0 , l'absorbance du blanc de lecture

A_t , l'absorbance du témoin.

2. Etude de l'excision de la dCyd341

Les cellules sont traitées avec 150 μ M de bléomycine suivant le même protocole que celui décrit dans la section V. A. Les cellules sont alors remises en culture pendant 0, 4, 10, 24 ou 48 heures. A l'issue de la période d'incubation, elles sont congelées à - 80°C de façon à réaliser toutes les extractions en même temps. Les extractions, puis les digestions sont réalisées suivant les protocoles précédemment décrits.

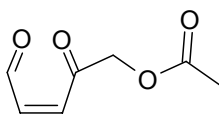
X. SYNTHÈSES CHIMIQUES DE LA DCYD341 ET DE L'ADDUIT DCYD-BUTENEDIALDEHYDE

Toutes les molécules sont caractérisées par spectrométrie de masse en utilisant un appareil LCQ de chez Thermo Electro Corporation (Cheshire, UK) constitué d'une source électrospray et d'un analyseur à trappe d'ions.

A. Synthèse de la dCyd341

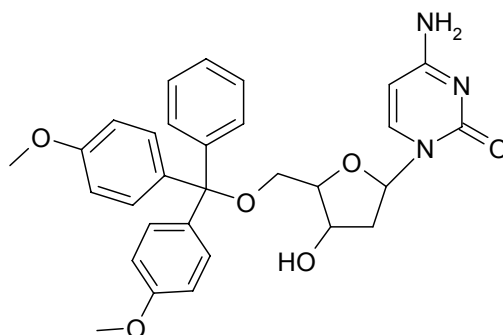
La synthèse chimique de la dCyd341 est réalisée en s'inspirant d'une synthèse précédemment décrite (Rentel *et al.*, 2005). Cette synthèse comporte plusieurs étapes :

1. Synthèse de l'acétate de 5-hydroxy-4-oxo-2-pental



Une solution d'acétate de 2-furfurylméthyle (2 g, 14,3 mmol) dans le dichlorométhane (10 mL) est ajoutée à une solution d'acide 3-chloroperoxybenzoïque (MCPBA) (2 g, 0,8 éq) dans le dichlorométhane (30 mL) à 0 °C. Après 1 h à 0 °C et 48 h à température ambiante, le mélange réactionnel est lavé avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (2 x 80 mL) et avec de l'eau distillée (80 mL), puis la phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée.

2. Synthèse de la 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-désoxycytidine

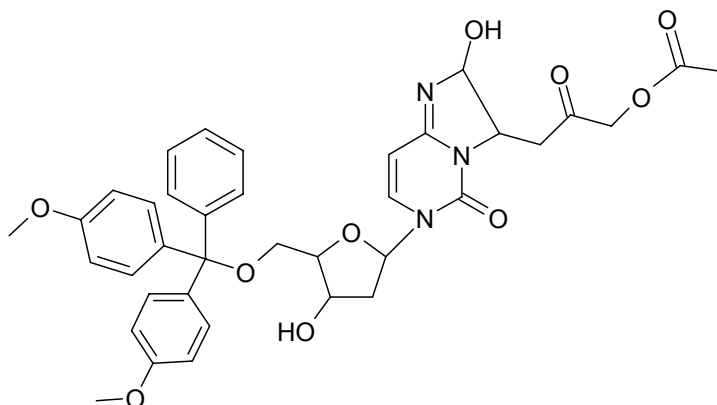


De la 2'-désoxycytidine (1,0 g, 4,4 mmol) et du catalyseur 4-*N,N*-diméthylaminopyridine (DMAP) (110 mg, 0,2 éq) sont co-évaporés trois fois dans 10 mL de pyridine anhydre, puis le résidu est dissous dans 20 mL de pyridine anhydre. Après refroidissement par un bain de glace, du chlorure de diméthoxytrityle (1,8 g, 1,2 éq) est ajouté. Après 24 h d'agitation et une CCM de contrôle (CH₂Cl₂/CH₃OH, 90/10), la réaction est stoppée par l'ajout de 10 mL de méthanol, puis le mélange est évaporé à sec. Le résidu est repris dans 40 mL de dichlorométhane et lavé avec de l'eau distillée (50 mL), puis la phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice et élué par un gradient de méthanol dans le chloroforme (0 à 10 %). La 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-désoxycytidine est obtenue avec 39 % de rendement (0,9 g ; 1,7 mmol).

Spectres de masse (ESI) : $m/z = 530$ pour $[M+H]^+$

$m/z = 552$ pour $[M+Na]^+$

3. Synthèse de la dCyd341-Ac-DMTr

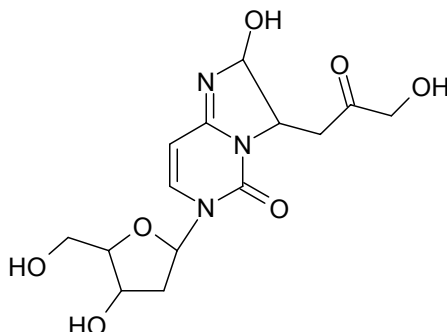


La 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-désoxycytidine (0,26 g ; 0,5 mmol) est mélangée à l'acétate de 5-hydroxy-4-oxo-2-pentenal (1,4 mL ; 1 équ) dans 10 mL de dichlorométhane. Après 1 h d'agitation à température ambiante, 1 équivalent d'acétate de 5-hydroxy-4-oxo-2-pentenal est rajouté. Cette opération est répétée une troisième fois au bout de 20 h de réaction. Au bout de 5 jours, la réaction est stoppée en évaporant le solvant. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice et élué par un gradient de méthanol dans le chloroforme (0 à 10 %). La dCyd341-Ac-DMTr est obtenue avec 53 % de rendement (0,18 g ; 0,26 mmol).

Spectres de masse (ESI) : $m/z = 686$ pour $[M+H]^+$

$m/z = 708$ pour $[M+Na]^+$

4. Obtention de la 6-(2-désoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-2-hydroxy-3-(3-hydroxy-2-oxopropyle)-2,6-dihydroimidazo[1,2-c]pyrimidin-5(3H)-one (dCyd341).



La dCyd341 est obtenue par déprotection du composé précédent. Le composé est, dans un premier temps, désacétylé en présence d'un mélange méthanol/ammoniaque à 30 % (1/1) pendant 30 min à température ambiante. Le mélange est ensuite évaporé à sec.

Puis, le groupement DMTr est éliminé par ajout de 5 mL d'une solution à 10 % d'acide trifluoroacétique dans du dichlorométhane pendant 1 h à 0 °C. Le mélange est ensuite neutralisé par ajout de NH₄ (700 μL) et la phase organique est extraite à l'eau distillée (2 x 20 mL) puis la phase aqueuse est lyophilisée. La purification de la molécule est effectuée par CLHP dans les mêmes conditions que dans le cas de l'obtention de dCyd341 à partir d'ADN exposé aux rayonnements γ.

Le coefficient d'extinction molaire de la dCyd341 est déterminé de la même façon que celui de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde (*cf* section suivante).

B. Synthèse de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde

La synthèse de l'adduit est réalisée en plusieurs étapes.

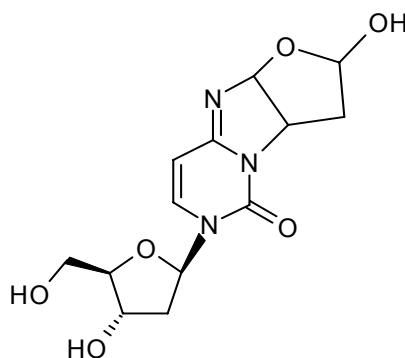
1. Synthèse du trans-butènedialdéhyde



Du tetramethoxy-trans-2-butène (0,53 g, 0,003 mol) provenant de Sigma Chemical Co (Saint-Louis, MO, USA) est mis en présence de 3 mL d'acétone et de 1,5

mL d'eau. Le milieu est acidifié par ajout de résine Amberlyst-15 (270 mg, 0,5 éq). La réaction est laissée sous agitation 36 heures à température ambiante. La résine est filtrée puis le filtrat est évaporé à sec. Une extraction au CH_2Cl_2 est réalisée et la phase organique est récupérée. La présence du trans-butènedialdéhyde est confirmée par RMN ^1H , les déplacements chimiques des protons correspondant bien à ceux donnés dans la littérature (Chen *et al.*, 1995a) : CHO 9,89 ppm et $\text{CH}=\text{CH}$ 6,83 ppm.

2. Synthèse de l'adduit



De la dCyd (32 mg, 0,14 mmol) est mélangée au trans-butènedialdéhyde (10 mg, 1 éq) pendant 24 heures à 37 °C. La réaction est arrêtée par congélation. L'adduit est ensuite purifié par CLHP sur une colonne Uptisphere-ODB C18 (5 μm , 0,46 \times 25 cm) de chez Interchim (Montluçon, France). Le gradient est de 10 % d'acétonitrile dans de l'acétate d'ammonium à 50 mM.

La présence de l'adduit dans les fractions collectées est contrôlée par spectrométrie de masse en utilisant l'appareil LCQ de chez Thermo Electro Corporation (Cheshire, UK).

C. Détermination du coefficient d'extinction molaire de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde

1. Détermination du rapport tube/insert (R_{ij})

Ce rapport tient compte de la différence de volumes entre le tube RMN et son insert. Il représente la différence entre l'aire de 2 pics RMN qui seraient obtenus par analyse du même produit dans le tube ou dans son insert. 600 μL d'une solution à 0,4 mM de Thd et 100 μL d'une solution à 1,2 mM de dCyd sont respectivement introduits dans le tube RMN et son insert. Les spectres RMN sont réalisés dans D_2O et l'intégration du singulet

correspondant au proton 6 de la Thd et du doublet correspondant au proton 6 de la dCyd permet de calculer le rapport R_{ti} :

$$R_{ti} = \frac{[dCyd]}{\text{intégration dCyd}} \times \frac{\text{intégration Thd}}{[Thd]}$$

2. Calcul du ϵ

La concentration d'une solution de l'adduit est déterminée en réalisant des spectres RMN simultanés d'une solution de dCyd de concentration 1,2 mM placée dans l'insert (100 μ L) et d'une solution d'adduit placée dans le tube (600 μ L). La concentration de l'adduit est donnée par la relation suivante :

$$[\text{adduit}] = \frac{[dCyd]}{\text{intégration dCyd}} \times \text{intégration adduit} \times \frac{1}{R_{ti}}$$

Une fois la concentration de la solution d'adduit déterminée, un spectre d'absorption UV est réalisé et le ϵ est déterminé en utilisant la loi de Beer-Lambert.

XI. ANALYSES PAR RMN

Les spectres RMN 1D ont été réalisés avec un appareil Avance 200 de Bruker (Wissembourg, France) et les spectres RMN 2D sur un appareil Avance 500 du même fabricant. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport au pic du solvant utilisé comme référence interne : 2,5 ppm pour DMSO, 3,31 ppm pour CD₃OD, 4,79 ppm pour D₂O et 7,26 pour CDCl₃.

XII. ANALYSES DE MASSE EXACTE

Les analyses de masse exacte à haute résolution sont effectuées sur un appareil QToF-2 de Micromass (Manchester, UK), dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Jörg Hau (Département des sciences bioanalytiques du Centre de Recherches Nestlé à Lausanne). Les conditions d'analyses ont été précédemment décrites (Hau *et al.*, 2001).

LISTE DES PUBLICATIONS, PRIX ET COMMUNICATIONS

Publications :

Regulus Peggy, Duroux Benoît, Cadet Jean, Favier Alain et Ravanat Jean-Luc. Radiation-induced DNA lesions: Identification of a locally multiple damage site generated subsequently to C4' hydrogen abstraction. *PNAS* (soumis pour publication).

Regulus Peggy, Spessotto Sébastien, Gateau Mathilde, Cadet Jean, Favier Alain, Ravanat Jean-Luc. Detection of new radiation-induced DNA lesions by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004 ; 18 : 2223-2228.

Prix:

Junior Investigator Award décerné par “the IXth International Workshop on Radiation Damage to DNA” (Tekirova, Turquie, mai 2006, communication orale):

Identification of a locally multiple damage site generated subsequently to C4' hydrogen abstraction (**Regulus Peggy**, Cadet Jean, Favier Alain et Ravanat Jean-Luc).

Prix Joseph Maisin de la Société Internationale de Radiobiologie de Langue Française (SIRLaF) décerné lors du 7^{ème} Colloque International de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée (CIRFA, Québec, Canada, septembre 2005, communication orale) :

Détection et caractérisation de nouvelles lésions radio-induites de l'ADN (**Regulus Peggy**, Cadet Jean, Favier Alain et Ravanat Jean-Luc).

Communications

4th Semi-Annual Meeting of the CLUSTOXDNA Research Training Network (Annecy, France, mars 2006, communication orale):

Radiation-induced DNA lesions: Identification of a locally multiple damage site generated subsequently to C4' hydrogen abstraction (**Regulus Peggy**, Cadet Jean, Favier Alain et Ravanat Jean-Luc).

7th Winter Research Conferences (Les Houches, France, mars 2006, poster):

Detection and characterisation of a new radiation-induced DNA lesion (**Regulus Peggy**, Cadet Jean, Favier Alain et Ravanat Jean-Luc).

12^{èmes} Journées d'Etudes de la Chimie sous Rayonnement (JECR, Strasbourg, France, juin 2004, communication orale) :

Domages radio-induits dans l'ADN isolé et cellulaire : détections de nouvelles lésions de l'ADN (**Regulus Peggy**, Spessotto Sébastien, Gateau Mathilde, Cadet Jean, Favier Alain, Ravanat Jean-Luc).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arrigo, A. P., Tanaka, K., Goldberg, A. L. & Welch, W. J. (1988).** Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* **331**, 192-194.
- Balasubramanian, B., Pogozelski, W. K. & Tullius, T. D. (1998).** DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9738-9743.
- Barker, S., Weinfeld, M. & Murray, D. (2005).** DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences. *Mutat Res* **589**, 111-135.
- Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J. N., Ried, T., Tagle, D. & Wynshaw-Boris, A. (1996).** Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* **86**, 159-171.
- Barlow, C., Brown, K. D., Deng, C. X., Tagle, D. A. & Wynshaw-Boris, A. (1997).** Atm selectively regulates distinct p53-dependent cell-cycle checkpoint and apoptotic pathways. *Nat Genet* **17**, 453-456.
- Bartek, J. & Lukas, J. (2001).** Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 738-747.
- Beesk, F., Dizdaroglu, M., Schulte-Frohlinde, D. & von Sonntag, C. (1979).** Radiation-induced DNA strand breaks in deoxygenated aqueous solutions. The formation of altered sugars as end groups. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **36**, 565-576.
- Belli, M., Sapora, O. & Tabocchini, M. A. (2002).** Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. *J Radiat Res (Tokyo)* **43 Suppl**, S13-19.
- Bohnert, T., Gingipalli, L. & Dedon, P. C. (2004).** Reaction of 2'-deoxyribonucleosides with cis- and trans-1,4-dioxo-2-butene. *Biochem Biophys Res Commun* **323**, 838-844.
- Brenner, D. J., Doll, R., Goodhead, D. T., Hall, E. J., Land, C. E., Little, J. B., Lubin, J. H., Preston, D. L., Preston, R. J., Puskin, J. S., Ron, E., Sachs, R. K., Samet, J. M., Setlow, R. B. & Zaider, M. (2003).** Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13761-13766.
- Byrns, M. C., Predecki, D. P. & Peterson, L. A. (2002).** Characterization of nucleoside adducts of cis-2-butene-1,4-dial, a reactive metabolite of furan. *Chem Res Toxicol* **15**, 373-379.
- Byrns, M. C., Vu, C. C., Neidigh, J. W., Abad, J. L., Jones, R. A. & Peterson, L. A. (2006).** Detection of DNA adducts derived from the reactive metabolite of furan, cis-2-butene-1,4-dial. *Chem Res Toxicol* **19**, 414-420.
- Cadet, J., Ravanat, J. L., Buchko, G. W., Yeo, H. C. & Ames, B. N. (1994).** Singlet oxygen DNA damage: chromatographic and mass spectrometric analysis of damage products. *Methods Enzymol* **234**, 79-88.

- Cadet, J., Berger, M., Douki, T. & Ravanat, J. L. (1997).** Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **131**, 1-87.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J. P., Ravanat, J. L. & Sauvaigo, S. (1999).** Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* **424**, 9-21.
- Cadet, J., Douki, T., Frelon, S., Sauvaigo, S., Pouget, J. P. & Ravanat, J. L. (2002).** Assessment of oxidative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC-MS/MS measurement. *Free Radic Biol Med* **33**, 441-449.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D. & Ravanat, J. L. (2003).** Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* **531**, 5-23.
- Cadet, J., Bellon, S., Douki, T., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Pouget, J. P., Ravanat, J. L., Romieu, A. & Sauvaigo, S. (2004).** Radiation-induced DNA damage: formation, measurement, and biochemical features. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **23**, 33-43.
- Caldecott, K. W., Aoufouchi, S., Johnson, P. & Shall, S. (1996).** XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res* **24**, 4387-4394.
- Chapman, J. D., Reuvers, A. P., Borsa, J. & Greenstock, C. L. (1973).** Chemical radioprotection and radiosensitization of mammalian cells growing in vitro. *Radiat Res* **56**, 291-306.
- Chen, B., Bohnert, T., Zhou, X. & Dedon, P. C. (2004).** 5'-(2-phosphoryl-1,4-dioxobutane) as a product of 5'-oxidation of deoxyribose in DNA: elimination as trans-1,4-dioxo-2-butene and approaches to analysis. *Chem Res Toxicol* **17**, 1406-1413.
- Chen, J. & Stubbe, J. (2004).** Synthesis and characterization of oligonucleotides containing a 4'-keto abasic site. *Biochemistry* **43**, 5278-5286.
- Chen, J. & Stubbe, J. (2005).** Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* **5**, 102-112.
- Chen, L. J., Hecht, S. S. & Peterson, L. A. (1995a).** Identification of cis-2-butene-1,4-dial as a microsomal metabolite of furan. *Chem Res Toxicol* **8**, 903-906.
- Chen, L. J., Hecht, S. S. & Peterson, L. A. (1997).** Characterization of amino acid and glutathione adducts of cis-2-butene-1,4-dial, a reactive metabolite of furan. *Chem Res Toxicol* **10**, 866-874.
- Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V. J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D. & Maniatis, T. (1995b).** Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* **9**, 1586-1597.

- Chung, F. L., Chen, H. J. & Nath, R. G. (1996).** Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis* **17**, 2105-2111.
- Chung, F. L., Nath, R. G., Ocando, J., Nishikawa, A. & Zhang, L. (2000).** Deoxyguanosine adducts of t-4-hydroxy-2-nonenal are endogenous DNA lesions in rodents and humans: detection and potential sources. *Cancer Res* **60**, 1507-1511.
- Cleaver, J. E. (2005).** Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer* **5**, 564-573.
- Collins, A., Cadet, J., Epe, B. & Gedik, C. (1997).** Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA. Report of a workshop, DNA oxidation, held in Aberdeen, UK, 19-21 January, 1997. *Carcinogenesis* **18**, 1833-1836.
- Collins, C., Zhou, X., Wang, R., Barth, M. C., Jiang, T., Coderre, J. A. & Dedon, P. C. (2005).** Differential oxidation of deoxyribose in DNA by gamma and alpha-particle radiation. *Radiat Res* **163**, 654-662.
- Costa, R. M., Chigancas, V., Galhardo Rda, S., Carvalho, H. & Menck, C. F. (2003).** The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* **85**, 1083-1099.
- Courdavault, S., Baudouin, C., Charveron, M., Canguilhem, B., Favier, A., Cadet, J. & Douki, T. (2005).** Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair (Amst)* **4**, 836-844.
- Dantzer, F. & de Murcia, G. (1998).** Quelles sont les ADN polymérases requises pour la réplication et la réparation chez les eucaryotes? *médecine/sciences* **14**, 704-712.
- de Boer, J. & Hoeijmakers, J. H. (2000).** Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* **21**, 453-460.
- De Bont, R. & van Larebeke, N. (2004).** Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* **19**, 169-185.
- Dedon, P. C. & Goldberg, I. H. (1992).** Free-radical mechanisms involved in the formation of sequence-dependent bistranded DNA lesions by the antitumor antibiotics bleomycin, neocarzinostatin, and calicheamicin. *Chem Res Toxicol* **5**, 311-332.
- Dedon, P. C., Plastaras, J. P., Rouzer, C. A. & Marnett, L. J. (1998).** Indirect mutagenesis by oxidative DNA damage: formation of the pyrimidopurinone adduct of deoxyguanosine by base propenal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11113-11116.
- Degan, P., Shigenaga, M. K., Park, E. M., Alperin, P. E. & Ames, B. N. (1991).** Immunoaffinity isolation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 8-hydroxyguanine and quantitation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by polyclonal antibodies. *Carcinogenesis* **12**, 865-871.
- Delattre, J., Beaudoux, J.-L. & Bonnefont-Rousselot, D. (2005).** *Radicaux libres et stress oxydant*.

- Dizdaroglu, M., von Sonntag, C. & Schulte-Frohlinde, D. (1975).** Strand breaks and sugar release by γ -irradiation of DNA in aqueous solution. *J Am Chem Soc* **97**, 2277-2278.
- Dizdaroglu, M. (1984).** The use of capillary gas chromatography-mass spectrometry for identification of radiation-induced DNA base damage and DNA base-amino acid cross-links. *J Chromatogr* **295**, 103-121.
- Dizdaroglu, M. (1985).** Application of capillary gas chromatography-mass spectrometry to chemical characterization of radiation-induced base damage of DNA: implications for assessing DNA repair processes. *Anal Biochem* **144**, 593-603.
- Dizdaroglu, M. & Simic, M. G. (1985).** Radiation-induced crosslinks between thymine and phenylalanine. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **47**, 63-69.
- Dizdaroglu, M., Laval, J. & Boiteux, S. (1993).** Substrate specificity of the Escherichia coli endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals. *Biochemistry* **32**, 12105-12111.
- Douki, T. & Cadet, J. (1996).** Peroxynitrite mediated oxidation of purine bases of nucleosides and isolated DNA. *Free Radic Res* **24**, 369-380.
- Douki, T., Delatour, T., Bianchini, F. & Cadet, J. (1996).** Observation and prevention of an artefactual formation of oxidized DNA bases and nucleosides in the GC-EIMS method. *Carcinogenesis* **17**, 347-353.
- Douki, T., Martini, R., Ravanat, J. L., Turesky, R. J. & Cadet, J. (1997).** Measurement of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine in isolated DNA exposed to gamma radiation in aqueous solution. *Carcinogenesis* **18**, 2385-2391.
- Drummond, J. T. & Bellacosa, A. (2001).** Human DNA mismatch repair in vitro operates independently of methylation status at CpG sites. *Nucleic Acids Res* **29**, 2234-2243.
- Ellis, R. E., Yuan, J. Y. & Horvitz, H. R. (1991).** Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 663-698.
- Enoch, T. & Norbury, C. (1995).** Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *Trends Biochem Sci* **20**, 426-430.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J. & Zollner, H. (1991).** Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* **11**, 81-128.
- Floyd, R. A., Watson, J. J., Wong, P. K., Altmiller, D. H. & Rickard, R. C. (1986).** Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radic Res Commun* **1**, 163-172.
- Floyd, R. A., West, M. S., Eneff, K. L. & Schneider, J. E. (1989).** Methylene blue plus light mediates 8-hydroxyguanine formation in DNA. *Arch Biochem Biophys* **273**, 106-111.

- Frank, B. L., Worth, L., Jr., Christner, D. F., Kozarich, J. W., Stubbe, J., Kappen, L. S. & Goldberg, I. H. (1991).** Isotope effects on the sequence-specific cleavage of DNA by neocarzinostatin: kinetic partitioning between 4'- and 5'-hydrogen abstraction at unique thymidine sites. *J Am Chem Soc* **113**, 2271-2275.
- Frankenberg-Schwager, M. & Frankenberg, D. (1990).** DNA double-strand breaks: their repair and relationship to cell killing in yeast. *Int J Radiat Biol* **58**, 569-575.
- Frelon, S., Douki, T., Ravanat, J. L., Pouget, J. P., Tornabene, C. & Cadet, J. (2000).** High-performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. *Chem Res Toxicol* **13**, 1002-1010.
- Giese, B., Beyrich-Graf, X., Erdmann, P., Giraud, L., Imwinkelried, P., Müller, S. & Schwitter, U. (1995a).** Cleavage of single-stranded 4'-oligonucleotide radicals in the presence of O₂. *J Am Chem Soc* **117**, 6146-6147.
- Giese, B., Beyrich-Graf, X., Erdmann, P., Petretta, M. & Schwitter, U. (1995b).** The chemistry of single-stranded 4'-DNA radicals: influence of the radical precursor on anaerobic and aerobic strand cleavage. *Chem Biol* **2**, 367-375.
- Gingipalli, L. & Dedon, P. C. (2001).** Reaction of cis- and trans-2-Butene-1,4-dial with 2'-deoxycytidine to form stable oxadiazabicyclooctamine adducts. *J Am Chem Soc* **123**, 2664-2665.
- Girault, I., Shuker, D. E., Cadet, J. & Molko, D. (1996).** Use of morpholinonucleosides to conjugate oxidized DNA bases to proteins. *Bioconjug Chem* **7**, 445-450.
- Goldberg, A. L. & Rock, K. L. (1992).** Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* **357**, 375-379.
- Goldberg, A. L., Cascio, P., Saric, T. & Rock, K. L. (2002).** The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* **39**, 147-164.
- Goodhead, D. T. (1994).** Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol* **65**, 7-17.
- Grune, T. & Davies, K. J. (1997).** Breakdown of oxidized proteins as a part of secondary antioxidant defenses in mammalian cells. *Biofactors* **6**, 165-172.
- Gulston, M., de Lara, C., Jenner, T., Davis, E. & O'Neill, P. (2004).** Processing of clustered DNA damage generates additional double-strand breaks in mammalian cells post-irradiation. *Nucleic Acids Res* **32**, 1602-1609.
- Hare, J. T. & Taylor, J. H. (1985).** One role for DNA methylation in vertebrate cells is strand discrimination in mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7350-7354.
- Harrison, L., Hatahet, Z. & Wallace, S. S. (1999).** In vitro repair of synthetic ionizing radiation-induced multiply damaged DNA sites. *J Mol Biol* **290**, 667-684.

- Harsch, A., Marzilli, L. A., Bunt, R. C., Stubbe, J. & Vouros, P. (2000).** Accurate and rapid modeling of iron-bleomycin-induced DNA damage using tethered duplex oligonucleotides and electrospray ionization ion trap mass spectrometric analysis. *Nucleic Acids Res* **28**, 1978-1985.
- Hashimoto, M., Donald, C. D., Yannone, S. M., Chen, D. J., Roy, R. & Kow, Y. W. (2001).** A possible role of Ku in mediating sequential repair of closely opposed lesions. *J Biol Chem* **276**, 12827-12831.
- Hattori, Y., Nishigori, C., Tanaka, T., Uchida, K., Nikaido, O., Osawa, T., Hiai, H., Imamura, S. & Toyokuni, S. (1996).** 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J Invest Dermatol* **107**, 733-737.
- Hau, J., Stadler, R., Jenny, T. A. & Fay, L. B. (2001).** Tandem mass spectrometric accurate mass performance of time-of-flight and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a case study with pyridine derivatives. *Rapid Commun Mass Spectrom* **15**, 1840-1848.
- Helbock, H. J., Beckman, K. B., Shigenaga, M. K., Walter, P. B., Woodall, A. A., Yeo, H. C. & Ames, B. N. (1998).** DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 288-293.
- Hickerson, R. P., Chepanoske, C. L., Williams, S. D., David, S. S. & Burrows, C. J. (1999).** Mechanism-based DNA-protein cross-linking of MutY via oxidation of 8-oxoguanosine. *J Am Chem Soc* **121**, 9901-9902.
- Hua, Y., Wainhaus, S. B., Yang, Y., Shen, L., Xiong, Y., Xu, X., Zhang, F., Bolton, J. L. & van Breemen, R. B. (2001).** Comparison of negative and positive ion electrospray tandem mass spectrometry for the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of oxidized deoxynucleosides. *J Am Soc Mass Spectrom* **12**, 80-87.
- Huang, J. C., Hsu, D. S., Kazantsev, A. & Sancar, A. (1994).** Substrate spectrum of human excinuclease: repair of abasic sites, methylated bases, mismatches, and bulky adducts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12213-12217.
- ICRP (1991).** *Recommendations of the International Commission on Radiological Protection - Publication ICRP 60.* International Commission on Radiological Protection, New York.
- Ide, H., Kow, Y. W. & Wallace, S. S. (1985).** Thymine glycols and urea residues in M13 DNA constitute replicative blocks in vitro. *Nucleic Acids Res* **13**, 8035-8052.
- Ide, H., Petruccio, L. A., Hatahet, Z. & Wallace, S. S. (1991).** Processing of DNA base damage by DNA polymerases. Dihydrothymine and beta-ureidoisobutyric acid as models for instructive and noninstructive lesions. *J Biol Chem* **266**, 1469-1477.
- Isildar, M., Schuchmann, M. N., Schulte-Frohlinde, D. & von Sonntag, C. (1981).** gamma-Radiolysis of DNA in oxygenated aqueous solutions: alterations at the sugar moiety. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **40**, 347-354.

- Jaruga, P., Zastawny, T. H., Skokowski, J., Dizdaroglu, M. & Olinski, R. (1994).** Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett* **341**, 59-64.
- Johnson, R. E., Kondratick, C. M., Prakash, S. & Prakash, L. (1999).** hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science* **285**, 263-265.
- Kannouche, P. L., Wing, J. & Lehmann, A. R. (2004).** Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell* **14**, 491-500.
- Karmakar, P., Balajee, A. S. & Natarajan, A. T. (2001).** Analysis of repair and PCNA complex formation induced by ionizing radiation in human fibroblast cell lines. *Mutagenesis* **16**, 225-232.
- Kasai, H., Iida, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. & Tanooka, H. (1990).** 5-Formyldeoxyuridine: a new type of DNA damage induced by ionizing radiation and its mutagenicity to salmonella strain TA102. *Mutat Res* **243**, 249-253.
- Kasai, H., Yamaizumi, Z., Yamamoto, F., Bessho, T., Nishimura, S., Berger, M. & Cadet, J. (1992).** Photosensitized formation of 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in DNA by riboflavin. *Nucleic Acids Symp Ser*, 181-182.
- Kennedy, L. J., Moore, K., Jr., Caulfield, J. L., Tannenbaum, S. R. & Dedon, P. C. (1997).** Quantitation of 8-oxoguanine and strand breaks produced by four oxidizing agents. *Chem Res Toxicol* **10**, 386-392.
- Kim, J., Gil, J. M. & Greenberg, M. M. (2003).** Synthesis and characterization of oligonucleotides containing the c4'-oxidized abasic site produced by bleomycin and other DNA damaging agents. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**, 5882-5885.
- Kohn, K. W., Erickson, L. C., Ewig, R. A. & Friedman, C. A. (1976).** Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry* **15**, 4629-4637.
- Kotera, M., Roupioz, Y., Defrancq, E., Bourdat, A. G., Garcia, J., Coulombeau, C. & Lhomme, J. (2000).** The 7-nitroindole nucleoside as a photochemical precursor of 2'-deoxyribonolactone: access to DNA fragments containing this oxidative abasic lesion. *Chemistry* **6**, 4163-4169.
- Kusumoto, R., Masutani, C., Iwai, S. & Hanaoka, F. (2002).** Translesion synthesis by human DNA polymerase eta across thymine glycol lesions. *Biochemistry* **41**, 6090-6099.
- Le, X. C., Xing, J. Z., Lee, J., Leadon, S. A. & Weinfeld, M. (1998).** Inducible repair of thymine glycol detected by an ultrasensitive assay for DNA damage. *Science* **280**, 1066-1069.
- Lehman, A. R., Kirk-Bell, S., Arlett, C. F., Paterson, M. C., Lohman, P. H., de Weerd-Kastelein, E. A. & Bootsma, D. (1975).** Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 219-223.

- Lehmann, A. R. (2005).** Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells. *FEBS Lett* **579**, 873-876.
- Leitheiser, C. J., Rishel, M. J., Wu, X. & Hecht, S. M. (2000).** Solid-phase synthesis of bleomycin group antibiotics. Elaboration of deglycobleomycin A(5). *Org Lett* **2**, 3397-3399.
- Lemaire, D. G. E., Bothe, E. & Schulte-Frohlinde, D. (1984).** Yields of radiation-induced main chain scission of poly U in aqueous solution: strand break formation via base radicals. *Int J Radiat Biol* **45**, 351-358.
- Li, Y. F., Kim, S. T. & Sancar, A. (1993).** Evidence for lack of DNA photoreactivating enzyme in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4389-4393.
- Lindahl, T., Demple, B. & Robins, P. (1982).** Suicide inactivation of the E. coli O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *Embo J* **1**, 1359-1363.
- Lindahl, T. (1993).** Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715.
- Liuzzi, M. & Talpaert-Borle, M. (1985).** A new approach to the study of the base-excision repair pathway using methoxyamine. *J Biol Chem* **260**, 5252-5258.
- Marnett, L. J. (1999).** Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* **424**, 83-95.
- Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J. & de Murcia, G. (1998).** XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* **18**, 3563-3571.
- Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K. & Hanaoka, F. (1999).** The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature* **399**, 700-704.
- Masutani, C., Kusumoto, R., Iwai, S. & Hanaoka, F. (2000).** Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase eta. *Embo J* **19**, 3100-3109.
- Matsumoto, Y. & Kim, K. (1995).** Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* **269**, 699-702.
- McKinnon, P. J. (2004).** ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep* **5**, 772-776.
- Miaskiewicz, K. & Osman, R. (1994).** Theoretical study on the deoxyribose radicals formed by hydrogen abstraction. *J Am Chem Soc* **116**, 232-238.
- Mitchell, D. L., Meador, J., Paniker, L., Gasparutto, D., Jeffrey, W. H. & Cadet, J. (2002).** Development and application of a novel immunoassay for measuring oxidative DNA damage in the environment. *Photochem Photobiol* **75**, 257-265.

- Moller, L. & Hofer, T. (1997).** [32P]ATP mediates formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine from 2'-deoxyguanosine, a possible problem in the 32P-postlabeling assay. *Carcinogenesis* **18**, 2415-2419.
- Mosmann, T. (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Mu, D., Tursun, M., Duckett, D. R., Drummond, J. T., Modrich, P. & Sancar, A. (1997).** Recognition and repair of compound DNA lesions (base damage and mismatch) by human mismatch repair and excision repair systems. *Mol Cell Biol* **17**, 760-769.
- Musarrat, J. & Wani, A. A. (1994).** Quantitative immunoanalysis of promutagenic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in oxidized DNA. *Carcinogenesis* **15**, 2037-2043.
- Naegeli, H. (1995).** Mechanisms of DNA damage recognition in mammalian nucleotide excision repair. *Faseb J* **9**, 1043-1050.
- Nair, J., Vaca, C. E., Velic, I., Mutanen, M., Valsta, L. M. & Bartsch, H. (1997).** High dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **6**, 597-601.
- Nair, J., Barbin, A., Velic, I. & Bartsch, H. (1999).** Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutat Res* **424**, 59-69.
- Ostling, O. & Johanson, K. J. (1984).** Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **123**, 291-298.
- Pan, J. & Chung, F. L. (2002).** Formation of cyclic deoxyguanosine adducts from omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids under oxidative conditions. *Chem Res Toxicol* **15**, 367-372.
- Park, E. M., Shigenaga, M. K., Degan, P., Korn, T. S., Kitzler, J. W., Wehr, C. M., Kolachana, P. & Ames, B. N. (1992).** Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3375-3379.
- Pflaum, M., Will, O. & Epe, B. (1997).** Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis* **18**, 2225-2231.
- Plastaras, J. P., Dedon, P. C. & Marnett, L. J. (2002).** Effects of DNA structure on oxopropenylation by the endogenous mutagens malondialdehyde and base propenal. *Biochemistry* **41**, 5033-5042.
- Pogozelski, W. K. & Tullius, T. D. (1998).** Oxidative strand scission of nucleic acids: routes initiated by hydrogen abstraction from the sugar moiety. *Chem Rev* **98**, 1089-1108.
- Poirier, J., Ribadeau-Dumas, J.-L., Catala, M., Gherardi, R. K. & Bernaudin, J.-F. (1997).** *Histologie moléculaire, ABREGES, 5ème édition, Masson.*

- Post, S., Weng, Y. C., Cimprich, K., Chen, L. B., Xu, Y. & Lee, E. Y. (2001).** Phosphorylation of serines 635 and 645 of human Rad17 is cell cycle regulated and is required for G(1)/S checkpoint activation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13102-13107.
- Pouget, J. P., Douki, T., Richard, M. J. & Cadet, J. (2000).** DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and Comet assay. *Chem Res Toxicol* **13**, 541-549.
- Pouget, J. P., Frelon, S., Ravanat, J. L., Testard, I., Odin, F. & Cadet, J. (2002).** Formation of modified DNA bases in cells exposed either to gamma radiation or to high-LET particles. *Radiat Res* **157**, 589-595.
- Radford, I. R. (1986).** Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell-killing after X-irradiation of mammalian cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **49**, 611-620.
- Randerath, K., Reddy, M. V. & Gupta, R. C. (1981).** ³²P-labeling test for DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6126-6129.
- Ravanat, J. L., Turesky, R. J., Gremaud, E., Trudel, L. J. & Stadler, R. H. (1995).** Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography--mass spectrometry and HPLC--electrochemical detection: overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography--mass spectrometry assay. *Chem Res Toxicol* **8**, 1039-1045.
- Ravanat, J. L., Duret, B., Guiller, A., Douki, T. & Cadet, J. (1998).** Isotope dilution high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **715**, 349-356.
- Ravanat, J. L., Di Mascio, P., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. & Cadet, J. (2000a).** Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *J Biol Chem* **275**, 40601-40604.
- Ravanat, J. L., Remaud, G. & Cadet, J. (2000b).** Measurement of the main photooxidation products of 2'-deoxyguanosine using chromatographic methods coupled to mass spectrometry. *Arch Biochem Biophys* **374**, 118-127.
- Ravanat, J. L., Douki, T., Duez, P., Gremaud, E., Herbert, K., Hofer, T., Lasserre, L., Saint-Pierre, C., Favier, A. & Cadet, J. (2002).** Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. *Carcinogenesis* **23**, 1911-1918.
- Regulus, P., Spessotto, S., Gateau, M., Cadet, J., Favier, A. & Ravanat, J. L. (2004).** Detection of new radiation-induced DNA lesions by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**, 2223-2228.
- Rentel, C., Wang, X., Batt, M., Kurata, C., Oliver, J., Gaus, H., Krotz, A. H., McArdle, J. V. & Capaldi, D. C. (2005).** Formation of modified cytosine residues in the presence of depurinated DNA. *J Org Chem* **70**, 7841-7845.

- Rock, K. L., York, I. A., Saric, T. & Goldberg, A. L. (2002).** Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol* **80**, 1-70.
- Roos-Mattjus, P., Hopkins, K. M., Oestreich, A. J., Vroman, B. T., Johnson, K. L., Naylor, S., Lieberman, H. B. & Karnitz, L. M. (2003).** Phosphorylation of human Rad9 is required for genotoxin-activated checkpoint signaling. *J Biol Chem* **278**, 24428-24437.
- Roots, R. & Okada, S. (1975).** Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells. *Radiat Res* **64**, 306-320.
- Rouet, P. & Essigmann, J. M. (1985).** Possible role for thymine glycol in the selective inhibition of DNA synthesis on oxidized DNA templates. *Cancer Res* **45**, 6113-6118.
- Roupioz, Y., Lhomme, J. & Kotera, M. (2002).** Chemistry of the 2-deoxyribonolactone lesion in oligonucleotides: cleavage kinetics and products analysis. *J Am Chem Soc* **124**, 9129-9135.
- Sancar, A. (1994a).** Mechanisms of DNA excision repair. *Science* **266**, 1954-1956.
- Sancar, A. (1994b).** Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* **33**, 2-9.
- Scholes, G., Willson, R. L. & Ebert, M. (1969).** Pulse radiolysis of aqueous solutions of deoxyribonucleotides and DNA: reaction with hydroxyl radicals. *J Chem Soc D* **1**, 17.
- Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W. & Bennink, J. R. (2000).** Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**, 770-774.
- Shibutani, S., Takeshita, M. & Grollman, A. P. (1991).** Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* **349**, 431-434.
- Shivji, M. K., Podust, V. N., Hubscher, U. & Wood, R. D. (1995).** Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA. *Biochemistry* **34**, 5011-5017.
- Sies, H. & Menck, C. F. (1992).** Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat Res* **275**, 367-375.
- Sobol, R. W., Horton, J. K., Kuhn, R., Gu, H., Singhal, R. K., Prasad, R., Rajewsky, K. & Wilson, S. H. (1996).** Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature* **379**, 183-186.
- Stadtman, E. R. (1993).** Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* **62**, 797-821.
- Stelter, L., von Sonntag, C. & Schulte-Frohlinde, D. (1974).** Letter: Radiation chemistry of DNA-model compounds. V. Phosphate elimination from ribose-5-phosphate after OH radical attack at C-4. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **25**, 515-519.

- Stone, K., Uzieblo, A. & Marnett, L. J. (1990).** Studies of the reaction of malondialdehyde with cytosine nucleosides. *Chem Res Toxicol* **3**, 467-472.
- Stubbe, J. & Kozarich, J. W. (1987).** Mechanisms of bleomycin-induced DNA degradation. *Chem Rev* **87**, 1107-1136.
- Sutherland, B. M., Bennett, P. V., Cintron-Torres, N., Hada, M., Trunk, J., Monteleone, D., Sutherland, J. C., Laval, J., Stanislaus, M. & Gewirtz, A. (2002a).** Clustered DNA damages induced in human hematopoietic cells by low doses of ionizing radiation. *J Radiat Res (Tokyo)* **43 Suppl**, S149-152.
- Sutherland, B. M., Bennett, P. V., Sutherland, J. C. & Laval, J. (2002b).** Clustered DNA damages induced by x rays in human cells. *Radiat Res* **157**, 611-616.
- Swarts, S. G., Smith, G. S., Miao, L. & Wheeler, K. T. (1996).** Effects of formic acid hydrolysis on the quantitative analysis of radiation-induced DNA base damage products assayed by gas chromatography/mass spectrometry. *Radiat Environ Biophys* **35**, 41-53.
- Talpaert-Borle, M. & Liuzzi, M. (1983).** Reaction of apurinic/apyrimidinic sites with [¹⁴C]methoxyamine. A method for the quantitative assay of AP sites in DNA. *Biochim Biophys Acta* **740**, 410-416.
- Tchou, J., Kasai, H., Shibutani, S., Chung, M. H., Laval, J., Grollman, A. P. & Nishimura, S. (1991).** 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4690-4694.
- Teebor, G., Cummings, A., Frenkel, K., Shaw, A., Voituriez, L. & Cadet, J. (1987).** Quantitative measurement of the diastereoisomers of *cis* thymidine glycol in gamma-irradiated DNA. *Free Radic Res Commun* **2**, 303-309.
- Teoule, R., Bert, C. & Bonicel, A. (1977).** Thymine fragment damage retained in the DNA polynucleotide chain after gamma irradiation in aerated solutions. II. *Radiat Res* **72**, 190-200.
- Todo, T., Takemori, H., Ryo, H., Ihara, M., Matsunaga, T., Nikaido, O., Sato, K. & Nomura, T. (1993).** A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4)photoproducts. *Nature* **361**, 371-374.
- Tounekti, O., Kenani, A., Foray, N., Orlowski, S. & Mir, L. M. (2001).** The ratio of single- to double-strand DNA breaks and their absolute values determine cell death pathway. *Br J Cancer* **84**, 1272-1279.
- Toyokuni, S., Tanaka, T., Hattori, Y., Nishiyama, Y., Yoshida, A., Uchida, K., Hiai, H., Ochi, H. & Osawa, T. (1997).** Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest* **76**, 365-374.
- Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T. & Okami, Y. (1966).** New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot (Tokyo)* **19**, 200-209.

UNSCEAR (2000). *United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: Sources and effects of ionizing radiation.* UNSCEAR, New York.

Vijayalaxmi, Strauss, G. H. & Tice, R. R. (1993). An analysis of gamma-ray-induced DNA damage in human blood leukocytes, lymphocytes and granulocytes. *Mutat Res* **292**, 123-128.

von Sonntag, C. (1987). *The chemical basis of radiation biology,* Taylor & Francis, London.

Wagner, J. R., Hu, C. C. & Ames, B. N. (1992). Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3380-3384.

Wallace, S. S. (1994). DNA damages processed by base excision repair: biological consequences. *Int J Radiat Biol* **66**, 579-589.

Wallace, S. S. (1998). Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiat Res* **150**, S60-79.

Wang, Y. J., Ho, Y. S., Lo, M. J. & Lin, J. K. (1995). Oxidative modification of DNA bases in rat liver and lung during chemical carcinogenesis and aging. *Chem Biol Interact* **94**, 135-145.

Weinfeld, M., Xing, J. Z., Lee, J., Leadon, S. A. & Le, X. C. (2002). Immunofluorescence detection of radiation-induced DNA base damage. *Mil Med* **167**, 2-4.

Weiss, R. S., Matsuoka, S., Elledge, S. J. & Leder, P. (2002). Hus1 acts upstream of chk1 in a mammalian DNA damage response pathway. *Curr Biol* **12**, 73-77.

Westphal, C. H., Schmaltz, C., Rowan, S., Elson, A., Fisher, D. E. & Leder, P. (1997). Genetic interactions between atm and p53 influence cellular proliferation and irradiation-induced cell cycle checkpoints. *Cancer Res* **57**, 1664-1667.

Worth, L., Jr., Frank, B. L., Christner, D. F., Absalon, M. J., Stubbe, J. & Kozarich, J. W. (1993). Isotope effects on the cleavage of DNA by bleomycin: mechanism and modulation. *Biochemistry* **32**, 2601-2609.

Wu, W., Vanderwall, D. E., Teramoto, S., Man Lui, S., Hoehn, S. T., Tang, X. J., Turner, C. J., Boger, D. L., Kozarich, J. W. & Stubbe, J. (1998). NMR studies of Co.deglycobleomycin A2 green and its complex with d(CCAGGCCTGG). *J Am Chem Soc* **120**, 2239-2250.

Yin, B., Whyatt, R. M., Perera, F. P., Randall, M. C., Cooper, T. B. & Santella, R. M. (1995). Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA. *Free Radic Biol Med* **18**, 1023-1032.

Yu, Y., Inamdar, K. V., Turner, K., Jackson-Cook, C. K. & Povirk, L. F. (2002). Base substitutions, targeted single-base deletions, and chromosomal translocations induced by bleomycin in plateau-phase mammary epithelial cells. *Radiat Res* **158**, 327-338.

Références bibliographiques

Yuan, F., Zhang, Y., Rajpal, D. K., Wu, X., Guo, D., Wang, M., Taylor, J. S. & Wang, Z. (2000). Specificity of DNA lesion bypass by the yeast DNA polymerase eta. *J Biol Chem* **275**, 8233-8239.

Zhou, X., Liberman, R. G., Skipper, P. L., Margolin, Y., Tannenbaum, S. R. & Dedon, P. C. (2005). Quantification of DNA strand breaks and abasic sites by oxime derivatization and accelerator mass spectrometry: Application to gamma-radiation and peroxynitrite. *Anal Biochem* **343**, 84-92.

ANNEXES

Detection of new radiation-induced DNA lesions by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Peggy Regulus, Sébastien Spessotto, Mathilde Gateau, Jean Cadet, Alain Favier and Jean-Luc Ravanat*

Laboratoire "Lésions des Acides Nucléiques", DRFMC/SCIB CEA Grenoble, 17 Avenue des Martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France

Received 19 March 2004; Revised 27 July 2004; Accepted 27 July 2004

High-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC/ESI-MS/MS) has been used to search for the formation of as yet unidentified radiation-induced DNA lesions. For that purpose, the characteristic fragmentation of most of 2'-deoxyribonucleosides that corresponds to the loss of the 2-deoxyribose moiety (loss of 116 mass units) has been utilized to specifically detect modified nucleosides. Aerated aqueous solutions of DNA were exposed to ionizing radiation, and subsequently DNA was digested to nucleosides with a cocktail of endo- and exonucleases. HPLC/ESI-MS/MS analysis of the resulting 2'-deoxyribonucleoside mixture allowed us to detect four novel DNA modifications. In a subsequent step, the sensitivity of the tandem mass spectrometer was used to search for the formation of the newly detected lesions in the DNA of γ -irradiated cells. Thus, one of the four newly detected lesions was found to be significantly generated in cellular DNA upon exposure to ionizing radiation. In addition, the latter lesion was also shown to be present in untreated cells, indicating that the modified nucleoside could be formed endogenously. Copyright © 2004 John Wiley & Sons, Ltd.

Deoxyribonucleic acid (DNA) is an important biological molecule that contains the genetic information. Therefore, chemical injury to this macromolecule may have severe biological consequences, that appear to be implicated in several biological disorders such as cancer and aging.^{1,2} The formation of oxidative DNA modifications may have endogenous and exogenous origins. It is well documented that reactive oxygen and nitrogen species could induce *in vivo* the formation of DNA lesions.^{3–5} Several oxidative DNA modifications, including the well-known 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo), have already been identified,^{6,7} and some of them are utilized as biomarkers of exposure to oxidative agents.^{8,9} About 100 different oxidative DNA lesions (including diastereomers) have been identified so far in isolated DNA and model compounds.⁷ In the meantime, analytical methods have been developed for the measurement of oxidative DNA damage,¹⁰ both in cellular DNA¹¹ and also in biological fluids.^{12,13}

The strategy that has usually been applied to determine the formation of oxidative lesions within DNA consisted, for analytical consideration, to work on model compounds including isolated nucleosides, or sometimes short oligonucleotides. Thus, the target compound is exposed under different oxidative conditions including photosensitization and γ -irradiation. The resulting decomposition products are

subsequently isolated, mainly using high-performance liquid chromatography (HPLC), and then characterized using suitable spectroscopic measurements. In addition, efforts have been made to delineate the mechanism of formation of the DNA lesions.¹⁴ Thereafter, analytical methods were developed to search for the formation of the identified modifications, first in isolated DNA, subsequently after DNA hydrolysis. When the sensitivity and specificity were good enough, the latter assay was also applied to cellular DNA, subsequently to DNA extraction. Usually, at least in the field of oxidative DNA damage, results obtained at the nucleoside level could for the most part be extrapolated to DNA. However, there are examples where modified nucleosides, formed in a high yield at the nucleoside level, are barely detected when the nucleoside is incorporated into DNA. This could be explained, at least partly, by a different reactivity of the initially generated radicals within the DNA structure. For instance, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyadenosine (8-oxodAdo), a major hydroxyl radical-mediated decomposition of free dAdo, is formed with a low yield in isolated DNA.⁷ Conversely, we cannot exclude the possibility that as yet unidentified DNA lesions, formed in a low yield at the nucleoside level, could be significantly generated in DNA. Detection of such modifications requires a sensitive and specific analytical method.

Nowadays, HPLC coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) represents one of the most powerful analytical tools, providing high sensitivity and specificity to the measurement.¹⁵ In the field of oxidative

*Correspondence to: J.-L. Ravanat, DRFMC/SCIB CEA Grenoble, 17 Avenue des Martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France.
E-mail: jravanat@cea.fr

2224 P. Regulus *et al.*

DNA damage, such a method has been already utilized to detect several modifications, both in DNA and in biological fluids.^{16–19} Furthermore, use of the isotope dilution mass spectrometry technique provides an accurate quantification of the detected products.^{20–22} This represents a major improvement in terms of specificity and sensitivity with respect to the initially developed HPLC coupled to an electrochemical detection method that was originally devoted to the detection of 8-oxodGuo²³ and, later, to a few other oxidative DNA lesions.^{24,25} The HPLC/ESI-MS/MS assay also shows major advantages with respect to the gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) method,²⁶ in which a derivatization reaction, that could induce notable artefactual formation of oxidized DNA bases,^{27–29} has to be performed prior to the chromatographic analysis.

The main advantage of HPLC/ESI-MS/MS, in the so-called multiple reaction monitoring (MRM) mode, when compared with HPLC/ESI-MS in the selected ion monitoring (SIM) mode, is the significant increase in sensitivity of detection. Such an increase in sensitivity is mainly due to the quasi absence of background.³⁰ The other advantage of tandem mass spectrometry is the possibility of detecting molecules by using a specific fragmentation (using either the neutral-loss or precursor-ion scan modes) to screen for the presence of unknown products.³⁰ Interestingly, the main fragmentation in the positive ionization mode for the majority of 2'-deoxyribonucleosides corresponds to the loss of the 2-deoxyribose moiety (–116 mass units).¹⁷ In the present work, such a specific fragmentation has been used to search for unknown base lesions generated by exposure of isolated DNA in aerated aqueous solution to ionizing radiation. The mixture of nucleosides obtained by enzymatic digestion of DNA exposed to ionizing radiation was analyzed by HPLC/ESI-MS/MS in the neutral loss scan mode. Interestingly, using the latter approach, four new as yet unidentified DNA modifications were detected in isolated DNA exposed to ionizing radiation. Thereafter, a MRM method was set up to improve the sensitivity of detection of the newly detected DNA lesions. This has allowed the detection of one of the modified nucleosides within the DNA of γ -irradiated human cells.

EXPERIMENTAL

Products

Calf thymus DNA, 2'-deoxycytidine (dCyd), thymidine (Thd), 2'-deoxyadenosine (dAdo), 2'-deoxyguanosine (dGuo), and the polynucleotides poly(dG,dC), poly(dA,dT), poly(dA), poly(dT) and poly(dC), were obtained from Sigma (St Quentin-Fallavier, France). Conditions used for the irradiation and enzymatic digestion of DNA have been described in detail elsewhere.²¹ DNA was extracted from irradiated THP1 cells, a human monocyte cell line, using a recently optimized protocol that minimizes the occurrence of spurious DNA oxidation during the workup.³¹

HPLC/ESI-MS/MS measurements

On-line HPLC/ESI-MS/MS measurements were carried out using a Agilent (Massy, France) 1100 HPLC system, equipped with a thermostated autosampler, a binary HPLC

pumping system, an oven and a UV detector. Separations were performed using either a Alltima octadecyl silyl silica gel (ODS) column (5 μ m, 0.2 \times 25 cm) from Alltech France (Tempmars, France), or an Uptisphere-ODB (3 μ m, 0.2 \times 15 cm) column from Interchim (Montluçon, France). The elution was achieved at a flow rate of 0.2 mL/min in the gradient mode. The proportion of acetonitrile in 5 mM ammonium acetate, starting from 0%, reached either 25% (condition A, Alltima column) or 15% (condition B, Uptisphere column) within 30 min. The HPLC analysis was performed during 30 min after injection and an additional 15 min period was required to equilibrate the HPLC column between two injections. The column eluent was directed first to a UV detector set at 260 nm for monitoring overwhelming normal nucleosides. Then, after addition of MeOH (0.1 mL/min), the eluent was directed onto a API3000 tandem mass spectrometer (Applied Biosystems) through a "turbo-spray" electrospray source, as described in detail elsewhere.^{20,21} First, for the detection of nucleosides in the positive ionization mode, the API3000 instrument was used in the neutral loss mode with a constant loss of 116 Da. The first quadrupole was scanned from m/z 150–450. In addition, in order to avoid saturation of the detector by the overwhelming normal nucleosides, the mass corresponding to the protonated molecule of the latter compounds, as well as their heavy isotopic analogs, were not monitored. Typically, the scan was performed within the windows m/z 150–225, 230–240, 245–250, 255–265 and 270–450. The total scan time was 2 s, and the collision energy used (17 eV) was that optimized for 8-oxodGuo.²¹ In addition, the product ion scan mode (of the ion at m/z 342) was used to obtain the collision-induced fragmentation mass spectra of dCyd341, using two different collision energies (17 and 40 eV). Finally, a MRM method was developed to increase the sensitivity of detection of the newly detected DNA lesions using transitions m/z 342 \rightarrow 226, 256 \rightarrow 140 and 348 \rightarrow 232. In addition, the formation of three major already identified oxidized nucleosides, i.e. the four diastereomers of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine (ThdGly), 8-oxodGuo and 8-oxodAdo, was also monitored as previously described.^{11,21} Typically, during the first 11 min (condition B), ThdGly diastereomers were detected in the negative ionization mode using the m/z 275 \rightarrow 116 transition. The mass spectrometer was then switched to the positive ionization mode. From 11 to 17.5 min, the transition m/z 342 \rightarrow 226 was used to detect dCyd341 and from 17.5 to 23 min two transitions 284 \rightarrow 168 and 256 \rightarrow 140 were selected to detect 8-oxodGuo, dN255-1 and dN255-2. Finally, from 23 to 28 min, transitions m/z 268 \rightarrow 152 and 348 \rightarrow 232 were monitored for the detection of 8-oxodAdo and dN347, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Major efforts have been made in the last two decades to determine the nature of oxidative modifications to DNA and to assess their formation and biological consequences in living systems.^{1,2} Today, even when numerous radiation-induced DNA modifications have already been identified³² in model compounds and in isolated DNA, the possibility that unknown types of damage occur could not be excluded. In

RCM

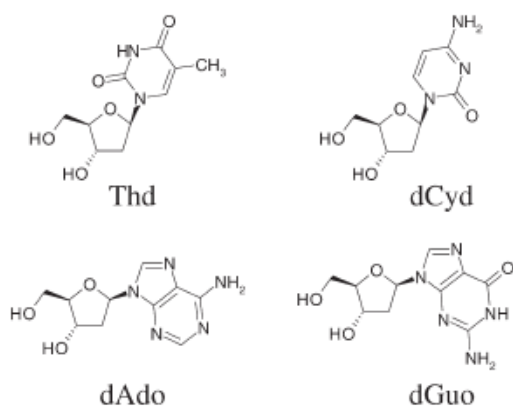


Figure 1. Structures of the four DNA nucleosides: thymidine (Thd), 2'-deoxycytidine (dCyd), 2'-deoxyadenosine (dAdo), and 2'-deoxyguanosine (dGuo).

the present work, HPLC coupled to tandem mass spectrometry has been used to search for as yet unidentified DNA lesions that could be generated upon exposure of aerated aqueous solutions of isolated DNA to ionizing radiation. However, the detection of unknown compounds by HPLC coupled to mass spectrometry is usually hampered by the low sensitivity of the approach. One way to overcome this problem, taking advantage of the specific fragmentation of 2'-deoxyribonucleosides (structures given in Fig. 1), is to use the neutral loss scan mode. This has allowed us to search

for unknown DNA modifications since most of nucleosides, in the positive ionization mode, lose the sugar moiety (116 Da) upon fragmentation.^{16,17,33} The HPLC/ESI-MS/MS elution profiles (gradient A) obtained in the neutral loss scan mode for the analysis of the enzymatic hydrolysate of either untreated (middle chromatogram) or γ -irradiated (500 Gy) aerated aqueous solutions of DNA (bottom chromatogram) are shown in Fig. 2. In addition, the UV elution profile (detection at 260 nm) of the untreated DNA sample is also reported (top chromatogram). Even if the ions corresponding to the protonated molecules of intact nucleosides were not monitored, the four overwhelming normal nucleosides were detected. In fact the detected peaks correspond mainly to the Na adduct of the unmodified nucleosides (data not shown). Interestingly, additional products were detected in the γ -irradiated DNA sample. These include, as expected, 8-oxodGuo (MW 283), a major radiation-induced DNA lesion that is eluted close to Thd. In addition, at least three other products, with $[M+H]^+$ ions at m/z 342, 256 and 348, respectively, were detected in irradiated DNA that were not present in untreated DNA. Such products are likely to be modified nucleosides since they lose 116 Da upon fragmentation, and are generated by γ -irradiation. Interestingly, at least three HPLC peaks that contain a compound exhibiting a $[M+H]^+$ ion at m/z 342 are observed (*vide infra*).

Having determined the molecular weights of the newly detected lesions, as well as their main fragmentation (loss of mass 116), a more sensitive MRM method was applied to detect these lesions in γ -irradiated DNA. The measurement

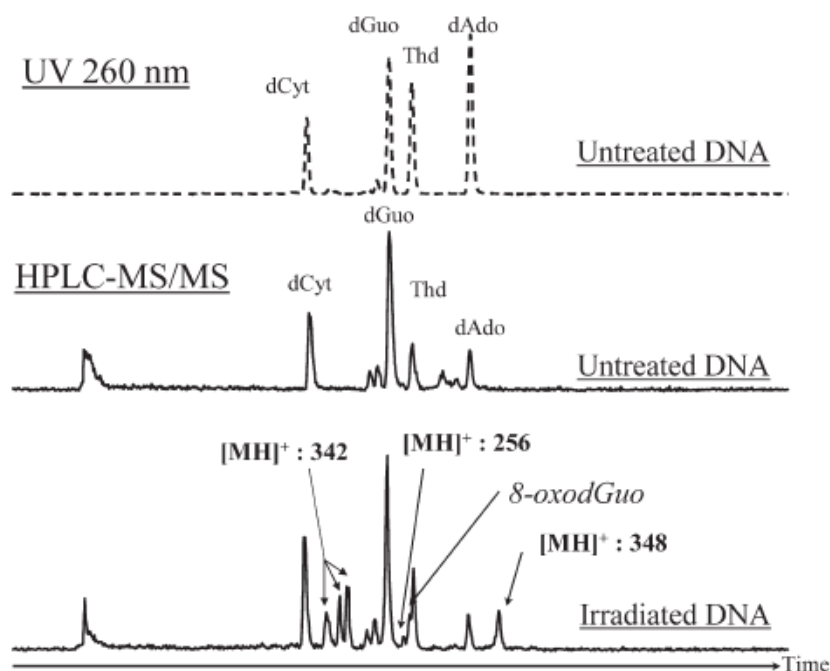


Figure 2. LC elution profiles (gradient A) of enzymatically hydrolyzed DNA. Top and middle chromatograms represent, respectively, the UV (260 nm) and MS/MS (neutral loss of 116 Da) traces of an untreated DNA sample. Bottom chromatogram represents the tandem mass spectrometric detection, in the neutral loss scan mode, of a DNA sample exposed to 500 Gy.

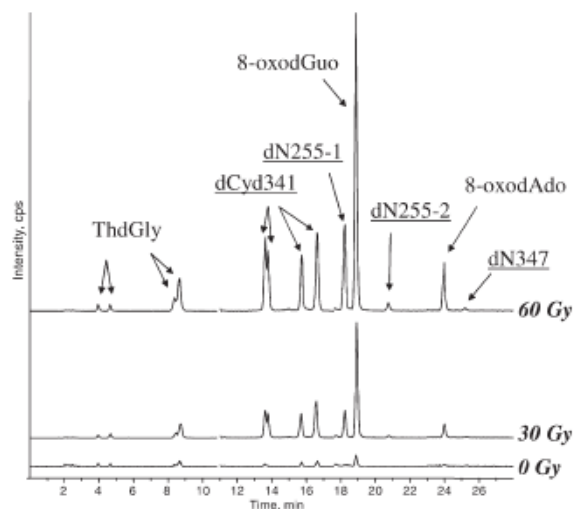
2226 P. Regulus *et al.*

Figure 3. HPLC/ESI-MS/MS elution profiles (gradient B) showing the detection (MRM mode) of the different DNA lesions in a control (0 Gy) and two irradiated (30 and 60 Gy) DNA samples.

was also extended to previously identified oxidized nucleosides including ThdGly, 8-oxodGuo and 8-oxodAdo. The HPLC/ESI-MS/MS chromatograms (gradient B) obtained

for the detection in the MRM mode of the selected lesions in γ -irradiated DNA samples exposed to 0, 30 and 60 Gy, respectively, are shown in Fig. 3. In agreement with previous findings,^{11,21} a linear increase in the level of already identified DNA lesions including ThdGly, 8-oxodGuo and 8-oxodAdo was observed. Under the HPLC conditions used (gradient B) four resolved peaks are now detected for the transition m/z 342 \rightarrow 226 and two products named dN255-1 and dN255-2 eluting at 18 and 21 min, respectively, are now detected using the m/z 256 \rightarrow 140 transition. Interestingly, the four new DNA modifications (dCyd341, dN255-1, dN255-2 and dN347), whose formation increases with the applied doses, were found to be generated in significant amounts. To the best of our knowledge, according to the retention time of the newly detected nucleosides and their molecular weight, these modified nucleosides are as yet unidentified DNA lesions. The other information that has to be highlighted is that the peak intensity of the newly detected DNA lesions, in particular for dCyd341, is comparable with that of the well-known DNA modification, 8-oxodGuo. For dCyd341 four peaks are detected (Fig. 3) and therefore it is reasonable to propose that the latter modified nucleoside, as ThdGly, exists as four different diastereomeric forms. Interestingly, collision-induced dissociation (CID) of the four different dCyd341 compounds confirms such a hypothesis (Fig. 4). To gain further insights into the dCyd341 structure, the

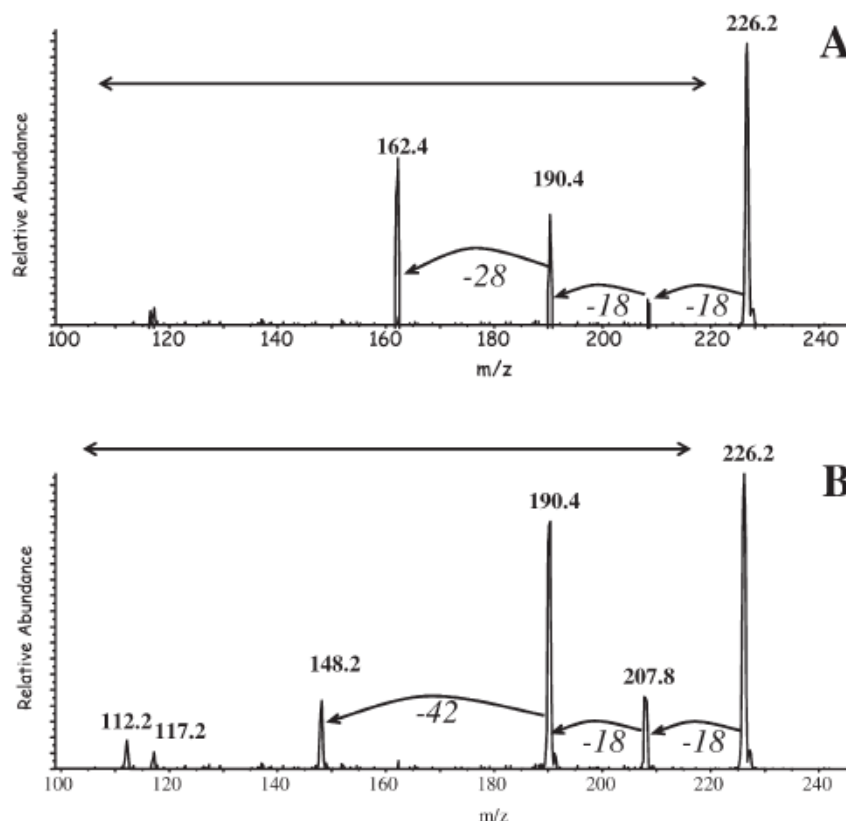


Figure 4. Collision-induced dissociation mass spectra of the protonated molecule (m/z 342) of dCyd341, obtained with a collision energy of 40 eV, for both the two fast eluting products (A) or the two other late eluting nucleosides (B).

Table 1. Formation (+) or not (–) of the different detected DNA modifications generated following exposure of aerated aqueous solutions of either isolated DNA, a mixture of nucleosides (dNs) or in different polynucleotides, to ionizing radiation

	8-oxodGuo	ThdGly	8-oxodAdo	dCyd341	dN255-1	dN255-2	dN347
DNA	+	+	+	+	+	+	+
dNs	+	+	+	–	–	+	–
Poly(dG,dC)	+	–	–	+	–	–	–
Poly(dT,dA)	–	+	+	–	–	–	–
Poly(dC)	–	–	–	+	–	–	–
Poly(dA)	–	–	+	–	–	–	–
Poly(dT)	–	+	–	–	–	–	–

tandem mass spectrometer was used in the product ion scan mode to obtain the CID mass spectrum of the m/z 342 ion of dCyd341. Using a collision energy of 17 eV, only the fragment at m/z 226 (loss of 116 Da) was observed (data not shown). Interestingly, additional structural information was obtained using a collision energy of 40 eV (Fig. 4) since additional fragments were detected. For all four modified nucleosides, two successive losses of 18 Da, that likely correspond to the loss of two water molecules, were observed. In addition, the two first eluted dCyd341 compounds exhibit an abundant ion at m/z 162. On the other hand, the mass spectra of the two other late eluting dCyd341 nucleosides show an abundant ion at m/z 148. Therefore, it could be postulated that dCyd341 exists as four diastereomers and further work has to be performed to assign their precise structure.

Homo- and hetero-polynucleotides containing dedicated DNA bases were then used to determine the origin of the formation of the different newly detected DNA lesions. For that purpose, poly(dC,dG), poly(dA,dT), poly(dT), poly(dA) and poly(dC) were irradiated and subsequently subjected to hydrolysis; the MRM detection method was applied to search for the presence of the different new DNA modifications. This allowed us to show that dCyd341 is formed following irradiation of either poly(dG,dC) or poly(dC), indicating that the product is a 2'-deoxycytidine lesion (Table 1). Another important piece of information is provided by the fact that dCyd341 is not formed when a mixture of nucleosides is irradiated. It should be noted that formation of dN255-1, dN255-2 and dN347 appears to occur significantly only in γ -irradiated aerated aqueous solutions of DNA. In addition, an equimolar mixture of dAdo, dCyd, dGuo and Thd (dNs in Table 1) was used to determine the importance of the DNA structure in the formation of the different DNA lesions. Interestingly, only dN255-2 was found to be significantly generated upon exposure of dNs to ionizing radiation. The fact that some modified nucleosides are only formed in double-stranded DNA confirms our hypothesis that the DNA structure plays a role in either the formation or the conversion of the radiation-induced radicals.

The loss of 116 Da in the fragmentation of the newly detected modifications strongly suggests that the 2-deoxyribose moiety is intact. This is further supported by the fact that the latter compounds are released as nucleosides following enzymatic digestion of DNA.³⁴ It is also interesting to note that dCyd341 and dN347 exhibit molecular weights significantly higher than normal nucleosides. The molecular weight of normal nucleosides is lower than 280 Da, whereas the two modified nucleosides have a molecular weight more

than 60 Da higher. Therefore, the structures of the latter products most probably involve the formation of an adduct within the base moiety of the nucleoside. Further work is now required to fully characterize the different newly detected modifications.

Using the sensitive MRM method, attempts were made to search for the formation of the newly detected modifications in γ -irradiated cells. Cells were exposed to γ -rays and subsequently DNA was extracted and digested into nucleosides prior to HPLC/ESI-MS/MS analysis. Interestingly, a significant increase in the four diastereomers of dCyd341 was observed in cells exposed to 60, 120 and 180 Gy of γ -rays (Fig. 5). An increase in 8-oxodGuo was also observed, whereas we were not able to detect other newly detected DNA modifications including dN255-1, dN255-2 and dN347, even in the DNA of cells treated with the highest dose of γ -irradiation. Another interesting point concerns the detection of dCyd341 (and also 8-oxodGuo) in untreated cells, suggesting that dCyd341 is formed under physiological conditions. Concerning the quantitative aspect of the formation of the different DNA lesions, it could be noted that the peak intensity of each of the diastereomers of dCyd341 is almost similar to that of 8-oxodGuo. However, it has to be remembered that the sensitivity of detection using ESI-MS/MS depends on the nature of the product and therefore could significantly vary from one compound to another. However, concerning the sensitivity of detection of DNA damage, in the positive ionization mode using the transition corresponding to the loss of the 2-deoxyribose moiety, a similar sensitivity was observed for several modified nucleosides.^{21,35} Therefore, it is reasonable to assume that the amount of dCyd341 formed in the DNA of cells exposed to γ -irradiation is of similar order to 8-oxodGuo, considered as one of the major DNA lesions generated upon ionizing radiation. Moreover, it is worth noting that a 250% increase in 8-oxodGuo is observed between untreated and 120 Gy irradiated cells, whereas the increase in dCyd341 is more than 500%, suggesting that this lesion could be a better biomarker of *in vivo* oxidative stress.

In conclusion, the HPLC/ESI-MS/MS detection method, used in the neutral loss scan mode, is a powerful approach to search for the formation of as yet unidentified DNA lesions. In the present work, four new DNA lesions have been detected in isolated DNA upon exposure to ionizing radiation. Among them, one (dCyd341) that exists as four diastereomers was found to be present in the DNA of untreated cells and significantly generated in cells exposed to ionizing radiation. Further work is now required to

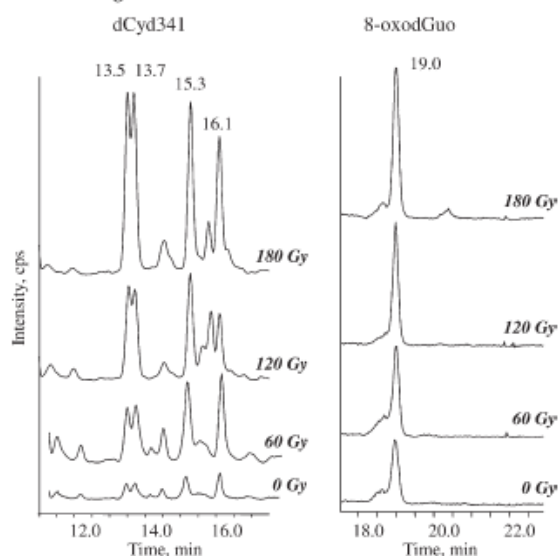
2228 P. Regulus *et al.*

Figure 5. HPLC/ESI-MS/MS detection (MRM mode) of dCyd341 (left panel, transition m/z 342 \rightarrow 226) and 8-oxodGuo (right panel, transition m/z 284 \rightarrow 168) in the DNA of untreated and γ -irradiated cells with doses of 60, 120 and 180 Gy.

characterize the different newly detected DNA modifications that most probably arise from the initial reaction of the hydroxyl radical with DNA. Particular efforts will be made to identify dCyd341 that seems to represent a major radiation-induced DNA modification. This represents a challenging issue, in terms of preparation of the modified nucleosides for assignment purpose, since dCyd341 is not generated when an aerated aqueous solution of the free nucleoside dCyd is exposed to ionizing radiation.

REFERENCES

- Lindahl T. *Nature* 1993; 362: 709.
- Ames BN, Gold LS. *Mutat. Res.* 1991; 250: 3.
- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat J-L. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1997; 31: 1.
- Halliwell B, Aruoma O. I. *FEBS Lett.* 1991; 281: 9.
- Collins AR. *Bioessays* 1999; 21: 238.
- Dizdaroglu M. *Free Radical Biol. Med.* 1991; 10: 225.
- Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget J-P, Ravanat J-L, Sauvaigo S. *Mutat. Res.* 1999; 424: 9.
- Helbeck HJ, Beckman KB, Ames BN. *Methods Enzymol.* 1999; 300: 156.
- Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. *Environ. Health Perspect.* 1996; 104: 465.
- Cadet J, Weinfeld M. *Anal. Chem.* 1993; 65: 675.
- Pouget J-P, Frelon S, Ravanat J-L, Testard I, Odin F, Cadet J. *Radiat. Res.* 2002; 157: 589.
- Ravanat J-L, Guicherd P, Tuce Z, Cadet J. *Chem. Res. Toxicol.* 1999; 12: 802.
- Loft S, Fischer-Nielsen A, Jeding IB, Vistisen K, Poulsen HE. *J. Toxicol. Environ. Health* 1995; 40: 391.
- Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Gromova M, Pouget J-P, Ravanat J-L, Romieu A, Sauvaigo S. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 1999; 151: 1.
- Griffiths WJ, Jonsson AP, Liu S, Rai DK, Wang Y. *Biochem. J.* 2001; 355: 545.
- Serrano J, Palmeira CM, Wallace KB, Kuehl DW. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996; 10: 1789.
- Hua Y, Wainhaus SB, Yang Y, Shen L, Xiong Y, Xu X, Zhang F, Bolton JL, van Breemen RB. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2001; 12: 80.
- Weimann A, Belling D, Poulsen HE. *Free Radical Biol. Med.* 2001; 30: 757.
- Dawidzik JB, Patrzyk HB, Iijima H, Budzinski EE, Higbee AJ, Cheng HC, Box HC. *Biochim. Biophys. Acta* 2003; 1621: 211.
- Ravanat J-L, Duret B, Guiller A, Douki T, Cadet J. *J. Chromatogr. B* 1998; 715: 349.
- Frelon S, Douki T, Ravanat J-L, Pouget JP, Tornabene C, Cadet J. *Chem. Res. Toxicol.* 2000; 13: 1002.
- Ravanat J-L, Di Mascio P, Martinez GR, Medeiros MH, Cadet J. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 40601.
- Floyd RA, Watson JJ, Wong PK, Altmiller DH, Rickard RC. *Free Radical Res. Commun.* 1986; 1: 163.
- Berger M, Anselmino C, Mouret J-F, Cadet J. *J. Liq. Chromatogr.* 1990; 13: 929.
- Wagner JR, Hu CC, Ames BN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 3380.
- Dizdaroglu M. *J. Chromatogr.* 1984; 295: 103.
- Ravanat J-L, Turesky RJ, Gremaud E, Trudel LJ, Stadler RH. *Chem. Res. Toxicol.* 1995; 8: 1039.
- Douki T, Delatour T, Bianchini F, Cadet J. *Carcinogenesis* 1996; 17: 347.
- Cadet J, Douki T, Ravanat J-L. *Environ. Health Perspect.* 1997; 105: 1033.
- Steen RJ, Bobeldijk I, Brinkman UA. *J. Chromatogr. A* 2001; 915: 129.
- Ravanat J-L, Douki T, Duet P, Gremaud E, Herbert K, Hofer T, Lasserre L, Saint-Pierre C, Favier A, Cadet J. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1911.
- Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat J-L. *Mutat. Res.* 2003; 531: 5.
- Reddy DM, Iden CR. *Nucleosides Nucleotides* 1993; 12: 815.
- Falcone JM, Box HC. *Biochim. Biophys. Acta* 1997; 1337: 267.
- Ravanat J-L, Remaud G, Cadet J. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 374: 118.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES.....	7
CHAPITRE I: CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	11
I. Le rayonnement ionisant.....	13
A. Définition et notions de radioactivité.....	13
1. Qu'est-ce qu'un rayonnement ionisant ?.....	13
2. Les rayonnements ionisants du ⁶⁰ Co.....	14
3. Spectre électromagnétique.....	15
B. Quelques notions de dosimétrie.....	16
C. Les différentes sources d'exposition au rayonnement ionisant.....	18
II. Les effets du rayonnement ionisant.....	19
A. A l'échelle de l'organisme entier.....	19
1. Effet des fortes doses.....	20
2. Effet des faibles doses.....	21
B. A l'échelle moléculaire.....	23
1. Effet direct et effet indirect.....	23
2. Oxydation des lipides et des protéines.....	24
3. Dommages à l'ADN.....	26
a) Les produits de modification du 2-désoxyribose.....	26
b) Les modifications des bases.....	28
c) Les pontages ADN-protéines.....	34
d) Les adduits bases-aldéhydes.....	35
III. La réponse de la cellule face aux dommages de l'ADN	36
A. L'arrêt du cycle cellulaire.....	36
B. Les systèmes de réparation des dommages de l'ADN.....	38
1. La réparation par réversion directe.....	39
2. La recombinaison homologue.....	39
3. La suture non homologue des cassures (NHEJ pour <i>Non Homologous End Joining</i>).....	39
4. La réparation des mésappariements.....	40
5. La réparation par excision de bases (REB).....	42
6. La réparation par excision de nucléotides (REN).....	44
C. La mort cellulaire.....	46
1. La nécrose.....	46
2. L'apoptose.....	47
3. La sénescence.....	47
D. Propriétés mutagènes des lésions de l'ADN.....	48
E. La synthèse translésionnelle (STL).....	49
IV. La mesure des dommages de l'ADN.....	50
A. Les méthodes non chromatographiques.....	50
1. Les techniques immunologiques.....	50
2. Les méthodes enzymatiques.....	51
B. Les méthodes chromatographiques.....	53
1. Le post-marquage.....	53

2.	La chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse (CG-SM)	54
3.	La chromatographie liquide haute performance couplée à une détection électrochimique (CLHP-DEC)	55
4.	La chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en mode tandem (CLHP-SM/SM)	55
CHAPITRE II: OBJECTIFS DE L'ETUDE		59
RESULTATS		63
CHAPITRE III: DETECTION DE NOUVELLES LESIONS DE L'ADN PAR CLHP-SM/SM		65
I.	Les différents modes d'utilisation de la CLHP-SM/SM	67
A.	Le mode « <i>Q1 scan</i> »	67
B.	Le mode « <i>SIM</i> »	68
C.	Le mode « <i>Product Ion Scan</i> »	68
D.	Le mode « <i>Parent Ion Scan</i> »	69
E.	Le mode « <i>perte de neutre</i> »	69
F.	Le mode « <i>MRM</i> »	70
II.	Utilisation du mode «<i>perte de neutre</i>» pour rechercher de nouvelles lésions dans l'ADN exposé au rayonnement γ	71
A.	Mise au point de la méthode spectrométrique	71
B.	Détection de nouvelles lésions de l'ADN	72
III.	Mise au point d'une méthode de détection plus sensible	73
A.	Développement de la méthode	73
B.	Recherche des nouvelles lésions dans l'ADN cellulaire	75
IV.	Discussion	76
CHAPITRE IV: CARACTERISATION D'UNE NOUVELLE LESION RADIO-INDUITE DE L'ADN		79
I.	Origine de la lésion	81
II.	Structure de la dCyd341	82
A.	Structure hypothétique	82
B.	Détermination de la masse exacte de la lésion	83
1.	Purification de dCyd341 à partir d'ADN exposé aux rayonnements γ	83
2.	Détermination de la masse exacte	84
C.	Caractérisation par résonance magnétique nucléaire (RMN) de l'adduit formé entre la dCyd et l'aldéhyde	85
1.	Synthèse chimique de cet adduit	85
2.	Caractérisation de la dCyd341 par résonance magnétique nucléaire (RMN)	87
D.	Propriétés d'absorption UV de la dCyd341	89
1.	Spectres UV	89
2.	Détermination du coefficient d'extinction molaire de la dCyd341	90
E.	Etude comparative entre la dCyd341 et l'adduit dCyd-butènedialdéhyde	91
1.	Synthèse chimique de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde	92
2.	Comparaison des données UV	93
3.	Détermination du coefficient d'extinction molaire de l'adduit	93
4.	Existe-t-il deux conformations de la dCyd341 ?	93
F.	Etude de la fragmentation de la dCyd341 : amélioration de la méthode « <i>MRM</i> »	94

III.	Mécanisme de formation de la dCyd341.....	97
A.	Schéma général du mécanisme de formation proposé.....	97
B.	Oxydation en position 4 du 2-désoxyribose.....	99
1.	Oxydation en position 4 du 2-désoxyribose.....	99
2.	Réaction d'un produit de dégradation du 2-désoxyribose sur la dCyd.....	101
C.	Implication d'un aldéhyde dans la formation de la dCyd341.....	103
IV.	Oxygène et dCyd341.....	105
A.	Irradiation en conditions aérées ou désaérées.....	106
B.	Irradiations en présence d' ¹⁸ O ₂ ou d' ¹⁸ H ₂ O.....	107
V.	Discussion.....	110
CHAPITRE V: ANALYSES QUANTITATIVES DANS LES ADN ISOLE ET CELLULAIRE		115
I.	Quantification de la dCyd341.....	117
A.	Sensibilité de la méthode de détection de dCyd341.....	117
B.	Quantification de la dCyd341 dans l'ADN isolé exposé aux rayonnements γ	119
C.	Quantification de la dCyd341 dans l'ADN cellulaire exposé aux rayonnements γ	120
II.	Quantification de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde.....	121
A.	Mise au point de la méthode de détection de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde.....	122
B.	Détection de l'adduit dans l'ADN isolé.....	124
III.	Conclusion.....	127
CHAPITRE VI: COMMENT LA DCYD341 EST-ELLE PRISE EN CHARGE PAR LES CELLULES ?		129
I.	Excision <i>in vitro</i> par des glycosylases.....	131
II.	Excision <i>in vitro</i> par des extraits nucléaires.....	132
III.	Réparation <i>in cellulo</i>.....	133
A.	Choix du traitement.....	133
B.	Choix des conditions de traitement.....	134
C.	Etude de la réparation de la dCyd341 par les cellules traitées à la bléomycine.....	135
IV.	Discussion.....	136
CHAPITRE VII: CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....		139
CHAPITRE VIII: CONDITIONS EXPERIMENTALES.....		145
I.	Lignée et culture cellulaire.....	147
II.	Irradiations γ.....	147
III.	Méthode d'extraction chaotropique au NaI de l'ADN cellulaire.....	148
IV.	Digestions enzymatiques de l'ADN.....	149
V.	Traitement d'ADN par des agents exogènes.....	149
A.	Traitement d'ADN cellulaire à la bléomycine.....	149
B.	Traitement d'ADN isolé irradié à la méthoxyamine.....	150

VI.	Préparation de solutions d'ADN sous différentes conditions.....	150
A.	Solutions aqueuses d'ADN isolé en conditions désaérées.....	150
B.	Solutions aqueuses d'ADN isolé en présence d' ¹⁸ O ₂	150
C.	Solutions d'ADN isolé en présence d'H ₂ ¹⁸ O.....	151
VII.	Analyses par CLHP-SM/SM.....	151
A.	Description du système.....	151
B.	Conditions chromatographiques.....	151
C.	Paramètres de la détection par spectrométrie de masse.....	152
VIII.	Production et purification de la dCyd341 à partir d'ADN irradié.....	152
A.	Irradiation de l'ADN.....	152
B.	Purification de la lésion.....	152
IX.	Réparation des lésions.....	153
A.	<i>In vitro</i>	153
B.	En utilisant des extraits nucléaires.....	154
C.	<i>In cellulo</i>	154
1.	Evaluation de la cytotoxicité des bléomycines sur les cellules THP1.....	154
2.	Etude de l'excision de la dCyd341.....	155
X.	Synthèses chimiques de la dCyd341 et de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde.....	155
A.	Synthèse de la dCyd341.....	155
1.	Synthèse de l'acétate de 5-hydroxy-4-oxo-2-pental.....	156
2.	Synthèse de la 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-2'-désoxycytidine.....	156
3.	Synthèse de la dCyd341-Ac-DMTr.....	157
4.	Obtention de la 6-(2-désoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-2-hydroxy-3-(3-hydroxy-2-oxopropyle)-2,6-dihydroimidazo[1,2-c]pyrimidin-5(3H)-one (dCyd341).....	158
B.	Synthèse de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde.....	158
1.	Synthèse du trans-butènedialdéhyde.....	158
2.	Synthèse de l'adduit.....	159
C.	Détermination du coefficient d'extinction molaire de l'adduit dCyd-butènedialdéhyde.....	159
1.	Détermination du rapport tube/insert (R _t).....	159
2.	Calcul du ε.....	160
XI.	Analyses par RMN.....	160
XII.	Analyses de masse exacte.....	160
	LISTE DES PUBLICATIONS, PRIX ET COMMUNICATIONS.....	161
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	165
	ANNEXES.....	181
	TABLE DES MATIERES.....	189

Détection, caractérisation et mesure d'un nouveau dommage radio-induit de l'ADN isolé et cellulaire.

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est porteur de l'information génétique et les conséquences biologiques des lésions survenant sur cette molécule peuvent être importantes. Nous avons utilisé la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (CLHP/SM-SM) pour mettre en évidence la formation de nouvelles lésions radio-induites de l'ADN. L'analyse par CLHP/SM-SM en mode « perte de neutre » utilise la perte de 116 unités de masse, spécifique de la fragmentation de la majorité des nucléosides. Ainsi, 4 nouvelles lésions radio-induites, dont la quantité formée est proportionnelle à la dose d'irradiation, ont été détectées dans l'ADN isolé. L'une d'elles, la dCyd341 est de plus formée dans l'ADN cellulaire. Il s'agit d'une modification de la 2'-désoxycytidine (dCyd) ayant un poids moléculaire de 341 uma. La synthèse chimique de ce nucléoside modifié nous a permis de le caractériser par résonance magnétique nucléaire (RMN) et de déterminer sa masse exacte. Un mécanisme de formation a été proposé, dans lequel l'évènement initiateur est l'arrachement de l'atome d'hydrogène en position 4 du 2-désoxyribose (dR) générant un intermédiaire aldéhydique capable de réagir sur une cytosine voisine. La dCyd341 peut être considérée comme un dommage complexe, sa formation impliquant une cassure de la chaîne d'ADN et un pontage entre un produit de modification du dR et une dCyd voisine. En plus de sa caractérisation, de premières études biologiques portant sur la réparation de la dCyd341 ont révélé que la lésion est excisée de l'ADN avec une certaine efficacité.

Mots clés : lésions de l'ADN, rayonnement ionisant, caractérisation chimique, spectrométrie de masse, cassure de chaîne, pontage de l'ADN.

Detection, characterization and measure of a new radiation-induced damage in isolated and cellular DNA.

Deoxyribonucleic acid (DNA) contains the genetic information and chemical injury to this macromolecule may have severe biological consequences. We report here the detection of 4 new radiation-induced DNA lesions by using a high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) approach. For that purpose, the characteristic fragmentation of most 2'-deoxyribonucleosides, the loss of 116 Da corresponding to the loss of the 2-deoxyribose moiety, was used in the so-called neutral loss mode of the HPLC-MS/MS. One of the newly detected lesions, named dCyd341 because it is a 2'-deoxycytidine modification exhibiting a molecular weight of 341 Da, was also detected in cellular DNA. Characterization of this modified nucleoside was performed using NMR and exact mass determination of the product obtained by chemical synthesis. A mechanism of formation was then proposed, in which the first event is the H-abstraction at the C4 position of a 2-deoxyribose moiety. Then, the sugar modification produced exhibits a reactive aldehyde that, through reaction with a vicinal cytosine base, gives rise to dCyd341. dCyd341 could be considered as a complex damage since its formation involves a DNA strand break and a cross-link between a damaged sugar residue and a vicinal cytosine base located most probably on the complementary DNA strand.

In addition to its characterization, repair studies have revealed the ability of cells to excise the lesion. Identification of the repair systems involved could represent an interesting challenge.

Key words: DNA lesions, ionizing radiation, chemical characterization, mass spectrometry, strand break, DNA crosslink.