



HAL
open science

Etude des dommages de l'ADN impliquant des pontages ADN-protéines et ADN-polyamines

Stéphanie Silerme

► **To cite this version:**

Stéphanie Silerme. Etude des dommages de l'ADN impliquant des pontages ADN-protéines et ADN-polyamines. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GREN050 . tel-01558987

HAL Id: tel-01558987

<https://theses.hal.science/tel-01558987v1>

Submitted on 10 Jul 2017

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Stéphanie SILERME

Thèse dirigée par **Jean-Luc RAVANAT**

préparée au sein du **Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Etude des dommages de l'ADN impliquant des pontages ADN-protéines et ADN-polyamines

Thèse soutenue publiquement le **31 octobre 2014**
devant le jury composé de :

Pr Eric PEYRIN

Professeur, Université Joseph Fourier Grenoble, Président

Dr Bertrand CASTAING

Directeur de recherche, CNRS Orléans, Rapporteur

Dr Serge PIN

Directeur de recherche, CEA Saclay, Rapporteur

Dr Dimitar ANGELOV

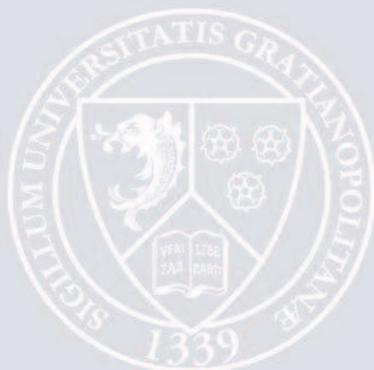
Directeur de recherche, CNRS Lyon, Examineur

Dr Christophe ARNOULT

Directeur de recherche, Université Joseph Fourier Grenoble, Examineur

Dr Jean-Luc RAVANAT

Directeur de Recherche, CEA Grenoble, Directeur de thèse



Remerciements

Je remercie chaleureusement les membres du jury, Serge Pin, Bertrand Castaing, Dimitar Angelov, Eric Peyrin et Christophe Arnoult, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à Jean-Luc Ravanat, directeur du laboratoire Lésions des Acides Nucléiques, pour la confiance qu'il m'a accordée, et pour son enseignement. Merci Jean-Luc pour ton soutien et ta gentillesse qui m'ont permis de travailler dans une atmosphère agréable pendant ces 3 ans, et pour tes nombreux encouragements. Grâce à ta grande patience, j'ai pu apprendre beaucoup, notamment en chimie analytique, et appréhender un peu mieux cet appareil énigmatique qu'est le « Quantum ». Merci de m'avoir donné ma chance et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse.

Je souhaiterais remercier tout le personnel du LAN. Travailler dans ce laboratoire aura été une expérience extrêmement enrichissante pour moi, au niveau scientifique bien sûr, mais pas seulement ! C'est une équipe où l'on apprend énormément les uns des autres, où l'on n'hésite pas à demander conseil à différentes personnes. Merci donc à vous tous pour votre accueil, et pour l'excellente ambiance que vous faites régner au sein de ce laboratoire.

J'adresse mes remerciements à Thierry Douki, directeur du Service de Chimie Inorganique et Biologique pour ses précieux conseils et pour son aide lors des analyses par HPLC-MS/MS. Je suis également très reconnaissante envers Didier Gasparutto, pour son aide très précieuse pour la synthèse du synthon phosphoramidite, ses conseils, sa gentillesse et sa grande patience.

Ce travail a pu être accompli grâce à différentes collaborations. Je remercie donc Vincent Maurel pour l'irradiation laser de nos échantillons, Olivier Sénèque et Vincent Lebrun pour leur contribution à la mise en place de modèles de pontage, Gilles Panteix, Christophe Arnoult et Saadi Khochbin pour la préparation des échantillons pour l'étude des adduits avec les polyamines. Un grand merci à Sandrine Perrier qui m'a fait découvrir les « bienfaits » de l'électrophorèse capillaire, pour tous ses conseils et pour son aide dans la rédaction de ce manuscrit.

Je souhaite remercier les membres du Comité de suivi de thèse, Olivier Sénèque et Dimitar Angelov, pour leur intérêt pour ce travail et leur expertise qui m'ont permis de prendre du recul sur différentes problématiques de ce projet.

Je remercie Jean Breton, pour le temps qu'il a bien voulu accorder à la relecture de cette thèse, et pour tous ses conseils avisés. Je souhaite remercier également Marie Carrière et Sylvie Sauvaigo pour leurs conseils et les discussions, scientifiques ou non.

Un grand merci à Christine, pour tes conseils avisés et pour ta grande disponibilité. Ce fut vraiment un plaisir de travailler à tes côtés pendant 3 ans. Merci pour le soutien inestimable que tu m'as apporté et pour l'ambiance que tu fais régner dans la « blue team ».

Merci à Lucie, pour ton soutien au quotidien, pour tes conseils de « biologiste » et pour ton aide lors de la rédaction de ce manuscrit : notamment toutes les idées originales et l'inventivité dont tu as fait preuve pour m'aider à garder le cap, et pour avoir choisi le bureau 305 comme « annexe ». Et sur un plan extra-scientifique, merci pour les discussions enrichissantes du

vendredi soir (ce sont les meilleures), et toutes les autres... Hè ! Je t'entends penser ! (et pour le coup c'est vrai !)

Un grand merci à Camille, pour avoir apporté un véritable tourbillon de bonne humeur dans le bureau 305 ! Merci à Carine, ma nouvelle super coloc de bureau, pour son agréable compagnie et sa gentillesse. Merci également à Marisa, pour tous tes précieux conseils (notamment en synthèse) et pour ton amitié. Dès mon arrivée à Grenoble, tu m'as ouvert la porte du Loco Mosquito ; merci pour ton accueil très chaleureux et pour les moments inoubliables que nous avons passés ensemble.

Merci à David, pour ton aide en culture cellulaire, et surtout pour ta patience face à mes nombreuses questions. Je remercie également Nadège, la chimiste du labo, pour sa patience, pour toutes les « petites » explications en RMN et autres (grâce à toi j'ai enfin compris ce qu'est un effet de toit, tout est donc possible!), Colette et Pierre-Alain pour les analyses par spectrométrie de masse et par RMN.

J'adresse également mes remerciements à Zohra, pour sa gentillesse, sa disponibilité, sa grande efficacité et son soutien dans de nombreuses situations !

Je remercie les personnes formidables que j'ai rencontrées au LAN, Iza, Momo, Guigui, Camille, Ewa, Lucie (de Chamonix !), Laure, Marie, Sarah, Anne, Viviana, Marion, Andrea, Audrey, pour les conseils et les bons moments passés ensemble. Merci également à Sylvain, pour son accueil, sa disponibilité et sa sympathie, ainsi qu'à Sylvestre pour sa perpétuelle bonne humeur (et son humour subtil). Merci à Tim et Vincent pour le soutien entre thésards. Je souhaite beaucoup de courage à Carine, Marie, Mathilde, Paul et Aurélie.

Merci à Marine, Anya, Vadik, pour leur amitié et leur soutien.

Merci à mes parents qui ont à chaque moment fait tout leur possible pour me soutenir et m'encourager dans ce que j'ai entrepris, qui ont su m'écouter, respecter mes choix et me guider vers la bonne voie.

Merci à toi, Olivier, de faire partie de ma vie depuis 2 ans maintenant, de me soutenir chaque jour et d'avoir embelli cette magnifique expérience Grenobloise !

Sommaire

Remerciements.....	3
Liste des abréviations.....	7
Avant-propos : Stress oxydant et lésions oxydatives de l'ADN.....	11
Chapitre 1 : Etude bibliographique.....	14
1 Les pontages ADN-protéines.....	15
2 Les polyamines.....	58
Objectifs de l'étude.....	77
Chapitre 2 : Partie expérimentale.....	79
1 Synthèse et caractérisation des standards.....	80
2 Méthodes d'analyse par HPLC-MS/MS.....	87
3 Formation d'adduits dans l'ADN isolé.....	90
4 Etude réalisée sur la lignée cellulaire THP1.....	93
5 Etude réalisée sur des échantillons de spermatozoïdes.....	99
6 Réparation des adduits guanine-polyamines par le BER.....	101
7 Préparation du synthon phosphoramidite de 8-put-dGuo.....	103
8 Modèles de pontage peptide + oligonucléotide.....	108
Résultats.....	112
Chapitre 3 : Les pontages avec la lysine.....	113
1 Introduction.....	114
2 Synthèse du standard.....	115
3 Caractérisation de l'adduit 8-lys-dGuo.....	117
4 Développement d'une méthode de quantification par HPLC-MS/MS.....	121
5 Formation d'adduits 8-lys-dGuo dans l'ADN isolé.....	125
6 Mise au point d'une méthodologie pour détecter l'adduit lysine-guanine dans un pontage ADN-protéine.....	130
7 Quantification de l'adduit 8-lys-Gua dans des cellules irradiées.....	137
8 Détection des pontages ADN-protéines dans l'ADN cellulaire.....	143
9 Conclusion.....	145
Chapitre 4 : Modèles de pontages peptides-oligonucléotides.....	146
1 Introduction.....	147
2 Le modèle « doigt de zinc CP1-Y2F + duplex 12-mer ».....	147

3	Les modèles « peptide + aptamère ».....	157
4	Conclusion.....	168
Chapitre 5 : Les pontages ADN-polyamines		169
1	Introduction	170
2	Synthèse des adduits avec la putrescine, la spermidine et la spermine	171
3	Caractérisation des adduits	177
4	Optimisation d'une méthode de quantification par HPLC-MS/MS	184
5	Formation d'adduits dans l'ADN isolé.....	186
6	Formation d'adduits dans l'ADN cellulaire.....	193
7	Optimisation d'une méthode de quantification plus sensible.....	200
8	Réparation des adduits guanine-polyamines par le BER	208
9	Synthèse d'oligonucléotides modifiés	211
10	Conclusion.....	220
Chapitre 6 : Discussion		221
1	Les pontages ADN-protéines.....	222
2	Les pontages ADN-polyamines	228
Conclusion & Perspectives.....		234
Références bibliographiques		239
Table des matières.....		252
Annexes		258
Annexe 1 : Liste des communications scientifiques		259
Annexe 2 : Article "DNA-polyamine crosslinks generated upon one electron oxidation of DNA", Chemical Research in Toxicology, 2014.....		260

Liste des abréviations

5-aza-C : 5-aza-cytidine
5-OH-8-oxoG : 5-hydroxy-8-oxo-7,8-dihydroguanine
5'MTA : 5'-méthylthioadénosine
8-Br-dGuo : 8-bromo-2'-désoxyguanosine
8-lys-dGuo : 8-lysine-2'-désoxyguanosine
8-lys-Gua : 8-lysine-guanine
8-oxodGuo : 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine
[8-oxoG]^{o+} : radical cation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine
8-oxoGua : 8-oxo-7,8-dihydroguanine
8-put-dGuo : 8-putrescine-2'-désoxyguanosine
8-spd-dGuo : 8-spermidine-2'-désoxyguanosine
8-spm-dGuo : 8-spermine-2'-désoxyguanosine
APE1 : apurinic endonuclease 1
APS : persulfate d'ammonium
APC : Adenomatous Polyposis Coli
AZ : antizyme
AZin : inhibiteur de l'antizyme
BER : base excision repair, réparation par excision de base
BINAP : 2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphthyle
BRCA2 : breast cancer type 2
BSA : bovine serum albumin
CdK : kinase cycline-dépendante
CEN2 : centrine 2
COSY : COrrelation SpectroscopY
CPD : cyclobutane pyrimidine dimers
CSA et CSB : Cockayne syndrome A et B
CtBP : C-terminal binding protein
CtIP : CtBP-interacting protein
dAdo : 2-désoxyadénosine
DAO : diamine oxidase
dba : dibenzylideneacetone
DCM : dichlorométhane
DDB : DNA damage-binding protein
DDR : DNA damage response

Liste des abréviations

dGuo : 2-désoxyguanosine
DHB : acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DMAP : diméthylaminopyridine
DME : diméthyléther
DMF : diméthylformamide
DMTr : diméthoxytrityle
DNMT : DNA methyltransferase
DPC : DNA-protein crosslink, pontage ADN-protéine
dRP : désoxyribose phosphate
dsDNA : double-stranded DNA
DTT : DL-dithiotreitol
EC/ESI-MS : on-line electrochemistrycoupled with electrospray ionization mass spectrometry
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
eIF5A : eukaryotic translation initiation factor 5A
EMSA : electrophoretic mobility shift assay
ERCC1 : excision repair cross-complementation group 1
ERO : espèce réactive de l'oxygène
ESI-MS : spectrométrie de masse avec ionisation par electrospray
Fapy-Gua : 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine
FEN-1 : flap endonucléase 1
FITC : isothiocyanate de fluorescéine
Fmoc : fluorenylmethyloxycarbonyl chloride
Fpg : Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase
FSH : Follicle-Stimulating Hormone, hormone folliculostimulante
G^{o+} : radical cation de la guanine
G0, G1 et G2 : growth phases 0,1 et 2, phases de croissance 0, 1 et 2 du cycle cellulaire
GC-MS : chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GG-NER : global genome NER
Gh : guanidinodihydantoïne
hOGG1 : human oxoguanine glycosylase 1
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HFBA : acide heptafluorobutyrique
HPLC-MS/MS : chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem
HR : recombinaison homologue
HR23B : Rad 53 homolog B
HRP : horseradish peroxydase

Liste des abréviations

HuR : Hu antigen R
IQ : 2-amino-3-methylimidazo 4 5-f quinoline
LH : luteinizing hormone, hormone luteïnisante
Lig : ligase
LC-MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LP-BER : long patch BER
M : mitosis, phase de mitose du cycle cellulaire
MALDI-TOF : matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight
MAP : mitogen-activated protein kinase
MEM : minimum essential medium
MMR : mismatch repair, réparation des mésappariements
MRM : multiple reactions monitoring
MRN : Mre11-Rad50-Nbs1
MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NAP : nuclear aggregates of polyamines; s, m, l-NAP : small, medium, large NAP
NBS : *N*-bromosuccinimide
NEAA : non-essential amino acids
NER : nucleotide excision repair, réparation par excision de nucléotide
NF : nuclear factor
NHE : normal hydrogen electrode
NHEJ : jonction non homologue des extrémités
Nrf-2 : nuclear factor erythroid 2-related factor 2
ODC : ornithine decarboxylase
OGox : 8-oxodGuo oxydée
OGG1 : oxoguanine glycosylase 1
PAGE : poly-acrylamide gel electrophoresis
PAO : polyamine oxidase
PCNA : proliferating cell nuclear antigen
PK : proteinase K
PMF-1 : polyamine-modulated factor 1
PNK : polynucleotide kinase
Pol : polymérase
PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor
PRE : polyamine responsive element
RADAR : Rapid Approach to DNA Adduct Recovery
Rf : rapport frontal
RF-C : replication factor C

Liste des abréviations

RMN : résonance magnétique nucléaire
RPA : replication protein A
S : synthesis, phase de synthèse du cycle cellulaire
SAM : S-adenosyl-méthionine
SAMHC : S-adenosyl-S-méthyl-homocystéamine
SAMdc : SAM-décarboxylase
SCGE : single-cell gel electrophoresis
SDS : dodécyl sulfate de sodium
Sp : spiroiminodihydantoïne
SP-BER : short-patch BER
SSAT : acetyl-Coa:spermidine/spermine N¹-acetyltransferase
SSB : single-stranded binding protein
ssDNA : single-stranded DNA
SVF : serum de veau foetal
SWB : sperm washing buffer
TBDMS : *tert*-butyldiméthylsilyle
TC-NER : transcription-coupled NER
TEA : triéthylamine
TEAA : acétate de triéthylammonium
TEMED : tetraméthylethylenediamine
TF : transcription factor
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane
TOPO : topoisomérase
TP53 : tumor protein p53
UV-DDB : UV-damaged DNA binding
XANTPHOS : 4,5-Bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène
XPA-G : *Xeroderma pigmentosum*, complémentation group A-G
XRCC1 : X-ray repair cross-complémenting group 1

Avant-propos : Stress oxydant et lésions oxydatives de l'ADN

Le stress oxydant se traduit par la présence excessive de radicaux oxygénés. Il provient d'une rupture de l'équilibre de la balance entre les prooxydants et les systèmes de défense antioxydants.

Au niveau cellulaire, il existe 2 types d'espèces radicalaires : (i) les radicaux primaires, qui dérivent directement de l'oxygène, par des réductions à un électron, et présentent un rôle physiologique et (ii) les radicaux secondaires, qui résultent de l'action des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Les principaux radicaux primaires sont l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$, le radical hydroxyle OH° , et le monoxyde d'azote NO° (Figure 1). Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le peroxyde d'azote $ONOO^-$, sont des précurseurs de radicaux.

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs ainsi que l'oxygène singulet 1O_2 constituent les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les plus réactives d'entre elles sont principalement le radical hydroxyle OH° , et les radicaux peroxyde ROO° , qui sont des radicaux secondaires provenant de l'oxydation de substrats organiques. (1)

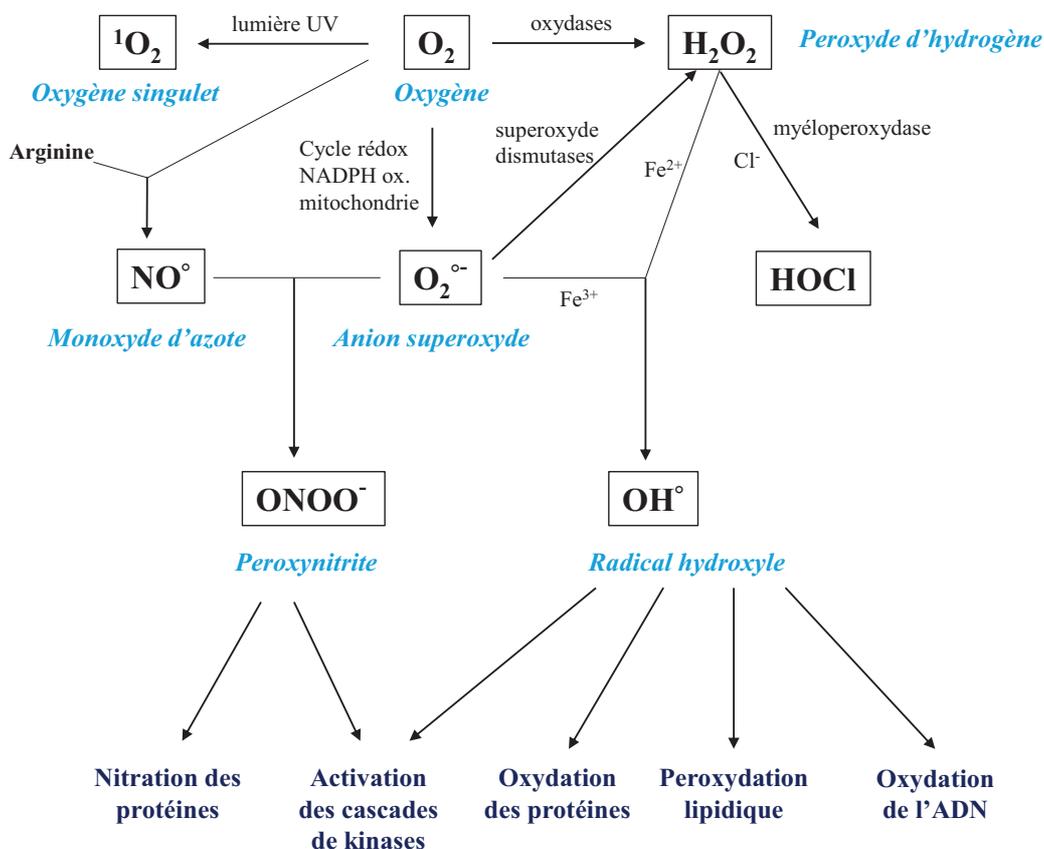


Figure 1 : Formation des espèces réactives de l'oxygène (1).

La formation d'espèces réactives de l'oxygène provient du métabolisme cellulaire (en particulier des chaînes de transporteurs d'électrons et de certaines activités enzymatiques), ou de l'action d'agents exogènes, tels que les radiations ionisantes, les métaux lourds ou certains produits chimiques (2). La production excessive de radicaux libres peut endommager un certain nombre de molécules biologiques, en particulier l'ADN, qui est très sensible à l'attaque des espèces réactives de l'oxygène. Celles-ci peuvent induire des modifications chimiques qui ont potentiellement des conséquences dommageables pour la cellule (2). Différents types de dommages oxydatifs de l'ADN sont connus à ce jour :

- les bases oxydées (Figure 2),
- les sites abasiques,
- les pontages intra-brin et inter-brins,
- les cassures simple ou double brins,
- les pontages ADN-protéines.

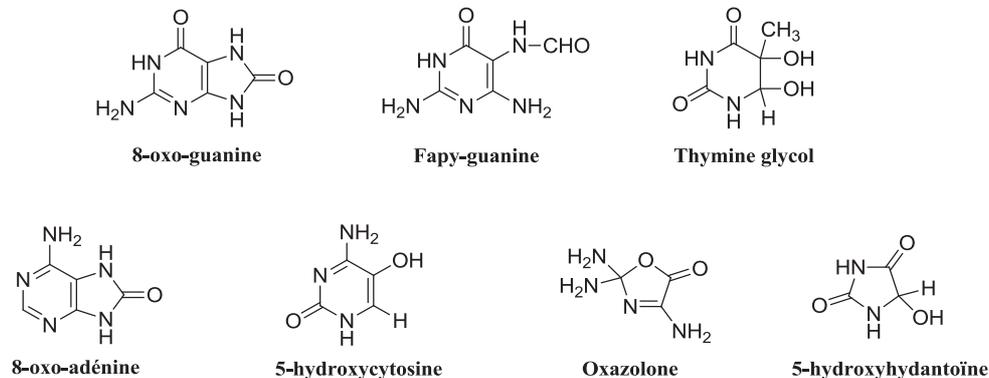


Figure 2 : Quelques exemples de lésions produites par oxydation de bases.

Ces lésions oxydatives peuvent être induites notamment par des réactions de photo-oxydation, par 2 principaux mécanismes (3,4) :

- la photo-oxydation de type I, qui correspond à une réaction d'oxydation à un électron, soit par abstraction d'un proton, soit par un transfert électronique ;
- la photo-oxydation de type II, qui implique la formation initiale d'oxygène singulet.

Certains radicaux libres, ainsi que nombreux agents physiques ou chimiques, peuvent induire une oxydation à un électron de l'ADN, en particulier au niveau de la guanine (5). Le processus d'ionisation par perte d'un électron produit un radical cation, localisé généralement sur les bases aromatiques. Ce déficit électronique se propage le long du duplex d'ADN, jusqu'à ce qu'il soit piégé par une réaction chimique irréversible (6). La guanine constitue le site préférentiel de ce déficit en électron, puisque cette base possède le potentiel d'ionisation le plus bas parmi les composants de l'ADN (7).

Le radical cation de la guanine ($G^{\bullet+}$) peut être impliqué dans 2 types de réactions : des additions nucléophiles et des réactions de déprotonation. Le carbone C8 du radical $G^{\bullet+}$ est particulièrement favorable aux additions nucléophiles. Parmi les différentes réactions actuellement décrites, la plus

étudiée est celle correspondant à la formation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine. Celle-ci se produit suite à l'addition nucléophile d'une molécule d'eau en C8 du radical cation de la guanine, ce qui conduit au radical 8-hydroxy-7,8-dihydroguanyl (Figure 3). Cette hydratation est suivie d'une seconde étape d'oxydation pour former la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua). Le radical 8-hydroxy-7,8-dihydroguanyl peut également être réduit, ce qui provoque une ouverture du cycle imidazole, formant ainsi la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua) (5). Nous verrons qu'il existe cependant d'autres espèces nucléophiles capables de s'ajouter sur le radical $G^{\bullet+}$, en particulier l'acide aminé lysine. Ces réactions seront présentées dans l'étude bibliographique qui suit.

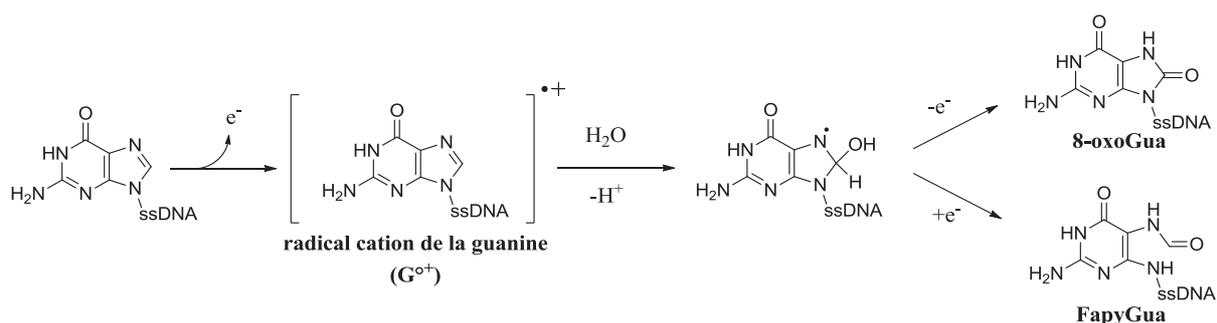


Figure 3 : Lésions obtenues lors de la réaction d'hydratation du radical cation de la guanine.

Ce projet de recherche s'inscrit dans l'étude des lésions oxydatives, et plus particulièrement des **pontages ADN-protéines** ou **DPCs**, pour « DNA-protein crosslinks ». Dans cette étude nous nous sommes concentrés sur les pontages se produisant par un mécanisme d'oxydation à un électron de l'ADN, suivi de l'addition nucléophile d'un acide aminé de type lysine sur le radical cation de la guanine. Nous verrons par la suite qu'un mécanisme similaire peut être impliqué dans la formation d'autres lésions que sont **les adduits avec les polyamines**. Les polyamines sont de petites molécules cationiques présentes au contact de l'ADN. Ces adduits ont donc fait l'objet de la seconde partie de ces travaux.

Ce document comporte 6 grandes parties. Le premier chapitre sera consacré à une étude bibliographique, qui présentera dans un premier temps quelques généralités sur les pontages ADN-protéines et l'état actuel des connaissances sur les pontages induits par le stress oxydant. Nous poursuivrons par une courte revue de la littérature concernant les polyamines, leurs rôles physiologiques, et leur implication dans la formation de lésions de l'ADN. Les résultats de ces travaux seront présentés dans les chapitres 2 à 4. Nous exposerons tout d'abord l'étude réalisée sur l'adduit guanine-lysine ainsi que le développement de modèles de pontages peptides-oligonucléotides, puis l'étude des adduits guanine-polyamines. Le chapitre 5 est une discussion sur l'ensemble des résultats obtenus, celui-ci sera suivi d'une conclusion générale et des perspectives. Dans le dernier chapitre seront présentées les conditions expérimentales ainsi que les techniques mises en œuvre pour la réalisation de ces travaux.

Chapitre 1 :

Etude bibliographique

1 Les pontages ADN-protéines

1.1 Généralités sur les pontages ADN-protéines

L'ADN génomique est constamment associé avec diverses protéines, formant ainsi la chromatine. Chez les organismes eucaryotes, l'ADN est enroulé autour d'octamères d'histones pour former le nucléosome. Il est replié en une structure compacte grâce à la présence de diverses protéines « architecturales » ; il interagit également avec les protéines de la matrice nucléaire. Outre ces protéines structurales, l'ADN est associé à différentes protéines fonctionnelles qui interviennent dans des processus cellulaires essentiels tels que la réplication, la transcription, la réparation ou la recombinaison. Ces interactions dynamiques et réversibles assurent l'expression et la transmission de l'information génétique (8). Un pontage ADN-protéine se produit lorsqu'une protéine se lie de façon covalente à l'ADN (9). Ces dommages peuvent être induits par divers agents endogènes (ERO) ou exogènes (physiques ou chimiques) (8). Les pontages ADN-protéines constituent un groupe de lésions très hétérogène, de par la diversité de leur mécanisme de formation et de leur structure chimique (9).

Les protéines peuvent être liées soit à la base, soit à la partie osidique. Selon le mécanisme de formation, la nature du pontage peut varier. Lorsqu'il s'agit d'un mécanisme impliquant le stress oxydatif, les protéines sont généralement pontées directement à l'ADN. Dans d'autres cas, le pontage peut s'effectuer de façon indirecte, *via* un linker constitué par un agent chimique ou un médicament antinéoplasique. Les protéines peuvent également être liées par coordination avec un atome métallique (9). Cette étude est axée sur les pontages survenant lors du stress oxydatif.

La stabilité de ces adduits est très variable : la demi-vie est de quelques heures à plusieurs jours (9,10). Les pontages ADN-protéines sont des lésions volumineuses qui peuvent impacter les processus de réplication, transcription et de réparation de l'ADN de par leur encombrement stérique (8).

1.1.1 Classification

Les pontages ADN-protéines pourraient être classés selon une multitude de critères (protéine impliquée, mécanisme de formation, agent inducteur, conséquences biologiques...). Il existe cependant une classification communément admise, reposant sur la structure chimique, et finalement reliée à l'origine du pontage. Ces lésions sont ainsi réparties en 4 groupes, selon la présence et le type de cassure de brin(s) autour du pontage (Figure 4). (8,11)

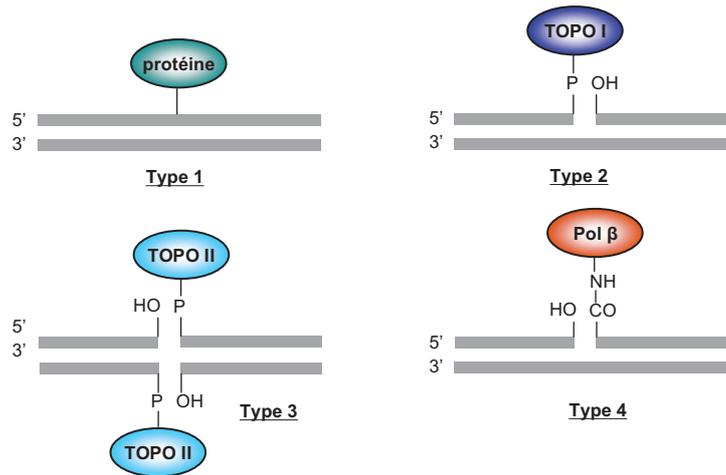


Figure 4 : Les 4 types de pontages ADN-protéines (8). TOPO : topoisomérase, Pol : polymérase

Dans le type 1, une protéine est liée de façon covalente à un brin d'ADN ininterrompu ne présentant pas de cassure. Ces pontages sont induits par différents agents physiques (radiations ionisantes, UV) ou chimiques (aldéhydes, chromates). On retrouve également dans ce groupe les pontages induits par certains anticancéreux tels que la 5-azacytidine (5-aza-C).

Les pontages des types 2, 3, et 4 impliquent des enzymes, et se produisent généralement suite à la présence d'un agent chimique capable de bloquer un intermédiaire réactionnel lors d'un processus physiologique.

Les topoisomérases sont impliquées dans les types 2 et 3. Dans les pontages de type 2, la topoisomérase I (TOPO I) est liée à l'extrémité 3' d'une cassure simple brin. Le type 3 fait intervenir la topoisomérase II (TOPO II) qui est pontée aux extrémités 5' d'une cassure double brin. Dans les 2 cas il s'agit d'un blocage de l'intermédiaire réactionnel, constitué d'une liaison phosphodiester entre l'extrémité d'un brin d'ADN coupé et une tyrosine, par un inhibiteur de topoisomérase utilisé en chimiothérapie, tel que l'étoposide.

Dans le type 4, l'ADN polymérase β (Pol β), l'une des principales enzymes de réparation du « Base Excision Repair » (BER), est liée en position 5' d'une cassure simple brin. Ces pontages apparaissent lors de l'excision de certains sites abasiques oxydés par Pol β . Dans le cas de la 2-désoxyribonolactone, formée suite à l'oxydation en position C1, l'attaque de la lactone par Pol β conduit à une liaison amide avec une lysine du site actif de l'enzyme (12). Des pontages covalents avec une autre enzyme du BER, la Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase (Fpg) ont été créés in vitro. L'intermédiaire base de Schiff formé lors de la réaction de la Fpg avec l'ADN a été piégé par réduction par le borohydrure de sodium. Cet intermédiaire résulte de l'addition nucléophile d'une proline du site actif de l'enzyme au niveau du carbone C1' de la base endommagée (13).

1.1.2 Les agents inducteurs et les principaux mécanismes de formation des DPCs

Les pontages ADN-protéines peuvent provenir de l'action des espèces réactives de l'oxygène, issues du métabolisme cellulaire ou de processus inflammatoires. De nombreux agents inducteurs sont d'origine exogène :

- les agents physiques : UV, radiations ionisantes ;
- les agents chimiques : formaldéhyde (14), glyoxal (9), méthylglyoxal (9), alcaloïdes dérivés de la pyrrolizidine (15);
- certains médicaments anticancéreux : cis-platine (16), 5-aza-cytidine (8) ;
- les métaux : chrome (17), nickel (9), arsenic (9)...

1.1.2.1 Les pontages indirects *via* un « linker »

Dans cette partie nous nous intéresserons au cas du formaldéhyde, qui est l'un des agents inducteurs de DPCs les plus étudiés. L'exemple de la 5-aza-cytidine sera également abordé. Bien que ce composé ne constitue pas un « linker » au sens strict, il est capable d'induire des pontages suite à son incorporation dans l'ADN, et a donc été rattaché à ce groupe.

▪ Le formaldéhyde

Ce gaz incolore et inflammable est naturellement présent dans l'environnement mais provient principalement de produits de combustion du bois, des gaz d'échappement, de la fumée de cigarette et autres sources liées à l'activité humaine. Ce toxique a été très étudié dans le cadre d'une exposition professionnelle et il a été classé « cancérigène avéré » par le CIRC en 2004. Le formaldéhyde est largement décrit dans l'étude des pontages ADN-protéines, puisqu'il induit préférentiellement des pontages avec les histones. (18)

Ce composé, après absorption, est partiellement métabolisé en acide formique ; ce dernier peut être excrété par voie rénale sous la forme de sels solubles, ou transformé en dioxyde de carbone. Le formaldéhyde peut également réagir avec différents nucléophiles présents au niveau cellulaire, tels que les bases de l'ADN, et former différents adduits (N⁶-hydroxyméthyladénosine, N⁶-hydroxyméthylguanosine) (18). Les pontages ADN-protéines sont parmi les principaux dommages à l'ADN induits par le formaldéhyde, et constituent un marqueur d'exposition à ce toxique (14). Ces pontages se forment par réaction du formaldéhyde avec la fonction amine ou imine d'un acide aminé ou d'une base nucléique, pour former une base de Schiff ; celle-ci peut alors réagir avec un 2^e groupement aminé pour former un pontage (Figure 5) (9).

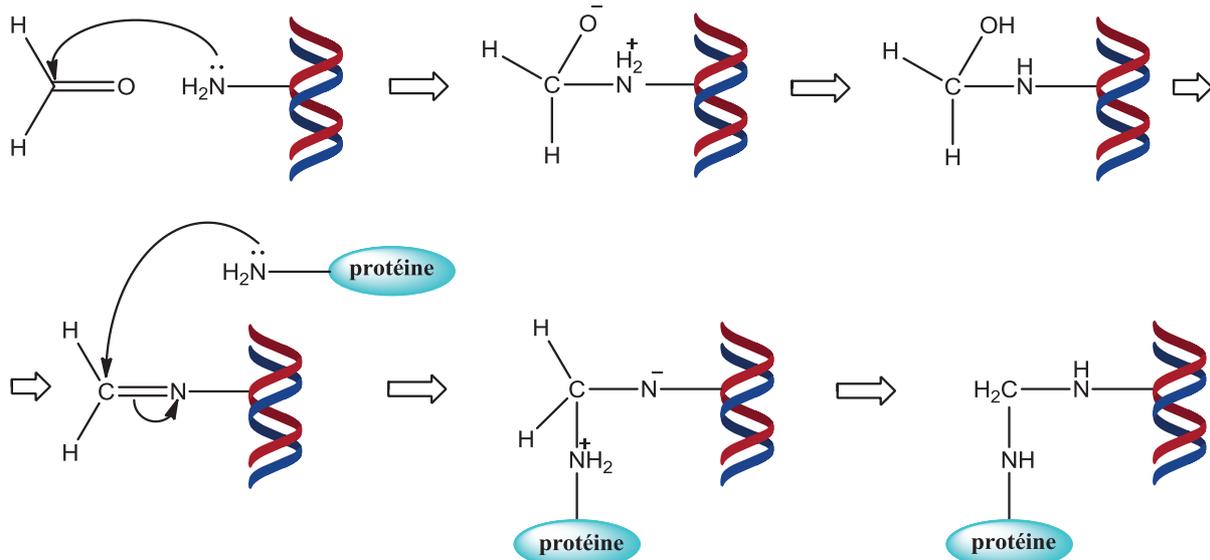


Figure 5 : Mécanisme de formation des pontages ADN-protéines induits par le formaldéhyde (9,19).

En 2003, Shaham *et al* ont mesuré le taux de pontages ADN-protéines chez des travailleurs exposés au formaldéhyde, au niveau des lymphocytes du sang périphérique. Cette étude a été réalisée sur 399 travailleurs dans 14 hôpitaux, rassemblés en 2 groupes : un groupe d'individus exposés dans des services de pathologie (médecins, assistants de laboratoire, techniciens) et un groupe contrôle, composé d'individus non exposés travaillant dans des services administratifs. Le taux de pontages est significativement plus élevé chez les travailleurs exposés que dans le groupe contrôle (Figure 6). Les auteurs de cette étude ont également évoqué la possible relation entre pontages ADN-protéines et mutations du gène *TP53*, ces 2 aspects étant apparemment impliqués dans l'effet cancérigène du formaldéhyde. (20)

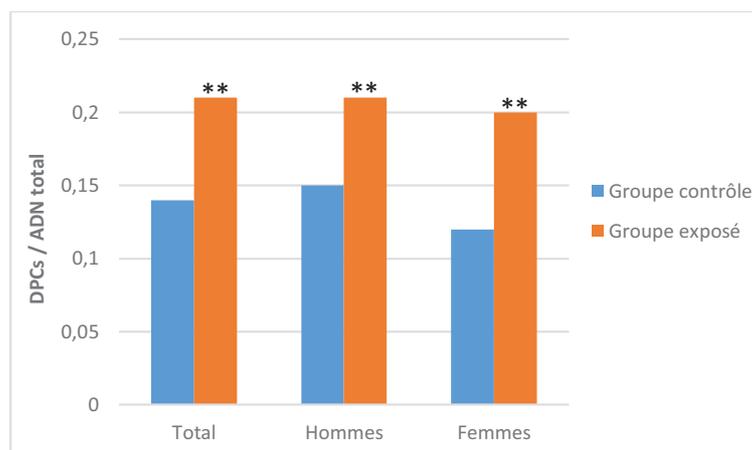


Figure 6 : Taux de pontages ADN-protéines dans les lymphocytes du sang périphérique, étude réalisée chez l'humain ; comparaison groupe exposé et non exposé. ** $p < 0.01$ (20). Les DPCs sont détectés par précipitation par SDS/K⁺. La fraction d'ADN précipitée reflète la fraction d'ADN ponté. Le taux de pontage est exprimé par le ratio entre la quantité d'ADN précipité et la quantité d'ADN totale dans les échantillons biologiques.

▪ **La 5-aza-cytidine**

La 5-aza-cytidine (5-aza-C) est un analogue de la cytosine utilisé comme antinéoplasique. Ce composé est un agent hypométhylant de l'ADN. Après phosphorylation en triphosphate, la 5-aza-C est incorporée dans l'ADN et l'ARN (21). Ceci conduit à une inhibition de la DNA methyltransferase (DNMT), enzyme responsable de la méthylation post-répliquative de l'ADN, en particulier au niveau de la cytosine. La méthylation de l'ADN joue un rôle dans la régulation de l'expression des gènes, et peut-être perturbée lors de certains processus de cancérisation. Il a notamment été démontré que l'hyperméthylation de l'ADN pouvait être associée à la répression ou à l'inactivation de certains gènes suppresseurs de tumeurs (22). Le mécanisme de l'inhibition de la DNMT semble provenir de la formation de pontages covalents entre un site nucléophile de l'enzyme et la 5-aza-cytidine intégrée dans l'ADN. Une étude réalisée par Santi *et al.* (23) a permis de mettre en évidence des pontages avec la méthylase bactérienne Hpa II. Le mécanisme général de la méthylation de la cytosine non modifiée par la DNMT est résumé dans la Figure 7-A. La première étape est une addition d'un groupement nucléophile du site catalytique de la DNMT au niveau de la position C6 de la cytosine. Ceci permet d'activer le carbone C5, qui subit ensuite l'addition électrophile d'un groupement méthyle. L'enzyme est ensuite libérée par une β -élimination, conduisant à la cytosine substituée en C5. Dans le cas de l'incorporation de la 5-aza-cytidine (Figure 7-B), le carbone C6 est également disponible pour l'addition nucléophile de l'enzyme, pour former un adduit covalent et stable, ce qui interrompt le processus enzymatique. (23)

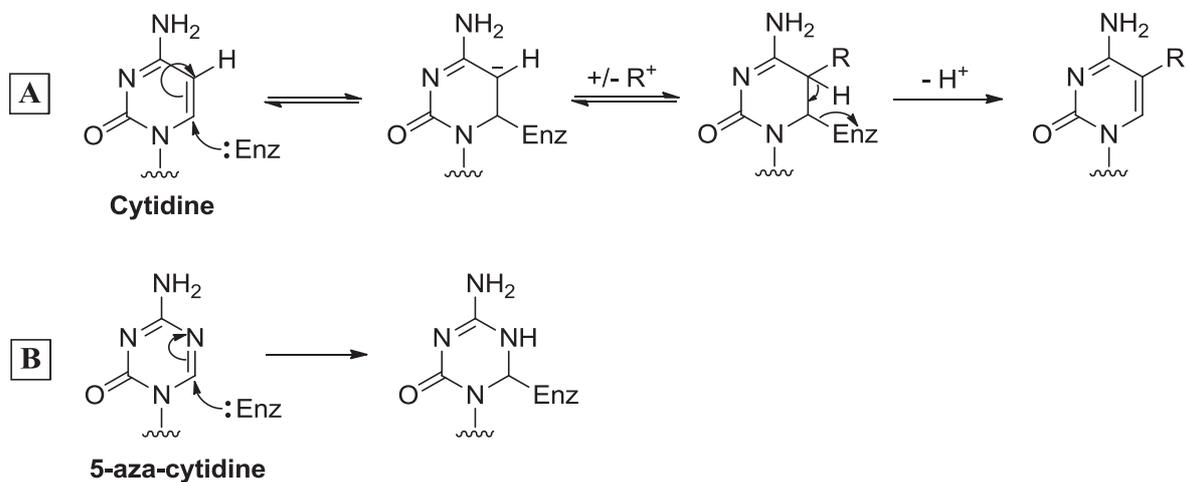


Figure 7 : Mécanisme de formation des pontages ADN-protéines induits par la 5-aza-cytidine proposé par Santi *et al.* (23)
 A : Réaction de la DNA-méthyltransferase avec la cytosine. B : Réaction avec la 5-aza-cytidine.

1.1.2.2 Les pontages directs induits par les radiations ionisantes (et les ERO)

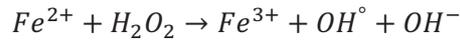
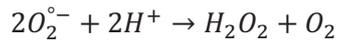
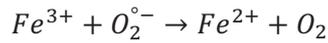
Les radiations ionisantes peuvent interagir directement avec la molécule cible, l'ADN ou les protéines associées, provoquer l'ionisation et la formation de radicaux. Elles peuvent également exercer un effet indirect, par l'ionisation des molécules d'eau environnantes conduisant ainsi à des espèces réactives de l'oxygène, dont le radical hydroxyle °OH, hautement réactif. Ces ERO peuvent alors réagir avec l'ADN ou les protéines. Les radiations ionisantes peuvent être à l'origine de nombreux types de dommages : cassures simple ou double-brins, dommages ou pertes de base, pontages ADN-ADN et pontages ADN-protéines. Ces derniers occupent une place importante car d'après les données présentes dans la littérature, le taux de pontages ADN-protéines induits par les radiations ionisantes est plus élevé que celui des cassures double-brins (~150 DPCs/cellule/gray et ~20 à 40 cassures double-brins/cellule/gray) (9). Par ailleurs, il a été démontré que la formation des pontages ADN-protéines suite à l'exposition aux radiations ionisantes est plus favorable en conditions hypoxiques (24).

1.1.2.3 Les pontages par coordination avec les métaux

Nous présenterons ici l'exemple de 3 agents inducteurs de pontages par coordination avec un atome métallique : les dérivés du nickel et du chrome, puis le cis-platine.

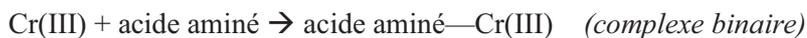
- **Le nickel** (9,25)

Le nickel et ses dérivés sont classés parmi les substances cancérogènes de classe 1 du CIRC. Les principales sources d'exposition anthropiques sont liées à la métallurgie, à la sidérurgie, à l'incinération des déchets ou encore à la combustion du charbon ou du fuel (26). L'exposition chronique au nickel est un facteur de risque du cancer du poumon. La génotoxicité du nickel est partiellement expliquée par sa capacité à interagir avec les protéines de la chromatine. Les ions Ni²⁺ présentent une très forte affinité pour les acides aminés, en particulier l'histidine et la cystéine. Le nickel, sous différentes formes (NiCl, NiSO₄, Ni₃S₂), a été étudié pour sa capacité à induire des pontages ADN-protéines. Dans une étude réalisée sur des lymphocytes extraits de rats (25), il a été démontré que l'exposition au nickel sous la forme de disulfure de trinickel Ni₃S₂ augmentait significativement le taux de pontages ADN-protéines. Cet effet est inhibé par la présence de « scavengers » de H₂O₂ (catalase, diméthylthiourée) et du radical hydroxyle (mannitol ou vitamine C), suggérant ainsi l'existence d'un mécanisme oxydatif et le rôle des espèces réactives de l'oxygène dans la formation de ces pontages. La déféroxamine, un agent chélateur des ions Fe³⁺, inhibe également la formation des pontages induits par Ni²⁺. Un mécanisme reposant sur la réaction de Fenton/Haber-Weiss est donc envisagé (27) :



▪ **Le chrome**

Les principales sources d'émission de chrome sont l'industrie chimique, la combustion de gaz naturel, d'huile et de charbon (28). Le chrome hexavalent est un agent cancérigène reconnu (classe 1 du CIRC). De nombreuses études ont démontré ses propriétés mutagène et clastogène. A l'inverse, le chrome trivalent est supposé moins toxique de par son incapacité à franchir la membrane plasmique. Les chromates représentent l'une des formes majoritaires du Cr(VI). Grâce à son analogie structurale avec les sulfates et phosphates, le chromate quant à lui traverse aisément les membranes plasmiques pour s'accumuler au niveau intracellulaire. Le chrome hexavalent en tant que tel ne constitue pas la forme réactive vis-à-vis de l'ADN. Celui-ci est réduit en chrome trivalent, responsable des dommages à l'ADN. Cette étape implique différents agents réducteurs de faible poids moléculaire présents au niveau intracellulaire, tels que l'ascorbate, le glutathion ou la cystéine. Le Cr(III) peut alors conduire à la formation de complexes ternaires stables avec l'ADN et certains acides aminés ligands, préférentiellement la cystéine et l'histidine. Ces pontages ADN-protéines impliquent des liaisons de coordination et peuvent être stabilisés par des liaisons hydrogène. Le mécanisme de formation de ces adduits nécessite au préalable la formation d'un complexe binaire entre le chrome et l'acide aminé ligand. Ce complexe binaire interagit dans un second temps avec l'ADN pour former un pontage ADN-protéine (cf. mécanisme ci-dessous). (17)



D'après une étude de Zhitkovitch et *al.*, ces adduits se forment par réaction avec les groupements phosphate de l'ADN et peuvent donc impliquer indifféremment les 4 bases nucléiques. (17)

Les pontages ADN-protéines induits par le chrome peuvent également se former par un mécanisme oxydatif. En effet l'étape de réduction intracellulaire du Cr(VI) en Cr(III) génère des dérivés possédant des états de valence intermédiaires, tels que le Cr(IV) et le Cr(V). Ces derniers, par réaction avec l'oxygène moléculaire, peuvent conduire à la formation d'espèces réactives de l'oxygène. De plus Cr(III) est capable de réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour former le radical hydroxyle OH° hautement réactif. Les ERO ainsi produites participent, au moins partiellement, à la formation des pontages ADN-protéines induits par le chrome. La structure des adduits formés par ce mécanisme oxydatif implique préférentiellement des pontages covalents. (29)

▪ **Le cis-platine**

Le cis-diamminedichloroplatinum(II) (cis-platine ou cis-Pt) a été très utilisé en chimiothérapie au cours des 30 dernières années. Le mécanisme impliqué dans sa cytotoxicité a été largement étudié. Lorsque le complexe du cis-Pt parvient dans le milieu intracellulaire, ses ions Cl⁻ sont substitués par des molécules d'eau pour former des espèces monoqua et diaqua chargées positivement. A pH physiologique, ces espèces cationiques réagissent avec les sites nucléophiles de l'ADN, de l'ARN et des protéines (30). Les lésions ainsi formées sont majoritairement des pontages intra-brins impliquant 2 purines adjacentes, et plus rarement 2 purines séparées par une 3^e base (16). Parmi les autres lésions induites par le cis-Pt, on retrouve également les pontages inter-brins, les adduits monofonctionnels, et les complexes ternaires ADN-platine-protéine. Ces derniers semblent participer à la cytotoxicité du cis-Pt (31).

Une étude récente a permis d'étudier le mécanisme de formation des complexes ternaires impliquant l'histone H1 (16). Il a été démontré que ces complexes pouvaient se former soit à partir d'adduits monofonctionnels ADN-platine, soit à partir de pontages intrabrins. D'après les travaux de Chvalova *et al.* les pontages inter-brins sont plus stables et se transforment moins favorablement en complexes ADN-platine-protéines. Ceci a été expliqué par la distorsion de la double hélice qu'ils induisent, ce qui réduit les probabilités de liaison des protéines susceptibles d'être pontées.

1.1.3 Méthodes d'études des pontages ADN-protéines

L'étude des mécanismes de formation et des conséquences biologiques des pontages ADN-protéines nécessite de disposer de méthodologies permettant de les détecter et de les quantifier, afin de suivre la formation et/ou la disparition de ces lésions dans l'ADN (8,10). Deux problématiques sont à considérer lors du développement de ces méthodes de détection (10) :

- Celles-ci doivent permettre de séparer la faible fraction de protéines pontées des protéines libres présentes en large excès.
- Une détection spécifique des pontages ADN-protéines parmi les autres lésions de l'ADN est requise. En effet, comme nous l'avons vu précédemment les agents inducteurs de pontages provoquent généralement la formation d'autres dommages dans des proportions importantes.

Les premières méthodologies mises en place reposent sur une détection indirecte des pontages : elles consistent à mesurer une modification des propriétés physico-chimiques de l'ADN ponté. Plus récemment, les techniques employées permettent de détecter directement la protéine impliquée dans le pontage.

1.1.3.1 Les méthodes indirectes

- **L'éluion alcaline**

Cette technique a été développée dans le but d'étudier les cassures simple-brin. Kohn et Ewig ont observé que la présence de ces cassures augmentait la vitesse d'éluion de l'ADN à travers un filtre, en conditions alcalines (32). La méthodologie a ensuite été appliquée à l'étude d'autres dommages, dont les pontages ADN-protéines. En effet, il existe également une différence de vitesse d'éluion entre l'ADN libre et l'ADN ponté. Les protéines liées à l'ADN sont adsorbées sur le filtre, ce qui augmente la rétention de l'ADN et modifie sa cinétique d'éluion (10). Le déroulement de cette technique peut être résumé en 2 étapes (33):

- 1) Les cellules sont déposées sur un filtre de polychlorure de vinyle puis lysées par une solution détergente (NaCl/EDTA/Sarkosyl) à pH=10.
- 2) L'ADN est élué à travers le filtre par une solution de tétrapropylammonium + EDTA à pH=12.

Dans les travaux de Kohn et Ewig (33), cette expérience est réalisée avec de fortes doses d'irradiation (rayons X) afin de fragmenter l'ADN, ce qui facilite l'éluion de l'ADN libre et permet d'augmenter la différence de vitesse d'éluion avec l'ADN ponté.

L'éluion alcaline est une méthode de détection sensible, mais celle-ci présente un certain nombre d'inconvénients. Le temps d'analyse par échantillon est relativement long (plusieurs heures). De plus les conditions de lyse utilisées ne permettent pas de dissocier les protéines liées de façon non covalente, et la reproductibilité de cette technique varie en fonction de la conformation de la chromatine. (34)

- **La méthode du « filter-binding »**

Le principe de cette technique est similaire à celui de l'éluion alcaline. Les cellules sont lysées, puis filtrées à l'aide d'un filtre de nitrocellulose qui retient les protéines libres, les protéines liées à l'ADN mais pas l'ADN libre. La quantité d'ADN retenue sur le filtre reflète le taux de pontages ADN-protéines. (10,35,36)

- **La précipitation par SDS/K⁺**

Le dodécyl sulfate de sodium (SDS) est un détergent anionique qui possède la capacité de se lier aux protéines mais pas à l'ADN. L'addition de K⁺ sur le SDS conduit à la formation d'un précipité insoluble que l'on peut isoler par centrifugation. Les cellules sont lysées par le SDS, qui se lie aux protéines libres et aux protéines liées à l'ADN. Il est donc nécessaire d'utiliser des conditions permettant de dissocier les complexes ADN-protéines non covalents. L'addition de chlorure de potassium permet de précipiter

sélectivement l'ADN impliqué dans des pontages ADN-protéines. L'ADN libre reste dans le surnageant. Les résultats sont exprimés par le coefficient de pontages ADN-protéines qui correspond au ratio entre le pourcentage d'ADN précipité par le SDS dans les cellules traitées et celui mesuré dans les cellules contrôles (34). A noter que dans certaines études, le taux de pontage est exprimé directement par le ratio entre la quantité d'ADN précipité et la quantité d'ADN totale dans les échantillons cellulaires (20). La détection peut s'effectuer par spectroscopie de fluorescence avec marquage de l'ADN par un fluorochrome tel que le Hoechst 33258, ou par radioactivité en utilisant de l'ADN tritié (incorporation de [³H]Thymidine ajoutée dans le milieu de culture) (34).

La précipitation par SDS/K⁺ a tout d'abord été utilisée pour isoler les complexes ADN-topoisomérase (37). En 1992 Zhitkovich et Costa ont décrit une adaptation de cette technique permettant d'améliorer la sensibilité et la reproductibilité pour la détection des pontages ADN-protéines (34). La reproductibilité est effectivement un paramètre critique puisque la taille des fragments d'ADN influence la précipitation. Une étude *in vivo* a ainsi pu être réalisée et a permis de mettre en évidence des pontages ADN-protéines dans des leucocytes isolés de rats et de souris exposés au chromate de potassium.

- **La méthode des comètes**

La méthode des comètes ou single-cell gel electrophoresis (SCGE) est largement utilisée en génotoxicologie pour la détection de différentes lésions de l'ADN, principalement les cassures simple-brin et double-brins, ainsi que les sites alcali-labiles. Cette technique est basée sur l'électrophorèse de nucléoïdes isolés immobilisés dans un gel d'agarose. Sous l'effet du champ électrique, l'ADN endommagé se déroule et migre plus rapidement que l'ADN intègre formant un "halo" d'ADN qui s'étire en direction de l'anode formant la queue de la comète (38). L'ADN est révélé par fluorescence suite à l'addition d'un intercalant tel que le bromure d'éthidium. Les pontages ADN-protéines peuvent également être étudiés par la méthode des comètes puisqu'il est admis qu'ils retardent la migration des fragments d'ADN. Ces dommages peuvent donc être visualisés par une diminution du pourcentage d'ADN présent dans la queue de la comète. La version alcaline du test des comètes est la plus couramment employée; l'électrophorèse est réalisée à pH=13.

Merk *et al* ont étudié l'effet de différents agents inducteurs de pontage, notamment le formaldéhyde, sur la migration de l'ADN observée lors du test des comètes sur des cellules V79 après traitement par rayonnement γ (39). L'ajout de formaldéhyde diminue de façon significative la migration induite par l'irradiation. Cet effet est clairement dépendant de la dose de formaldéhyde (Figure 8-A). L'incubation avec la protéinase K avant l'électrophorèse permet de « restaurer » la migration de l'ADN induite et donc de s'affranchir de l'effet inhibiteur du formaldéhyde (Figure 8-B). Cette dernière observation permet de s'assurer de la présence de pontages ADN-protéines.

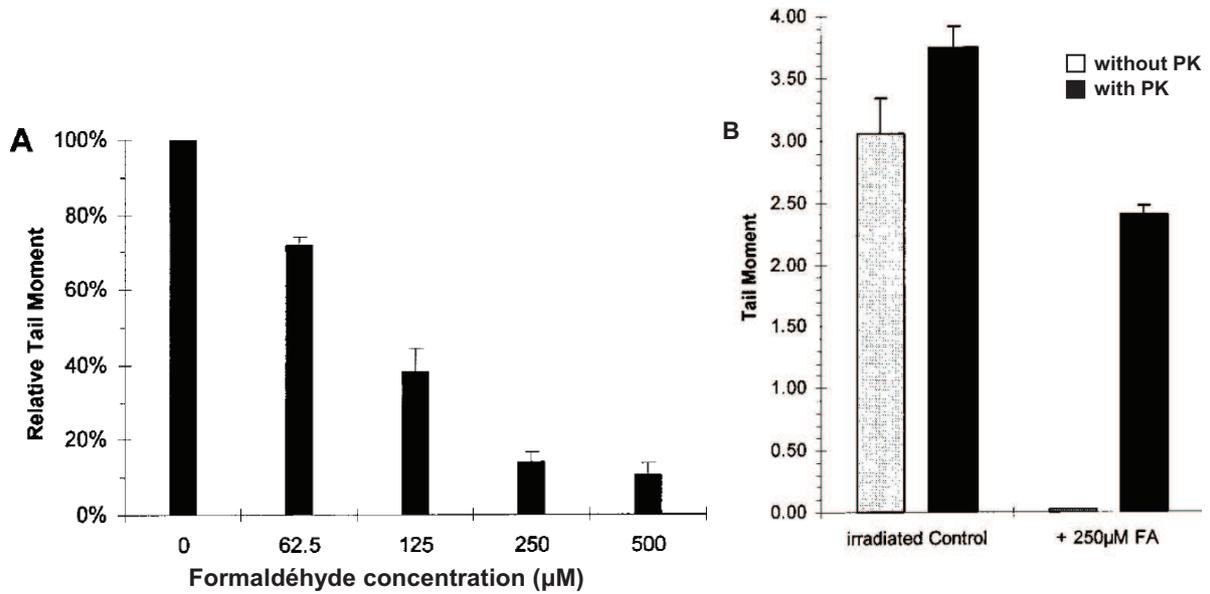


Figure 8 : Effet du traitement des cellules V79 par le formaldéhyde sur la migration de l'ADN lors du test des comètes (39). A : Evolution du tail moment en fonction de la dose de formaldéhyde. B : Effet de l'incubation avec la protéinase K (PK). Les résultats sont exprimés grâce au « tail moment », qui correspond au produit de la longueur de la queue comète par le pourcentage d'ADN dans la queue.

Les résultats obtenus avec le formaldéhyde permettent donc de confirmer l'intérêt du test des comètes dans l'étude des pontages ADN-protéines. Cependant d'autres données présentes dans la littérature suggèrent que la version alcaline n'est pas toujours la plus adaptée pour la détection de ces dommages. En 2000 l'équipe de Merk a étudié l'effet d'un autre agent inducteur de pontages, le chromate de potassium (K_2CrO_4) (40). A l'inverse du formaldéhyde, le chromate ne réduit pas la migration de l'ADN et a plutôt tendance à l'augmenter. Les pontages ADN-protéines induits par le chromate sont donc difficilement détectables par la version alcaline de la méthode des comètes.

Il est important de noter que la migration observée est la résultante d'effets inducteurs et inhibiteurs des différentes lésions présentes, ce qui rend l'interprétation délicate. Généralement les agents inducteurs de pontages sont également responsables de l'apparition d'autres dommages qui peuvent de ce fait influencer sur la migration. Les différents types de pontages ADN-protéines n'ont d'ailleurs vraisemblablement pas tous le même effet sur la migration de l'ADN.

L'équipe de Merk a optimisé une autre variante du test des comètes, en conditions neutres ; l'étape d'électrophorèse s'effectue à pH=9. Cette variante est moins utilisée que la méthode alcaline, car elle ne permet pas la détection des cassures simples-brin et des sites alcali-labiles. Elle peut néanmoins représenter une alternative intéressante pour la détection des pontages ADN-protéines : une nette réduction de la migration induite par le rayonnement γ a été observée pour de fortes doses de chromate. (40)

Ainsi le test des comètes fait partie des méthodologies applicables à la détection des pontages ADN-protéines. En fonction du type d'agent inducteur étudié, des étapes d'optimisation peuvent être requises, en particulier au niveau des conditions d'électrophorèse.

Les méthodes de détection indirecte précédemment décrites ont permis de progresser dans la compréhension du mécanisme de formation des pontages ADN-protéines. Elles présentent cependant l'inconvénient d'être peu spécifiques de ces lésions, puisque d'autres événements peuvent probablement conduire à un même changement des propriétés physico-chimiques de la molécule d'ADN, à l'origine de « faux-positifs ». D'autre part, elles nécessitent généralement des quantités relativement importantes de matériel biologique.

1.1.3.2 Les méthodes directes

Ces méthodes permettent de détecter les protéines liées à l'ADN, par fluorimétrie ou chimiluminescence, ou bien par radioactivité.

- **Le marquage au FITC**

Le principe est de marquer les protéines pontées à l'ADN par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) puis de les quantifier soit directement par fluorimétrie, soit par Western Blot (10). A partir de cellules traitées par un agent inducteur de pontages, l'ADN génomique est purifié par centrifugation en gradient de densité avec du chlorure de césium, afin d'éliminer complètement les protéines libres. Les protéines pontées à l'ADN sont marquées sélectivement par l'isothiocyanate de fluorescéine : ce composé réagit avec les amines primaires des protéines et non avec les amines aromatiques des bases de l'ADN. Le FITC en excès est éliminé par précipitation de l'ADN par l'éthanol. L'ADN total est dosé par spectrophotométrie UV. L'étape de quantification comporte 2 variantes :

- la quantification directe par fluorimétrie : les pontages sont quantifiés par mesure de la fluorescence à 520 nm.
- la quantification par Western Blot : l'ADN est fixé sur une membrane de nitrocellulose par Slot-Blot. Une première étape d'incubation est réalisée avec un anticorps anti-FITC, puis une seconde avec un anticorps secondaire conjugué avec la horseradish peroxydase (HRP). Les pontages sont ensuite quantifiés par chimiluminescence. Cette variante présente l'avantage de nécessiter 10 fois moins d'ADN que pour la détection par fluorimétrie.

Le marquage par le FITC peut également être utilisé pour visualiser les pontages ADN-protéines par électrophorèse sur gel d'agarose (41).

- **Le post-marquage par l'iode 125**

Cette méthode est basée sur l'incorporation d'iode radioactif sur les résidus tyrosine des peptides liés à l'ADN. Le marquage est réalisé sur 50 µg d'ADN extrait. Les échantillons sont mis en présence de 10 mCi de iodure de potassium marqué à l'iode 125. La réaction s'effectue avec un oxydant, la chloramine

T ; l'iode s'additionne en position ortho du phénol (Figure 9). L'iode en excès est réduit par addition de β -mercaptoéthanol. La radioactivité est mesurée au compteur gamma. En parallèle l'absorbance à 260/280 nm est également relevée afin de pouvoir exprimer les résultats en cpm/ μ g d'ADN. (42)

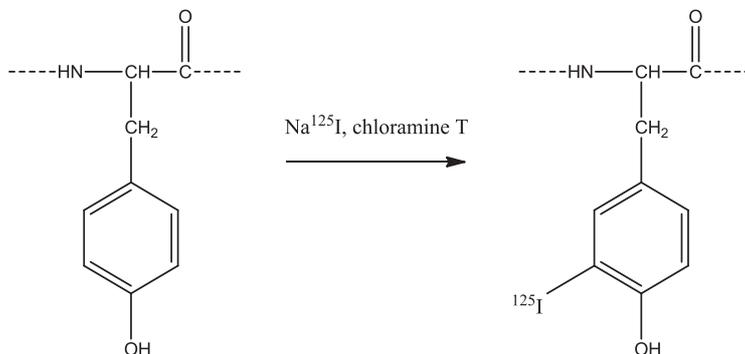


Figure 9 : Marquage des résidus tyrosine par l'iode 125.

▪ **« RADAR » : Rapid Approach to DNA Adduct Recovery**

Dans cette technique développée récemment par Kiianitsa *et al.* (43), les pontages ADN-protéines sont au préalable séparés des protéines libres, puis quantifiés par immunodétection (Figure 10). Le principe est proche de celui du test au FITC, mais la détection est spécifique pour une protéine déterminée.

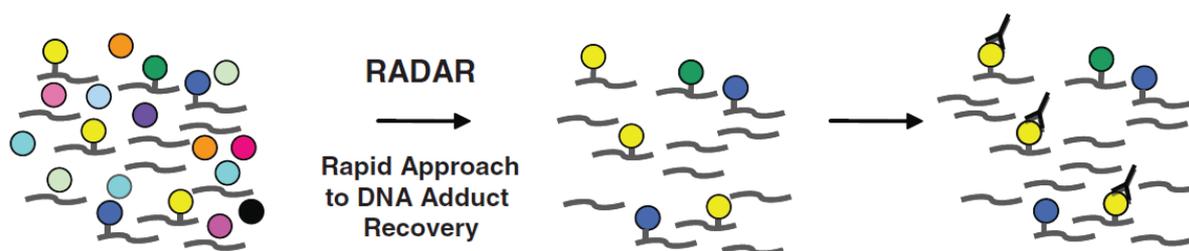


Figure 10 : Principe du test « RADAR » (43).

Le déroulement du test « RADAR » est résumé dans la Figure 11. Les cellules en culture sont incubées avec l'agent inducteur de pontage, puis lysées par l'association de sels chaotropiques et de détergents. Les acides nucléiques et les pontages ADN-protéines sont isolés par précipitation à l'éthanol, puis transférés sur une membrane de nitrocellulose par Slot-Blot. Ces conditions permettent de préserver les épitopes impliqués dans l'immunodétection. La membrane est incubée avec un anticorps primaire, spécifique de la protéine étudiée. Une seconde étape d'incubation est réalisée avec un anticorps secondaire conjugué avec la HRP. La détection s'effectue par chimiluminescence. En parallèle l'ADN est quantifié par fluorescence en présence de Picogreen®, afin de normaliser les résultats obtenus.

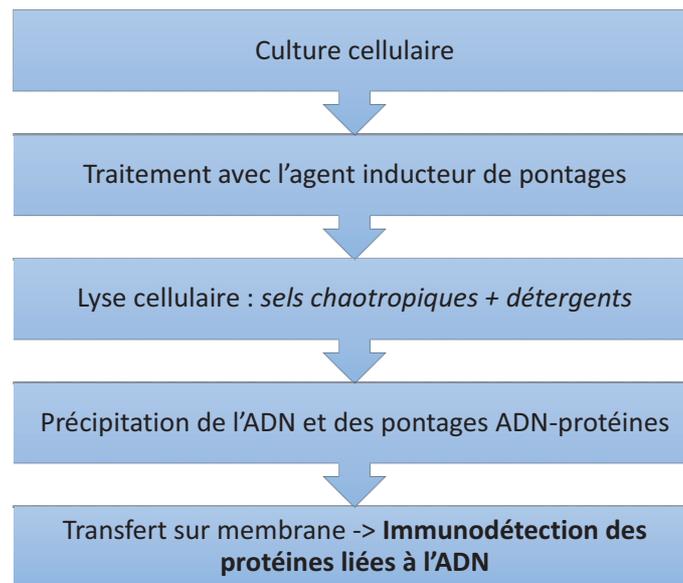


Figure 11 : Quantification des pontages ADN-protéines par le test "RADAR" : grandes étapes (43).

Cette méthodologie a été utilisée pour quantifier les pontages avec les topoisomérases 1 et 2 induits par différents antinéoplasiques (camptothécine, topotécan et étoposide) ainsi que les pontages avec les DNA-méthyltransférases provoqués par la 5-aza-C.

Le test « RADAR » est sensible et nécessite peu de matériel biologique. Il est associé à un rendement d'analyses élevé, et permet d'éviter d'avoir recours à l'ultracentrifugation. Cependant le panel des adduits détectables par cette technique se limite à ceux impliquant des protéines dont les anticorps sont actuellement disponibles.

La détection des pontages ADN-protéines par voie directe est donc plus spécifique que par voie indirecte. Cependant les 3 méthodes décrites n'ont été développées que pour un nombre limité d'agents de pontage. La technique « RADAR » permet de détecter un type de pontage impliquant une protéine déterminée, à condition de disposer de l'anticorps correspondant.

Les méthodes de détection décrites dans la littérature, qu'elles soient directes ou indirectes, sont indispensables pour suivre les taux de pontages en fonction de l'exposition à différents agents inducteurs. Toutefois, elles ne fournissent pas d'information sur la structure chimique du pontage. L'émergence de la protéomique a considérablement facilité l'étude de ces lésions, permettant ainsi l'identification et la quantification de protéines spécifiques liées à l'ADN (41). L'étude de la structure chimique des pontages ADN-protéines repose sur l'identification de l'acide aminé et de la base impliquée dans le pontage, et la caractérisation de la liaison covalente. Dans cet objectif, la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse constitue une technique de choix. Dizdaroglu *et al.* ont utilisé la GC-MS pour mettre en évidence des adduits thymine-tyrosine (44) et thymine-lysine

(45) dans des nucléohistones (cf. paragraphe 1.2.1). Plus récemment, les pontages entre guanine et lysine dans un oligonucléotide ont été caractérisés par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem (cf. paragraphe 1.2.4.2) (46).

1.1.4 Conséquences biologiques

L'étude de l'impact des pontages ADN-protéines au niveau de la cellule est complexe, puisqu'il n'existe pour le moment pas d'agent connu pour induire spécifiquement et exclusivement ce type de lésions. En effet tous les agents connus pour induire des pontages provoquent également d'autres dommages à l'ADN, et il est difficile d'identifier quelle lésion en particulier est responsable de l'effet observé. (9)

Les pontages ADN-protéines peuvent interrompre certains processus métaboliques tels que la réplication, la transcription, la réparation et la recombinaison de l'ADN ainsi que le remodelage de la chromatine. Ces lésions sont volumineuses, et créent une distorsion de la double hélice. Elles peuvent de ce fait bloquer la progression des complexes de réplication et de transcription et diminuer l'accessibilité pour les protéines fonctionnelles, notamment les enzymes de réparation. (9)

1.1.4.1 Effets sur la réplication de l'ADN (8)

Au niveau de la fourche de réplication, une hélicase permet de dérouler le duplex d'ADN. Celle-ci est un hexamère se présentant sous la forme d'un anneau de 2 à 4 nm de diamètre. Chez les procaryotes, l'hélicase progresse dans la direction 5' vers 3' sur le brin retardé. Ensuite la polymérase III assure la synthèse des deux brins. Chez les eucaryotes, l'hélicase exerce son activité de 3' vers 5' sur le brin précoce. La synthèse est effectuée par la polymérase ϵ pour le brin précoce et la polymérase δ pour le brin tardif.

Les pontages ADN-protéines peuvent affecter ce processus à 2 niveaux :

- blocage de l'hélicase : Barker *et al* ont suggéré que si la protéine liée à l'ADN est très volumineuse et que le pontage est présent sur le brin où progresse l'hélicase, cela pourrait entraver la progression de cette dernière (9).

- blocage de la polymérase : l'inhibition de la polymérisation a été rapportée dans plusieurs études, notamment pour des pontages réalisés avec le cis-platine impliquant un oligonucléotide 44-mer et l'histone H1. Dans ce modèle la polymérisation par la transcriptase inverse RT VIH-1 est totalement inhibée, et la synthèse translésionnelle n'a pas lieu (16). Ce mécanisme intervient probablement dans la cytotoxicité du cis-platine.

Ainsi, certains pontages ADN-protéines peuvent, de par leur encombrement stérique, impacter la réplication de l'ADN par inhibition des polymérases, ou par blocage de l'hélicase, selon la position de ces lésions sur l'un ou l'autre des brins.

1.1.4.2 Effets sur la transcription (8)

L'ARN polymérase déroule le duplex au niveau du site d'entrée de l'ADN dans le complexe enzymatique. Le brin modèle est adressé au site actif de l'enzyme. Le second brin passe par un canal localisé près de la surface de la polymérase. Les 2 brins se rejoignent au niveau du site de sortie de l'enzyme.

Les lésions encombrantes, telles que les dimères de pyrimidine ou les adduits du cis-platine, peuvent bloquer la progression de l'ARN polymérase. Lorsqu'elles sont présentes sur le brin modèle, elles peuvent être prises en charge par un système de réparation couplé à la transcription. Les lésions présentes sur le brin non modèle bloquent rarement la polymérase.

D'après Ide *et al.*, il est fortement probable que les pontages ADN-protéines bloquent la progression des ARN polymérases par leur encombrement stérique, même si elles se situent sur le brin non modèle (8).

1.1.4.3 Effets mutagènes

Nous considérerons ici l'exemple des mutations induites par le chrome. Comme il a été décrit dans le paragraphe 1.1.2.3, la toxicité du chrome vis-à-vis de l'ADN est due à la réduction du Cr(VI) en Cr(III) au niveau intracellulaire. Le chrome trivalent forme des complexes avec certains acides aminés ligands et l'ADN par l'intermédiaire des groupements phosphate. Voitkun *et al.* ont étudié les propriétés mutagènes des adduits impliquant le glutathion, l'histidine et la cystéine (47). Ces complexes ternaires sont associés à une fréquence de mutations plus élevée que les adduits ADN-Cr(III). Afin d'identifier le type de mutations formées, des plasmides contenant ces différents adduits ont été transfectés dans des fibroblastes humains. Après 48h ces plasmides ont été isolés et séquencés. Les mutations observées sont majoritairement des substitutions au niveau de la paire de bases G:C. Il s'agit principalement de transitions G:C → A:T et de transversions G:C → T:A.

A nouveau les propriétés mutagènes de ces adduits peuvent être attribuées à l'encombrement stérique qu'ils procurent. De telles lésions volumineuses peuvent en effet provoquer une distorsion de la double hélice et ainsi causer des mésappariements lors de la réplication de l'ADN. Cette effet semble particulièrement marqué au niveau de la paire de bases G:C, alors que la formation d'adduits n'est quant à elle, ni base-spécifique ni séquence-spécifique. Ainsi, les propriétés mutagènes du chrome hexavalent peuvent être en partie attribuées à la présence de pontages ADN-protéines.

Les pontages ADN-protéines sont donc susceptibles de perturber certains processus cellulaires essentiels. Bien que les mécanismes exacts n'aient pas été totalement élucidés, il semblerait que les effets observés au niveau cellulaires soient en grande partie liées à l'encombrement stérique que procurent ces lésions en l'absence de prise en charge par les systèmes de réparation.

1.1.5 Réparation des DPCs

1.1.5.1 Les principaux systèmes de réparation

Nos cellules sont constamment soumises à l'attaque de différents agents endogènes ou exogènes susceptibles d'endommager la molécule d'ADN, et de générer une instabilité génomique. Ces dommages peuvent porter atteinte à la structure de l'ADN et altérer certains processus cellulaires essentiels. On estime à plusieurs milliers le nombre de lésions par cellule et par jour. (48)

Afin de prévenir les effets de ces lésions, la cellule met en place une cascade d'évènements coordonnés, regroupés sous le terme de « DNA Damage Response » (DDR). Ce processus permet de détecter les altérations de la molécule d'ADN, de signaler leur présence, puis de coordonner leur réparation. La DDR peut également arrêter de façon transitoire le cycle cellulaire ou activer le phénomène d'apoptose si les dommages persistent. (48)

La réparation de l'ADN se définit comme l'ensemble des réponses cellulaires mises en place pour restaurer l'intégrité du génome suite à un dommage (49). Chez les organismes eucaryotes, les mécanismes de réparation peuvent être résumés selon 5 grands systèmes (Figure 12). Chaque système est globalement spécifique d'un certain nombre de substrats, mais il existe des recouvrements et des redondances entre les enzymes impliquées. Ainsi, la défaillance d'une enzyme d'un système peut être compensée par un second système et n'est donc pas toujours associée à des conséquences biologiques irréversibles. Entre les procaryotes et les eucaryotes, ces processus de réparation sont relativement proches au niveau fonctionnel, mais ils diffèrent par les acteurs protéiques mis en jeu. (50)

Les lésions de petite taille ne déformant pas la double hélice d'ADN, telles que bases oxydées (en particulier la 8-oxoguanine) ou alkylées, l'uracile, les sites abasiques et les cassures simples brins, sont prises en charge par le **BER**. Les lésions plus volumineuses telles que les photoproduits de type dimères de pyrimidine, les pontages intra-brins, ou certains adduits sont réparés par le système de **réparation par excision de nucléotides (NER)**. Le BER et le NER sont 2 systèmes qui fonctionnent par excision-resynthèse. Ils diffèrent par le nombre de nucléotides resynthétisés (jusqu'à 8 pour le BER et une trentaine pour le NER), et les protéines mises en jeu. En ce qui concerne les cassures double-brins, 2 systèmes peuvent intervenir : la **recombinaison homologue (HR)** et la **jonction non homologue des extrémités (NHEJ)**. Le système HR est très fiable, puisqu'il utilise une séquence d'une chromatide sœur intacte comme modèle, mais il n'entre en jeu principalement qu'aux phases S et G2 du cycle cellulaire. Le système NHEJ réalise une ligation directe des extrémités, et risque de créer des séquences erronées dans les brins néosynthétisés ; il est cependant présent à toutes les phases du cycle cellulaire. Enfin le système "**Mismatch Repair**" (**MMR**) prend en charge les mésappariements, les insertions et les délétions. (48,50)

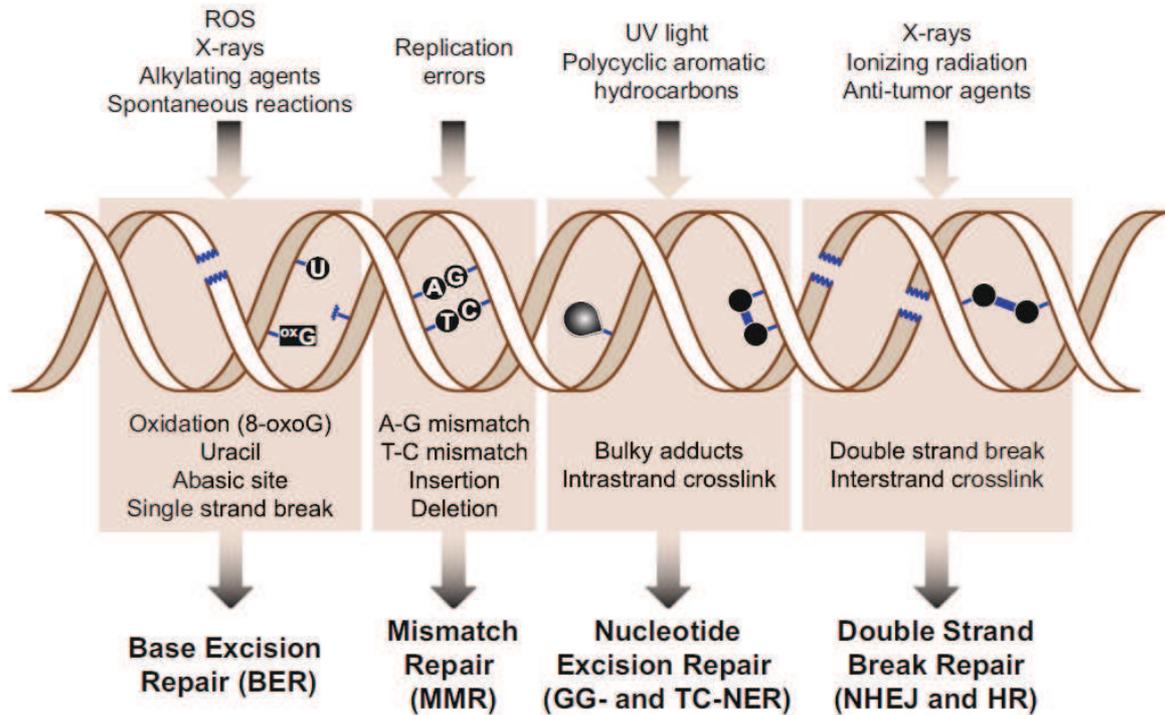


Figure 12 : Les principaux systèmes de réparation chez les organismes eucaryotes (48).

L'étude des mécanismes de réparation des pontages ADN-protéines est très complexe, de par la grande diversité structurale de ces lésions. D'après la littérature, les 2 principaux systèmes impliqués dans l'élimination de ces dommages sont le **NER** et la **recombinaison homologue** (8,41,51). La contribution du **BER** dans l'élimination des pontages ADN-protéines apparaît beaucoup plus limitée (8). Ce système est cependant susceptible d'être impliqué dans la réparation des pontages avec les polyamines, qui constituent des adduits beaucoup moins volumineux que les pontages ADN-protéines. Ces 3 systèmes seront donc étudiés plus en détails dans les paragraphes suivants.

1.1.5.2 Le BER : « Base Excision Repair »

Le BER constitue la voie de réparation des bases endommagées comportant des modifications chimiques peu volumineuses, telles que les oxydations, les alkylations et les désaminations. Ce système est également capable de réparer les sites abasiques et les cassures de brins (52). Le processus du BER se déroule en 5 grandes étapes (Figure 13) : la reconnaissance et l'excision de la base endommagée, l'élimination du site abasique, le nettoyage des extrémités, la resynthèse d'ADN puis la ligation. Le mécanisme général de cette voie de réparation sera décrit dans les cas des eucaryotes. Les différents acteurs protéiques impliqués dans ce processus, chez l'homme et chez *E. coli*, sont répertoriés dans le Tableau 1.

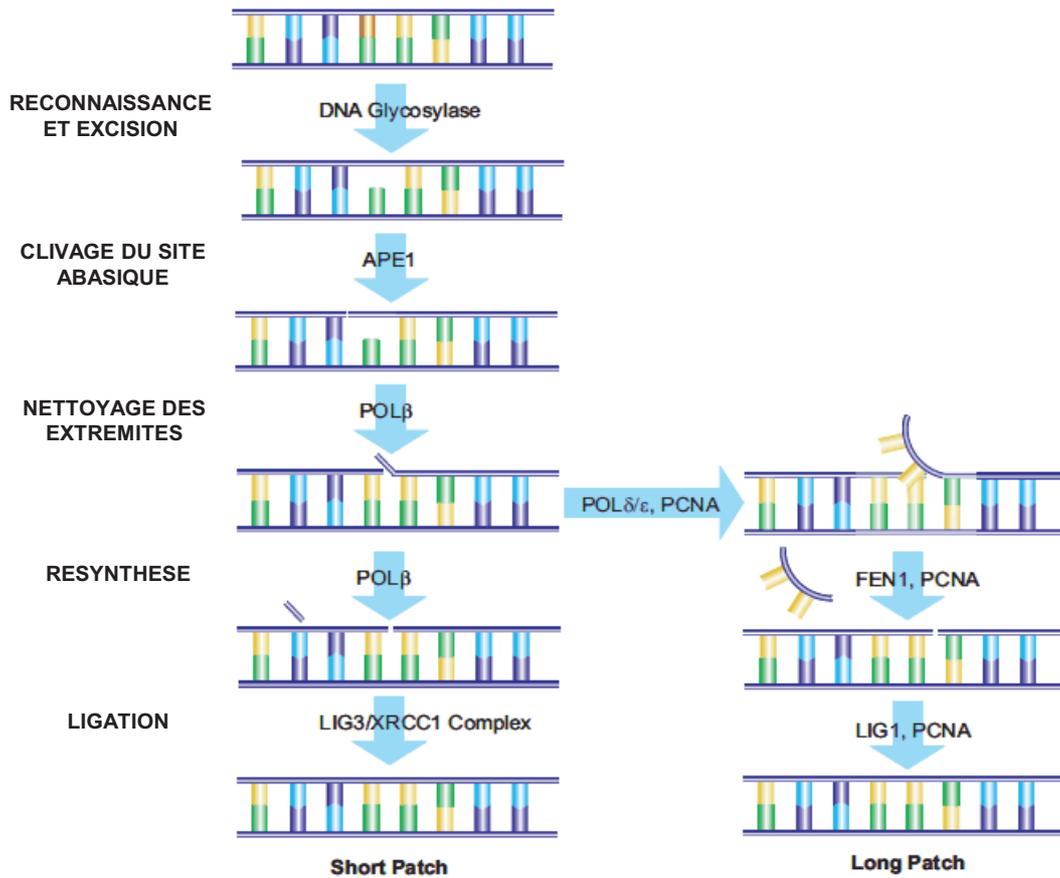


Figure 13 : Les principales étapes du processus de réparation par le BER (53). Schéma général dans le cas d'une excision faisant intervenir une glycosylase monofonctionnelle.

▪ **Reconnaissance, excision de la base endommagée et clivage du site abasique** (50,54)

La reconnaissance et l'excision de la base endommagée sont effectuées par des enzymes spécialisées, appelées *N*-glycosylases. Celles-ci catalysent l'hydrolyse de la liaison *N*-glycosidique, générant ainsi un site abasique. Ces enzymes peuvent être mono ou bifonctionnelles.

Les **glycosylases monofonctionnelles** sont responsables uniquement du clivage de la liaison *N*-glycosidique. Le site abasique créé est ensuite pris en charge par l'APE1 (« apurinic endonuclease 1 »). Cette dernière incise le brin d'ADN en 5' du site abasique, générant des extrémités 3'-OH et 5'-désoxyribose phosphate (5'-dRP).

Les **glycosylases bifonctionnelles** quant à elles présentent une activité lyase intrinsèque, elles sont donc capables de réaliser à la fois l'excision de la base, et le clivage du site abasique. Ces enzymes procèdent selon 2 mécanismes :

- *la β -élimination*, qui génère un interstice présentant en 3' un motif 2-désoxyribose oxydé sous la forme d'un aldéhyde α,β insaturé, et en 5' une extrémité portant un groupement phosphate ;
- *la β - δ -élimination*, qui produit un interstice entouré de 2 extrémités phosphorylées.

▪ **Nettoyage des extrémités** (50,54)

Le substrat préférentiel des polymérases, impliquées dans l'étape de resynthèse, est un interstice entouré par des terminaisons 3'-OH et 5'-phosphate. Suite au processus d'excision par les glycosylases, les extrémités de brins générées sont différentes, d'où la nécessité d'un « nettoyage ».

- Le résidu 5'-dRP, provenant de l'action de l'APE1 (cas des glycosylases monofonctionnelles), est clivé par la polymérase β , qui possède une activité dRP-lyase intrinsèque.
- Dans le cas d'une excision par β -élimination, l'aldéhyde insaturé est éliminé par l'APE1, ce qui régénère l'extrémité 3'-OH.
- Dans le cas d'une excision par β,δ -élimination, le phosphate en 3' est clivé par la polynucleotide kinase (PNK) qui présente une activité 3'-phosphatase.

▪ **Resynthèse – ligation**

Pour cette étape, on distingue 2 voies : une voie courte (SP-BER pour « short-patch BER ») et une voie longue (LP-BER pour « long-patch BER »).

Dans **la voie courte**, le nucléotide manquant est incorporé par la polymérase β , puis le complexe Lig 3 / XRCC1¹ effectue la ligation des extrémités par une liaison phosphodiester (50,52).

La voie longue a lieu lorsque l'activité dRP lyase de la polymérase β est inefficace. Dans ce cas, cette activité est relayée aux polymérases δ ou ϵ . L'introduction du premier nucléotide est toujours réalisée par la polymérase β . Ensuite, les protéines PCNA (« proliferating cell nuclear antigen ») se fixent sur le fragment d'ADN et, en coopération avec le facteur de chargement RF-C (« replication factor C »), induisent le retrait de la polymérase β et le recrutement des polymérases δ ou ϵ . Le complexe Pol δ/ϵ -PCNA-RF-C² procède à la synthèse de 2 à 8 nucléotides supplémentaires. Le fragment néosynthétisé envahit le brin endommagé, ce qui soulève quelques nucléotides, formant une structure appelée « flap ». Les protéines PCNA libèrent les polymérases et la flap endonucléase FEN-1 rejoint le complexe. Celle-ci clive le « flap », puis la ligase 1 effectue la ligation des extrémités. (50,54)

¹ DNA-ligase III / XRCC1

² Polymérase δ/ϵ – PCNA – RF-C

Chapitre 1 : Etude bibliographique

Tableau 1 : Les principales protéines impliquées dans les différentes étapes du BER, chez *E. coli* et chez l'homme. (52)

	<i>E. coli</i>	<i>H. sapiens</i>
DNA glycosylases		
Uracile-DNA glycosylases	Ung* Mug*	UNG* TDG* SMUG1*
Glycosylases spécifiques des bases oxydées	Nth** Fpg** Nei**	NTH1** OGG1** NEIL1** NEIL2**
Glycosylases spécifiques des bases alkylées	Tag*, AlkA*	MPG*
AP endonucléases	Xth Nfo	APE1, APE2
DNA polymérases	Pol I	Pol γ Pol δ , Pol ϵ Pol β , Pol λ
DNA ligases	LigA	Lig I et III
Autres		FEN1 XRCC1 PARP1 PCNA RFC

*glycosylase monofonctionnelle, **glycosylase bifonctionnelle

1.1.5.3 Le NER : « Nucléotide Excision Repair »

Le NER est un système de réparation très polyvalent qui fonctionne également par excision-resynthèse. Il prend en charge des lésions volumineuses déformant la double hélice (48) :

- les adduits volumineux,
- les photoproduits, tels que les dimères de pyrimidine : photoproduits 6-4 et CPD (« cyclobutane pyrimidine dimers »),
- les pontages intra-brin, notamment ceux induits par le cis-platine.

L'importance biologique du NER est révélée par l'existence de pathologies génétiques associées à des déficiences de ce système. On citera notamment *Xeroderma pigmentosum* : cette pathologie se caractérise par une hypersensibilité au rayonnement UV. Le processus de réparation par le NER peut se résumer en 5 étapes (48) (Figure 14) :

- 1) Reconnaissance du dommage
- 2) Ouverture de la double hélice
- 3) Excision d'un court fragment d'ADN simple brin
- 4) Resynthèse d'ADN
- 5) Ligation

Il existe 2 sous voies du système NER : (i) le **Global Genome NER (GG-NER)**, capable d'éliminer des lésions dans le génome entier et (ii) le **Transcription-Coupled NER (TC-NER)** qui prend en charge les dommages qui bloquent la progression de l'ARN polymérase II pendant la transcription. Ces 2 sous-voies diffèrent par le mode de reconnaissance de la lésion et les enzymes impliquées. (55)

▪ **Reconnaissance du dommage** (48,50,56)

Dans le GG-NER, la reconnaissance s'effectue grâce au complexe XPC/HR23B/CEN2³. HR23B et CEN2 sont des protéines accessoires qui augmentent spécificité de XPC et son affinité pour la lésion. L'affinité de XPC dépend du degré de distorsion de l'hélice. De ce fait, certains dommages associés à une faible déformation de l'hélice, tels que les CPDs sont plus difficilement reconnus. Dans ce cas, le complexe auxiliaire appelé « UV-damaged DNA binding » (UV-DDB) constitué des acteurs DDB1 et DDB2 (appelé aussi XPE) reconnaît au préalable le dommage, et provoque le recrutement du complexe XPC.

Dans le cas du TC-NER, le blocage de l'ARN polymérase II au niveau du site lésé constitue le signal de recrutement des protéines CSA et CSB (Cockayne Syndrome A et B) : celles-ci désactivent la RNA

³ *Xeroderma pigmentosum* complementation group C/Rad23 homolog B/Centrin-2

polymérase II, ce qui déplace le complexe impliqué dans la transcription, rendant la lésion accessible aux protéines du NER.

- **Ouverture de la double-hélice et excision** (48,50)

Les protéines recrutées lors de la reconnaissance, le complexe XPC (pour le GG-NER) ou CSA-CSB (pour le TC-NER) réalisent une ouverture partielle de la double hélice. Elles recrutent également les acteurs impliqués dans les étapes suivantes du NER, notamment le facteur de transcription multifonctionnel TFIIH. Ensuite, les hélicases XPB et XPD, 2 sous-unités de TFIIH, déroulent la double hélice sur environ 30 bases autour de la lésion. Les protéines XPA et RPA (« replication protein A ») rejoignent le complexe. XPA confirme la présence du dommage, et RPA se fixe sur le brin non endommagé pour stabiliser le complexe de pré-incision. Enfin les endonucléases XPG et XPF/ERCC1⁴ clivent l'ADN en 3' et 5', respectivement, ce qui représente une excision d'environ 30 nucléotides.

- **Resynthèse et ligation** (48,55,56)

La resynthèse du segment manquant est réalisée par les ADN polymérases δ et ϵ , en utilisant le brin non endommagé comme modèle. Les polymérases agissent avec l'aide des protéines PCNA, qui jouent le rôle de clamps glissants. La ligase 1 effectue la dernière étape de ligation afin de sceller le brin néosynthétisé, complétant ainsi le processus du NER.

- **NER chez les procaryotes : le système UvrABC** (57)

Chez les procaryotes, les principaux gènes responsables de la réparation par le NER sont *uvrA*, *uvrB* et *uvrC*. Le système « SOS response » régule l'expression des gènes *uvrA* et *uvrB*, en réponse à un agent inducteur de dommages à l'ADN. Les protéines UvrA, B et C reconnaissent et clivent les dommages par un mécanisme ATP-dépendant en plusieurs étapes : UvrA et UvrB s'associent pour former un hétérotrimère (A_2B) ou un hétérotétramère (A_2B_2), qui reconnaît le site endommagé. UvrA entre en contact avec l'ADN, et transfère ce dernier à UvrB, puis se dissocie. UvrC rejoint le complexe de préincision, et réalise les coupures en 3' et 5'. UvrC est remplacée par UvrD (hélicase II), qui libère le fragment incisé. L'ADN polymérase I resynthétise le fragment manquant, UvrB quitte alors le complexe. Enfin, l'action de la ligase achève la réparation.

⁴ *Xeroderma pigmentosum* complementation group F / excision repair cross-complementation group 1

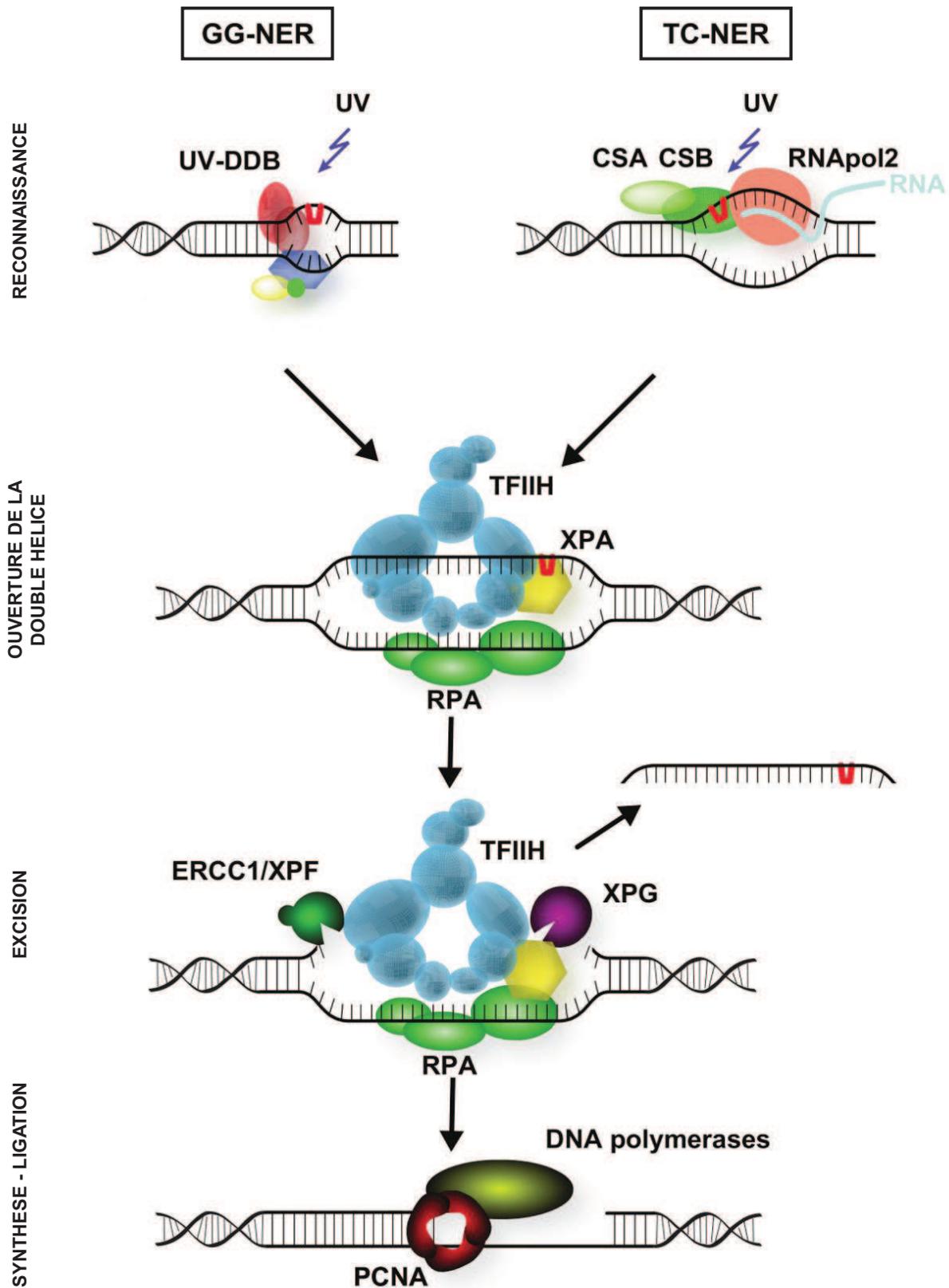


Figure 14 : Représentation schématique du processus de réparation par le NER chez les eucaryotes (58). Exemple de la prise en charge d'une lésion induite par les UV.

1.1.5.4 La recombinaison homologue (HR)

La recombinaison homologue prend en charge les cassures double-brins, les pontages inter-brins, mais également certains adduits tels que les pontages ADN-protéines. Le processus débute par une étape de résection (Figure 15). Celle-ci est initiée par le complexe trimérique MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) en association avec CtIP. Les extrémités 5' de chaque cassure sont digérées grâce à l'activité exonucléasique 5' → 3' du complexe MRN. Cette étape génère ainsi une fraction simple brin du côté 3' de la cassure sur chaque brin. La protéine RPA se fixe sur ces extrémités simple brin, afin d'éliminer les structures secondaires qui pourraient perturber les étapes suivantes de la réparation. RPA est ensuite remplacée par RAD51 qui est recrutée avec plusieurs protéines médiatrices, notamment RAD52, BRCA2 (« breast cancer type 2 ») et un ensemble d'autres facteurs appelés « RAD51 paralogs ». Les extrémités simple-brin sont alors complètement recouvertes du complexe formé par RAD51, formant un filament de nucléoprotéines. Les protéines RAD52 et RAD54 permettent de stimuler cet assemblage. Le filament RAD51 recherche une séquence d'ADN homologue, sur la chromatide sœur par exemple, qui sera utilisée comme modèle pour la synthèse. L'identification de la séquence homologue est suivie d'une invasion croisée de brin : l'un des brins lésés tronqués s'apparie avec un des brins intacts de la séquence modèle, et le second brin intact s'apparie avec le second brin tronqué. Puis la synthèse d'ADN est réalisée par la polymérase η à partir des extrémités 3' des brins lésés. L'étape de ligation est réalisée par ligase I, formant ainsi une structure intermédiaire avec les 4 brins d'ADN, appelée jonction de Holliday. Cette structure est dissociée par les enzymes « résolvases ». (48,50,59)

- **La recombinaison homologue chez les procaryotes** (60,61)

Chez les organismes procaryotes, le processus de recombinaison homologue est très proche de celui observé chez les eucaryotes. Des différences résident cependant au niveau des enzymes impliquées. L'étape de résection est réalisée par le complexe multi-enzymatique RecBCD, qui possède une double activité hélicase-exonucléase. Les extrémités 3' ainsi obtenues sont ensuite « coatées » par les protéines RecA, pour former le filament nucléoprotéique. Ces 2 étapes sont régulées par la séquence consensus χ , présente sur l'un des 2 brins endommagés. Le filament RecA recherche une séquence homologue et réalise l'invasion croisée de brins. La synthèse d'ADN à partir du duplex modèle s'effectue de façon similaire au mécanisme décrit précédemment chez les eucaryotes. La jonction de Holliday est dissociée par l'action combinée de RuvABC et RecG.

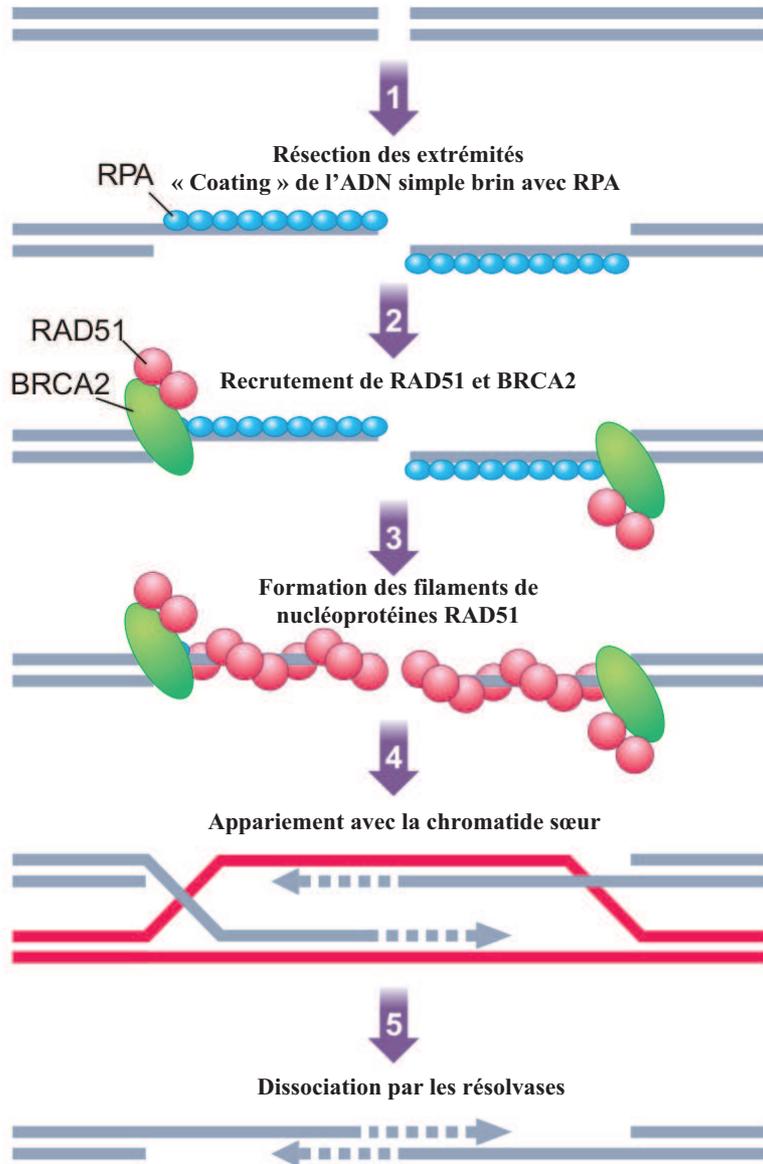


Figure 15 : Représentation schématique du processus de réparation par recombinaison homologue chez les eucaryotes (62).

1.1.5.5 Réparation des pontages ADN-protéines par le NER et la recombinaison homologue

▪ Réparation des DPCs chez les procaryotes

Les mécanismes de réparation des pontages ADN-protéines ont tout d'abord été élucidés chez les bactéries, à l'aide de différentes études génétiques. En 2009, les travaux de Salem *et al.* ont comparé l'implication des différents systèmes dans la réparation des pontages induits par le formaldéhyde et la 5-aza-cytidine, à l'aide de différentes lignées *Escherichia coli* mutantes, déficientes en certaines enzymes de réparation (63). Cette étude a révélé une sensibilité accrue à l'exposition au formaldéhyde pour les lignées mutantes au niveau des gènes impliqués dans la recombinaison homologue et le NER. L'exposition à la 5-aza-cytidine, connue pour induire des pontages volumineux avec la DNMT (DNA methyltransferase, 53 kDa) est associée à une sensibilité très élevée des lignées mutantes au niveau des gènes responsable de la recombinaison homologue ; cet effet étant moins marqué pour les déficients en enzymes du NER. Ces observations suggèrent l'importance de ces 2 systèmes dans l'élimination des pontages ADN-protéines, et en particulier le rôle prédominant de la recombinaison homologue dans la prise en charge des pontages les plus volumineux. Le BER ne semble pas jouer un rôle prédominant dans la réparation de ces dommages. La synthèse translésionnelle, qui participe à la « tolérance » des lésions de l'ADN, n'apparaît que très partiellement impliquée.

Le mécanisme de prise en charge des pontages ADN-protéines chez les organismes procaryotes est résumé dans la Figure 16-A. Le **système UvrABC**, impliqué dans le **NER** chez les procaryotes, est capable de réparer les pontages peu volumineux, mais son activité diminue lorsque la taille de la protéine pontée augmente. Généralement on considère que la taille limite de prise de charge par le NER *in vivo* se situe aux alentours de 11 kDa. Les protéines UvrA et UvrB s'associent pour former le complexe A₂B et recherchent les dommages à l'ADN. Lorsque le complexe rencontre un dommage, la protéine UvrB se lie au niveau du site lésé. A cette étape, l'efficacité de liaison de UvrB est dépendante de la taille de la protéine pontée. La nucléase UvrC est ensuite recrutée pour réaliser les incisions en 3' et 5', et l'hélicase UvrD libère le fragment incisé, dont la longueur dépend également de la taille du pontage. L'activité de UvrD peut être entravée si le pontage est présent sur le brin où celle-ci progresse (8). Une étude récente (51) a démontré que le NER prend en charge préférentiellement les pontages impliquant la base guanine. De plus, l'activité du NER est plus élevée vis-à-vis des adduits présents sur le brin transcrit.

Les pontages plus volumineux (>12-14 kDa) sont pris en charge par la **recombinaison homologue dépendante de RecBCD** (cf. paragraphe 1.1.5.4) (8). Les travaux de Salem ont permis de mettre en évidence l'importance de la protéine RecA, enzyme responsable de la recherche de la séquence homologue et de l'invasion croisée de brin. Le rôle du complexe RuvABC, associé à RecG a également été souligné, et confirme l'existence de la jonction de Holliday (63).

Les travaux de Fang (51) ont révélé l'existence d'interactions entre ces 2 systèmes de réparation lors de la prise en charge des pontages ADN-protéines : dans certains cas, la présence de la protéine UvrA au niveau du site lésé peut affecter la reconnaissance et la réparation du pontage par le processus de recombinaison homologue et ainsi induire une augmentation de la fréquence des mutations. Ce phénomène a été observé pour les pontages inefficacement pris en charge par le NER, c'est-à-dire ceux impliquant la thymine ou ceux présents sur le brin non transcrit.

- **Réparation des DPCs chez les eucaryotes**

Chez les eucaryotes, les 2 systèmes prédominants intervenant dans la réparation des pontages ADN-protéines sont également le NER et la recombinaison homologue (Figure 16-B). La taille limite des lésions prises en charge par le NER est plus basse que chez les bactéries (environ 8 kDa *in vitro*) (8). Il existe probablement une autre voie pour les pontages plus volumineux, impliquant le protéasome : la protéine liée à l'ADN est ubiquitinée puis dégradée par le complexe 26S, donnant lieu à un pontage-peptide qui peut alors être éliminé par le NER. Ce mécanisme a été mis en évidence *in vitro* (64) mais son existence *in vivo* est controversée. Les processus enzymatiques de réparation par le NER et la recombinaison homologue sont détaillés dans les paragraphes 1.1.5.3 et 1.1.5.4.

En résumé, les pontages ADN-protéines sont pris en charge principalement par le NER et la recombinaison homologue. L'intervention de l'un ou l'autre de ces 2 systèmes dépend grandement de la taille de la protéine pontée. La taille limite des pontages réparable par le NER est plus faible chez les eucaryotes, d'où une plus grande contribution de la recombinaison homologue. Chez ces organismes il existerait une voie supplémentaire, impliquant le protéasome. Des acteurs d'autres systèmes de réparation pourraient également participer à la reconnaissance et à l'élimination de ces dommages, mais leurs rôles exacts ne sont pas encore clairement définis, et leur contribution semble secondaire.

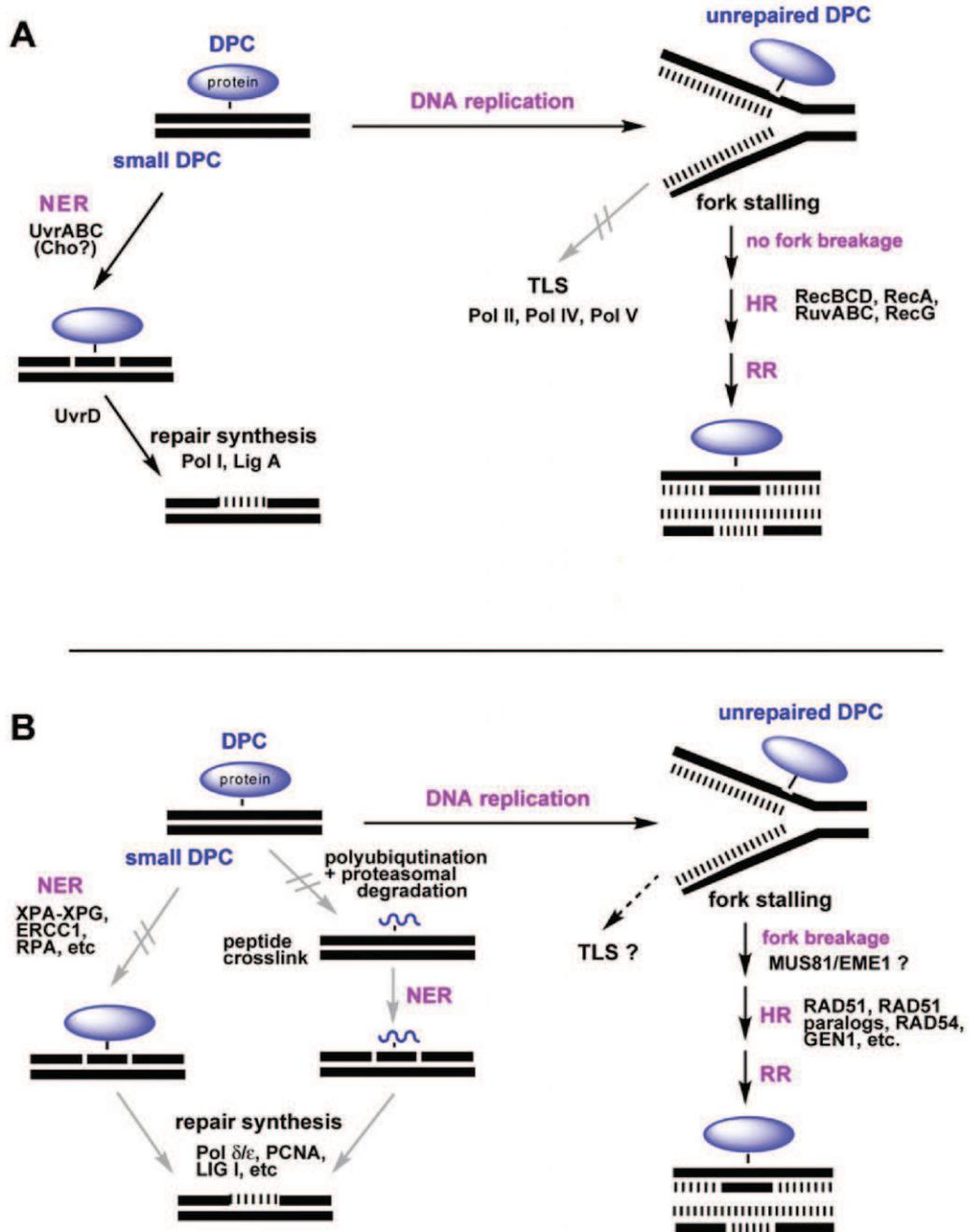


Figure 16 : Représentation schématique de la prise en charge des pontages ADN-protéines chez les organismes procaryotes (A) et chez les eucaryotes (B)(8).

1.2 Structure et mécanisme de formation des pontages induits par le stress oxydant

Ce travail de thèse est centré sur les pontages ADN-protéines se produisant lors de l'exposition au stress oxydant. L'objet de ce paragraphe est de résumer les différents adduits décrits dans la littérature se formant par un mécanisme oxydatif : les 2 sites privilégiés de ces réactions de pontage sont la thymine et la guanine. Nous nous intéresserons également aux adduits provenant de la suroxydation de la 8-oxoguanine.

1.2.1 Mécanisme général

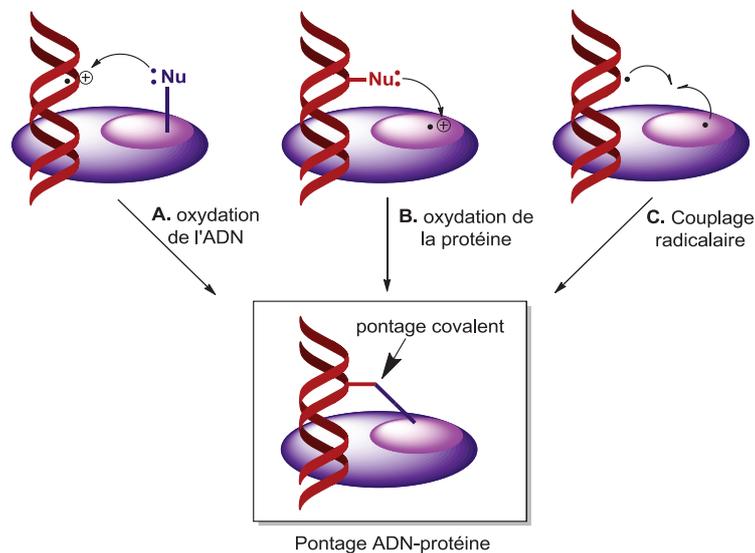


Figure 17 : Mécanisme de formation des pontages ADN-protéines induits par le stress oxydant (65).

Les pontages covalents entre ADN et protéines se forment selon différents mécanismes résumés dans la Figure 17. Les adduits peuvent provenir de l'oxydation initiale d'une base de l'ADN. Comme nous l'avons vu précédemment, la guanine possède le potentiel d'oxydo-réduction le plus bas parmi les composants de l'ADN, elle constitue donc un site d'oxydation préférentiel. L'espèce déficiente en électron ainsi obtenue est attaquée par un groupement nucléophile présent au niveau du résidu protéique. L'oxydation initiale peut également se produire au niveau de la protéine qui réagit avec un groupement nucléophile de l'ADN. Dans certains cas plus rares, le pontage provient d'un couplage entre 2 espèces radicalaires. (65)

1.2.2 Formation d'adduits avec la thymine

Le radical OH^\bullet , produit par les radiations ionisantes, réagit avec la thymine soit par abstraction d'un hydrogène au niveau du groupement méthyle, soit par addition sur la double liaison $\text{C5}=\text{C6}$, pour former 2 types de radicaux (Figure 18). Ces derniers peuvent être impliqués dans des réactions de pontages avec différents acides aminés.

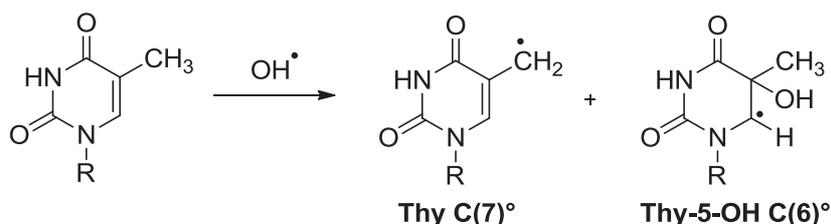


Figure 18 : Formation de radicaux de la thymine sous l'effet du radical hydroxyle (66).

L'adduit avec la **tyrosine** a été caractérisé à l'aide d'un système modèle, par irradiation de thymine en solution aqueuse en présence de tyrosine (66). Cet adduit a ensuite été détecté dans des échantillons d'ADN de nucléohistone (44). Le mécanisme repose sur l'addition du radical $\text{Thy C}(7)^\bullet$ sur le carbone C3 de la tyrosine (Figure 19). L'adduit peut également se former par couplage entre le radical de la thymine et un deuxième radical formé sur la tyrosine, même si la probabilité que ces 2 espèces coexistent à proximité est faible.

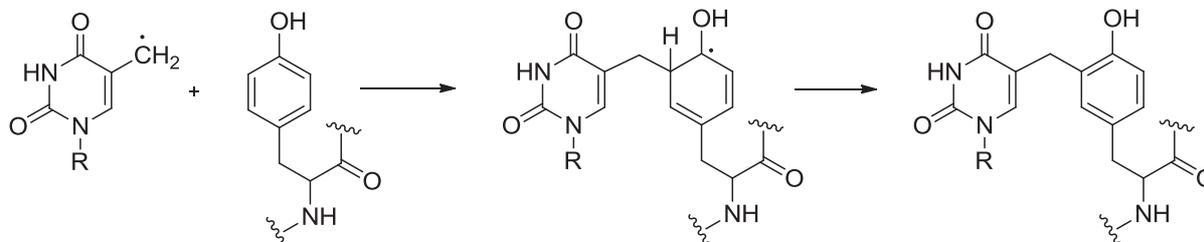


Figure 19 : Mécanisme de formation des pontages thymine-tyrosine proposé par Dizdaroglu et al. (44)

Des pontages entre thymine et tyrosine ont également été détectés dans l'ADN cellulaire : les travaux de Altman *et al.* (67) ont mis en évidence une augmentation de la formation de ces adduits après exposition des cellules à du sulfate ferreux FeSO_4 . Cette dernière observation s'explique par une augmentation de la production de radicaux OH^\bullet lors du traitement par les ions Fe^{2+} .

Dans les histones le radical de la thymine forme des pontages avec la **lysine** (45). Le mécanisme retenu diffère de celui décrit pour la tyrosine : cet adduit se formerait majoritairement par couplage entre les 2 espèces radicalaires formées $\text{Thy-5-OH C}(6)^\bullet$ et $\text{Lys C}(4)^\bullet$ (composé **I**) (Figure 20). Une étape de déshydratation conduit aux produits secondaires **II** et **III**. (68)

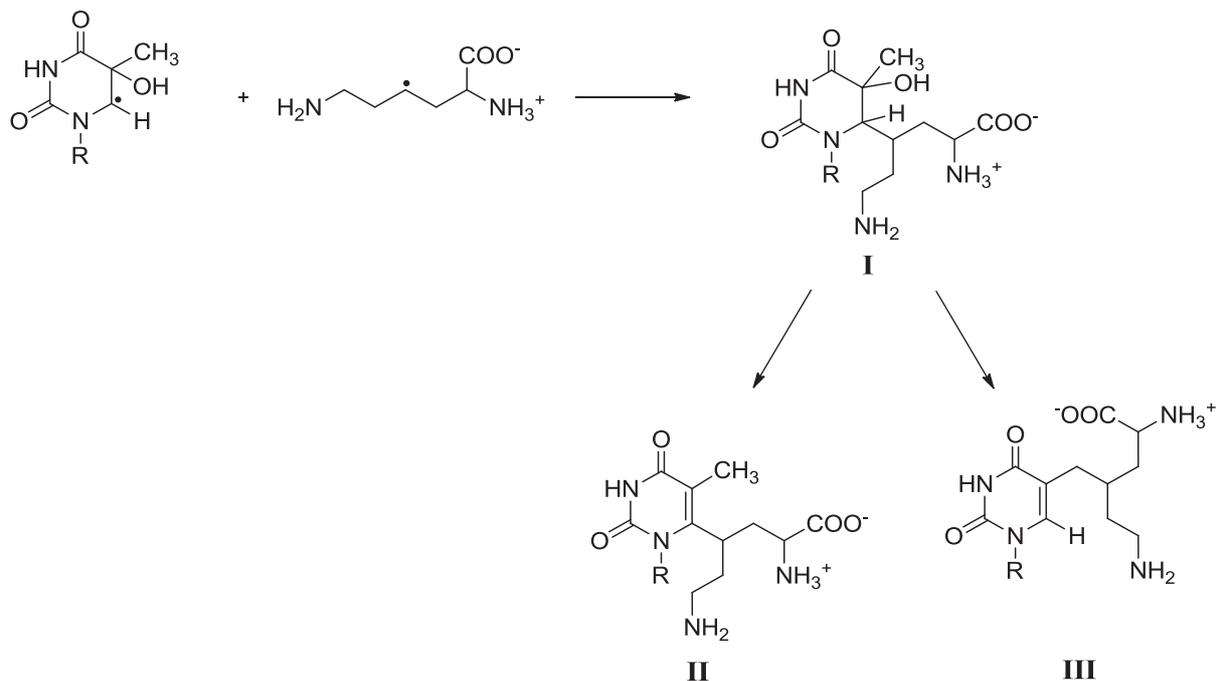


Figure 20 : Mécanisme de formation des adduits thymine-lysine proposé par Morimoto et al. (68)

Ainsi, la thymine intervient dans la formation d'adduits avec différents acides aminés sous l'action du radical hydroxyle. Deux exemples ont été décrits dans ce chapitre, mais des réactions de pontage avec d'autres acides aminés ont également été rapportées : on citera notamment le cas de la phénylalanine (69) ou bien de certains acides aminés aliphatiques (Gly, Ala, Val, Leu, Ile et Thr) (70). En résumé, 2 types de mécanismes ont été proposés pour la formation de ces lésions :

- l'addition radicalaire du radical de la thymine sur l'acide aminé (cas de l'addition sur le cycle aromatique de la tyrosine) ;
- le couplage des deux radicaux formés sur la thymine et sur l'acide aminé (cas de la formation de l'adduit thymine-lysine).

Ce type de réactivité joue potentiellement un rôle important dans les pontages ADN-protéines. A noter cependant que ces données ont été obtenues par une méthode de détection impliquant la GC-MS très décriée dans la littérature ces dernières années. De plus il a été suggéré que ces produits de pontage entre acides aminés et la thymine puissent se former de façon artéfactuelle lors de l'hydrolyse acide de l'ADN au préalable de l'analyse par GC-MS ou LC-MS (71) : Charlton *et al.* ont en effet démontré que la 5-hydroxyméthyluracile, produite par l'irradiation de la thymine, pouvait réagir avec la tyrosine en conditions acides pour former l'adduit thymine-tyrosine. Il serait donc intéressant d'avoir de nouvelles données sur la formation de ces différents adduits.

1.2.3 Formation d'adduits par suroxydation de la 8-oxoguanine

Bien que la guanine soit la base la plus sensible à l'oxydation, l'un de ses produits d'oxydation, la 8-oxoguanine, est encore plus réactif. En effet, la 8-oxoguanine possède un potentiel d'oxydo-réduction d'environ 0,6 V vs NHE alors que la guanine se situe à 1.29 V vs NHE. Dans le cas d'une oxydation à un électron qui se produit sur une autre base, un transfert électronique au sein du polymère conduit à la formation de l'espèce réactive $[8\text{-oxoG}]^{+\bullet}$.

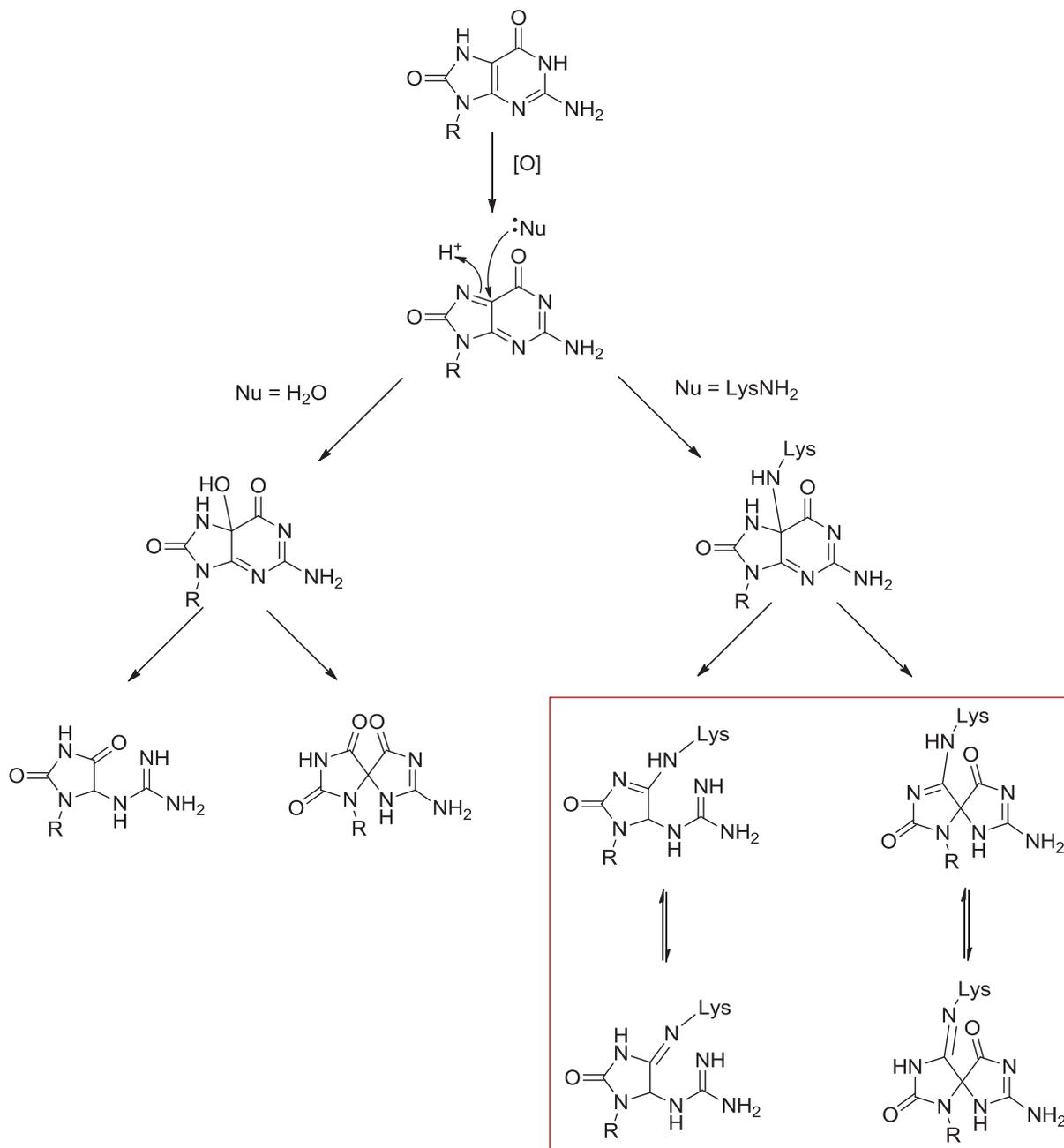


Figure 21 : Suroxydation de la 8-oxoguanine : addition nucléophile d'une molécule d'eau ou d'un résidu lysine en position C5 (65,72-74).

Le radical cation de la 8-oxodGuo peut subir des attaques nucléophiles au niveau de la position C5. En présence d'eau cette réaction conduit à la formation de la 5-hydroxy-8-oxoG (5-OH-8-oxoG) ; cet intermédiaire instable se décompose par ouverture du cycle pyrimidine au niveau de la liaison C5-C6 suivie d'une réaction de décarboxylation, pour donner la **guanidinodihydantoïne** (Gh). La 5-hydroxy-8-oxoG peut également faire l'objet d'un réarrangement en structure spiro, *via* un shift du groupement acyle, pour former la **spiroiminodihydantoïne** (Sp) (75,76). Une étude de 2003 (77) a permis d'identifier la prépondérance de l'un ou l'autre de ces produits de dégradation en fonction du pH lors de l'oxydation par l'oxygène singulet de la guanosine. A pH acide (< 7) la Gh est majoritaire, alors que le composé Sp se forme préférentiellement à pH 7 et plus. Ce phénomène n'est pas transposable à l'oxydation de l'ADN double brin : la formation du carbone quaternaire spiro étant moins favorable, on observe le produit de dégradation Gh.

La 8-oxodGuo oxydée peut également réagir avec d'autres espèces nucléophiles que l'eau, et intervenir dans la formation des pontages ADN-protéines. Les travaux entrepris par Hickerson et *al.* en 1999 ont permis d'identifier un pontage avec un résidu lysine de Mut Y, par l'intermédiaire de la 8-oxodGuo oxydée (74). La protéine Mut Y est une enzyme de réparation présente chez *Escherichia coli* capable de se lier aux mésappariements 8-oxoG:A. Le mécanisme de formation de ce pontage est similaire à celui de la 5-OH-8-oxoG et implique l'addition d'un groupement nucléophile peptidique au niveau de la position C5 de l'espèce [8-oxoG^{o+}].

Les pontages impliquant la suroxydation de la 8-oxodGuo ont également été mis en évidence avec la « single-stranded binding protein » (SSB) (72). Cette protéine est capable de se lier à l'ADN simple brin indépendamment de la séquence nucléotidique, afin de le protéger de la digestion par les nucléases. En conditions oxydantes, la protéine SSB forme des pontages avec la 8-oxodGuo et la 8-oxodAdo. Afin d'étudier le ou les acides aminés impliqués dans ces pontages et de caractériser les lésions obtenues, 3 modèles ont été mis en place en remplaçant la protéine SSB par les acides aminés d'intérêt sous la forme de monomères: AcLysOMe, AcArgOMe, AcTyrOMe. L'adduit avec la lysine s'est avéré légèrement plus favorable qu'avec l'arginine et beaucoup plus qu'avec la tyrosine. La caractérisation de l'adduit avec AcLysOMe a permis de mettre en évidence 2 structures de type spiroiminodihydantoïne (Sp-Lys) et guanidinohydantoïne (Gh-Lys) (Figure 21). Ces composés dérivent d'un intermédiaire commun, la 5-lys-8-oxodGuo. La Sp-Lys est obtenue par un réarrangement de type spiro. La Gh-Lys provient de l'ouverture du cycle pyrimidine suivie d'une réaction de décarboxylation.

Plus récemment, l'équipe de C. Burrows a démontré qu'il existait d'autres structures pour ces composés issus de la réaction entre la lysine et la guanine, selon le mécanisme d'oxydation envisagé (65) (Figure 22).

Photo-oxydation de type II

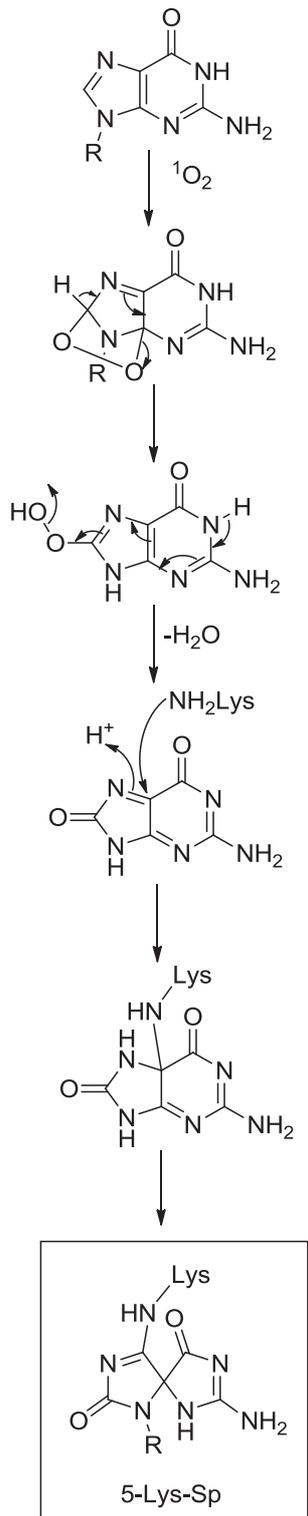


Photo-oxydation de type I

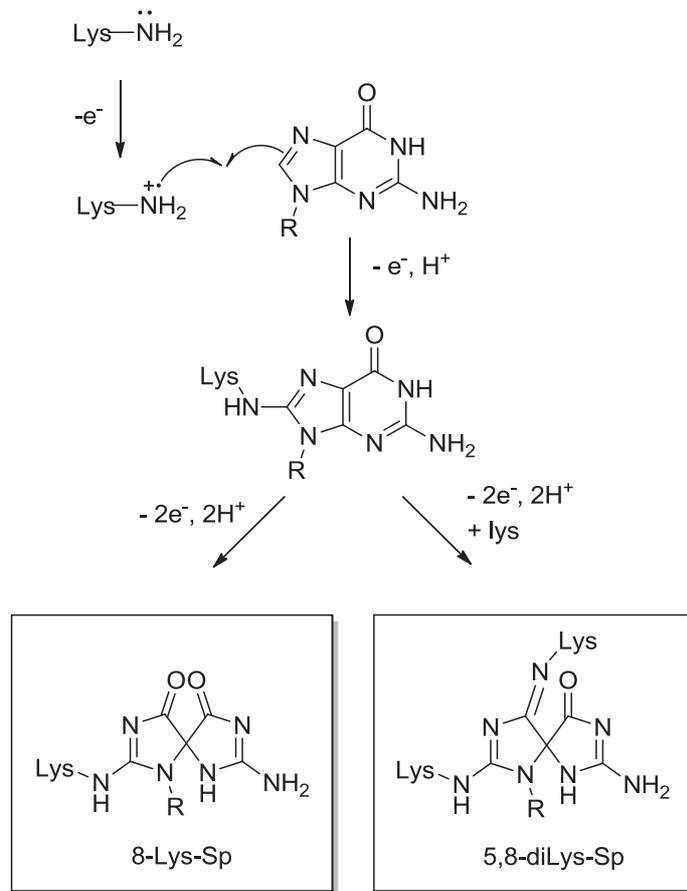


Figure 22 : Réaction de la lysine avec la guanine : existence de 2 mécanismes, selon le type d'oxydation, conduisant à des dérivés « spiro » (65).

L'oxydation de la guanine par l'oxygène singulet en présence de lysine conduit principalement au dérivé de type 5-lys-Sp. Ce mécanisme est obtenu avec des photosensibilisateurs de type II tels que le Rose

Béngal ou le bleu de méthylène. Une cycloaddition de type [4+2] conduit à l'intermédiaire OGo_x (8-oxodGuo oxydée). L'addition nucléophile de l'amine ε de la lysine s'effectue en position C5 de cet intermédiaire. Un réarrangement s'effectue pour obtenir le dérivé spiro 5-Lys-Sp. La photo-oxydation de type I, observée avec la riboflavine ou la benzophénone, est associée à un mécanisme différent. La lysine subit une oxydation à un électron pour conduire au radical Lys^{o+} : ce radical aminyl primaire présentant une forte réactivité envers les électrons π va s'additionner en position C8 de la guanine. Le mécanisme exact de cette réaction reste discuté.

Suite à un réarrangement de type shift [1,2] la 8-lys-guanine conduit au dérivé spiro 8-Lys-Sp. Une 2^e molécule de lysine peut également s'additionner en position C5 pour former le dérivé 5,8-diLys-Sp.

La formation d'adduits par suroxydation de la 8-oxodGuo a également été étudiée dans le cas de la tyrosine. Les résidus tyrosine jouent potentiellement un rôle important dans les pontages ADN-protéines puisqu'ils sont fortement présents dans les « DNA-binding regions » des protéines SSB. Le motif phénol de la tyrosine est capable d'effectuer une addition nucléophile en position C5, puis en C4 de la 8-oxodGuo oxydée, pour former une structure tricyclique [4.3.3.0]. (78)

1.2.4 Pontage sur la guanine

1.2.4.1 Addition radicalaire

La position C8 de la guanine est sensible aux attaques radicalaires. Looi *et al.* ont étudié la formation d'adduits avec la tyrosine et le glutathion, à l'aide d'une technique d'oxydation électrochimique couplée à la spectrométrie de masse (EC/ESI-MS) (79). Cette approche est utilisée pour étudier les produits d'oxydation des nucléotides (80). La tyrosine et le glutathion possèdent un potentiel d'ionisation plus bas que la guanine et sont donc oxydés plus facilement. Les radicaux formés s'additionnent en position C8 de la guanine (Figure 23). Le glutathion est oxydé au niveau de la fonction thiol de la cystéine, le pontage s'effectue donc par une liaison thioéther. A noter que ces réactions n'ont été pour l'instant observées qu'en phase gazeuse.

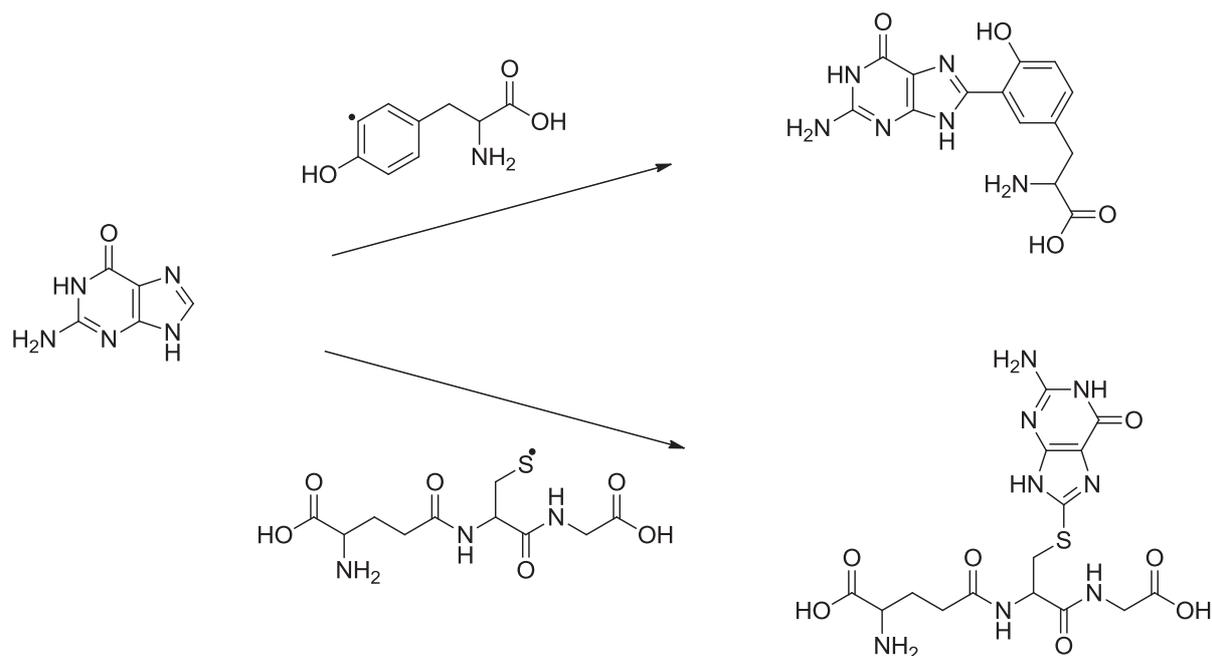


Figure 23 : Formation de d'adduits 8-Tyr-guanine et 8-GSH-guanine par un mécanisme radicalaire (79).

Les travaux de Milligan (81) ont démontré l'existence d'un transfert électronique de certains acides aminés tels que la cystéine, la méthionine, la tyrosine et le tryptophane, vers la guanine oxydée sous la forme d'un radical cation $G^{\bullet+}$. Ces acides aminés présentent en effet des potentiels d'ionisation plus bas que $G^{\bullet+}$, et constituent donc des potentiels donneurs d'électrons capables de « réparer » les radicaux cations de la guanine. Les produits de cette réaction de transfert électronique sont des radicaux localisés sur les acides aminés. D'après Milligan *et al.*, il est probable que ces derniers soient impliqués dans la formation de pontages ADN-protéines.

1.2.4.2 Addition nucléophile

Nous avons vu précédemment que la guanine possède le potentiel d'ionisation le plus bas parmi les 4 bases de l'ADN. Celle-ci est donc particulièrement sujette aux réactions d'oxydation, conduisant à la formation du radical cation $G^{\bullet+}$. Ce radical est sensible aux additions nucléophiles au niveau de la position C8. Ce paragraphe résumera les principaux mécanismes d'addition nucléophile impliquant le radical cation de la guanine décrits dans la littérature.

En 1992, Kasai *et al.* (82) ont démontré que la 8-oxoguanine pouvait se former par addition d'une molécule d'eau sur $G^{\bullet+}$. Cette réaction a été observée lors de la photosensibilisation d'ADN isolé par la lumière visible en présence de riboflavine. Le mécanisme correspond à la formation du radical cation de la guanine par une photo-oxydation de type I, suivie de l'addition de H_2O en C8. Le radical obtenu est déprotoné et subit une seconde étape d'oxydation pour conduire à la 8-oxoguanine (cf. avant-propos).

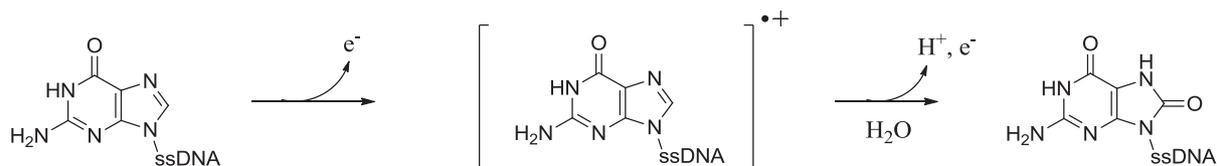


Figure 24 : Mécanisme de formation de la 8-oxoguanine lors de la photosensibilisation d'ADN isolé par la lumière visible en présence de riboflavine. Le radical cation formé par une photo-oxydation de type I subit une réaction d'hydratation, puis une seconde oxydation, conduisant à la 8-oxoguanine (82).

B. Morin et J. Cadet ont décrit différents modèles d'addition nucléophile sur la base guanine afin d'étudier le mécanisme de formation des pontages ADN-protéines.

La photo-oxydation de type I de la 2'-desoxyguanosine en solution dans un mélange eau/méthanol (50/50) saturée en oxygène provoque l'addition nucléophile du méthanol sur la guanine (83). Le mécanisme de formation proposé est résumé dans la Figure 25.

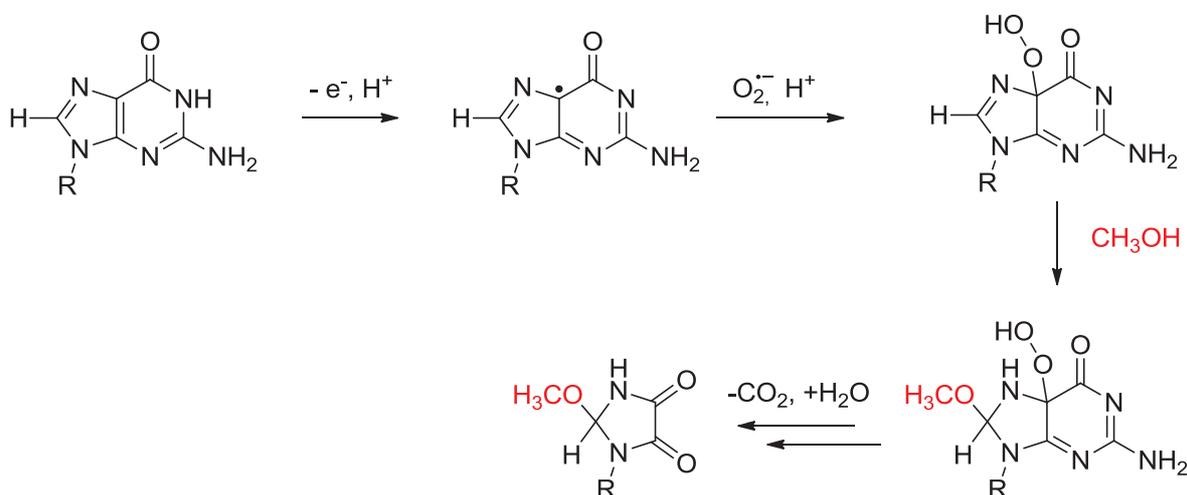


Figure 25 : Mécanisme de formation de l'adduit méthanol-guanine proposé par Morin et Cadet (83).

La première étape consiste en un transfert électronique de la guanine vers la benzophénone utilisée comme photosensibilisateur, ce qui aboutit à la formation du radical cation de la guanine, qui est rapidement déprotoné. L'anion superoxyde réagit en position C5 du radical. Le méthanol s'additionne ensuite en position C8 de la guanine. Cet intermédiaire réactionnel peut se décomposer par ouverture du cycle pyrimidine suivie d'une réaction de décarboxylation. Enfin une réaction d'hydrolyse s'accompagne de la perte du motif guanidine pour former le 1-(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-2-méthoxy-4,5-imidazolidinedione, qui a été isolé et caractérisé. Ce modèle permet de mimer la réactivité des groupements hydroxyle des résidus tyrosine, thréonine ou sérine, pouvant être impliqués dans la formation des pontages ADN-protéines. (83)

Le précédent modèle a été transposé à l'addition d'une fonction amine, afin de mimer la réactivité des résidus lysine et arginine. A l'aide d'un dérivé de la guanosine de type 5'-amino-2',5'-didésyoguanosine (5'-NH₂-dGuo), il a été démontré que l'amine en 5' est capable de s'additionner en

C8 de la guanine, par une réaction intramoléculaire sur le radical cation obtenu par photo-oxydation de type I (Figure 26). Cette réaction est suivie de l'addition de l'anion superoxyde en C5. L'intermédiaire formé peut ensuite se décomposer, par ouverture du cycle pyrimidine, suivie de plusieurs étapes d'hydrolyse pour conduire aux photoproduits 1 et 2, qui ont été isolés et caractérisés. (4)

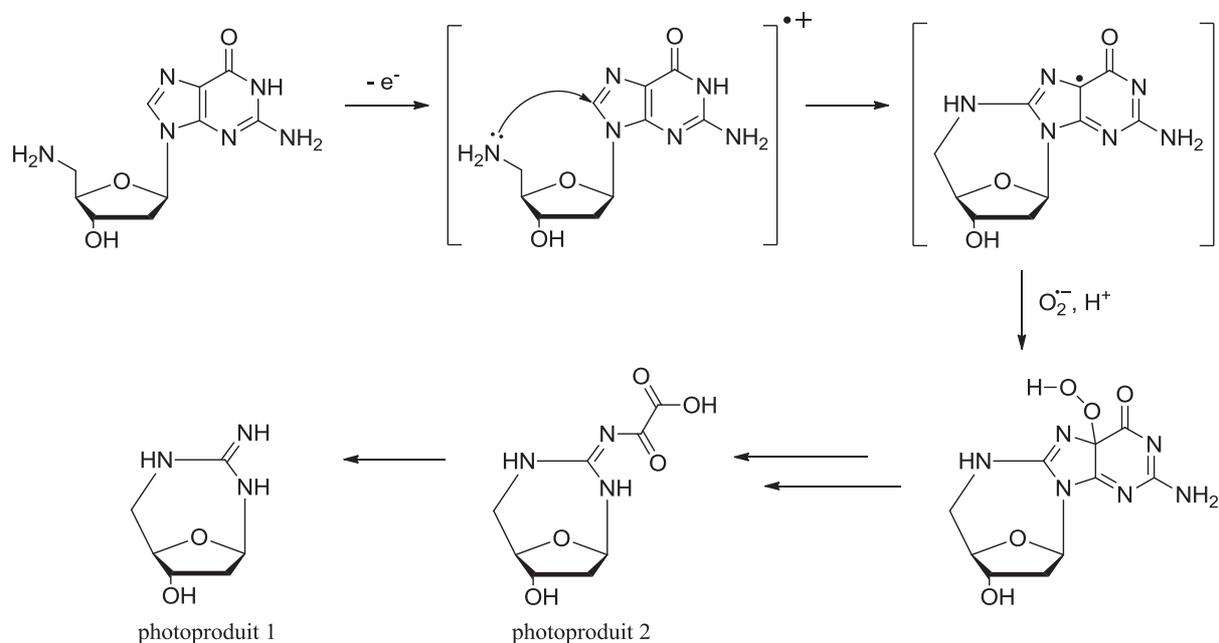


Figure 26 : Addition nucléophile de l'amine 5' en position C8 du 5'-amino-2'-didésoxyguanosine (4).

B. Morin et J. Cadet ont également décrit le modèle 5'-lys-dGuo (84) : ce dérivé possède une lysine greffée au niveau de l'hydroxyle en 5' afin de mimer les interactions étroites existant entre ADN et acides aminés des histones au niveau cellulaire. Il constitue un modèle pertinent de par la forte proportion de résidus lysine présents dans les histones et notamment dans certaines régions très impliquées dans les interactions ADN-nucléosome. La photo-oxydation de ce nucléoside par la benzophénone conduit à des adduits intramoléculaires, par une attaque nucléophile de l'amine α de la lysine en position C8 de la guanine. Cette réaction peut se produire directement sur le radical cation de la guanine ou sur le radical neutre après déprotonation et addition du radical superoxyde en C5. Cette approche a permis de mettre en évidence la réactivité de la lysine pour former des adduits en position C8 de la guanine suite à une oxydation à un électron.

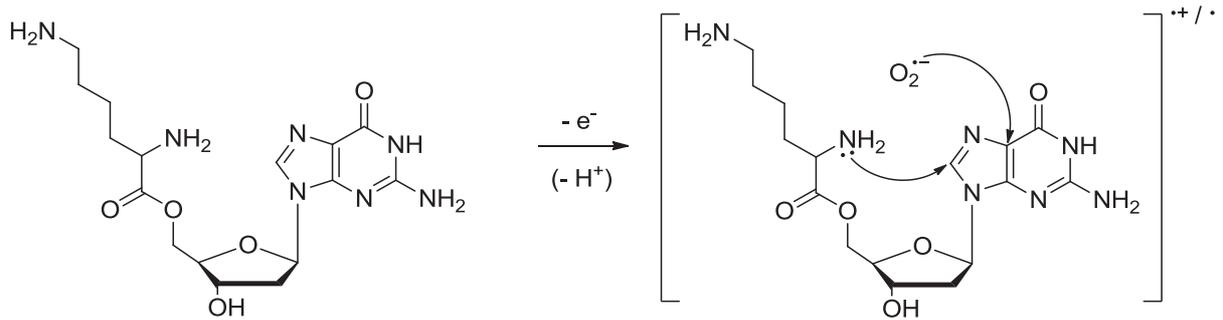


Figure 27 : Formation de l'adduit intramolécule du dérivé 5'-lys-dGuo (84).

Toujours au laboratoire, les travaux de S. Perrier et *al.* ont mis en évidence la formation d'un pontage covalent entre lysine et guanine par photo-oxydation (de type I) d'un oligonucléotide TGT en présence d'un tripeptide KKK (46). La photo-oxydation de type I conduit à la formation du radical cation de la guanine ou à sa forme déprotonée, majoritaire à pH neutre. La réaction de pontage s'effectue par l'addition nucléophile de l'amine ϵ de la lysine centrale du peptide en position C8 du radical cation de la guanine (Figure 28). L'adduit ainsi obtenu peut subir une oxydation secondaire et donner lieu à différents composés secondaires qui ont été isolés et caractérisés.

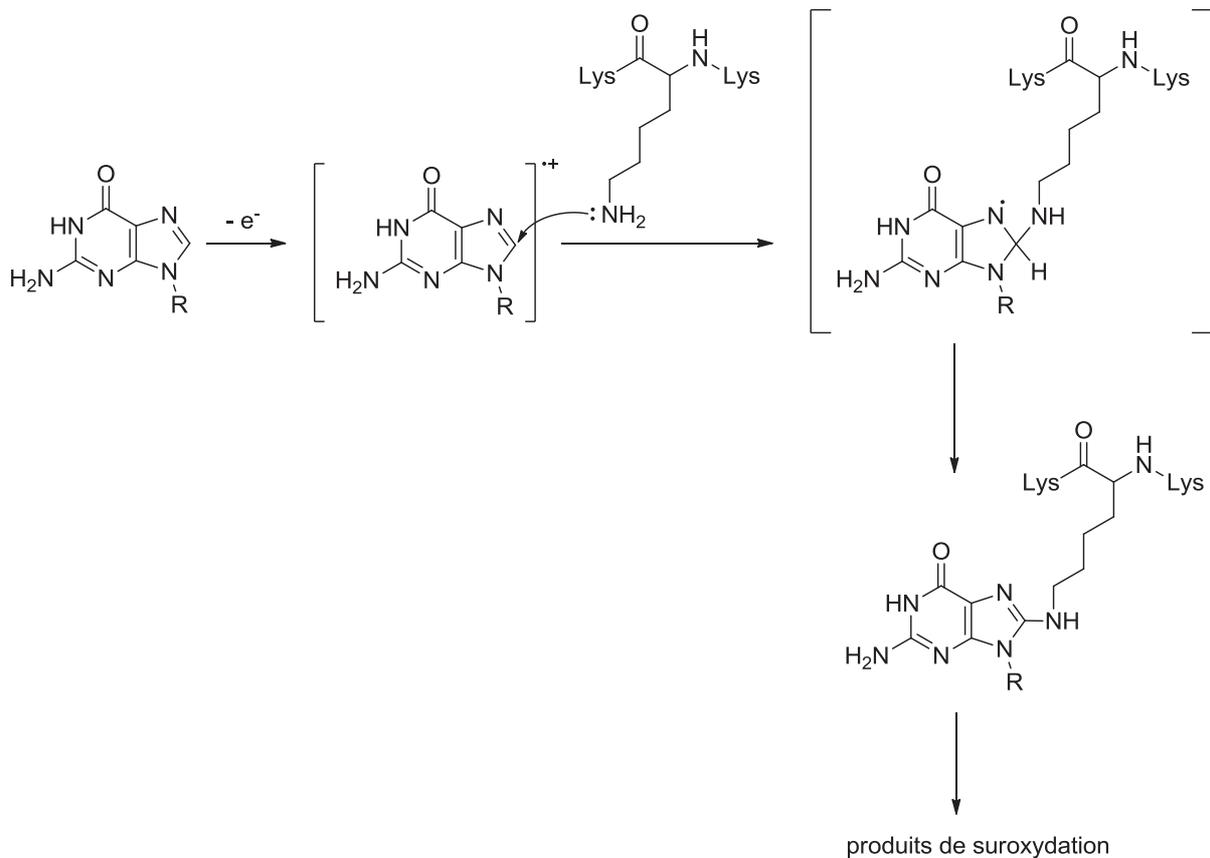


Figure 28 : Mécanisme de formation de l'adduit KKK-guanine (46).

Le mécanisme de suroxydation consiste en la formation d'un radical cation de l'adduit guanine-KKK qui comme la 8-oxodGuo présente un potentiel d'oxydation plus bas que celui de la guanine, suivi de l'addition d'une molécule d'eau en position C5. Par analogie avec la suroxydation de la 8-oxodGuo, cette réaction donne lieu à l'intermédiaire 5-OH-8-triLys-dGuo qui conduit aux dérivés spiroimino-trilysine-dihydantoïne et guanidino-trilysine-dihydantoïne (Figure 29). Un autre produit de suroxydation a également été décrit, suite à l'addition intramoléculaire d'une amine libre du peptide en position C5.

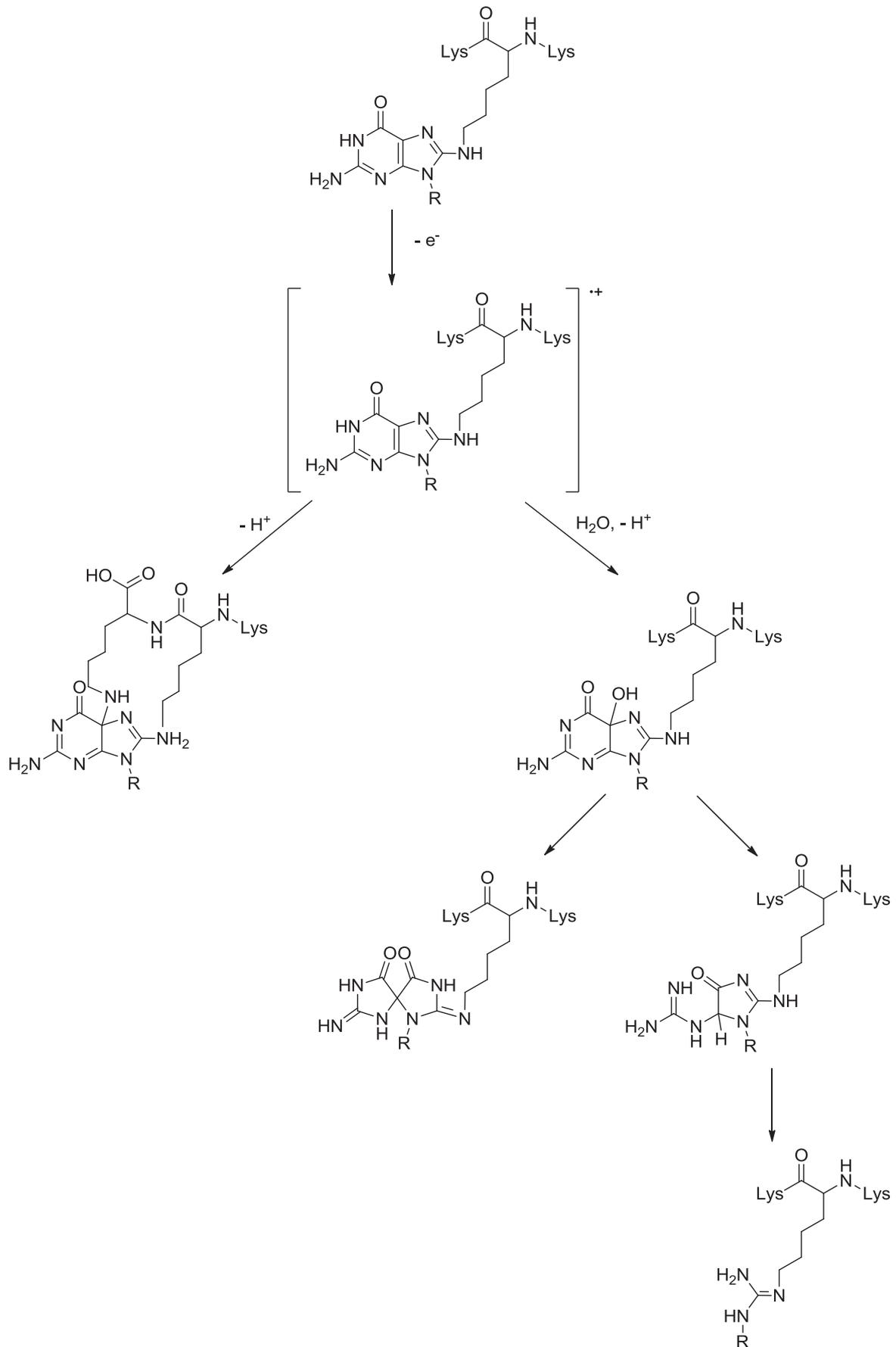


Figure 29 : Mécanisme de suroxydation de l'adduit KKK-guanine (46).

Le radical cation de la guanine intervient dans la formation de nombreuses lésions de l'ADN. La réactivité de la position C8 vis-à-vis des espèces nucléophiles présentes dans l'environnement cellulaire a été mise en évidence. Outre les exemples développés ici, d'autres additions nucléophiles en position C8 de la guanine ont également été décrites, et confirment cette réactivité. On citera notamment l'addition de la thymine par l'amine N3 sur le radical cation de la guanine conduisant à la formation d'adduits thymine-guanine (Thd-Gua) (85) qui ont été détectés à l'échelle cellulaire après irradiation laser à 266 nm (86). Le radical cation de la guanine réagit avec certains acides aminés nucléophiles, comme nous l'avons évoqué dans ce chapitre (cf. paragraphe 1.2.4.2). Ces acides aminés peuvent s'additionner par un groupement amine (cas de la lysine) ou par une fonction alcool (cas de la sérine, Perrier *et al.*, données préliminaires). L'addition nucléophile d'acides aminés sur le radical cation de la guanine pourrait donc vraisemblablement être impliquée dans la formation des pontages ADN-protéines.

2 Les polyamines

2.1 Implications physiologiques des polyamines

Les polyamines sont des petites molécules cationiques présentes dans tous les organismes vivants. Dans la cellule elles sont généralement liées à des molécules polyanioniques telles que l'ADN, l'ARN et les phospholipides (87). Les polyamines biosynthétisées chez les mammifères sont la putrescine, la spermidine et la spermine (Figure 30). L'agmatine, qui provient de la décarboxylation de l'arginine, est synthétisée uniquement chez les plantes et chez la plupart des bactéries, notamment celles de la flore intestinale (88).

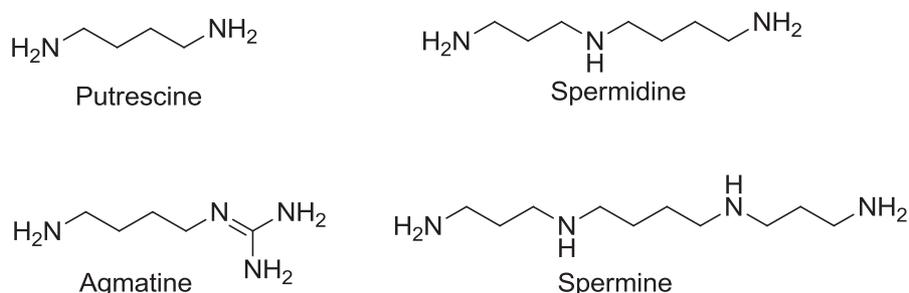


Figure 30 : Structure des polyamines.

2.1.1 Métabolisme

2.1.1.1 Biosynthèse

La putrescine est biosynthétisée à partir de l'ornithine, issue du cycle de l'urée (Figure 31). Cette réaction est catalysée par l'ornithine décarboxylase (ODC). La putrescine est le précurseur des 2 autres polyamines. La spermidine est produite lors de l'addition d'un groupement aminopropyle par la spermidine synthase. La spermine est synthétisée à partir de la spermidine par la même réaction catalysée par la spermine synthase. Les groupements aminopropyle proviennent de la S-adenosyl-S-méthyl-homocysteamine (SAMHC). Ce composé est obtenu à partir de la S-adenosyl-méthionine (SAM) sous l'action de la SAM-décarboxylase (SAMdc). La SAM est issu de la condensation de la méthionine avec une molécule d'ATP. La synthèse de la spermidine et de la spermine dépend donc de la présence d'un acide aminé essentiel, la méthionine. (87,89)

2.1.1.2 Catabolisme

Les polyamines sont métabolisées en un grand nombre de dérivés. Leur catabolisme fait intervenir des réactions d'acétylation et d'oxydation (Figure 31).

La conversion de la spermine en spermidine puis de la spermidine en putrescine nécessite la formation d'intermédiaires acétylés, la N¹-acétylspermine et la N¹-acétylspermidine. Cette réaction est catalysée par l'enzyme clef du catabolisme des polyamines, l'acetyl-Coa:spermidine/spermine N¹-acetyltransferase (SSAT), présente au niveau du cytosol. Les réactions d'acétylation des polyamines permettent de diminuer le nombre de charges positives qu'elles portent, et ainsi de limiter les interactions avec les molécules polyanioniques. (87,89)

La N¹-acétylspermine et la N¹-acétylspermidine sont ensuite oxydées par la polyamine oxydase (PAO), pour régénérer la spermidine et la putrescine. Enfin, la diamine oxydase (DAO) métabolise la putrescine en acide γ -aminobutyrique.

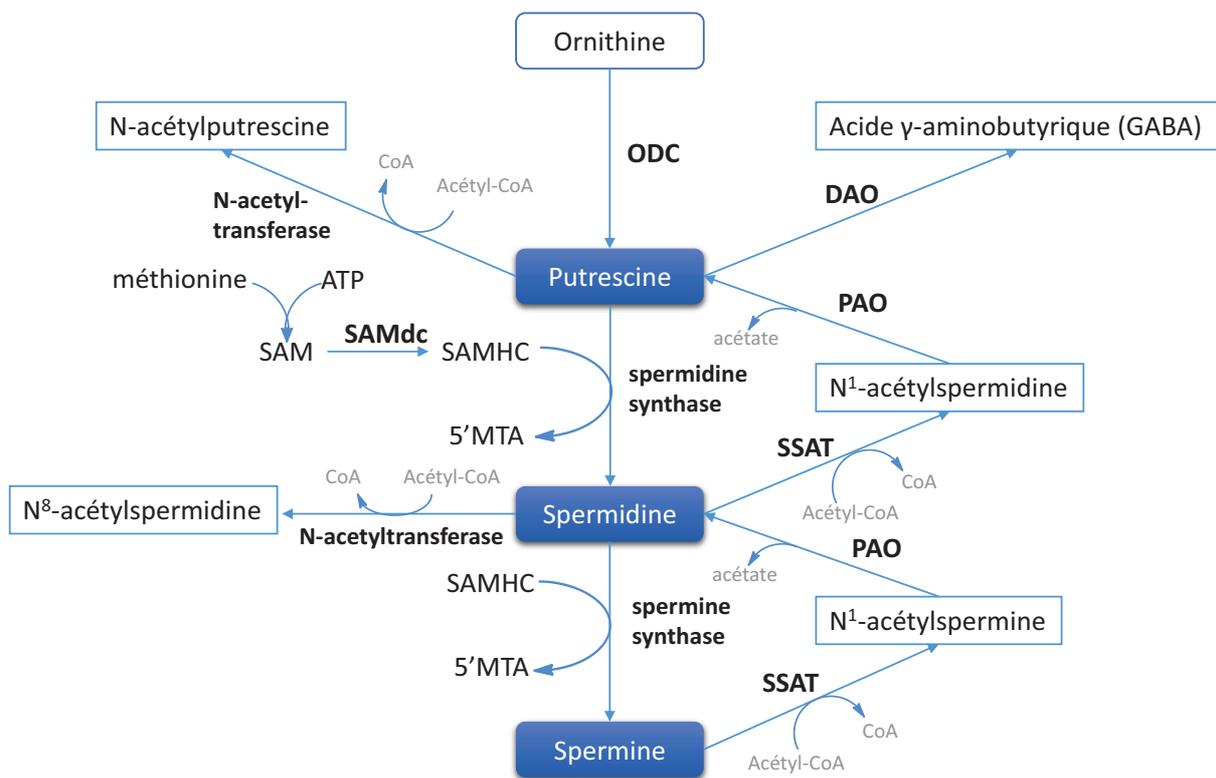


Figure 31 : Métabolisme des polyamines (89). ODC : ornithine décarboxylase ; SAM : S-adenosyl-méthionine ; SAMHC : S-adenosyl-S-méthyl homocysteamine ; SAMdc : SAM-décarboxylase ; 5'MTA : 5'-méthylthioadénosine ; SSAT : acetylCoA spermidine/spermine N¹-acetyltransferase ; PAO : polyamine oxydase ; DAO : diamine oxydase.

2.1.1.3 Régulation du métabolisme des polyamines

La concentration intracellulaire en polyamines est hautement régulée. Des perturbations dans leur métabolisme sont associées à diverses pathologies. Les 3 enzymes impliquées dans la régulation sont l'ODC, la SAMdc et la SSAT. (87)

- **Régulation de l'ODC** (88)

La régulation s'effectue à 2 niveaux :

- modification du taux d'expression du gène *odc*,
- dégradation de la protéine.

La modulation de l'expression génique a lieu notamment lors de la synthèse d'ARN messenger. La transcription du gène *odc* augmente sous l'action de divers stimuli : la région promotrice de ce gène contient des séquences réceptives à certaines hormones ou facteurs de croissance. La synthèse d'ARNm est par exemple augmentée par le proto-oncogène *c-Myc*, par l'intermédiaire d'un facteur de transcription.

La demi-vie de l'ODC est relativement courte. Sa dégradation est accélérée lorsque la concentration intracellulaire en polyamines est élevée, et ne requière par d'ubiquitination au préalable. La forme active de cette enzyme est un homodimère, l'association des 2 sous-unités étant instable. Le principal acteur de la dégradation de l'ODC est l'antizyme (AZ) : celui-ci se lie à la forme monomérique pour inactiver la protéine et déclenche sa dégradation par le protéasome 26S. Il existe un inhibiteur de l'antizyme (AZin) qui est capable de déplacer l'AZ lié à l'ODC et ainsi empêcher sa dégradation.

- **Régulation de la SAMdc**

La putrescine active la pro-enzyme et stimule l'activité de SAMdc. A l'inverse, l'augmentation de la concentration intracellulaire en spermidine et spermine diminue la synthèse de cette enzyme en inhibant la transcription du gène *SAMdc*. La spermidine et la spermine induisent également la dégradation de cette enzyme par le protéasome, après ubiquitination. (87)

De nombreux processus liés à la croissance cellulaire, tels que la régénération tissulaire ou la différenciation, sont associés à une élévation de la concentration cellulaire en SAMdc (88).

- **Effet du monoxyde d'azote (NO)**

L'ODC et la SAMdc comportent au niveau de leur site actif, des résidus cystéine impliqués dans le mécanisme catalytique. Ces cystéines peuvent réagir avec le NO, ce qui conduit à l'inactivation de l'enzyme. Le NO constitue donc un inhibiteur de la biosynthèse des polyamines. (88)

- **Régulation de la SSAT**

L'élévation de la concentration en polyamines s'accompagne d'une induction de la transcription du gène *SSAT*, via la séquence promotrice « polyamine responsive element » (PRE). L'activité de la SSAT est modulée par différentes hormones, telles que l'estradiol ou les corticostéroïdes (87). L'oncogène *k-Ras* est capable d'inhiber cette enzyme, conduisant ainsi à une augmentation de la concentration cellulaire en spermine et spermidine. (88)

2.1.1.4 Transport des polyamines (87,88,90,91)

Les systèmes de transport des polyamines contribuent à l'homéostasie de leur métabolisme.

L'entrée des polyamines dans la cellule dépend du potentiel de la membrane plasmique et de la présence de cations divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}). Il existe 2 types de transporteurs pour l'influx de ces molécules : (i) les transporteurs prenant en charge préférentiellement la putrescine et les composés diamminés, et (ii) ceux destinés à la spermidine et la spermine. L'internalisation des polyamines peut également s'effectuer par un mécanisme d'endocytose dépendante de la cavéoline-1. Ces processus d'influx sont inhibés par l'antizyme.

Ces molécules sont externalisées par un transporteur d'acides aminés, SLC3A2. Celui-ci forme un complexe avec l'enzyme SSAT et catalyse l'efflux de putrescine et de la N^1 -acetylspermidine grâce à un échange polyamine/arginine.

L'oncogène *k-Ras* stimule l'endocytose et inhibe l'externalisation des polyamines. Bien que très étudiés, les mécanismes impliqués dans le transport de ces molécules ne sont pas totalement élucidés.

2.1.2 Fonctions biologiques des polyamines

Les polyamines sont protonées à pH physiologique et peuvent donc se lier à différentes macromolécules présentant des sites anioniques tels que les acides nucléiques, les protéines ou les phospholipides membranaires. Ces interactions sont susceptibles de jouer un rôle dans certains processus physiologiques. (88)

Les principales fonctions biologiques des polyamines sont résumées dans la Figure 32. En particulier, elles peuvent influencer la structure de l'ADN : ces petites molécules cationiques interagissent avec les charges négatives de l'ADN et peuvent ainsi réguler sa condensation. D'autre part, elles participent à la régulation de l'expression de certains gènes et interviennent dans les processus de la prolifération cellulaire et d'apoptose. Dans ce paragraphe ces principaux rôles biologiques seront étudiés plus en détails. Nous verrons également que les polyamines sont impliquées dans certains aspects des fonctions reproductrices, au niveau de la production des gamètes mâles et femelles, et de la fécondation. Dans ces travaux nous nous intéresserons exclusivement à leur rôle dans les fonctions reproductrices mâles. L'implication des polyamines dans les fonctions ovariennes est décrite dans la revue de Pavine Lefèvre *et al.* (92). Ces molécules interviennent dans d'autres processus physiologiques essentiels qui ne seront pas détaillés ici, tels que la régulation de la réponse immunitaire, la cicatrisation, et le maintien de la trophicité intestinale.

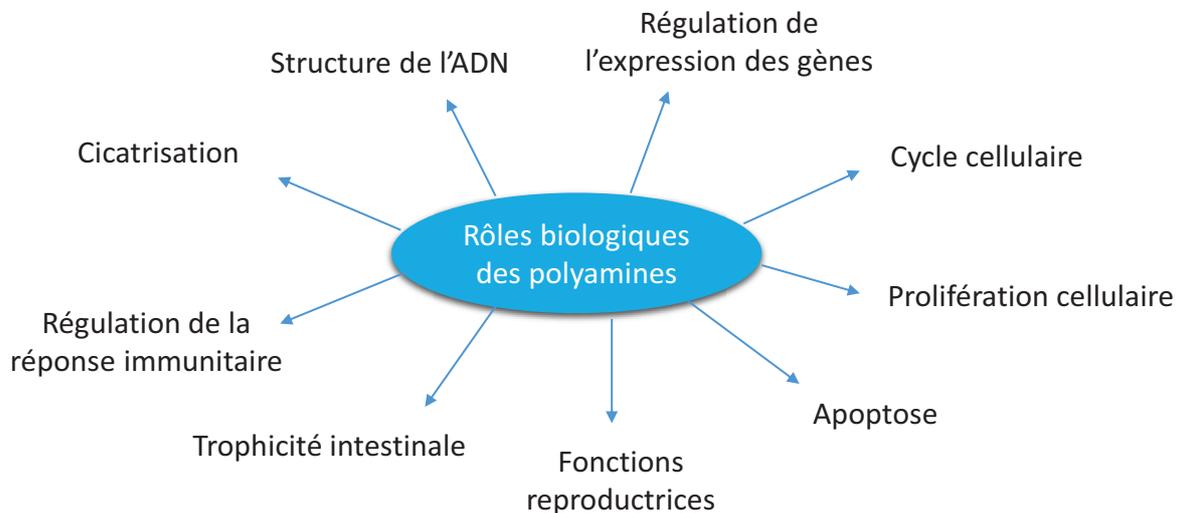


Figure 32 : Importance physiologique des polyamines.

2.1.2.1 Effets sur la structure de l'ADN

Les polyamines sont en contact étroit avec l'ADN par différents types d'interaction (87) :

- liaisons ioniques entre leurs groupements amines et les phosphates de l'ADN,
- interactions cation- π avec les nucléobases,
- interactions hydrophobes.

Elles stabilisent le nucléosome et participent à la condensation de l'ADN, ce qui permet de protéger la macromolécule contre l'effet des radiations ionisantes, des espèces réactives de l'oxygène, ou des DNAses. Elles sont impliquées dans le remodelage de la chromatine en modulant l'acétylation des histones. (87)

- **Les agrégats de polyamines (“Nuclear Aggregates of polyamines”, NAPs) (93–97)**

Les polyamines sont connues pour leur habilité à stabiliser et condenser la molécule d'ADN, mais le mécanisme de cette interaction n'est pas totalement élucidé. L'équipe de D'Agostino a proposé un modèle reposant sur la formation d'agrégats de polyamines, appelés NAPs. Les polyamines sont capables de s'auto-assembler pour former des agrégats moléculaires, qui adoptent une structure macrocyclique. A l'échelle cellulaire, 3 types de structure ont été identifiés, présentant des poids moléculaires d'environ 1000, 4800 et 8000 Da, respectivement nommés small-NAP (s-NAP), medium-NAP (m-NAP) et large-NAP (l-NAP) (93,98). Ces structures interagissent avec l'ADN génomique, et influencent sa conformation ; elles ont également un effet protecteur vis-à-vis des nucléases. Les NAPs permettent notamment de préserver l'ADN de la dégradation par la DNase I, plus efficacement que les polyamines « libres » (94).

Les NAPs se forment par interactions ioniques des amines primaires des polyamines avec les phosphates environnants. Chaque phosphate est lié à 2 polyamines par leurs fonctions *N*-terminales, conduisant à un assemblage alterné et linéaire. Au cours du processus d'élongation, les forces de répulsion Coulombiennes provoquent la courbure de la chaîne de polyamines, dont la flexibilité dépend de la longueur des éléments qui la composent (la spermine étant la molécule la plus flexible et la putrescine la plus rigide). Le système se stabilise par cyclisation. La seconde étape de l'assemblage est l'agrégation de ses monomères macrocycliques, pour aboutir à une structure supramoléculaire plane et polycyclique (Figure 33). Les macrocycles sont alors associés par des liaisons hydrogène entre les groupements phosphate.

Les s-NAP sont des structures monocycliques constituées de 2 molécules de spermine, une molécule de spermidine et une molécule de putrescine ; il s'agit de précurseurs pour la formation des autres agrégats. Les m-NAP sont des assemblages de 5 s-NAP, connectés par des liaisons hydrogène. Ces structures semblent impliquées dans la réplication cellulaire, puisque leur concentration intracellulaire est maximale en phase S. Les l-NAP sont constitués de 5 monomères de 6 polyamines (2 spermine, 2

spermidine et 2 putrescine). Ils ont vraisemblablement un rôle dans la stabilisation, la protection et/ou la réparation de l'ADN simple brin. La putrescine joue un rôle essentiel dans la formation des NAPs, puisque ses charges positives sont entièrement neutralisées par les phosphates (à l'inverse de la spermidine et la spermine), ce qui diminue les forces répulsives entre ces molécules qui pourraient entraver les interactions entre les monomères. La spermidine et la spermine quant à elles sont nécessaires à l'interaction des NAPs avec l'ADN, grâce à la présence de charges positives excédentaires sur leurs amines secondaires. (99)

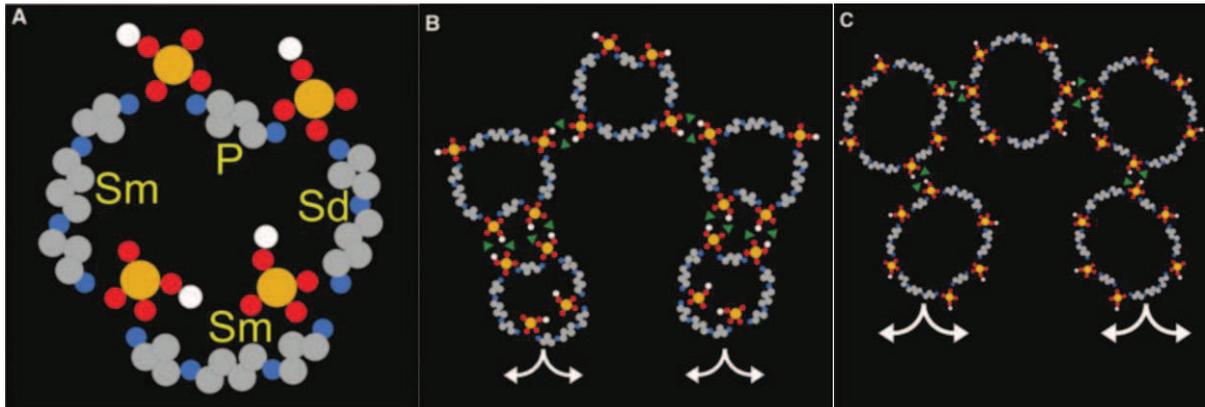


Figure 33 : Représentation schématique de la structure des « nuclear aggregates of polyamines » (NAPs) (94). A : small-NAP, constitué de 2 spermine, 1 spermidine et 1 putrescine, reliées par des groupements phosphate. B : medium-NAP, polymère de 5 unités s-NAP, liées par des liaisons hydrogènes (représentées par des triangles verts). C : large-NAP, polymère de 5 unités cycliques de 6 polyamines. Les flèches indiquent la flexibilité nécessaire à l'adaptation à la double hélice d'ADN.

Les travaux de D'Agostino ont démontré que ces NAPs étaient capables d'interagir avec l'ADN, par formation de liaisons ioniques entre les groupements amines et les phosphates de l'ADN. Les amines primaires étant déjà impliquées dans la formation des agrégats circulaires, les amines secondaires sont les seules disponibles pour se lier à l'ADN. Les NAPs s'insèrent dans les sillons de l'ADN suite à un phénomène de reconnaissance. La liaison d'un résidu spermine d'un s-NAP avec les phosphates de l'ADN-Z est particulièrement efficace et permet à cet agrégat de se loger dans le petit sillon (99) (Figure 34). La structure obtenue est stabilisée par des liaisons hydrophobes (entre les groupements méthylène de la thymine et les chaînes aliphatiques des polyamines) et des interactions de type ion-dipôle (entre les amines secondaires des polyamines et les amines N7 des purines ou les carboxyles O4 des thymines). Les macrocycles s'alignent parfaitement dans le sillon, puis l'ensemble est renforcé par des liaisons hydrogène entre les groupements phosphate de NAPs adjacents, formant ainsi un tunnel supramoléculaire qui enveloppe l'ADN.

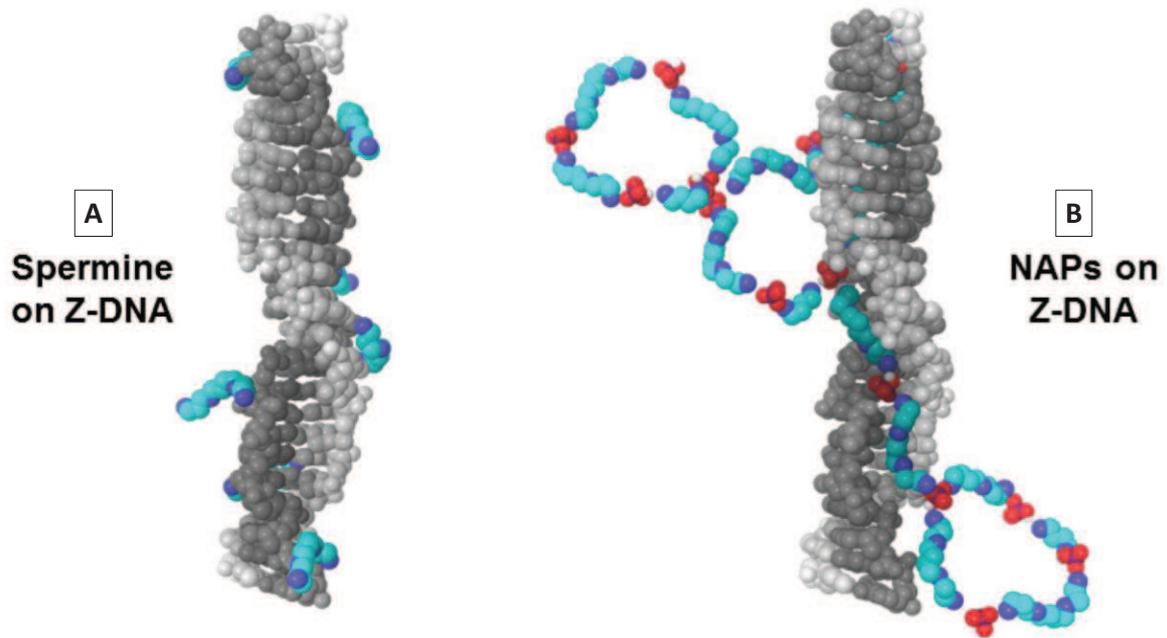


Figure 34 : Stabilisation de l'ADN-Z par la spermine « libre » vs NAPs (99). A : Structure 3D de l'ADN-Z co-cristallisé avec la spermine (100). B : Structure proposée par Brooks et al. pour l'ADN-Z lié à des NAP (99).

Les NAPs ont un effet sur la structure tridimensionnelle de l'ADN, et participent notamment à une transition conformationnelle de l'hélice A en hélice Z. Cette transition peut se produire lors de la formation d'un m-NAP *in situ*, par agrégation de 3 s-NAP libres avec 2 unités déjà liées à l'ADN (Figure 35). L'assemblage de cette structure s'accompagne d'un élargissement du pas de la double hélice qui favorise la transition.

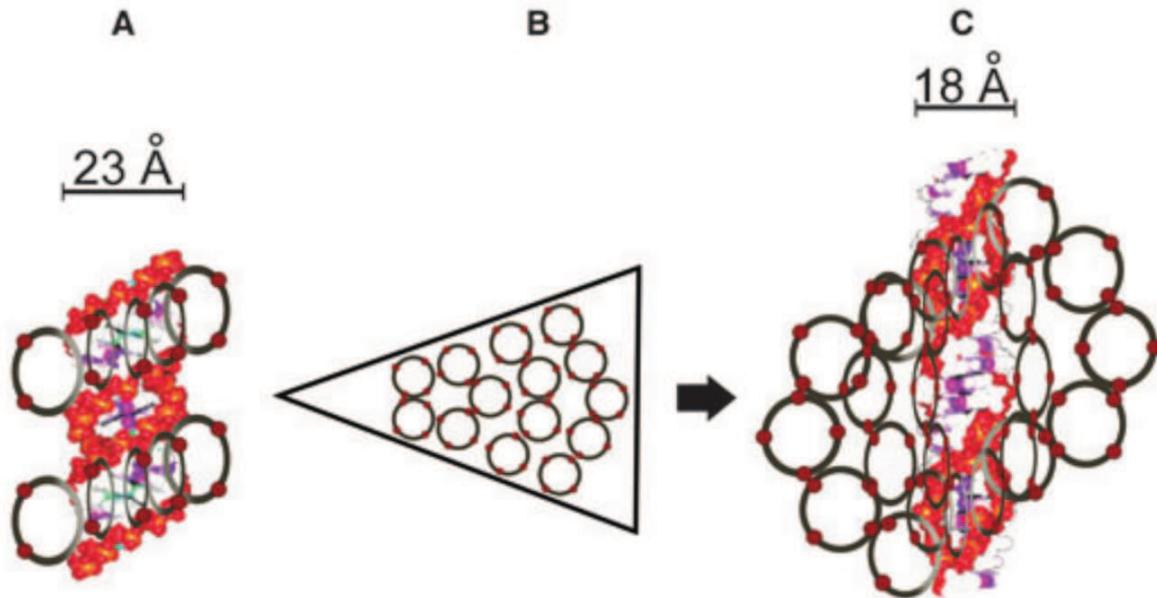


Figure 35 : Interactions des NAPs avec les différentes formes de l'ADN ; transition conformationnelle de l'hélice A en hélice Z (94). A : sNAP liés à l'ADN-A. Les anneaux gris représentent les macrocycliques de polyamines, avec les groupements phosphate en rouge. B : Formation progressive d'un m-NAP. C : m-NAP liés à l'ADN-Z.

D'après D'Agastino *et al.*, ces NAPs constituent la forme biologiquement active par laquelle les polyamines interagissent avec l'ADN et exercent leur effet protecteur (94).

2.1.2.2 Régulation de l'expression des gènes

Ces molécules participent à la régulation de l'expression de certains gènes, en particulier ceux impliqués dans leur propre métabolisme, ou dans la prolifération cellulaire. Cette régulation s'effectue à 3 niveaux : la transduction du signal, la transcription des gènes, et la traduction.

- **Modulation de la transduction du signal** (89)

Les polyamines sont impliquées dans certaines voies de signalisation intracellulaire. Par leur nature polycationique, elles interagissent avec les membranes phospholipidiques et régulent l'activité de certaines enzymes membranaires. Elles sont notamment capables d'activer des kinases, telles de la tyrosine kinase, la protéine kinase A ou les MAP kinases⁵, ce qui a pour effet de stimuler l'expression de proto-oncogènes (*c-Myc* par exemple). Elles interagissent également avec les protéines G, en stimulant leur activité GTPase.

⁵ mitogen-activated protein kinases

▪ **Régulation de la transcription des gènes** (87)

Les polyamines régulent la transcription de certains gènes par différents mécanismes. En particulier, celles-ci peuvent induire la transcription du gène de la SSAT (cf. paragraphe 2.1.1.3), enzyme impliquée dans leur catabolisme, via une séquence promotrice appelée « polyamine responsive element » (PRE). Ce processus de régulation s'effectue par l'intermédiaire de 2 facteurs de transcription, PMF-1⁶ et Nrf-2⁷, qui interagissent avec la séquence PRE.

Les polyamines sont également impliquées dans l'expression des facteurs de transcription c-fos et c-myc, qui à leur tour régulent l'expression de certains gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Enfin, elles stimulent également la liaison du facteur de transcription NF-κB à sa séquence spécifique de l'ADN. Ceci lui permet d'exercer son activité régulatrice, et d'intervenir dans les processus inflammatoires.

▪ **Régulation de la traduction de l'ARN** (87,88)

Les polyamines se lient à l'ARN, afin de moduler la synthèse des protéines. La spermidine régule la formation du complexe d'initiation. Les polyamines peuvent interagir avec les ARN de transfert, et stabiliser leur structure.

La régulation s'effectue également par l'intermédiaire de la protéine HuR (Hu antigène R). Celle-ci stabilise les ARN messagers en se liant aux séquences riches en A-U des régions 3' non transcrites. Les polyamines réduisent l'expression de certains gènes impliqués dans l'apoptose et la prolifération cellulaire en inhibant la liaison de HuR à l'ARNm. A l'inverse, elles peuvent augmenter l'expression du proto-oncogène *c-Myc* par phosphorylation de HuR ce qui favorise sa liaison à l'ARNm.

Le facteur eIF5A est essentiel à la traduction lors de la phase d'élongation. Cette protéine subit une modification post-traductionnelle d'une lysine en hypusine, nécessaire à son activité biologique. La protéine précurseur est tout d'abord modifiée par la désoxyhypusine synthase, qui greffe un motif aminobutyle provenant de la spermidine (Figure 36). Ensuite la désoxyhypusine hydrolase réalise une hydroxylation pour former la protéine eIF5A active.

⁶ polyamine-modulated factor 1

⁷ nuclear factor erythroid 2-related factor 2

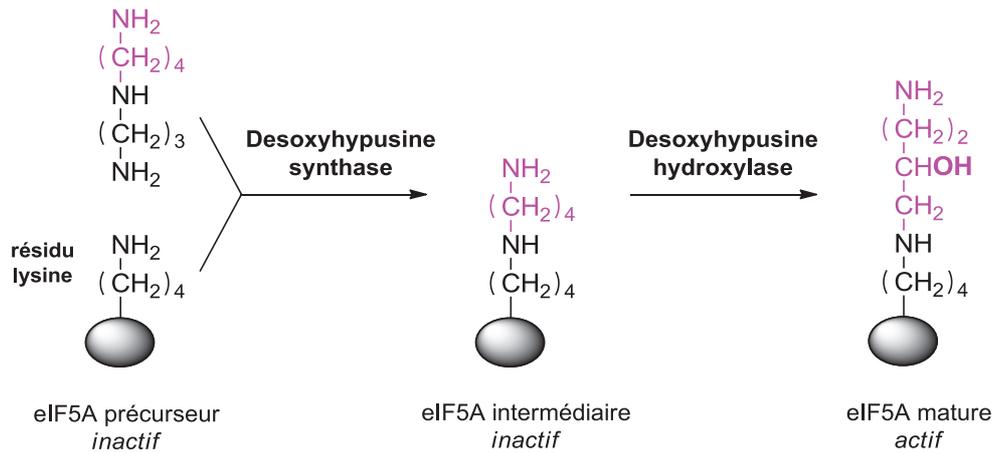


Figure 36 : Mécanisme de formation du facteur eIF5A (87).

2.1.2.3 Effets sur la progression du cycle cellulaire, la croissance cellulaire et l'apoptose

Les polyamines sont nécessaires à la progression du cycle cellulaire. Leur concentration cellulaire augmente à 2 étapes du cycle : (i) la transition G1/S et (ii) la transition S/G2. La diminution de leur biosynthèse par l'inhibition de l'ODC se traduit par un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. L'inhibition sélective de la SAMdc provoque une élongation de la phase S. Au cours de la transition G2/M, on observe une augmentation de leur catabolisme par la SSAT. (87)

Les polyamines sont capables de réguler l'activité des cyclines, protéines impliquées dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire par l'activation des protéines kinases cycline-dépendantes (CdK). La protéine CdK 4 intervient dans la progression de la phase G1, et CdK 2 est impliquée dans la transition G1/S. Lorsque la concentration cellulaire en polyamines diminue, on observe une réduction de l'expression de la cycline D1, et parallèlement une augmentation de celle des inhibiteurs des CdK 2 et 4 (p21Cip1 et d27Kip1). Ceci conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. On constate également une diminution de l'expression de la cycline A, à l'origine de l'élongation de la phase S associée à une inhibition de la synthèse d'ADN. (87)

Les polyamines participent à la polymérisation des microtubules. Par leur nature polycationique, elles se lient à l'extrémité c-terminale de la tubuline chargée négativement, et jouent le rôle de contre-ion entre les hétérodimères α/β , ce qui favorise leur assemblage. De plus, elles modulent les interactions avec des protéines impliquées dans la stabilisation du réseau de microtubules. (87)

Les polyamines jouent également un rôle dans la prolifération cellulaire par l'intermédiaire de la protéine p53 (89). Ce facteur de transcription n'est que très peu présent dans la cellule à l'état normal. Son activation en situation de stress conduit à l'arrêt du cycle cellulaire ou à l'apoptose. Une forte diminution de la concentration en polyamines est associée à une augmentation de l'expression du gène p53, et en parallèle à une inhibition de celle de MDM2, protéine qui se fixe à p53 et induit sa destruction

(101,102). A l'inverse, l'augmentation de la concentration cellulaire en polyamines s'accompagne d'une augmentation de la prolifération cellulaire (103).

Paradoxalement, une accumulation excessive de polyamines favorise l'apoptose. Ceci peut s'expliquer par une augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène par la polyamine oxydase lors du catabolisme des polyamines (89).

2.1.2.4 Polyamines et fonctions reproductrices mâles

Les polyamines sont produites dans les cellules germinales, ainsi que dans les cellules de Sertoli et de Leydig (92). Leur synthèse est modulée par les gonadotrophines, l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéïnisante (LH) qui agissent sur l'activité de l'ODC. Les polyamines sont nécessaires au fonctionnement des cellules de Leydig et sont impliquées dans la sécrétion des hormones stéroïdiennes (104). Ces molécules ont un rôle dans le développement testiculaire et la spermatogenèse. Des études réalisées chez le rat ont mis en évidence une élévation de l'expression du gène *Odc* dans les spermatogonies au stade prépubère (105,106). D'après les travaux de Kaipia *et al.* (107) l'expression de ce gène évolue au cours des différentes étapes de la spermatogenèse. Une augmentation des taux d'ARNm de *Odc* est observée dans les spermatocytes au cours de la première division méiotique, en particulier au stade pachytène⁸ de la prophase. Cette tendance coïncide avec l'augmentation de la synthèse des ARN totaux dans ces cellules. Ceci témoigne du rôle des polyamines dans la méiose, et dans la régulation de la transcription au cours de la spermatogenèse. Le taux d'expression de *Odc* est également élevé dans les spermatides. Cette dernière observation souligne l'importance des polyamines dans la spermiogénèse, qui correspond à l'étape de différenciation des spermatides en spermatozoïdes. Bien que les polyamines soient essentielles au processus de spermatogenèse, il a été démontré que leur présence en excès pouvait à l'inverse altérer les fonctions reproductrices (109). L'activité de l'ODC est donc régulée par l'antizyme et plus précisément par l'isoforme AZ3, présent dans les cellules germinales. Afin d'éviter toute surproduction de putrescine, AZ3 est capable de désactiver l'ODC (cf. paragraphe 2.1.1.3). AZin2 peut entraver l'effet inhibiteur de AZ3 sur l'ODC et sur le transport de polyamines. Ainsi, le taux de polyamines dépend de la modulation de l'expression du gène *Odc*, mais également d'un équilibre entre les activités de AZ3 in AZin2 (92).

Dans la prostate, l'épididyme et les vésicules séminales, la production de polyamines est régulée par les androgènes (92). La putrescine, la spermidine, et la spermine sont présentes dans le liquide séminal à des concentrations d'environ 0.10, 0.16 et 2.43 mM, respectivement (110). Leur concentration est plus basse dans le sperme de patients infertiles (92). Dans une étude réalisée chez des hommes présentant

⁸ Le stade pachytène correspond à l'un des stades de la prophase de la première division méiotique, au cours duquel les chromatides s'épaississent et se raccourcissent. Les appariements chromosomiques sont achevés, et des événements de recombinaison génétique (crossing-over) se produisent entre les homologues (108).

une oligospermie (111), l'augmentation du taux de polyamines par un traitement par la S-adenosylmethionine (SAM) s'accompagne d'une augmentation du nombre de spermatozoïdes et de la motilité. Les polyamines jouent donc un rôle dans la motilité des spermatozoïdes, par un mécanisme qui n'est pas encore totalement élucidé. Les travaux de Shah *et al.* (112) évoquent une possible intervention de l'adénylate cyclase.

La spermidine et la spermine participent indirectement à la fécondation de l'oocyte. Les travaux de Rubinstein *et al.* (113) ont montré leur implication dans la capacitation des spermatozoïdes et dans la réaction acrosomique. La capacitation est un processus de maturation de la membrane des spermatozoïdes, qui s'accompagne d'une augmentation de la mobilité latérale des protéines et d'une altération de la fluidité membranaire. La spermine inhibe ce processus, et agit comme un facteur décapacitant, en stabilisant la membrane plasmique. Ceci permet d'éviter une réaction acrosomique prématurée, et augmente les chances de succès de la fécondation. La spermidine est également impliquée, mais son effet inhibiteur est moindre. La putrescine quant à elle ne semble pas jouer un rôle dans la capacitation et la fécondation.

2.1.3 Polyamines et cancer

2.1.3.1 Modification du métabolisme des polyamines lors de la cancérogenèse

Les polyamines sont impliquées dans la croissance cellulaire et dans certains processus de différenciation. De nombreuses études ont révélé une accumulation de ces molécules dans des tissus cancéreux.

La relation entre le métabolisme des polyamines et les processus de cancérisation a été très étudiée dans le cas du cancer colorectal (Figure 37). Le mécanisme décrit repose sur l'implication de 2 oncogènes, *Myc* et *k-Ras*, et 2 suppresseurs de tumeur, APC et PPAR γ (103). Nous avons vu précédemment que l'oncogène *Myc* intervient dans le métabolisme des polyamines par stimulation de leur synthèse par l'ODC (cf. paragraphe 2.1.1.3). Dans une cellule normale, le suppresseur de tumeur Adenomatous Polyposis Coli (APC) inhibe la transcription du gène *Myc*, ce qui conduit à un faible taux de transcription de *Odc*, et indirectement à une faible concentration cellulaire en polyamines. APC induit également une stimulation de l'antizyme qui est responsable de l'induction de la dégradation de l'ODC par le protéasome. Chez les individus souffrant de polypose adénomateuse familiale (114), on observe une mutation du gène suppresseur de tumeur *APC*. Ceci provoque une diminution de l'activité de l'antizyme, et une induction de la transcription de l'ongène *Myc*. Le facteur de transcription MYC active la transcription de *Odc*. La mutation de *APC* est donc responsable d'une augmentation de la synthèse des polyamines. (115)

D'autre part, l'oncogène *k-Ras* est impliqué dans la régulation de la transcription de la SSAT (cf. paragraphe 2.1.1.3), par une voie de signalisation dépendante du facteur de transcription PPAR γ . La spermidine/spermine acetyltransferase est une enzyme impliquée dans le catabolisme et la régulation du transport des polyamines. Dans une cellule normale, le facteur PPAR γ active la transcription de la SSAT. La protéine k-RAS est inactive vis-à-vis de PPAR γ . La mutation de *k-Ras* dans les cancers colorectaux a pour effet l'inhibition de l'activité de PPAR γ , On assiste donc à une diminution de l'expression de la SSAT, ce qui réduit le catabolisme et l'efflux des polyamines. (116)

Ainsi, les mutations observées au niveau des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs lors du développement du cancer colorectal induisent à la fois une augmentation de la synthèse des polyamines et une diminution de leur catabolisme.

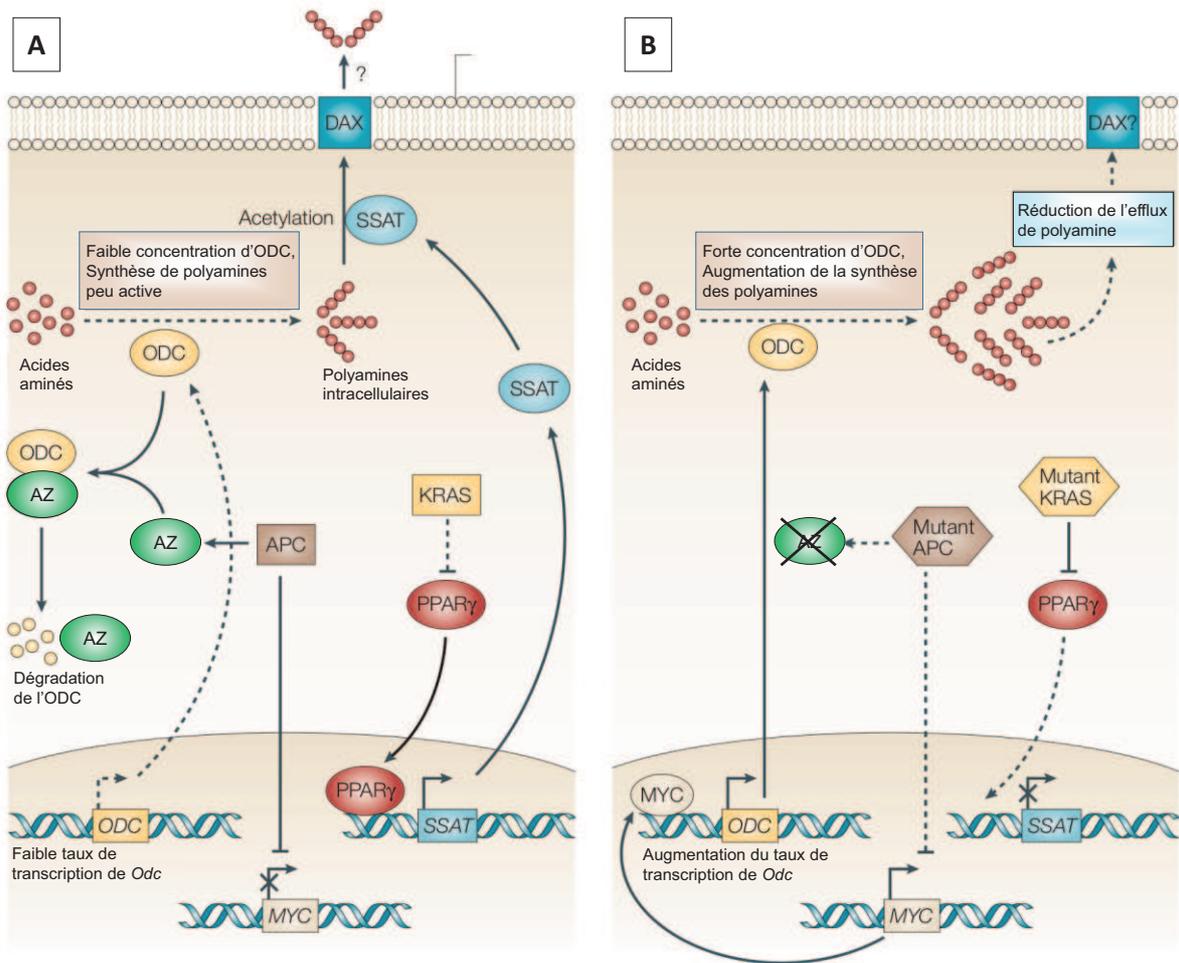


Figure 37 : Régulation du métabolisme des polyamines dans les cellules de la muqueuse du colon par des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le développement du cancer colorectal (117). A : Métabolisme dans une cellule normale. B : Métabolisme dans une cellule cancéreuse.

2.1.3.2 Rôles des polyamines dans le développement des cancers

Bien qu'il soit admis qu'il existe un lien entre le taux de polyamines intracellulaire et le processus de cancérogenèse, le rôle exact de ces molécules dans le développement des cancers reste pour le moment inconnu. L'élévation de la concentration cellulaire en polyamines est associée à (117) :

- une augmentation de la prolifération cellulaire,
- une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le développement tumoral et l'apparition de métastases,
- une diminution de l'apoptose⁹.

De plus, les polyamines sont indispensables à l'angiogenèse, se produisant suite à une lésion tissulaire ou lors du développement tumoral (118).

⁹A noter que dans le cas de concentrations de polyamines extrêmement élevées on assiste au contraire à une stimulation du processus d'apoptose. (cf. paragraphe 2.1.2.3)

2.1.3.3 Les polyamines comme outil diagnostique

Des taux de polyamines anormalement élevés ont été détectés dans les urines de patients souffrant de différents types de cancer. La mesure des taux urinaires de polyamines pourrait donc constituer un outil diagnostique dans ces pathologies. Cependant, ces taux anormalement élevés concernent seulement 80% des patients souffrant de cancer, ce qui suppose un risque important de faux négatifs. Ce paramètre peut cependant s'avérer pertinent pour le suivi de l'efficacité des chimiothérapies, et la prévention des rechutes. Les polyamines sont également détectées dans d'autres fluides biologiques tels que le sang ou le liquide cébrospinal. (119)

2.1.3.4 Métabolisme des polyamines et thérapeutique

Le métabolisme des polyamines constitue une cible dans le traitement des cancers. La première stratégie envisagée a permis de développer des molécules qui inhibent spécifiquement certaines enzymes impliquées dans la biosynthèse. L' α -difluorométhylornithine est un inhibiteur de l'ODC. Ce composé présente des propriétés cytostatique et cytotoxique. Le méthylglyoxal-bis(guanylhydrazone) est un inhibiteur de la SAMdc. Il s'agit d'un analogue de la spermidine, qui a été utilisé comme agent anti-leucémique. La seconde stratégie consiste à cibler plusieurs enzymes simultanément, grâce à des inhibiteurs multisites. Les composés de première génération sont des analogues des polyamines substitués symétriquement, tels que les bis(ethyl)polyamines. La seconde génération de molécules proposée est constituée d'analogues non symétriques. (117,120)

2.2 Polyamines et lésions de l'ADN ?

2.2.1 Effet radioprotecteur des polyamines

Les polyamines, par leur capacité à stabiliser et à condenser l'ADN, le protègent de la formation d'un certain nombre de lésions induites par les radiations. En 1995, Spothem-Maurizot *et al.* ont étudié l'effet des polyamines sur la formation de cassures simple-brin et double-brins produites par radiolyse dans de l'ADN plasmidique (121). Ces travaux ont révélé une diminution de la formation de ces cassures en présence de spermine et de spermidine. Cet effet est nettement moins marqué dans le cas de la putrescine. Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer ces propriétés radioprotectrices. Dans la première, les polyamines auraient un rôle de scavenger vis-à-vis des radicaux OH°. Cet effet peut s'observer localement, au niveau des sites de liaison des polyamines à l'ADN, ou bien couvrir l'ensemble du milieu environnant. La seconde est liée à l'augmentation de la condensation de l'ADN par la spermine et la spermidine, ce qui réduirait l'accessibilité des sites sensibles aux radicaux. Cette dernière hypothèse a été partiellement confirmée par les travaux de Chiu *et al.* dans le cas de la spermine (122). Cette polyamine est en effet capable d'exercer un effet radioprotecteur vis-à-vis des cassures double-brins dans de la chromatine dépourvue d'histone H1, dont la radiosensibilité est accrue. Cet effet n'est pas observé pour la chromatine intacte associée à tous les histones. Cette équipe a également démontré que la présence de putrescine et de spermine était associée à une diminution du taux de pontages ADN-protéines induits par les radiations (123).

En 2000, une étude réalisée par Douki *et al.* (124) a permis de mettre en évidence l'effet protecteur des polyamines vis-à-vis de la formation de certaines modifications de bases induites par les radicaux OH° issus de la radiolyse de l'eau. Une expérience d'irradiation d'ADN isolé par rayonnement γ (50 Gy) a révélé une forte diminution du taux de 8-oxodGuo et de 5-OH-dCyd en présence de spermine à des concentrations supérieures à 100 μ M. Cette tendance est similaire dans le cas de spermidine, mais beaucoup moins marquée pour la putrescine, qui possède moins de charges positives et se lie peu à l'ADN. La liaison des polyamines à l'ADN serait donc un élément clef dans le phénomène de radioprotection. Ceci est confirmé par le fait que l'irradiation de nucléosides avec la spermine est associée à une radioprotection moindre, alors que les polyamines n'interagissent pas avec ses monomères de charge neutre. La spermine est un scavenger des radicaux hydroxyle (125), mais d'après ces travaux ceci n'interviendrait que très partiellement dans son effet protecteur contre les modifications de bases radioinduites. Le mécanisme principal de la radioprotection des polyamines serait une modification de la conformation de l'ADN, avec une compaction de la double hélice qui diminuerait l'accessibilité des sites sensibles aux radicaux hydroxyle. Ainsi, ces molécules exercent leur effet protecteur sur l'ensemble de la molécule, et pas seulement au niveau de leur site de liaison à l'ADN.

2.2.2 Formation d'adduits avec la 8-oxoguanine

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.2.3, la 8-oxodGuo possède un potentiel d'ionisation plus bas que les bases non modifiées, ce qui lui confère une grande sensibilité à l'oxydation pour conduire à l'intermédiaire OGox. Cette espèce est favorable aux additions nucléophiles au niveau de la position C5. Les polyamines sont présentes au contact de l'ADN et représentent des nucléophiles potentiels pour l'addition sur OGox. L'équipe de Burrows a démontré que la spermine était capable de réagir avec la position C5 de OGox, pour former des adduits 5-spm-8-oxoguanine (126). Ces adduits se décomposent partiellement pour produire des lésions présentant une structure de type désoxyribosylurée. Le mécanisme de cette réaction est représenté dans la Figure 38. Au niveau du motif spermine de l'adduit 5-spm-8-oxoguanine, l'amine secondaire en N5 réalise une attaque nucléophile en C5 de la guanine, ce qui se traduit par une cyclisation et aboutit à l'intermédiaire spiroaminal. Ce composé est sensible à l'hydrolyse, ce qui conduit au dérivé désoxyribosylurée.

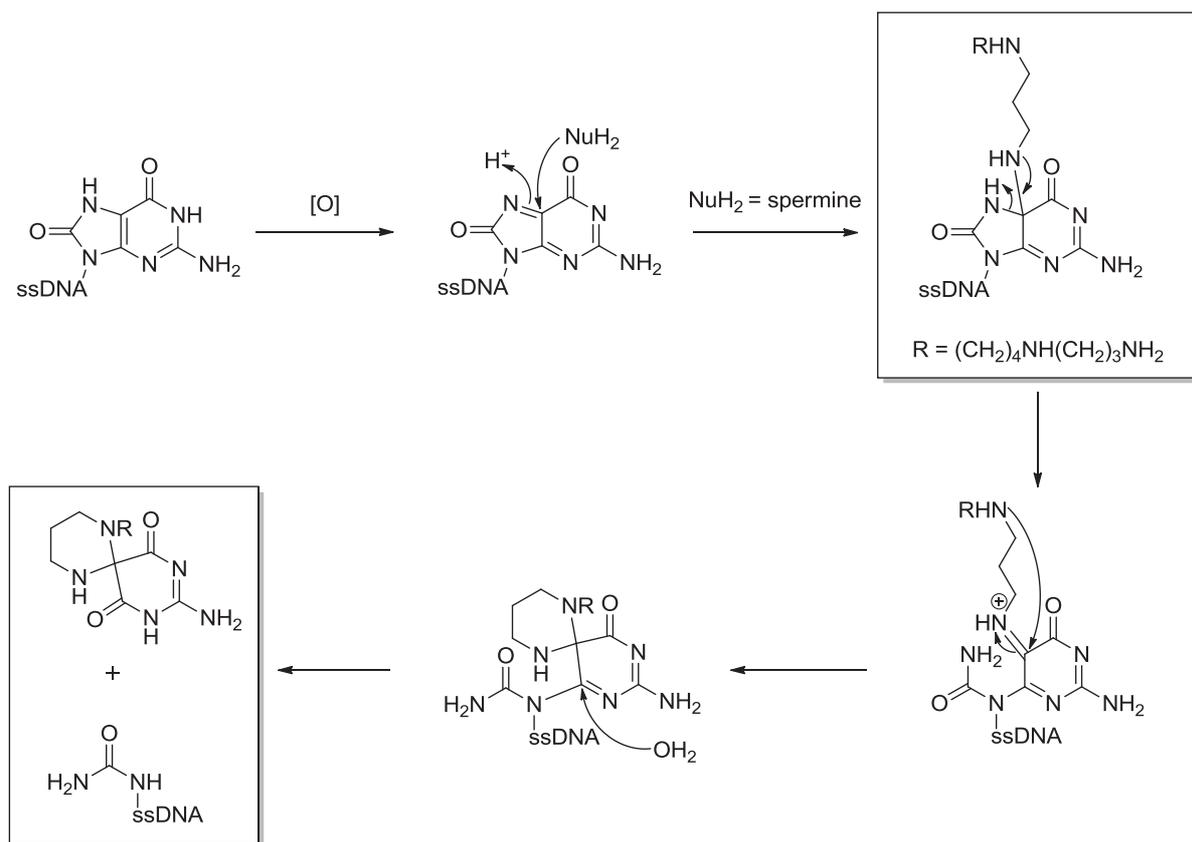


Figure 38 : Mécanisme de formation de l'adduit 5-spm-8-oxoguanine et de ses produits de dégradation, proposé par Hosford et al. (126)

Ce mécanisme est transposable à l'adduit avec le 1,3-aminopropane, qui se dégrade également en désoxyribosylurée, et confirme le mécanisme précédemment décrit (Figure 39). Dans le cas de l'adduit avec une polyamine plus longue, telle que le 1,4-diaminobutane (la putrescine), le produit de dégradation

observé est de type spiroiminodihydroantoiné ; la cyclisation étant moins favorable avec un carbone supplémentaire.

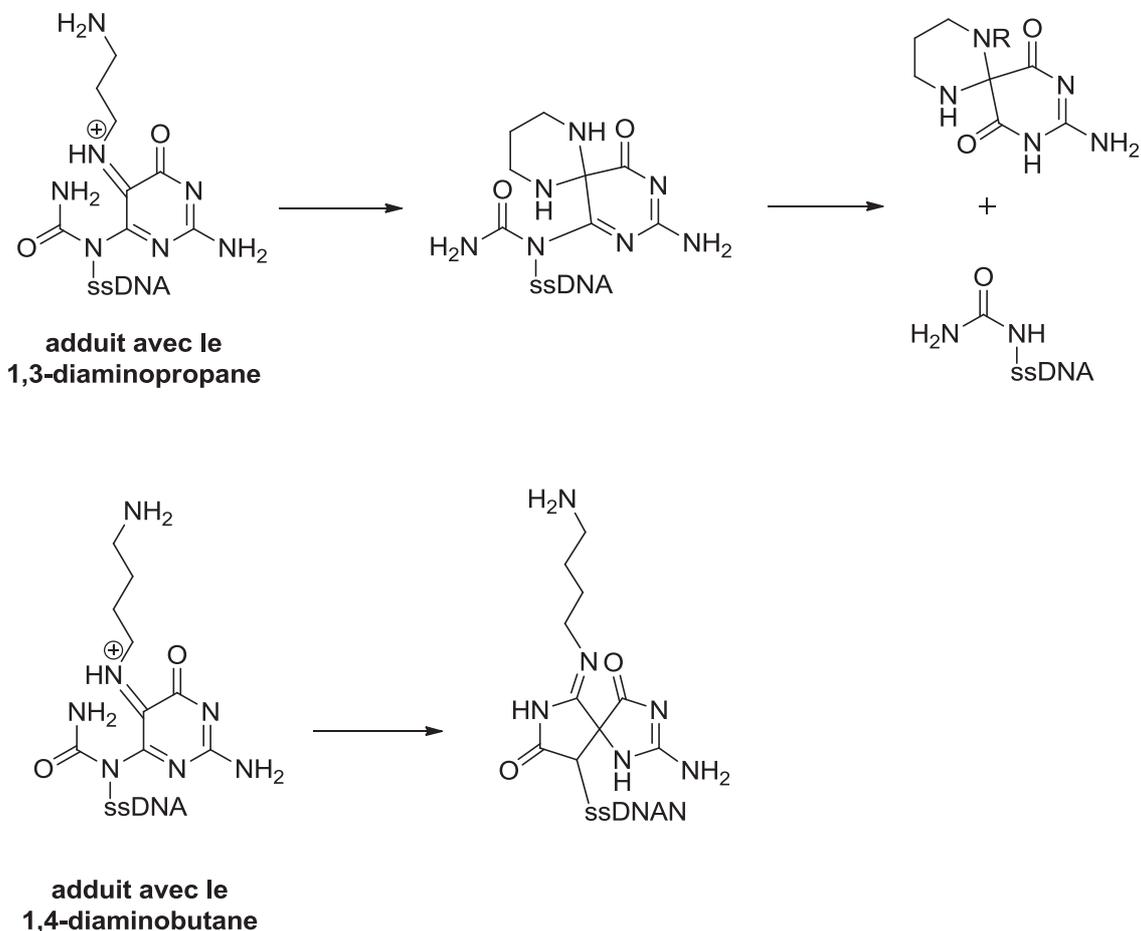


Figure 39 : Produits de dégradation des adduits avec le 1,3-diaminopropane et le 1,4-diaminobutane. (126)

Ces travaux ont donc permis de mettre en évidence la formation d'adduits entre les polyamines et la 8-oxodGuo *in vitro*. A notre connaissance, l'existence de ces lésions au niveau cellulaire ainsi que les éventuelles répercussions physiologiques associées sont actuellement inconnues. Cette étude permet cependant de démontrer la réactivité des polyamines vis-à-vis des bases de l'ADN, et plus précisément avec la position C5 de l'intermédiaire OGox. Il est probable que ces molécules de polyamines présentent une réactivité similaire avec d'autres sites déficitaires en électron, et ainsi être impliquées dans la formation d'autres lésions de l'ADN.

Objectifs de l'étude

Objectifs de l'étude

Ce travail de thèse consiste en l'étude de 2 types de lésions de l'ADN :

- les pontages ADN-protéines
- les pontages ADN-polyamines

Le mécanisme de formation recherché est commun à ces dommages, et fait intervenir le radical cation de la guanine, suite à une oxydation à un électron de l'ADN. Nous avons vu dans le chapitre précédent que cette espèce est impliquée dans la formation de nombreux dommages oxydatifs. Il existe en effet différents nucléophiles capables de s'additionner en position C8 du radical cation de la guanine et de former des adduits. D'après les données décrites dans la littérature, les groupements nucléophiles particulièrement impliqués sont des fonctions alcool (cas du MeOH, (83)) ou bien des amines primaires. Les travaux réalisés sur le peptide trilycine (46) ont permis de mettre en évidence l'addition nucléophile de l'acide aminé lysine sur le radical cation de la guanine d'un oligonucléotide TGT. Il est tout à fait probable qu'une telle réaction puisse jouer un rôle déterminant dans la formation des pontages ADN-protéines. Dans ces travaux nous avons donc entrepris de démontrer que cette réaction de pontage entre la guanine et la lysine pouvait également avoir lieu dans l'ADN double brin. Les adduits guanine-lysine ont par la suite été recherchés dans l'ADN cellulaire.

Il existe actuellement peu de données dans la littérature concernant la structure chimique des pontages ADN-protéines induits par le stress oxydant. Le but de cette étude est d'identifier la nature chimique de ces pontages, et de déterminer s'ils peuvent impliquer la guanine et la lysine. Dans ce but, des modèles de pontage entre des peptides et des oligonucléotides ont été mis au point.

Les polyamines constituent également des nucléophiles potentiels pour cette réaction de formation d'adduits. Ces petites molécules présentes au contact de l'ADN possèdent des amines primaires susceptibles de réagir avec le radical cation de la guanine. Des données préliminaires concernant la formation des adduits guanine-polyamines ont été obtenues par Laure Bobyk, lors de travaux antérieurs réalisés au laboratoire. L'étude de ces lésions a donc fait l'objet de la seconde partie de ce projet. Ces adduits ont été recherchés dans l'ADN extrait de spermatozoïdes, afin de mieux comprendre l'implication biologique des polyamines dans les fonctions reproductrices mâles et la fertilité masculine.

Ces deux types de dommages ont été étudiés en adoptant la même stratégie. Dans un premier temps, les lésions ont été synthétisées chimiquement, sous la forme de nucléosides modifiés, puis caractérisées à l'aide de différentes méthodes d'analyse structurale. Nous avons ensuite développé des méthodes analytiques par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem, afin de pouvoir les détecter et mesurer leurs taux de formation dans l'ADN isolé puis dans l'ADN cellulaire. Les outils analytiques développés permettent d'envisager l'étude des conséquences biologiques de ces lésions.

Chapitre 2 :

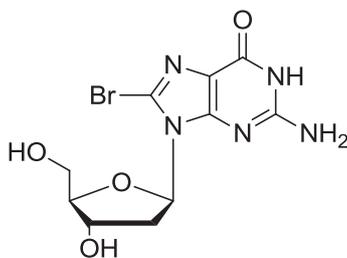
Partie expérimentale

1 Synthèse et caractérisation des standards

1.1 Réactifs

Le *N*-bromosuccinimide, le 1,4-diaminobutane (putrescine), la spermidine, la spermine, la triéthylamine, la L-lysine, l'acide trifluoroacétique, ainsi que les solvants utilisés pour la synthèse proviennent de chez Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La 2'-désoxyguanosine a été fournie par Pharma Waldhof (Düsseldorf, Germany). L'acide formique et les solvants pour HPLC proviennent de VWR BDH Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France).

1.2 Bromation de la 2'-désoxyguanosine

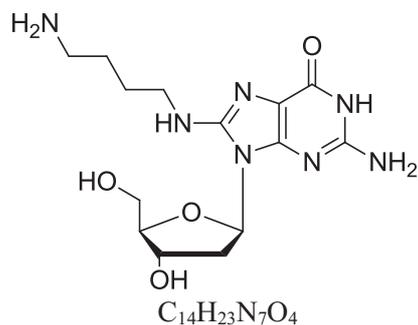


8-bromo-2'-deoxyguanosine (8-Br-dGuo)

4g (15 mmoles) de 2'-désoxyguanosine sont mis en suspension dans un mélange d'eau (40 mL) et d'acétonitrile (160 mL). Le *N*-bromosuccinimide (4g, 22.5 mmoles) est ajouté en 3 fois à 0°C. Le mélange réactionnel est agité pendant 30 min à température ambiante, puis concentré sous pression réduite. Le résidu est ensuite repris dans l'acétone (80 mL) puis agité pendant 2h à température ambiante. Le précipité observé est ensuite isolé par filtration sur Büchner. Le filtrat est rincé 2 fois à l'acétone froid, et séché sous vide. On obtient 3,85 g (11,1 mmoles) d'une poudre légèrement rosée avec un rendement de 74%. Ce composé est utilisé pour la suite de la synthèse sans purification supplémentaire.

¹H NMR (D₂O, 200 MHz, δ): 2.13 (ddd, 1H, *J*= 2.3, 6.5, 13.6 Hz, H2''), 3.07 (ddd, 1H, *J*= 6.3, 8.1, 13.6 Hz, H2'), 3.64 (dd, 1H, *J*= 4.2, 12.0 Hz, H5''), 3.75 (dd, 1H, *J*= 3.4, 12.0 Hz, H5'), 3.89-3.95 (m, 1H, H4'), 4.48-4.54 (m, 1H, H3'), 6.30 (dd, 1H, *J*= 6.5, 8.1 Hz, H1').

1.3 Synthèse des adduits 8-polyamine-dGuo



M= 353,38 g/mol

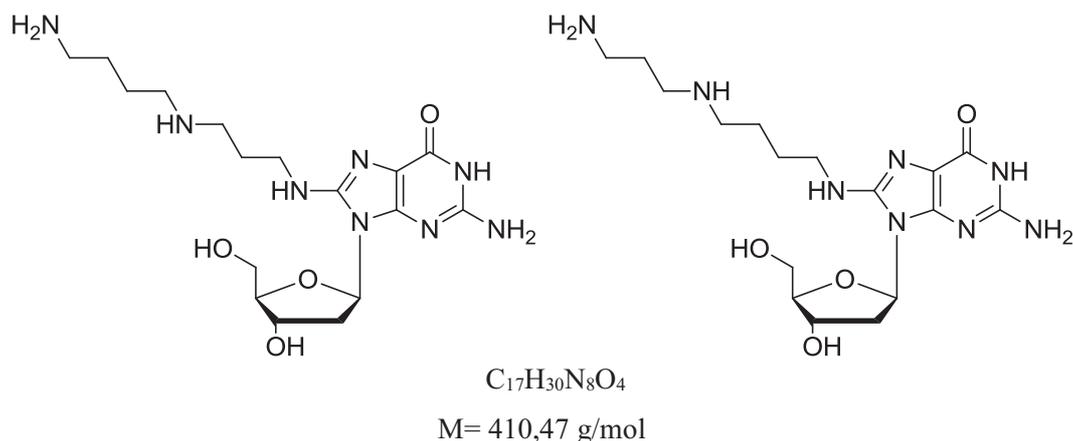
8-((4-aminobutyl)amino)-2'-deoxyguanosine (8-put-dGuo)

La 8-Br-dGuo (69 mg, 0,2 mmole) est mise en solution dans 1,2 mL de DMSO avec du 1,4 diaminobutane (100 μ L, 1 mmole). De la triéthylamine est ajoutée (135 μ L, 1 mmole), puis le mélange réactionnel est chauffé pendant 15h à 110°C sous agitation. Le brut réactionnel est dilué au 1/10^e dans l'eau, neutralisé par HCl, et injecté par HPLC phase inverse. La purification est réalisée sur une colonne C18 (Interchim Uptisphere 5 μ m ODB 250*4.6 mm), avec un débit de 1 mL/min. La phase mobile est constituée d'acide trifluoroacétique à 0,1% (éluant A) avec un gradient d'acétonitrile (éluant B) de 0 à 14% en 21 min. Le composé élué à 15 min (k' =3.41) est collecté, concentré et lyophilisé. Les conditions décrites pour la purification par HPLC peuvent être adaptées pour le suivi de l'avancement de la réaction : le brut réactionnel est alors dilué au 1/100^e et le gradient d'acétonitrile est réglé à 1% par min. Cette réaction de substitution présente un taux de conversion de 25% d'adduit.

¹H NMR (D₂O, 500 MHz, δ): 1.70-1.78 (m, 4H, H_{putB,C}), 2.26 (ddd, 1H, J = 1.8, 6.6, 14.5 Hz, H2''), 2.77 (ddd, 1H, J = 6.6, 8.4, 14.5 Hz, H2'), 3.02-3.08 (m, 2H, H_{putD}), 3.34-3.42 (m, 2H, H_{putA}), 3.88 (dd, 1H, J = 2.3, 12.4 Hz, H5''), 3.92 (dd, 1H, J = 2.1, 12.4 Hz, H5'), 4.12-4.14 (m, 1H, H4'), 4.63-4.65 (m, 1H, H3'), 6.31 (dd, 1H, J = 6.6, 8.4 Hz, H1').

MALDI-HRMS m/z for C₁₄H₂₄N₇O₄⁺ ([M+H]⁺): calculé 354.1890, mesuré 354.1883.

UV(H₂O) : λ_{\max} = 260 nm, ϵ = 16930 L.mol⁻¹.cm⁻¹



8-((3-((4-aminobutyl)amino)propyl)amino)-2'-deoxyguanosine (8-spd-dGuo, isomère 1)

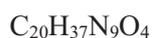
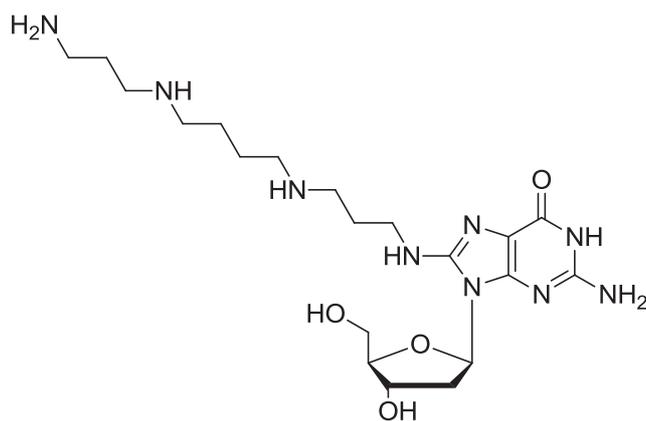
8-((4-((3-aminopropyl)amino)butyl)amino)-2'-deoxyguanosine (8-spd-dGuo, isomère 2)

La synthèse est effectuée selon la procédure décrite pour le 8-put-dGuo en faisant réagir 1 équivalent de 8-Br-dGuo, 5 équivalents de spermidine et 5 équivalents de triéthylamine. L'avancement de la réaction est suivi par HPLC-UV (cf page précédente). Le taux de conversion atteint environ 25% d'adduits. Le brut réactionnel est purifié par HPLC dans les conditions détaillées pour la 8-put-dGuo, avec un gradient d'éluant B de 0 à 12 % en 20 min. Les 2 composés élués à 14.3 min ($k'=3.21$) et 15.7 min ($k'=3.62$), correspondant aux 2 isomères de l'adduit 8-spd-dGuo, sont collectés. Ces 2 isomères présentent des caractéristiques RMN et UV similaires.

$^1\text{H NMR (D}_2\text{O, 500 MHz, } \delta)$: 1.76-1.80 (m, 3H, H_{spd}), 2.06-2.12 (m, 3H, H_{spd}), 2.34 (ddd, 1H, $J = 2.2, 6.1, 14.3 \text{ Hz}$, $H2''$), 2.74 (ddd, 1H, $J = 6.5, 9.1, 14.3 \text{ Hz}$, $H2'$), 3.09-3.12 (m, 4H, H_{spd}), 3.14-3.18 (m, 2H, H_{spdG}), 3.44-3.47 (m, 2H, H_{spdA}), 3.88 (dd, 1H, $J = 2.8, 12.4 \text{ Hz}$, $H5''$), 3.94 (dd, 1H, $J = 2.1, 12.4 \text{ Hz}$, $H5'$), 4.19-4.20 (m, 1H, $H4'$), 4.63-4.66 (m, 1H, $H3'$), 6.42 (dd, 1H, $J = 6.1, 9.1 \text{ Hz}$, $H1'$).

MALDI-HRMS m/z for $C_{17}H_{31}N_8O_4^+$ ($[M+H]^+$): calculé 411.2468, mesuré 411.2534.

UV(H_2O) : $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$, $\epsilon = 19590 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$



$$M = 467,57 \text{ g/mol}$$

8-((3-((4-((3-aminopropyl)amino)butyl)amino)propyl)amino)-2'-deoxyguanosine (8-spm-dGuo)

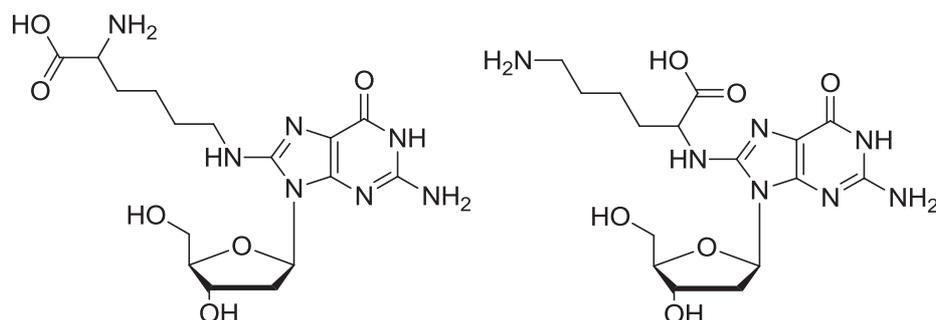
La synthèse est effectuée selon la procédure décrite pour la 8-put-dGuo en faisant réagir 1 équivalent de 8-Br-dGuo, 5 équivalents de spermine et 5 équivalents de triéthylamine. L'avancement de la réaction est suivi par HPLC. Le taux de conversion observé se situe aux alentours de 23%. Le brut réactionnel est purifié par HPLC dans les conditions détaillées pour la 8-put-dGuo, avec un gradient d'éluant B de 0 à 14 % en 21 min. Le composé élué à 13.8 min ($k' = 3.06$) est collecté.

$^1\text{H NMR}$ (D_2O , 500 MHz, δ): 1.36-1.39 (m, 4H, $\text{H}_{\text{spmE,F}}$), 1.64-1.72 (m, 4H, $\text{H}_{\text{spmB,I}}$), 1.94 (ddd, 1H, $J = 2.0, 6.2, 14.3$ Hz, $\text{H}2''$), 2.35 (ddd, 4H, $J = 6.3, 8.6, 14.3$ Hz, $\text{H}2'$), 2.68-2.72 (m, 8H, $\text{H}_{\text{spmC,D,G,H}}$), 2.74-2.77 (m, 2H, H_{spmJ}), 3.09-3.13 (m, 2H, H_{spmA}), 3.48 (dd, $J = 2.6, 12.4$ Hz, $\text{H}5''$), 3.53 (dd, $J = 2.4, 12.4$ Hz, $\text{H}5'$), 3.77-3.79 (m, 1H, $\text{H}4'$), 4.23-4.25 (m, 1H, $\text{H}3'$), 5.99 (dd, $J = 6.2, 8.6$ Hz, $\text{H}1'$).

MALDI-HRMS m/z for $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_9\text{O}_4^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): calculé 468.3047, mesuré 468.3094.

UV(H_2O) : $\lambda_{\text{max}} = 258$ nm, $\epsilon = 20820$ $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

1.4 Synthèse des adduits 8-lys-dGuo et 8-lys-Gua



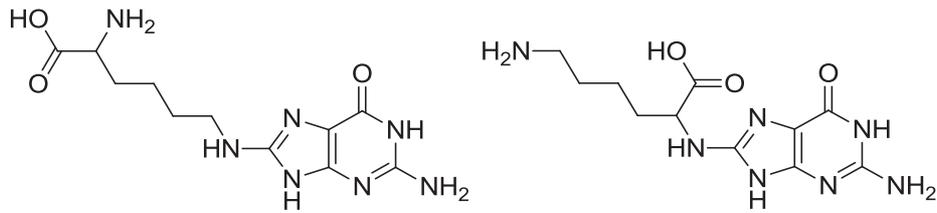
8((5-carboxy-5-amino-pentanyl)amino)-2'-deoxyguanosine (isomère 1)

8((1-carboxy-5-amino-pentanyl)amino)-2'-deoxyguanosine (isomère 2)

La 8-Br-dGuo (34 mg, 0,1 mmole) est mise en solution dans 500 μ L de DMSO avec de la L-lysine (73 mg, 0,5 mmole). 1 mL de NaOH à 1N est ajouté, puis le mélange réactionnel est chauffé pendant 8h à 110°C sous agitation. L'avancement de la réaction est suivi par HPLC-UV, dans les conditions décrites pour la substitution par la putrescine. Cette réaction de substitution présente un taux de conversion de 8% d'adduits 8-lys-dGuo. Le brut réactionnel est dilué au 1/10^e dans l'eau, neutralisé par HCl, et injecté par HPLC phase inverse. La purification est réalisée sur une colonne C18 (Interchim Uptisphere 5 μ m ODB 250*4.6 mm), avec un débit de 1 mL/min. La phase mobile est constituée d'acide trifluoroacétique à 0,1% (éluant A) avec un gradient d'acétonitrile (éluant B) de 0 à 10% en 20 min. Le composé élué à 18 min (k' =4.29) est collecté, concentré et lyophilisé.

¹H NMR (D₂O, 500 MHz, δ): 1.41-1.53 (m, 2H, H_{lys}C), 1.67-1.75 (m, 2H, H_{lys}B), 1.87-1.91 (m, 2H, H_{lys}D), 2.32 (ddd, 1H, $J = 2.3, 6.0, 14.3$ Hz, H_{2''}), 2.70 (ddd, 1H, $J = 6.3, 8.8, 14.5$ Hz, H_{2'}), 3.38-3.44 (m, 2H, H_{lys}A), 3.72-3.76 (m, 2H, H_{lys}E), 3.87 (dd, 1H, $J = 2.8, 12.5$ Hz, H_{5''}), 3.93 (dd, 1H, $J = 2.0, 12.5$, H_{5'}), 4.17-4.18 (m, 1H, H_{4'}), 4.62-4.64 (m, 1H, H_{3'}), 6.41 (dd, 1H, $J = 6.5, 9.0$ Hz, H_{1'}).

UV(H₂O) : $\lambda_{\text{max}} = 251 \text{ nm}$, $\epsilon = 25540 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$



$$M = 295,30 \text{ g/mol}$$

8((5-carboxy-5-amino-pentyl)amino)-guanine (isomère 1)

8((1-carboxy-5-amino-pentyl)amino)-guanine (isomère 2)

Une solution de 8-lys-dGuo (50 nmoles) est concentrée au speed-vac. Le résidu est repris dans 500 μL d'acide formique à 60% v/v. Cette solution est chauffée à 100°C pendant 20 min. L'acide formique est ensuite évaporé au speed-vac. L'adduit 8-lys-Gua obtenu est dilué dans de l'eau milliQ puis la solution est calibrée par mesure de l'absorbance à 255 nm.

1.5 Caractérisation des adduits

1.5.1 Détermination de la masse exacte

Les échantillons sont analysés par un spectromètre de masse MALDI-TOF (Bruker Microflex), avec une matrice composée d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (Sigma, St. Louis, MO). L'acquisition est effectuée en mode réflectron, avec une ionisation en mode positif. On réalise une calibration interne à l'aide d'une solution de standard de Tyrosine 1,3,6 (CS Bio Co, Menlo Park, CA). La matrice est préparée par dissolution de l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique dans un mélange acétonitrile / eau (1/1), puis la solution obtenue est diluée 8 fois dans le même solvant. A 1 μ L de cette matrice sont ajoutés 1 μ L d'échantillon à caractériser, et 1 μ L de solution de standard calibrée. Après agitation le mélange obtenu est déposé sur la cible qui est ensuite séchée. 3 composés de rapports m/z allant de 190.0504 à 997.3978 sont utilisés pour la calibration interne, en mode « cubic enhanced ». La résolution à 400 Da se situe aux alentours de 2000.

1.5.2 RMN et UV

L'acquisition des spectres RMN est réalisée sur des spectromètres Bruker Avance DMX 200 et Bruker Avance 500, à 295 K, dans 400 μ L de CD₃OD (pureté isotopique > 99,8%), de D₂O (pureté isotopique : 99,95 %) ou de CDCl₃ (pureté isotopique > 99,96%). Les solvants pour RMN proviennent de chez Euriso-top (Gif-sur-Yvette, France).

Les spectres UV des composés synthétisés sont obtenus entre 200 et 400 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Uvikon 930 de chez Kontron Instruments.

2 Méthodes d'analyse par HPLC-MS/MS

Les analyses par HPLC-MS/MS ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse TSQ Quantum Ultra de chez Thermo Scientific. La source d'ionisation est de type électrospray, et l'analyseur est constitué d'un triquadripôle. Le spectromètre est couplé à une chaîne HPLC provenant du même fabricant, composée d'une pompe Thermo Accela, d'un injecteur Accela thermostaté comprenant un four à colonne également thermostaté, et d'un détecteur à barrettes de diodes Accela. Les données sont traitées grâce au logiciel Xcalibur.

2.1 Quantification des adduits 8-polyamines-dGuo

Les échantillons d'ADN hydrolysés sont au préalable supplémentés en putrescine, spermidine et spermine (concentration finale de chaque polyamine : 0,5 mM). Les solutions calibrées de standard sont également supplémentées à la même concentration.

La séparation des nucléosides provenant de la digestion enzymatique est effectuée grâce à une colonne Uptisphere ODB 3 μ M 150 * 2,1 mm de chez Interchim. Le débit est réglé à 0,2 mL/min avec une phase mobile constituée d'acide trifluoroacétique à 0,1% dans l'eau (éluant A) et un gradient de méthanol (éluant B) de 0 à 25 % en 20 min. Les nucléosides normaux sont dosés par détection UV à 280 nm. Le mode « Multiple Reaction Monitoring » (MRM) est utilisé, pour détecter 2 transitions spécifiques de chaque adduit :

- 354.3 \rightarrow 221.2 (EC=22) et 354.3 \rightarrow 238.5 (EC=15) pour **8-put-dGuo**;
- 468.2 \rightarrow 207.1 (EC=38) et 468.2 \rightarrow 352.3 (EC=24) pour **8-spm-dGuo**;
- 411.5 \rightarrow 207.2 (EC=25) et 411.5 \rightarrow 221.3 (EC=30) pour **8-spd-dGuo**.

PARAMETRE	VALEUR OPTIMISEE
SPRAY VOLTAGE	5000
VAPORIZER TEMPERATURE	200
SHEATH GAS PRESSURE	35
ION SWEEP GAS PRESSURE	0.0
AUX GAS PRESSURE	30
CAPILLARY TEMPERATURE	250
SKIMMER OFFSET	-10
COLLISION PRESSURE	1.4

Pour chaque série d'échantillons, des solutions calibrées de nucléosides normaux, de 8-oxodGuo, et d'adduits polyamines-dGuo sont injectées pour vérifier la sensibilité du système de détection MS/MS.

Après environ 10 échantillons, ces standards sont injectés à nouveau afin de s'assurer de la stabilité de la détection au cours du temps. Le taux de nucléosides normaux et de lésions sont mesurés par calibration externe, par détection UV et MS/MS respectivement. Les résultats sont exprimés en nombre de lésions (8-oxodGuo et adduits 8-polyamines-dGuo) par million de nucléosides.

2.2 Quantification de l'adduit 8-lys-dGuo

La séparation des nucléosides provenant de la digestion enzymatique est effectuée grâce à la même colonne que précédemment (cf paragraphe 2.1.). Le débit est réglé à 0,2 mL/min avec une phase mobile constituée d'acide trifluoroacétique à 0,1% dans l'eau (éluant A) et un gradient de méthanol (éluant B) de 0 à 30 % en 30 min. Les nucléosides normaux sont dosés par détection UV à 280 nm. La détection en mode MRM s'effectue par 2 transitions spécifiques de l'adduit 8-lys-dGuo : 412.4 -> 296.0 (EC=16) et 412.4 -> 233.0 (EC=28).

Comme il été décrit pour les adduits 8-polyamines-dGuo, des solutions calibrées de standard sont injectées régulièrement et la quantification est réalisée par calibration externe, par détection UV et MS/MS. Les résultats sont exprimés en nombre de lésions (8-oxodGuo et adduits 8-lysine-dGuo) par million de nucléosides.

PARAMETRE	VALEUR OPTIMISEE
SPRAY VOLTAGE	4500
VAPORIZER TEMPERATURE	300
SHEATH GAS PRESSURE	40
ION SWEEP GAS PRESSURE	0
AUX GAS PRESSURE	10
CAPILLARY TEMPERATURE	250
SKIMMER OFFSET	-10
COLLISION PRESSURE	1.4

2.3 Quantification de l'adduit 8-lys-Gua

La séparation des bases nucléiques provenant de l'hydrolyse acide est effectuée grâce à une colonne Uptisphere ODB 3 µM 150 * 2,1 mm de chez Interchim. Le débit est réglé à 0,2 mL/min avec une phase mobile constituée de formiate d'ammonium à 0,5 mM dans l'eau (éluant A) et un gradient de méthanol (éluant B) de 0 à 20 % en 20 min. La détection de l'adduit 8-lys-Gua en mode MRM s'effectue par 3 transitions spécifiques : 296.1 -> 233.1 (EC=20), 296.1 -> 251.1 (EC=22) et 296.1 -> 205.1 (EC=32).

Chapitre 2 : Partie expérimentale

La guanine normale est également détectée en mode MRM avec 2 transitions spécifiques : 153.0 -> 111.0 (EC=20) et 154.0 -> 137.0 (EC=20).

Le taux de guanines non modifiées et d'adduits sont mesurés par calibration externe, par détection MS/MS. Les résultats sont exprimés en nombre de lésions par million de bases, en considérant que la guanine représente 20,95% des bases.

PARAMETRE	VALEUR OPTIMISEE
SPRAY VOLTAGE	3000
VAPORIZER TEMPERATURE	250
SHEATH GAS PRESSURE	20
ION SWEEP GAS PRESSURE	0
AUX GAS PRESSURE	20
CAPILLARY TEMPERATURE	250
SKIMMER OFFSET	-10
COLLISION PRESSURE	1.4

3 Formation d'adduits dans l'ADN isolé

Ces expériences sont réalisées sur de l'ADN double brin extrait de thymus de veau (Sigma-Aldrich). La riboflavine utilisée pour la photosensibilisation provient de chez BDH Chemicals (Poole, England) et les enzymes pour l'hydrolyse d'ADN de chez Sigma-Aldrich.

3.1 Photosensibilisation

L'ADN isolé est mis en solution dans l'eau à une concentration de 0,1 ou 0,5 mg/mL, en présence de 40 μ M de riboflavine, de NaCl à 0,2 M et de différentes concentrations de putrescine, spermidine, spermine ou de lysine (0, 100, 500 ou 1000 μ M). 1 ou 2 mL de cette préparation sont placés dans un petit flacon en verre de 4 mL. L'irradiation s'effectue à température ambiante par une lampe halogène de 500 W placée à 20 cm. Un réfrigérant est placé à mi-distance entre la lampe et l'échantillon. Les solutions sont saturées en oxygène par un bullage d'air comprimé en continu. 50 μ L sont prélevés en triplicats à 0, 1, 2, 5 et 10 min. L'ADN est immédiatement précipité.

3.2 Irradiation gamma

L'irradiation est réalisée sur des échantillons de 50 μ L de préparation d'ADN placée dans des eppendorf de 1,5 mL. L'ADN est en solution dans l'eau à une concentration de 0,5 mg/mL, avec différentes concentrations de putrescine, spermidine, spermine ou de lysine (0, 100, 500 ou 1000 μ M). Les échantillons sont placés à proximité d'une source de cobalt 60, à une distance permettant d'obtenir un débit de 7 Gy/min. La source est immergée sous une hauteur d'eau d'environ 3 mètres à température ambiante afin de protéger le manipulateur.

3.3 Exposition au rayonnement laser

Le dispositif utilisé pour l'irradiation est un laser Brilliant B de chez Quantel. La source laser est constituée d'un cristal de type Nd : YAG et génère un faisceau de longueur d'onde initiale 1064 nm. La durée de chaque impulsion est de 5 nanosec. La conversion en rayonnement UV de longueur d'onde 266 nm est effectuée par deux doublements de fréquence consécutifs (1064→538→266 nm) à l'aide d'un générateur de seconde harmonique. Un système de mesure est utilisé pour vérifier l'énergie délivrée : le faisceau est partiellement dévié (environ 8 % des photons) par une succession de lames de quartz vers un détecteur de type photodiode de chez Ophir.

L'irradiation est réalisée sur des échantillons de 20 μL de préparation d'ADN placée dans des eppendorf de 0,1 mL. L'ADN est en solution dans l'eau à une concentration de 0,5 mg/mL, avec différentes concentrations de putrescine, spermidine, spermine ou de lysine (0, 100 ou 500 μM). Chaque eppendorf est ouvert et placé horizontalement dans l'axe du faisceau. On délivre 1, 3 ou 5 impulsions laser à 110-120 mJ par pulse (ce qui représente une énergie de 950 à 1000 $\text{mJ}/\text{cm}^2/\text{pulse}$).

3.4 Précipitation de l'ADN

A chaque échantillon d'ADN en solution, sont ajoutés successivement 0,2 volume de NaCl 4 M et 2,5 volumes d'éthanol absolu. Les échantillons sont vortexés puis centrifugés 3 min à 1500 g. Les culots d'ADN sont rincés par 2,5 volumes d'éthanol à 70%. Après centrifugation le surnageant d'éthanol est retiré. Cette étape de rinçage est réalisée à 2 reprises lors du traitement par les polyamines. L'ADN est ensuite hydrolysé soit par un cocktail enzymatique, soit par l'acide chlorhydrique. Dans le cas de l'hydrolyse acide il est préférable d'évaporer l'éthanol résiduel au speed-vac au préalable.

3.5 Hydrolyse enzymatique des échantillons d'ADN (176)

L'ADN est mis en solution dans 50 μL d'eau ou de déféroxamine à 0,1 mM. A chaque échantillon sont ajoutés :

- 2,5 μL de tampon MNSPDE (acide succinique 200 mM, CaCl_2 100 mM, pH 6),
- 0,025 U de phosphodiesterase II,
- 2,5 U de DNase II,
- 0,5 U de nucléase P1 dans 2,5 μL de tampon P1 (acétate d'ammonium 300 mM, ZnSO_4 1 mM, pH 5,3).

Après 2h d'incubation à 37°C, on ajoute dans chaque échantillon :

- 6 μL de tampon de phosphatase alcaline (Tris 500 mM, EDTA 1 mM, pH 8),
- 0,015 U de phosphodiesterase I,
- 2 U de phosphatase alcaline.

Les échantillons sont à nouveau incubés 2 h à 37 °C avant d'ajouter 3,5 μL d'HCl à 0,1 N. Ils sont ensuite transférés en vials HPLC. L'éthanol résiduel de l'étape de précipitation d'ADN est éventuellement évaporé au speed-vac. Le mélange de nucléosides obtenu est analysé par HPLC-MS/MS.

3.6 Hydrolyse acide des échantillons d'ADN

Les culots secs d'ADN sont repris dans 200 μ L d'acide chlorhydrique 6N. Les échantillons sont ensuite agités pendant 15h à 105°C. L'acide chlorhydrique est évaporé au speedvac, puis l'hydrolysate d'ADN est remis en solution dans l'éluant HPLC (formiate d'ammonium 0,5 mM pour l'analyse des adduits 8-lys-Gua).

4 Etude réalisée sur la lignée cellulaire THP1

4.1 Produits et matériel utilisés

Le milieu de culture (RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement, HEPES), le sérum de veau fœtal (SVF), les antibiotiques, les acides aminés non essentiels (MEM/NEAA), le PBS (sans CaCl₂ et MgCl₂ : DPBS) proviennent de chez Life Technologies (Saint-Aubin, France). Les cellules ont été cultivées dans des flasques et dans des plaques multi-puits de chez BD Falcon. Pour les récoltes, des tubes de 15 ou 50 mL du même fournisseur ont été utilisés. Les cryotubes pour la congélation proviennent de chez Greiner Bio-One. La numération des cellules a été effectuée par un compteur automatique Countess de chez Life Technologies, équipé de lames à usage unique. Le MTT, le DMSO, l'agarose, le FITC ainsi que les différents réactifs utilisés pour la préparation des tampons proviennent de chez Sigma-Aldrich. Il en est de même pour les enzymes nécessaires à l'extraction d'ADN, sauf la protéase qui est fournie par Qiagen et la RNase T1 qui provient de Roche Diagnostics (Manheim, Allemagne).

4.2 Conditions de culture

La lignée THP1 est une lignée monocyttaire isolée du sang périphérique d'un patient souffrant d'une leucémie monocyttaire aigue. Les cellules sont mises en culture dans du milieu RPMI 1640 supplémenté en GlutaMAX, HEPES et Phenol Red, auquel on ajoute 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 1% d'une solution d'acides aminés non essentiels MEM 100 X et 1% d'un mélange de pénicilline (5000 U/mL) et de streptomycine (5000 µg/mL). La lignée se développe à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Les cellules sontensemencées dans 50 mL de milieu, dans des flasques de 75 cm², à une concentration de 50000 cellules par mL. La maintenance de la lignée est effectuée 2 fois par semaine par dilution au 1/5^e dans du milieu neuf.

4.3 Congélation

La suspension cellulaire est centrifugée à 1170 g pendant 5 min après comptage. Le surnageant est aspiré, puis le culot est repris délicatement par la solution de congélation (SVF décomplémenté + 10% de DMSO). Les cellules sont transférées dans des cryotubes (1 mL/tube, 4 millions de cellules/tube environ), puis congelées à -80°C pendant une nuit. Les cryotubes sont ensuite stockés dans l'azote liquide.

4.4 Traitement des cellules par différents agents exogènes

4.4.1 Photosensibilisation des cellules THP1

Les suspensions cellulaires sont transférées dans des tubes Falcon de 50 mL, puis centrifugées à 1170 g pendant 5 min. Les culots cellulaires sont repris par 2 mL de PBS puis centrifugés à nouveau. Le surnageant est retiré, puis on ajoute une solution de riboflavine à 200 μ M dans du PBS. Les échantillons cellulaires sont incubés pendant 30 min à 37°C. Cette étape est nécessaire pour permettre la pénétration cellulaire de la riboflavine.

Les cellules sont centrifugées et rincées à 2 reprises avec du PBS. Elles sont ensuite remises en suspension avec précaution dans 9 mL de PBS et transférées dans des plaques 6 puits (3 mL de suspension cellulaire soit 10 millions de cellules/puit). Les plaques sont déposées sur de la glace pilée et irradiées à l'aide d'une lampe UVA de 700 W (système Waldmann UVA 700L, équipé d'un dosimètre intégré) à des doses de 0, 50 et 100 mJ/cm². Après l'irradiation, les suspensions cellulaires sont transférées dans des tubes Falcon puis centrifugées. Les culots sont repris dans 2 mL de PBS, puis chaque échantillon est divisé en 2 dans des eppendorf de 2 mL. Après centrifugation, les culots sont congelés à -20 °C. On dispose donc de 2 séries de triplicats (~ 5 millions de cellules par culot); la première série est destinée au dosage de la 8-oxodGuo et la seconde au dosage des adduits. Un test de cytotoxicité est effectué en parallèle (cf paragraphe 4.5.).

4.4.2 Irradiation gamma

Les suspensions cellulaires sont transférées dans des tubes Falcon de 50 mL puis centrifugées à 1170 g pendant 5 min. Les culots cellulaires sont repris par 2 mL de PBS puis centrifugés à nouveau. Le surnageant est retiré, puis on ajoute 500 μ L de PBS. Les suspensions cellulaires sont ensuite transférées dans des eppendorf de 2 mL. Les échantillons sont transportés dans la glace. Avant chaque irradiation, les cellules sont remises en suspension délicatement. Les échantillons sont ensuite placés à proximité de la source de cobalt 60 pour l'irradiation (cf paragraphe 3.2.)

Pour le test des comètes, 750.000 cellules sont prélevées dans chaque échantillon : après centrifugation, les culots cellulaires sont repris dans 300 μ L tampon de congélation « comètes » (cf paragraphe 4.7.1.), placés dans 3 cryotubes (250.000 cellules/100 μ L par tube), puis congelés à -80 °C.

Pour la quantification d'adduits par HPLC-MS/MS, les suspensions cellulaires restantes sont divisées en 2 dans des eppendorf de 2 mL (environ 10 millions de cellules/tube) : après centrifugation, les culots sont congelés à -20°C.

4.4.3 Exposition au rayonnement laser à 266 nm

Les suspensions cellulaires sont transférées dans des tubes Falcon de 50 mL puis centrifugées à 1170 g pendant 5 min. Les culots cellulaires sont repris par 2 mL de PBS puis centrifugés. Le surnageant est retiré, puis on ajoute 1 mL de PBS. Les suspensions cellulaires sont ensuite transférées dans des eppendorf de 1,5 mL, puis centrifugées à nouveau. Les culots cellulaires sont repris dans 100 µL de PBS, puis chaque échantillon est réparti dans 2 eppendorf de 0,1 mL (~5 millions de cellules/50 µL par tube).

Les échantillons sont transportés dans la glace. Avant chaque irradiation, les cellules sont remises en suspension délicatement. Le dispositif utilisé pour l'irradiation laser est décrit dans le paragraphe 3.3. Chaque eppendorf est ouvert et placé horizontalement dans l'axe du faisceau. On délivre 1, 3 ou 10 impulsions laser à 60 mJ par pulse (ce qui représente une énergie d'environ 520 mJ/cm²/pulse). Les échantillons sont ensuite dilués dans 950 µL de PBS puis transférés dans des eppendorf de 2 mL.

Pour le test des comètes, 500.000 cellules sont prélevées dans chaque échantillon : après centrifugation, les culots cellulaires sont repris dans 200 µL de tampon de congélation « comètes » (cf paragraphe 4.7.1.), placés dans des cryotubes, puis congelés à -80 °C.

Pour la quantification d'adduits par HPLC-MS/MS, les suspensions cellulaires restantes (environ 4 à 5 millions de cellules par échantillon) sont centrifugées, puis les culots sont congelés à -20°C.

4.5 Test de cytotoxicité par le MTT

Suite au traitement par irradiation, les suspensions cellulaires sont centrifugées puis le culot est repris délicatement dans du milieu de culture. Pour chaque condition les cellules sontensemencées en triplicats, dans des plaques 12 puits (2 millions de cellules dans 2 mL de milieu de culture par puit). Un puit est réservé pour le milieu seul afin de déterminer le blanc de lecture. 24h après ensemencement, 200 µL de MTT à 5 mg/mL sont ajoutés dans chaque puit contenant 2 mL de suspension cellulaire. Les cellules sont incubées 2h à l'abri de la lumière. Le contenu de chaque puit est transféré dans un tube Falcon de 15 mL, puis centrifugé 5 min à 1170 g. Le surnageant est aspiré avec précaution, puis 2 mL de PBS sont ajoutés sans homogénéiser (afin de ne pas lyser prématurément les cellules). Les tubes sont centrifugés à nouveau, le surnageant est aspiré, et le DMSO (1mL) est ajouté. Le contenu des tubes est ensuite re-transféré dans les plaques 12 puits initiales, puis celles-ci sont agitées 20 min à température ambiante à l'abri de la lumière. Les absorbances sont mesurées à 560 nm à l'aide d'un lecteur de plaques Molecular Devices Spectra Max M2. Si celles-ci sont trop élevées ($A > 0.9-1$) ou si les cristaux de formazan ne sont pas complètement dissous, il est possible d'ajouter à nouveau 1 mL de DMSO et de renouveler l'étape d'agitation avant de refaire une nouvelle mesure. L'absorbance témoin correspond à

un échantillon cellulaire non irradié. Le blanc de lecture correspond au test réalisé sur le milieu seul. La viabilité cellulaire est exprimée par la formule suivante :

$$viabilité\ cellulaire\ (\%) = \frac{(A_e - A_0)}{(A_t - A_0)} \times 100$$

A_e : absorbance de l'échantillon

A_t : absorbance d'un témoin non irradié

A_0 : blanc de lecture

4.6 Extraction de l'ADN cellulaire

Ce protocole, décrit par Helbock *et al.* (177), est utilisé pour des échantillons comportant jusqu'à 20-25 millions de cellules environ. Il comporte 3 grandes étapes.

- *Etape 1 : lyse des membranes plasmiques*

Les culots cellulaires sont mis en suspension dans 750 μ L de tampon de lyse A (Sucrose 320 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Tris-HCl 10 mM et déféroxamine 0,1 mM, triton X₁₀₀ 1%, pH=7,5) et centrifugés 5 min à 1500 g. Après élimination des surnageants, la même étape est répétée.

- *Etape 2 : lyse des membranes nucléaires*

Les culots nucléaires précédemment obtenus sont repris dans 300 μ L de tampon de lyse B (EDTA- Na_2 5 mM, Tris-HCl 10 mM, déféroxamine 0,15 mM, pH=8) auxquels sont ajoutés 18 μ L de SDS à 10 %.

- *Etape 3 : isolement et précipitation de l'ADN*

On ajoute successivement 1,5 μ L de RNase A à 100 mg/mL et 3,5 U de RNase T1, puis les échantillons sont incubés pendant 15 min à 50°C. 15 μ L de protéase Qiagen à 20 mg/mL sont ajoutés, et les échantillons sont placés 1h à 37°C. La précipitation de l'ADN est réalisée par ajout de 600 μ L de solution de NaI (EDTA- Na_2 20 mM, NaI 7,6 M, Tris-HCl 40 mM, déféroxamine 0,3 mM, pH 8) et de 1 mL d'isopropanol à 100%. Après une agitation douce des tubes et une centrifugation de 5 min à 5000 g, les culots sont repris dans 0,5 mL d'isopropanol à 40 %. Les échantillons sont à nouveau centrifugés 5 min à 5000 g, puis les culots sont remis en suspension dans 0,5 mL d'éthanol à 70 %. Après une dernière centrifugation de 5 min à 5000 g, les culots finaux sont repris dans 50 μ L d'une solution de déféroxamine à 0,1 mM.

4.7 Détection des pontages ADN-protéines dans l'ADN cellulaire

4.7.1 Méthode des comètes (50,178)

- *Conservation des échantillons cellulaires avant le test des comètes*

Les culots cellulaires sont repris dans le tampon de congélation suivant : Sucrose 85,5 g/L, citrate de sodium 11,76 g/L, DMSO 50 mL/L (Ce tampon est au préalable filtrée à l'aide d'un filtre stérile à 0,2 µM). Les aliquots sont conservés à -80 °C.

- *Dépôt des cellules sur les lames*

Après décongélation et centrifugation (1170 g, 5 min), les culots cellulaires sont mis en suspension dans du PBS, de façon à obtenir une concentration finale de 2 millions de cellules par mL. Pour des échantillons exposés à de fortes doses d'irradiation gamma ou laser, il est préférable de refaire une numération des cellules après décongélation, afin de s'assurer de la concentration optimale de cellules pour la lecture du test des comètes. Cette suspension est ensuite diluée au 1/10^e dans une solution d'agarose low-melt à 0,6% dans du PBS. 100 µL de cette préparation (soit 20000 cellules) sont déposés sur chaque lame. Ces lames ont été au préalable recouvertes d'un gel d'agarose à 1% dans du PBS. Après le dépôt des cellules, les lames sont recouvertes de lamelles et laissées 10 min sur de la glace pour solidifier l'agarose.

- *Lyse des cellules*

Les lamelles sont retirées, et les lames sont immergées dans le tampon de lyse (NaCl 2,5 M, Tris (base) 10 mM, EDTA 0,1 M, Sodium Lauryl Sulfate 1%, DMSO 10%, Triton 1%) pendant une nuit à 4°C à l'abri de la lumière. Le lendemain, les lames sont rincées pendant 5 min 3 fois de suite avec une solution de Tris-HCl à 0,4 M pH=7,4.

- *Incubation avec la protéinase K*

Les lames sont équilibrées 3 fois pendant 5 min avec un tampon TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH=10). Après séchage sont déposés 100 µL d'une solution de protéinase K (Qiagen) à 1 mg/mL dans le tampon TE, puis chaque lame est recouverte d'une lamelle et incubée à 37°C pendant 2h. Les lames témoins sont incubées dans les mêmes conditions, avec 100 µL de tampon TE. Suite aux 2h d'incubation, la réaction enzymatique est arrêtée en déposant les lames sur de la glace.

- *Migration*

Les lamelles sont retirées, et les lames sont placées dans une cuve à l'électrophorèse, puis recouvertes doucement avec le tampon d'électrophorèse suivant, à 4°C : NaOH 0,3 M, EDTA 1 mM. Le système

est laissé sans courant électrique pendant 30 min, afin de permettre de « débobinage » de l'ADN. La migration est ensuite effectuée à 25 V, 300 mA, pendant 30 min. Les lames sont ensuite lavées 3 fois pendant 5 min par la solution de Tris-HCl 0,4 M, puis séchées à l'air libre pendant 30 min.

- *Lecture*

L'ADN est révélé par ajout de 50 µL d'une solution de bromure d'éthidium à 20 µg/mL dans du PBS, puis les lames sont immédiatement recouvertes d'une lamelle. Les lames sont ensuite analysées à l'aide d'un microscope à fluorescence couplé au logiciel Comet Assay IV (Perceptive Instrument, Haverhill, UK). 50 comètes sont sélectionnées au hasard sur chaque lame. Pour chaque comète, le pourcentage d'ADN dans la queue est calculé par le logiciel grâce à l'intensité de fluorescence (« % tail intensity »). La médiane de ces 50 valeurs (« median % tail intensity ») est utilisée pour le traitement des résultats. Cette expérience est réalisée en triplicat (pour chaque condition : 3 lames incubées avec la protéinase + 3 lames incubées avec le tampon seul).

4.7.2 Détection par marquage au FITC

Cette expérience est réalisée sur des échantillons d'ADN extrait (à l'aide du protocole décrit dans le paragraphe 4.6) de cellules THP1 exposées au rayonnement laser, et nécessite au moins 8 à 10 millions de cellules par condition. L'ADN est remis en solution dans 100 µL de tampon borate à 20 mM, pH 8. L'absorbance à 260 nm est mesurée. On ajoute 1 µL d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) en solution à 10 mM dans de la diméthylformamide (concentration finale en FITC : 0,1 mM). Les échantillons sont incubés à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 1h. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol pour éliminer le FITC en excès, puis repris dans 100 µL d'eau. La fluorescence est mesurée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop ND-1000. Les résultats sont exprimés par le rapport de l'intensité de fluorescence à 515 nm sur l'absorbance avant marquage à 260 nm, ce qui reflète le taux de pontages ADN-protéines.

5 Etude réalisée sur des échantillons de spermatozoïdes

5.1 Provenance des échantillons et réactifs

Les échantillons de sperme humain nous ont été fournis par le laboratoire Biomnis par l'intermédiaire du Dr Gilles Panteix. Les échantillons murins ont été fournis par l'équipe de Christophe Arnoult du laboratoire AGIM (Andrologie Géro-technologie Inflammation Modélisation, Université Joseph Fourier, La Tronche) et par Saadi Kochbin de l'IAB (Institut Albert Bonniot, La Tronche). Les différents réactifs utilisés pour la préparation des tampons ainsi que le peroxyde d'hydrogène proviennent de chez Sigma. Pour les enzymes nécessaires à l'extraction d'ADN, se référer au paragraphe 4.1.

5.2 Exposition au rayonnement gamma

Après décongélation des échantillons de sperme, on ajoute 1 volume de tampon SWB (« Sperm Washing Buffer » : Tris 10 mM, pH=7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM (177)). Après centrifugation à 600 g pendant 10 min à 4°C, le surnageant est retiré délicatement. Cette étape de lavage est effectuée à deux reprises et permet d'isoler les spermatozoïdes du liquide séminal.

Les culots de spermatozoïdes sont repris dans 1 mL de PBS. Chaque échantillon est ensuite réparti dans plusieurs eppendorf, pour obtenir environ 8 millions de spermatozoïdes par tube, dans 500 µL de PBS. Après remise en suspension, les échantillons sont irradiés par une source de cobalt 60 (cf paragraphe 3.2.). Les doses de rayonnement reçues varient de 0 à 100 Gy selon les conditions. Après centrifugation, le surnageant est retiré, puis on réalise l'extraction d'ADN et la digestion enzymatique. Les expériences présentées dans ces travaux ont été réalisées avec environ 8 millions de spermatozoïdes par condition.

5.3 Traitement au peroxyde d'hydrogène

Après décongélation des échantillons de sperme, on ajoute 1 volume de tampon SWB. Après centrifugation à 600 g pendant 10 min à 4°C, le surnageant est retiré délicatement. Cette étape de lavage est effectuée à deux reprises.

Les culots de spermatozoïdes sont repris dans 1 mL de PBS. Chaque échantillon est ensuite réparti dans plusieurs eppendorf, pour obtenir environ 4 à 5 millions de spermatozoïdes par tube. Ceux-ci sont centrifugés dans les mêmes conditions que précédemment, le surnageant est retiré, puis on ajoute le PBS et le peroxyde d'hydrogène (mis en solution au préalable dans du PBS). Les concentrations de peroxyde d'hydrogène utilisées varient de 0 à 200 µM. Les échantillons sont incubés 30 min dans la glace, puis

centrifugés. Le surnageant de PBS est retiré avant l'extraction de l'ADN et la digestion enzymatique. Ces expériences ont été réalisées avec environ 4 à 5 millions de spermatozoïdes par condition.

5.4 Extraction de l'ADN des spermatozoïdes

Le principe est similaire à celui de l'extraction d'ADN cellulaire ; on réalise cependant un traitement supplémentaire par le DL-dithiothreitol (DTT). Le protocole utilisé est une adaptation de la procédure de Helbock *et al.* (1979) comporte 4 grandes étapes.

- Etape 1 : séparation des spermatozoïdes du liquide séminal

Pour les échantillons spermatozoïdes irradiés ou traités par H₂O₂, cette étape n'est pas nécessaire car déjà réalisée avant l'exposition.

Après décongélation des échantillons de sperme, on ajoute 1 volume de tampon SWB. Après centrifugation à 600 g pendant 10 min à 4°C, le surnageant est retiré délicatement. Cette étape de lavage est effectuée à deux reprises.

- Etape 2 : lyse des membranes plasmiques

Les culots de spermatozoïdes sont mis en suspension dans 750 µL de tampon de lyse A (Sucrose 320 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM et déféroxamine 0,1 mM, triton X₁₀₀ 1%, pH=7,5) et centrifugés 5 min à 1500 g. Après élimination des surnageants, la même étape est répétée.

- Etape 3 : lyse des membranes nucléaires

Les culots nucléaires précédemment obtenus sont repris dans 270 µL de tampon de lyse B (EDTA-Na₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM, déféroxamine 0,15 mM, pH=8) et 30 µL de DTT en solution à 100 mM dans le tampon B, auxquels sont ajoutés 18 µL de SDS à 10 %.

- Etape 4 : isolement et précipitation de l'ADN

On ajoute successivement 1,5 µL de RNase A à 100 mg/mL et 3,5 U de RNase T1, puis les échantillons sont incubés pendant 15 min à 50°C. 15 µL de protéase Qiagen à 20 mg/mL sont ajoutés, et les échantillons sont placés 1h à 37°C. La précipitation de l'ADN est réalisée par ajout de 600 µL de solution de NaI (EDTA-Na₂ 20 mM, NaI 7,6 M, Tris-HCl 40 mM, déféroxamine 0,3 mM, pH 8) et 1 mL d'isopropanol à 100%. Après une agitation douce des tubes et une centrifugation 5 min à 5000 g, les culots sont repris dans 0,5 mL d'isopropanol à 40 %. Les échantillons sont à nouveau centrifugés 5 min à 5000 g, puis les culots sont remis en suspension dans 0,5 mL d'éthanol à 70 %. Après une dernière centrifugation 5 min à 5000 g, les culots finaux sont repris dans 50 µL d'une solution de déféroxamine à 0,1 mM.

6 Réparation des adduits guanine-polyamines par le BER

Les capacités de réparation de ces adduits par le BER ont été étudiées grâce à des tests d'excision par la Fpg et par OGG1 + APE1. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr Pablo Radicella, de l'Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire (CEA Saclay).

- Irradiation d'ADN en présence ou non de polyamines

Une solution d'ADN extrait de thymus de veau (0,5 mg/mL, 4 mL) est irradiée en présence de riboflavine (40 µM) et de putrescine, spermidine ou spermine (100 µM). L'irradiation est réalisée avec une lampe halogène placée à 20 cm de l'échantillon, pendant 5 ou 10 min. Les solutions sont saturées en oxygène par bullage d'air en continu. L'ADN est ensuite précipité par l'éthanol absolu, pour ôter la riboflavine et les polyamines en excès. Après centrifugation, le culot d'ADN est lavé à 2 reprises par l'éthanol à 70% puis repris dans un volume d'eau distillée égal au volume initial.

- Dosage des lésions avant incubation

Des échantillons de 25 µg d'ADN irradié en solution dans de l'eau sont hydrolysés par un cocktail enzymatique. Les nucléosides obtenus sont analysés par HPLC-MS/MS, afin de déterminer le taux d'adduits avec les polyamines (cf paragraphe 2.1.). La 8-oxodGuo, choisie comme lésion de référence, est également dosée.

- Incubation avec les enzymes de réparation

➤ Incubation avec la Fpg

Après évaporation au speed-vac, l'ADN irradié (25 µg) est mis en présence de 15 U de FpG (Trevigen), dans 50 µL de tampon « 1X REC Buffer 10 » (HEPES-KOH 10 mM pH=7.4, KCl 100 mM, EDTA 10 mM, BSA 0,1 mg/mL, Trevigen). Une série témoin est réalisée sans FpG, l'ADN est en solution à la même concentration dans le TP 1X. Les échantillons sont incubés 2h ou 4h, à 37°C. Après incubation, l'ADN est précipité à l'éthanol, rincé puis remis en suspension dans de l'eau distillée (50 µL).

➤ Incubation avec OGG1/APE1

L'ADN irradié (12,5 µg) est mis en présence de hOGG1 (150 ng, soit 3 ng/µL) et/ou de APE1 (1 µg soit 20 ng/µL) dans 50 µL du tampon suivant : BSA 1%, Tris 20 mM pH=7.5, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM. Une série témoin est réalisée sans enzyme, l'ADN est en solution à la même concentration dans le même tampon. Les échantillons sont incubés 1h ou 2h, à 37°C. Après incubation, l'ADN est précipité à l'éthanol, rincé puis remis en suspension dans de l'eau distillée (50 µL).

- *Dosage des lésions après incubation*

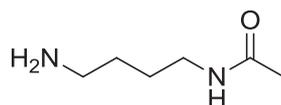
Après hydrolyse enzymatique, la 8-oxodGuo et les adduits polyamines sont dosés à nouveau comme décrit précédemment.

7 Préparation du synthon phosphoramidite de 8-put-dGuo

7.1 Réactifs

Les différents réactifs et solvants utilisés pour cette synthèse proviennent de chez Sigma-Aldrich, à l'exception de l'anhydride acétique qui est fourni par Acros, du butanol et de l'éther diéthylique obtenus chez Carlo Erba. Les produits ont été purifiés par chromatographie sur colonne à l'aide d'un gel de silice à 60 μm Geduran fourni par Merck. Les analyses par RMN ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour les standards d'adduits (cf paragraphe 1.5.2.).

7.2 Monoacétylation de la putrescine



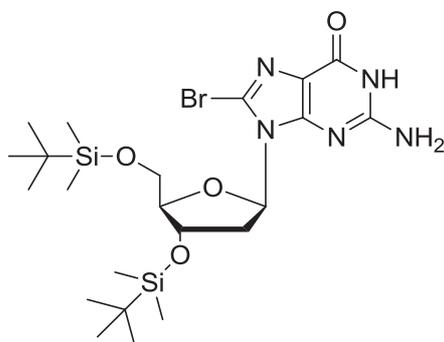
N-(4-aminobutyl)acetamide

La monoacétylation de la putrescine est réalisée selon la procédure décrite par Tang *et al.* (161) 2 mL (20 mmoles) de 1,4-diaminobutane sont mis en solution dans 1,9 mL (20 mmoles) d'acétate d'éthyle et 1 mL d'eau sous atmosphère inerte. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 24h sous agitation. L'avancement de la réaction est suivi par CCM avec l'éluant suivant : 20 % d'éther diéthylique + 80 % d'un « mix » méthanol/acétonitrile/triéthylamine (2/2/1). La plaque est révélée par une solution de ninhydrine (ninhydrine 4,5 g, butanol 300 ml, acide acétique 9 ml). Dans ces conditions, la putrescine reste sur la ligne de dépôts, le produit monoacétylé présente un R_f de 0.3 et l'éventuel produit biacétylé devrait être beaucoup moins polaire ($R_f > 0.5$ d'après Tang (161)). Après évaporation des solvants, le brut réactionnel est dissout dans 10 mL de mélange $\text{Et}_2\text{O}/\text{mix}$ (80/20), puis purifié par chromatographie sur colonne de silice, en élution isocratique avec le même éluant que celui utilisé pour le suivi CCM. Le produit monoacétylé est ainsi obtenu avec un rendement de 47%.

R_f : 0.30 (20 % diéthyle éther + 80 % d'un « mix » méthanol/acétonitrile/triéthylamine (2/2/1))

^1H NMR (CD_3OD , 200 MHz, δ): 1.50-1.57 (m, 4H, 2^*CH_2), 1.93 (s, 3H, OCH_3), 2.73 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz, $\text{NH}_2\text{-CH}_2$), 3.18 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, CONH-CH_2).

7.3 Protection des hydroxyles 3' et 5' de la 8-Br-dGuo par des groupements TBDMS



8-bromo-3',5'-O-bis(tert-butyldiméthylsilyl)-2'-désoxyguanosine

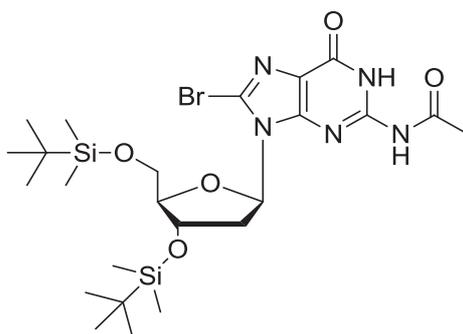
6 g (13,3 mmoles) de 8-Br-dGuo et 5,6 g (86,5 mmoles) d'imidazole sont introduits dans un ballon de 250 mL sous atmosphère inerte. Les poudres sont séchées par co-évaporation avec de la pyridine anhydre. 35 mL de diméthylformamide anhydre sont ensuite ajoutés. Le chlorure de *t*-butyldiméthylsilyle (7,8 g, 51,9 mmoles) est dissout dans 50 mL de tétrahydrofurane, puis cette solution est incorporée au mélange réactionnel à 0°C au goutte à goutte. La réaction s'effectue à température ambiante sous agitation ; l'avancement est suivi par CCM avec un éluant de type dichlorométhane/méthanol (90/10). Après 48h, 4,5 g (30 mmoles) de TBDMSCl et 3,4 g d'imidazole (50 mmoles) sont ajoutés, puis la réaction est poursuivie pendant 24h à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite concentré sous vide, dilué dans 200 mL d'eau distillée, puis extrait par 200 mL d'acétate d'éthyle par 2 fois. Les phases organiques sont réunies, séchées par Na₂SO₄. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice, avec un gradient d'acétate d'éthyle dans l'hexane (Hex/AcOEt 90/10 à 50/50). Le rendement de cette réaction est de 63%.

Rf : 0.29 (Hex/AcOEt 30/70)

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz, δ): 0.01 (s, 3H, CH₃), 0.04 (s, 3H, CH₃), 0.07 (s, 3H, CH₃), 0.14 (s, 3H, CH₃), 0.87 (s, 9H, tBu-H), 0.94 (s, 9H, tBu-H), 2.10-2.22 (m, 1H, H2''), 3.39-3.51 (m, 1H, H2'), 3.72 (dd, 1H, *J*= 4.3, 9.9 Hz, H4'), 3.81-3.96 (m, 2H, H5' et H5''), 4.71-4.76 (m, 1H, H3'), 6.23 (dd, 1H, *J*= 6.7, 7.1 Hz, H1').

ESI-MS *m/z* for C₂₂H₄₁BrN₅O₄Si₂⁺ ([M+H]⁺): calculé 574.19, mesuré 573.9.

7.4 Acétylation du nucléoside silylé



N²-acetyl-8-bromo-3',5'-O-bis(tert-butyldiméthylsilyl)-2'-désoxyguanosine

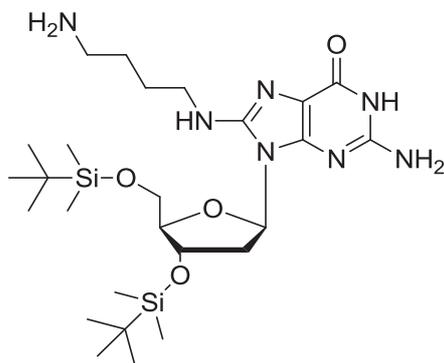
115 mg (0,2 mmole) de 8-bromo-3',5'-O-bis(tert-butyldiméthylsilyl)-2'-désoxyguanosine sont séchés par co-évaporation avec de la pyridine anhydre. Le résidu est ensuite repris dans 8 mL de pyridine anhydre, puis on ajoute successivement sous atmosphère inerte l'anhydride acétique (189 μL , 2 mmoles), la diméthylaminopyridine (2,5 mg, 0,02 mmole) et la triéthylamine (324 μL , 2,4 mmoles). Le mélange réactionnel est chauffé à 55°C pendant 80h. Après évaporation du solvant, le résidu est repris dans du dichlorométhane, et purifié par chromatographie sur colonne de silice avec un gradient de méthanol dans du dichlorométhane (DCM/MeOH 100/0 à 96/4). Le nucléoside acétylé est obtenu avec un rendement de 59%.

Rf : 0.32 (DCM/MeOH 95/5)

¹H NMR (CDCl₃ + quelques gouttes CD₃OD, 200 MHz, δ): 0.00 (s, 3H, CH₃), 0.03 (s, 3H, CH₃), 0.06 (s, 3H, CH₃), 0.11 (s, 3H, CH₃), 0.86 (s, 9H, tBu-H), 0.91 (s, 9H, tBu-H), 2.09 (s, 3H, CH₃), 2.13-2.22 (m, 1H, H2''), 2.27 (s, 3H, CH₃), 3.20-3.22 (m, 1H, H2'), 3.67-3.92 (m, 3H, H4', H5' et H5''), 4.59-4.65 (m, 1H, H3'), 6.26 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, H1').

ESI-MS m/z for C₂₄H₄₃BRN₅O₅Si₂⁺ ([M-H]⁺): calculé 614.18, mesuré 614.0.

7.5 Substitution nucléophile du nucléoside silylé par la putrescine

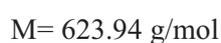
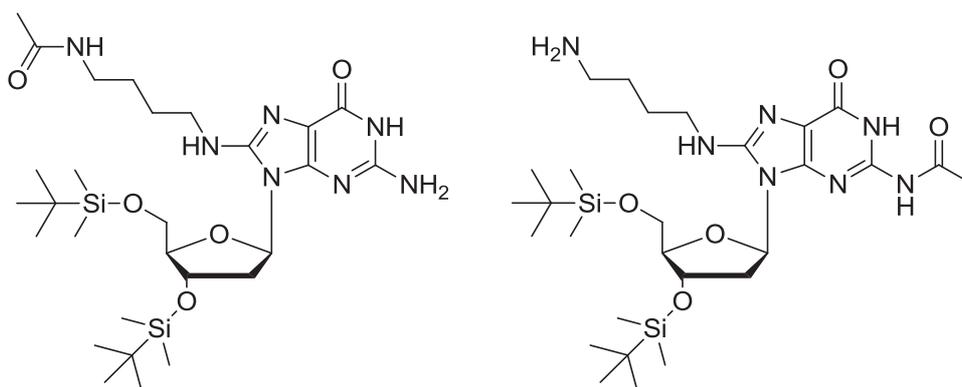


8-((4-aminobutyl)amino)-3',5'-O-bis(tert-butyl diméthylsilyl)-2'-désoxyguanosine

600 mg (1,0 mmole) 8-bromo-3',5'-O-bis(tert-butyl diméthylsilyl)-2'-désoxyguanosine sont dissous dans 10 mL de pyridine anhydre. 1 mL (9,9 mmoles) de 1,4-diaminobutane sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité pendant 20h à 95°C. Cette réaction de substitution présente un taux de conversion de 28% de produit substitué. Le produit brut est ensuite dilué au 1/10^e dans un mélange eau/acétonitrile (60/40) et injecté par HPLC phase inverse. La purification est réalisée à l'aide d'une colonne C18 (Interchim Uptisphere 5µm ODB 250*4.6 mm), avec un débit de 1 mL/min. La phase mobile est constituée d'acide trifluoroacétique à 0,1% (éluant A) avec un gradient d'acétonitrile (éluant B) de 40 à 80% en 40 min. Le composé élué à 13 min ($k' = 2.82$) est collecté, concentré et lyophilisé. Avant la purification par HPLC, il est possible de réaliser une extraction par l'acétate d'éthyle : après évaporation du solvant, le brut réactionnel est alors dilué dans l'eau (10 mL) puis extrait par 3*20 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées puis concentrées sous vide. Ce traitement par extraction permet d'éliminer une grande partie la pyridine résiduelle mais elle associée à une légère perte du composé d'intérêt dans les eaux de lavage.

ESI-MS m/z for $\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{N}_7\text{O}_4\text{Si}_2^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): calculé 582.36, mesuré 582.42

7.6 Acétylation de l'adduit



N-(4-((2-amino-9-((2R,4S,5R)-4-((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)-5-(((tert-butyl dimethylsilyl)oxy) methyl) tetrahydrofuran-2-yl)-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-8-yl)amino)butyl)acetamide
N²-acetyl-8-((4-aminobutyl)amino)-3',5'-O-bis(tert-butyl diméthylsilyl)-2'-désoxyguanosine

La réaction d'acétylation a été effectuée directement sur le brut réactionnel obtenu lors de la substitution nucléophile du nucléoside silylé par la putrescine (cf paragraphe 7.5.), après traitement par extraction à l'acétate d'éthyle. 600 mg de brut réactionnel est séché par co-évaporation avec de la pyridine anhydre. Le résidu est ensuite repris dans 45 mL de pyridine anhydre, puis on ajoute successivement sous atmosphère inerte l'anhydride acétique (1 mL, 10 mmoles), la diméthylaminopyridine (12,5 mg, 0,1 mmole) et la triéthylamine (1,6 mL, 12 mmoles). Le mélange réactionnel est chauffé à 55°C pendant 80h. Le brut réactionnel est dilué au 1/50^e dans un mélange eau/acétonitrile (60/40) puis injecté par HPLC phase inverse. La purification est réalisée à l'aide une colonne C18 (Interchim Uptisphere 5µm ODB 250*4.6 mm), avec un débit de 1 mL/min. La phase mobile est constituée d'acide trifluoroacétique à 0,1% (éluant A) avec un gradient d'acétonitrile (éluant B) de 40 à 80% en 30 min. Le composé élué à 21 min ($k' = 2.82$) est collecté, concentré et lyophilisé. Le taux de conversion de l'adduit mono-acétylé est de 15%.

ESI-MS m/z for $\text{C}_{28}\text{H}_{54}\text{N}_7\text{O}_5\text{Si}_2^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): calculé 624.37, mesuré 624.28.

8 Modèles de pontage peptide + oligonucléotide

Les oligonucléotides utilisés lors de ces expériences ont été synthétisés par Eurogentec. Le peptide doigt de zinc CP1-Y2F nous a été fourni par Vincent Lebrun et Olivier Sénèque du laboratoire de Physicochimie des Métaux en Biologie (PMB, iRTSV, CEA Grenoble). La thrombine provient de chez Ozyme et la protéine SSB de chez Epicentre. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Sandrine Perrier du Département de Pharmacochimie Moléculaire (Université Joseph Fourier Grenoble).

8.1 Etude par gelshift après marquage radioactif

8.1.1 Marquage des oligonucléotides par le phosphore 32

Le marquage est effectué sur 10 pmoles d'oligonucléotide. 1 μL d'une solution d'oligonucléotide à 10 μM est ajoutée à 9,6 μL d'eau. On ajoute ensuite 3 μL de tampon de kinase 5X (forward reaction buffer de chez Sigma), 0,1 μL de T4 polynucléotide kinase (Life Technologies, solution d'enzyme à 10 U/ μL) et 1 μL d'ATP marqué au phosphore 32 (PerkinElmer). Le mélange est incubé 1h à 37°C, puis 25 μL d'eau sont ajoutés. La solution d'oligonucléotide marquée est ensuite purifiée avec une colonne G-25 illustra MicroSpin (GE Healthcare) afin d'enlever l'ATP en excès. On obtient 40 μL d'une solution d'oligonucléotide marqué à 250 nM.

8.1.2 Hybridation avec la séquence complémentaire et formation des G-quadruplex

Une étape d'hybridation est nécessaire pour le système « doigt de zinc CP1-Y2F + duplex 12-mer ». L'oligonucléotide marqué est dilué au 1/500^e dans une solution d'oligonucléotide « froid » (non marqué). On ajoute donc 300 pmoles d'oligonucléotide, dont 0,6 pmoles d'oligonucléotide marqué, à 360 pmoles (1,2 éq.) du brin complémentaire non marqué, dans le tampon 1X qui sera utilisé pour l'expérience de gel shift. La dénaturation s'effectue à 90°C pendant 2 min, puis l'hybridation se produit lors du refroidissement progressif à température ambiante.

Pour le système « thrombine + aptamère 15-mer » les structures en G-quadruplex sont obtenues également par une étape de dénaturation. La solution d'aptamère dans le tampon 1X utilisé pour la formation des complexes est chauffée à 90°C pendant 5 min, puis refroidie très progressivement à température ambiante.

8.1.3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

- Préparation des gels

Les gels utilisés contiennent un mélange d'acrylamide/bisacrylamide (29/1) à 8% (Tableau 2).

Tableau 2 : Composition des gels utilisés pour l'étude des modèles de pontage par PAGE

	Gel natif (pour 100 mL)	Gel dénaturant (pour 100 mL)
Urée* (Sigma)	-	42 g
Solution d'acrylamide/bisacrylamide (29/1) à 40 % (Sigma-Aldrich)	20 mL	20 mL
TBE 10X (Gibco)	10 mL	10 mL
Eau milliQ	70 mL	QSP 100 mL

*L'urée est dissoute en agitant à 35°C pendant 1 ou 2 h. La solution est ensuite filtrée sous vide sur verre fritté.

Deux formats de gels ont été utilisés : 33*20 cm (épaisseur 0.5 mm) et 8.0*7.5 cm (épaisseur 1 mm). Les grands gels sont coulés en 2 fois. Le bas du gel est polymérisé à partir de 20 mL de la préparation à base de polyacrylamide, auxquels on ajoute 200 µL d'une solution de persulfate d'ammonium (APS) à 10 g/100 mL (Sigma) et 20 µL N,N,N',N'-tétraméthylethylènediamine (TEMED, Sigma). Pour le reste du gel, on utilise 60 mL de préparation de polyacrylamide avec 400 µL de solution d'APS et 40 µL de TEMED. Les petits gels sont coulés en une fois avec 20 mL de préparation d'acrylamide avec 150 µL de solution d'APS et 15 µL de TEMED.

- 1^e étape : Formation des complexes

➤ Formation des complexes « doigt de zinc CP1-Y2F + duplex 12-mer »

Les complexes sont formés par incubation à température ambiante pendant 30 min, dans le tampon suivant : Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, ZnCl₂ 100 µM. L'oligonucléotide duplex (5 µM) marqué à 0,5 mole% sur l'un des brins est mis en présence de différentes concentrations de peptide (0 à 4 mM) dans un volume total de 10 µL, avec 10 % de glycérol.

➤ Formation des complexes « thrombine + aptamère 15-mer »

100 fmoles d'aptamère marqué à 100 mole% (concentration finale 8,33 nM) sont incubées avec différentes concentrations de thrombine (0 à 1000 nM), dans un volume total de 12 µL, avec 8 % de glycérol, pendant 1h (30 min suffisent pour former les complexes) à température ambiante. Les différents tampons d'incubation utilisés sont listés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Tampons d'incubation utilisés lors de l'étude de la formation des complexes "thrombine + aptamère 15-mer" par gelshift.

Tampon phosphate	Tampon de sélection (136)	Tampon EMSA classique (180)
NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM pH=7,4 KCl 100 mM	Tris acétate 20 mM NaCl 140 mM KCl 5 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 1 mM	Tris 20 mM pH=7,4 EDTA 1 mM KCl 100 mM

- 2^e étape : irradiation (pour le système « doigt de zinc CP1-Y2F + duplex 12-mer »)

De la riboflavine en solution dans le tampon d'incubation est ajoutée, pour obtenir une concentration finale de 50 µM, juste avant chaque irradiation (les échantillons sont irradiés un par un, dans des eppendorf de 100 µL). L'eppendorf est disposé dans un petit flacon en verre de 2 mL contenant de l'eau froide. L'irradiation s'effectue par une lampe halogène, placée à 20 cm de l'échantillon, pendant 15 ou 30 min.

- 3^e étape : dépôt et migration

La pré-migration est effectuée dans un tampon TBE 1X pendant une nuit à 400 V, 10 mA, 3 W. Chaque échantillon est supplémenté de 6 µL de bleu sucrose (sucrose 40%, bleu de bromophénol 0.25%, cyanol xylène 0.25%, TBE 2X dans H₂O) et on dépose 7 µL des mélanges obtenus dans les puits (pour cette expérience le bleu sucrose est déposé uniquement dans un puits séparé). La migration est réalisée dans les mêmes conditions que la pré-migration, pendant 4h30 à 5h.

Pour les expériences réalisées sur petit gel, la migration est effectuée à 100V, et la pré-migration ne dure que 1h.

- 4^e étape : analyse des gels

Après la migration, le gel est démoulé et exposé pendant une nuit contre une plaque (Kodak) sensible au rayonnement émis par le phosphore-32. La lecture de la plaque est effectuée le lendemain à l'aide d'un appareil Personal Molecular Imager FX (Bio-Rad). Le logiciel Quantity One (Bio-Rad) est utilisé pour l'analyse de l'image de gel.

8.2 Etude par HPLC-MS/MS

- Etape d'incubation pour le système « thrombine + aptamère 15-mer »

Après dénaturation, l'aptamère 15-mer à une concentration de 20 μM est incubé avec 10 μM de thrombine, à 37°C pendant au moins 30 min. Le tampon d'incubation utilisé est le suivant : tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 10 mM pH=7,5 ; KCl 15 mM. Dans certaines expériences, la solution de thrombine commerciale est purifiée au préalable à l'aide d'une colonne d'exclusion stérique G10 présentant un cut-off de 5,5 kDa.

- Etape d'incubation pour le système « SSB + aptamère 49-mer »

L'aptamère 49-mer, à une concentration de 6,2 μM est incubé avec 3,44 μM de protéine Single-Stranded Binding, à 37°C pendant au moins 15 min. Le tampon d'incubation utilisé est le suivant : tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 10mM pH=7,5 ; KCl 15 mM. La solution de SSB commerciale est également purifiée pour certaines expériences à l'aide d'une colonne d'exclusion stérique G10 présentant un cut-off de 5,5 kDa.

- Photosensibilisation

De la riboflavine (en solution dans le tampon d'incubation) est ajoutée pour obtenir une concentration finale de 40 μM . L'irradiation est effectuée dans un volume total de 40 μL , pendant 10 ou 20 min avec un lampe halogène, selon le même protocole que celui utilisé dans le paragraphe 8.1.3.

- Irradiation laser

L'irradiation laser est effectuée sur un volume total de 25 μL par échantillon, dans des eppendorf de 100 μL . Le dispositif d'irradiation utilisé est décrit dans le paragraphe 3.3. Chaque eppendorf est ouvert et placé horizontalement dans l'axe du faisceau. On délivre une impulsion laser à 110 mJ par échantillon (ce qui représente une énergie d'environ 1000 mJ/cm^2).

- Détection des pontages par HPLC-MS/MS

Les échantillons sont hydrolysés en conditions acides (cf paragraphe 3.6.) puis les adduits 8-lys-Gua sont dosés par HPLC-MS/MS (cf paragraphe 2.3.).

Résultats

Chapitre 3 :

Les pontages avec la lysine

1 Introduction

Les pontages ADN-protéines constituent un groupe de lésions très hétérogène, de par la diversité des agents capables de les induire. De nombreux mécanismes peuvent donc potentiellement être à l'origine de la formation de ces dommages. L'étude de leur structure chimique est délicate ; il est en effet complexe d'identifier quel acide aminé et quelle base nucléique interviennent dans le pontage. Les méthodes de détection des DPCs actuellement décrites ne fournissent que peu d'informations sur la nature chimique du pontage.

Cette partie du projet consiste à étudier les pontages ADN-protéines se produisant suite à l'exposition au stress oxydant. Nous cherchons à démontrer que ces lésions peuvent se former par réaction entre un acide aminé nucléophile et le radical cation de la guanine, provenant d'une oxydation à un électron de l'ADN (Figure 40). En effet, comme nous l'avons vu en introduction, les acides aminés comportant des groupements nucléophiles peuvent potentiellement s'ajouter sur le radical cation de la guanine, en position C8, pour former des adduits. Les groupements nucléophiles pouvant être impliqués sont notamment les amines (cas de la lysine et de l'arginine) et les alcools (cas de la sérine).

Afin de mieux appréhender la structure chimique des pontages ADN-protéines, nous nous sommes intéressés à l'adduit entre la guanine et la lysine qui avait déjà été mis en évidence au laboratoire (46). Durant cette thèse, cette lésion a été synthétisée sous la forme de nucléoside modifié (8-lysine-2'-désoxyguanosine), puis caractérisée. Une méthode de quantification par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem a ensuite été optimisée, afin de détecter l'adduit dans l'ADN isolé, puis dans l'ADN cellulaire, au sein d'un pontage ADN-protéine. Cette étude a été effectuée dans différentes conditions de stress oxydant.

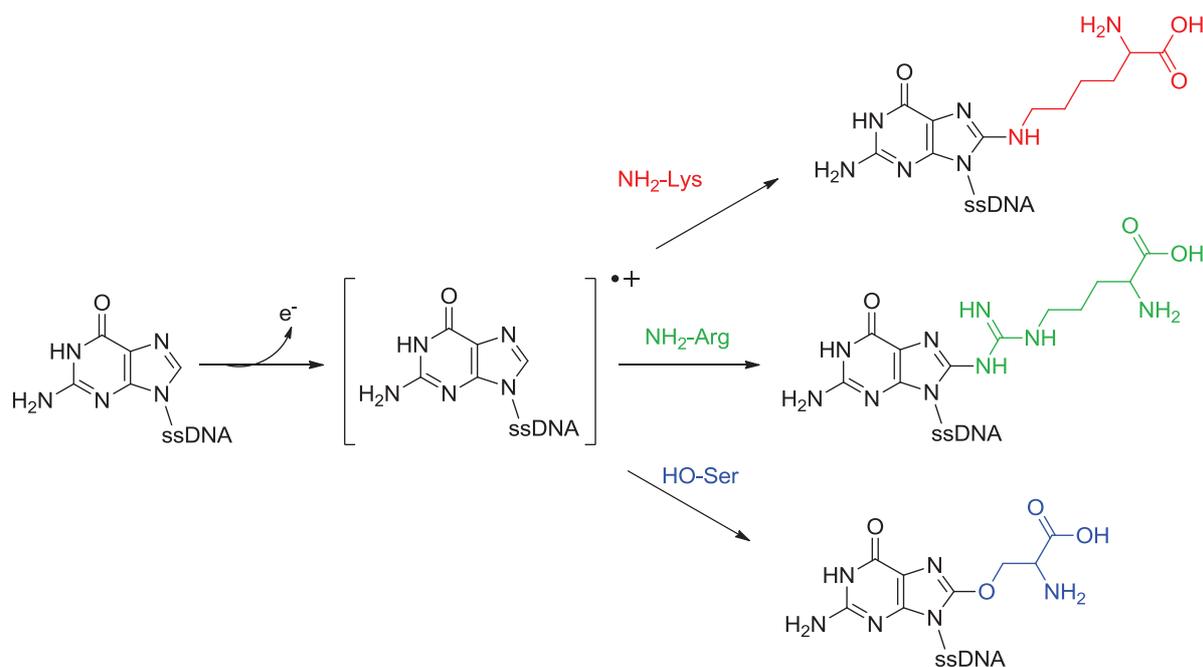


Figure 40 : Hypothèse de formation des pontages ADN-protéines suite à une oxydation à un électron de l'ADN.

2 Synthèse du standard

L'adduit 8-lysine-2'-désoxyguanosine (8-lys-dGuo) est synthétisé en adoptant la stratégie décrite dans la Figure 41. La synthèse s'effectue à partir de la 8-bromo-2'-désoxyguanosine (**8-Br-dGuo**) qui est obtenue par la bromation de la 2'-désoxyguanosine en position C8 par le *N*-Bromosuccinimide. La 8-Br-dGuo est ensuite substituée par la lysine en position C8. Cette réaction est réalisée dans un mélange DMSO / NaOH 1N, et peut conduire en théorie à 2 isomères de 8-lys-dGuo. En effet, la substitution peut s'effectuer avec l'amine ϵ (isomère 1, **8-lys-dGuo-1**) ou avec l'amine α (isomère 2, **8-lys-dGuo-2**). L'isomère que nous souhaitons étudier provient de la substitution par le groupement ϵ . L'amine α est impliquée dans la liaison peptidique, alors que l'amine ϵ est libre dans la chaîne peptidique, et pourrait donc physiologiquement donner lieu à des pontages ADN-protéines.

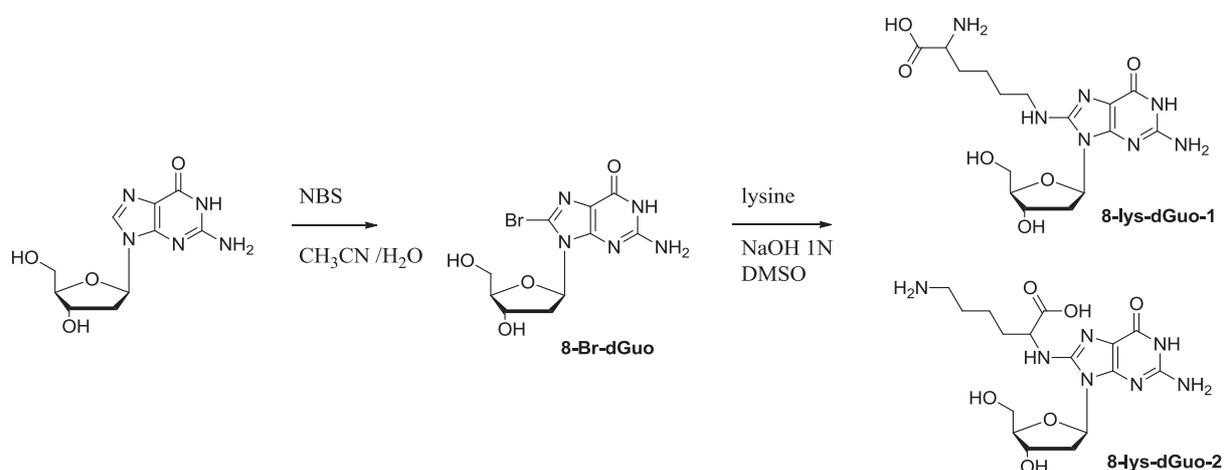


Figure 41 : Synthèse de l'adduit 8-lys-dGuo.

L'adduit est ensuite purifié par HPLC en phase inverse. L'optimisation de la purification par HPLC de cette famille de composés sera traitée plus en détails dans le chapitre 4 : l'adduit 8-lys-dGuo a été purifié dans les mêmes conditions que les adduits avec les polyamines, en utilisant 0,1% d'acide trifluoroacétique comme éluant, avec un gradient d'acétonitrile. La Figure 42 représente le chromatogramme du brut réactionnel obtenu après substitution de la 8-Br-dGuo par la lysine. Le composé élué à 15,6 min est la 8-Br-dGuo en excès ; au cours de la réaction ce réactif se dépurine en 8-bromo-guanine, éluée à 10,6 minutes. L'adduit 8-lys-dGuo est élué entre la 8-bromo-guanine et la 8-Br-dGuo à 14,5 min. Si la réaction de substitution donne lieu à 2 isomères (Figure 41), ceux-ci peuvent présenter des temps de rétention différents ou être élués en même temps si la résolution n'est pas suffisante pour les séparer. Le composé collecté à 14,5 min correspond donc soit à l'isomère 1 soit à l'isomère 2, soit à un mélange des 2 isomères. Nous avons donc utilisé différentes approches physicochimiques pour caractériser le (ou les) produits obtenus dans cette fraction.

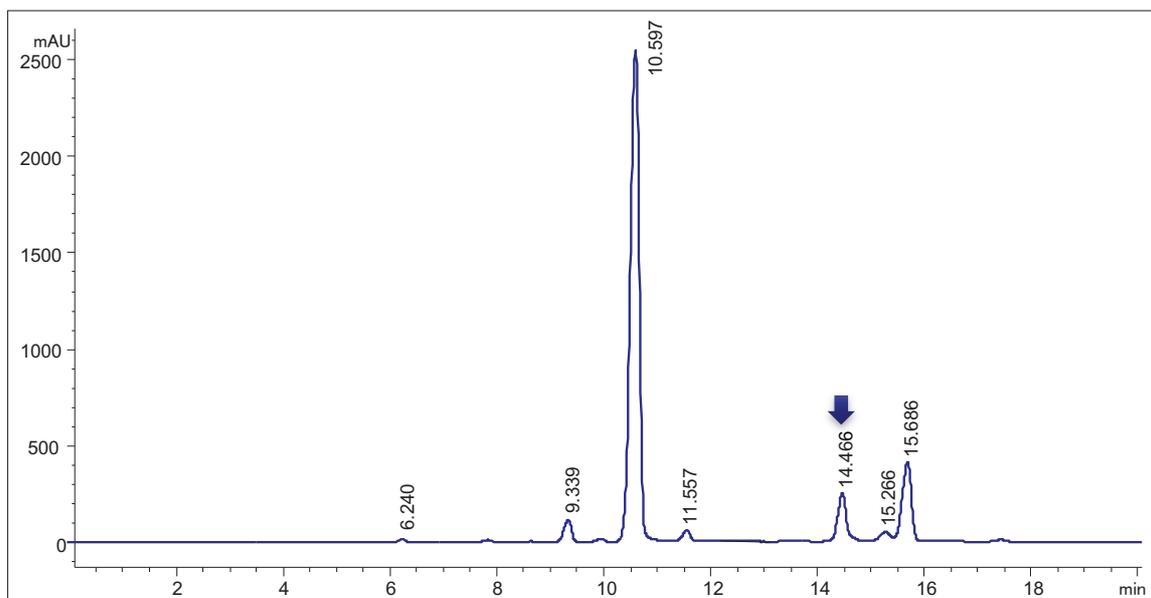


Figure 42 : Chromatogramme brut réactionnel synthèse adduit 8-lys-dGuo. Détection UV à 254 nm.

3 Caractérisation de l'adduit 8-lys-dGuo

3.1 Spectrométrie de masse

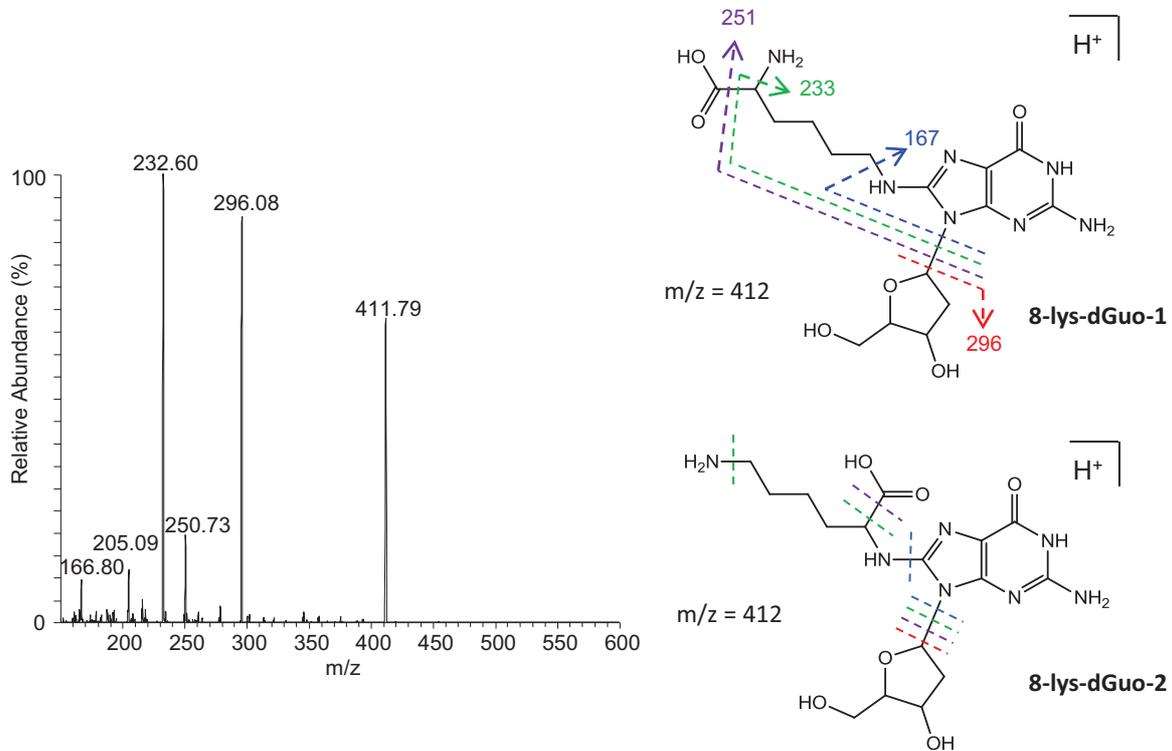


Figure 43 : Spectre de fragmentation de l'adduit 8-lysine-2'-désoxyguanosine.

L'analyse par spectrométrie de masse est effectuée en mode positif avec une ionisation par électrospray. L'ion pseudomoléculaire observé en mode MS1 présente un rapport m/z de 412, correspondant à la 8-lysine-2'-deoxyguanosine protonée. En MS2 cet ion se fragmente au niveau de la liaison N-glycosidique (m/z=296). Le motif lysine se fragmente avec une perte de la fonction acide carboxylique (m/z=251) et de l'amine alpha (m/z=233). L'ion avec un rapport m/z de 167 correspond à la base aminée en C8. La fragmentation observée sur ce spectre pourrait correspondre aux 2 structures proposées dans la Figure 43, et ne nous permet donc pas de conclure sur la prévalence de l'un ou l'autre des isomères.

3.2 RMN

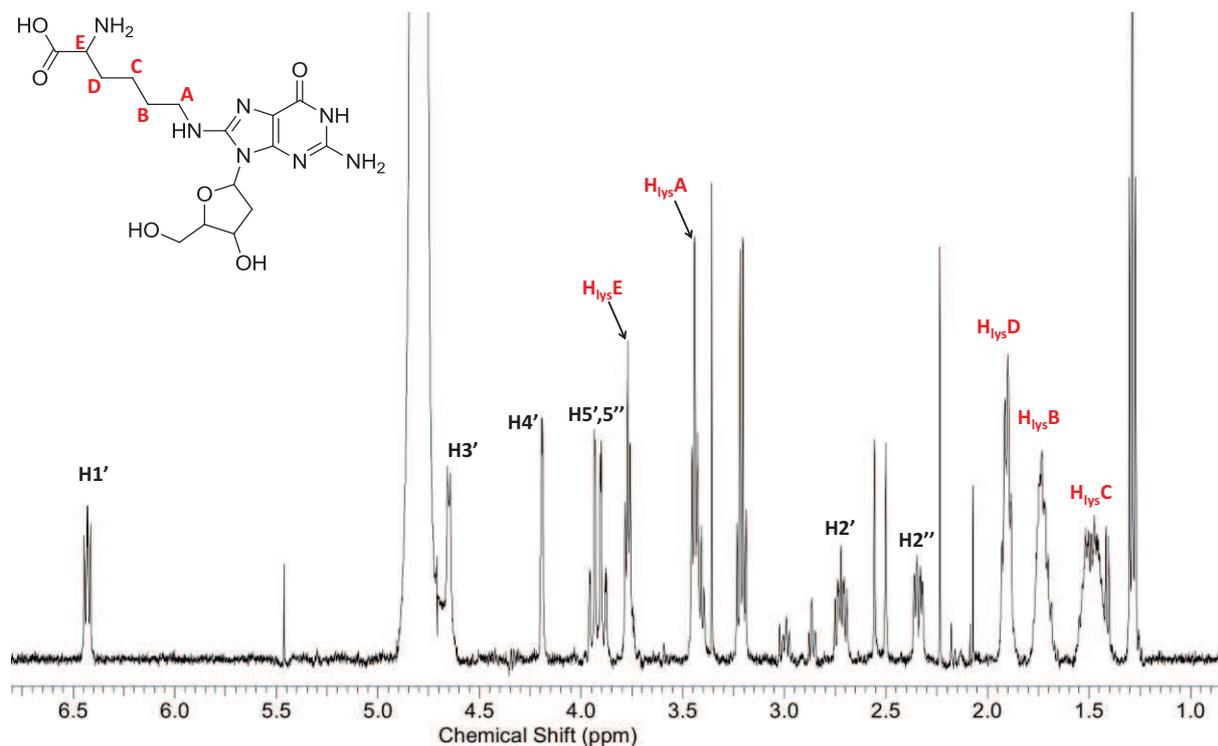


Figure 44 : Spectre RMN ¹H de la 8-lysine-2'-désoxyguanosine.

Le composé purifié a été caractérisé par RMN. La Figure 44 représente le spectre RMN du proton obtenu dans le D₂O. En plus des signaux habituels des protons du 2-désoxyribose, ce spectre comporte 5 autres signaux correspondant au motif lysine. Le proton H8 de la guanine n'est pas détecté (cf. partie expérimentale). Ces 2 observations nous confirment donc que la substitution nucléophile a bien été effectuée, en position C8 de la guanine. D'après ce spectre la fraction purifiée par HPLC ne contient qu'un seul isomère, car nous n'observons aucun dédoublement des signaux des hydrogènes du 2-désoxyribose ; le proton anomérique est parfaitement individualisé. Les signaux des protons du motif lysine ont été attribués à l'aide des spectres 1D et COSY (Figure 44 et Figure 45).

Le proton « E » est facilement identifié car il présente le déplacement chimique le plus grand ; il est couplé avec les protons « D ». Les protons « A » sont couplés avec les protons « B ». Enfin les protons « C » sont les plus blindés et sont impliqués dans les couplages avec les 4 autres protons aliphatiques.

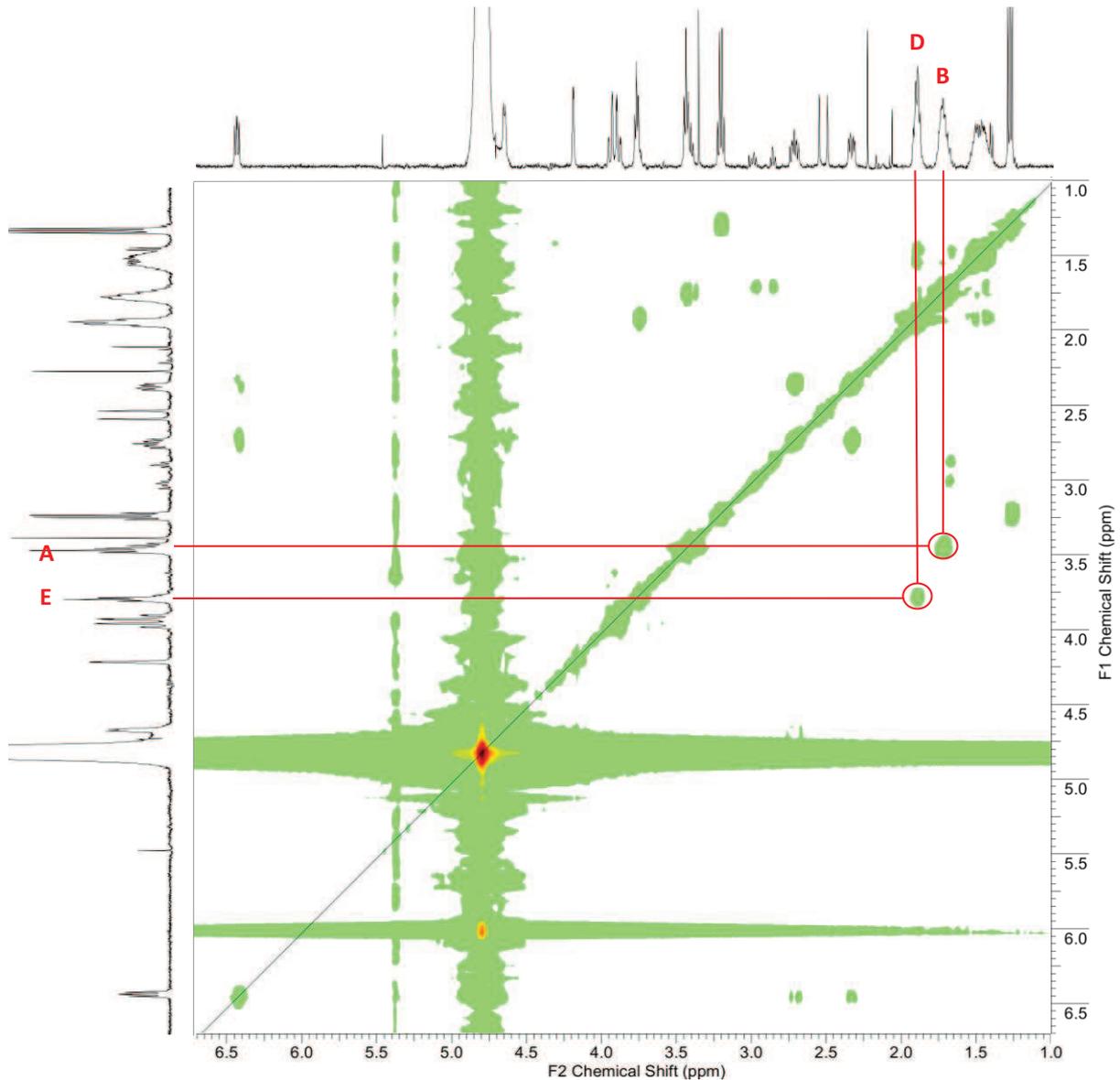


Figure 45 : Spectre RMN COSY de la 8-lysine-2'-désoxyguanosine

Afin de confirmer que le composé purifié correspond bien à l'isomère 1, nous nous sommes intéressés à la différence de déplacement chimique entre les protons « A » et « E ». Leurs déplacements chimiques sont respectivement de 3.45 et 3.77 ppm, ce qui représente un écart de 0.32 ppm. Dans le spectre RMN ^1H de la lysine, obtenu dans le même solvant, cette différence est de 0.55 ppm (Tableau 4). Si le pontage s'effectue sur l'amine α , le déplacement chimique de l'hydrogène « E » est augmenté, ce qui accentue cet écart. A l'inverse, un pontage avec l'amine ϵ rend les hydrogènes « A » plus déblindés, et diminue l'écart de déplacement chimique. Cette dernière observation est en faveur d'une structure correspondant à l'isomère 1. Ce point sera confirmé indirectement lors de la détection de l'adduit *in cellulo*.

Tableau 4 : Comparaison des déplacements chimiques des hydrogènes "A" et "E", pour l'adduit 8-lysine-désoxyguanosine et pour l'acide aminé libre. Les spectres ont été réalisés dans le D₂O.

Protons	8-lysine-dGuo	Lysine
A (ppm)	3.45	2.72
E (ppm)	3.77	3.27

3.3 UV

Le spectre UV de l'adduit 8-lysine-dGuo (Figure 46) comporte un maximum d'absorption à 255 nm, et un épaulement à 290 nm. Par comparaison avec les spectres de la 2'-désoxyguanosine (Figure 47-A) et du nucléoside bromé (Figure 47-B), on note un shift bathochrome qui est caractéristique de la substitution en C8, et qui a déjà été observé pour la 8-oxoguanine et la 8-aminoguanine. (127)

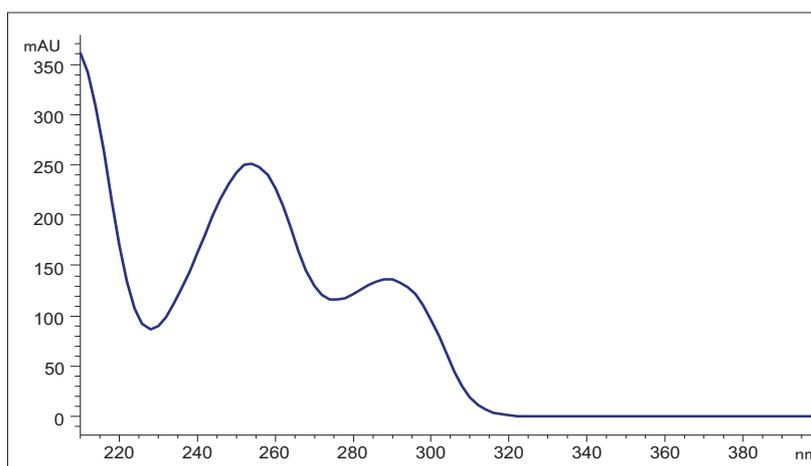


Figure 46 : Spectre d'absorption UV de l'adduit 8-lys-dGuo.

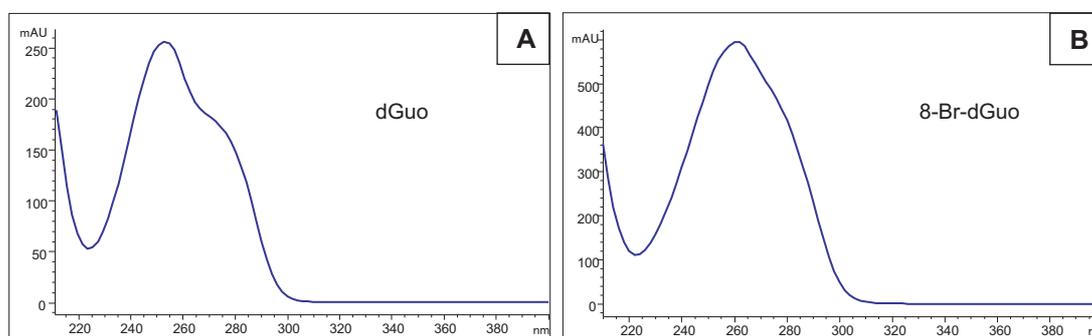


Figure 47 : Spectres d'absorption UV de la 2'-désoxyguanosine (A) et de la 8-bromo-2'-désoxyguanosine (B).

4 Développement d'une méthode de quantification par HPLC-MS/MS

L'HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem est une technique très largement décrite pour la quantification des lésions des acides nucléiques. Son utilisation présente de nombreux avantages, notamment sa spécificité de détection. La mise au point de la méthode d'analyse comporte 2 étapes : (i) l'optimisation des paramètres de détection par spectrométrie de masse et (ii) l'optimisation des paramètres chromatographiques.

4.1 Le mode « MRM » : Multiple Reaction Monitoring

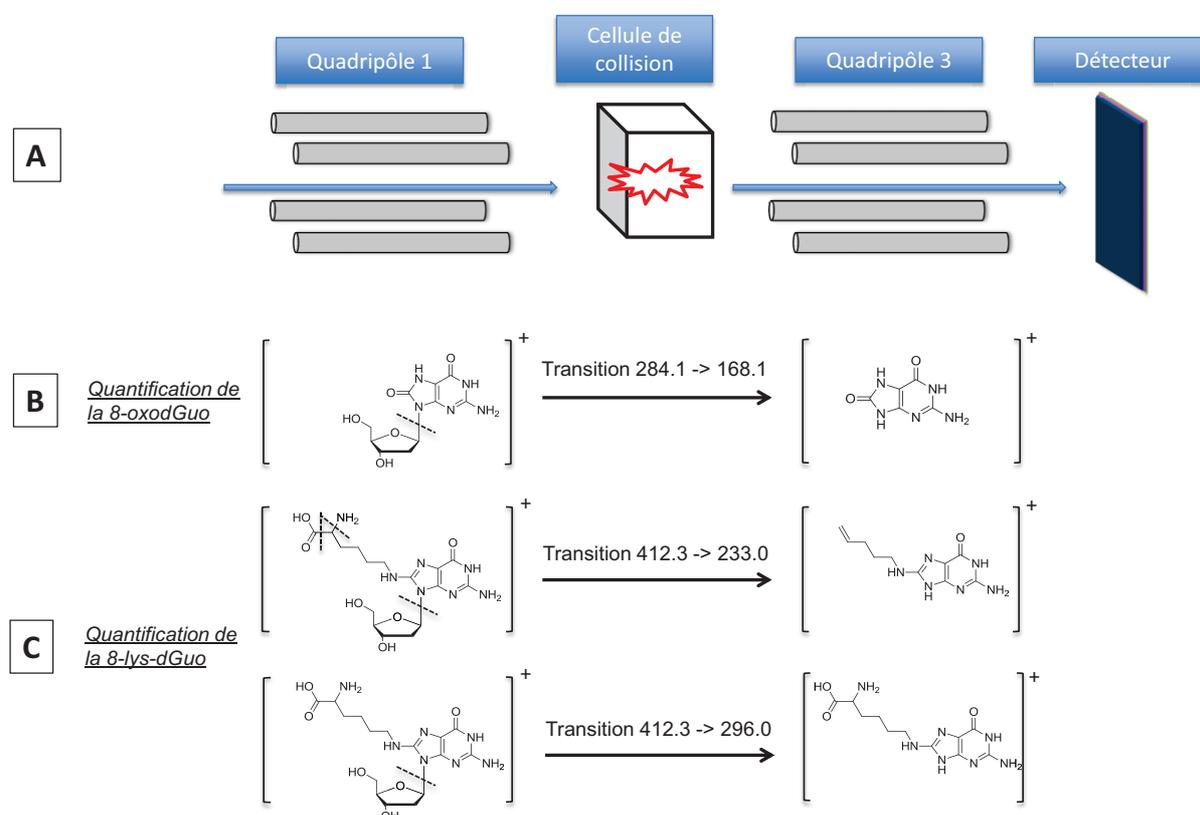


Figure 48 : Détection des lésions en mode MRM. A : représentation schématisée de l'analyseur de type triquadripolaire. B : transition utilisée pour doser la 8-oxodGuo (128). C : transitions utilisées pour analyser l'adduit 8-lys-dGuo.

Le système utilisé possède une source d'ionisation par électrospray et un analyseur triquadripolaire. Le fonctionnement du triquadripôle est schématisé dans la Figure 48-A. Les quadripôles 1 et 3 sont les analyseurs, et le quadripôle 2 joue le rôle de cellule de collision. Le mode d'utilisation « MRM » pour « Multiple Reactions Monitoring » consiste à spécifier une masse en MS1 pour filtrer les ions précurseurs dans le quadripôle 1, et de sélectionner les ions fils avec une masse prédéfinie en MS2 dans

le quadripôle 3, en considérant la fragmentation qui survient pour ces ions dans la cellule de collision. Les ions qui parviennent au détecteur ont donc été sélectionnés par la masse spécifique des ions parents et une fragmentation qui leur est propre. On parle ainsi de « transition ». Le mode MRM présente l'avantage d'assurer une détection sensible, quantitative, et surtout spécifique. Cette double spécificité est renforcée par le couplage avec l'HPLC, qui permet de sélectionner les composés présentant un temps de rétention prédéfini. Face à la complexité et la diversité des lésions des acides nucléiques, la quantification par HPLC-MS/MS en mode MRM constitue donc une méthode analytique de choix.

La 8-oxodGuo, qui a été choisie comme lésion oxydative de référence, est quantifiée par le mode MRM à l'aide de la transition 284.1 -> 168.1, représentée sur la Figure 48-B (128). En MS1, une masse de 284, correspondant au composé protoné, a été définie. En MS2 a été sélectionné l'ion $m/z = 168$ issu d'une fragmentation impliquant la rupture de la liaison *N*-glycosidique, s'accompagnant de la perte du motif 2-désoxyribose.

4.2 Optimisation des paramètres de détection par spectrométrie de masse

L'adduit 8-lys-dGuo est analysé en mode d'ionisation positif. Nous avons utilisé des transitions correspondant à la fragmentation de l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$, de masse 412. Comme il a été décrit dans la partie caractérisation, cet ion se fragmente en 2 ions fils principaux, de masses 296 et 233. Nous avons ainsi pu travailler sur 2 transitions (Figure 48-C) :

- 412.3 -> 296.0, correspondant à la perte du 2-désoxyribose ;
- 412.3 -> 233.0, correspondant à la perte du 2-désoxyribose et à 2 fragmentations, en α du groupement acide carboxylique et en α de l'amine du motif lysine.

L'utilisation de 2 transitions pour le même analyte permet de renforcer la spécificité de la méthode d'analyse. Les énergies de collision optimisées pour chaque transition sont reportées dans le Tableau 5. Afin de pouvoir analyser la 8-oxodGuo, une transition spécifique de cette lésion est ajoutée dans la méthode. Des paramètres d'ionisation communs ont été définis (cf. partie expérimentale).

Tableau 5 : Transitions optimisées pour la détection de l'adduit 8-lys-dGuo en mode MRM.

Composé	Poids molaire	Principales transitions en mode MRM				
		Masse de l'ion parent (<i>m/z</i>)	Masse de l'ion fils (<i>m/z</i>)	Mode d'ionisation	Energie de collision (<i>eV</i>)	Intensité relative (%)
8-lys-dGuo	411.4	412.3	296.0	+	16	92
		412.3	233.0	+	28	100
8-oxodGuo	283.3	284.1	168.1	+	13	100

4.3 Optimisation des paramètres chromatographiques en HPLC-MS/MS

La phase stationnaire utilisée est constituée de silice greffée C18. Les nucléosides sont élués avec de l'acide trifluoroacétique à 0,1% avec un gradient de méthanol (cf. partie expérimentale).

Le choix de l'acide trifluoroacétique comme éluant sera explicité plus en détails dans le chapitre 4. Cet éluant permet d'obtenir une bonne résolution lors de la séparation par HPLC. Dans ces conditions, l'adduit 8-lys-dGuo est élué à 13 minutes avec un rapport signal/bruit pour la détection en masse d'environ 160 pour 0,5 pmole de standard injectée (Figure 49).

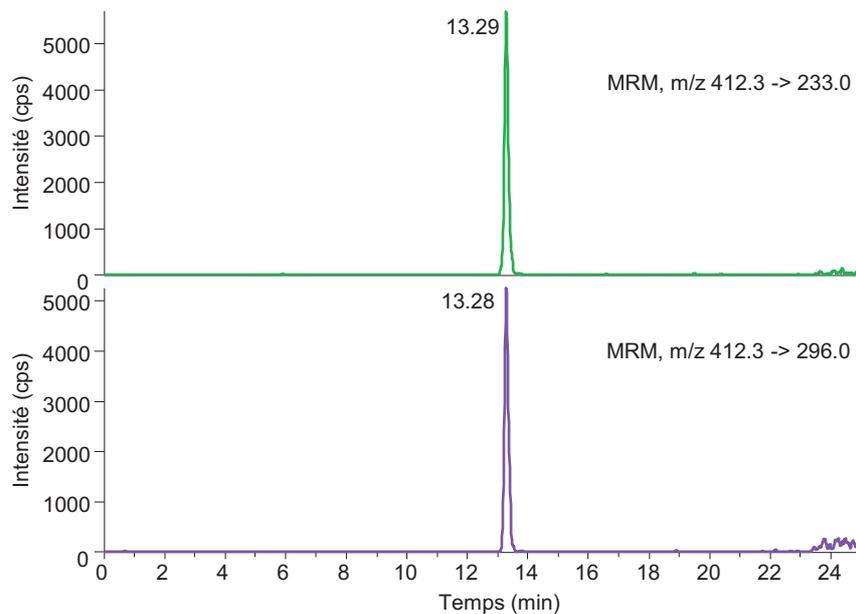


Figure 49 : Chromatogramme correspondant à la détection par HPLC-MS/MS de 0,5 pmole de standard de 8-lys-dGuo, élué à 13,3 min.

La limite de détection de l'adduit 8-lys-dGuo est de 50 fmoles environ, et la limite de quantification se situe aux alentours de 100 fmoles. La linéarité de cette méthode d'analyse est estimée grâce à la droite de calibration réalisée pour des quantités de standard allant de 50 à 2000 fmoles injectées (Figure 50).

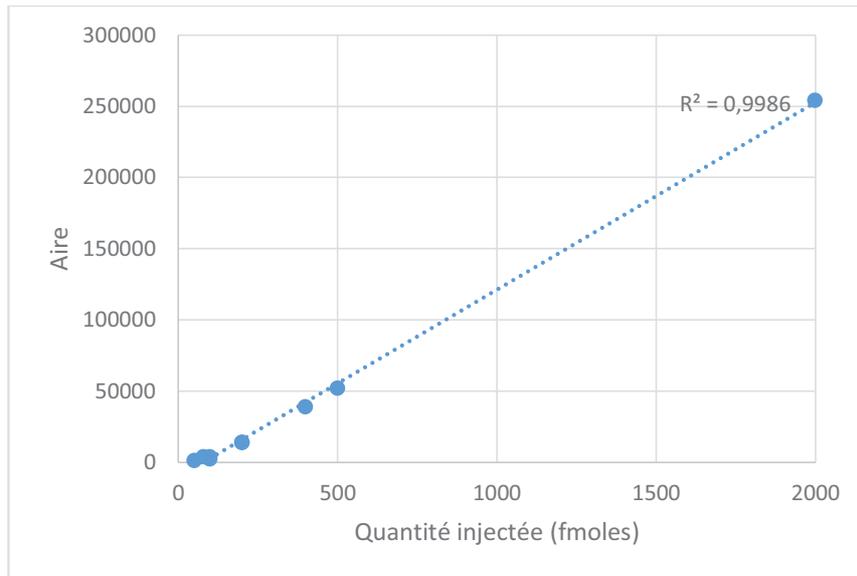


Figure 50 : Droite de calibration pour la détection de l'adduit 8-lys-dGuo par HPLC-MS/MS.

Pour la quantification des adduits, l'ADN est au préalable hydrolysé par un cocktail enzymatique (voir partie expérimentale) afin de libérer les nucléosides, non modifiés ou comportant des lésions. Les adduits 8-lys-dGuo sont quantifiés par HPLC-MS/MS à l'aide de la méthode optimisée en mode MRM, en considérant la transition la plus intense. Les nucléosides normaux sont quantifiés par HPLC-UV avec une détection à 280 nm (Figure 51).

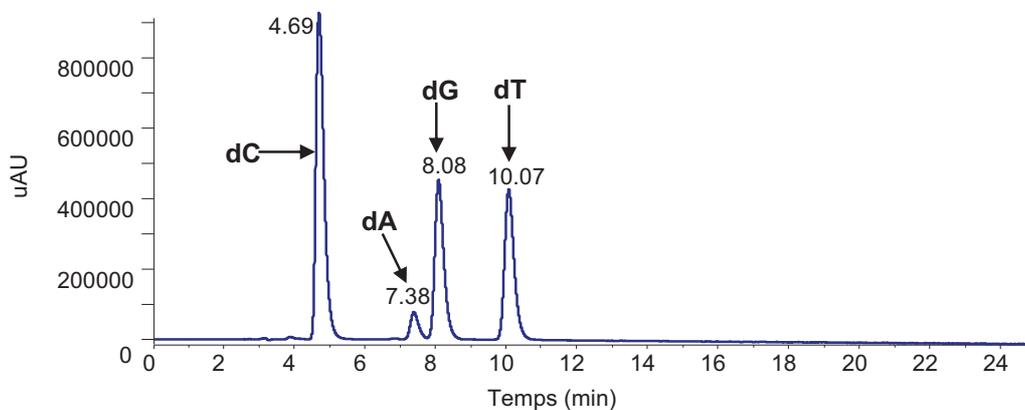


Figure 51 : Chromatogramme obtenu pour la détection des nucléosides normaux en UV à 280 nm. dC : désoxycytidine, dA : désoxyadénosine, dG : désoxyguanosine, dT : désoxythymidine.

5 Formation d'adduits 8-lys-dGuo dans l'ADN isolé

5.1 Formation d'adduits après photosensibilisation

Cette expérience est réalisée sur de l'ADN isolé, extrait de thymus de veau. L'ADN est irradié par UVA en présence de riboflavine (afin de produire une photo-oxydation de type I) et en présence de lysine libre. Le but de cette expérience est de déterminer si l'addition nucléophile de la lysine peut avoir lieu dans de l'ADN double brin étant donné que les résultats obtenus précédemment au laboratoire étaient focalisés sur de l'ADN simple brin (46). L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol puis hydrolysé enzymatiquement. Les nucléosides obtenus sont analysés par HPLC-MS/MS.

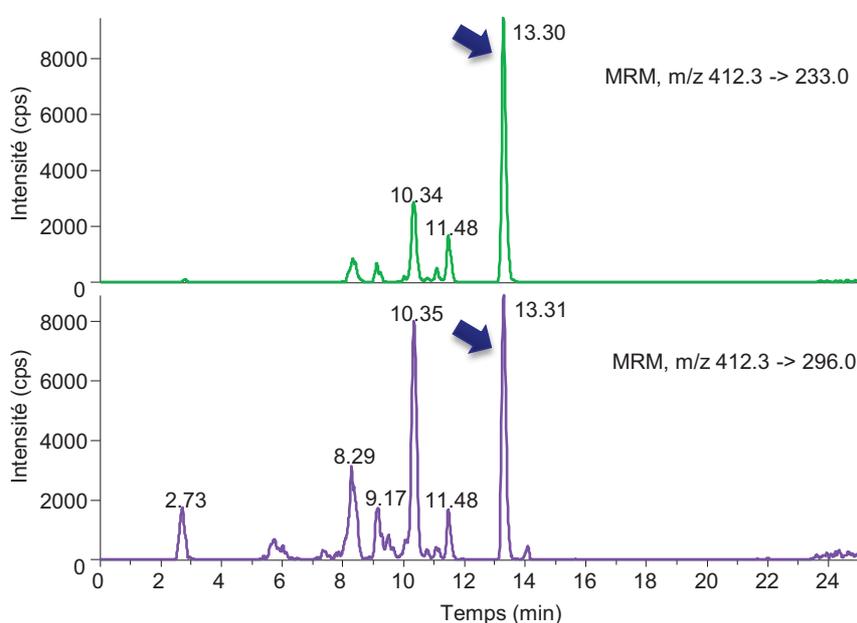


Figure 52 : Analyse par HPLC-MS/MS d'ADN isolé après photosensibilisation en présence de 1 mM de lysine. Chromatogrammes obtenus pour la détection de l'adduit 8-lys-dGuo en mode MRM.

Les chromatogrammes obtenus pour la détection de 8-lys-dGuo lors de l'irradiation réalisée en présence de 1 mM de lysine (Figure 52) comportent un pic au temps de rétention attendu (13 minutes), pour les 2 transitions (avec un rapport d'intensité identique à celui observé pour le standard), ce qui prouve la présence de l'adduit dans ces échantillons. La photosensibilisation en présence de lysine produit donc des adduits 8-lysine-2'-désoxyguanosine. D'après les cinétiques d'irradiation représentées dans la Figure 53, cette formation d'adduits est quasi-proportionnelle au temps d'irradiation entre 2 et 10 minutes. Celle-ci est également dépendante de la dose de lysine employée, aux vues des vitesses de formation d'adduits indiquées dans le Tableau 6. La photosensibilisation en présence de 0,1, 0,5 et 1

mM de lysine permet de produire respectivement 38, 75 et 140 adduits par million de nucléosides après 10 minutes d'irradiation.

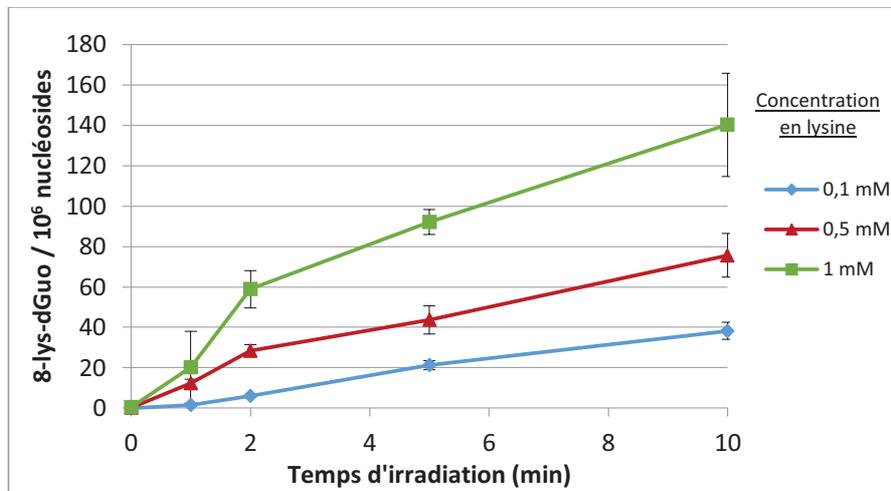


Figure 53 : Cinétiques de formation d'adduits 8-lys-dGuo après photosensibilisation d'ADN isolé. L'ADN, en solution dans l'eau à une concentration de 0,5 mg/mL, est irradié en présence de riboflavine (40 μ M) et de lysine (0,1, 0,5 et 1 mM).

Tableau 6 : Evolution des vitesses de formation d'adduits 8-lys-dGuo entre 2 et 10 min d'irradiation en fonction de la concentration en lysine.

Concentration de lysine (mM)	Vitesse de formation d'adduits (lésions / min)
0,1	4,0
0,5	5,9
1	10,1

En parallèle, la 8-oxodGuo est également dosée par HPLC-MS/MS (Figure 54). On observe une diminution de son taux de formation lorsque la concentration en lysine dans le milieu d'irradiation augmente.

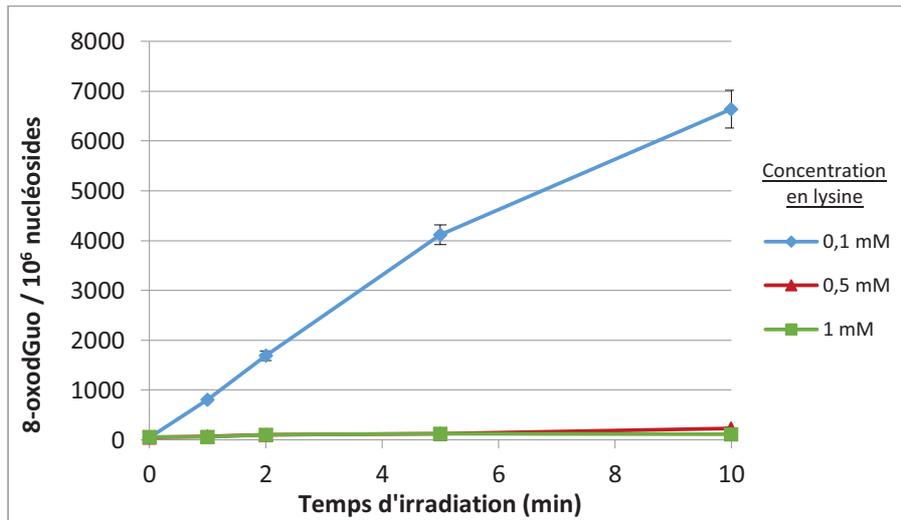


Figure 54 : Cinétique de formation de 8-oxodGuo après photosensibilisation d'ADN isolé. L'ADN, en solution dans l'eau à une concentration de 0,5 mg/mL est irradié en présence de riboflavine (40 μ M) et de lysine (0,1, 0,5 et 1 mM).

5.2 Formation d'adduits après irradiation par rayonnement γ

Le rayonnement γ est un rayonnement ionisant et pénétrant. Comme nous l'avons vu précédemment, ces ondes électromagnétiques hautement énergétiques interagissent avec l'ADN de façon directe ou indirecte. Lorsque que le rayonnement atteint directement l'ADN, l'énergie déposée provoque l'ionisation et l'apparition de radicaux, en particulier au niveau de la guanine. Le rayonnement γ peut également avoir un effet indirect par ionisation des molécules d'eau produisant des espèces réactives de l'oxygène, notamment le radical hydroxyle, qui interagissent avec l'ADN pour former diverses lésions. L'irradiation d'ADN isolé par le rayonnement γ en présence de lysine, aux 2 concentrations les plus élevées, conduit à la formation d'adduits 8-lys-dGuo (Figure 55). L'irradiation en présence de 0,5 mM de lysine semble produire plus d'adduits que celle réalisée avec une concentration de 1 mM. Cet effet peut être lié à une légère diminution de la solubilité de l'ADN en présence d'une concentration élevée de lysine. La formation d'adduits atteint un plateau après environ 80 Gy. Ce plateau témoigne probablement de l'apparition de produits de dégradation secondaires dus à une suroxydation : en effet les travaux de S. Perrier *et al.* sur les pontages guanine-KKK dans l'ADN simple brin (46) ont permis de mettre en évidence que l'adduit 8-lys-dGuo est sensible à l'oxydation et que cela conduit à des produits de suroxydation de ce composé, de type guanidinodihydantoïne et spiroiminodihydantoïne.

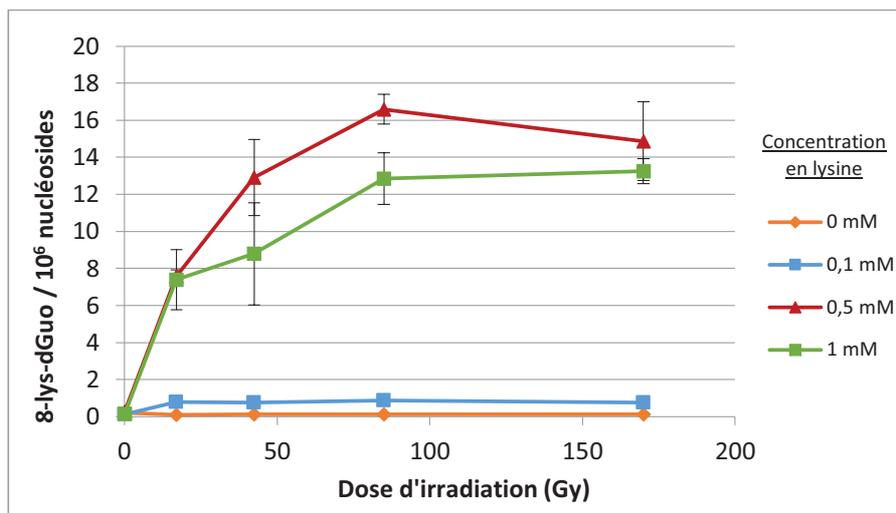


Figure 55 : Formation d'adduits 8-lys-dGuo dans l'ADN isolé après irradiation gamma en présence de lysine. L'ADN est solution dans l'eau à une concentration de 0,5 mg/mL.

L'évolution du taux de 8-oxodGuo en fonction de la dose d'irradiation est représentée dans la Figure 56. Pour toutes les concentrations de lysine testées, la courbe de formation de 8-oxodGuo atteint un plateau aux alentours de 80 grays. Comme nous l'avons constaté lors de l'expérience de photosensibilisation, la présence de lysine s'accompagne d'une inhibition dose-dépendante de la formation de 8-oxodGuo. Il existe vraisemblablement une compétition entre l'addition nucléophile de l'eau sur le radical cation de la guanine, conduisant à la 8-oxodGuo, et celle de la lysine, produisant des adduits. Cependant, la diminution du taux de 8-oxodGuo n'est que très partiellement compensée par la formation d'adduits. Ceci suggère donc l'existence d'autres phénomènes intervenant dans l'inhibition de la formation de 8-oxodGuo, qui seront analysés plus en détails (cf. discussion).

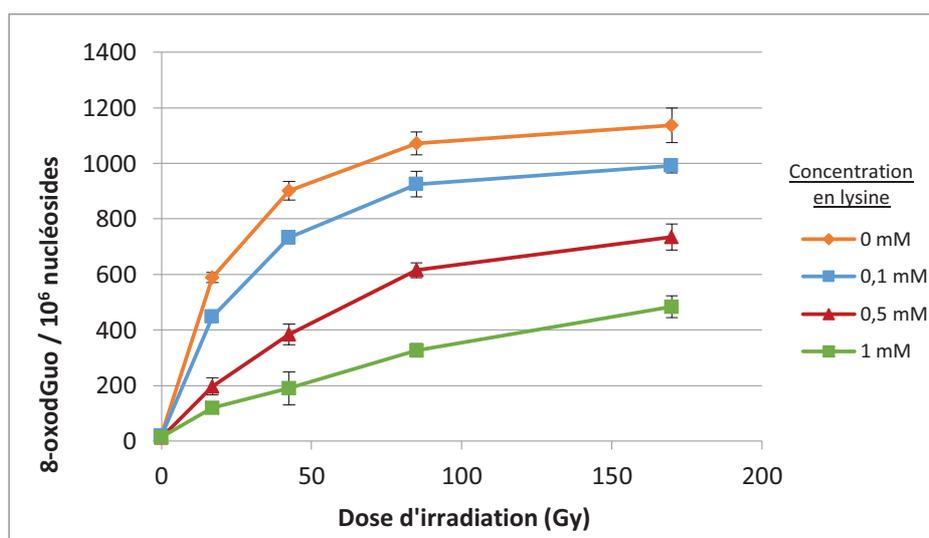


Figure 56 : Formation de 8-oxodGuo dans l'ADN isolé après irradiation γ en présence de lysine. L'ADN est solution dans l'eau à une concentration de 0,5 mg/mL.

Ainsi, les expériences réalisées sur l'ADN isolé permettent de conclure que la lysine, en tant qu'espèce nucléophile, est capable de réagir avec le radical cation de la guanine dans l'ADN double brin. Cette réaction conduit à la formation d'un adduit 8-lysine-2'-désoxyguanosine. De plus, cette réaction est dose-dépendante et s'accompagne d'une diminution de la formation de 8-oxodGuo. Ces résultats obtenus *in vitro* représentent une première étape dans la compréhension du mécanisme de formation des adduits entre guanine et lysine. Ces lésions ont par la suite été étudiées dans l'ADN extrait de cellules irradiées, afin de déterminer si cette réaction est impliquée dans les pontages ADN-protéines *in cellulo*. Dans ce but, une méthodologie est développée afin de détecter l'adduit lysine-guanine au sein d'un pontage ADN-protéine.

6 Mise au point d'une méthodologie pour détecter l'adduit lysine-guanine dans un pontage ADN-protéine

6.1 Stratégie

Afin de quantifier l'adduit formé entre l'acide aminé lysine et la base guanine, nous devons au préalable libérer cet adduit de la structure formée par le pontage ADN-protéine. Ceci nécessite d'hydrolyser à la fois les acides nucléiques et les liaisons amide de la chaîne peptidique. Cette étape ne peut être réalisée par voie enzymatique, nous avons donc opté pour une hydrolyse acide, qui permet d'hydrolyser les liaisons peptidiques et les liaisons *N*-glycosidiques, libérant ainsi l'adduit sous forme de base modifiée (Figure 57). Cette stratégie nous impose de développer une 2^e méthode analytique pour détecter l'adduit sous la forme de base, 8-lysine-guanine (8-lys-Gua).

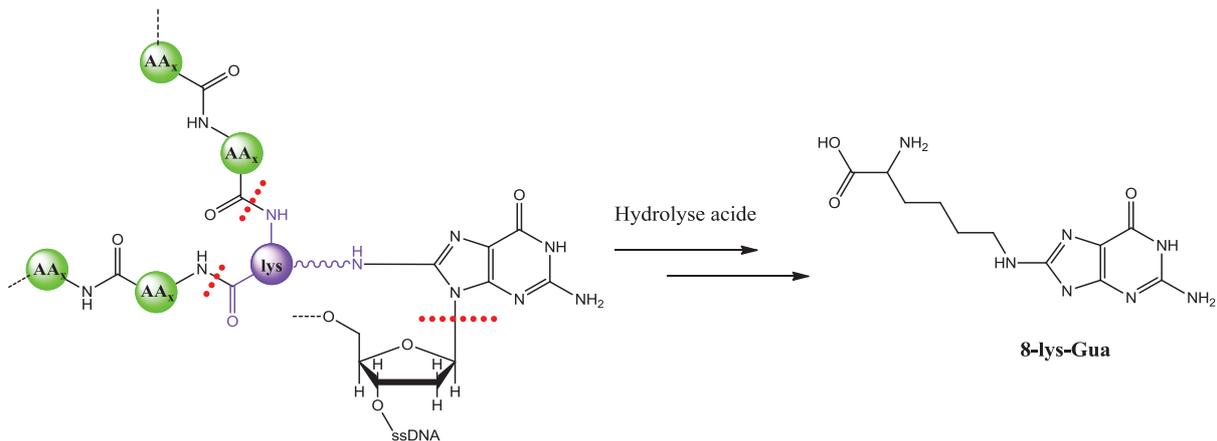


Figure 57 : Stratégie pour isoler l'adduit 8-lys-Gua au sein d'un pontage ADN-protéine. L'hydrolyse acide permet d'hydrolyser les liaisons peptidiques et les liaisons *N*-glycosidiques.

6.2 Synthèse du standard 8-lysine-guanine

Le standard 8-lysine-guanine est synthétisé par une étape d'hydrolyse de l'adduit 8-lysine-2'-désoxyguanosine par de l'acide formique (Figure 58). L'adduit dépuriné est obtenu avec une pureté d'environ 95% (visualisée par HPLC, donnée non présentée ici), il a donc été utilisé comme standard pour les analyses par HPLC-MS/MS sans purification supplémentaire.

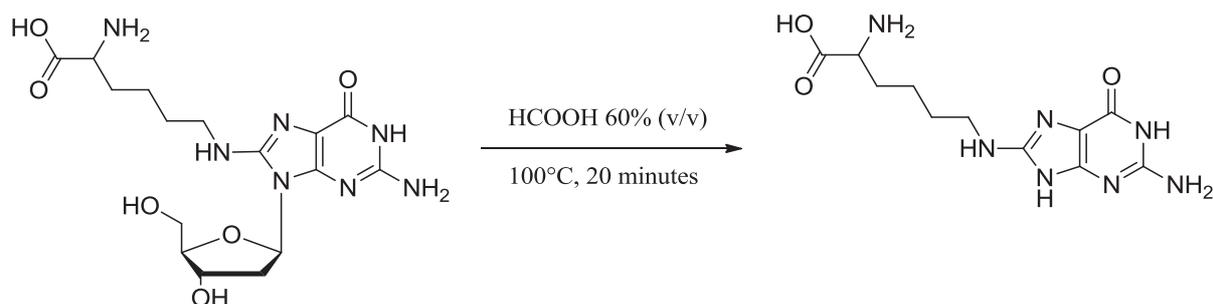


Figure 58 : Synthèse de l'adduit 8-lys-Gua.

6.3 Méthode de quantification de l'adduit 8-lys-Gua par HPLC-MS/MS

Une méthode de quantification par HPLC-MS/MS a été optimisée pour l'adduit sous la forme de base modifiée (8-lys-Gua). Ce composé est analysé en mode d'ionisation positif, à l'aide de 2 transitions correspondant à la fragmentation de l'adduit protoné $[M+H]^+$ ($m/z=296$) (Tableau 7). La transition $296.1 \rightarrow 233.1$ est liée à la perte de la fonction acide carboxylique ; la transition $296.1 \rightarrow 251.1$ correspond à une fragmentation en α de l'amine libre de la partie lysine et à la perte de l'acide carboxylique. La quantité d'ADN est mesurée à partir de la guanine non modifiée, quantifiée en mode MRM également ; la fragmentation correspond à la perte de la fonction amine. Les taux de lésions seront ainsi exprimés en nombre d'adduits par million de bases normales. La transition utilisée pour détecter la guanine correspond à la fragmentation de l'isotope +1 uma de la base protonée afin de diminuer la sensibilité pour ne pas saturer la détection.

Tableau 7 : Transitions optimisées pour la détection de l'adduit 8-lys-Gua en mode MRM.

Composé	Poids molaire	Principales transitions en mode MRM				
		Masse de l'ion parent (m/z)	Masse de l'ion fils (m/z)	Mode d'ionisation	Energie de collision (eV)	Intensité relative (%)
8-lys-Gua	295.3	296.1	233.1	+	20	100
		296.1	251.1	+	22	32
Guanine	151.1	153.0	111.0	+	20	100
		154.0	137.0	+	20	25

La séparation par HPLC est effectuée avec une phase de silice greffée C18. Les bases sont éluées dans le formiate d'ammonium à 0,5 mM avec un gradient de méthanol (cf. partie expérimentale). La Figure 59 représente les chromatogrammes obtenus lors de l'injection de 100 fmoles de standard. L'adduit 8-

lys-Gua est élué à 9.5 minutes, avec un rapport signal/bruit d'environ 25. La limite de détection de l'adduit 8-lys-Gua se situe aux alentours de 1 fmoles injectée.

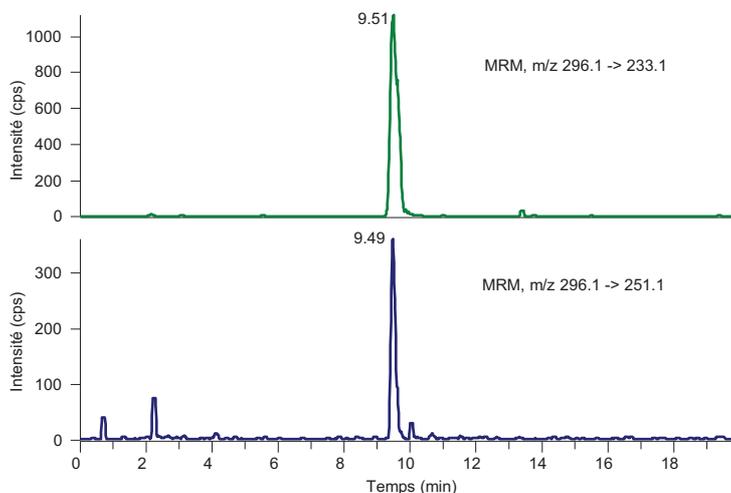


Figure 59 : Chromatogrammes obtenus pour la détection du standard 8-lys-Gua par HPLC-MS/MS en mode MRM (100 fmoles injectées).

6.4 Choix des conditions d'hydrolyse

L'étape d'hydrolyse acide a été optimisée dans le but de définir des conditions permettant d'hydrolyser à la fois les bases de l'ADN et la partie protéique, et de limiter la dégradation de l'adduit obtenu. La liaison *N*-glycosidique est facilement hydrolysable par traitement acide, mais le clivage de la liaison peptidique nécessite des conditions plus drastiques. La stabilité de l'adduit 8-lys-Gua en conditions acides fortes a donc été vérifiée (donnée non présentée ici). L'utilisation d'acide chlorhydrique a déjà été décrite pour l'hydrolyse des peptides (129). D'autre part, l'utilisation d'un acide volatil est plus commode car il peut être éliminé par simple évaporation après l'hydrolyse. Différentes conditions d'hydrolyse ont été envisagées :

- acide formique à 60 %,
- acide formique à 88 %,
- et acide chlorhydrique à 6 N.

Une solution d'ADN double brin extrait de thymus de veau est irradiée par UVA en présence de riboflavine et d'un tripeptide KKK à une concentration de 1 mM. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol et hydrolysé dans les 3 conditions testées, à 105°C. L'adduit 8-lys-Gua est dosé après 30 min, 1, 2, 4 et 6 heures (Figure 60). L'hydrolyse par HCl 6 N est la plus efficace puisqu'après 6 heures on mesure un taux d'adduits d'environ 900 lésions par million de bases, soit 10 fois plus qu'avec l'acide formique. La

cinétique sur 6 heures de réaction n'atteint pas de plateau ; des temps d'hydrolyse plus longs sont donc nécessaires.

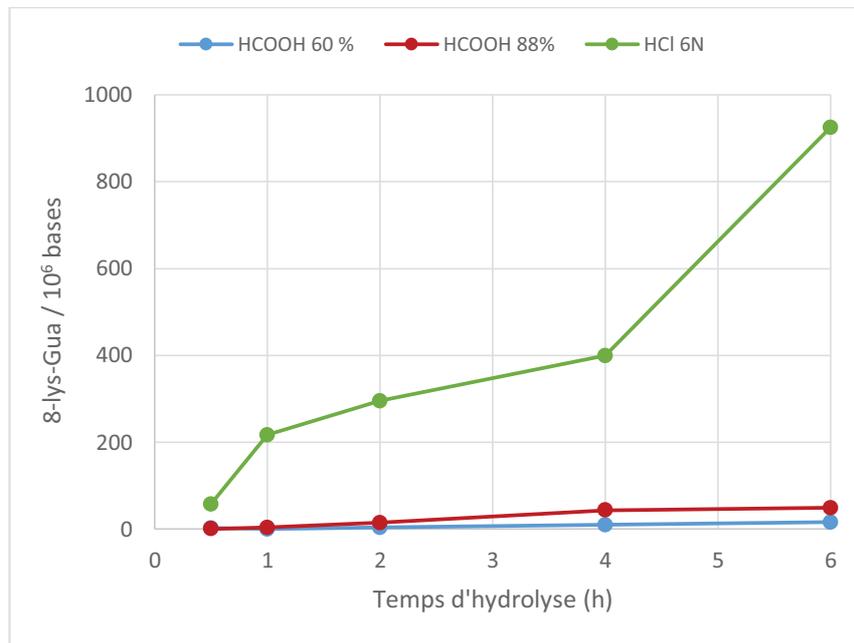


Figure 60 : Optimisation des conditions d'hydrolyse d'un pontage ADN-tripeptide dans l'ADN isolé. Le pontage est formé par photosensibilisation d'ADN à 0,5 mg/mL en présence de 1 mM de peptide trilycine. L'adduit 8-lys-Gua est dosé par HPLC-MS/MS après hydrolyse acide.

Une cinétique d'hydrolyse par l'acide chlorhydrique est ensuite réalisée (Figure 61). L'expérience d'irradiation est renouvelée dans les mêmes conditions que précédemment, avec 500 μ M de peptide KKK. L'ADN est précipité puis traité par HCl 6N à 105°C. L'adduit 8-lys-Gua est dosé après 4, 8, 12 et 24 heures d'hydrolyse. La cinétique s'approche d'un plateau à environ 12 heures ce qui indique que l'hydrolyse est presque totale. Les expériences décrites par la suite ont donc été réalisées avec un traitement par HCl 6N pendant 15h, afin d'assurer une complète hydrolyse des liaisons peptidiques dans le cas d'une partie protéique plus volumineuse, notamment pour les expériences *in cellulo*.

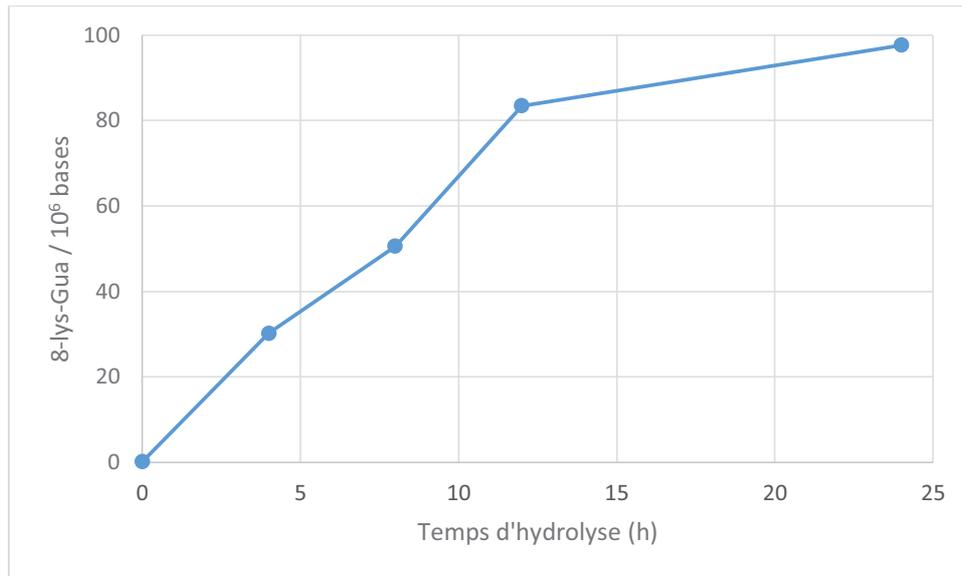


Figure 61 : Cinétique d'hydrolyse d'un pontage ADN-tripeptide. Le pontage est formé par photosensibilisation d'ADN à 0,5 mg/mL en présence de 500 μ M de peptide trilycine. L'adduit 8-lys-Gua est dosé après hydrolyse par HCl 6 N.

6.5 Validation de l'approche : détection de l'adduit 8-lys-Gua dans des pontages dG-KKK et dG-KYK

Les conditions expérimentales mises au point pour doser l'adduit 8-lys-Gua au sein d'un pontage ADN-protéine ont tout d'abord été testées lors d'expériences réalisées *in vitro* avec les tripeptides KKK et KYK, afin de s'assurer de la faisabilité et de la reproductibilité de cette méthodologie.

Une solution d'ADN double brin est irradiée en présence de riboflavine et d'un peptide KKK ou KYK à 500 μ M. L'ADN est précipité, hydrolysé et analysé par HPLC-MS/MS pour quantifier l'adduit 8-lys-Gua. Une cinétique d'irradiation à 0, 1, 2, 5 et 10 minutes est ainsi tracée pour chacun des 2 peptides étudiés (Figure 62). L'irradiation en présence de KKK conduit à une cinétique de formation d'adduits linéaire, avec une vitesse de formation d'adduits d'environ 17 lésions par minute. Dans le cas de l'irradiation avec KYK, la formation d'adduits est presque inexistante dans ces conditions.

La tyrosine possède un potentiel d'oxydo-réduction inférieur à celui de la guanine. Nous avons vu en introduction qu'un transfert électronique pouvait se produire de la tyrosine vers la guanine oxydée, réparant ainsi les radicaux formés sur la guanine (81). Ce phénomène pourrait donc expliquer les résultats observés pour la série d'irradiation réalisée avec le peptide KYK. La tyrosine centrale est vraisemblablement impliquée dans la réparation des radicaux cations de la guanine formés lors de la photosensibilisation, ce qui réduit le nombre de sites disponibles pour la formation d'adduits lysine-guanine.

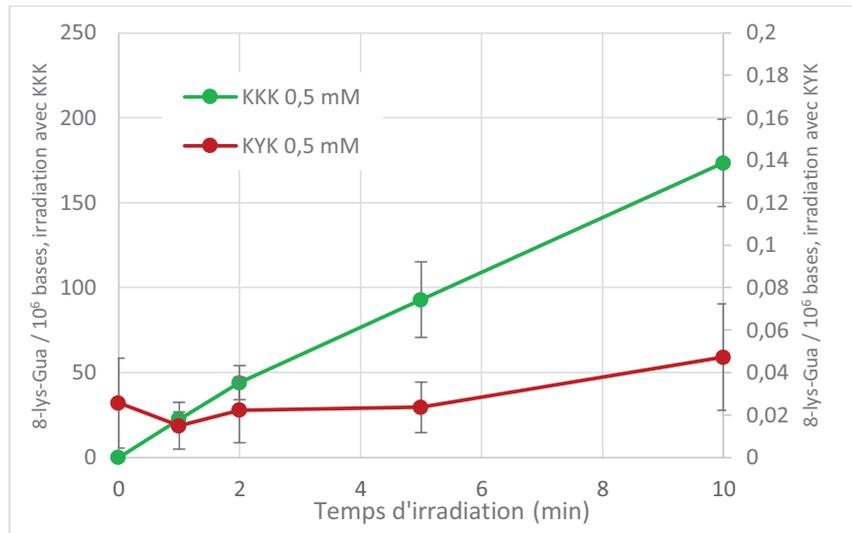


Figure 62 : Cinétiques de formation d'adduits 8-lys-Gua après photosensibilisation d'ADN isolé (0,5 mg/mL) en présence d'un tripeptide KKK ou KYK à une concentration de 500 µM. Les taux d'adduits sont indiqués sur l'axe des ordonnées à gauche pour l'expérience avec KKK et sur l'axe de droite pour l'expérience avec KYK.

Une deuxième expérience d'irradiation a été réalisée avec le peptide KKK afin d'évaluer l'effet du milieu d'irradiation (Figure 63). L'irradiation est réalisée soit dans l'eau soit dans un tampon phosphate à 10 mM. L'irradiation dans le tampon phosphate ralentit la formation de 8-lys-Gua : la vitesse de formation est de 1 adduit par minute, pour 17 après irradiation dans l'eau. Le milieu d'irradiation influe donc sur la formation de ces lésions ; l'utilisation du tampon phosphate modifie certainement la répartition du tripeptide dans la solution, par compétition entre les paires d'ions se formant avec les charges négatives de l'ADN et celles du tampon, ce qui a tendance à diminuer les interactions ioniques entre ADN et KKK, et donc diminue la possibilité d'addition nucléophile du peptide sur le radical cation de la guanine.

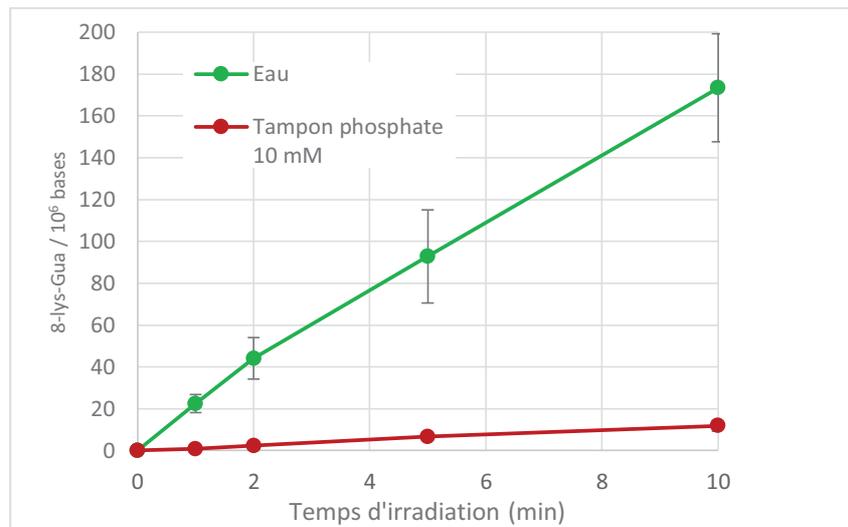


Figure 63 : Effet du milieu d'irradiation sur la formation d'adduits 8-lys-Gua après photosensibilisation d'ADN isolé en présence de KKK. L'irradiation est réalisée dans l'eau ou dans un tampon phosphate à 10 mM.

Chapitre 3 : Les pontages avec la lysine

La méthodologie ainsi développée pour isoler et quantifier l'adduit 8-lys-Gua nous a donc permis d'étudier la formation de cette lésion *in vitro*, lors d'un pontage avec un court peptide. Elle pourra donc être mise en œuvre pour les études *in cellulo*.

7 Quantification de l'adduit 8-lys-Gua dans des cellules irradiées

L'adduit 8-lys-gua est recherché dans l'ADN extrait de cellules THP1. La lignée THP1 est une lignée monocyttaire issue d'un patient leucémique. Ces cellules sont traitées avec différentes conditions de stress oxydant : (i) photosensibilisation par irradiation UVA en présence de riboflavine, (ii) rayonnement γ , (iii) rayonnement laser UV à 266 nm.

7.1 Etude après photosensibilisation

7.1.1 Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est étudiée à l'aide du test MTT, afin d'évaluer quantitativement l'effet des rayonnements UVA et du photosensibilisateur (Figure 64). Le test MTT est l'une des méthodes les plus utilisées pour estimer la viabilité cellulaire par mesure de l'activité métabolique. Le réactif utilisé est un sel de tétrazolium de couleur jaune (le bromure de 3-(4,5-Diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium), qui est réduit sous l'action de la succinate deshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes, en cristaux de formazan, de couleur violette. Ce précipité est ensuite solubilisé par le DMSO qui pénètre les membranes plasmiques.

Les cellules, en suspension dans du PBS, sont incubées avec différentes concentrations de riboflavine (0, 10 et 200 μM), à 37°C, pendant 30 minutes. Après rinçage au PBS, elles sont ensuite irradiées par UVA, à une dose de 50 J/cm². Une série témoin, non irradiée, est également réalisée.

L'incubation avec la riboflavine à une concentration de 10 μM diminue la viabilité des cellules de 23%, et de 48% pour une concentration de 200 μM . L'irradiation par UVA affecte beaucoup plus la viabilité cellulaire, qui atteint 40% environ sans photosensibilisateur ou avec la faible concentration de riboflavine, et 13% pour la concentration plus élevée.

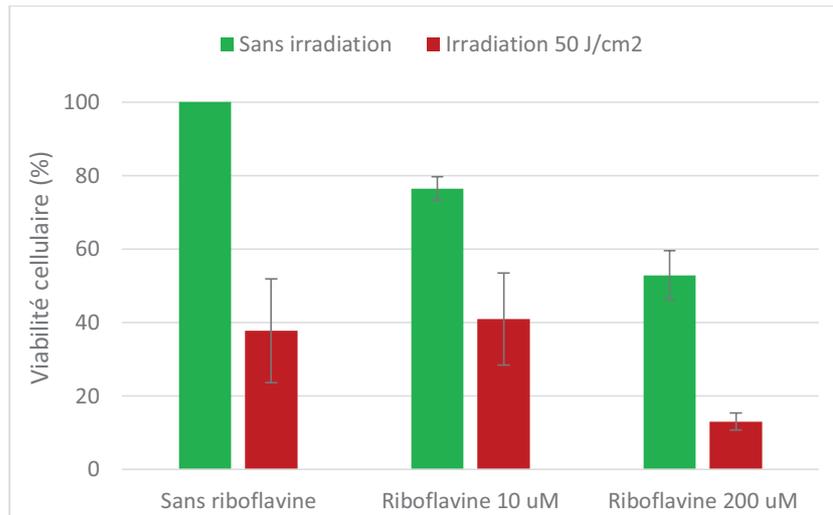


Figure 64 : Effets des UVA et de la riboflavine sur la viabilité des cellules THP1 évaluée par le test MTT, 24h après le traitement par irradiation.

7.1.2 Quantification de 8-lys-Gua et 8-oxodGuo

Les cellules sont incubées avec la riboflavine à une concentration de 200 μM , pendant 30 min à 37°C. Elles sont ensuite irradiées avec des doses d'UVA de 0, 50 et 100 J/cm^2 . Une série témoin, non traitée à la riboflavine, est également réalisée. La 8-oxodGuo et l'adduit 8-lys-Gua ont été recherchés par HPLC-MS/MS. L'irradiation en présence du photosensibilisateur conduit à la formation de 8-oxodGuo, avec un taux d'environ 8 lésions par million de nucléosides pour une dose de 100 J/cm^2 (Figure 65). Les taux d'adduits 8-lys-Gua se situent en-dessous du seuil de détection pour toutes les conditions de photosensibilisation étudiées.

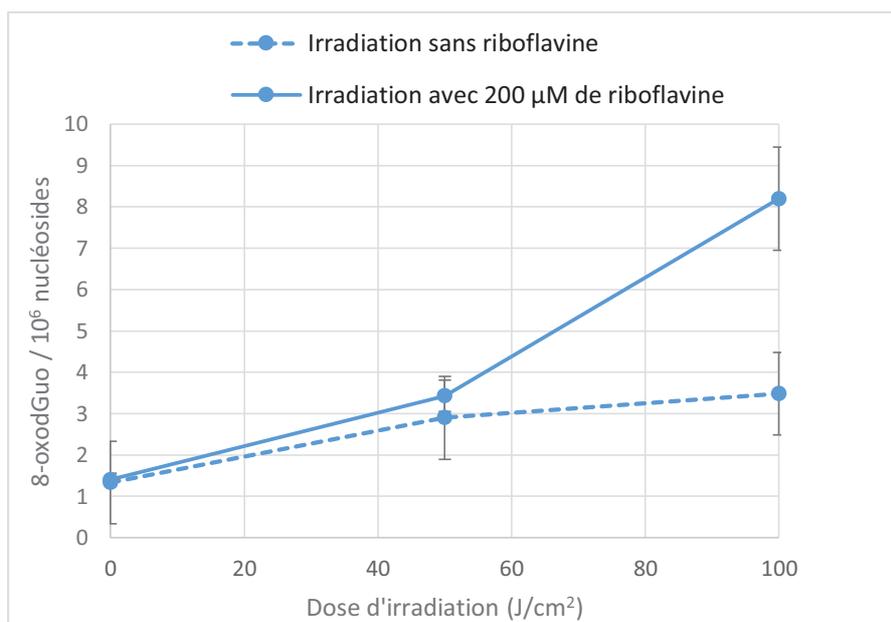


Figure 65 : Formation de 8-oxodGuo dans l'ADN cellulaire après photosensibilisation par UVA en présence de riboflavine.

7.2 Etude après exposition au rayonnement ionisant

7.2.1 Viabilité cellulaire

Les cellules sont mises en suspension dans du PBS et irradiées avec différentes doses de rayonnements γ : 0, 10, 50 et 100 grays. L'irradiation à 10 grays n'a pas provoqué de perturbations métaboliques détectables lors du test MTT (Figure 66). Les doses de 50 et 100 grays ont conduit à une baisse de la viabilité cellulaire de respectivement 30% et 57%

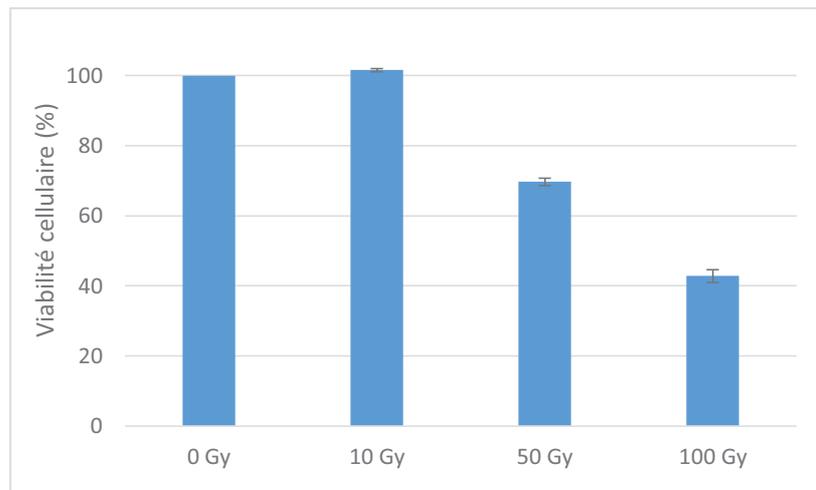


Figure 66 : Effets de l'exposition au rayonnement γ sur la viabilité des cellules THP1 évaluée par le test MTT, 24h après le traitement par irradiation.

7.2.2 Quantification de 8-lys-Gua et 8-oxodGuo

Les cellules sont exposées à des doses de rayonnement γ allant de 0 à 225 grays. Les taux de 8-oxodGuo et de 8-lys-Gua ont été mesurés par HPLC-MS/MS pour chaque dose d'irradiation. L'exposition au rayonnement γ produit de la 8-oxodGuo avec une constante de formation de 1.10^{-2} lésion/gray. Les taux de 8-lys-Gua observés dans ces conditions sont inférieurs à la limite de détection.

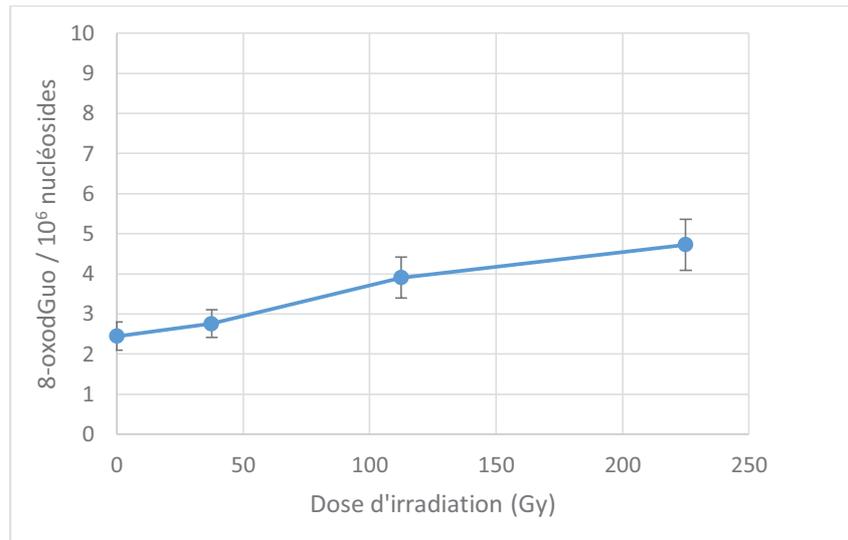


Figure 67 : Formation de 8-oxodGuo dans l'ADN cellulaire après exposition au rayonnement γ .

7.3 Etude après exposition à des impulsions laser à 266 nm

7.3.1 Viabilité cellulaire

Les cellules en suspension dans du PBS sont exposées au rayonnement laser UV, de longueur d'onde 266 nm, avec une énergie de 120 mJ par pulse (soit environ 1000 mJ/cm²/pulse). Le système utilisé sera décrit dans le paragraphe suivant. Les résultats de viabilité cellulaire obtenus lors du test MTT sont présentés dans la Figure 68. La plus faible dose utilisée (1 pulse) provoque une diminution de la viabilité de 15%. Une dose 10 fois plus élevée abaisse la viabilité de 62%.

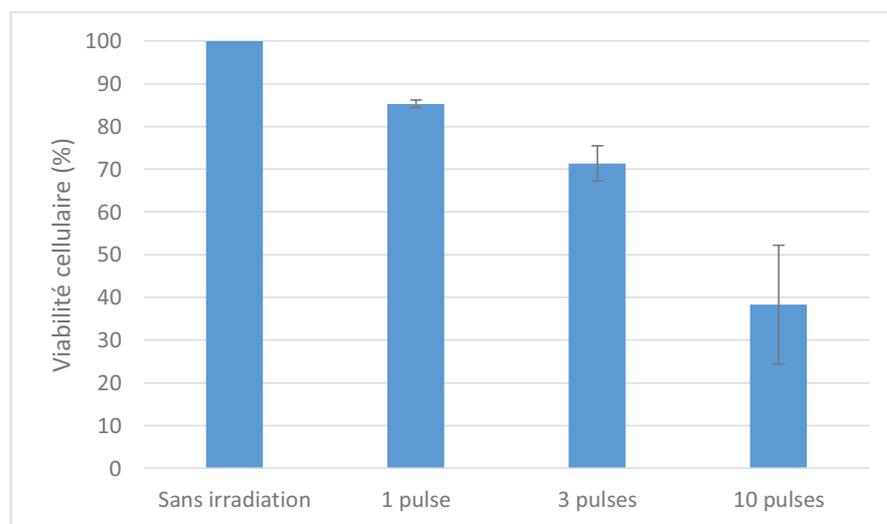


Figure 68 : Effets de l'exposition au rayonnement laser à 266 nm sur la viabilité des cellules THP1 évaluée par le test MTT, 24h après le traitement par irradiation.

7.3.2 Quantification de 8-lys-Gua et 8-oxodGuo

Les cellules sont exposées à des impulsions laser de longueur d'onde 266 nm. A cette longueur d'onde, les photons sont presque exclusivement absorbés par les bases nucléiques. Les conditions d'irradiation utilisées ont été choisies dans le but de favoriser un mécanisme biphotonique ; 2 photons atteignent la molécule cible (l'ADN) dans un laps de temps court (quelques nanosecondes). Le 1^e photon absorbé provoque une transition vers un état excité. Si un 2^e photon est absorbé par cet état excité, cela conduit à l'ionisation de la molécule. Ces conditions expérimentales permettent donc de produire beaucoup de radicaux cations de la guanine, soit par ionisation directe de la guanine, soit par transfert d'électron de la guanine vers un radical cation d'une autre base. Le but est de favoriser la formation de lésions impliquant le radical cation de la guanine par rapport à d'autres dommages à l'ADN.

Après exposition des cellules au rayonnement laser, l'ADN est extrait, hydrolysé en conditions acides, puis analysé par HPLC-MS/MS. Les chromatogrammes obtenus pour des échantillons irradiés par 10 impulsions laser (Figure 69) comportent un pic majoritaire à 9 min similaire à celui observé pour le standard 8-lys-Gua. Ce pic est présent pour les 2 transitions étudiées, 296 -> 233 et 296 -> 251 dans les mêmes proportions que celles obtenues pour le standard, et correspond donc à l'adduit 8-lysine-guanine.

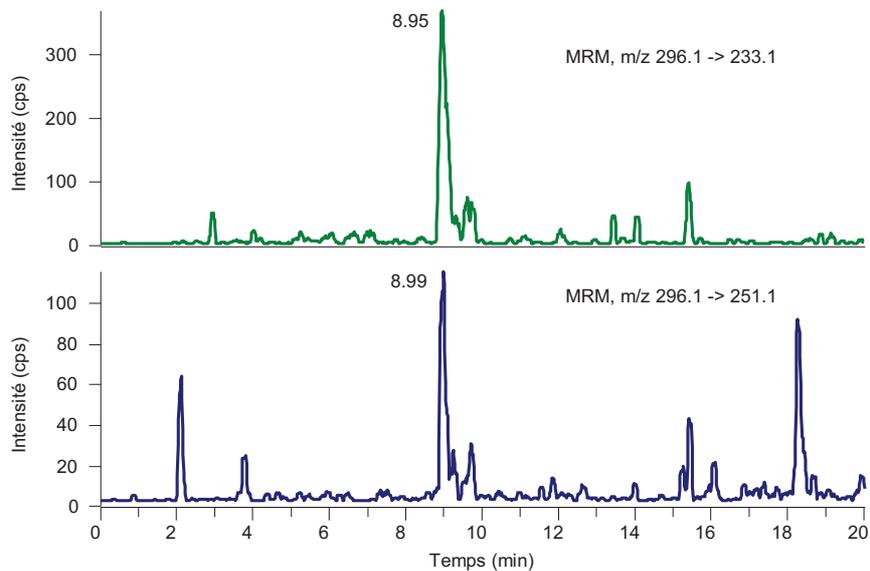


Figure 69 : Analyse par HPLC-MS/MS d'ADN extrait de cellules THP1 exposées au rayonnement laser correspondant à une énergie reçue de 5000 mJ/cm². Chromatogrammes obtenus pour la détection de l'adduit 8-lys-Gua.

L'exposition aux impulsions laser dans les conditions de cette expérience produit environ 300 fois plus de 8-oxodGuo que d'adduits lysine-guanine (Figure 70). Les taux de formation de ces 2 lésions sont quasi-proportionnels au nombre de pulses reçus. Pour une dose d'irradiation correspondant à 10 pulses laser, les taux de formation observés sont de 313 lésions par million de nucléosides pour la 8-oxodGuo et de 1 lésion par million de bases pour 8-lys-Gua.

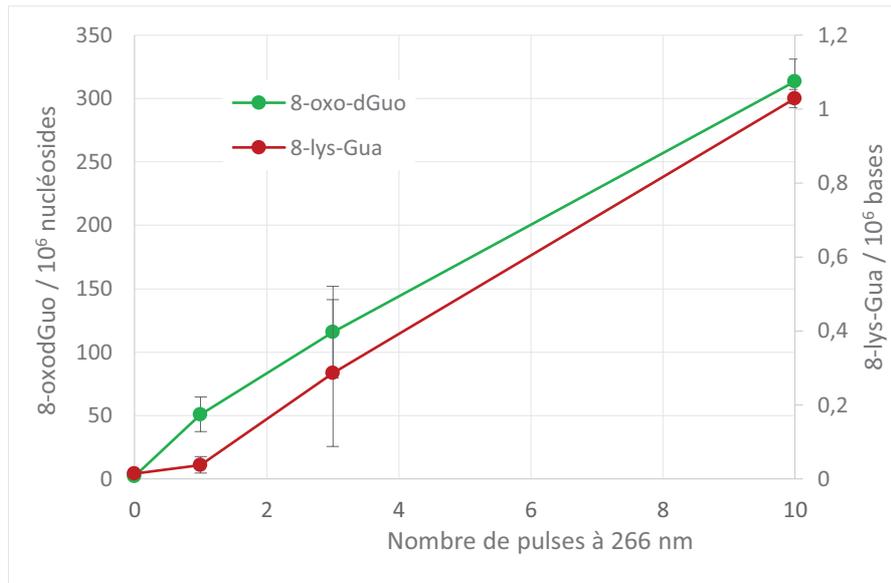


Figure 70 : Formations de 8-oxodGuo et de 8-lys-Gua après exposition à des impulsions laser à une longueur d'onde de 266 nm avec une énergie 60 mJ (ce qui représente une énergie reçue d'environ 500 mJ/cm²/pulse).

L'adduit 8-lysine-guanine a donc été détecté dans l'ADN extrait de cellules THP1 exposées au rayonnement laser. Les taux de formation de cette lésion sont proportionnels à la dose d'irradiation et donc au taux de guanines oxydées. Les autres conditions de traitement utilisées (photosensibilisation, exposition au rayonnement ionisant) n'ont pas permis d'induire des taux d'adduits supérieurs à la limite de détection par HPLC-MS/MS. Ces travaux montrent donc pour la première fois que la lysine est capable de réagir avec le radical cation de la guanine *in cellulo* pour former des pontages ADN-protéines. D'autre part, ces expériences confirment indirectement la structure de l'isomère de l'adduit lysine-guanine étudié. Dans le paragraphe traitant de la synthèse des adduits, nous avons évoqué l'existence de 2 isomères pour ce composé. La caractérisation du standard par RMN apporte des arguments en faveur de la structure correspondant à un pontage avec l'amine ϵ . Lors des expériences réalisées *in cellulo*, la lysine pontée était probablement impliquée dans une liaison peptidique, par l'amine α . Les adduits détectés correspondent donc très vraisemblablement à un pontage avec l'amine ϵ .

8 Détection des pontages ADN-protéines dans l'ADN cellulaire

Différentes méthodes de détection des pontages ADN-protéines ont été décrites dans la littérature (cf. partie bibliographique). Nous avons tenté d'adapter des conditions permettant de détecter dans l'ADN cellulaire les pontages survenant lors de l'exposition au rayonnement laser. Le but est de démontrer que les taux d'adduits lysine-guanine observés dans ces conditions sont corrélés à la formation de pontages ADN-protéines. Le développement de cet outil de détection constitue une étape importante dans la compréhension du mécanisme de formation des pontages ADN-protéines. 2 méthodes de détection ont été envisagées :

- le test des comètes,
- le test au FITC.

8.1 Détection des pontages ADN-protéines par le test des comètes

Le test des comètes constitue une méthode de détection indirecte des pontages ADN-protéines (cf. partie bibliographique, paragraphe 1.1.3.1). Ces dommages ont pour effet de réduire la migration de l'ADN observée lors de ce test (40). Nous avons donc mis en œuvre cette technique afin de mettre en évidence les pontages ADN-protéines induits par l'exposition au rayonnement laser de cellules THP1 (Figure 71).

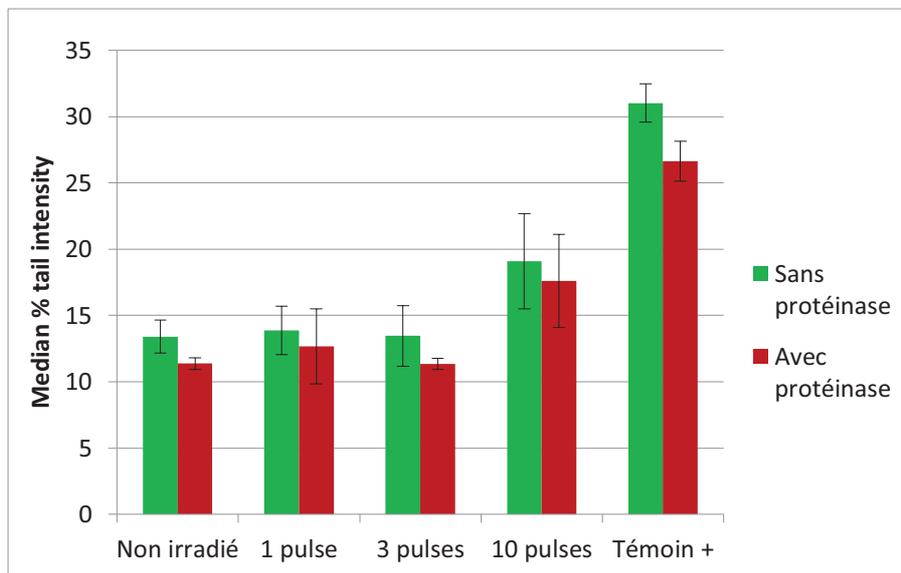


Figure 71 : Test des comètes réalisé sur des cellules THP1 exposées à différentes doses de rayonnement laser à 266 nm. Chaque pulse présente une énergie de 60 mJ ce qui correspond à environ 500 mJ/cm². L'échantillon « témoin + » est constitué de cellules A549, incubées avec 1 µM de riboflavine pendant 20 minutes, puis exposées au rayonnement UVA, à une dose de 10 J/cm².

Les conditions expérimentales utilisées sont une adaptation du protocole décrit par Merk *et al.* (40). Après l'étape de lyse des cellules, une partie des lames a été incubée avec la protéinase K. Une série témoin est réalisée en incubant les lames dans les mêmes conditions sans protéinase.

La quantité relative d'ADN présente dans la queue de la comète est évaluée à partir de l'intensité de fluorescence dans la queue exprimée en pourcentage de la fluorescence totale. Cette valeur reflète la migration de l'ADN endommagé. Nous n'observons pas de variation significative de la migration de l'ADN pour les irradiations à 1 ou 3 pulses par rapport aux cellules non irradiées. Cet indicateur augmente pour la dose la plus élevée correspondant à 10 pulses d'irradiation. L'incubation avec la protéinase diminue très légèrement la migration de l'ADN pour toutes les doses d'irradiation, mais cette tendance n'est pas observée de façon significative.

L'exposition des cellules THP1 à de fortes doses de rayonnement laser provoque donc une augmentation de la migration de l'ADN lors du test des comètes en conditions alcalines. Cet effet ne peut pas être associé à la présence de pontage ADN-protéines puisque l'incubation avec la protéinase K n'induit aucun effet significatif sur la migration.

Le test des comètes est une méthode de détection peu spécifique des pontages ADN-protéines. En effet, la migration de l'ADN peut être influencée par la présence de divers dommages tels que les cassures simple/double brin(s), et les adduits (avec les protéines ou autres molécules). Ainsi, l'augmentation de la migration lors de l'exposition à la plus haute dose d'irradiation peut être associée à la formation de plusieurs types de lésions. Cette expérience ne nous permet donc pas de conclure sur la présence de pontages ADN-protéines, du fait de l'absence de différence de migration entre les échantillons contrôles et ceux traités par la protéinase.

8.2 Détection par marquage au FITC

La détection des pontages ADN-protéines par des méthodes indirectes est généralement peu spécifique. Nous avons donc choisi une méthode directe impliquant le marquage à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), avec une détection par fluorescence. Le principe de cette technique est décrit plus en détails dans la partie bibliographique (cf. paragraphe 1.1.3.2).

Le protocole du test au FITC a été décrit par Shoukamy *et al.* en 2012 (10). Les protéines liées à l'ADN sont marquées avec le FITC, qui réagit spécifiquement avec les amines des protéines, et non avec les amines des bases nucléiques.

L'ADN extrait de cellules irradiées par laser est incubé avec le FITC. Il est ensuite précipité et rincé à l'éthanol afin d'éliminer le FITC en excès et les protéines libres. La fluorescence est mesurée à 515 nm, et la quantité d'ADN est mesurée à partir de l'absorbance UV à 260 nm. Le rapport de l'intensité de fluorescence sur l'absorbance UV reflète de façon relative le taux de pontages ADN-protéines. Les résultats obtenus en fonction du nombre de pulses à 266 nm sont représentés dans la Figure 72.

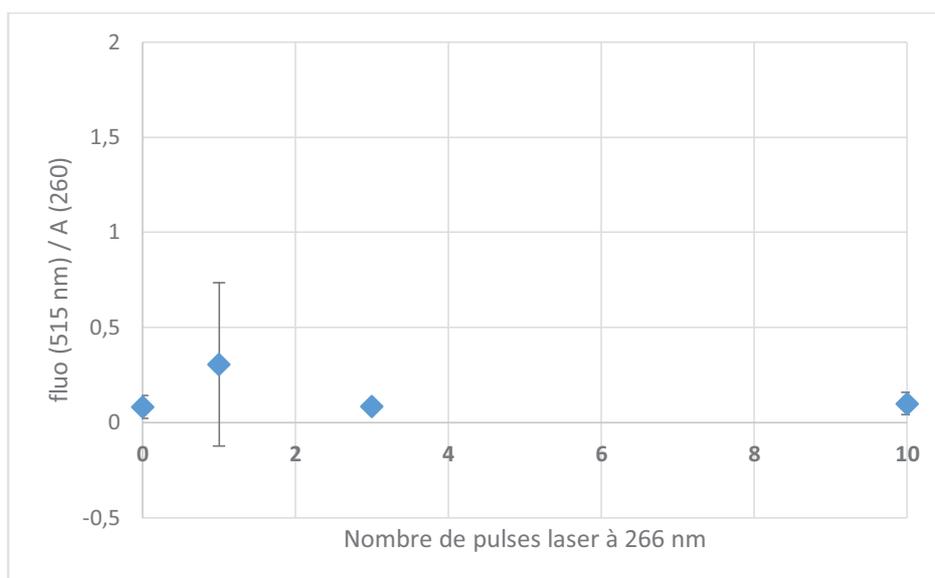


Figure 72 : Détection des pontages ADN-protéines par le test au FITC. Les résultats sont exprimés par le rapport de l'intensité de fluorescence à 515 nm sur l'absorbance à 260 nm, qui reflète le taux de pontages ADN-protéines. Cette expérience est réalisée en triplicats pour chaque dose d'irradiation. Chaque pulse présente une énergie de 120 mJ ce qui correspond à environ 1000 mJ/cm².

Nous n'observons pas de différence significative entre les différentes doses d'irradiation. L'exposition au rayonnement laser n'a pas d'effet sur l'intensité de fluorescence mesurée normalisée par la quantité d'ADN. D'autre part, aux vues des écarts-type observés pour les triplicats, les conditions testées semblent peu reproductibles. Cette expérience ne permet donc pas d'appréhender la formation des pontages ADN-protéines produits par les impulsions laser à 266 nm. Le problème provient certainement de la nécessité d'utiliser un protocole d'extraction de l'ADN optimisé afin de s'affranchir des protéines non liées de façon covalente à l'ADN (H. Ide, communication personnelle). De nouvelles conditions seront donc mises au point, en s'assurant de la fixation du marqueur sur les résidus protéiques à l'aide d'un témoin positif. Cette méthodologie présente en effet l'avantage d'être rapide à mettre en œuvre et d'être spécifique pour ce type de dommages à l'ADN.

9 Conclusion

Cette première partie du projet a été consacrée à la formation d'adduits entre la lysine et la guanine, lors de l'oxydation à un électron de l'ADN. Après avoir synthétisé et caractérisé la 8-lysine-2'-désoxyguanosine, nous avons mis au point une méthode de quantification de cet adduit au sein d'un pontage ADN-protéine. Nous avons ainsi pu mettre en évidence des pontages entre l'amine ϵ de la lysine et le carbone C8 de la guanine dans de l'ADN extrait de cellules THP1 irradiées par laser. Des expériences préliminaires ont été entreprises afin de déterminer les taux pontages ADN-protéines totaux dans ces échantillons irradiés.

Chapitre 4 :

Modèles de pontages peptides-oligonucléotides

1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons exposé le développement d'une méthode analytique destinée à quantifier les adduits entre la lysine et la guanine. Cet adduit a été détecté dans de l'ADN cellulaire. Dans la suite de ces travaux nous avons entrepris de mettre au point des modèles de pontages entre une séquence oligonucléotidique et un peptide. L'objectif était de mettre en évidence un pontage entre les 2 molécules, lors du processus d'oxydation à un électron de l'ADN, puis d'identifier quel acide aminé et quelle base de l'ADN intervenaient dans cette réaction. En particulier, grâce à la méthode analytique développée, nous avons démontré que certains de ces pontages s'effectuaient probablement entre une guanine et une lysine. La stratégie adoptée ainsi que les techniques utilisées sont résumées dans la Figure 73.

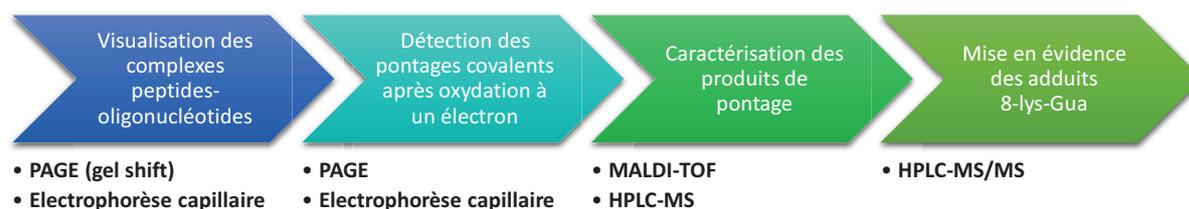


Figure 73 : Stratégie suivie pour l'étude des pontages peptides-oligonucléotides et techniques utilisées. PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis, MALDI-TOF : matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight

2 Le modèle « doigt de zinc CP1-Y2F + duplex 12-mer »

2.1 Présentation du modèle

Les doigts de zinc sont des motifs d'une trentaine d'acides aminés qui participent à la structure secondaire des protéines. Ces motifs sont stabilisés par des liaisons de coordination avec un ou plusieurs atomes de zinc (Figure 74-A), et par un cœur hydrophobe. La chaîne peptidique adopte ainsi un repliement particulier (Figure 74-B), ce qui lui permet d'interagir avec certaines séquences de l'ADN grâce à un phénomène de reconnaissance (Figure 74-C).

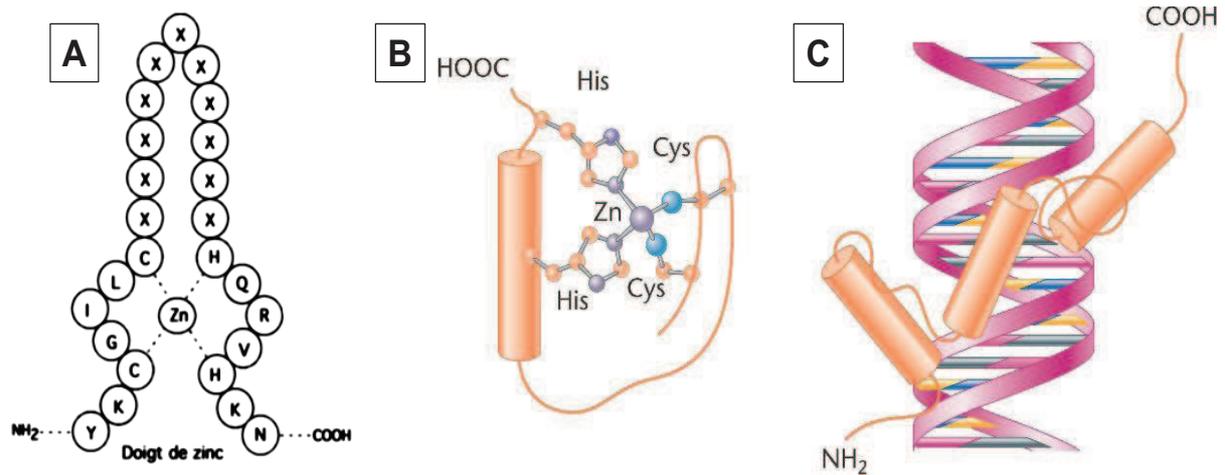


Figure 74 : Le motif doigt de zinc. A & B : Représentation schématisée d'un doigt de zinc Cys₂His₂. C: Interaction avec l'ADN.

Il existe plusieurs types de doigt de zinc, mais les plus étudiés constituent la classe des Cys₂His₂ : un atome de zinc forme des liaisons de coordination avec 2 cystéines et 2 histidines (Figure 74-B). Les peptides doigt de zinc sont constitués d'un feuillet β antiparallèle, présentant une boucle formée par 2 cystéines, et d'une hélice α qui contient une seconde boucle formée par 2 histidines. Ces 2 unités structurales sont reliées par un ion Zn²⁺. (130)

La reconnaissance d'une séquence d'ADN par un motif doigt de zinc se déroule de la façon suivante (130) :

- Le premier contact s'effectue grâce à l'hélice α , qui se lie au grand sillon. Des liaisons hydrogène se forment spécifiquement entre les acides aminés en position -1, 3 et 6 de l'hélice, et 3 bases successives de l'un des brins d'ADN (131).
- Il existe une seconde interaction entre l'acide aminé en position 2 de l'hélice α et une base du second brin d'ADN (132).

Ce phénomène de reconnaissance est représenté dans la Figure 75. Les travaux de Sera (133) ont permis d'établir un code de reconnaissance entre une séquence de 4 paires de bases et les acides aminés en position -1, 2, 3 et 6 de la chaîne α du motif doigt de zinc. Ce code permet d'identifier pour chaque base, les acides aminés qui peuvent probablement interagir, au niveau d'une position relative définie dans l'hélice α .

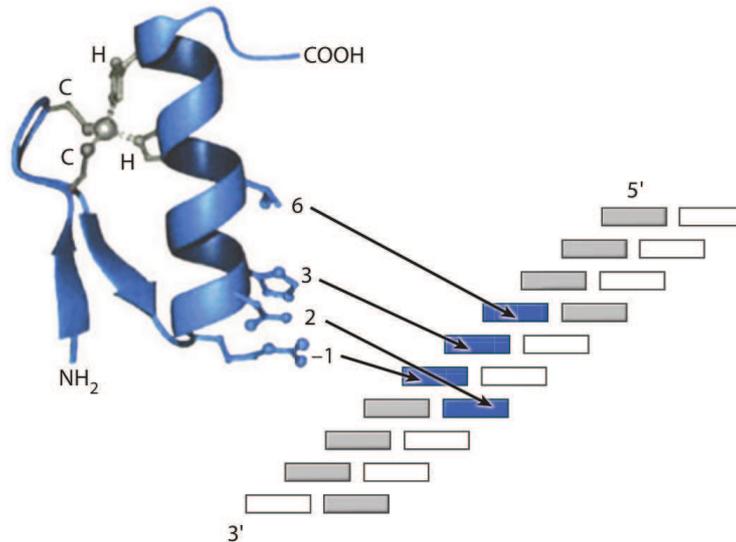
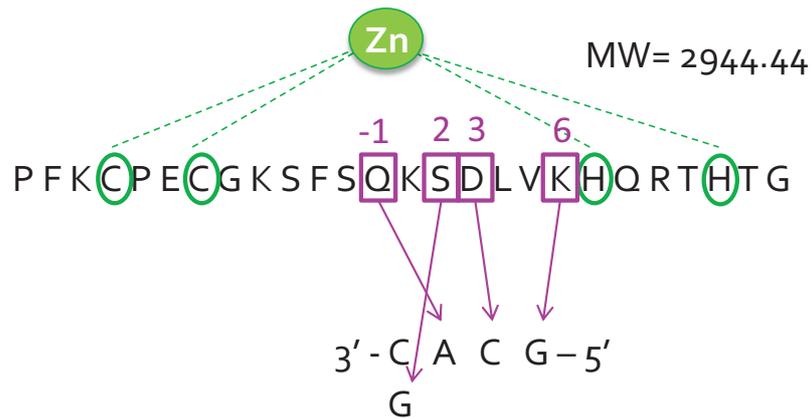


Figure 75 : Représentation schématique du phénomène de reconnaissance d'une séquence d'ADN par un motif doigt de zinc (130).

Berg *et al.* ont synthétisé un peptide doigt de zinc présentant une séquence consensus, appelé CP1. Cette séquence a été conçue en sélectionnant pour chaque position l'acide aminé le plus représenté à partir d'une base de données de 131 séquences de doigts de zinc. Le peptide obtenu présente une affinité pour les ions métalliques supérieure à celles des motifs précédemment décrits. (134)

Les expériences présentées dans ce paragraphe ont été réalisées avec un peptide de 26 acides aminés, CP1-Y2F. Il s'agit d'une séquence proche de la séquence consensus CP1, mais la tyrosine en position 2 est remplacée par une phénylalanine. Cette modification n'affecte pas la formation de la structure en doigt de zinc.

Grâce au code de reconnaissance nous avons reconstitué la séquence « CACG » (Figure 76) : l'adénine est reconnue par la glutamine en position -1, l'acide aspartique en position 3 se lie à une cytosine ; et la lysine en position 6 interagit avec la guanine. Au niveau du brin complémentaire, la guanine est reconnue par le motif sérine en position 2. La séquence oligonucléotidique du duplex que nous avons utilisé pour les expériences présentées ici est représentée dans la Figure 76, celle-ci est constituée de 3 unités de 4 paires de bases correspondant au motif identifié.



(1) 5'-GCA CGC ACG CAC-3' MW= 3598.65

(2) 5'-GTG CGT GCG TGC-3' MW= 3691.64

Figure 76 : Le système « doigt de zinc CP1-Y2F + duplex 12-mer ». Séquences du peptide et des oligonucléotides, existence d'un code de reconnaissance.

2.2 Étude de la formation de pontages par Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

L'objectif des expériences présentées ci-après est de former un complexe entre le peptide CP1-Y2F et le duplex oligonucléotidique, afin de favoriser leur rapprochement spatial, puis de réaliser une oxydation à un électron de l'ADN pour provoquer une réaction de pontage covalent.

2.2.1 Détection du complexe par « gel shift »

Cette première expérience permet de s'assurer de la formation du complexe avant d'induire des pontages covalents par irradiation. L'oligonucléotide duplex est marqué en 5' au ^{32}P sur le brin *I*. Le complexe est formé par incubation du duplex 12-mer avec le peptide CP1-Y2F à différentes concentrations. Plusieurs essais ont été effectués afin de déterminer les conditions optimales pour former le complexe (à 4°C ou à température ambiante, avec variation du temps d'incubation). Le complexe est ensuite détecté par gel shift, encore appelé « Electrophoretic Mobility Shift Assay » (EMSA) (Figure 77). Cette expérience est réalisée sur un gel natif composé de polyacrylamide à 8%. La migration du duplex est plus faible que celle du contrôle simple brin, ce qui confirme la correcte hybridation des 2 brins. Le duplex est mis en présence de concentrations de peptide allant de 0 à 4 mM. Quelle que soit la concentration en peptide, on n'observe pas de « shift ». Les différentes conditions d'incubation testées conduisent au même résultat. Ceci peut provenir : (i) d'une absence de formation de complexe ou (ii) d'une dissociation du complexe obtenu lors de l'électrophorèse. La constante d'affinité entre ces 2 molécules est faible (de l'ordre du millimolaire), il est donc probable que le complexe soit relativement peu stable lors de la migration. Cette expérience ne nous permet donc pas de conclure sur la présence ou non du complexe.

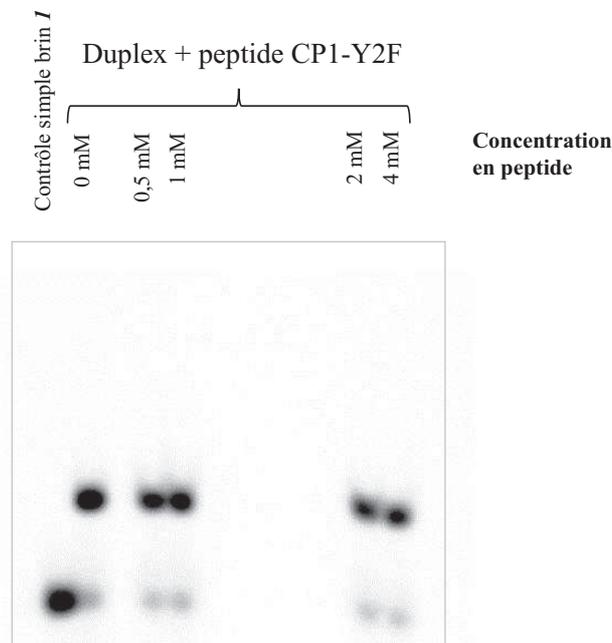


Figure 77 : Détection du complexe par gel shift sur un gel natif (polyacrylamide 8%, acrylamide/bisacrylamide 29/1). L'oligonucléotide duplex à 5 μM (dont 0,5 mole % marquée au ^{32}P) est incubé avec différentes concentrations de peptide CP1-Y2F pendant 30 min à température ambiante dans un tampon constitué de Tris-HCl à 20 mM pH 7,4, de NaCl à 100 mM, et de ZnCl_2 à 100 μM .

2.2.2 Visualisation des pontages après photosensibilisation

L'expérience précédente est renouvelée en ajoutant après l'incubation avec le peptide une étape de photosensibilisation. Celle-ci est effectuée par irradiation halogène en présence de riboflavine. En parallèle, une série témoin est réalisée : le duplex est irradié dans les mêmes conditions mais sans peptide. Les pontages sont ensuite visualisés par migration sur un gel dénaturant composé de polyacrylamide à 8% additionné d'urée à 42 g/100mL (Figure 78). Dans la série d'irradiation du duplex sans le peptide, on observe l'apparition de produits de dégradation de l'oligonucléotide **I**, en fragments de plus faible poids moléculaire. Le taux de dégradation augmente avec le temps d'irradiation. Pour la série d'irradiation du duplex en présence du peptide, on observe en plus des produits de dégradation de **I** la présence d'un « shift », qui correspond à des produits de pontage covalent. Ainsi, la photosensibilisation du duplex 12-mer en présence du peptide CP1-Y2F conduit à la formation de pontages, qui migrent de façon retardée sur gel dénaturant.

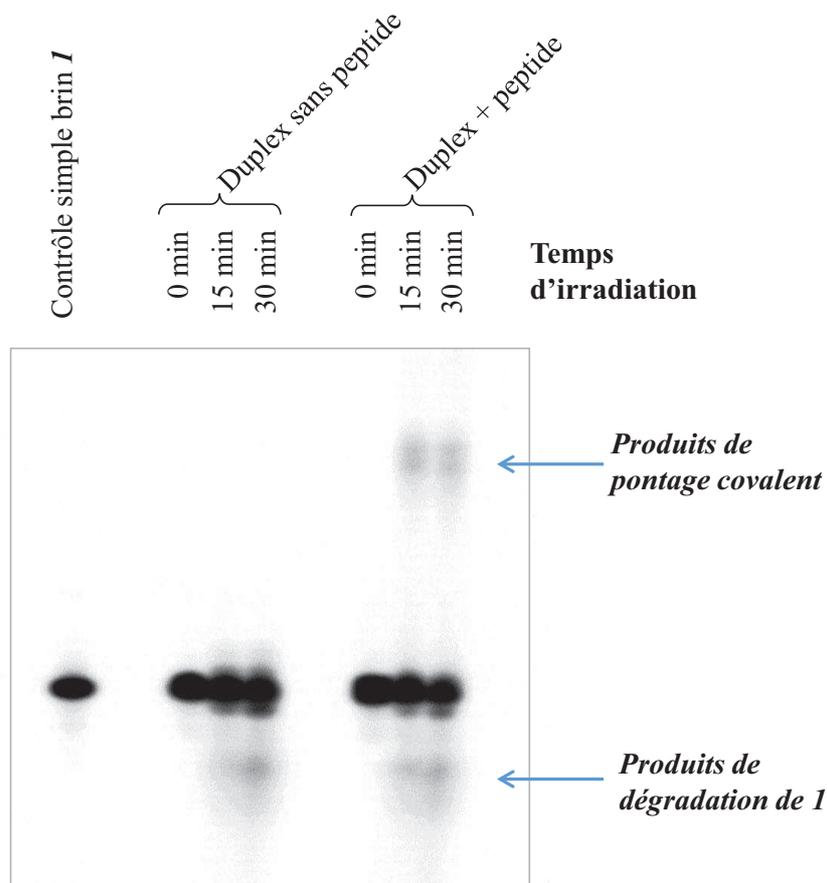


Figure 78 : Détection des pontages covalents par migration sur gel dénaturant (polyacrylamide 8%, acrylamide/bisacrylamide 29/1, urée 42 g/100 mL). L'oligonucléotide duplex à 5 μ M (dont 0,5 mole % de **I** marquée au 32 P) est incubé avec 0,5 mM de peptide CP1-Y2F pendant 15 minutes à température ambiante (dans un tampon suivant Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, ZnCl₂ 100 μ M), puis irradié par halogène en présence de riboflavine (50 μ M).

Nous avons ensuite cherché à déterminer si le pontage s'effectuait préférentiellement sur l'un des brins. Pour cela, une expérience d'irradiation est réalisée, après marquage du duplex en 5' soit sur le brin **1**, soit sur le brin **2**. Lors de la migration sur gel dénaturant (Figure 79), des résultats similaires sont obtenus pour les 2 marquages :

- l'irradiation du duplex seul conduit à des produits de dégradation dont la migration est augmentée ;
- l'irradiation du duplex avec le peptide conduit à d'autres composés en plus de ces produits de dégradation : ils sont détectables par un « shift » qui est relativement identique quel que soit le brin marqué.

Le pontage par photosensibilisation du duplex 12-mer en présence du peptide se produit donc indifféremment sur l'un ou l'autre des brins. Par conséquent il existe vraisemblablement plusieurs produits de pontage.

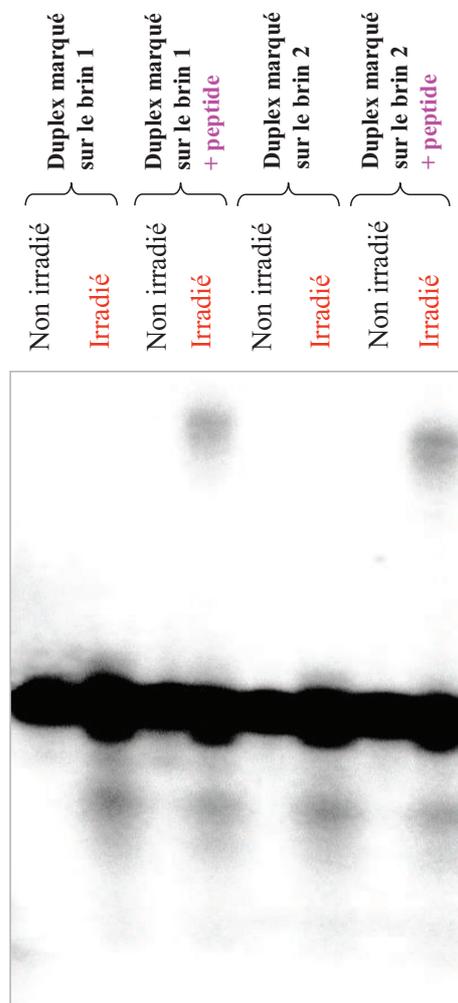


Figure 79 : Détection des pontages covalents par migration sur gel dénaturant (polyacrylamide 8%, acrylamide/bisacrylamide 29/1, urée 42 g/100 mL). Le duplex est marqué au ^{32}P soit sur le brin **1** soit sur le brin **2**, à 0,5 mole %. L'incubation est réalisée avec 5 μM de duplex et 0,5 mM de peptide CPI-Y2F pendant 20 minutes à température ambiante dans un tampon constitué de Tris-HCl à 20 mM pH 7,4, de NaCl à 100 mM, et de ZnCl_2 à 100 μM . Les échantillons sont mis en présence de riboflavine à 50 μM puis irradiés ou non par halogène pendant 20 minutes.

2.3 Purification des produits de pontage

Les produits de pontage sont purifiés par gel préparatif. Un oligonucléotide 44-mer est utilisé comme référence car il présente une migration similaire, d'après le gel dénaturant de la Figure 80 réalisé après marquage au ^{32}P . La purification s'effectue ensuite sur les oligonucléotides non marqués, avec une détection par fluorescence : la zone prélevée sur le gel est repérée grâce à l'oligonucléotide 44-mer qui est marqué par la cyanine 3 ($\lambda_{\text{excitation}} : 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} : 570 \text{ nm}$). Le produit obtenu est ensuite purifié par HPLC (Figure 81).

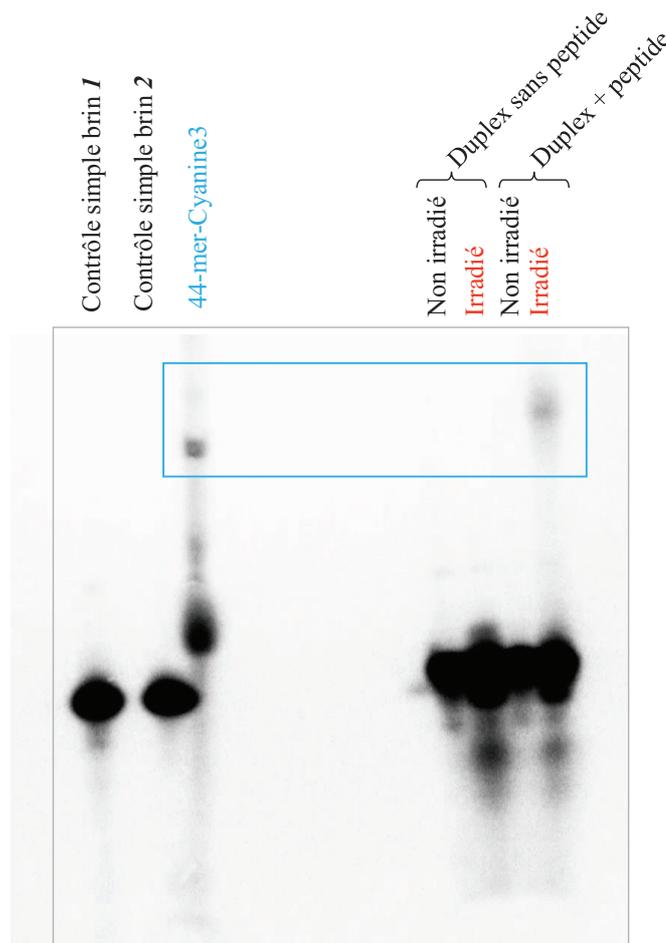


Figure 80 : Choix d'un oligonucléotide de référence pour la purification des produits de pontage par gel dénaturant (polyacrylamide 8%, acrylamide/bisacrylamide 29/1, urée 42 g/100 mL). Les oligonucléotides sont marqués au ^{32}P à 0,5 mole %. Le duplex ($5 \mu\text{M}$) est incubé avec le peptide CPI-Y2F ($0,5 \text{ mM}$) pendant 20 minutes à température ambiante dans un tampon constitué de Tris-HCl à 20 mM pH 7,4, de NaCl à 100 mM , et de ZnCl_2 à $100 \mu\text{M}$. Les échantillons sont mis en présence de riboflavine à $50 \mu\text{M}$ puis irradiés ou non par halogène pendant 20 minutes.

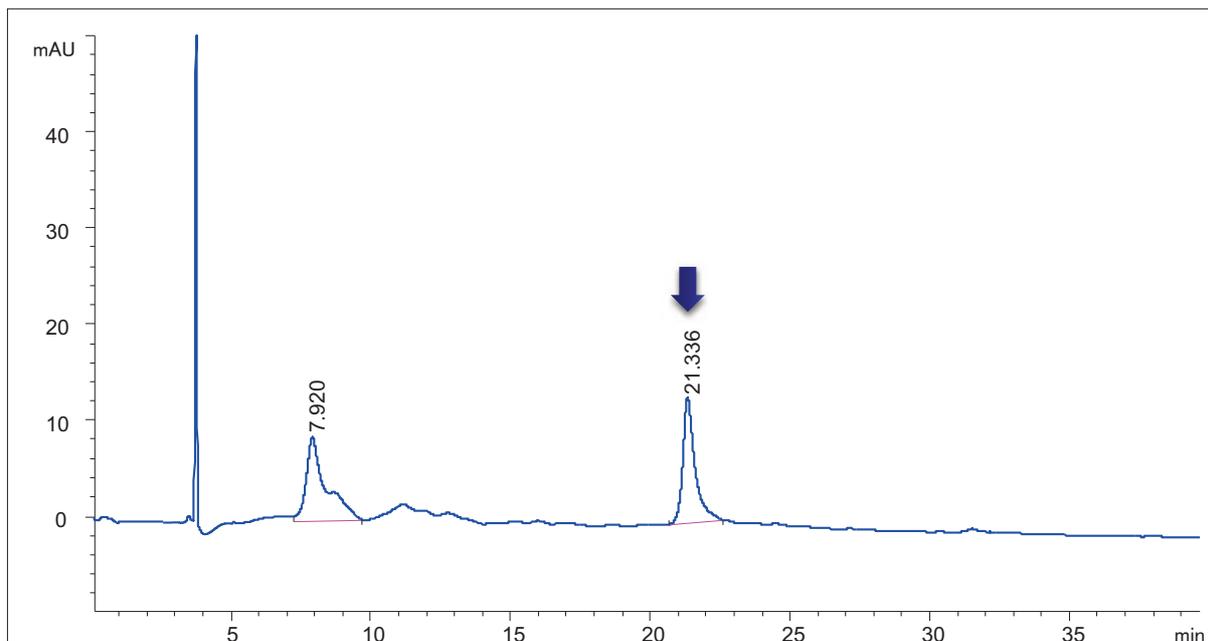


Figure 81 : Chromatogramme obtenu lors de la purification par HPLC des produits de pontage « peptide CP1-Y2F + duplex 12-mer ». L'élution est réalisée dans de l'acétate de triéthylammonium (TEAA) à 10 mM avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 12 % en 40 minutes. La détection est effectuée par UV à 230 nm. Le composé élué à 21 minutes a été purifié et caractérisé.

2.4 Caractérisation des produits de pontage par spectrométrie de masse

Le produit purifié est caractérisé par MALDI-TOF. Les masses théoriques attendues pour les produits de pontage impliquant la formation d'une lésion covalente guanine-lysine entre le duplex 12-mer et le peptide CP1-Y2F sont de 5640, si le pontage a lieu sur le brin 1, et 6633 s'il s'effectue sur le brin 2. Le spectre obtenu en mode positif (Figure 82) montre un ion majoritaire de rapport m/z 5384,5. Le produit purifié présente donc une masse inférieure aux masses attendues, mais supérieure à celles des oligonucléotides ou du peptide seuls. Ce composé pourrait donc provenir d'un pontage suivi d'une dégradation de la partie oligonucléotidique ou du motif peptidique au cours de la photo-oxydation : suroxydation, cassure de brin...

Différentes tentatives de digestion de la partie peptidique par la trypsine ont été entreprises, mais celles-ci ne nous ont pas apporté plus d'information sur la structure du pontage. De même, les expériences de digestion de la partie oligonucléotidique par une exonucléase (la phosphodiesterase I) ne nous ont pas permis de reconstituer la séquence pontée.

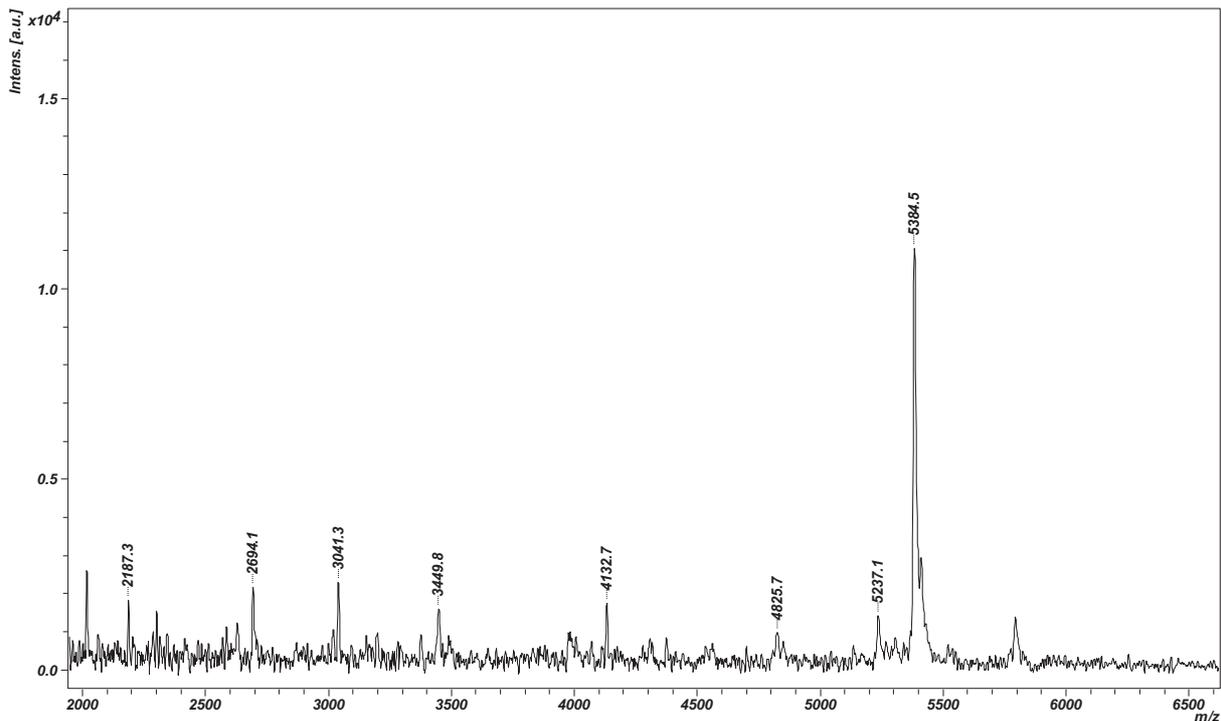


Figure 82 : Spectre MALDI-TOF obtenu lors de la caractérisation du produit de pontage purifié. La matrice utilisée est l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB). L'acquisition est réalisée en mode linéaire positif.

La Figure 83 illustre l'une des possibilités de pontage qui a été envisagée. Si le pontage s'effectue avec le brin 2, présentant une cassure entre la 2^e cytosine et la guanine qui lui succède, on obtiendrait un poids moléculaire de 2440,4. Si ce fragment était ponté avec le peptide intact, de poids moléculaire 2944,4, le produit de pontage se situerait à 5382,8 g/mol. L'analyse par spectrométrie de masse en mode positif devrait donc révéler un ion pseudomoléculaire avec un m/z proche de 5384, ce qui est cohérent avec le spectre présenté dans la Figure 82. Etant donné que le produit de pontage peut subir des modifications chimiques au niveau de la partie peptidique et/ou de la partie oligonucléotidique, sur l'un ou l'autre des brins, une multitude de possibilités de pontages sont envisageables.



Figure 83 : Possibilité de pontage entre le brin 2 fragmenté et le peptide CP1-Y2F. Les carrés violets représentent les acides aminés impliqués dans la reconnaissance de la séquence d'ADN. La fragmentation supposée pour le brin 2 est représentée en rouge.

Grâce au modèle « CP1-Y2F + duplex 12-mer », nous avons mis en évidence un pontage covalent, formé par photo-oxydation. Ce pontage a été visualisé par PAGE, en gel dénaturant. Nous avons tenté d'identifier la nature chimique du pontage, mais les analyses réalisées par spectrométrie de masse n'ont pas permis de résoudre la structure des produits de pontages purifiés. Le rendement de pontage étant

relativement faible (quelques % d'oligonucléotides pontés environ), nous n'avons pas pu isoler suffisamment de produit de pontage pour entreprendre une caractérisation plus détaillée. La constante d'affinité de ce motif doigt de zinc pour la séquence d'ADN se situe vraisemblablement aux alentours de 1 mM. Il est donc pertinent de considérer un modèle présentant une constante d'affinité plus élevée pour l'ADN, afin de favoriser d'avantage le rapprochement spatial entre les 2 molécules, et ainsi augmenter les rendements de pontage.

Nous avons donc envisagé d'étudier d'autres modèles « peptide + oligonucléotide » afin d'obtenir des rendements plus élevés, et de pouvoir isoler plus de produit de pontage pour la caractérisation. Ces modèles doivent se rapprocher au mieux des caractéristiques suivantes :

- Le peptide est de préférence de faible poids moléculaire, commercial ou facilement synthétisable.
- Il doit avoir une forte affinité pour une séquence consensus identifiée.
- Le modèle doit présenter des possibilités de pontages guanine-lysine avec des résidus lysyl accessibles.

3 Les modèles « peptide + aptamère »

3.1 Présentation des modèles

3.1.1 Le modèle « thrombine + aptamère 15-mer »

La thrombine est une protéine qui intervient dans la cascade de coagulation. Par son activité sérine-protéase, elle convertit le fibrinogène soluble en fibrine insoluble et contribue ainsi à la formation des caillots sanguins. Ce facteur de coagulation est donc la cible de certains traitements anticoagulants.

L' α -thrombine est la structure obtenue directement après activation de la pro-thrombine par la pro-thrombinase. Elle est composée de 2 chaînes A et B, reliées par un pont disulfure. A pH physiologique, l' α -thrombine possède une charge positive nette d'environ +7 ; celle-ci peut donc se lier à différentes molécules polyanioniques, telles que le fibrinogène, l'anti-thrombine III ou certaines séquences nucléotidiques. Les travaux de Church *et al.* ont permis d'identifier des résidus lysyl de la chaîne B intervenant dans l'interaction avec le fibrinogène (135).

En 1992, l'équipe de Toole (136) a isolé des aptamères simple brin de la thrombine, présentant des constantes d'affinité de 25 à 200 nM. Parmi ces aptamères, la séquence 15-mer représentée dans le Tableau 8 possède des propriétés anticoagulantes : cet aptamère est capable d'inhiber l'activité protéolytique de la thrombine, à des concentrations de l'ordre du nanomolaire.

L'aptamère n'interagit pas directement avec le site catalytique de la thrombine, mais il se lie avec un site secondaire, appelé « anion-binding exosite ». Ce site de surface est localisé au niveau d'une région hautement basique, et il participe à la spécificité de l'activité de la thrombine. Dans une étude de 1993, Paborsky *et al.* ont démontré que les 2 résidus lysine impliqués dans l'interaction avec le fibrinogène intervenaient également dans la liaison avec l'aptamère. (137)

3.1.2 Le modèle « Single Strand Binding protein + aptamère 49-mer »

Les protéines « Single-Stranded Binding » (SSB) se lient aux régions simple brin de l'ADN afin de les protéger de la dégradation par les nucléases. De plus elles interviennent dans différents processus du métabolisme de l'ADN : la réplication, la réparation et la recombinaison, principalement (138). La protéine SSB la plus étudiée provient d'*E. coli*. Celle-ci est composée de 4 sous-unités de 20 kDa environ (139). Elle possède une forte affinité pour l'ADN, et constitue donc l'un des principaux modèles pour étudier les interactions entre ADN et protéines. La liaison de la protéine SSB de *E. coli* à l'ADN simple brin est coopérative ; la constante d'affinité vis-à-vis de séquences poly(dT) a été estimée à $10^8 - 10^{10} \text{ M}^{-1}$. A noter que l'affinité pour d'autres séquences oligonucléotidiques ou pour l'ADN naturel est moindre (138).

Différents travaux ont contribué à l'identification du domaine de liaison à l'ADN. En particulier, l'importance d'un résidu phénylalanine dans la formation des complexes ADN-SSB a été mise en évidence par Merrill *et al.* (140). Plus tard, Khamis *et al.* ont étudié le rôle de 2 résidus tyrosine (141). De plus, la liaison de la SSB à l'ADN semble également être influencée par différentes interactions hydrophobes, et ioniques, entre les charges négatives de l'ADN et des acides aminés de type lysine (138). D'ailleurs, il apparaît que les résidus lysine jouent un rôle essentiel, puisque la modification de ces derniers s'accompagne d'une diminution de l'affinité (142).

La formation des complexes ADN-SSB est peu spécifique de la séquence d'ADN, mais l'affinité augmente avec la longueur de l'oligonucléotide. Pour notre étude, une séquence de 49 bases a été sélectionnée (Tableau 8). Cette séquence est riche en guanine et comporte 4 motifs avec 2 guanines adjacentes. Ces motifs confèrent à la guanine un potentiel d'ionisation plus bas que la guanine isolée, ce qui favorise la formation du radical cation (143).

Tableau 8 : Caractéristiques des aptamères étudiés.

Taille	Séquence	%G	Poids moléculaire
15-mer	GGTTGGTGTGGTTGG	60	6,2 kDa
49-mer	AATTCGCTAGCTGGAGCTTGGATTGATGTGGTGTGT GAGTGCGGTGCCC	39	25 kDa

3.2 Visualisation des complexes

Afin de vérifier que les complexes entre les peptides et les aptamères sont majoritaires par rapport aux aptamères libres, nous avons eu recours à 2 techniques : la détection par gel shift et l'électrophorèse capillaire. Les résultats décrits ci-dessous correspondent au modèle « thrombine + aptamère 15-mer ». Dans ce modèle, le complexe fait intervenir l'aptamère replié sous la forme d'un G-quadruplex, composé de 2 G-quartets reliés par 2 boucles TT et une boucle TGT (Figure 84). Cette structure est stabilisée en solution par la présence d'ion potassium (144).

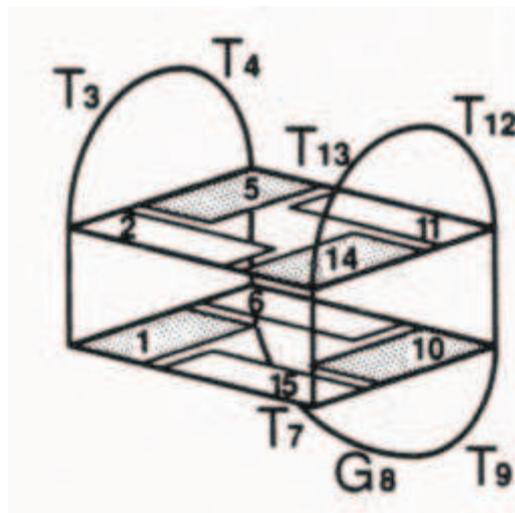


Figure 84 : Structure en G-quadruplex de l'aptamère 15-mer proposée par Macaya et al. (144)

3.2.1 Par gel shift

L'aptamère 15-mer est préalablement marqué au ^{32}P . Il est ensuite dénaturé à 90°C puis le G-quadruplex se forme spontanément lors du refroidissement. L'aptamère est incubé avec la thrombine à différentes concentrations. On réalise également une série contrôle en incubant l'aptamère sous sa forme linéaire avec la thrombine dans les mêmes conditions.

La migration sur gel natif ne révèle pas de « shift » de façon distincte, mais on observe cependant une très nette diminution de la quantité d'aptamère libre lorsque l'on augmente la concentration du peptide (Figure 85). Cette tendance est plus marquée lors de l'incubation avec le G-quadruplexe qu'avec l'aptamère linéaire. Cependant si l'on compare les profils obtenus lors du dépôt des aptamères sans peptide, on observe une légère modification du profil de migration lorsque celui-ci est replié sous la forme de G-quadruplex. Le complexe est difficile à détecter par gel shift, puisqu'on assiste probablement à une dissociation de ce dernier au cours de la migration. Alors que l'oligonucléotide est chargé négativement, la thrombine quant à elle présente une charge globale positive ; il est donc possible que l'électrophorèse favorise la dissociation du complexe formé entre ces 2 molécules. Afin de limiter cette

dissociation, la migration a été réalisée sur un gel de petite taille, et les dépôts ont été effectués sans bleu sucrose. Malgré ces précautions, aucune bande de plus faible migration n'a été nettement détectée. Néanmoins la diminution de l'intensité du spot de l'aptamère libre lors de l'augmentation de la concentration en thrombine suppose fortement la formation d'un complexe. La trainée présente pour de fortes concentrations de thrombine correspondrait à la dissociation du complexe et ce dernier est probablement visible à plus forte concentration de protéine car on observe une bande diffuse en fin de trainée.

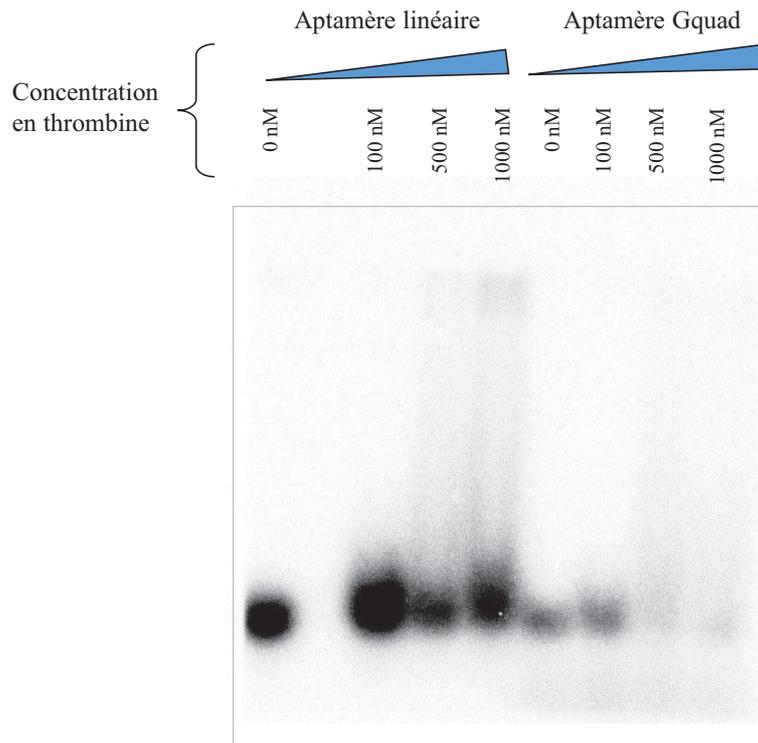


Figure 85 : Détection des complexes « thrombine + aptamère 15-mer » par EMSA sur gel natif (polyacrylamide 8%, acrylamide/bisacrylamide 29/1). L'oligonucléotide est marqué à 100 mole % avec du ^{32}P , et dénaturé ou non pour former des G-quadruplexes. Une quantité identique (100 fmoles, soit 8,33 nM) d'aptamère 15-mer marqué est mise en présence de différentes concentrations de thrombine (0 à 1000 nM) pendant 1h à température ambiante dans un tampon composé de phosphate de sodium à 20 mM pH 7,4, et de KCl à 100 mM.

3.2.2 Par électrophorèse capillaire

Les analyses par électrophorèse capillaire ont été réalisées au Département de Pharmacochimie Moléculaire par Sandrine Perrier. En 2004 les travaux de Huang *et al.* ont mis en évidence la détection du complexe thrombine + aptamère 15-mer par cette technique, qui permet d'obtenir une résolution bien meilleure que par PAGE (145). Les conditions d'analyse ont été optimisées avec un capillaire de silice « coaté », c'est-à-dire que les silanols sont masqués avec un polymère, l'oxyde de polyéthylène (PEO). Le « coating » permet de diminuer le flux électroosmotique et l'adsorption des protéines sur les parois

du capillaire pendant l'électrophorèse et ainsi d'obtenir des séparations reproductibles présentant des signaux fiables et précis (146).

Les électrophorégrammes obtenus lors de l'analyse d'échantillons d'aptamère incubé avec différentes concentrations de thrombine sont présentés dans la Figure 86. Les analyses sont effectuées en mode anionique, la longueur du capillaire utilisée est de 8,5 cm. La détection UV est paramétrée à 260 nm.

L'aptamère incubé sans peptide est détecté à environ 1 minute, avec un pic gaussien. Avec 5 μM de thrombine, l'intensité de ce pic diminue, mais on n'observe aucun pic supplémentaire. Le complexe se forme probablement mais il n'est pas détectable, soit parce qu'il se dissocie ou bien parce que la résolution du pic correspondant est très faible. Avec 10 μM de thrombine, l'intensité du pic de l'aptamère libre est encore plus faible, et un pic large qui correspond au complexe apparaît aux alentours de 1,8 minute. L'élargissement du pic de l'aptamère en présence de protéine reflète certainement la fraction d'ADN dissociée du complexe pendant l'électrophorèse.

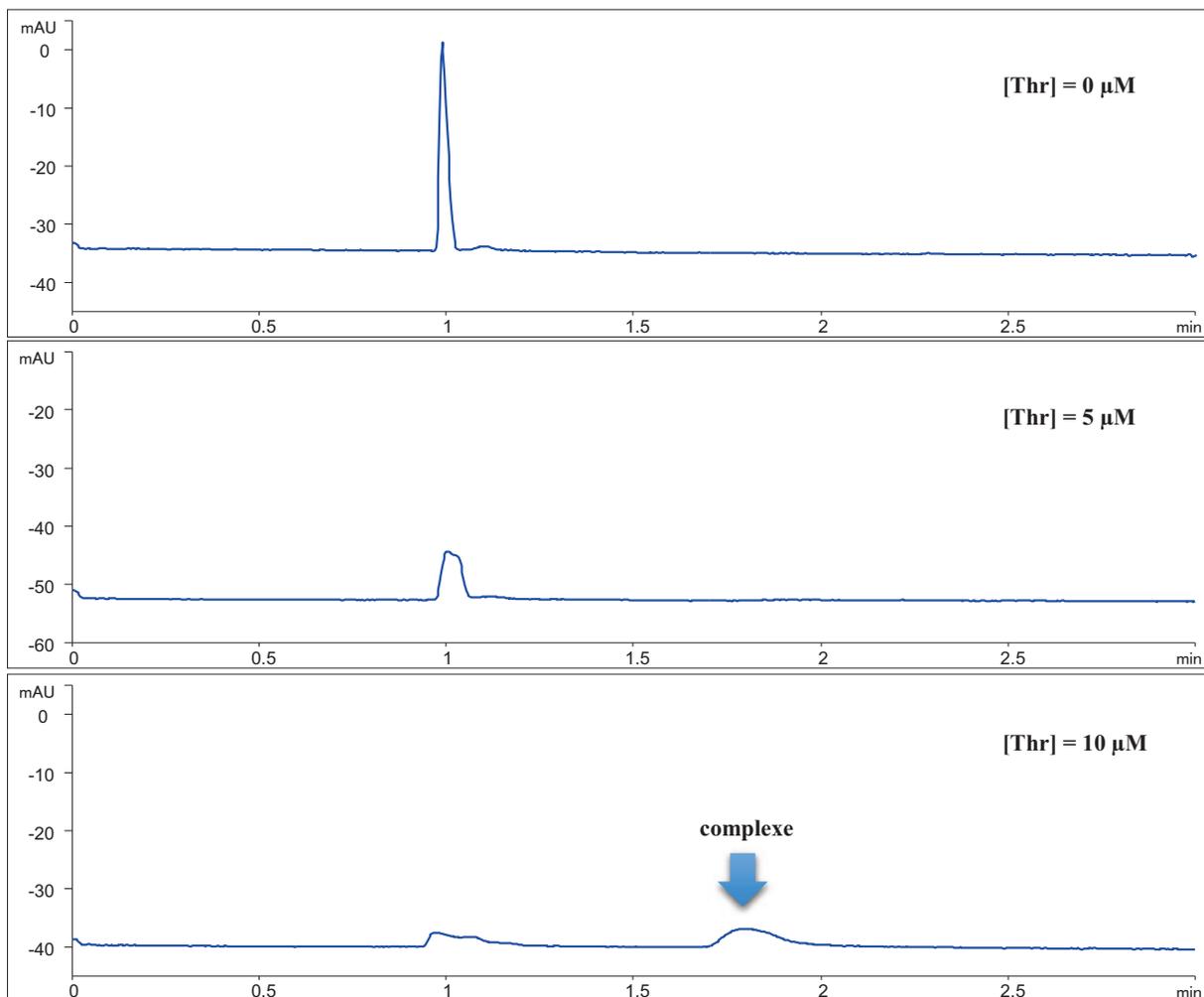


Figure 86 : Visualisation de l'aptamère 15-mer et du complexe « thrombine + aptamère 15-mer » par électrophorèse capillaire. L'aptamère (20 μM) est incubé avec différentes concentrations de thrombine (0 à 10 μM) dans un tampon Tris-HCl à 10 mM pH 7,5 contenant 15 mM de KCl. L'analyse est effectuée en mode anionique sur une longueur de capillaire de 8,5 cm dans le tampon d'incubation avec un voltage de +25 kV. La pression d'injection est réglée à -50 mbar pendant 4 secondes.

L'électrophorèse capillaire constitue donc une technique de choix pour visualiser la formation des complexes entre la thrombine et l'aptamère 15-mer. Elle a également été employée pour la détection du complexe « SSB + 49-mer » sans équivoque puisque ce dernier ne se dissocie pas pendant l'électrophorèse. Elle permet en outre de quantifier la fraction d'ADN complexé en mesurant la hauteur du pic de l'aptamère.

3.3 Expérience d'irradiation

Les échantillons d'ADN complexé aux protéines ont été irradiés par une lampe halogène en présence d'un photosensibilisateur, et exposés au rayonnement laser, afin de générer une oxydation à un électron de l'ADN et de créer un pontage covalent. Dans les expériences présentées ici le tampon composé de Tris, nucléophile et susceptible de réagir avec le radical cation de la guanine, a été remplacé par un tampon phosphate de potassium.

3.3.1 Photosensibilisation par UVA en présence de riboflavine

L'expérience de photosensibilisation a été effectuée avec le modèle « thrombine + aptamère 15-mer ». Dans ce but, les complexes formés après incubation ont été irradiés pendant 10 et 20 min, puis les échantillons ont été analysés par électrophorèse capillaire. Une série témoin est effectuée en traitant l'aptamère seul dans les mêmes conditions. L'analyse de l'aptamère sans thrombine révèle une dégradation de celui-ci d'environ 70 % lors de l'irradiation, ce qui se traduit sur l'électrophorégramme de la Figure 87 par une diminution de l'intensité du pic correspondant et l'apparition d'un nouveau pic de plus faible mobilité.

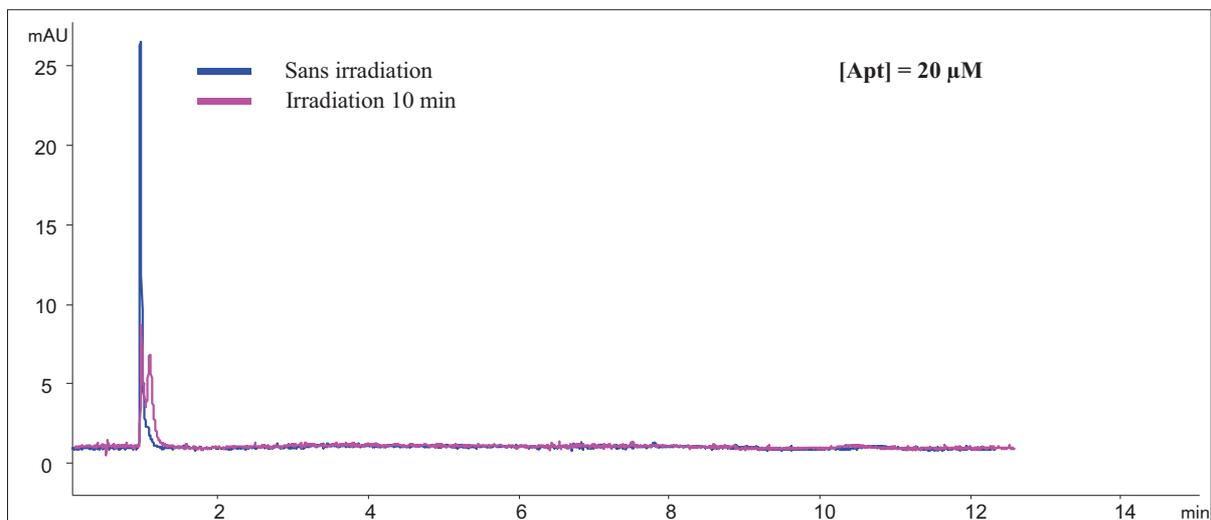


Figure 87 : Electrophorégramme obtenu lors de l'analyse des échantillons témoins, constitués de l'aptamère sans peptide, irradiés ou non par une lampe halogène en présence de riboflavine. Les conditions d'analyse sont identiques à celles de la Figure 86. Le tampon utilisé pour l'irradiation et l'analyse des échantillons est composé de phosphate de potassium à 10 mM pH 7,5 et de KCl à 15 mM.

Les tracés obtenus lors de l'analyse des échantillons de complexe irradiés (Figure 88-A) révèlent une forte dégradation de l'aptamère comme il a été observé précédemment, mais on note la présence de 2 massifs de pics supplémentaires. Les pics présents à 10 minutes environ correspondent à des produits

de dégradation de la riboflavine (données non présentées ici). Le massif de pics à 2 minutes pourrait provenir des produits de pontage.

Afin de vérifier cette hypothèse, l'analyse a été répétée dans des conditions dénaturantes (Figure 88-B) : les échantillons sont traités par l'urée (2M) à 90°C pendant 5 min, la migration est effectuée également en présence d'urée (1M) dans le tampon, et le capillaire est chauffé à 40°C. Ces conditions permettent de favoriser la dissociation des complexes non covalents, et de ne visualiser que les pontages covalents. Sur l'électrophorégramme obtenu, les produits de pontage supposés ne sont plus détectés ; il s'agissait donc de composés instables en conditions dénaturantes. Aucun pontage covalent n'est observé dans ces conditions d'irradiation.

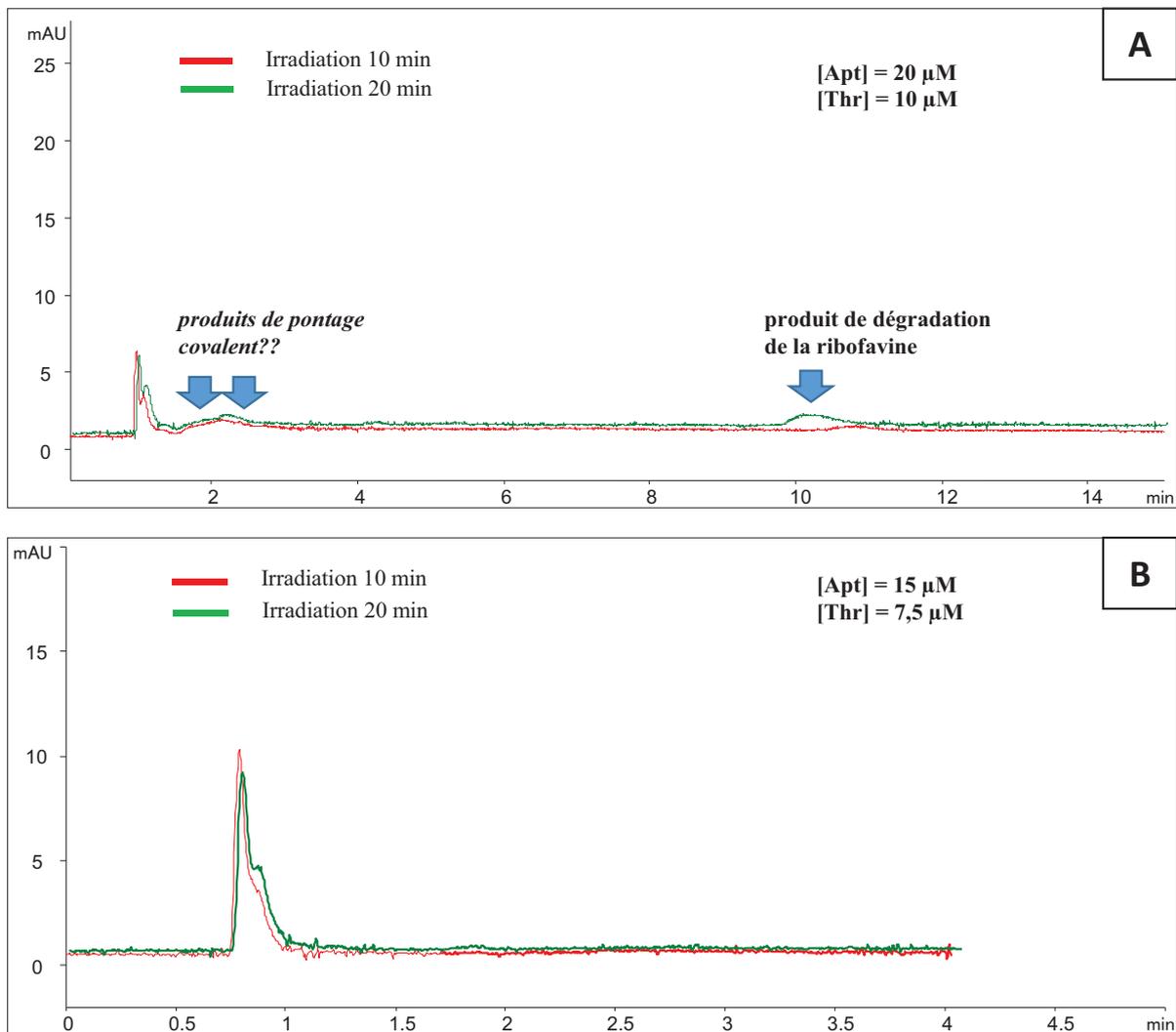


Figure 88 : Electrophorégrammes des échantillons de complexe irradiés par halogène en présence de riboflavine. L'aptamère 15-mer (20 μM) et la thrombine (10 μM) sont incubés dans un tampon composé de phosphate de potassium à 10 mM, pH 7,5 et de KCl 15 mM. Les échantillons sont ensuite mis en présence de riboflavine (40 μM) puis irradiés par une lampe halogène. Les conditions d'analyse sont identiques à celles de la Figure 86. Le tampon utilisé pour l'analyse est identique au tampon d'incubation. A : Analyse en conditions classiques. B : Analyse en conditions dénaturantes (tampon additionné d'urée (1M) et capillaire chauffé à 40°C).

L'expérience de photosensibilisation ne nous a donc pas permis de former un pontage covalent détectable par électrophorèse capillaire. Nous nous sommes donc orientés vers l'exposition au rayonnement laser à 266 nm, qui est associée à des taux élevés de radicaux cations de la guanine et devrait favoriser la réaction de pontage par oxydation à un électron de l'ADN. Ces conditions ont également été choisies pour le modèle impliquant la SSB.

3.3.2 Irradiation par laser à 266 nm

Les échantillons d'aptamères incubés avec la thrombine ou avec la SSB ont été irradiés par un pulse laser à 1000 mJ/cm², afin d'induire une oxydation à un électron.

La thrombine commerciale est stockée dans un tampon contenant 50% de glycérol. Le tampon de stockage de la SSB commerciale contient également du glycérol et du tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris). Ces deux espèces (le glycérol et le Tris) constituent des nucléophiles potentiels pour l'addition sur le radical cation de la guanine. Elles pourraient donc entrer en compétition avec l'addition des groupements nucléophiles des peptides et ainsi perturber la réaction de pontage recherchée. Ces solutions de peptides ont donc été purifiées grâce à des colonnes d'exclusion stérique G10 présentant un cut-off de 5,5 kDa, afin d'ôter le glycérol et le Tris.

Au préalable les échantillons sont analysés par électrophorèse capillaire afin de s'assurer de la présence des complexes suite à l'étape d'incubation. Dans les échantillons d'aptamères incubés avec les protéines non purifiées, les taux d'ADN complexé sont respectivement de 92 et 68% pour les systèmes « thrombine + aptamère 15-mer » et « SSB + aptamère 49-mer ». Lorsque les solutions de protéines sont purifiées au préalable, les complexes n'ont pas été détectés par électrophorèse capillaire.

Après irradiation par laser, les échantillons sont traités par hydrolyse acide, et injectés par HPLC-MS/MS pour doser l'adduit 8-lys-Gua. Les résultats obtenus pour le système « thrombine + aptamère 15-mer » sont représentés dans la Figure 89. Le chromatogramme correspondant au complexe irradié « aptamère + thrombine purifiée » présente un pic au temps de rétention attendu pour la détection de l'adduit 8-lys-Gua. La quantification de cet adduit reflète un taux de pontages aux alentours de 0,28 pour 1000 oligonucléotides. Le pic correspondant à 8-lys-Gua n'est pas observé sur le chromatogramme de l'aptamère irradié sans peptide, et il est à peine visible lors de l'irradiation du complexe impliquant la thrombine non purifiée.

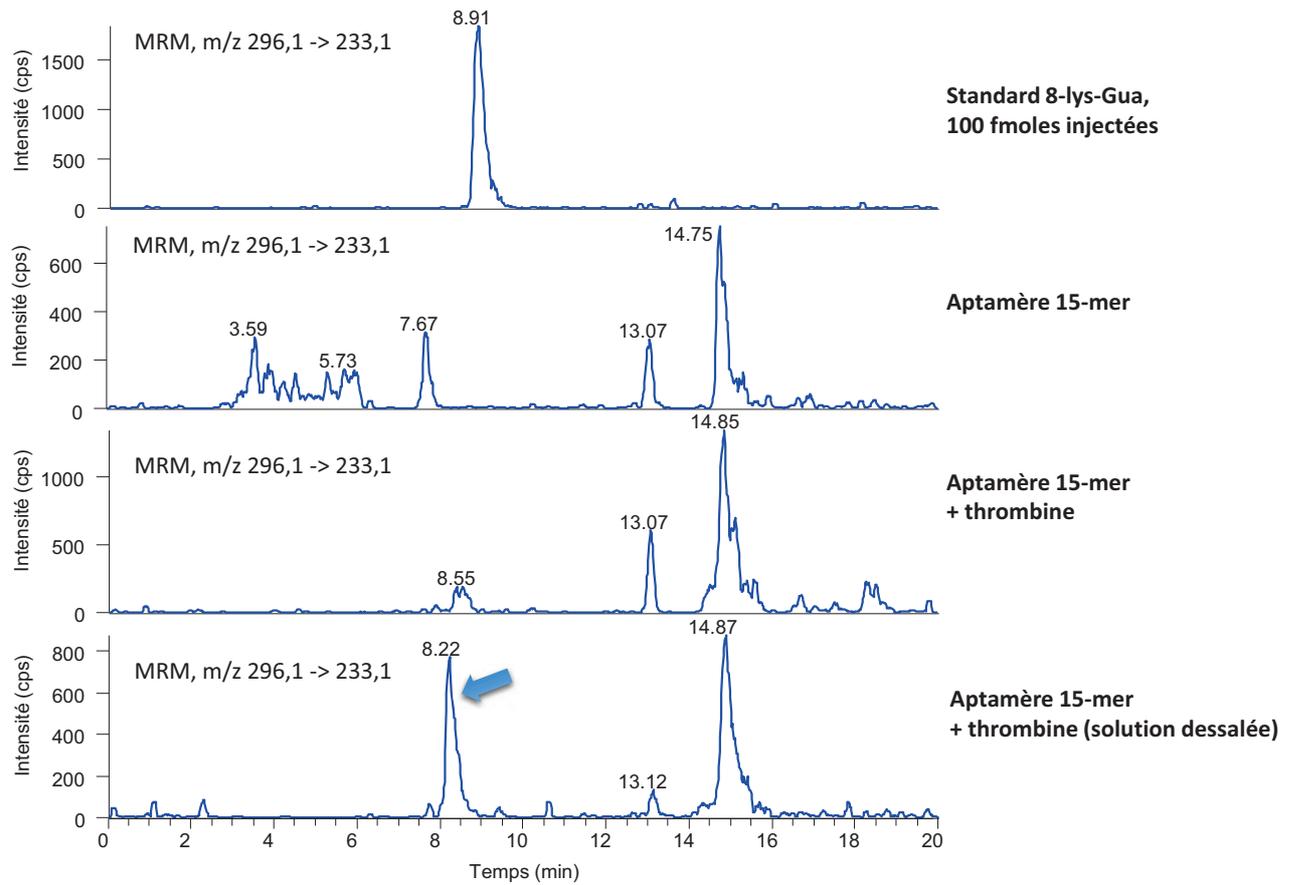


Figure 89 : Chromatogrammes obtenus lors de la détection par HPLC-MS/MS de l'adduit 8-lys-Gua dans des échantillons de complexe « thrombine + aptamère 15-mer » exposés à une impulsion laser à 1000 mJ/cm^2 . Au préalable, le complexe est formé par incubation de $20 \mu\text{M}$ d'aptamère 15-mer avec $10 \mu\text{M}$ de thrombine dans un tampon phosphate de potassium à 10 mM pH 7,5 additionné de 15 mM de KCl, pendant 30 minutes.

Des résultats similaires sont observés pour le système « SSB + aptamère 49-mer » (Figure 90). Pour les échantillons de complexe irradié, l'adduit 8-lys-Gua est détecté seulement lorsque la solution de protéine a été purifiée, avec un taux de pontage d'environ 1 pour mille nucléotides.

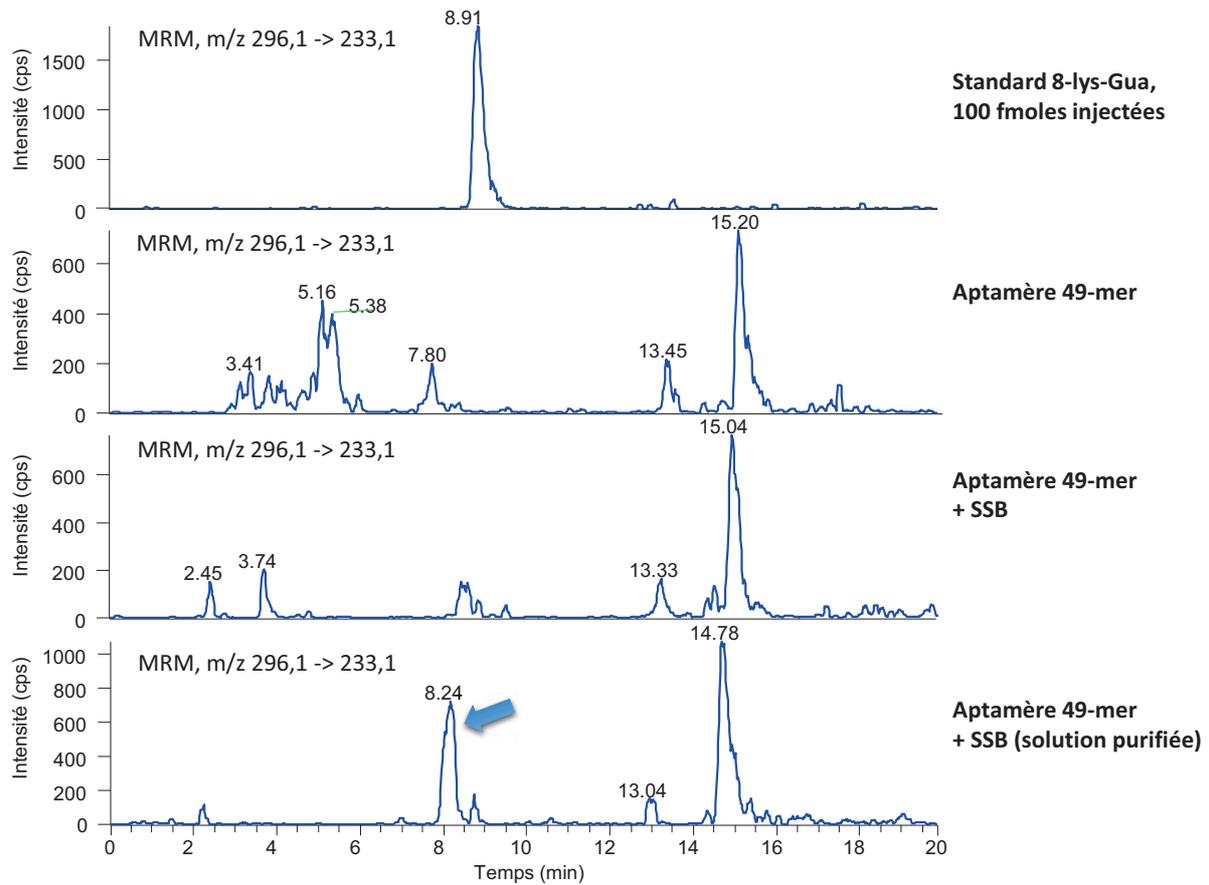


Figure 90 : Chromatogrammes obtenus lors de la détection par HPLC-MS/MS de l'adduit 8-lys-Gua dans des échantillons de complexe SSB + aptamère 49-mer exposés à une impulsion laser à 1000 mJ/cm². Au préalable, le complexe est formé par incubation de 6,2 µM d'aptamère 49-mer avec 3,44 µM de SSB dans un tampon phosphate de potassium à 10 mM pH 7,5 additionné de 15 mM de KCl, pendant 15 minutes.

L'adduit 8-lys-Gua a donc été détecté lors de l'irradiation des complexes impliquant la thrombine ou la SSB et leur aptamère respectif. Ces observations nous permettent de formuler l'hypothèse que l'irradiation laser de ces complexes conduit à des pontages ADN-protéines. De plus, le pontage ferait intervenir l'acide amine lysine et la base guanine. Il reste néanmoins surprenant que les complexes non covalents n'aient pas été observés suite à l'étape d'incubation dans les échantillons où l'on détecte l'adduit. D'autre part les rendements observés pour ces 2 modèles sont faibles (<1% d'oligonucléotide ponté).

4 Conclusion

En résumé, les 3 systèmes présentés ici ont permis de mettre en évidence des pontages entre des peptides et des oligonucléotides. Les faibles rendements de pontage observés représentent cependant un réel obstacle pour la caractérisation des produits obtenus. Il sera donc primordial d'améliorer ces rendements, afin d'obtenir de plus amples informations sur la structure des pontages, en particulier la nature de l'acide aminé et de la base impliqués, ainsi que leur position respective.

Chapitre 5 :

Les pontages ADN-polyamines

1 Introduction

Les polyamines sont des petites molécules cationiques présentes dans le noyau des cellules eucaryotes, au contact de l'ADN, à des concentrations de l'ordre du millimolaire. Les structures des 3 principales polyamines sont représentées dans la Figure 91.

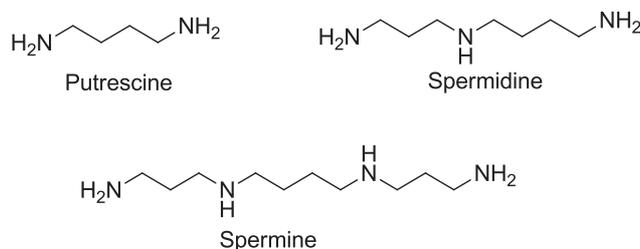


Figure 91 : Structure des polyamines.

La chimie du radical cation de la guanine intervient dans la formation de nombreuses lésions oxydatives, par réaction avec diverses espèces nucléophiles. Les polyamines constituent des nucléophiles potentiels pour l'addition sur ce radical.

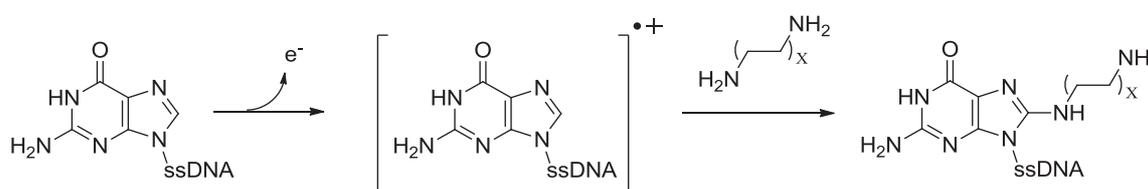


Figure 92 : Hypothèse de formation des adduits avec les polyamines.

Dans cette partie nous nous sommes efforcés de déterminer si les polyamines pouvaient effectivement s'additionner par leur amine primaire sur le radical cation de la guanine en position C8 pour former des adduits, dont les structures sont représentées dans la Figure 92. Dans cette optique, les adduits ont tout d'abord été synthétisés sous la forme de nucléosides modifiés, puis une méthode d'analyse de ces lésions par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem a été développée afin de les quantifier dans l'ADN. Ensuite, une étude a été réalisée sur l'ADN isolé, puis les adduits ont été recherchés dans l'ADN cellulaire, après exposition à différentes conditions de stress oxydant.

Des expériences préliminaires ont également été réalisées dans le but d'explorer les conséquences biologiques des pontages ADN-polyamines, notamment par l'étude de leur prise en charge par les systèmes de réparation. Nous avons d'ailleurs entrepris de synthétiser des oligonucléotides comportant l'adduit avec la putrescine, afin de pouvoir étudier plus en détails les mécanismes impliqués dans l'élimination de ces dommages.

2 Synthèse des adduits avec la putrescine, la spermidine et la spermine

La première étape de la synthèse des adduits sous la forme de nucléosides modifiés consiste en une bromation de la 2'-désoxyguanosine (dGuo), au niveau de la position C8. Cette réaction s'effectue par le *N*-bromosuccinimide dans un mélange acétonitrile/eau, pour obtenir la 8-bromo-2'-désoxyguanosine (**8-Br-dGuo**) avec un rendement d'environ 75% (Figure 93). La purification est réalisée par précipitation dans l'acétone.

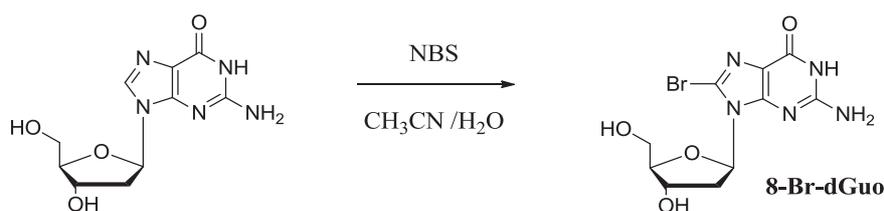


Figure 93 : Bromation de la 2'-désoxyguanosine en position C8.

On effectue ensuite une substitution du brome en position C8 de la 8-bromo-2'-désoxyguanosine par chacune des 3 polyamines. Pour cela, 2 stratégies ont été envisagées : (i) la substitution par couplage palladocatalysé sur le nucléoside protégé, et (ii) la substitution directe sur la 8-Br-dGuo.

2.1 Couplage pallado-catalysé de Buchwald-Hartwig

La réaction de Buchwald-Hartwig est un couplage pallado-catalysé entre un halogénure d'aryle et une amine permettant de former une liaison carbone-azote (147,148). Cette méthodologie a été fréquemment décrite pour la synthèse des adduits entre des nucléosides et des amines aromatiques, notamment lors de l'étude de la génotoxicité des amines aromatiques hétérocycliques. Le couplage de Buchwald-Hartwig a permis de synthétiser les adduits du Benzo[a]pyrène en N2 de la 2'-désoxyguanosine (dGuo), et en N6 de la 2'-désoxyadénosine (dAdo) (149). Cette stratégie a également été adoptée pour les adduits en C8 de la dGuo avec différentes amines hétérocycliques (Figure 94), notamment le 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), qui est un agent mutagène très étudié (150). La réaction fait intervenir un catalyseur à base de palladium (le plus souvent l'acétate de palladium(II) ou le Pd₂(dba)₃, qui est une forme soluble du palladium(0)), un ligand et une base. Le Tableau 9 regroupe des exemples de conditions optimisées pour les couplages avec la dGuo, en position N2 et C8.

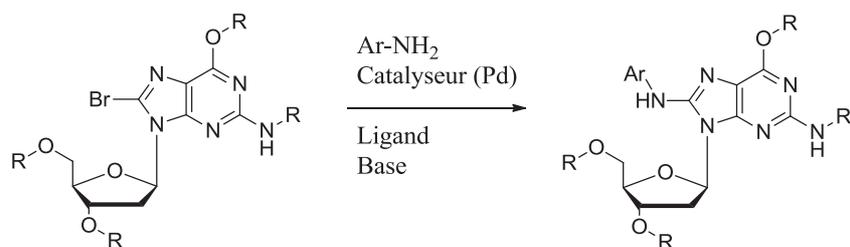


Figure 94 : Stratégie de synthèse des adduits en C8 de la 2'-désoxyguanosine par le couplage de Buchwald-Hartwick.

Tableau 9 : Conditions décrites dans la littérature pour le couplage de Buchwald-Hartwick entre les amines aromatiques et la 2'-désoxyguanosine protégée.

	Catalyseur	Ligand	Base	Solvant	Référence
Adduits N2	Pd(OAc) ₂	BINAP	Cs ₂ O ₃	Toluène	Johnson <i>et al.</i> (149)
Adduits C8	Pd ₂ (dba) ₃	BINAP	NaOtBu	Toluène	Gillet <i>et al.</i> (151)
	Pd ₂ (dba) ₃	BINAP	LiHMDS	Toluène	Elmqvist <i>et al.</i> (150)
	Pd ₂ (dba) ₃	XANTPHOS	Cs ₂ O ₃	DMF / DMSO	Takamura <i>et al.</i> (152)
	Pd ₂ (dba) ₃	BINAP	K ₃ PO ₄	1,2-DME	Böge <i>et al.</i> (153)

Cette stratégie a été envisagée pour la synthèse des adduits avec les polyamines, afin d'augmenter le rendement de la synthèse, et de faciliter la purification de ces composés sous la forme de nucléosides protégés. Nous avons dans un premier temps tenté d'effectuer le couplage entre le dérivé protégé de la 8-bromo-2'-désoxyguanosine (synthétisé selon la procédure décrite par Gillet *et al.* (151)) et la putrescine substituée par un groupement Fmoc (Figure 95), en adaptant les conditions décrites par Johnson *et al.*, avec l'acétate de palladium(II). Différents solvants ont été testés afin d'améliorer la solubilité de la polyamine protégée par le Fmoc. Ces conditions ne nous ont pas permis d'obtenir le produit de pontage. Nous avons ensuite utilisé un autre catalyseur, le Pd₂(dba)₃, d'après les protocoles développés par Gillet (151) puis Takamura (152). Cette tentative s'est également révélée infructueuse.

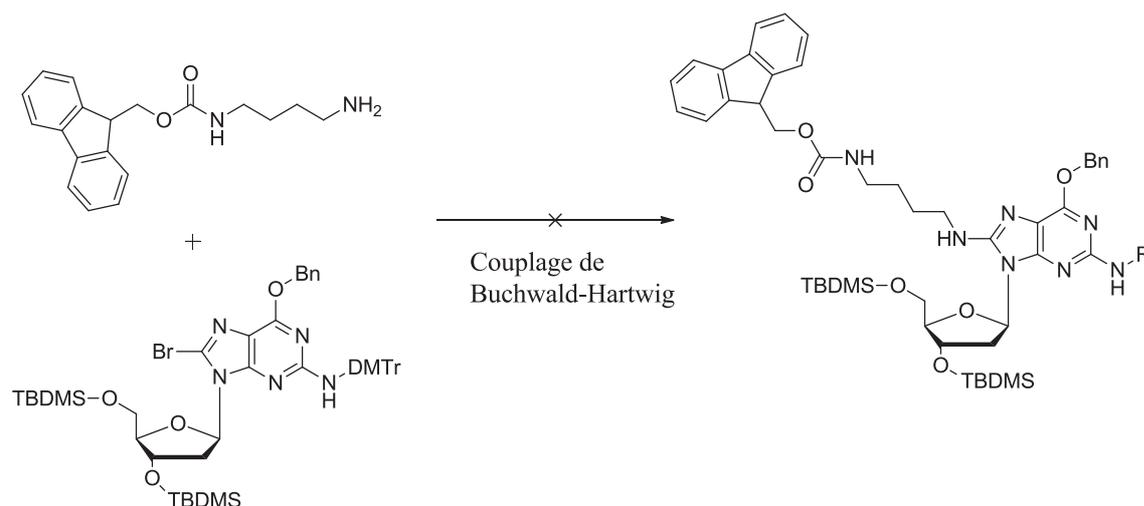


Figure 95 : Synthèse de l'adduit 8-putrescine-2'-désoxyguanosine par le couplage de Buchwald-Hartwig. La 8-Bromo-2'-désoxyguanosine est protégée par des groupements TBDMS au niveau des fonctions alcool en 3' et 5', au niveau de la cétone C6 par un benzyl, puis sur l'amine exocyclique par un motif DMTr, selon la procédure décrite par Gillet et al. (151) Les essais de couplage ont été réalisés avec 2 catalyseurs : $Pd(OAc)_2$ (149) et $Pd_2(dba)_3$ (151,152).

La substitution en C8 de la 8-bromo-2'-désoxyguanosine par les polyamines n'a pas pu être effectuée par le couplage de Buchwald-Hartwig. Cette stratégie a été décrite pour les amines aromatiques et n'a pu être transposée à ces amines aliphatiques, qui présentent une réactivité très différente. Une seconde alternative a été envisagée, en réalisant directement la substitution nucléophile sur le composé bromé non protégé.

2.2 Substitution directe de la 8-bromo-2'-désoxyguanosine

Les adduits avec les polyamines ont été synthétisés par substitution nucléophile de la 8-bromo-2'-désoxyguanosine non protégée (Figure 96). La principale difficulté de cette étape est de choisir un solvant permettant à la fois de solubiliser le nucléoside bromé et les polyamines et de limiter la dépurination du nucléoside. Cette réaction est réalisée dans le DMSO en présence de triéthylamine. La putrescine, la spermidine ou la spermine sont présentes en large excès. Les conditions réactionnelles sont similaires pour les 3 adduits, et permettent d'atteindre un taux de conversion de 25 à 30%. La spermidine possède une structure non symétrique ; la substitution avec cette polyamine peut donc conduire à 2 isomères, par réaction avec l'une ou l'autre des amines primaires. L'avancement de la réaction est suivi par HPLC-UV.

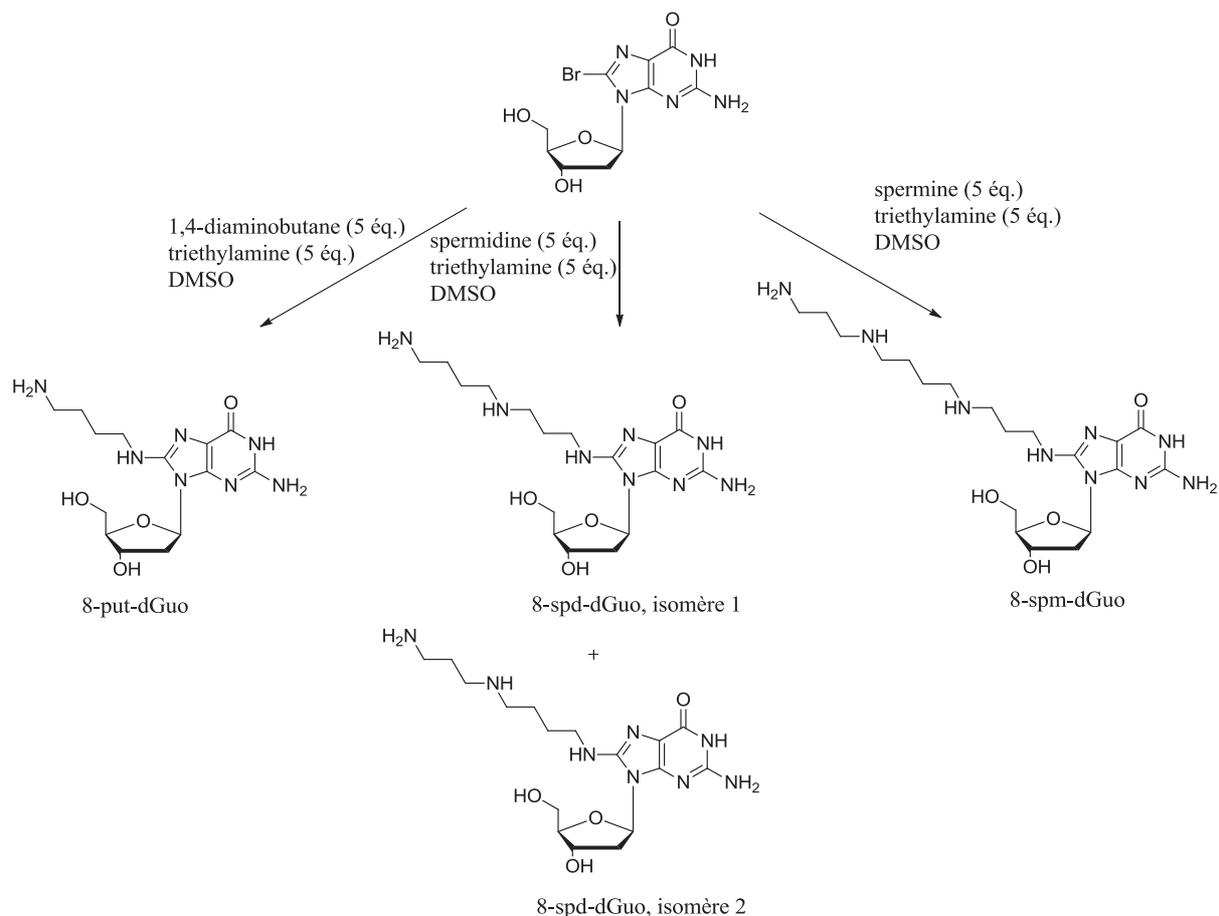


Figure 96 : Réaction de substitution nucléophile de la 8-Br-dGuo par les polyamines.

2.3 Purification des adduits 8-polyamines-2'-désoxyguanosine

La purification est effectuée en HPLC phase inverse. La phase stationnaire est constituée de silice greffée C18. La présence des amines primaires et secondaires des polyamines confère à ces adduits un comportement chromatographique particulier. En effet ces groupements aminés interagissent avec les silanols résiduels de la phase stationnaire pour former des liaisons hydrogène. Ces interactions perturbent les phénomènes de rétention et abaissent fortement la résolution. La Figure 97 montre un chromatogramme du brut réactionnel pour la synthèse de l'adduit avec la spermine. L'élution est réalisée dans du formiate d'ammonium à 10 mM, classiquement utilisé pour la séparation des nucléosides non protégés, avec un gradient d'acétonitrile. Le pic à 14,2 minutes correspond à la 8-bromo-2'-désoxyguanosine (8-Br-dGuo) en excès ; au cours de la réaction ce réactif se dépure en 8-bromo-guanine (8-Br-Gua), élue à 9,8 minutes. L'adduit 8-spermine-2'-désoxyguanosine est élué juste après la 8-Br-dGuo entre 15 et 17,5 minutes, en formant un pic très large. Le remplacement du formiate d'ammonium par de l'acide trifluoroacétique à 0,1% (pH=3) permet d'obtenir le chromatogramme de la Figure 98. L'adduit est alors élué entre la 8-Br-Gua et la 8-Br-dGuo à 12 minutes, formant un pic beaucoup mieux résolu. Les éluants acides augmentent la protonation des amines primaires et

secondaires des polyamines, et améliorent ainsi la résolution. Les acides fluorés présentent un contre ion peu polaire, afin de conserver les interactions hydrophobes avec les résidus alkyles de la phase stationnaire. Les 3 adduits sont donc purifiés dans l'acide trifluoroacétique avec un gradient d'acétonitrile (cf. partie expérimentale). Les 2 isomères de l'adduits 8-spd-dGuo présentent des temps de rétention bien distincts dans ces conditions (14,3 et 15,7 minutes lorsque l'élution est réalisée par du TFA à 0,1% avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 12% en 20 minutes), ils ont donc pu être isolés au cours de la purification

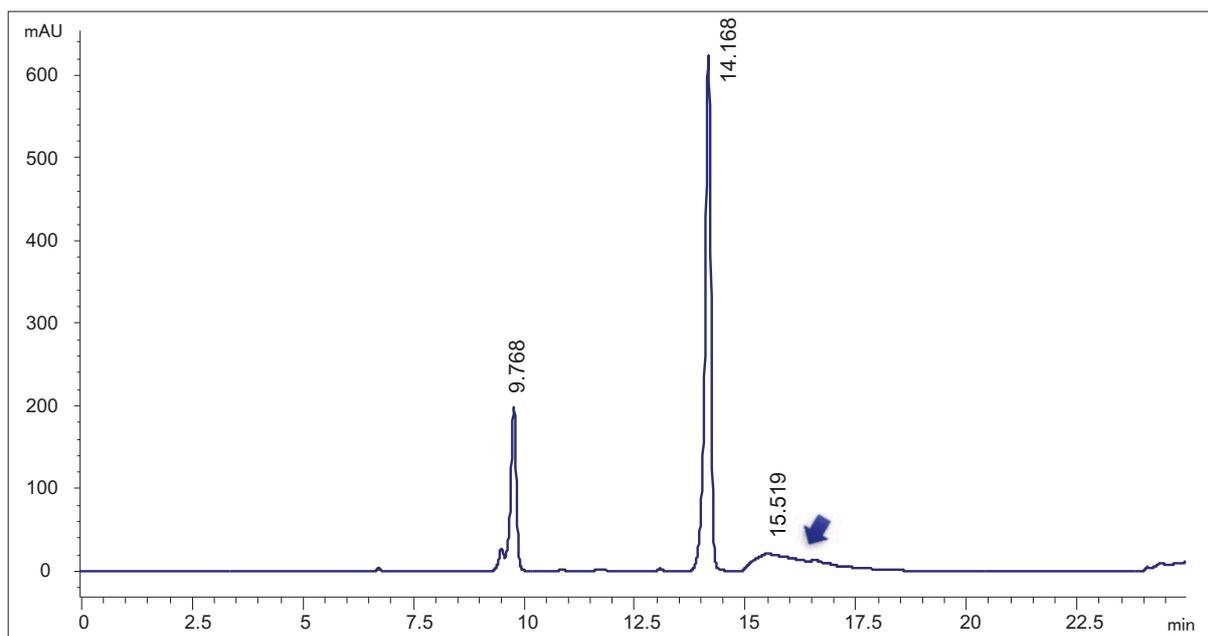


Figure 97 : Chromatogramme du brut réactionnel pour la synthèse de l'adduit 8-spm-dGuo : l'élution est réalisée dans le formiate d'ammonium à 10 mM avec un gradient d'acétonitrile à 1% par minute. Détection UV à 254 nm.

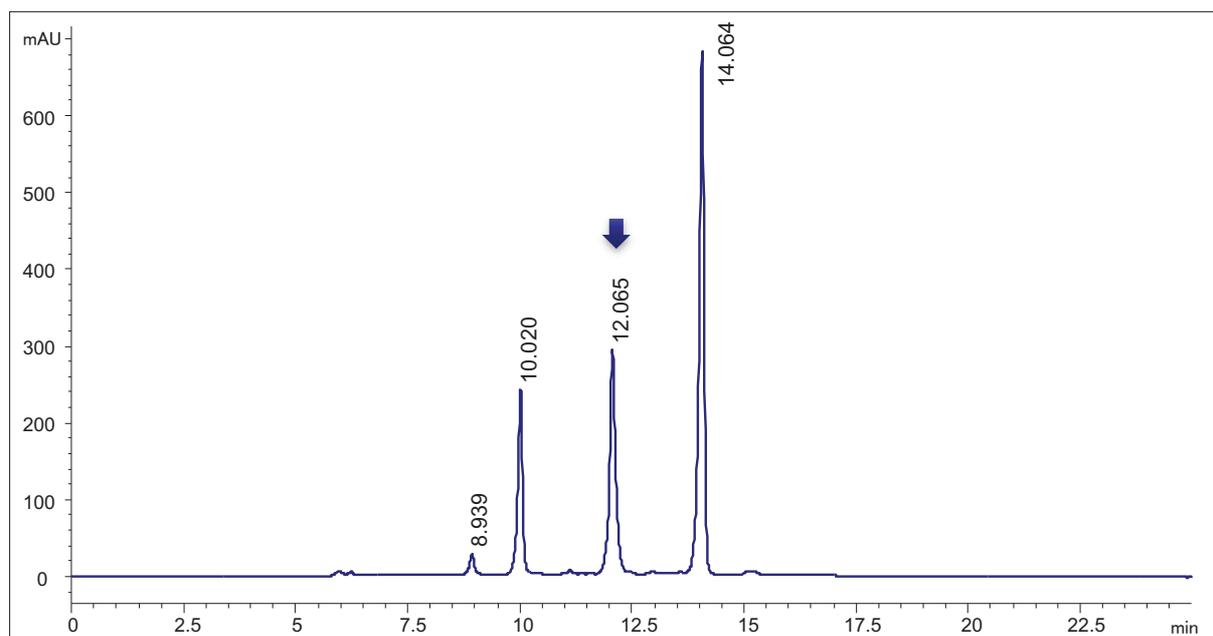


Figure 98 : Chromatogramme du brut réactionnel pour la synthèse de l'adduit 8-spm-dGuo : l'éluion est réalisée dans l'acide trifluoroacétique à 0,1% avec un gradient d'acétonitrile à 1% par minute. Détection UV à 254 nm.

3 Caractérisation des adduits

3.1 RMN

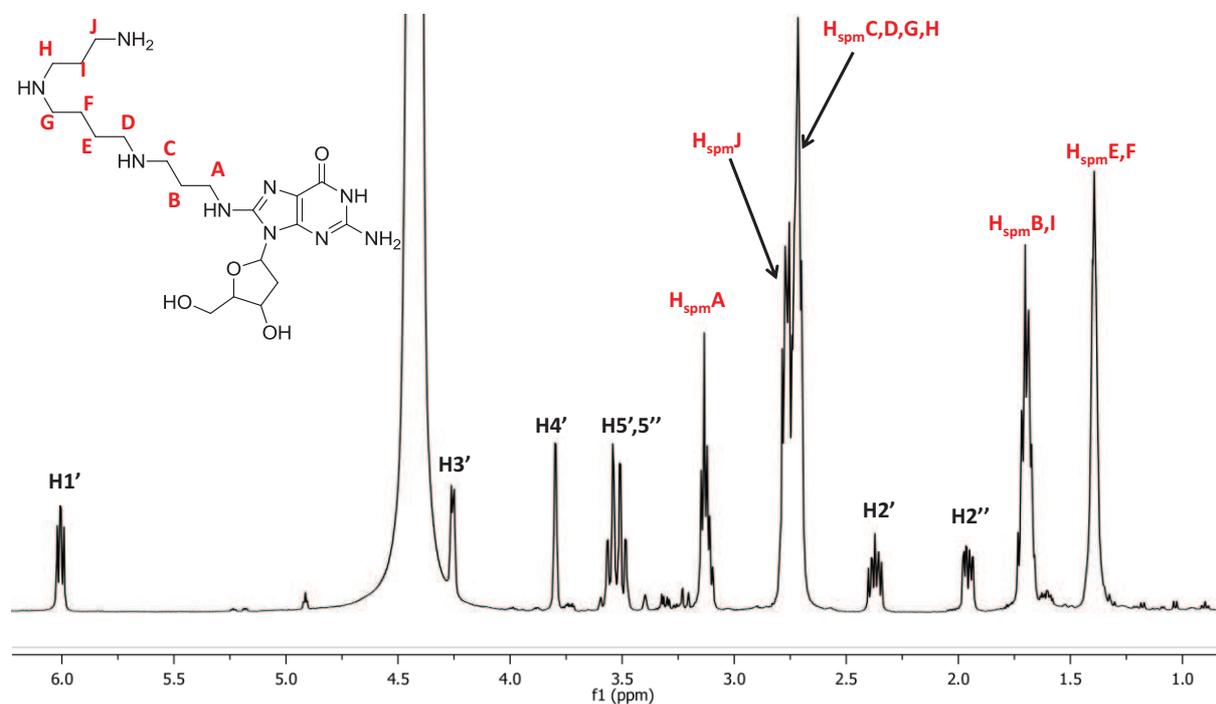


Figure 99 : Spectre RMN ^1H de la 8-spermine-2'-désoxyguanosine.

Les adduits synthétisés ont été caractérisés par RMN. Pour exemple, le spectre RMN du proton de l'adduit 8-spermine-2'-désoxyguanosine (8-spm-dGuo) obtenu dans le D_2O est représenté dans la Figure 99. Pour les 3 composés, on observe les signaux des protons du 2-désoxyribose, mais pas de signal pour le proton H8 de la base (cf. partie expérimentale), ce qui permet de vérifier la présence d'un substituant en position C8 de la guanine. Les signaux additionnels ont été attribués aux protons des chaînes de polyamines. Pour l'adduit 8-spm-dGuo, les protons « E » et « F » puis « B » et « I » sont équivalents et présentent les déplacements chimiques les plus bas. Les protons « C », « D », « G » et « H » ont des déplacements chimiques très proches et forment un multiplet à 2,7 ppm. Les protons « A » et « J » ne sont pas équivalents ce qui confirme le couplage entre la spermine et la guanine.

3.2 Propriétés UV

3.2.1 Spectres d'absorption UV

Les spectres d'absorption UV des adduits polyamines présentent un maximum à 255 nm, ainsi qu'un épaulement à 290 nm (Figure 100). Par comparaison avec les spectres de la 2'-désoxyguanosine (Figure 101-A) et du nucléoside bromé (Figure 101-B), on note donc un shift bathochrome qui est caractéristique de la substitution en C8 (cf. chapitre 2 paragraphe 3.3).

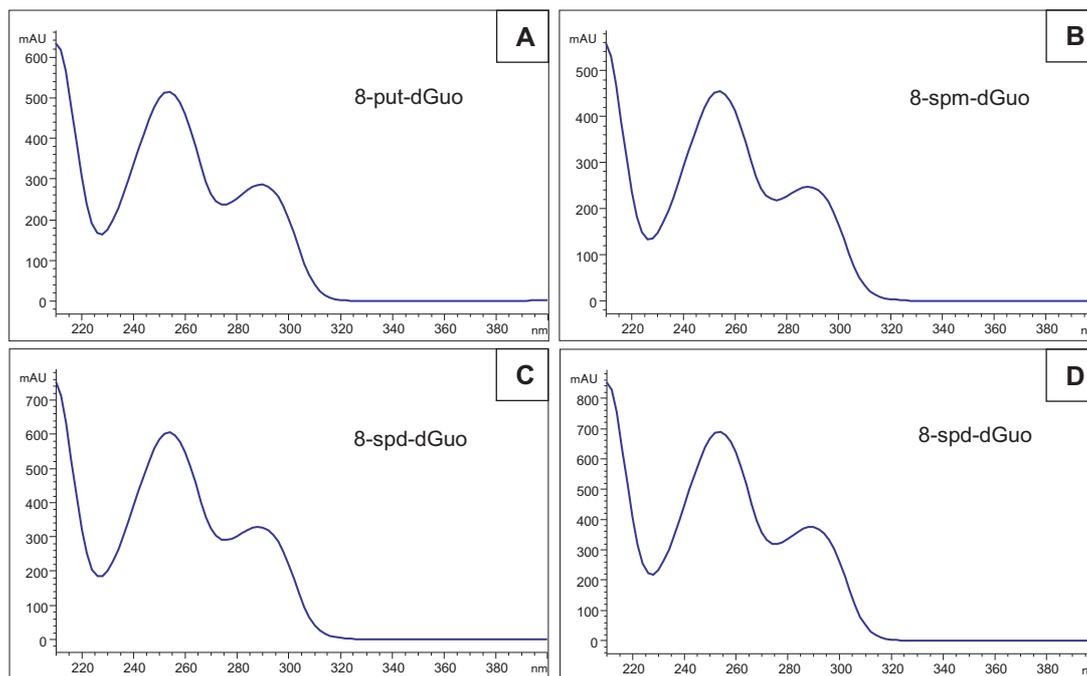


Figure 100 : Spectres d'absorption UV des adduits avec la putrescine (A), la spermine (B) et la spermidine (C et D).

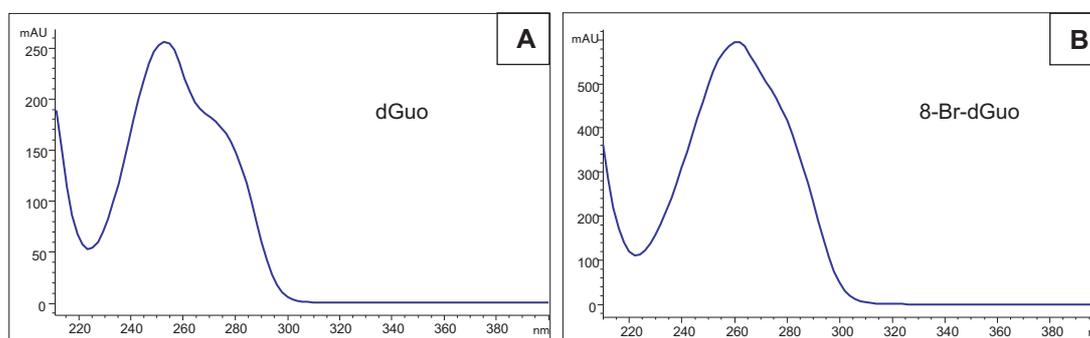


Figure 101 : Spectres d'absorption UV de la 2'-désoxyguanosine (A) et de la 8-bromo-2'-désoxyguanosine (B).

3.2.2 Détermination du coefficient d'extinction molaire

Les coefficients d'extinction molaire sont déterminés par RMN du proton, à l'aide d'une solution calibrée de thymidine (dT). Cette expérience nécessite au préalable de mesurer le temps de relaxation t_1 du proton anomérique H1' des adduits. Ceci permet de déterminer le délai de relaxation d_1 nécessaire, afin de permettre le retour à l'équilibre énergétique du système après excitation. Le proton anomérique présente un temps de relaxation de 2 à 3 secondes, d_1 a donc été fixé à 12 secondes, dans le but de réduire les incertitudes sur les intégrations. L'acquisition des spectres de la solution de dT calibrée et de la solution de composé à quantifier est réalisée par 512 scans dans le D_2O . Un insert contenant le composé de référence, l'acide 3-(triméthylsilyl)propionique de sodium, dans le même solvant, est introduit dans chaque tube (Figure 102).

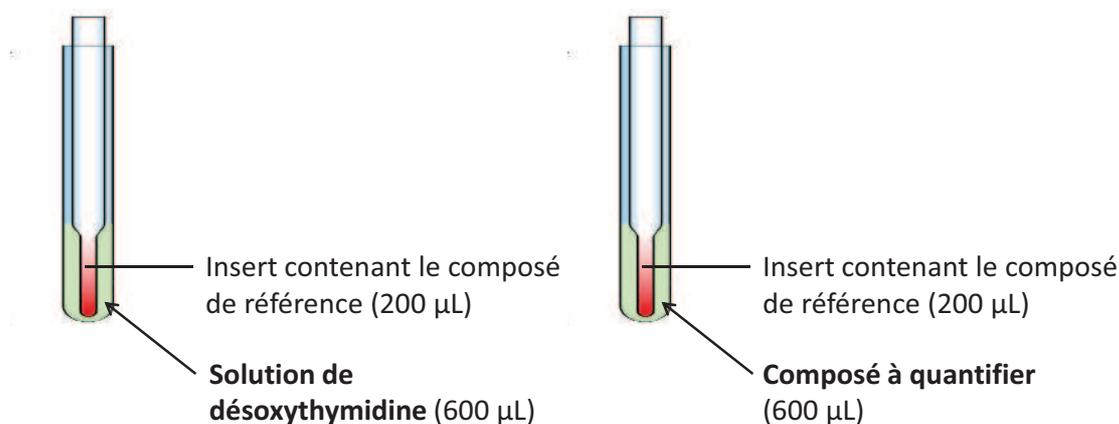


Figure 102 : Principe de détermination du coefficient d'extinction molaire des adduits par RMN du proton.

Les protons du motif triméthylsilyle permettent de normaliser les intégrations entre les 2 tubes. La concentration de la solution à doser est calculée à partir des intégrations des protons anomériques de la dT et du composé à doser, grâce à la formule suivante :

$$C_{\text{composé}} = \frac{Int_{\text{composé}} \times C_{dT}}{Int_{dT}}$$

$C_{\text{composé}}$: concentration de la solution de composé à quantifier

C_{dT} : concentration de la solution de 2'-désoxythymidine

$Int_{\text{composé}}$: valeur de l'intégration du proton anomérique de la solution de composé à quantifier

Int_{dT} : valeur de l'intégration du proton anomérique de la solution de 2'-désoxythymidine

Le coefficient d'extinction molaire est ensuite obtenu avec une gamme d'absorbances UV en appliquant la loi de Beer-Lambert. Pour les adduits avec les polyamines, les coefficients d'extinction molaire sont

plus élevés que celui de la 2'-désoxyguanosine et dépendent légèrement de la longueur de la chaîne polyamine (Tableau 10).

Tableau 10 : Propriétés UV des adduits 8-polyamines dGuo

Composé	λ_{\max} (nm)	ϵ (λ_{\max}) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
8-put-dGuo	260	16930
8-spd-dGuo	258	19590
8-spm-dGuo	258	20820

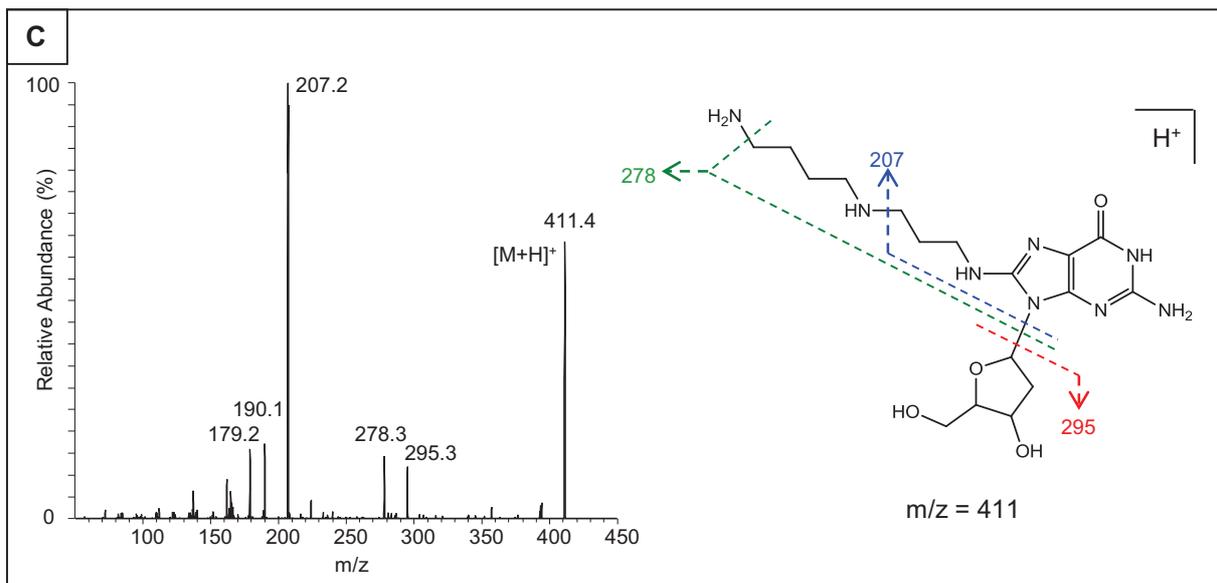
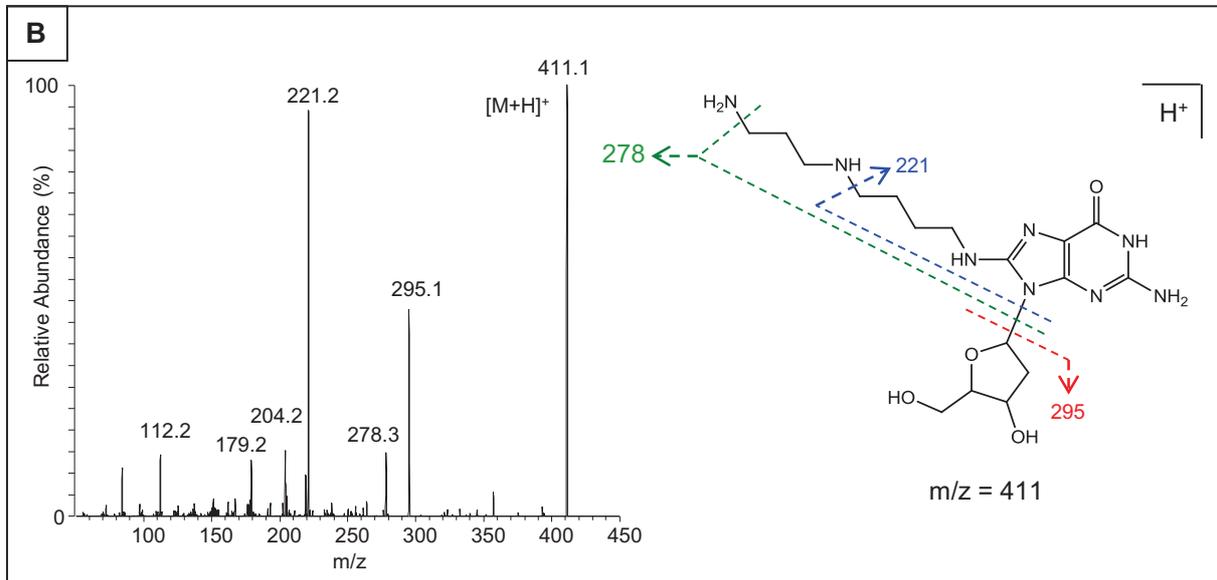
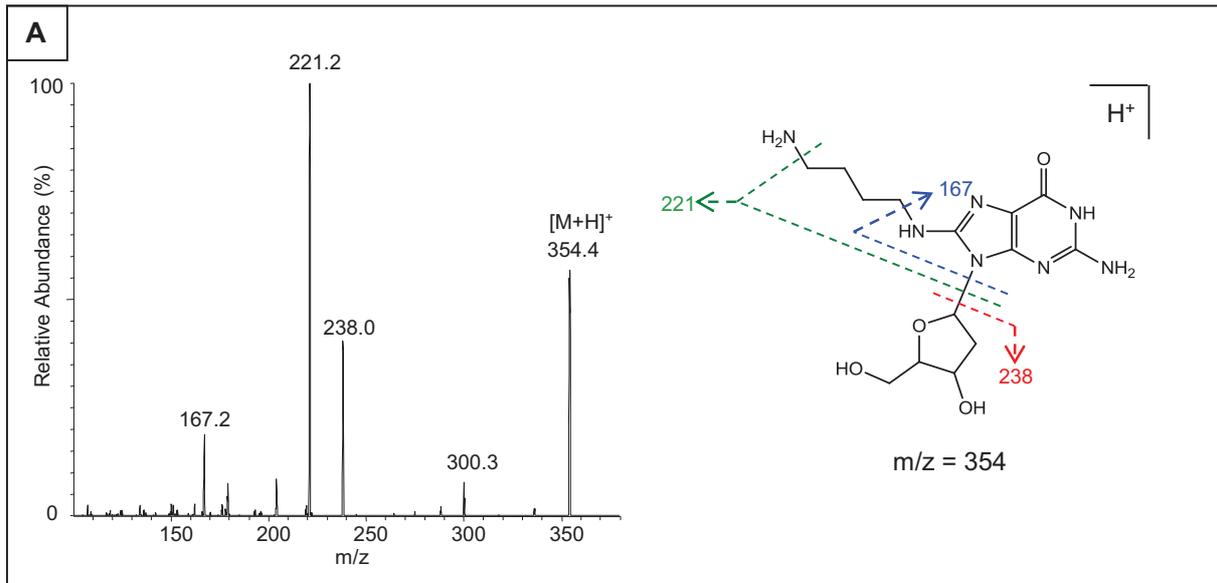
3.3 Par spectrométrie de masse

3.3.1 Etude par électrospray (MS1 et MS2)

Les spectres MS1 des adduits 8-put-dGuo, 8-spd-dGuo, 8-spm-dGuo, obtenus en mode d'ionisation positif, comportent des ions pseudomoléculaires de rapport m/z de 354, 411 et 468, respectivement. Ces ions correspondent aux adduits protonés $[M+H]^+$ (les poids moléculaires des adduits sont respectivement de 353, 410, 467).

Les spectres MS2 obtenus par la fragmentation des ions pseudomoléculaires (Figure 103) présentent des ions provenant de la rupture de la liaison N-glycosidique, classiquement observée pour les 2'-désoxyribonucléosides (154), avec une perte de 116 uma ($m/z = 238, 295$ et 352 pour 8-put-dGuo, 8-spd-dGuo et 8-spm-dGuo respectivement). D'autres fragmentations se produisent également au niveau de la chaîne polyamine, en α des fonctions amine, générant des ions de m/z 221 et 167 pour 8-put-dGuo, 278 et 207 pour l'isomère 1 de 8-spd-dGuo, 278 et 221 pour l'isomère 2 de 8-spd-dGuo, 278, 224 et 207 pour 8-spm-dGuo. Il est intéressant de noter que les 2 isomères 1 et 2 de l'adduit 8-spd-dGuo, provenant de la réaction avec l'une ou l'autre des amines primaires de la spermidine (cf. paragraphe 2.2), diffèrent au niveau de la fragmentation de la chaîne polyamine.

Afin de confirmer la structure de chacun de ces isomères, nous nous sommes intéressés à la présence des ions de m/z 207 et 221. Lorsque la polyamine est liée au nucléoside par le motif aminopropyle, un ion à m/z 207 est observé (cas de 8-spm-dGuo et de l'isomère 1 de 8-spd-dGuo). Lorsque le pontage fait intervenir le motif aminobutyle, un ion de m/z 221 est observé (cas de 8-put-dGuo et de l'isomère 2 de 8-spd-dGuo). Ceci nous a permis d'identifier l'isomère 1 comme la 8-((3-((4-aminobutyl)amino)propyl)amino)-2'-désoxyguanosine, et l'isomère 2 comme la 8-((4-((3-aminopropyl)amino)butyl)amino)-2'-désoxyguanosine.



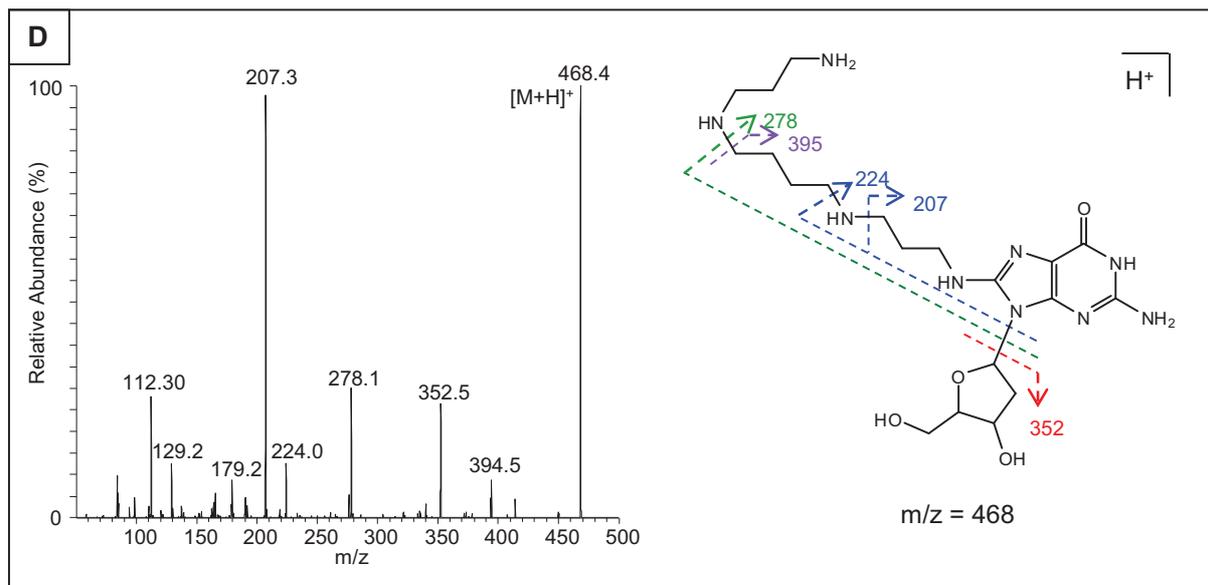


Figure 103 : Spectres de fragmentation des adduits 8-put-dGuo (A), 8-spd-dGuo isomères 1 (C) et 2 (B) et 8-spm-dGuo (D).

3.3.2 Détermination de la masse exacte par MALDI

La masse exacte des adduits est déterminée par spectrométrie MALDI-TOF en mode d'ionisation positif en réflectron, avec un standard interne de tyrosine 1,3,6. La calibration est réalisée avec 3 composés : la tri-tyrosine, la 6(tyrosine) et un pic de la matrice. Le spectre de la Figure 104 montre l'exemple de l'adduit 8-spm-dGuo. La résolution est de l'ordre de 2000.

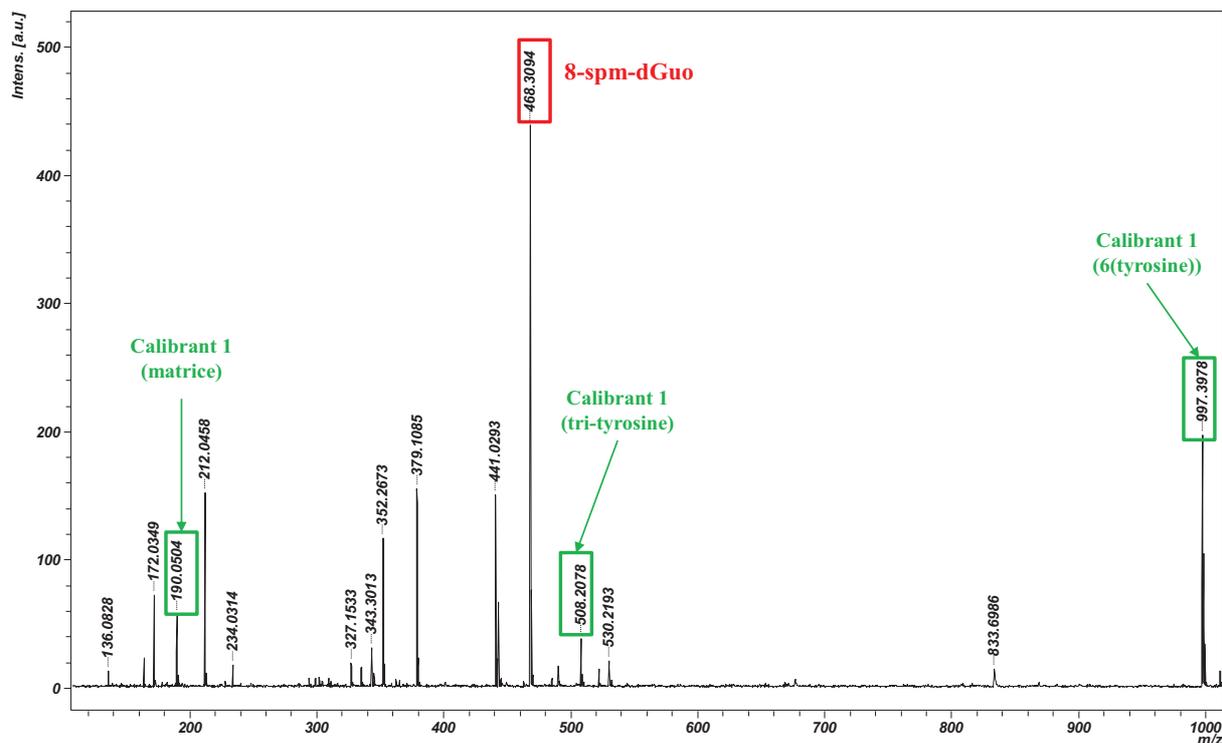


Figure 104 : Spectre MALDI-TOF obtenu lors de la détermination de la masse exacte de l'adduit 8-spm-dGuo.

Afin de confirmer la structure des adduits synthétisés, les masses exactes mesurées sont comparées aux masses exactes théoriques (Tableau 11). Les erreurs entre les masses mesurées et théoriques se situent entre 1 et 10 ppm, sauf pour l'isomère 1 de l'adduit 8-spd-dGuo pour lequel celle-ci est de 16 ppm. A partir de la liste des formules brutes possibles pour chaque masse en considérant la marge d'erreur observée, nous n'avons retrouvé qu'une seule formule possible pour chacun de ces composés.

Tableau 11 : Comparaison des masses théoriques des adduits 8-polyamines-dGuo et des masses mesurées par MALDI-TOF.

Composés	Formules chimiques ([M+H] ⁺)	Masses exactes théoriques ([M+H] ⁺)	Masses exactes mesurés ([M+H] ⁺)	Δ= masse théorique-masse mesurée	Erreur (ppm)
8-put-dGuo	C ₁₄ H ₂₄ N ₇ O ₄ ⁺	354.1890	354.1883	0.0007	2.0
8-spd-dGuo, isomère 1	C ₁₇ H ₃₁ N ₈ O ₄ ⁺	411.2468	411.2534	0.0066	16,0
8-spd-dGuo, isomère 2	C ₁₇ H ₃₁ N ₈ O ₄ ⁺	411.2468	411.2481	0.0013	3.2
8-spm-dGuo	C ₂₀ H ₃₈ N ₉ O ₄ ⁺	468.3047	468.3094	0.0047	10.0

4 Optimisation d'une méthode de quantification par HPLC-MS/MS

Une méthode d'analyse par HPLC-MS/MS a été développée pour la quantification des adduits guanine-polyamines. Ces composés sont analysés en mode d'ionisation positif, à l'aide des transitions indiquées dans le Tableau 12. Plusieurs transitions sont optimisées pour chaque analyte, afin d'assurer une meilleure spécificité. Pour chaque adduit, il existe une transition correspondant à la fragmentation de liaison *N*-glycosidique (-116 uma) et une deuxième transition associée à une fragmentation supplémentaire en α d'une amine de la chaîne polyamine. Dans le cas de l'adduit avec la spermidine, la transition 411 \rightarrow 207 est spécifique de l'isomère 1, alors que la transition 411 \rightarrow 221 permet de détecter l'isomère 2.

Tableau 12 : Transitions optimisées pour la détection des adduits polyamines en mode MRM.

Composé	Poids molaire	Principales transitions en mode MRM				
		Masse de l'ion parent (m/z)	Masse de l'ion fils (m/z)	Mode d'ionisation	Energie de collision (eV)	Intensité relative (%)
8-put-dGuo	353.4	354.3	221.2	+	20	100
		354.3	238.5	+	15	5
8-spd-dGuo	410.5	411.5	207.2	+	25	90
		411.5	221.3	+	30	75
		411.5	295.2	+	17	100
8-spm-dGuo	467.6	468.2	207.1	+	38	100
		468.2	352.2	+	24	25

La séparation par HPLC est effectuée avec une phase de silice greffée C18. Les nucléosides sont élués dans l'acide trifluoroacétique à 0,1% avec un gradient de méthanol (cf. partie expérimentale). L'utilisation de l'acide trifluoroacétique permet d'améliorer le comportement chromatographique des adduits, et d'assurer une bonne résolution en HPLC-MS/MS (cf. paragraphe 2.3). La Figure 105 représente les chromatogrammes obtenus lors de l'injection d'un mix de 10 pmoles de chaque standard. Le temps de rétention et les rapports signal/bruit pour l'analyse des adduits sont indiqués dans le Tableau 13.

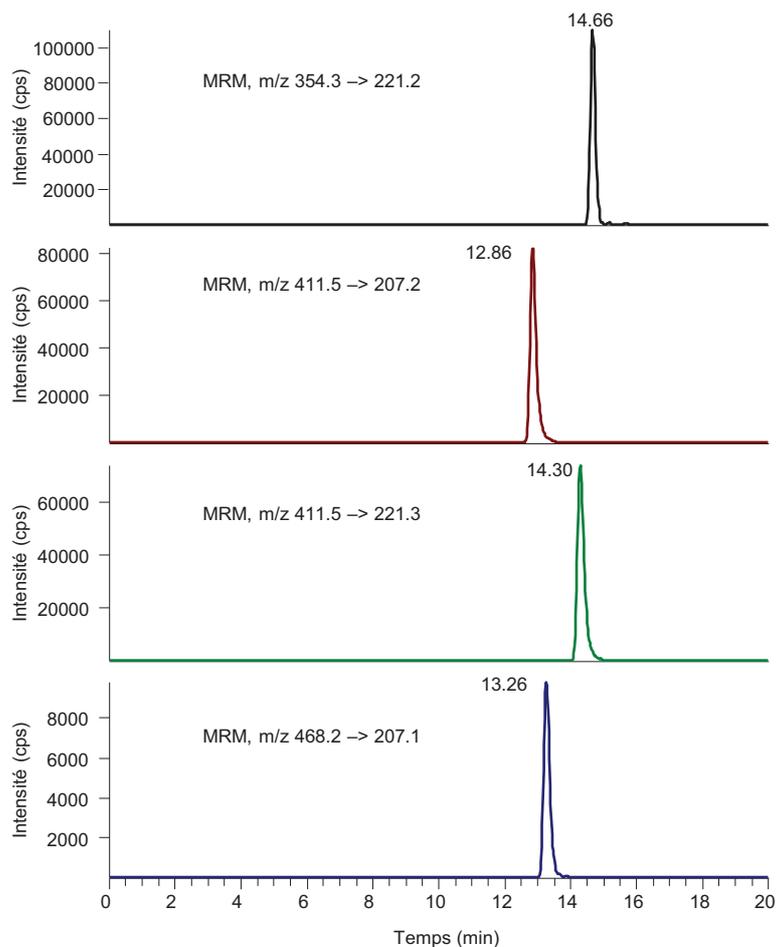


Figure 105 : Chromatogrammes obtenus pour la détection des adduits polyamines par HPLC-MS/MS en mode MRM (10 pmoles injectées).

Tableau 13 : Paramètres chromatographiques observés pour l'analyse des adduits polyamines par HPLC-MS/MS.

Composé	Temps de rétention en HPLC-MS/MS (minutes)	Rapport signal/bruit pour 10 pmoles injectées
8-put-dGuo	14.7	170
8-spd-dGuo, isomère 1	12.9	10530
8-spd-dGuo, isomère 2	14.3	3550
8-spm-dGuo	13.3	490

Les analyses sont réalisées sur les nucléosides résultant de l'hydrolyse enzymatique de l'ADN (cf. chapitre 2, paragraphe 4.3). Les adduits 8-put-dGuo, 8-spd-dGuo, 8-spm-dGuo sont détectés simultanément par HPLC-MS/MS, et les nucléosides normaux sont quantifiés par HPLC-UV avec une détection à 280 nm

5 Formation d'adduits dans l'ADN isolé

Afin de déterminer si les polyamines peuvent effectivement s'additionner sur le radical cation de la guanine, nous avons quantifié les adduits guanine-polyamines dans l'ADN isolé exposé à différentes conditions de stress oxydant : (i) photosensibilisation, (ii) exposition au rayonnement ionisant et (iii) exposition au rayonnement laser. Cette étude a été réalisée sur de l'ADN double brin extrait de thymus de veau.

5.1 Etude de la formation d'adduits par photosensibilisation

L'ADN en solution est irradié par rayonnement UVA en présence de riboflavine afin de générer une photo-oxydation de type I. Après irradiation, l'ADN est précipité à l'éthanol et hydrolysé en nucléosides par digestion enzymatique. Les nucléosides obtenus sont analysés par HPLC-MS/MS. L'ADN est photosensibilisé en présence soit de putrescine, soit de spermidine ou bien de spermine à une concentration de 500 μM , puis l'adduit correspondant est quantifié. Pour chaque expérience, une série d'irradiations sans polyamine est réalisée en parallèle. Les cinétiques de formation d'adduits sont présentées dans la Figure 106.

Après 10 minutes d'irradiation, on mesure des taux d'adduits d'environ 700, 150 et 2000 lésions par million de nucléosides pour respectivement la 8-put-dGuo, la 8-spd-dGuo et la 8-spm-dGuo. Les cinétiques de formation d'adduits sont linéaires pour de faibles temps d'irradiation, puis un phénomène de saturation survient à partir d'environ 2 minutes. La diminution de la vitesse de formation d'adduits est moins marquée dans le cas de l'adduit avec la putrescine. Ce phénomène de saturation a déjà été décrit dans le cas des adduits avec la lysine (46) et également pour la 8-oxodGuo, et peut s'expliquer par l'apparition de produits de dégradation secondaire par suroxydation des adduits.

Nous avons ensuite étudié l'effet de la présence de polyamines dans le milieu d'irradiation sur la formation de 8-oxodGuo. D'après la Figure 107, la photosensibilisation en l'absence de polyamine produit de la 8-oxodGuo, avec une cinétique de formation qui est linéaire jusqu'à 5 minutes d'irradiation, et atteint environ 5000 lésions par million de nucléosides après 10 minutes. Lorsque de la spermine est ajoutée dans le milieu d'irradiation, à une concentration de 500 μM , on note une très forte diminution de la formation de 8-oxodGuo. Des résultats similaires sont obtenus lors de l'irradiation en présence de putrescine ou de spermidine.

Dans la Figure 108 sont indiqués les taux de formation 8-oxodGuo et d'adduits 8-spm-dGuo, après 2 minutes d'irradiation, afin de se situer dans la partie linéaire de la formation de ces 2 lésions. La présence de spermine est associée à une diminution du taux de 8-oxodGuo d'environ 1900 lésions par million de nucléosides, et en parallèle la production d'adduits est d'environ 1300 lésions. L'inhibition de la formation de 8-oxodGuo est donc compensée en grande partie par la production d'adduits avec la

spermine, mais pas totalement. Ceci nous prouve l'existence de plusieurs mécanismes impliqués dans cette inhibition de la formation de 8-oxodGuo. Les polyamines, par leur capacité à augmenter la condensation de l'ADN (87), le protègent contre l'apparition de lésions oxydatives (155). D'autre part, il existe une compétition entre l'addition nucléophile de l'eau sur le radical cation de la guanine, conduisant à la 8-oxodGuo, et celle des polyamines, qui produit des adduits. Cette problématique sera étudiée plus en détails dans la partie discussion.

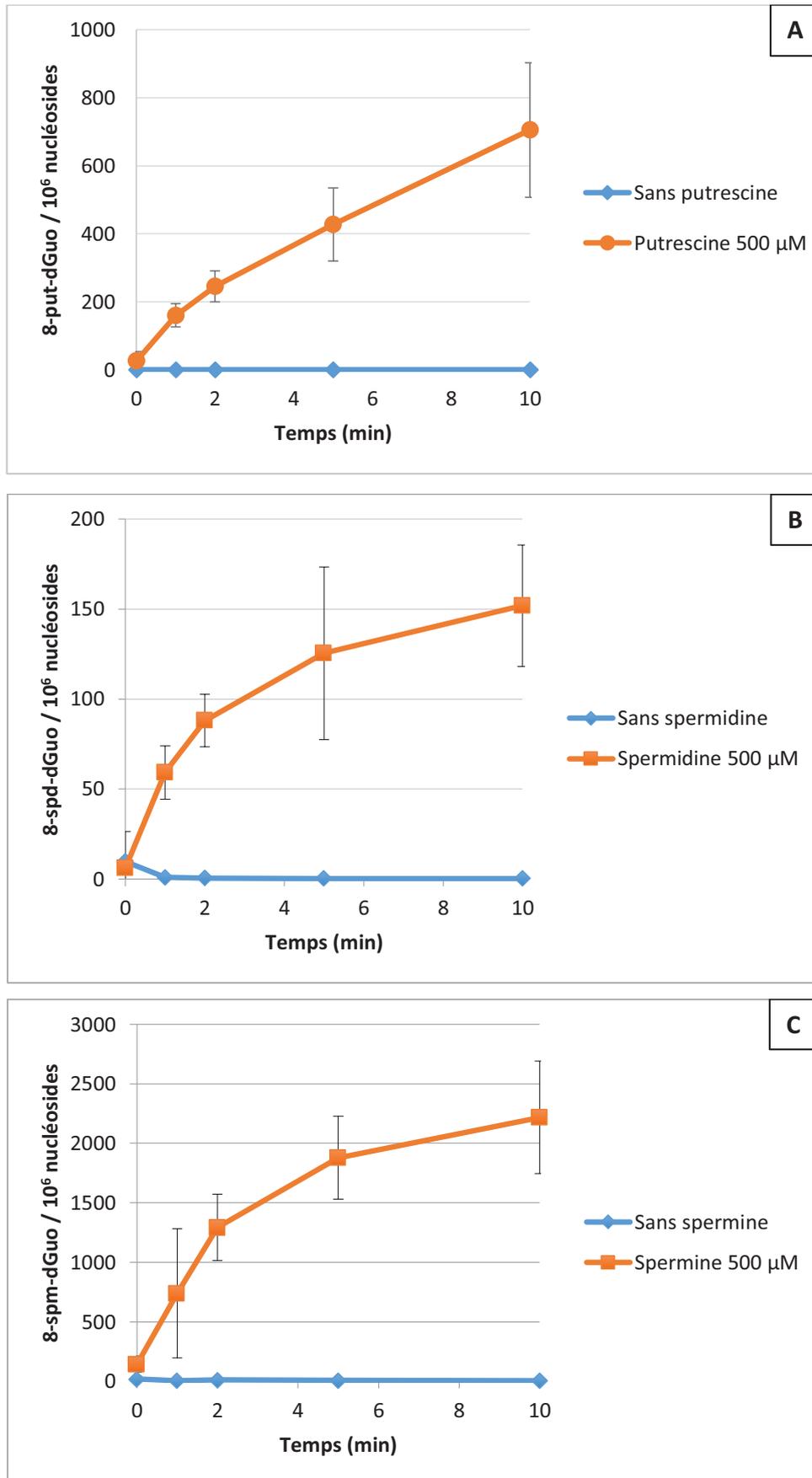


Figure 106 : Cinétiques de formation d'adduits 8-put-dGuo (A), 8-spd-dGuo (B), 8-spm-dGuo (C) par photosensibilisation d'ADN isolé (0,1 mg/mL) en présence de 500 μM de putrescine (A), de spermidine (B) ou de spermine (C).

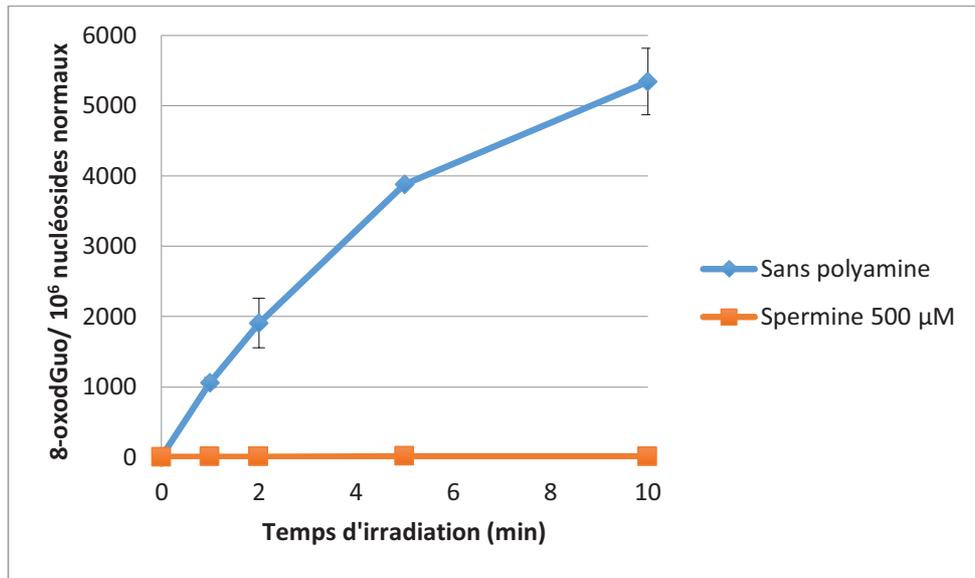


Figure 107 : Cinétique de formation de 8-oxodGuo par photosensibilisation d'ADN isolé (0,1 mg/mL) en présence de spermine.

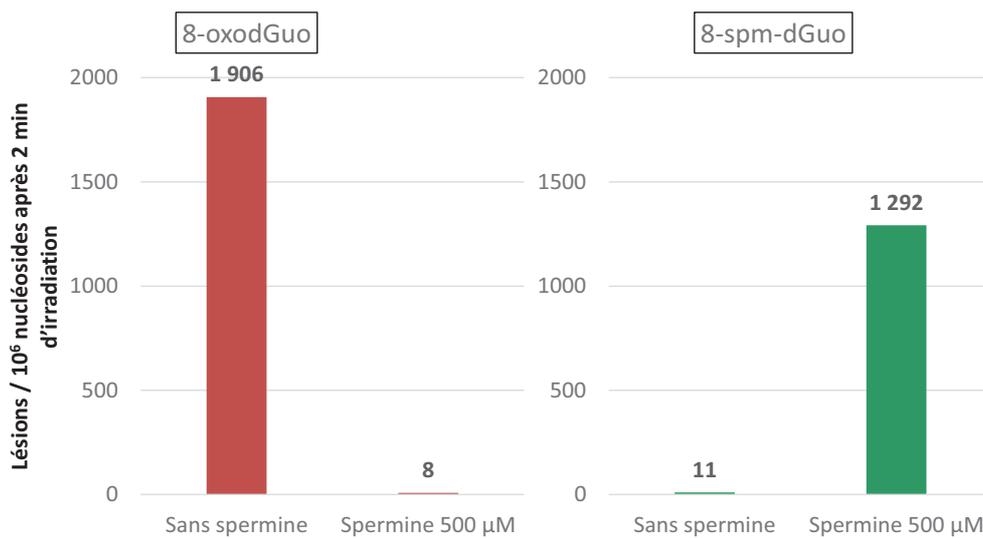


Figure 108 : Formation de 8-oxodGuo et de 8-spm-dGuo après photosensibilisation d'ADN isolé (0,1 mg/mL) en présence ou non de spermine (500 µM).

5.2 Etude de la formation d'adduits par exposition au rayonnement ionisant

Les échantillons d'ADN sont traités par le rayonnement γ issu d'une source de cobalt 60. L'ADN est ensuite précipité et hydrolysé comme précédemment.

La présence de spermine à une concentration de 100 μM produit de très faibles taux d'adduits (Figure 109). A 500 μM la formation de 8-spm-dGuo est beaucoup plus marquée et atteint 38 lésions par million de nucléosides pour la dose la plus élevée (87 grays). Dans ces conditions la constante de formation est de 0,47 adduit par million de nucléosides par gray.

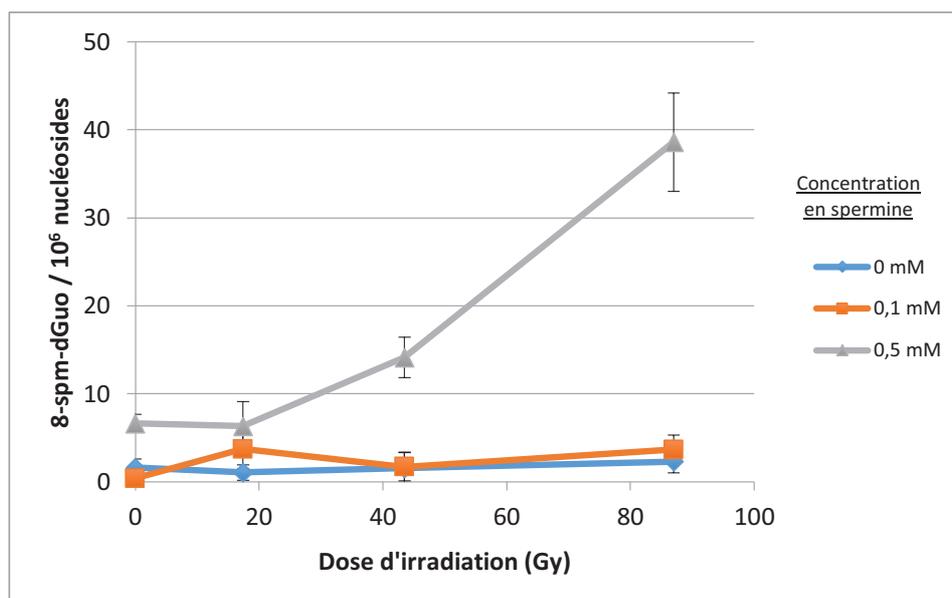


Figure 109 : Formation d'adduits 8-spm-dGuo dans l'ADN isolé (0,5 mg/mL) après exposition au rayonnement γ en présence de différentes concentrations de spermine (0, 0,1 et 0,5 mM).

Concernant la formation de 8-oxodGuo, les résultats sont similaires à ceux obtenus lors de l'expérience de photosensibilisation (Figure 110). Pour l'irradiation sans polyamine, la production de 8-oxodGuo est d'environ 19 lésions par million de nucléosides par gray. La présence de polyamines provoque à nouveau une très forte inhibition de la formation de cette lésion, pour atteindre des constantes de 3 et 0,6 lésions par million de nucléosides par gray pour respectivement des concentrations de 100 et 500 μM de spermine.

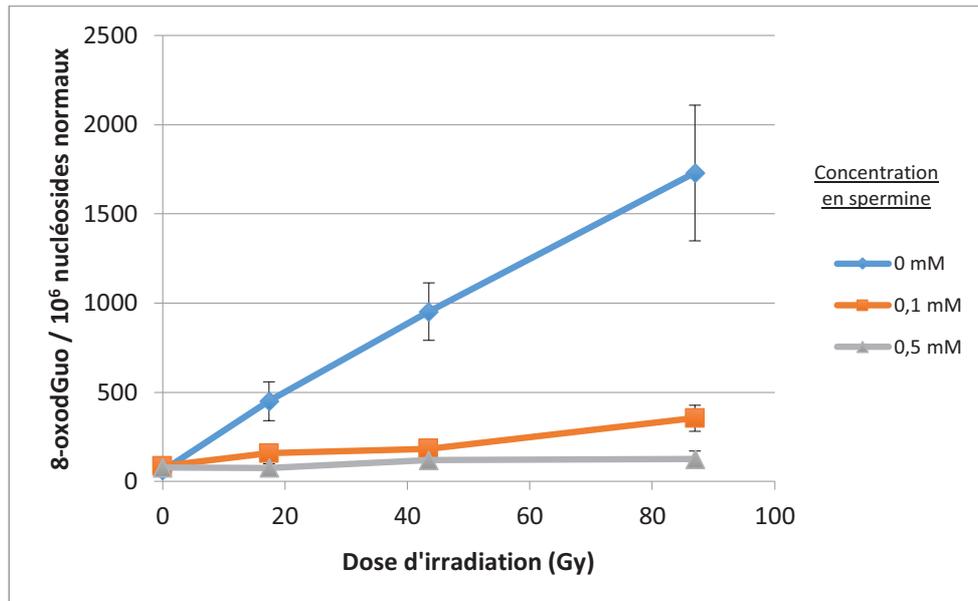


Figure 110 : Formation de 8-oxodGuo dans l'ADN isolé (0,5 mg/mL) après exposition au rayonnement γ en présence de différentes concentrations de spermine (0, 0,1 et 0,5 mM).

5.3 Etude de la formation d'adduits après exposition au rayonnement laser

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, l'exposition au rayonnement laser à une longueur d'onde de 266 nm produit des taux élevés de radicaux cations de la guanine. Les conditions choisies pour réaliser cette expérience sont favorables à un mécanisme biphotonique afin de provoquer l'ionisation de la molécule cible.

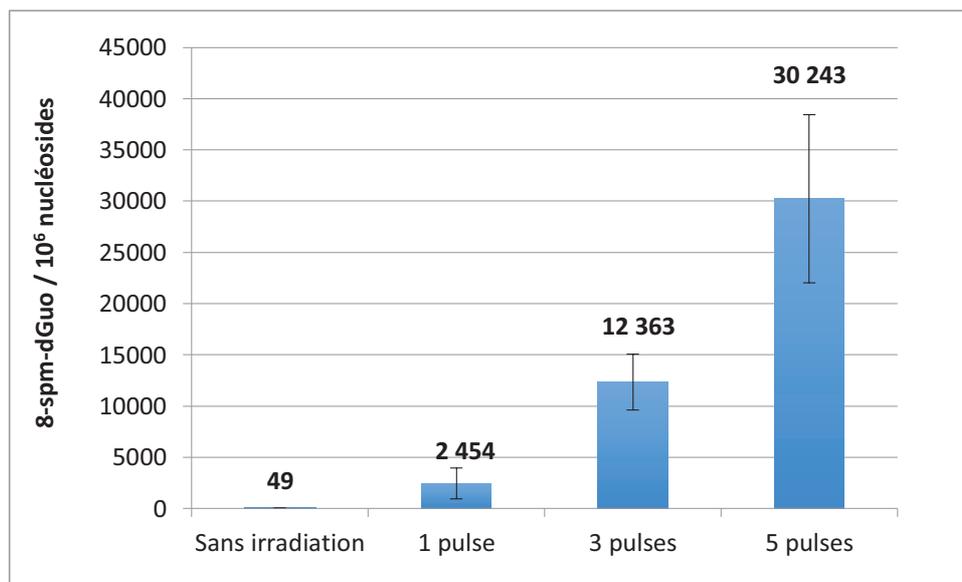


Figure 111 : Formation de 8-spm-dGuo après exposition d'ADN isolé (0,5 mg/mL) au rayonnement laser, en présence de spermine (500 μ M). Chaque impulsion laser correspond à une énergie reçue de 1000 mJ/cm².

Les résultats présentés dans la Figure 111 ont été obtenus après irradiation en présence de spermine, à une concentration de 500 μM . L'exposition aux impulsions laser conduit à des taux d'adduits très élevés. Après une impulsion laser à 120 mJ (ce qui correspond à une énergie reçue d'environ 1000 mJ/cm^2) le taux de 8-spm-dGuo atteint environ 2500 lésions par million de nucléosides. La dose la plus élevée (5 pulses) produit environ 30000 adduits / million de nucléosides, ce qui représente approximativement 1,5 8-spm-dGuo / 100 2'-désoxyguanosine.

Les résultats de quantification d'adduits dans l'ADN isolé permettent de conclure que les polyamines sont des nucléophiles capables de réagir avec le radical cation de la guanine pour former des adduits en position C8. Aux vues des taux d'adduits observés, la spermine est plus particulièrement impliquée dans cette réaction que les autres polyamines. Les expériences de photosensibilisation mettent en évidence un phénomène de saturation qui témoigne de la suroxydation des adduits formés. Ces adduits seront par la suite recherchés dans l'ADN cellulaire.

De plus, nous observons une forte inhibition de la formation de 8-oxodGuo en présence de polyamines. Ces molécules sont connues pour leurs propriétés radioprotectrices : Douki *et al.* ont décrit une inhibition de la formation de 8-oxodGuo dans l'ADN isolé en présence de polyamines lors de l'exposition au rayonnement ionisant (155). Cette inhibition a également été observée lors des expériences de photosensibilisation et d'exposition au rayonnement laser. L'étude des adduits entre polyamines et guanine constitue un élément pertinent dans la compréhension du mécanisme d'inhibition de formation de 8-oxodGuo. Les résultats obtenus reflètent en effet une compétition entre l'addition nucléophile de l'eau et celle des polyamines sur le radical cation de la guanine.

6 Formation d'adduits dans l'ADN cellulaire

Les travaux réalisés dans l'ADN isolé ont permis de confirmer que les polyamines pouvaient réagir avec le radical cation de la guanine pour former des adduits. Afin de déterminer si cette réaction se produisait dans l'ADN cellulaire, nous avons dans un premier temps entrepris une étude sur la lignée THP1. Ensuite, les adduits polyamines ont été recherchés dans l'ADN extrait de spermatozoïdes humains et murins.

6.1 Etude réalisée sur lignée THP 1

Les cellules THP1, en solution dans du PBS, sont exposées à des impulsions laser de longueur d'onde de 266 nm à 60 mJ (ce qui représente une énergie reçue de 500 mJ/cm²/pulse environ). Le système d'irradiation utilisé permet de former des taux élevés de radicaux cations de la guanine, par un mécanisme biphotonique (cf. chapitre 2, paragraphe 7.3.2.). Après exposition des cellules au rayonnement laser, l'ADN est extrait, hydrolysé par digestion enzymatique, puis analysé par HPLC-MS/MS, afin de doser la 8-oxodGuo et les adduits polyamines (Figure 112). Le taux de 8-oxodGuo augmente avec le nombre de pulses appliqués, pour atteindre environ 300 lésions par million de nucléosides pour 10 impulsions laser. Dans ces conditions, les taux d'adduits 8-polyamine-dGuo sont inférieurs à la limite de sensibilité ; on n'observe aucune formation d'adduits lors de l'exposition au rayonnement laser.

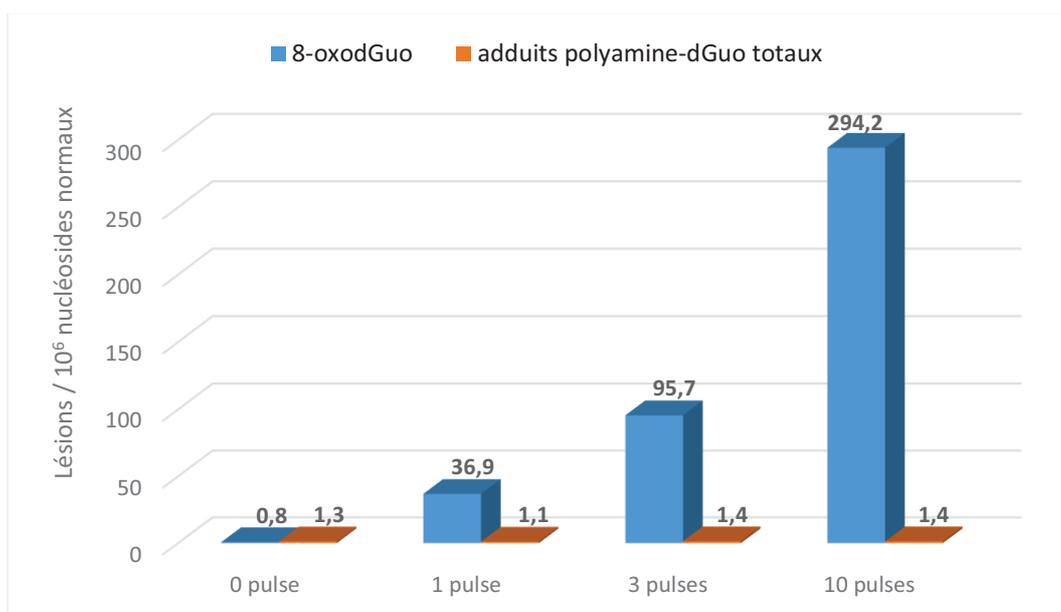


Figure 112 : Taux de 8-oxodGuo et d'adduits polyamines totaux (8-put-dGuo + 8-spd-dGuo + 8-spm-dGuo) dans l'ADN extrait de cellules THP1 exposées à des impulsions laser.

6.2 Formation d'adduits dans l'ADN de spermatozoïdes

Nous avons vu en introduction que les polyamines intervenaient dans les fonctions reproductrices mâles. Elles participent notamment à la spermatogenèse, à la motilité des spermatozoïdes et à la fécondation. De façon plus générale, il est connu que ces molécules sont présentes au contact de l'ADN et permettent de moduler sa conformation. Les polyamines, et en particulier la spermine, sont présentes dans le sperme. Leur concentration dans les spermatozoïdes est difficile à déterminer, mais dans le liquide séminal elle est de l'ordre du millimolaire. On peut donc envisager que ces polyamines interagissent étroitement avec l'ADN des spermatozoïdes, et sont susceptibles de se lier de façon covalente. Les adduits 8-polyamines-dGuo ont donc été recherchés dans l'ADN extrait de spermatozoïdes. Cette étude a été réalisée sur des échantillons de sperme de souris et de sperme humain afin de déterminer le taux basal d'adduits. Certains échantillons ont ensuite été soumis au rayonnement ionisant et au peroxyde d'hydrogène, afin d'appréhender l'effet du stress oxydant sur la formation de ces lésions.

Le taux basal d'adduits a été mesuré après extraction d'ADN et hydrolyse par digestion enzymatique. La Figure 113 montre les chromatogrammes obtenus lors de l'analyse par HPLC-MS/MS d'un échantillon d'ADN extrait. Par comparaison avec les chromatogrammes des standards de 8-spd-dGuo et 8-spm-dGuo, on observe des pics intenses aux temps de rétention attendus, ce qui prouve la présence de ces lésions. La 8-spd-dGuo et la 8-spm-dGuo ont été dosées dans 9 échantillons humains ; les taux mesurés sont reportés dans le Tableau 14.

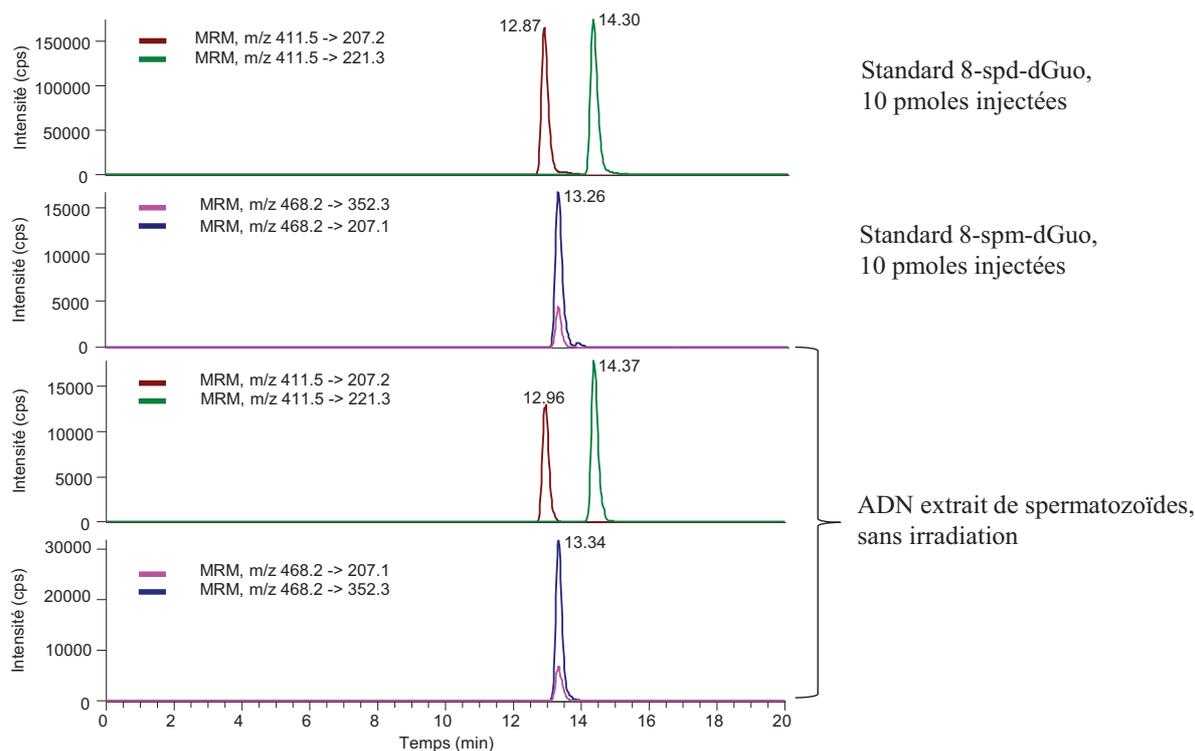


Figure 113 : Chromatogrammes obtenus lors de l'analyse par HPLC-MS/MS d'ADN extrait de spermatozoïdes non irradiés.

Dans tous les échantillons analysés, on note des taux élevés de 8-spd-dGuo et 8-spm-dGuo. L'adduit 8-put-dGuo n'est pas détecté. Il existe une très grande hétérogénéité entre les échantillons, puisque les taux d'adduits avec la spermidine varient de 30 à 4000 et ceux des adduits avec la spermine de 3000 à 50000 par million de nucléosides. Il est difficile de déterminer à première vue si ces différences proviennent de variations interindividuelles ou d'un manque de robustesse de la méthode analytique utilisée. Les adduits avec la spermidine et la spermine ont également été détectés dans les échantillons d'ADN extrait de spermatozoïdes de souris (Tableau 15). Ces résultats suggèrent donc que les polyamines réagissent avec la guanine pour former des pontages covalents avec l'ADN dans les spermatozoïdes. Malgré la grande variabilité entre les différents dosages, les taux d'adduits observés sont en moyenne étonnamment élevés, en particulier pour l'adduit spermine dans les échantillons humains. En effet l'adduit 8-spm-dGuo représente en moyenne 1,5% des nucléotides, ce qui est largement supérieur aux taux de lésions oxydatives généralement mesurés dans l'ADN cellulaire (cf. discussion).

Dans certains échantillons les taux d'adduits ont été comparés à ceux de la 5-Me-désoxycytidine (5-MedC), modification épigénétique de référence, également dosée par HPLC-MS/MS. Les taux de 8-spd-dGuo sont du même ordre de grandeur que ceux de la 5-Me-dC, qui représente environ 1 à 5% des nucléosides totaux (Données non présentées ici).

Tableau 14 : Dosage des adduits 8-put-dGuo, 8-spd-dGuo et 8-spm-dGuo dans l'ADN extrait de spermatozoïdes humains.

Lésions / 10⁶ nucléosides

<i>Echantillon n°</i>	8-put-dGuo	8-spd-dGuo	8-spm-dGuo
1	1,2	737,0	9248,2
2	0,6	133,8	2846,7
3	1,8	792,0	10788,5
4	0,5	1720,6	47692,3
5	1,2	79,6	3565,2
6	0,6	28,9	30222,1
7	0,8	396,1	8001,7
8	2,1	4248,8	25282,8
9	1,5	2466,7	15162,0
<i>Moyenne</i>	1,14	1178,17	16978,83
<i>Ecart-type</i>	0,57	1412,32	14787,12

Tableau 15 : Dosage des adduits 8-put-dGuo, 8-spd-dGuo et 8-spm-dGuo dans l'ADN extrait de spermatozoïdes de souris.

Lésions / 10⁶ nucléosides

<i>Echantillon n°</i>	8-put-dGuo	8-spd-dGuo	8-spm-dGuo
1	14,8	20,4	2398,8
2	54,8	3,4	557,3
<i>Moyenne</i>	34,8	11,9	1478,1
<i>Ecart-type</i>	28,3	12,0	1302,1

Nous avons ensuite étudié l'évolution des taux d'adduits avec la spermidine et la spermine lors de l'exposition au stress oxydant. Les échantillons de sperme ont été traités par différentes doses de rayonnement ionisant (0 à 100 Gy), puis l'ADN est extrait et hydrolysé par digestion enzymatique. Cette expérience a été réalisée sur plusieurs échantillons de donneurs sains présentant un niveau basal d'adduits très différent. Les résultats obtenus pour 2 échantillons représentatifs (A et B), sont représentés dans la Figure 114. On observe une diminution quasi-exponentielle des taux d'adduits en fonction de la dose d'irradiation. Cette tendance est similaire pour l'ensemble des échantillons exposés, et ce malgré les différences des taux d'adduits initiaux.

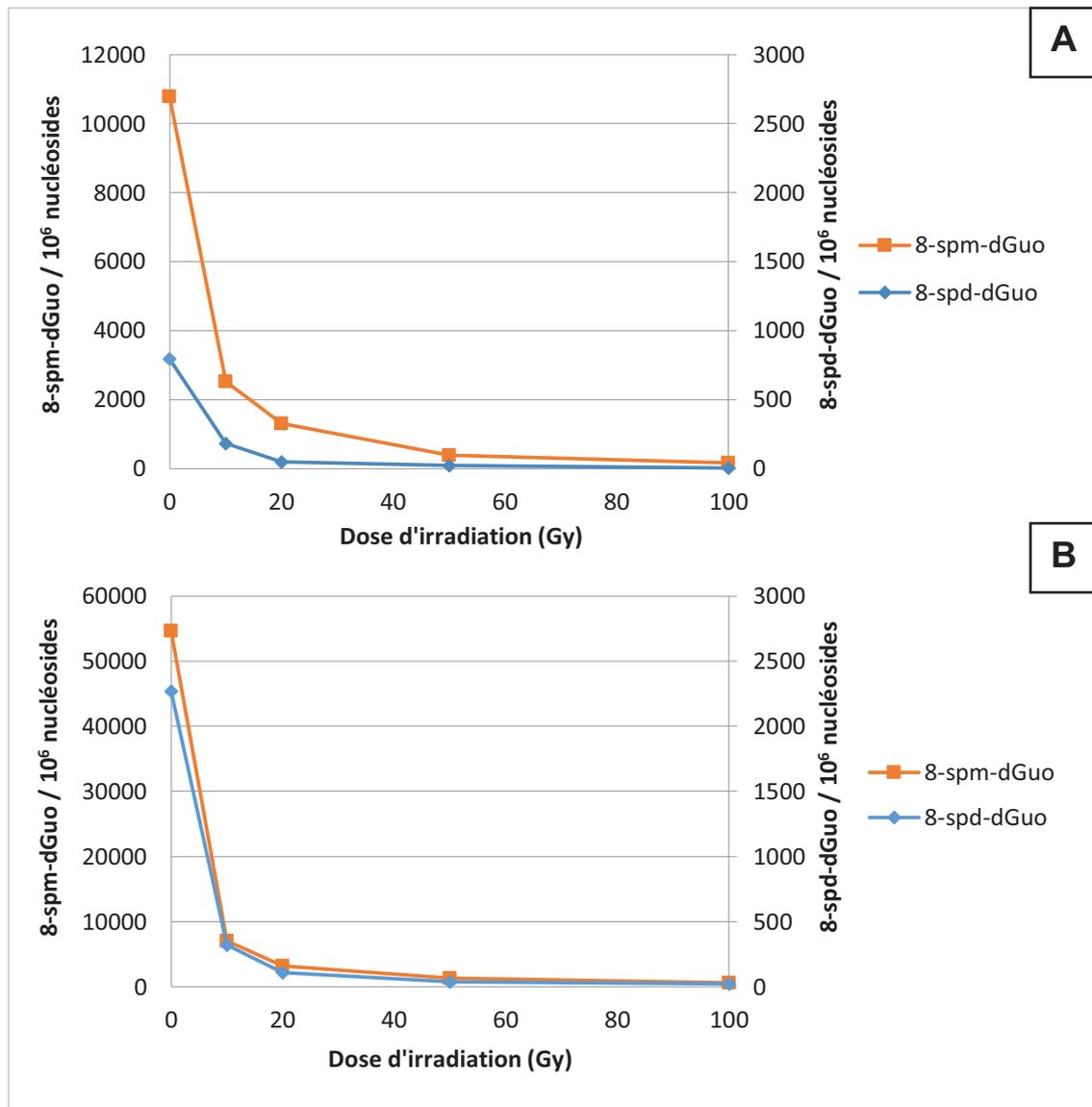


Figure 114 : Evolution du taux de 8-spd-dGuo et de 8-spm-dGuo lors de l'exposition au rayonnement γ dans 2 échantillons (A & B) d'ADN extrait de spermatozoïdes.

Cette expérience a été renouvelée afin d'évaluer l'incidence d'un traitement au peroxyde d'hydrogène H₂O₂ sur les taux d'adduits observés. Les échantillons de sperme sont exposés à différentes doses de H₂O₂ pendant une heure à 37°, puis l'ADN est extrait et hydrolysé. De la même manière que pour

l'expérience précédente, des échantillons présentant des taux basaux très différents ont été analysés. La Figure 115 montre les résultats obtenus pour 2 échantillons représentatifs (A et B). L'évolution des taux d'adduits lors du traitement suit la même tendance que pour l'irradiation γ , pour l'ensemble des échantillons étudiés, avec une diminution quasi exponentielle des taux de 8-spd-dGuo et 8-spm-dGuo.

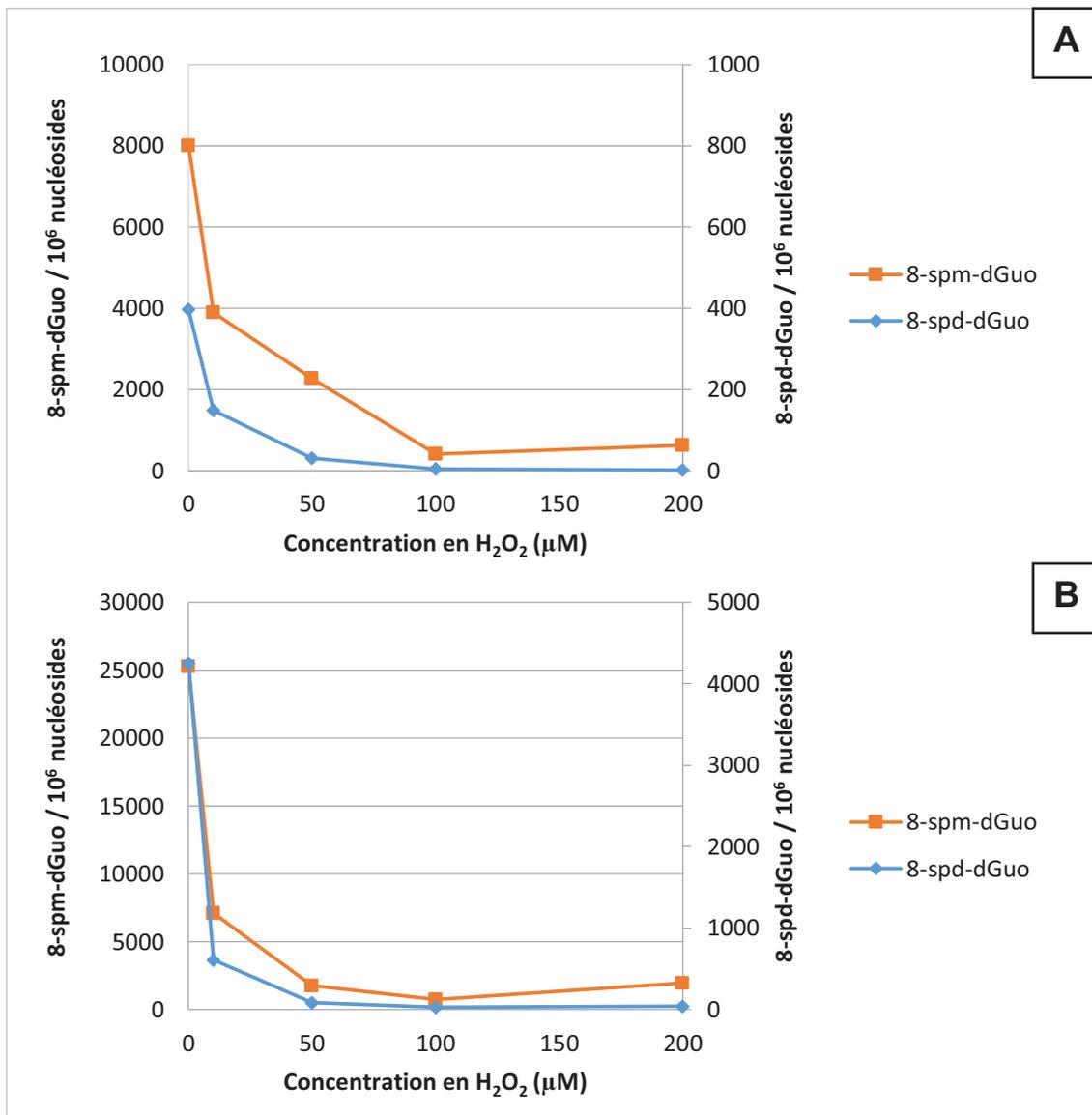


Figure 115 : Evolution du taux de 8-spd-dGuo et 8-spm-dGuo lors de l'exposition au peroxyde d'hydrogène dans 2 échantillons (A & B) d'ADN extrait de spermatozoïdes.

L'analyse des échantillons d'ADN de spermatozoïdes révèle donc des taux d'adduits 8-spd-dGuo et 8-spm-dGuo très élevés, en particulier pour l'adduit avec la spermine qui a été estimé à environ 1,5 % des bases dans les échantillons de donneurs sains. Ces lésions ont également été détectées dans de l'ADN extrait de sperme de souris, à des taux moindres. Les taux d'adduits avec la putrescine se situent en dessous du seuil de détection. Ces résultats démontrent également une diminution du nombre d'adduits avec les polyamines lors de l'exposition au stress oxydatif. Suite au manque de reproductibilité lors du dosage des adduits par HPLC-MS/MS, il serait pertinent de renouveler ces expériences sur un nombre d'échantillons plus conséquent et de s'assurer de la robustesse de la méthode analytique utilisée.

7 Optimisation d'une méthode de quantification plus sensible

Nous avons évoqué dans le paragraphe 2.3 les difficultés rencontrées lors de l'analyse des adduits polyamines-dGuo par HPLC. Ces difficultés sont liées à des interactions parasites entre les amines primaires et secondaires des chaînes polyamine des adduits avec les groupements silanols résiduels de la phase stationnaire. Une faible proportion d'analytes est ainsi « piégée » au niveau des silanols. L'injection de faibles quantités d'adduits n'est donc pas détectable. Pour l'adduit 8-put-dGuo, la limite de détection se situe aux alentours de 50 fmoles. Pour les adduits avec la spermidine et la spermine, qui comportent plus de groupements amine, ce phénomène est encore plus marqué ; la limite de détection est plutôt de l'ordre d'une pmole.

De plus cette interaction provoque également un « effet mémoire ». Celui-ci a été mis en évidence par l'analyse d'un témoin négatif, constitué d'ADN irradié sans polyamine, juste après l'injection d'un standard moyennement concentré (1 μ M de chaque adduit) : on observe alors une contamination de la colonne par une fraction d'adduits du standard, qui sont élués lors de l'analyse du témoin négatif. Ceci peut être expliqué par la présence, dans la matrice de l'échantillon témoin, de composés capables de « décrocher » les adduits liés aux silanols.

L'étude des droites de calibration (Figure 116 à Figure 118) reflète très nettement le phénomène de « piégeage » des analytes, en lien avec un seuil de détection élevé. Les droites de tendance coupent l'axe des abscisses à environ 120 fmoles pour 8-put-dGuo, 300 fmoles pour les 2 isomères 8-spd-dGuo, et 330 fmoles pour 8-spm-dGuo. D'autre part les coefficients de corrélation révèlent soit une faible reproductibilité soit une faible linéarité sur cette gamme d'injections.

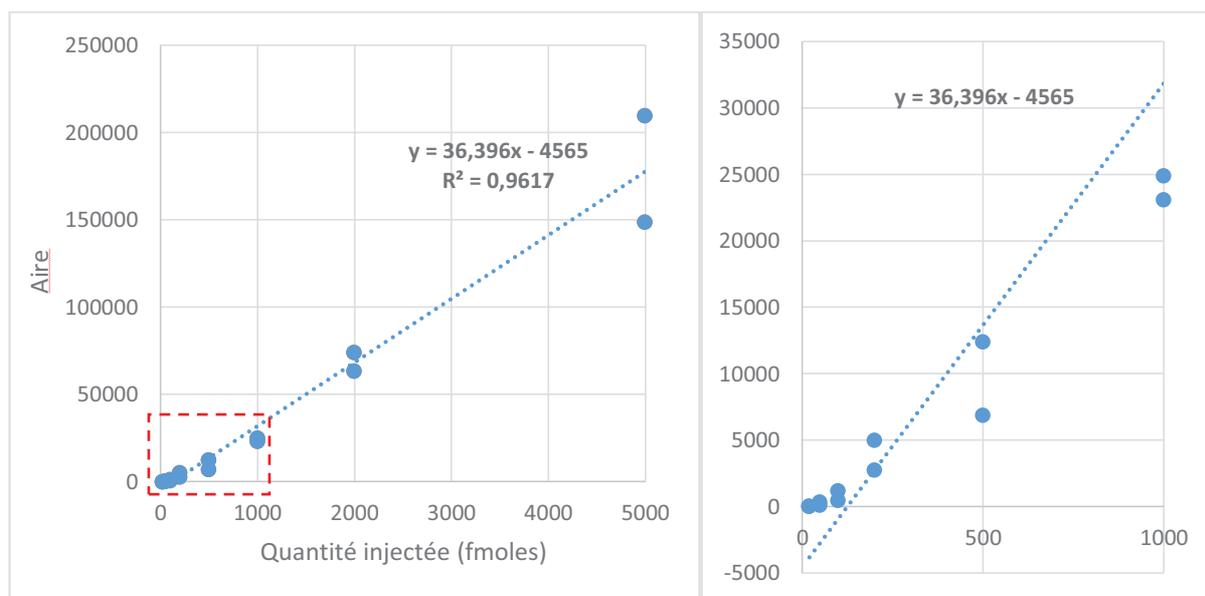


Figure 116 : Droite de calibration pour la détection du standard 8-put-dGuo par HPLC-MS/MS, sur une gamme de 20 à 5000 fmoles injectées. Le graphique de droite est un zoom de la droite de calibration entre 0 et 1000 fmoles injectées.

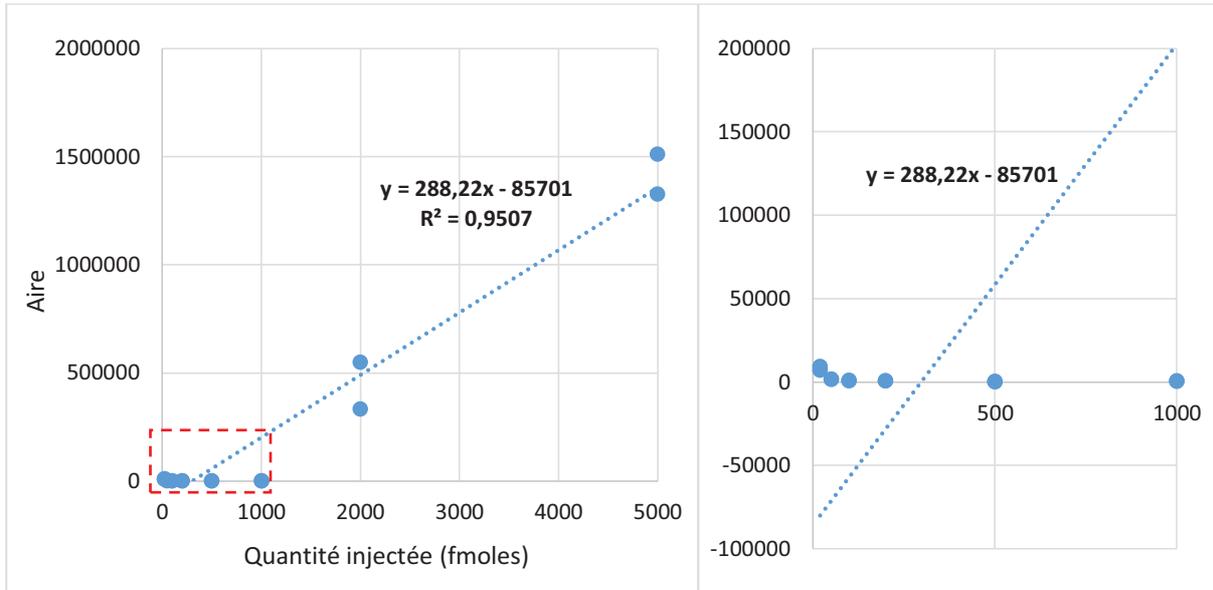


Figure 117 : Droite de calibration pour la détection du standard 8-spd-dGuo (isomère 1) par HPLC-MS/MS, sur une gamme de 20 à 5000 fmoles injectées. Le graphique de droite est un zoom de la droite de calibration entre 0 et 1000 fmoles injectées.

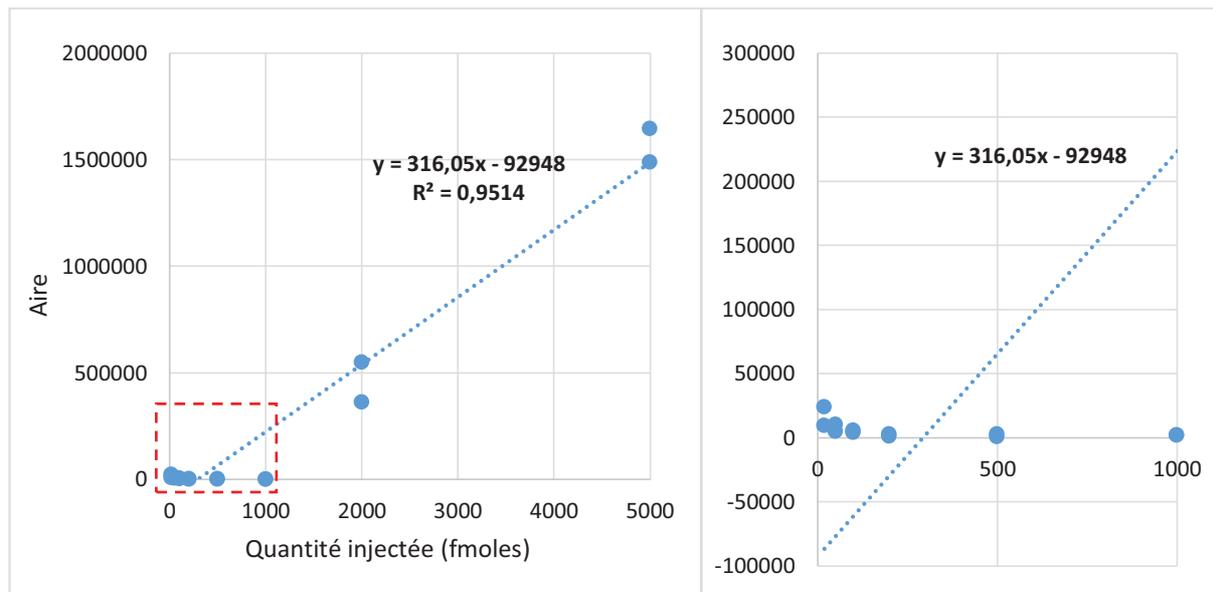


Figure 118 : Droite de calibration pour la détection du standard 8-spd-dGuo (isomère 2) par HPLC-MS/MS, sur une gamme de 20 à 5000 fmoles injectées. Le graphique de droite est un zoom de la droite de calibration entre 0 et 1000 fmoles injectées.

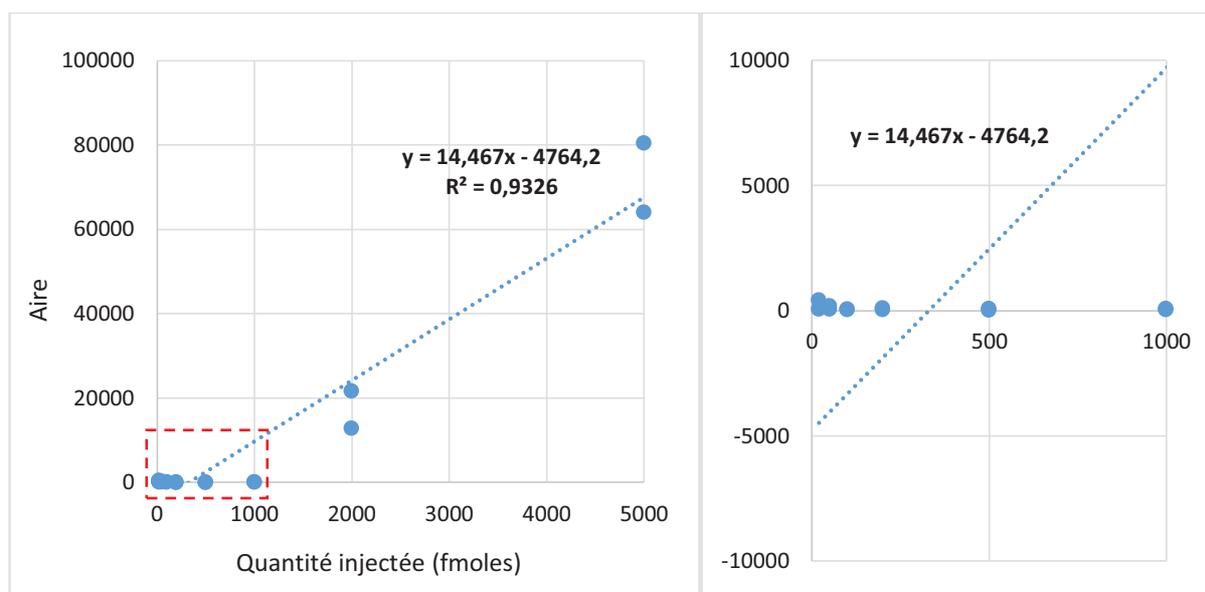


Figure 119 : Droite de calibration pour la détection du standard 8-spm-dGuo par HPLC-MS/MS, sur une gamme de 20 à 5000 fmoles injectées. Le graphique de droite est un zoom de la droite de calibration entre 0 et 1000 fmoles injectées.

Le développement de la méthode d'analyse par HPLC-MS/MS a donc fait l'objet d'une optimisation, qui sera détaillée dans les paragraphes suivants. Le but est d'améliorer le seuil de détection de cette méthode, et de limiter l'effet mémoire, afin de pouvoir étudier la formation de ces lésions à l'échelle cellulaire.

7.1 Optimisation des phases mobile et stationnaire

La première stratégie envisagée est d'augmenter la protonation des amines de la chaîne polyamine, afin de limiter la formation de liaisons hydrogène avec les silanols. Pour cela différents éluants acides ont été testés. Les acides classiquement utilisés tels que l'acide acétique ou l'acide formique permettent effectivement d'améliorer la détection des adduits, mais sont associés à des temps de rétention trop courts. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 2.3, l'utilisation d'acides fluorés, tels que l'acide trifluoroacétique ou l'acide heptafluorobutyrique, grâce à la présence d'un contre-ion moins polaire, permet de contourner cette difficulté. Cependant, les éluants composés d'acides fluorés sont connus pour diminuer la sensibilité de détection en spectrométrie de masse, mais l'augmentation de la pression et de la température des gaz coaxiaux au niveau de la source d'ionisation par électrospray permet d'améliorer la désolvatation et donc d'augmenter la sensibilité.

La 2^e possibilité pour contourner ce problème chromatographique est de réduire le nombre de silanols résiduels de la phase stationnaire. Des colonnes de silice greffée C18 conditionnées par plusieurs étapes de « end-capping » ont donc été testées, mais le phénomène de « piégeage » est toujours présent dans ces conditions.

7.2 Dérivation des polyamines

Dans la littérature, l'analyse des polyamines sous leur forme libre par chromatographie liquide a été fréquemment décrite. En plus des phénomènes d'adsorption décrits précédemment, les polyamines présentent l'inconvénient d'être difficilement visualisables par détection UV (156). Parmi les méthodes développées, la plupart reposent donc sur la dérivation des fonctions amines. Cette dérivation s'effectue le plus souvent avec un groupement fluorescent, tels que l'*o*-phthaldialdéhyde (157) ou le dansyl chlorure (158), afin de faciliter la détection de ces composés. Byun *et al.* ont mis en place une méthode d'analyse des polyamines par LC-ESI-MS/MS avec une dérivation par le chloroformate d'isobutyle (159) (Figure 120). Cette réaction permet de fonctionnaliser les amines primaires et secondaires. Un standard interne de 1,6-diaminohexane est utilisé afin de normaliser les résultats en fonction du rendement de la réaction de dérivation. Cette technique a été appliquée à l'analyse d'une dizaine de polyamines, (notamment la putrescine, la spermidine, la spermine, et leurs formes acétylées) et a permis de les quantifier dans des échantillons d'urine et de sérum.

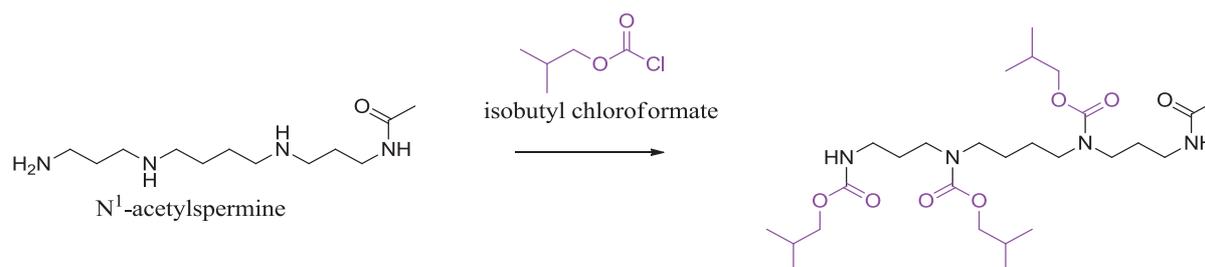


Figure 120 : Réaction de dérivation de la N¹-acétylspermine par le chloroformate d'isobutyle (159).

Afin d'optimiser la détection des adduits guanine-polyamines par HPLC-MS/MS, nous avons adapté la stratégie de dérivation de Byun à ces composés (Figure 121). La mise au point présentée ici a été réalisée avec l'adduit 8-put-dGuo. L'agent de dérivation employé est le chloroformate de butyle. La réaction de dérivation est effectuée sur le composé dépuriné 8-put-Gua, et conduit à un mélange de produits mono, bi et tri-dérivés qui sont identifiés par HPLC-MS/MS (Figure 122). Sur le chromatogramme obtenu en mode MS1 (Figure 122-A), le composé élué à 11 minutes et présentant un rapport m/z de 338 correspond à l'adduit monodérivé protoné. Les adduits portant 2 et 3 groupements carbamate ont un rapport m/z de respectivement 439 et 538 et sont élués à 19 et 26 minutes (Figure 122-B et C). Nous avons choisi de travailler sur le composé monodérivé, afin de ne pas diminuer excessivement la polarité des adduits, ce qui pourrait constituer un inconvénient pour la séparation chromatographique.

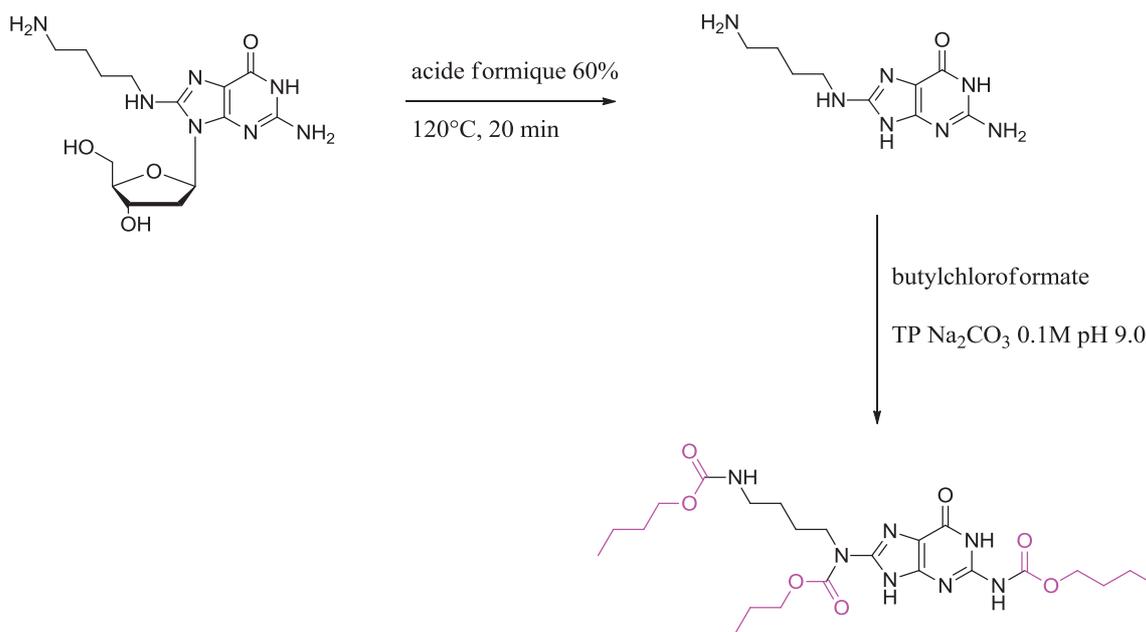


Figure 121 : Stratégie pour la dérivation de l'adduit 8-put-dGuo.

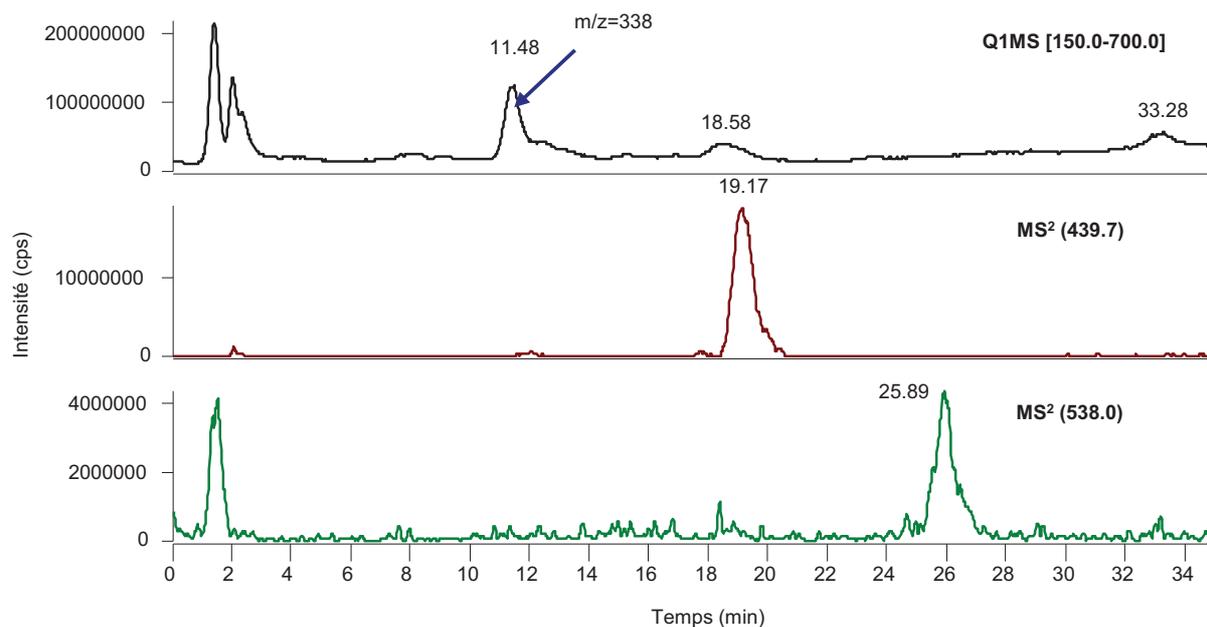


Figure 122 : Analyse par HPLC-MS/MS du brut réactionnel pour la dérivation de l'adduit 8-put-Gua par le chloroformate d'isobutyle. Le composé monodérivé ($m/z=338$) est détectable en mode Q1MS (A). Les adduits bi et tridérivés ($m/z=439$ et 538, respectivement) sont visualisés en MS2 (B & C).

L'adduit 8-put-Gua monodérivé a été purifié par HPLC phase inverse. Ce composé est ensuite analysé par HPLC-MS/MS en mode MRM à l'aide de la transition 339.2 \rightarrow 264.9, avec une énergie de collision de 20 eV. Sur le chromatogramme de la Figure 123, correspondant à 50 fmoles de standard injectées, le rapport signal/bruit est de 90. D'après la droite de calibration (Figure 124), le phénomène de « piégeage » des adduits au niveau des silanols est beaucoup moins présent (la droite de tendance coupe l'axe des

abscisses à 35 fmoles). Le coefficient de corrélation est de 0,989 entre 2 et 5000 fmoles injectées. La sensibilité est améliorée d'un facteur de presque 10, et la limite de détection se situe aux alentours d'une fmoles.

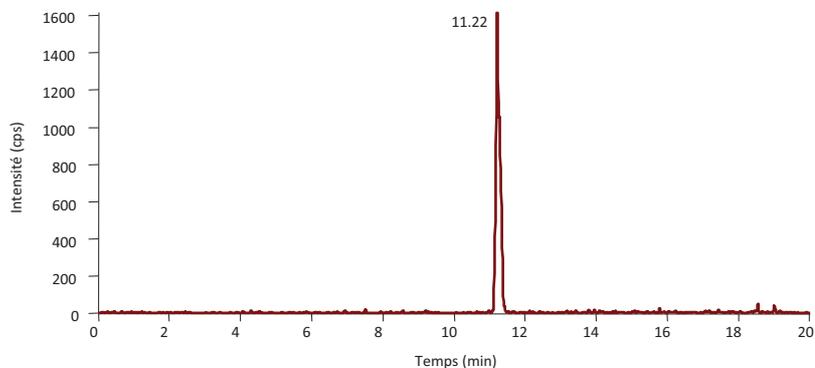


Figure 123 : Chromatogramme obtenu pour la détection par HPLC-MS/MS de l'adduit 8-put-Gua monodérivé (50 fmoles injectées).

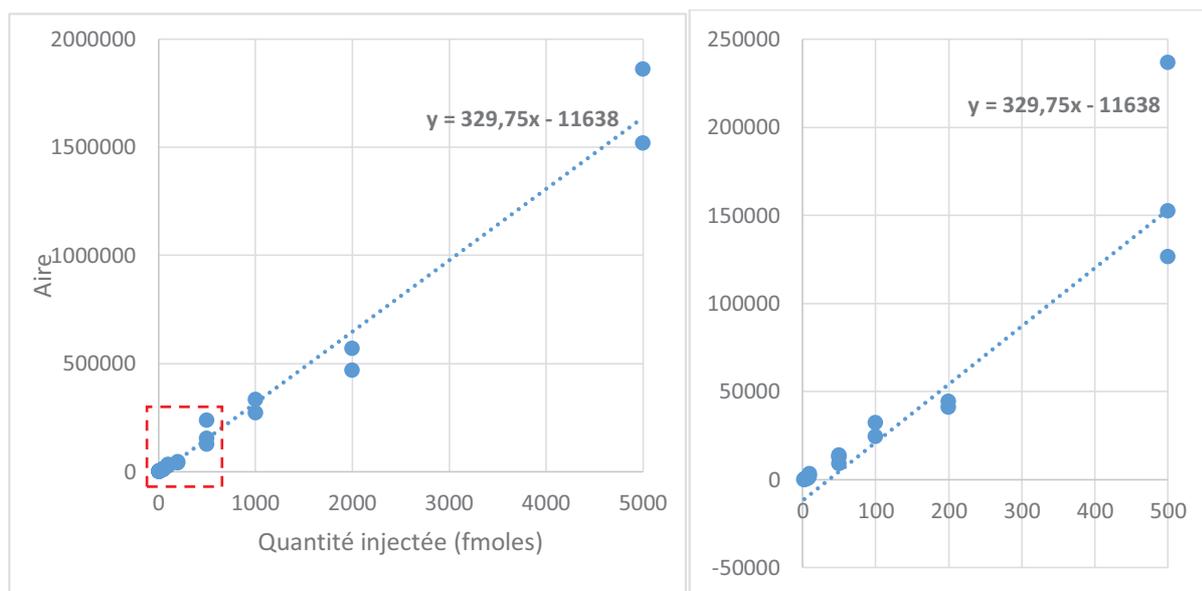


Figure 124 : Droite de calibration pour la détection du standard 8-put-Gua monodérivé par HPLC-MS/MS. Le graphique de droite est un zoom de la droite de calibration entre 0 et 500 fmoles injectées.

Grâce à la technique de dérivation par le chloroformate de butyle, la sensibilité de détection de l'adduit guanine-putrescine a été améliorée. En revanche cette stratégie s'avère difficilement transposable aux adduits comportant plus de fonctions amines « dérivables », car la réaction de dérivation conduit à un mélange plus complexe, et s'accompagne d'une forte diminution de la polarité de ces analytes.

7.3 Saturation des silanols résiduels par un mix de polyamines

La dernière alternative envisagée pour contourner ce problème chromatographique a été de saturer les silanols résiduels avec des polyamines libres. Différents tests ont été effectués en ajoutant dans chaque standard et dans chaque échantillon un mix de polyamines libres, à une concentration finale bien supérieure à celles des adduits. L'ajout d'un mix à une concentration finale de 0,5 mM de chaque polyamine permet d'éviter complètement tout effet mémoire. Les droites de calibration (Figure 125) témoignent également d'une réduction du piégeage des adduits par les silanols : les droites de tendance coupent les abscisses à environ 50 fmoles. La reproductibilité reste assez faible, mais sensibilité de détection est très nettement améliorée, d'après les limites de détection rassemblées dans le Tableau 16.

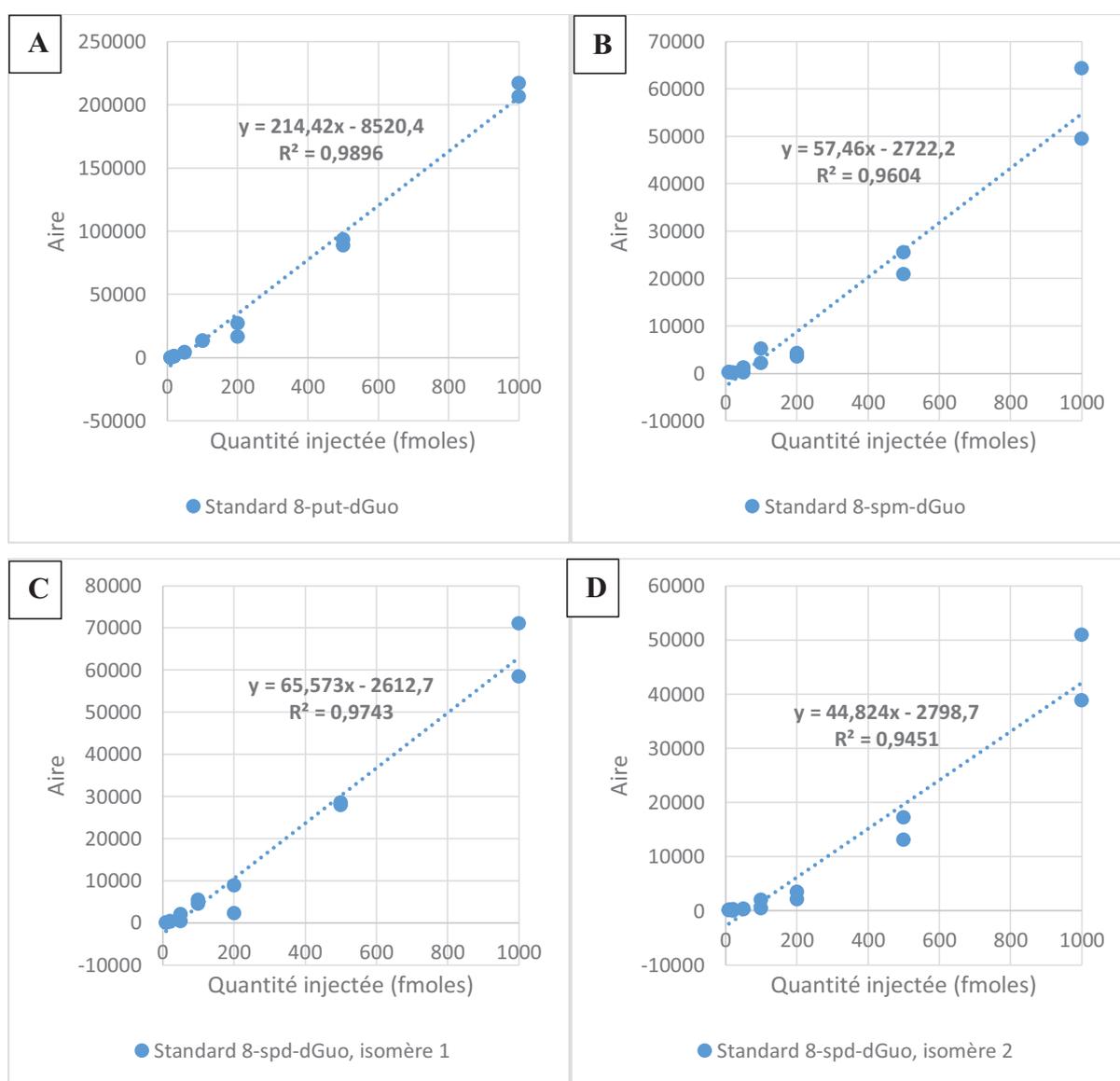


Figure 125 : Droites de calibration pour la détection des standards 8-put-dGuo (A), 8-spm-dGuo (B), et 8-spd-dGuo (C & D), contenant un mix de polyamines libre à une concentration de 0,5 mM pour chaque polyamine.

Tableau 16 : Limites de détection des adduits polyamines-dGuo par la méthode d'analyse HPLC-MS/MS optimisée grâce à la saturation des silanols résiduels de la colonne par un mix de polyamines à 0,5 mM.

<i>Analyte</i>	<i>Limite de détection</i>
<i>8-put-dGuo</i>	~ 20 fmoles
<i>8-spd-dGuo</i>	~ 50 fmoles
<i>8-spm-dGuo</i>	~ 100 fmoles

La saturation des silanols par un mix de polyamines libres nous a donc permis d'optimiser la détection et la quantification des adduits polyamines-dGuo par HPLC-MS/MS. L'ajout du mix à une concentration de 0,5 mM s'accompagne d'une augmentation modérée du pH (≤ 8), ce qui est compatible avec la phase stationnaire utilisée), et ne semble pas dégrader les échantillons d'ADN. Lors de séries d'analyses réalisées sur plusieurs jours, la présence de concentrations élevées en polyamines n'a pas perturbé le système de détection par spectrométrie de masse, certainement car celles-ci ne sont présentes que dans les échantillons, et non dans l'éluant. Cette alternative présente l'avantage d'être rapide à mettre en œuvre, et applicable aux 3 adduits simultanément. De plus, cet ajout permet de résoudre complètement le problème d'effet mémoire.

8 Réparation des adduits guanine-polyamines par le BER

Nous avons tenté de déterminer si les adduits avec les polyamines pouvaient être pris en charge par le système de réparation par excision de bases (BER). Le BER constitue la voie de réparation privilégiée des modifications chimiques peu volumineuses, et en particulier des dommages induits par le stress oxydant. La prise en charge des adduits guanine-polyamines par les enzymes du BER est difficilement prévisible. Les 2 étapes déterminantes sont la reconnaissance de la lésion puis son excision par les *N*-glycosylases. Afin d'explorer la prise en charge de ces adduits par le BER, nous avons entrepris des tests d'excision, avec l'enzyme Fpg et avec le système OGG1 +/- APE1. Cette étude a été effectuée en collaboration avec le Dr Pablo Radicella, de l'Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire du CEA de Saclay.

La formamidopyrimidine-DNA glycosylase (FpG) est une *N*-glycosylase bifonctionnelle retrouvée chez *E. coli*. OGG1 (OxoGuanine Glycosylase 1) est une *N*-glycosylase d'origine humaine. Elle est également bifonctionnelle et procède à l'excision des lésions par un mécanisme de β -élimination, générant ainsi une extrémité 3' portant un aldéhyde α,β insaturé. Nous avons vu en introduction que l'endonucléase APE1 avait pour rôle de régénérer l'extrémité 3'-OH nécessaire à la suite du processus de réparation et de plus elle augmente l'efficacité d'OGG1 en déplaçant la glycosylase qui présente une forte affinité pour le site abasique qu'elle génère. Ces 2 systèmes enzymatiques sont responsables de l'excision de la 8-oxoguanine et de la Fapy-guanine.

Des échantillons d'ADN isolé sont photosensibilisés en présence de chacune des 3 polyamines étudiées, afin de produire des adduits. L'ADN est ensuite précipité pour ôter le photosensibilisateur et les polyamines en excès, remis en solution, puis incubé pendant 1h et 2h avec la FpG à 37°C, ou 2h et 4h avec OGG1 (+/- APE1) également à 37°C. Le traitement par OGG1 et APE1 est effectué au CEA de Saclay. L'ADN est à nouveau précipité puis hydrolysé enzymatiquement. Les taux de 8-oxodGuo et d'adduits polyamines sont mesurés par HPLC-MS/MS (Figure 126 à Figure 128). Pour chaque expérience, un témoin est réalisé dans les mêmes conditions d'incubation mais sans enzyme de réparation. La 8-oxodGuo est utilisée comme témoin positif afin de s'assurer de l'efficacité des enzymes dans les conditions utilisées. Les données sont exprimées en pourcentage des lésions résiduelles, en comparant les taux mesurés en présence de glycosylases comparés aux taux de lésions de l'ADN traité sans glycosylase.

Les conditions utilisées permettent d'obtenir 60 à 70% d'excision de la 8-oxodGuo avec la Fpg, 50 à 70% avec OGG1, et 45 à 65% avec le système OGG1+APE1. Les taux d'adduits 8-put-dGuo ne sont pas affectés par la présence de Fpg ou de OGG1. Ceci révèle une absence d'excision par ces enzymes de réparation. Concernant les adduits avec la spermidine, on note une faible diminution du taux de ces lésions en présence de OGG1. Cette observation est à considérer avec précaution, puisque les résultats

obtenus lors de cette série d'analyses semblent peu reproductibles. A l'inverse, les taux d'adduits avec la spermine sont plus élevés dans les échantillons incubés avec les enzymes de réparation que dans les échantillons témoins. Ceci pourrait être expliqué soit par un manque de reproductibilité des analyses, soit par une dégradation des adduits dans certaines conditions, notamment pendant le transport des échantillons d'ADN irradié pour l'étape d'incubation avec les enzymes.

D'après ces résultats qui restent néanmoins préliminaires, les *N*-glycosylases Fpg et OGG1 ne semblent pas capables d'exciser les adduits 8-put-dGuo et 8-spm-dGuo *in vitro*. Dans le cas de l'adduit 8-spd-dGuo, le test révèle une possible excision qui serait à confirmer. Celle-ci est cependant peu probable, si l'on considère le fait que l'adduit avec la putrescine, moins volumineux, n'est pas excisé. Ces expériences seront renouvelées avec plusieurs réplicats, afin d'obtenir des informations plus précises sur la réparation des adduits polyamines par le BER.

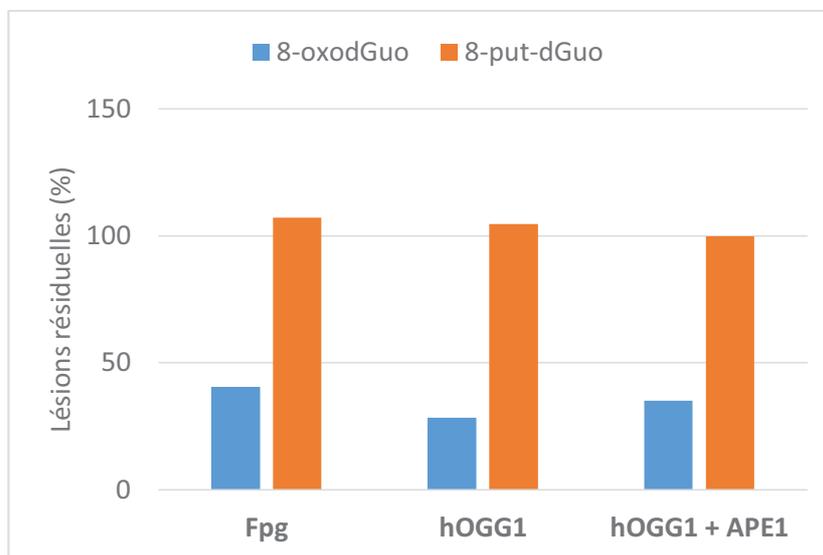


Figure 126 : Tests d'excision de la 8-oxodGuo et de l'adduit 8-put-dGuo par la Fpg (2h d'incubation) et par OGG1 (+/- APE1, 4h d'incubation). Les résultats sont exprimés en pourcentage du taux de lésions résiduelles par rapport au taux mesuré dans un échantillon incubé sans enzyme.

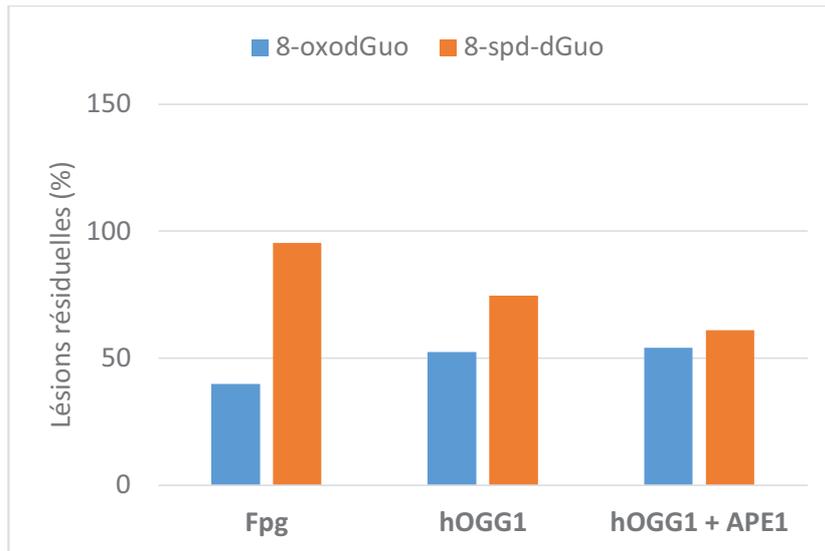


Figure 127 : Tests d'excision de la 8-oxodGuo et de l'adduit 8-spd-dGuo par la Fpg (2h d'incubation) et par OGG1 (+/- APE1, 4h d'incubation). Les résultats sont exprimés en pourcentage du taux de lésions résiduelles par rapport au taux mesuré dans un échantillon incubé sans enzyme.

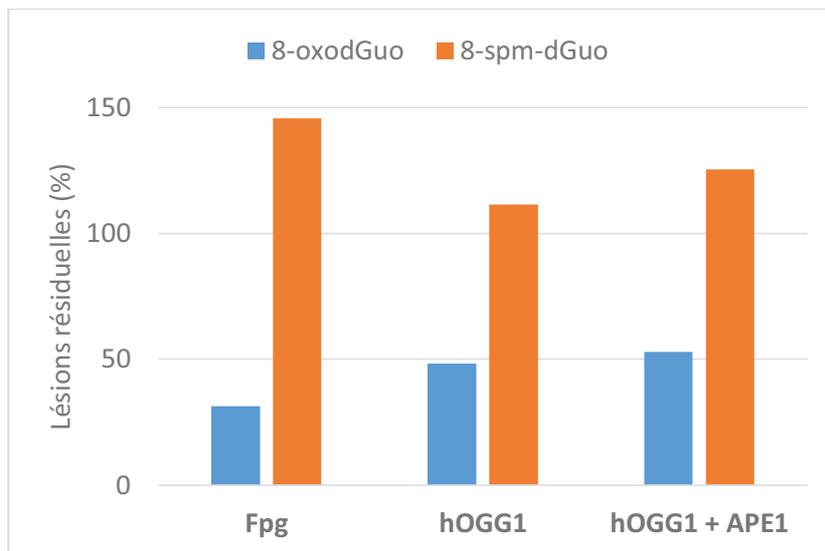


Figure 128 : Tests d'excision de la 8-oxodGuo et de l'adduit 8-spm-dGuo par la Fpg (2h d'incubation) et par OGG1 (+/- APE1, 2h d'incubation). Les résultats sont exprimés en pourcentage du taux de lésions résiduelles par rapport au taux mesuré dans un échantillon incubé sans enzyme.

9 Synthèse d'oligonucléotides modifiés

Cette partie est consacrée à la synthèse d'oligonucléotides comportant des adduits guanine-polyamines. Ce travail a été entrepris pour l'adduit 8-put-dGuo, et débute par la préparation du synthon, qui sera intégré par la voie des phosphoramidites. Ces oligonucléotides pourront par la suite être utilisés pour étudier les processus impliqués dans la réparation de ces lésions.

9.1 Stratégie de synthèse : intégration de la lésion par voie phosphoramidite

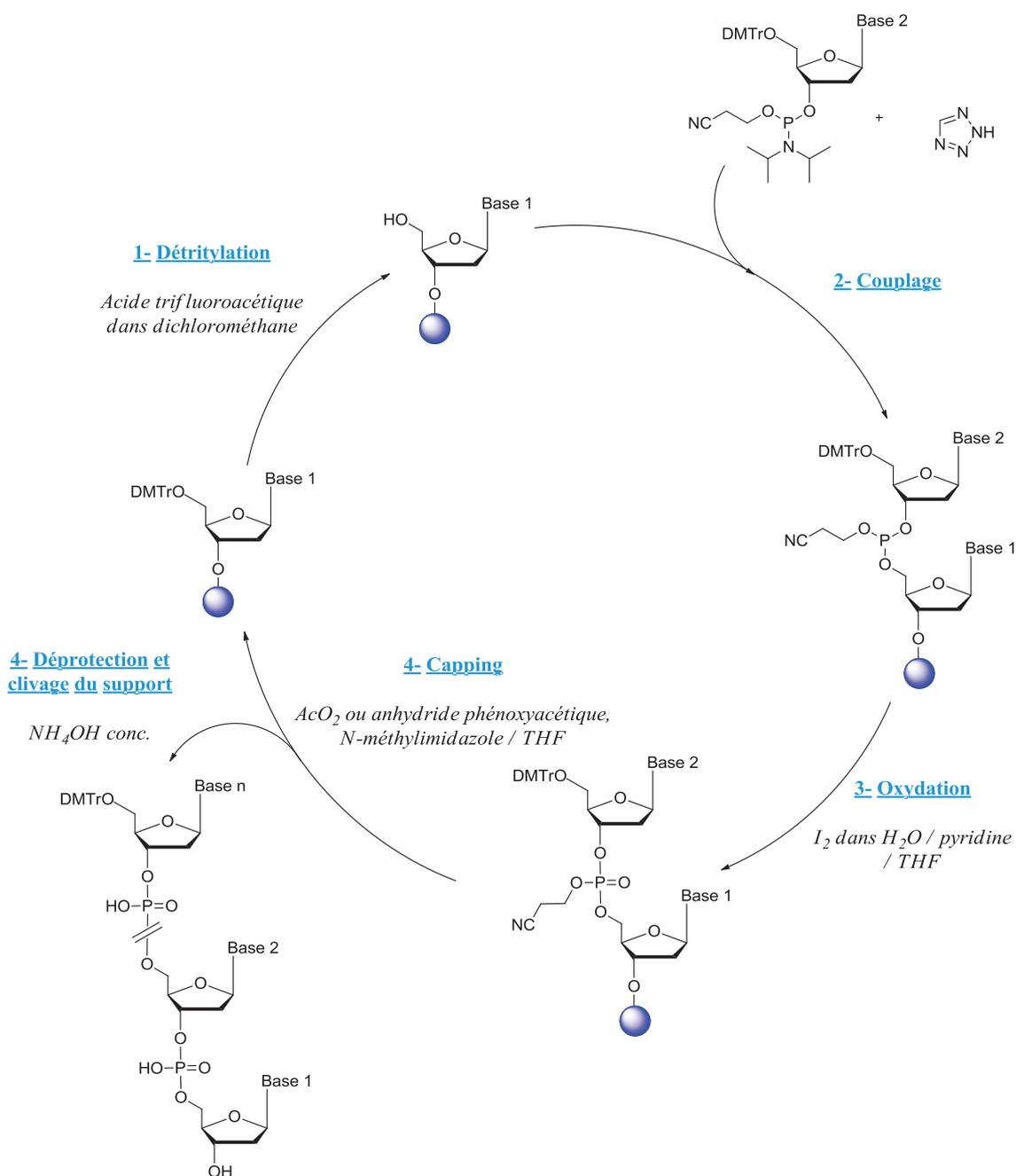


Figure 129 : Cycle de synthèse sur support solide d'oligonucléotides par la voie des phosphoramidites.

Les oligonucléotides modifiés sont synthétisés sur support solide par la voie des phosphoramidites. Le principe du cycle de synthèse automatisé est représenté dans la Figure 129. Le premier nucléotide est fixé sur le support par l'hydroxyle en 3' puis la synthèse s'effectue dans le sens 3' vers 5', c'est-à-dire dans le sens inverse de la biosynthèse naturelle. Les nucléotides sont ajoutés un à un, en cycles successifs. La chaîne oligonucléotidique est allongée par création d'une liaison phosphotriester entre la fonction 5'-hydroxyle d'un nucléotide n et le groupement 3'-phosphoramidite d'un nucléotide $n+1$. Le cycle de synthèse peut être résumé en 4 étapes successives (160).

- **La détritvlation** : le groupement protecteur diméthoxytrityle est clivable en milieu acide. Cette étape est réalisée par l'acide trifluoroacétique et permet de déprotéger sélectivement l'hydroxyle en 5' sans altérer la fixation au support.
- **Le couplage** : le nucléotide suivant est inséré par réaction avec l'hydroxyle en 5' qui a été déprotégé. Le couplage nécessite une activation du phosphoramidite du synthon par le tétrazole : celui-ci substitue l'isopropylamine pour former une espèce tétrazolium hautement réactive.
- **L'oxydation** : le phosphite trivalent, instable, est oxydé en phosphate pentavalent. Cette étape s'effectue par une solution d'iode dans un mélange eau/pyridine/THF.
- **Le capping** : les fonctions 5'-hydroxyle n'ayant pas réagi au cours de la synthèse sont désactivées par estérification par l'anhydride phénoxyacétique.

La chaîne oligonucléotidique est allongée en répétant ces 4 étapes jusqu'à l'obtention de la séquence complète. Le rendement de chaque cycle est d'environ 97- 98%, mais peut varier lors de l'intégration d'une lésion. La synthèse de termine par l'étape de **déprotection / clivage** : un traitement par l'ammoniaque concentrée permet d'hydrolyser les groupements cyanoéthyles et de cliver la liaison au support solide, libérant ainsi la chaîne oligonucléotique, et également les groupements alcali-labiles protégeant les fonctions réactives des bases.

9.2 Choix des groupements protecteurs

La synthèse d'oligonucléotides par la voie des phosphoramidites nécessite l'emploi de synthons substitués par le motif 2-cyanoéthyl-phosphoramidite sur l'hydroxyle en 3' et protégés en 5' par un groupement acido-labile, classiquement le diméthoxytrityle. Dans le cas de l'adduit 8-put-dGuo, l'amine primaire de la putrescine ainsi que l'amine exocyclique devront également être protégées. Ces protections doivent être clivées lors de l'étape de déprotection par l'ammoniaque concentrée à la fin de la synthèse. Nous avons donc choisi des groupements acétyles, alcalilabiles. La structure du synthon protégé est représentée dans la Figure 130.

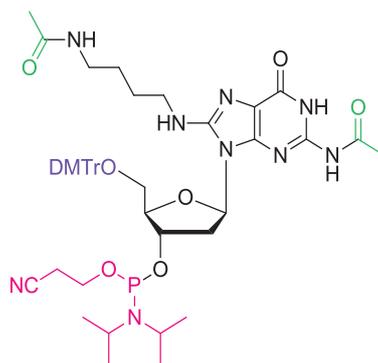


Figure 130 : Structure du synthon phosphoramidite de l'adduit 8-put-dGuo.

Afin de valider cette approche, il est nécessaire de vérifier la stabilité de l'adduit guanine-putrescine, dans les conditions qui seront utilisées pour la déprotection. Un premier test de stabilité est réalisé en milieu basique, afin de mimer l'étape de déprotection/clivage. Une solution de standard à 200 μ M de l'adduit 8-put-dGuo non protégé est incubée dans de l'ammoniaque à 30% pendant 15 heures. La réaction est suivie par HPLC-UV, en estimant la dégradation du composé grâce à l'évolution de l'aire du pic correspondant. Les résultats obtenus dans ces conditions ne montrent pas de dégradation de l'adduit. Une expérience similaire est réalisée en milieu acide, avec un traitement par l'acide trifluoroacétique à 1%, utilisé lors de la première étape du cycle de synthèse pour déprotéger le diméthoxytrityle. La cinétique de dégradation de l'adduit 8-put-dGuo est représentée dans la Figure 131, accompagnée des cinétiques de formation des 3 produits de dégradation correspondant aux 3 pics principaux observés sur le chromatogramme. A noter que le produit de dégradation 1 est déjà présent avant le traitement acide, et provient vraisemblablement d'un problème de conservation. La dégradation est estimée à 20% environ après 2 heures de traitement acide. Les produits de dégradation n'ont pas été identifiés, mais l'un d'entre eux est certainement issu d'une réaction de dépurination.

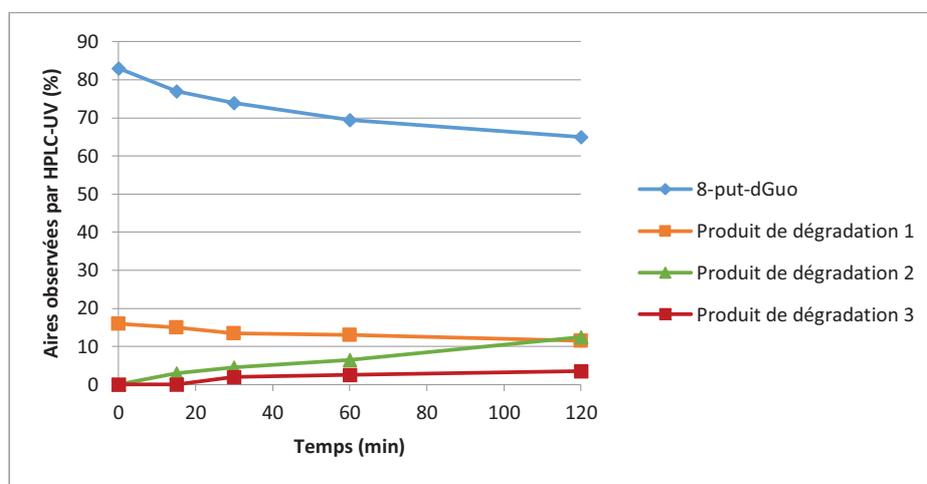


Figure 131 : Test de stabilité de l'adduit 8-put-dGuo en milieu acide. Le composé est traité par l'acide trifluoroacétique à 1%. La réaction est suivie par HPLC-UV. Les cinétiques représentent l'évolution des aires de 4 pics majoritaires observés sur le chromatogramme.

Aux vues des résultats obtenus lors du test de stabilité en milieu basique, l'étape de déprotection/clivage par l'ammoniaque ne devrait pas perturber considérablement la structure de l'adduit 8-put-dGuo. L'utilisation de groupements acétyle pour la protection des amines est compatible avec cette lésion. D'autre part, la stabilité en milieu acide n'est pas totale, mais reste cependant acceptable dans les conditions utilisées : en effet lors de la synthèse l'étape de détritulation est relativement courte ; de plus la stabilité de l'adduit peut être meilleure après intégration dans une séquence oligonucléotidique. Ces observations nous permettent donc de valider l'approche envisagée pour le choix des groupements protecteurs.

9.3 Rétrosynthèse

L'étape clef de cette synthèse est le couplage entre la putrescine et la 8-bromo-2'-désoxyguanosine protégée. Ce couplage peut être envisagé selon 2 approches (Figure 132) :

- la réaction entre les 2 composés acétylés (**voie 1**), qui nécessite une monoacétylation de la putrescine au préalable. Cette approche présente l'avantage de faciliter la purification du produit issu du couplage.
- le couplage avant acétylation (**voie 2**). Par cette stratégie, l'amine exocyclique et l'amine primaire de la putrescine sont acétylées en une seule étape ; cependant la purification du produit de couplage risque d'être plus délicate : l'existence de liaisons faibles entre la putrescine et les silanols rend la purification par colonne de silice difficilement réalisable, une alternative à cette technique de purification devra donc être envisagée.

Pour effectuer ces réactions de couplage et d'acétylation, le nucléoside est protégé au niveau du 2-désoxyribose par des groupements silylés, qui pourront être clivés de façon sélective par le fluorure de tétrabutylammonium. Le synthon sera ensuite obtenu par la protection en 5' suivie de la fonctionnalisation en 3' par le motif phosphoramidite.

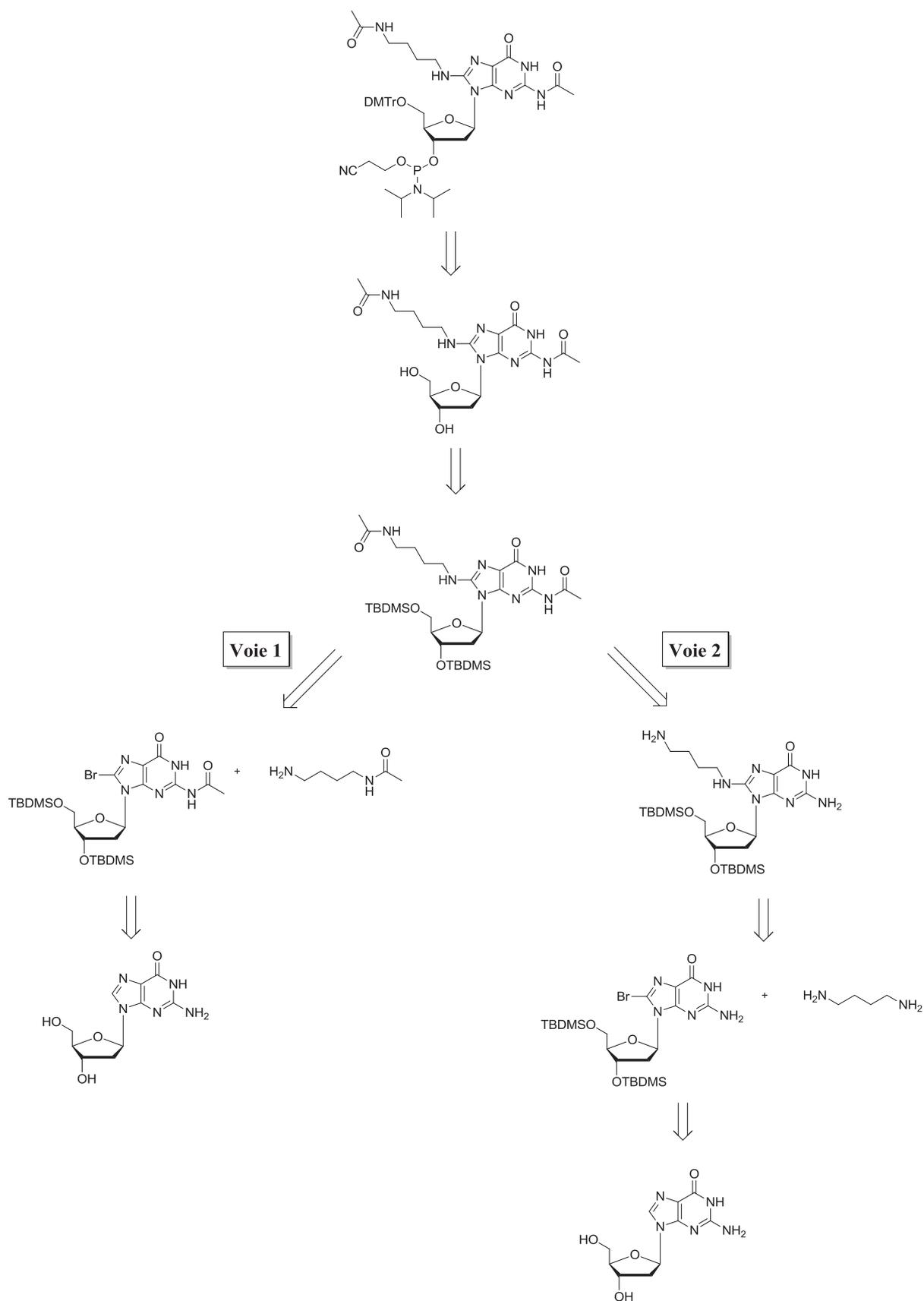


Figure 132 : Stratégie de synthèse envisagée pour le synthon phosphoramidite de l'adduit 8-put-dGuo.

9.4 Synthèse du synthon phosphoramidite par la voie 1

La réaction entre un composé diaminé et un agent d'acétylation conduit préférentiellement au dérivé diacétylé. L'utilisation d'un large excès de composé diaminé n'est pas toujours favorable à la monoacétylation. En 2008 Tang et Fang ont décrit une méthode de monoacétylation des diamines symétriques en conditions aqueuses (161). Cette approche a été adoptée pour la synthèse de la putrescine acétylée (Figure 133). L'agent d'acétylation utilisé est l'acétate d'éthyle. Le composé monoacétylé est purifié par colonne de silice avec un rendement de 47%.

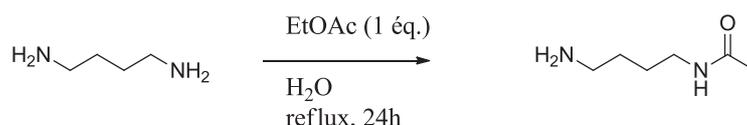


Figure 133 : Monoacétylation de la putrescine (161).

La 2'-désoxyguanosine est bromée en position C8 par le NBS d'après la procédure décrite dans le paragraphe 2 de ce chapitre (Figure 134).

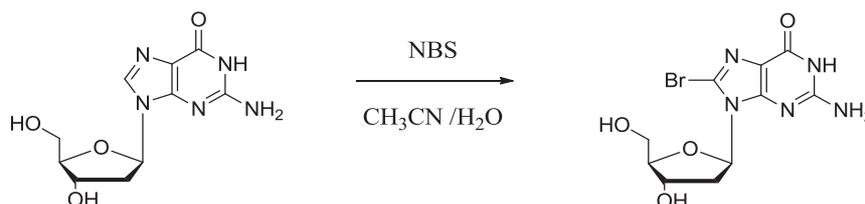


Figure 134 : Bromation de la 2'-désoxyguanosine par le N-Bromosuccinimide.

Le désoxyribose est ensuite protégé au niveau des positions 3' et 5' par des groupements TBDMS (Figure 135). Cette réaction s'effectue par le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle en présence d'imidazole, d'après le protocole de Gillet *et al.* (151). Le produit diprotégé est ensuite purifié par colonne de silice avec un rendement de 63%.

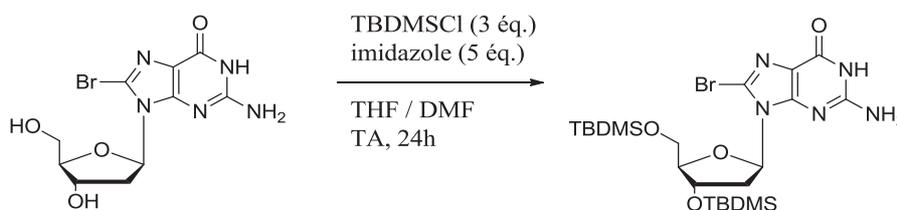


Figure 135 : Protection du 2-désoxyribose par silylation en 3' et en 5'.

La 8-Br-dGuo silylée est ensuite acétylée au niveau de l'amine exocyclique par l'anhydride acétique (Figure 136). Ces conditions ont été décrites par Nechev *et al.* (162). Le nucléoside acétylé est obtenu avec un rendement de 59% après purification par colonne de silice.

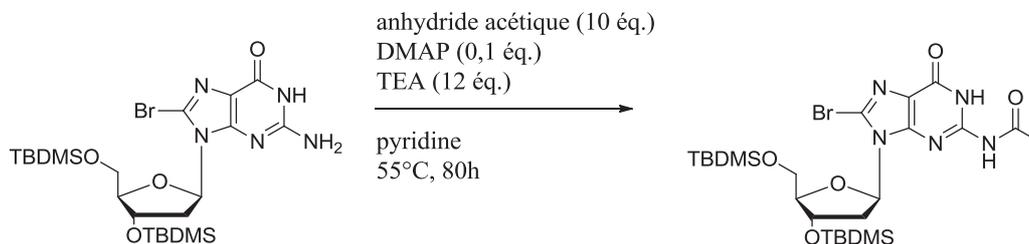


Figure 136 : Acétylation de la 8-bromo-2'-désoxyguanosine protégée.

Le nucléoside protégé est ensuite couplé avec la putrescine monoacétylée (Figure 137). Cette réaction a été réalisée avec différents solvants (DMSO, DMF, pyridine). L'emploi de triéthylamine est proscrit car cela risque de cliver les groupements acétyle. Les conditions testées ne nous ont pas permis d'obtenir le produit attendu. La principale difficulté rencontrée réside dans le choix d'un solvant favorable à la substitution nucléophile et permettant de solubiliser le nucléoside et la putrescine acétylée.

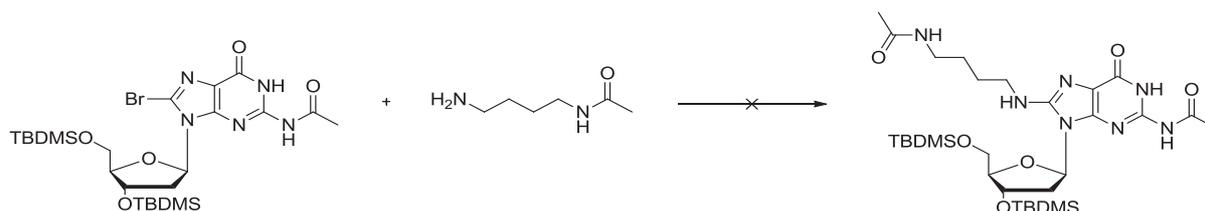


Figure 137 : Réaction de couplage avec la putrescine acétylée.

9.5 Synthèse du synthon phosphoramidite par la voie 2

Les tentatives de couplage entre le nucléoside et la putrescine après acétylation se sont révélées infructueuses ; une 2^e stratégie a donc été envisagée. Nous avons choisi d'effectuer le couplage avant l'acétylation, en utilisant la pyridine comme solvant (Figure 138).

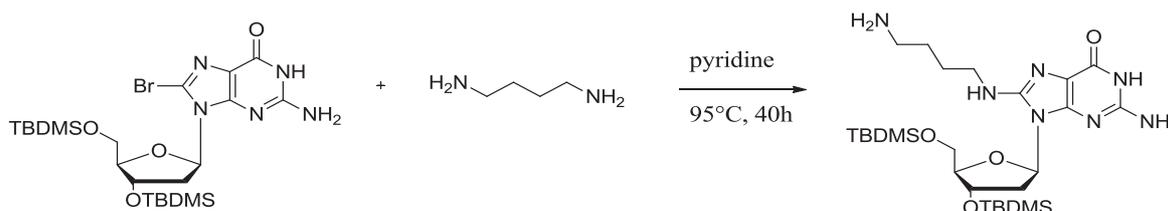


Figure 138 : Réaction de couplage avant acétylation.

La réaction est suivie par HPLC-UV. Le brut réactionnel est analysé par HPLC-MS/MS (Figure 139) : le chromatogramme obtenu en mode MS1 comporte un pic à 11,4 minutes présentant un rapport m/z correspondant au composé protoné attendu (m/z= 582).

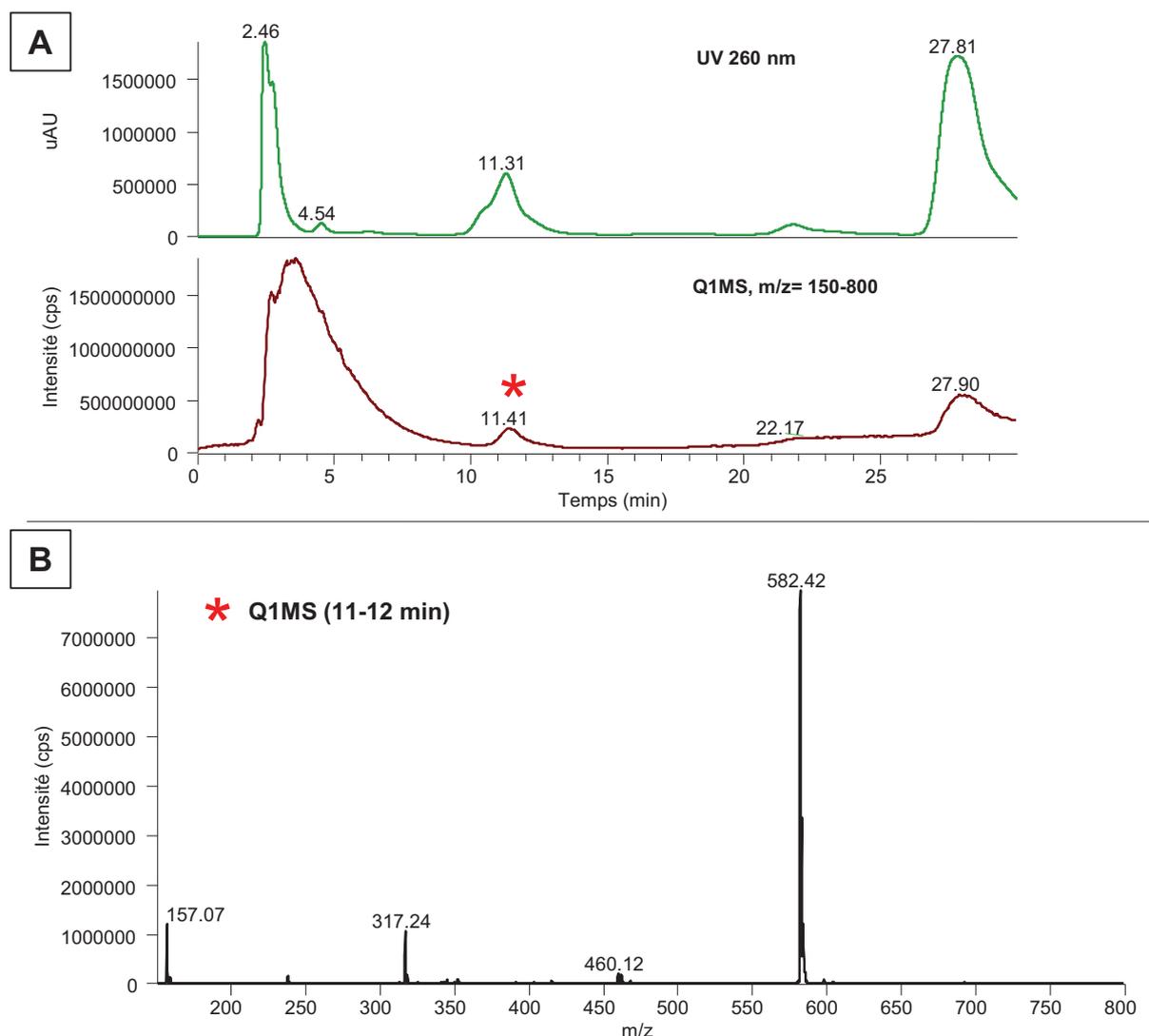


Figure 139 : Couplage avec la putrescine : analyse du brut réactionnel par HPLC-MS/MS. A : Chromatogrammes obtenus avec détection UV à 260 nm (partie haute) et détection en mode Q1MS (partie basse). B : Spectre Q1MS des ions détectés entre 11 et 12 minutes.

Le produit de couplage est purifié par HPLC phase inverse avec une phase stationnaire constituée de silice greffée C18. Le chromatogramme obtenu par détection UV est représenté dans la Figure 140. Le composé substitué par la putrescine est élué à 12,5 minutes. Le nucléoside en excès, moins polaire, est élué pendant le rinçage de la colonne. Cette technique de purification permet d'isoler une faible quantité d'adduit (~100 nmoles) pour réaliser la caractérisation par spectrométrie de masse et ainsi valider la méthode de synthèse. Cependant pour la suite de la synthèse, des quantités plus importantes seront nécessaires (au moins 1 mmole pour l'optimisation); la purification doit donc être adaptée à une plus grande échelle. Des tentatives d'optimisation de la purification par colonne ouverte ont été réalisées,

mais celles-ci se sont révélées sans succès. L'étape suivante a donc été envisagée sur le brut réactionnel après traitement par extraction liquide/liquide.

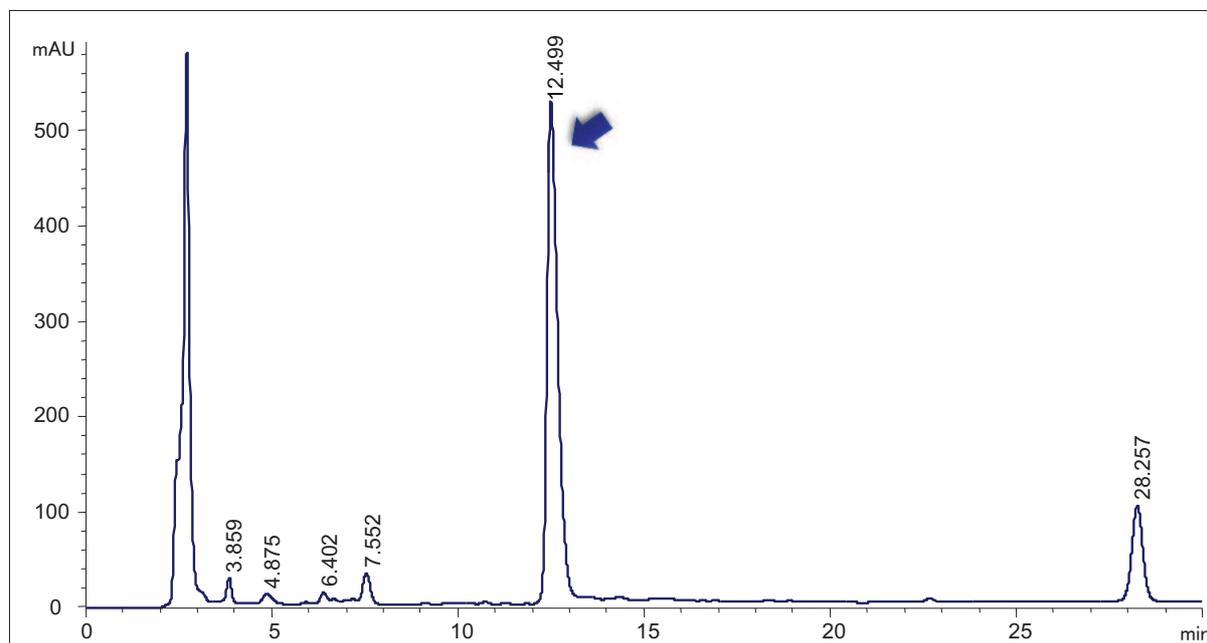


Figure 140 : Chromatogramme obtenu lors de la purification du produit de couplage avec la putrescine (détection UV à 260 nm).

Le traitement du brut réactionnel issu de l'étape de couplage est réalisé par extraction par l'acétate d'éthyle, afin d'éliminer la pyridine et la putrescine en excès. L'acétylation est ensuite effectuée selon la procédure décrite précédemment pour la protection du nucléoside (cf. paragraphe 9.4). Ces conditions nous ont permis d'identifier et de purifier le produit monoacétylé. Le composé portant 2 groupements acétylé n'a pas été obtenu.

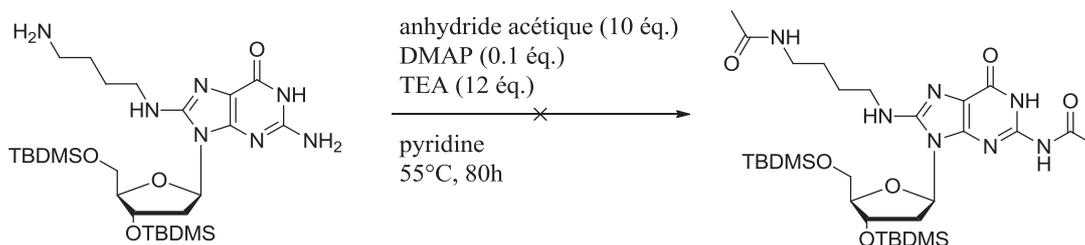


Figure 141 : Acétylation du produit de couplage.

La synthèse du synthon phosphoramidite de l'adduit 8-put-dGuo a fait l'objet de nombreuses étapes d'optimisation. Ces travaux ont permis d'isoler le produit de couplage entre le nucléoside protégé et la putrescine. Des difficultés ont été rencontrées lors du couplage avec la putrescine acétylée ; ceci peut s'expliquer par une modification de la réactivité de l'amine libre, en tant qu'espèce nucléophile, lors de l'introduction d'un acétyle sur l'amine opposée (161). Cette réaction a donc été réalisée sur la putrescine non protégée, avant acétylation. Le développement d'une méthode de purification à une plus grande échelle serait pertinente afin d'achever la substitution du synthon. L'intermédiaire que nous avons isolé nous permet de valider cette stratégie, qui pourra être transposée aux adduits avec la spermidine et la spermine.

10 Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre démontrent que les polyamines peuvent effectivement réagir avec le radical cation de la guanine en position C8 pour former des adduits. Grâce à la méthode de dosage par HPLC-MS/MS que nous avons développée, ces adduits ont été mis en évidence dans l'ADN isolé double brin. Nous avons ensuite recherché ces lésions dans l'ADN extrait de cellules THP1 exposées au rayonnement laser, puis dans l'ADN extrait de spermatozoïdes. Cette étude a nécessité une optimisation de la méthode de dosage, afin d'augmenter la sensibilité de détection et la reproductibilité des analyses. Les résultats préliminaires obtenus révèlent la présence de ces adduits dans l'ADN provenant des échantillons de spermatozoïdes non irradiés. Des expériences complémentaires ont ensuite été entreprises dans le but d'étudier les répercussions physiologiques de ces lésions et leur prise en charge par les systèmes de réparation.

Chapitre 6 :

Discussion

1 Les pontages ADN-protéines

Les pontages ADN-protéines sont des lésions volumineuses susceptibles de perturber certains processus physiologiques. De plus, ces lésions ne sont que partiellement prises en charge par les systèmes de réparation. L'étude des pontages ADN-protéines est complexe à entreprendre de par la grande diversité des structures envisageables. Il existe potentiellement un grand nombre d'agents inducteurs de ces dommages et, de ce fait, de nombreux mécanismes de formation. Le mécanisme a été élucidé pour certains agents inducteurs, par exemple le formaldéhyde ou le cis-platine. En ce qui concerne les pontages provenant d'un mécanisme oxydatif, de nombreuses questions persistent. Dans cette étude nous nous sommes concentrés sur les pontages issus d'une oxydation à un électron de l'ADN.

L'oxydation à un électron est impliquée dans la formation de nombreux dommages à l'ADN. La guanine (ainsi que son principal produit d'oxydation la 8-oxoguanine) constitue le site préférentiel pour cette réaction. Les lésions étudiées dans ce travail de thèse impliquent la guanine, sous la forme d'un radical cation issu d'une oxydation à un électron. Il a été démontré que si l'oxydation se produit au niveau d'une autre base de l'ADN, un transfert électronique peut survenir de la guanine vers un autre radical cation, ce qui aboutit également au radical $G^{\circ+}$ (163).

Parmi les espèces nucléophiles capables de s'ajouter sur le radical cation de la guanine, l'acide aminé lysine a fait l'objet de cette partie du projet. Les travaux réalisés précédemment au laboratoire (46) ont permis de mettre en évidence l'addition nucléophile d'un résidu lysine, par une fonction amine, au niveau du radical cation de la guanine, conduisant à un adduit guanine-lysine. Ce pontage se produit par exemple lors d'une photo-oxydation de type I, dans des conditions favorables à la formation des radicaux cations de la guanine. L'étude a été réalisée sur un oligonucléotide de 3 bases de long « TGT » donc simple brin, avec un peptide trilycine. Des expériences complémentaires ont permis de confirmer l'implication de l'acide aminé central du tripeptide, et donc de l'amine ϵ . Le mécanisme décrit pour l'acide aminé lysine pourrait potentiellement exister pour d'autres acides aminés comportant des groupements nucléophiles, tels que la sérine, l'arginine ou bien la cystéine.

L'objectif de ce travail de thèse a donc été de poursuivre l'étude de l'adduit lysine-guanine, et de démontrer qu'il pouvait se former dans l'ADN isolé double brin par le même mécanisme que celui observé dans un court oligonucléotide. Nous avons ensuite mis en évidence la présence de cet adduit dans l'ADN extrait de cellules irradiées par laser.

Nous avons tout d'abord entrepris de synthétiser l'adduit lysine-guanine sous la forme d'un monomère 8-lysine-2'-désoxyguanosine (8-lys-dGuo). La principale difficulté rencontrée lors de cette synthèse est due à l'existence de 2 isomères possibles, provenant de l'addition nucléophile de l'amine α ou de l'amine ϵ . L'analyse structurale par RMN du produit purifié fournit des arguments en faveur d'une structure présentant un pontage avec l'amine ϵ qui de plus présente la plus forte nucléophilicité. Cet isomère est

en fait le seul potentiellement impliqué dans les pontages ADN-protéines. Les expériences réalisées dans l'ADN cellulaire ont permis de confirmer cette structure. Le standard 8-lysine-guanine (8-lys-Gua) est obtenu par hydrolyse acide de 8-lys-dGuo.

La synthèse des adduits avec la sérine et l'arginine a été envisagée, mais ces adduits n'ont pas pu être obtenus. Dans le cas de l'arginine, la réaction entre la 8-bromo-dGuo et l'acide aminé peut également conduire à 2 isomères ; l'addition nucléophile pouvant impliquer l'amine α ou un groupement NH_2 de la fonction guanidine. Dans une chaîne peptidique, la seule amine libre et donc disponible pour effectuer un pontage, est celle de la fonction guanidine. L'isomère comportant un pontage avec l'amine α a été isolé ; la structure a en effet été identifiée par spectrométrie de masse : l'ion pseudomoléculaire se fragmente en α de la fonction guanidine. L'isomère attendu n'a pas pu être obtenu, probablement du fait de la plus faible nucléophilicité du groupement guanidino. Il pourra donc être envisagé de synthétiser l'adduit avec l'arginine à partir de l'acide aminé protégé au niveau de l'amine α . Dans le cas de l'adduit avec la sérine, des essais de synthèse ont été effectués en protégeant la fonction amine α , mais la nucléophilie de l'alcoolate reste assez faible ; ces tentatives se sont donc révélées infructueuses. L'autre stratégie envisageable et d'utiliser l'approche utilisée par Sandrine Perrier, en générant par photosensibilisation un adduit entre un court oligonucléotide comportant une seule guanine et un peptide comportant une arginine ou une sérine à la place de la lysine. A noter que des résultats préliminaires montrant l'efficacité de cette approche ont été obtenus (résultats non publiés). Cependant cette approche ne permet pas l'obtention d'une grande quantité de produit et il serait donc préférable de développer une méthode de synthèse chimique.

Deux méthodes de quantification ont été développées, pour l'adduit sous la forme de nucléoside modifié (8-lys-dGuo) et pour celui sous la forme de base modifiée (8-lys-Gua). L'HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem représente une technique analytique de choix, car elle permet la détection de quelques lésions par million de bases, et ce en utilisant une quantité d'ADN très réduite (environ 10 μg). De plus elle présente une grande spécificité et le temps d'analyse par échantillon reste modéré.

Ces méthodes optimisées présentent des limites de détection de 50 fmoles environ pour 8-lys-dGuo et de l'ordre d'une fmole pour 8-lys-Gua. En pratique, la méthode d'analyse de 8-lys-Gua permet de détecter moins de 0,1 modification par million de bases (en utilisant environ 10 μg d'ADN), ce qui correspond à une sensibilité tout à fait appropriée pour envisager l'étude de ces lésions à l'échelle cellulaire.

Les dosages dans l'ADN isolé extrait de thymus de veau ont été réalisés après hydrolyse enzymatique de l'ADN. Les adduits ont été quantifiés sous la forme de nucléosides modifiés « 8-lys-dGuo » suite à l'exposition à différentes sources de stress oxydant, en présence de lysine : la photo-oxydation de type I et le rayonnement ionisant (rayonnement γ). Les expériences réalisées ont révélé une augmentation du

taux de 8-lys-dGuo dans ces 2 conditions. Ces résultats permettent de confirmer que le mécanisme décrit précédemment dans un oligonucléotide simple brin peut également se produire dans l'ADN double brin. La lysine peut donc s'ajouter sur le radical cation de la guanine pour former des adduits *in vitro*. La présence de lysine provoque également une forte diminution de la formation de 8-oxodGuo. Il existe probablement une compétition entre l'addition nucléophile de l'eau sur le radical cation, qui conduit à la 8-oxodGuo, et celle de la lysine. Il est également pertinent de prendre en considération la concentration en lysine à proximité de la molécule d'ADN, qui peut localement être très élevée. Les expériences présentées dans ce travail ont été réalisées dans l'eau comme milieu d'irradiation, la lysine est donc présente sous sa forme protonée et peut donc former des liaisons faibles avec les phosphates de l'ADN. Cet effet a d'ailleurs été mis en évidence par l'expérience d'irradiation réalisée en présence du tripeptide KKK dans un tampon phosphate : l'utilisation du tampon diminue le taux de formation de l'adduit car il modifie probablement la répartition du tripeptide dans la solution, parce qu'il existe une compétition entre les paires d'ions se formant avec les charges négatives de l'ADN et celles du tampon.

Nous avons cherché à déterminer si les pontages ADN-protéines pouvaient se produire dans des cellules par réaction entre un résidu lysine et une guanine lors d'une oxydation à un électron. Dans ce but, l'adduit lysine-guanine sous la forme de base modifiée (8-lys-Gua), a été dosé après hydrolyse acide de l'ADN cellulaire. Nous avons démontré que cette étape d'hydrolyse permettait d'isoler l'adduit à partir d'un pontage ADN-tripeptide.

L'adduit 8-lys-Gua a été détecté lors de l'exposition au rayonnement laser. Les autres conditions de traitement utilisées (photosensibilisation, exposition au rayonnement ionisant) ne nous ont pas permis de mettre en évidence la formation de cette lésion dans l'ADN. Il est cependant possible que celle-ci se forme dans ces conditions, à des taux inférieurs à la limite de détection, qui est estimée entre 0,05 et 0,1 lésions par million de bases. Les conditions utilisées lors de l'exposition au rayonnement laser sont très favorables à la formation de radicaux cations de la guanine. Les taux d'adduits 8-lysine-guanine sont cependant 300 fois moins élevés que ceux de la 8-oxodGuo. Si l'on transpose ce ratio aux expériences de photosensibilisation ou d'irradiation γ , où les taux de 8-oxodGuo observés aux doses d'irradiation les plus élevées sont respectivement d'environ 8 et 5 lésions par millions, on peut supposer que les taux de l'adduit lysine-guanine se situent effectivement en dessous de la limite de détection. Pour ce qui concerne l'irradiation laser, il est intéressant de noter que le taux de formation de l'adduit Lys-Gua est similaire au taux de formation de l'adduit Thd-Gua qui a été récemment mesuré dans des cellules exposées au rayonnement laser bi-photonique (86). Ceci indique donc que l'addition nucléophile de la lysine sur le radical cation de la guanine est aussi efficace que l'addition nucléophile d'une thymine adjacente. Par contre, il faut noter que l'addition nucléophile de l'eau, produisant la 8-oxodGuo reste très nettement supérieure (environ 2 ordre de grandeur).

Nous avons ensuite envisagé de quantifier les pontages ADN-protéines totaux produits dans les conditions associées à la formation d'adduits 8-lysine-guanine. Nous avons vu en introduction qu'il existait de nombreuses méthodes de détection des pontages ADN-protéines. La méthode des comètes a été choisie en premier lieu. Cette technique est largement utilisée au laboratoire pour la détection des cassures simple ou double-brins et des sites alcali-labiles. Différents travaux ont révélé qu'elle pouvait être utilisée pour étudier les pontages ADN-protéines. En effet ces dommages influent sur la migration de l'ADN lors de l'électrophorèse. Dans la méthode décrite par Merk *et al.* (39,40), une étape d'incubation avec la protéinase K est réalisée avant l'électrophorèse afin de pouvoir attribuer la variation de la migration observée à la présence de pontages ADN-protéines. Nous avons donc adapté cette méthode afin d'étudier les pontages formés lors de l'irradiation laser de cellules THP1. L'électrophorèse est effectuée en conditions alcalines.

Lors des expériences que nous avons entreprises, le « tail moment » augmente avec la dose d'irradiation, et aucune différence significative entre les échantillons incubés ou non avec la protéinase n'a pu être observée. Il est probable que les pontages ADN-protéines ne représentent qu'une faible proportion des dommages présents dans ces échantillons. Par cette hypothèse, leur effet sur la migration ne serait pas décelable parmi celui des autres lésions. Ce test ne permet donc pas de conclure sur la présence de pontages ADN-protéines dans ces échantillons. A noter que la méthode des comètes constitue une technique de détection sensible, mais peu spécifique des dommages étudiés. L'équipe de Merk *et al.* a proposé une variante du test des comètes, en réalisant l'électrophorèse en conditions neutres (40). Cette variante est considérée comme moins sensible pour la détection des cassures de brins ou des sites alcali-labiles, elle est donc susceptible d'apporter une meilleure spécificité pour la détection des pontages ADN-protéines, et pourrait être envisagée pour la suite de ces travaux.

Les pontages produits lors de l'exposition au rayonnement laser ont également été étudiés par une technique de détection reposant sur le marquage à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Le FITC est un fluorochrome qui réagit avec les fonctions amines primaires et permet donc de marquer sélectivement les protéines liées à l'ADN. Le marquage au FITC a été utilisé par l'équipe de Hiroshi Ide pour l'étude des pontages ADN-protéines, par différentes méthodes :

- la visualisation des pontages par électrophorèse sur gel d'agarose (41),
- la quantification des pontages par fluorimétrie (10),
- la quantification par Western Blot couplé à une détection par chimiluminescence (10).

Dans notre étude, nous avons entrepris de mettre en place les conditions décrites pour la quantification par fluorimétrie après le marquage des protéines. Les résultats obtenus lors de cette expérience sont très peu reproductibles et ne permettent pas de conclure sur la présence de pontages. Il est important de considérer que cette méthode de détection requiert au préalable une purification de l'ADN très efficace afin de s'affranchir des protéines libres, ou liées à l'ADN de façon non covalente. Dans les conditions décrites par Shoulkamy *et al.* (10), la purification de l'ADN cellulaire est réalisée par plusieurs cycles d'ultra-centrifugation par gradient de densité sur chlorure de césium. Il est donc très probable que les

conditions d'extraction d'ADN que nous avons utilisées ne permettent pas d'éliminer totalement les protéines libres, ce qui rend les résultats obtenus lors de la quantification par fluorimétrie difficilement interprétables.

Bien que les pontages ADN-protéines n'aient pu être quantifiés à l'aide d'une méthode de détection directe ou indirecte décrite dans la littérature, nous avons mis en évidence la formation d'adduits entre la guanine et la lysine après irradiation de cellules THP1 par des pulses laser à 266 nm. Ces adduits à eux seuls témoignent de la présence de ces pontages, et permettent en outre d'identifier la structure chimique de la liaison covalente entre ADN et protéines. Il serait néanmoins intéressant de pouvoir corrélérer les taux d'adduits lysine-guanine mesurés par HPLC-MS/MS avec ceux des pontages ADN-protéines totaux afin de savoir parmi tous les pontages, quel est le pourcentage de ceux qui impliquent une liaison Lys-Gua. Si ce pourcentage est faible il serait alors intéressant de déterminer quels sont les autres mécanismes mis en jeu.

Ainsi, cette partie du projet a permis de mettre en évidence pour la première fois la formation de pontages ADN-protéines par réaction d'un acide aminé nucléophile sur le radical cation de la guanine, produit lors d'une oxydation à un électron de l'ADN. Nous avons étudié le cas de l'acide aminé lysine, qui est présent en forte proportion dans les histones, et en particulier dans des régions impliquées dans les interactions ADN-nucléosome.

L'étude des pontages ADN-protéines a été poursuivie par la mise en place de modèles de pontage entre un peptide et un oligonucléotide. L'objectif est de former des pontages covalents entre les 2 molécules, et de caractériser le produit obtenu. Ceci implique d'utiliser si possible de courts peptides et oligonucléotides, afin de faciliter l'analyse des produits générés. Nous avons tout d'abord étudié un modèle constitué d'un peptide comportant un doigt de zinc et d'un fragment d'ADN double brin de 12 bases de long. La constante d'affinité pour de ces 2 molécules se situe aux alentours du millimolaire. Les expériences entreprises par gel shift n'ont pas permis de visualiser la formation du complexe. Ceci peut être expliqué par une trop faible affinité du peptide pour le duplex. Des pontages covalents ont cependant été mis en évidence après photosensibilisation par la riboflavine. Les rendements de pontage observés par électrophorèse sur gel dénaturant sont cependant très faibles. Après purification (par gel préparatif puis par HPLC), la caractérisation des produits de pontage a été entreprise, mais celle-ci ne nous a pas permis d'identifier la nature chimique du pontage. Il serait nécessaire de disposer d'une plus grande quantité de produit purifié et pour cela d'améliorer le rendement de cette réaction. On peut supposer que l'utilisation d'un système présentant une meilleure constante d'affinité produise un meilleur rendement de pontage lors de l'irradiation. D'après les données présentes dans la littérature, la présence de 2 ou 3 doigts de zinc est associée à une meilleure affinité pour la séquence d'ADN consensus. En 2009, Nomura et *al.* ont synthétisé un peptide comportant 2 doigts de zinc, avec une constante d'affinité de l'ordre du micromolaire pour un duplex oligonucléotidique de 11 bases (164).

D'après Shi et Berg (165), la constante d'affinité du facteur de transcription Sp1, dont le domaine de liaison à l'ADN comporte 3 doigts de zinc, est de l'ordre du nanomolaire. Il serait donc envisageable dans ce cas de concevoir un autre modèle avec un peptide comportant plusieurs doigts de zinc.

Le 2^e modèle envisagé est constitué de la thrombine et de l'aptamère 15-mer correspondant. Pour ce système, la constante d'affinité est plus élevée (de l'ordre du nanomolaire). Le complexe n'est pas observé par gelshift, car il est certainement dégradé lors de la migration. Il est cependant détectable par électrophorèse capillaire. L'irradiation des complexes par un pulse laser à 1000 mJ/cm² est associé à la formation d'adduits lysine-guanine qui ont été détectés par HPLC-MS/MS.

Le dernier modèle présenté dans ces travaux est formé de la protéine SSB et d'un aptamère de 49 bases. La séquence de l'oligonucléotide comporte 39% de guanine, avec 4 motifs de 2 guanines adjacentes. La formation des complexes est également étudiée par électrophorèse capillaire. L'affinité entre les 2 molécules est telle que l'analyse en conditions dénaturantes ne permet pas de visualiser la dissociation du complexe. L'exposition de ces complexes à un pulse laser s'accompagne également de la formation d'adduits lysine-guanine.

Les données présentes dans la littérature suggèrent que pour ces 2 derniers systèmes, certains acides aminés de type lysine jouent un rôle dans la liaison de la protéine à l'ADN. On peut donc supposer que ces résidus sont spatialement proches de l'ADN ce qui pourrait favoriser la formation d'un pontage faisant intervenir la lysine lors de l'oxydation à un électron.

Cependant il est certain que l'efficacité de la formation d'un pontage covalent va entièrement dépendre de l'environnement dans lequel se trouvera le radical cation de la guanine, et en particulier de la présence d'acides aminés nucléophiles. De plus, la présence d'acides aminés ayant un potentiel d'oxydation plus bas que celui de la guanine va elle avoir tendance à réduire la formation de ces pontages en « réparant » le radical cation de la guanine. Il semble donc difficile de prédire qu'elle sera l'efficacité de pontage pour tel complexe ADN-protéine, et donc seule une approche empirique peut nous permettre de trouver le bon modèle.

2 Les pontages ADN-polyamines

Les polyamines sont des petites molécules cationiques qui interagissent avec l'ADN et influencent sa conformation. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence un certain nombre de propriétés des polyamines associées à leur interaction avec l'ADN, notamment :

- la compaction et la régulation de la condensation de l'ADN,
- les transitions conformationnelles,
- la protection de la double hélice...

Cependant, le mécanisme exact de cette interaction n'est pas totalement élucidé. Différents modèles ont été proposés. Les molécules de polyamines peuvent interagir directement avec l'ADN par interaction ionique entre les amines protonées à pH physiologique et les groupements anioniques de l'ADN. L'équipe de D'Agastino a décrit un modèle reposant sur la formation de structures macrocycliques par interaction des polyamines entre elles grâce à des groupements phosphate; ces macrocycles se lient à l'ADN pour construire une structure qui l'enveloppe et le protège (93,94,96,97,166). D'après D'agastino *et al.* ces agrégats nucléaires constituent la forme biologiquement active par laquelle les polyamines exercent leur effet protecteur (94). Les polyamines sont présentes dans toutes les cellules de l'organisme au niveau du noyau. Leur présence dans le sperme, ainsi que leur implication dans les fonctions reproductrices mâles, ont été largement décrites (92).

Le stress oxydant provient d'un déséquilibre entre les radicaux libres produits par la cellule ou d'origine exogène, et les défenses anti-oxydantes disponibles. Il s'agit probablement d'une cause importante d'infertilité masculine (167). Les radicaux libres oxygénés peuvent altérer la membrane des spermatozoïdes, qui est très riche en acides gras polyinsaturés, mais également la chromatine (168,169). L'étude des interactions des polyamines avec l'ADN des spermatozoïdes est donc pertinente, dans le but de mieux appréhender leur rôle dans les fonctions reproductrices, ainsi que les dommages à l'ADN dans lesquels elles peuvent être impliquées. En effet, ces molécules sont de bons candidats nucléophiles qui peuvent potentiellement réagir avec le radical cation de la guanine. On peut donc s'interroger sur la possible formation d'adduits en position C8 de la guanine. Ces adduits pourraient en outre constituer des marqueurs du stress oxydant et de l'oxydation à un électron de l'ADN, car ils ne sont produits que par ce mécanisme. A l'opposé la 8-oxodGuo, qui est un très bon marqueur du stress oxydant, a été très utilisée pour cette propriété au cours des 30 dernières années, mais sa formation n'est pas spécifique d'un mécanisme particulier car elle est générée soit par une oxydation à un électron, soit par l'oxygène singulet, soit par le radical OH°.

L'objectif de cette seconde partie du projet était donc d'étudier la formation d'adduits entre la guanine et les polyamines. Ce travail a tout d'abord été entrepris dans l'ADN isolé afin de valider l'hypothèse

mécanistique de l'addition des polyamines au niveau du radical cation de la guanine. Les adduits ont ensuite été recherchés dans l'ADN extrait de cellules et de spermatozoïdes.

Nous avons à nouveau eu recours à l'HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem afin de quantifier les adduits guanine-polyamines. L'analyse HPLC est effectuée en phase inverse, grâce à une colonne de silice greffée C18. Nous avons vu dans le chapitre 4 que la mise au point de cette méthode analytique avait fait l'objet de nombreuses étapes d'optimisation.

Les principales difficultés rencontrées résident dans les faibles sensibilité et reproductibilité des dosages. Il a été précisé à plusieurs reprises dans ce travail que les chaînes de polyamines présentes dans les adduits leur confèrent un comportement chromatographique particulier, ce qui apporte un certain nombre de contraintes lors du développement de méthodes d'analyse par HPLC. Ces étapes d'optimisation nous ont permis de mieux appréhender ce phénomène. Celui-ci repose très certainement sur une interaction entre les fonctions aminées des polyamines et les silanols résiduels de la colonne, ce qui entraîne :

- une modification de l'élution des adduits, qui influe directement sur la résolution et la sensibilité.
- un piégeage d'une partie des composés sur la colonne.
- un relargage des analytes liés au silanols lors de l'analyse des échantillons suivants. Ceci est de plus très dépendant de la matrice des échantillons, et impacte la reproductibilité, en provoquant un « effet mémoire ».

En fin de travail de thèse nous avons montré que l'ajout d'un mix de polyamines libres à de fortes concentrations dans chaque échantillon et standard a, semble-t-il, permis de remédier à ce problème. On peut supposer que les polyamines libres, présentes majoritairement par rapport aux adduits, se lient préférentiellement aux silanols. Les sites de liaison des polyamines au niveau de la phase stationnaire sont donc masqués/saturés. Cette alternative a eu pour conséquence une très nette augmentation de la sensibilité et de la reproductibilité des analyses.

Les adduits guanine-polyamines ont été recherchés dans l'ADN double brin extrait de thymus de veau. L'ADN est soumis à différentes conditions de stress oxydant (photo-oxydation de type I, rayonnement ionisant, rayonnement laser), en présence de polyamines. Ces expériences ont permis de démontrer que l'oxydation à un électron de l'ADN double brin en présence de polyamines conduit à des adduits guanine-polyamines. Ainsi, les polyamines constituent des espèces nucléophiles capables de s'additionner en position C8 du radical cation de la guanine.

Cette réaction de formation d'adduits est plus efficace dans le cas de la spermine. La différence de pKa entre les fonctions amines primaires ne semble pas suffisante pour expliquer ce phénomène. En revanche la molécule de spermine est plus longue et plus flexible que les autres polyamines, ce qui pourrait augmenter les probabilités d'interactions.

Les taux d'adduits avec les polyamines dépendent du système d'irradiation utilisé. L'irradiation par impulsions laser produit des taux d'adduits très élevés. Les taux observés sont plus faibles lors de l'expérience de photosensibilisation et encore plus faibles pour l'exposition au rayonnement γ . La production d'adduits dépend directement de celle des radicaux cations de la guanine, ce qui permet de valider l'hypothèse mécanistique. En effet nous avons vu précédemment que ces radicaux étaient très largement présents suite à l'exposition au rayonnement laser. Le traitement par rayonnement ionisant peut être à l'origine de nombreux types de dommages, selon 2 principaux mécanismes : (i) l'effet direct, qui correspond à des réactions d'ionisation par interaction directe des photons incidents avec l'ADN, et (ii) l'effet indirect qui implique les ERO, principalement OH° , issues de la radiolyse de l'eau (170). Les radicaux $\text{G}^{\circ+}$ sont produits par l'effet direct. La 8-oxodGuo quant à elle provient soit de l'addition d'une molécule d'eau sur $\text{G}^{\circ+}$ (effet direct), soit de l'addition du radical OH° sur la guanine (mécanisme indirect). Or, il a été démontré que lors de l'irradiation par rayonnement γ d'ADN en solution l'effet direct était prédominant. Les conditions que nous avons utilisées pour étudier la formation d'adduits guanine-polyamines dans l'ADN isolé après exposition au rayonnement γ produisent donc surtout des radicaux OH° , et peu de radicaux $\text{G}^{\circ+}$ ce qui explique le faible ratio entre le taux d'adduits et celui de la 8-oxodGuo.

La formation d'adduits est également en relation avec la concentration en polyamines dans le milieu. La concentration de polyamines optimale pour cette réaction se situe aux alentours de 500 μM . Les concentrations inférieures sont associées à des taux d'adduits plus bas. En revanche, si la concentration en polyamines est trop élevée, la solubilité de l'ADN diminue, et ceci peut perturber la formation de ces lésions. On observe une précipitation de l'ADN pour des concentrations de polyamines aux alentours de 1 mM, mais celle-ci est variable en fonction de la température et de la force ionique du milieu.

Les concentrations de polyamines utilisées sont proches de celles mesurées dans les cellules (On estime que la concentration cellulaire en polyamines est de l'ordre du millimolaire). Dans les expériences présentées ici, les irradiations ont été réalisées avec la putrescine, la spermidine ou la spermine, mais pas avec un mélange de polyamines. Les conditions utilisées pour ces expériences réalisées sur l'ADN isolé ne reflètent pas totalement l'environnement cellulaire, mais elles permettent de valider le mécanisme envisagé pour la formation des adduits guanine-polyamines.

Dans le modèle d'interaction reposant sur la formation d'agrégats nucléaires de polyamines, les amines primaires sont engagées dans des liaisons faibles avec les groupements phosphate des macrocycliques, et l'interaction avec l'ADN s'effectue grâce aux amines secondaires. Les adduits recherchés, impliquant les amines primaires des polyamines, se formeraient donc plus vraisemblablement avec la fraction libre. La présence de polyamines provoque une forte inhibition de la formation de 8-oxodGuo. Les résultats présentés suggèrent l'existence de 2 phénomènes :

- l'augmentation de la condensation de l'ADN par les polyamines, ce qui le protège de l'oxydation ;

- une compétition entre l'addition nucléophile de l'eau, formant la 8-oxodGuo, et celle des polyamines.

Dans le cas de la spermine, l'inhibition de formation de 8-oxodGuo est plus marquée qu'avec les autres polyamines. Son effet radioprotecteur est d'ailleurs plus puissant, et cette polyamine est plus propice à la formation d'adduits.

Les adduits guanine-polyamines n'ont pas été détectés dans l'ADN extrait de cellules THP1, même après exposition au rayonnement laser. Ces résultats ne permettent cependant pas de conclure sur la présence de ces lésions dans les échantillons analysés, car la méthode analytique employée lors de ces expériences présentait une sensibilité modérée et donc certainement insuffisante. Néanmoins nos résultats montrent qu'au niveau cellulaire, il y a une formation importante de 8-oxodGuo alors que *in vitro* la formation des adduits est très majoritaire par rapport à la 8-oxodGuo pour des concentrations utilisées voisines de celles présentes dans les cellules. Cette différence peut être expliquée probablement par le fait que la 8-oxodGuo détectée *in cellulo* peut se former selon différents mécanismes : (i) l'addition d'une molécule d'eau sur le radical cation de la guanine suite à l'oxydation à un électron de l'ADN, mais également (ii) l'addition du radical OH° ou encore (iii) la réaction avec l'oxygène singulet. A notre connaissance les adduits polyamines quant à eux ne proviennent que de l'addition nucléophile des polyamines sur G^{o+}, et selon les conditions utilisées ce mécanisme n'est pas toujours le plus favorable. Cette hypothèse ne s'applique cependant qu'aux expériences de photosensibilisation et d'irradiation γ . Concernant l'expérience d'irradiation laser, nous avons vu que l'oxydation à un électron était le processus majoritaire. On peut cependant supposer que l'environnement chimique de l'ADN isolé et de l'ADN cellulaire est très différent. Lors des expériences réalisées *in vitro* en présence de tampon phosphate, le rendement de pontage diminue très significativement ce qui souligne l'importance de l'environnement chimique sur la formation d'adduits. Certains paramètres peuvent en effet influencer sur cette réaction d'addition nucléophile sur G^{o+}, et donc sur la formation d'adduits :

- la force ionique du milieu et le pH.
- la concentration en polyamines à proximité de l'ADN : celle-ci est très difficile à estimer, notamment avec la présence des histones qui enveloppent l'ADN cellulaire. De plus ces molécules sont susceptibles de former des paires d'ions avec différentes espèces anioniques ce qui influe sur leur répartition dans la cellule.
- la présence d'autres nucléophiles dans l'environnement cellulaire.
- la conformation de l'ADN qui varie au cours du cycle cellulaire et peut perturber l'accessibilité des sites G^{o+} pour les polyamines.

De plus, parmi les polyamines présentes au niveau cellulaire, la fraction qui est « libre », c'est-à-dire non impliquée dans des agrégats et disponible pour former des adduits est actuellement méconnue. Les expériences réalisées *in vitro* ne reflètent donc que très partiellement les phénomènes qui se produisent au niveau cellulaire.

Les adduits avec la spermidine et la spermine ont cependant été mis en évidence dans l'ADN extrait de spermatozoïdes humains et murins. Les taux d'adduits observés sont étonnamment élevés, en particulier avec la spermine. La concentration en spermine dans le liquide séminal est plus élevée que celles des autres polyamines, il serait cependant pertinent de vérifier si cette tendance est similaire dans les spermatozoïdes. Lors de la détection des lésions oxydatives dans l'ADN cellulaire, les taux sont généralement de l'ordre d'une modification par million de bases. Les taux de 8-spd-dGuo et 8-spm-dGuo mesurés sont de l'ordre de 1000 et 10000 lésions par million respectivement ; ces adduits ne proviennent peut être pas d'un processus d'oxydation.

Avant toute chose il paraît important de confirmer ces résultats. Chronologiquement, les données ont été obtenues avant que nous ayons montré que l'ajout d'un mélange de polyamines aux échantillons juste avant injection en HPLC-MS/MS améliore la sensibilité, et la reproductibilité des résultats. Il conviendrait donc de répéter ces analyses dans ces conditions pour confirmer (ou non) nos données préliminaires. Si nos données sont confirmées il convient de se poser plusieurs questions.

La 5-méthyl-désoxycytidine (5-Me-dC) a également été dosée dans certains échantillons d'ADN de spermatozoïdes, car il s'agit de la modification épigénétique de référence (171,172). Les modifications épigénétiques sont des modifications générées enzymatiquement qui participent à la régulation de l'expression des gènes mais n'altèrent pas la séquence nucléotidique. Nous avons constaté que la 5-Me-dC représentait environ 1 à 5 % des nucléotides totaux, ce qui correspond aux données présentes dans la littérature (173). Dans ces échantillons d'ADN extraits de spermatozoïdes, les taux d'adduits 8-spm-dGuo se situent dans le même ordre de grandeur que ceux de la 5-Me-dC. Il n'est pas à exclure que les adduits guanine-polyamines ne constituent pas des lésions oxydatives mais des modifications épigénétiques. Si c'est le cas, il sera nécessaire d'essayer de trouver les enzymes qui produisent ces modifications et de déterminer leur rôle biologique.

D'après les expériences d'exposition de sperme humain au rayonnement ionisant et au peroxyde d'hydrogène, les taux d'adduits observés diminuent lors de l'exposition au stress oxydant. Cette dernière observation suggère la présence de produits d'oxydation secondaire qui accompagnerait la dégradation des adduits. Par analogie avec les travaux de S. Perrier *et al.* qui ont permis de mettre en évidence une réaction de suroxydation des adduits guanine-KKK (46), les adduits polyamines pourraient également se suroxyder pour former des dérivés de type spiroiminodihydantoïne et guanidinodihydantoïne (Figure 142). Etant donné les taux mesurés, il n'est pas surprenant qu'une suroxydation puisse se produire.

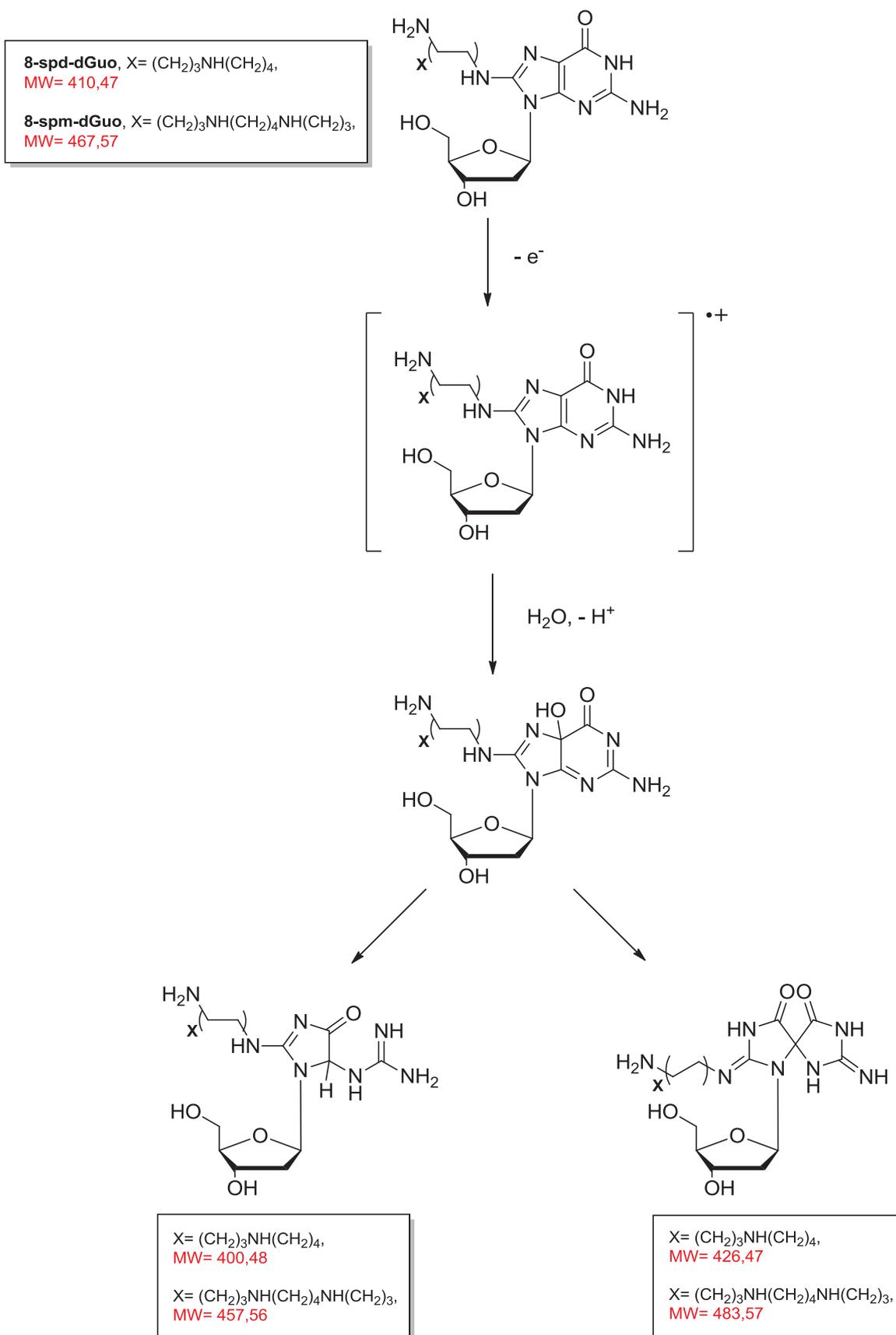


Figure 142 : Hypothèse de formation de produits de suroxydation des adduits 8-spd-dGuo et 8-spm-dGuo, de type spiroiminodihydroxyguanine et spiroguanidodihydroxyguanine, par analogie avec les travaux de S. Perrier et al. (46)

Conclusion
&
Perspectives

Ce travail de thèse vise à enrichir les connaissances sur les pontages ADN-protéines, qui sont parmi les principaux dommages oxydatifs de l'ADN. Nous avons entrepris d'explorer la structure chimique de ces lésions, grâce à l'étude des pontages se produisant avec l'acide amine lysine. En parallèle nous avons également identifié et caractérisé de nouvelles lésions de l'ADN, les adduits avec les polyamines. Ces 2 types de lésions ont en commun un mécanisme de formation reposant sur une addition nucléophile sur le radical cation de la guanine provenant d'une oxydation à un électron de l'ADN (Figure 143).

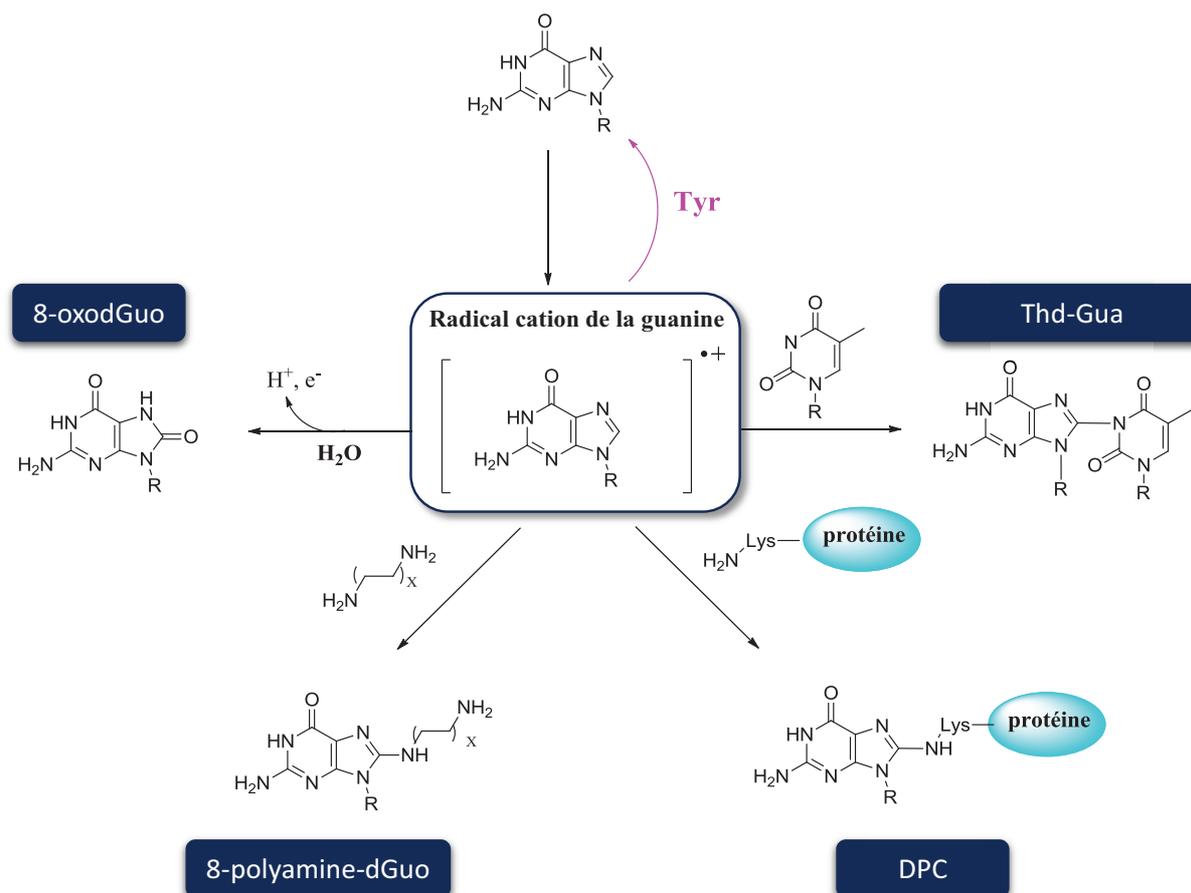


Figure 143 : Schéma récapitulatif de la réactivité du radical cation de la guanine. $G^{\bullet+}$ peut intervenir dans la formation de différentes lésions : la 8-oxodGuo, les adduits Thd-Gua, les adduits avec les polyamines ou encore les pontages ADN-protéines. A noter qu'en présence d'acides aminés présentant un potentiel d'oxydation plus bas que la guanine (exemple de la tyrosine ci-dessus), un transfert électronique peut se produire, ce qui régénère la guanine.

Pour commencer nous avons synthétisé et caractérisé l'adduit entre la guanine et la lysine. Une méthodologie a été mise en place, afin de détecter et quantifier cet adduit dans l'ADN. Celle-ci repose sur un dosage par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Nous avons ainsi mis en évidence la présence des adduits guanine-lysine dans l'ADN isolé soumis à différentes conditions de stress oxydant (photo-oxydation, rayonnement ionisant, rayonnement laser à 266 nm). Ces expériences nous ont permis de confirmer l'existence du mécanisme supposé, impliquant le radical cation de la guanine. Ces adduits ont également été détectés dans de l'ADN extrait de cellules THP1 irradiées par

laser à 266 nm. Ces résultats prouvent la présence de pontages ADN-protéines dans ces échantillons, et permettent d'identifier la nature chimique du pontage, constitué d'une liaison covalente entre la base guanine et l'acide aminé lysine. Des expériences complémentaires seront effectuées afin d'étudier la possible formation de l'adduit guanine-lysine dans l'ARN extrait de cellules irradiées par laser.

En parallèle nous avons entrepris de mesurer les taux de DPCs dans l'ADN cellulaire, afin de les corrélés à ceux des adduits 8-lys-Gua et ainsi estimer la proportion de pontages entre lysine et guanine par rapport aux pontages ADN-protéines totaux. Le test des comètes et le marquage à l'isothiocyanate de fluorescéine ont été utilisés comme outils de détection, mais ils ne nous ont pas permis d'obtenir des résultats probants. Le test des comètes est une méthode de détection indirecte des pontages ADN-protéines, qui s'avère de ce fait très peu spécifique de ces dommages. L'augmentation de la migration observée suite à l'irradiation par rayonnement laser n'a pu être attribuée à la formation de pontages ADN-protéines, du fait de l'absence de variation significative du « tail moment » lors de l'incubation avec la protéinase K. Nous avons donc opté pour une méthode de détection directe, le marquage à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Par cette technique, nous n'avons observé aucune différence significative entre les différentes doses d'irradiation. En outre, les conditions utilisées pour mettre en œuvre cette méthode semblent peu reproductibles. Ceci peut provenir d'une contamination par des protéines libres, qui perturberait la détection par fluorescence, en créant des « faux positifs ». Nous envisageons donc de poursuivre les expériences entreprises par le marquage au FITC, en ajoutant une étape d'ultracentrifugation afin de s'affranchir des protéines libres et d'améliorer ainsi la reproductibilité de cette expérience. Ce travail se fera par le biais d'une collaboration avec Hiroshi Ide de l'université de Hiroshima.

Des modèles de pontages entre des peptides et des oligonucléotides ont été développés. La mise en place de ces systèmes s'effectue en 2 étapes : il convient dans un premier temps de mettre en évidence la formation de pontages covalents et, dans un deuxième temps, de caractériser les produits de pontage purifiés. Notre objectif était d'identifier la nature chimique du pontage, et de déterminer quel acide aminé et quelle base de l'ADN intervenaient. Le système formé d'un peptide doigt de zinc et d'un duplex oligonucléotidique nous a permis de démontrer la formation d'un pontage covalent suite à la photo-oxydation, malgré un rendement assez faible. La caractérisation des produits de pontage a été entreprise, mais celle-ci nécessite d'être approfondie. En parallèle, d'autres systèmes modèles constitués des protéines thrombine et SSB avec des aptamères ont été étudiés. L'analyse par HPLC-MS/MS de ces systèmes après irradiation laser suggère la présence d'adduits lysine-guanine. Ces résultats devront être confirmés, mais ils constituent des arguments pertinents pour prouver la présence de pontages ADN-protéines présentant une liaison covalente entre la lysine et la guanine.

Il serait également intéressant de déterminer si des pontages avec d'autres acides aminés basiques présentant des groupements nucléophiles, tels que l'arginine, pourraient également survenir. Les données présentes dans la littérature suggèrent que les additions nucléophiles sur le radical cation de la

guanine font intervenir des groupements amine, mais également des fonctions alcool. L'étude des pontages se produisant avec l'acide aminé sérine fait donc partie des perspectives de ce projet.

La deuxième partie de ces travaux est consacrée à l'étude des adduits entre la guanine et les polyamines. Ces dernières sont de petites molécules qui interagissent étroitement avec l'ADN et interviennent dans de nombreux processus cellulaires essentiels. La même stratégie que précédemment a été adoptée pour détecter et quantifier ces lésions. Nous avons tout d'abord confirmé que la putrescine, la spermidine et la spermine s'additionnaient sur le radical cation guanine pour former des adduits *in vitro*. Au cours de ce travail, une étude préliminaire a également été réalisée sur l'ADN extrait de spermatozoïdes. Les polyamines sont en effet présentes dans le sperme, et sont connues pour jouer un rôle dans différents processus liés aux fonctions reproductrices mâles, notamment la motilité des spermatozoïdes et la fécondation. Les résultats de cette étude révèlent des taux très élevés d'adduits avec la spermine et la spermidine dans des échantillons d'ADN extrait de spermatozoïdes provenant d'hommes sains. Les taux d'adduits mesurés sont étonnamment élevés, par rapport à ceux des lésions oxydatives généralement rencontrées ; et ils ont tendance à diminuer lors de l'exposition au rayonnement ionisant ainsi que lors du traitement des spermatozoïdes au peroxyde d'hydrogène. Nous devons donc avant toute chose valider les résultats obtenus, à l'aide de la méthode de quantification des adduits récemment optimisée. Concernant les taux élevés que nous avons rapportés, il serait également intéressant de comprendre l'origine et les conséquences biologiques de ces adduits. S'agit-il de lésions provenant d'un mécanisme oxydatif, ou bien de modifications épigénétiques? Ces adduits interviennent-ils dans l'infertilité masculine? Quelle relation existe-t-il entre le taux d'adduits et la fertilité? Afin d'explorer ces différents points, nous envisageons de quantifier les adduits avec la spermidine et la spermine, ainsi que d'autres lésions oxydatives comme la 8-oxodGuo, dans l'ADN extrait de spermatozoïdes provenant d'hommes présentant différents profils de fertilité. Nous pourrions également nous interroger sur l'évolution du taux de ces adduits au cours de la maturation des spermatozoïdes. Pour répondre à cette problématique, il conviendrait de renouveler les dosages d'adduits dans de l'ADN extrait de spermatozoïdes provenant de l'épididyme à différents stades de leur maturation. Nous avons vu en introduction que la 8-oxodGuo et les adduits en C8 de la guanine étaient particulièrement sensibles à l'addition nucléophile de H₂O au niveau du carbone C5 (paragraphes 1.2.3 et 1.2.4.2). Ceci conduit à des dérivés de type guanidinodihydantoïne et spiroiminodihydantoïne. Il serait pertinent de rechercher ces produits d'oxydation secondaire dans le cas des adduits 8-polyamine-dGuo. Ces réactions de suroxydation pourraient de plus expliquer la diminution des taux d'adduits observée dans les spermatozoïdes après exposition au stress oxydant.

Les adduits polyamine-dGuo constituent des marqueurs de la formation de radicaux cations de la guanine. Ces nouvelles lésions pourraient donc être utilisées pour des études mécanistiques. Par exemple, de nombreuses questions persistent concernant les différents processus induits par l'exposition

au rayonnement ionisant. Différentes équipes ont entrepris d'étudier plus particulièrement l'importance de la contribution des effets direct et indirect dans la formation de lésions de l'ADN (174,175). Dans ce contexte les adduits polyamine-dGuo seraient des biomarqueurs pour la quantification de l'effet direct. Un projet visant à identifier et caractériser de nouvelles structures de types « bi-adduits » est également à l'étude. La putrescine, la spermidine et la spermine possèdent chacune 2 fonctions amine primaire, susceptibles de réagir avec 2 radicaux cations de la guanine. De telles lésions pourraient en outre conduire à des structures de types pontages inter-brins. Cette étude requiert de synthétiser au préalable ces bi-adduits sous la forme de nucléosides modifiés, puis de développer une méthode de quantification dans l'ADN.

Des expériences ont été entreprises afin d'explorer la réparation de ces lésions par les enzymes du BER. Les résultats obtenus suggèrent une absence d'excision par la Fpg ainsi que par OGG1. Il serait intéressant de comprendre si ceci provient d'une absence de reconnaissance ou bien d'un déficit d'activité enzymatique vis-à-vis de ces lésions. Il est communément admis que le BER est un système responsable de la prise en charge des lésions provenant de petites altérations chimiques. Néanmoins ce système est susceptible de réparer les bases alkylées. Les adduits guanine-polyamines constituent probablement des lésions trop volumineuses pour être reconnues par les enzymes du BER. Nous devons donc confirmer cette hypothèse, grâce à des tests d'excision avec d'autres *N*-glycosylases appartenant à ce système. Par ailleurs, nous pouvons envisager d'étudier la possible réparation de ces adduits par le NER, réalisant des tests d'incision *in vitro* avec les enzymes impliquées dans ce système, par exemple le système UvrABC. Ce système est en effet plus favorable à la prise en charge des dommages plus volumineux.

Dans le but de synthétiser des oligonucléotides comportant l'adduit avec la putrescine, la préparation du synthon phosphoramidite correspondant a été entreprise. La poursuite de cette synthèse et son adaptation aux adduits avec les autres polyamines (spermidine et spermine) figurent également parmi les perspectives de ce projet. Ces oligonucléotides représenteraient des outils appropriés pour étudier de façon plus détaillée la réparation des adduits, ainsi que leurs conséquences biologiques. Ils pourraient en particulier être utilisés pour déterminer si les enzymes du BER reconnaissent ces dommages sans les exciser. Dans ce cas il serait également intéressant de savoir si la présence d'adduits avec les polyamines entraîne une inhibition de la réparation d'autres lésions, en piégeant les glycosylases. Des substrats reconnus mais non excisés pourraient être utiles pour les structuralistes, et l'obtention de cristaux « enzyme + substrat abortif » permettrait certainement de comprendre pourquoi les glycosylases sont inefficaces vis-à-vis de ces lésions.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Favier A. Le stress oxydant. L'actualité Chim. 2003;108.
2. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J. 2003 Jul;17:1195–214.
3. Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. Photochem Photobiol. 1991 Nov;54(5):659.
4. Morin B, Cadet J. Type I benzophenone-mediated nucleophilic reaction of 5'-amino-2',5'-dideoxyguanosine. A model system for the investigation of photosensitized formation of DNA-protein cross-links. Chem Res Toxicol. 1995 Aug;8(5):792–9.
5. Cadet J, Douki T, Ravanat J-L. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. Acc Chem Res. 2008 Aug;41(8):1075–83.
6. Kanvah S, Joseph J, Schuster GB, Barnett RN, Cleveland CL, Landman U. Oxidation of DNA: damage to nucleobases. Acc Chem Res. Feb 16;43:280–7.
7. Pratviel G, Meunier B. Guanine oxidation: one- and two-electron reactions. Chemistry. 2006 Aug 7;12:6018–30.
8. Ide H, Shoukamy MI, Nakano T, Miyamoto-Matsubara M, Salem AMH. Repair and biochemical effects of DNA–protein crosslinks. Mutat Res Mol Mech Mutagen. 2011 Jun;711(1-2):113–22.
9. Barker S, Weinfeld M, Murray D. DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences. Mutat Res-Rev Mutat Res. 2005 Mar;589:111–35.
10. Shoukamy MI, Nakano T, Ohshima M, Hirayama R, Uzawa A, Furusawa Y, et al. Detection of DNA-protein crosslinks (DPCs) by novel direct fluorescence labeling methods: distinct stabilities of aldehyde and radiation-induced DPCs. Nucleic Acids Res. 2012 Oct 1;40(18):e143–e143.
11. Reardon JT, Cheng Y. Repair of DNA–Protein Cross-links in Mammalian Cells. Cell Cycle. 2006 Jul 1;5(13):1366–70.
12. DeMott MS. Covalent Trapping of Human DNA Polymerase beta by the Oxidative DNA Lesion 2-Deoxyribonolactone. J Biol Chem. 2002 Mar 1;277(10):7637–40.
13. Gilboa R. Structure of Formamidopyrimidine–DNA Glycosylase Covalently Complexed to DNA. J Biol Chem. 2002 May 24;277(22):19811–6.
14. Ye X, Ji Z, Wei C, McHale CM, Ding S, Thomas R, et al. Inhaled formaldehyde induces DNA-protein crosslinks and oxidative stress in bone marrow and other distant organs of exposed mice: Formaldehyde Inhalation Induces Distant Toxicity in Mice. Environ Mol Mutagen. 2013 Dec;54(9):705–18.
15. Kim HY, Stermitz FR, Coulombe RA Jr. Pyrrolizidine alkaloid-induced DNA-protein cross-links. Carcinogenesis. 1995 Nov;16(11):2691–7.
16. Chvalova K, Brabec V, Kasparikova J. Mechanism of the formation of DNA-protein cross-links by antitumor cisplatin. Nucleic Acids Res. 2007 Mar 1;35(6):1812–21.
17. Zhitkovich A, Voitkun V, Costa M. Formation of the Amino Acid–DNA Complexes by Hexavalent and Trivalent Chromium *in Vitro*: Importance of Trivalent Chromium and the Phosphate Group †. Biochemistry (Mosc). 1996 Jan;35(22):7275–82.

Références bibliographiques

18. Shaham J, Bomstein Y, Meltzer A, Kaufman Z, Palma E, Ribak J. DNA--protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde--in vitro and in vivo studies. *Carcinogenesis*. 1996 Jan;17(1):121--5.
19. McGhee JD, von Hippel PH. Formaldehyde as a probe of DNA structure. I. Reaction with exocyclic amino groups of DNA bases. *Biochemistry (Mosc)*. 1975 Mar 25;14(6):1281--96.
20. Shaham J, Bomstein Y, Gurvich R, Rashkovsky M, Kaufman Z. DNA-protein crosslinks and p53 protein expression in relation to occupational exposure to formaldehyde. *Occup Environ Med*. 2003 Jun;60(6):403--9.
21. Sutter M, Page C, Hoffman B, Curtis M, Walker M. *Cancers. Pharmacologie intégrée*. De Boeck; 1999.
22. Lacave R, Larsen C-J, Robert J. Méthylation de l'ADN, empreinte parentale et cancer. *Cancérologie fondamentale*. John Libbey Eurotext. 2005.
23. Santi DV, Norment A, Garrett CE. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Nov;81(22):6993--7.
24. Meyn RE, vanAnkeren SC, Jenkins WT. The Induction of DNA-Protein Crosslinks in Hypoxic Cells and Their Possible Contribution to Cell Lethality. *Radiat Res*. 1987 Mar 1;109(3):419--29.
25. Chakrabarti S. DNA--Protein Crosslinks Induced by Nickel Compounds in Isolated Rat Lymphocytes: Role of Reactive Oxygen Species and Specific Amino Acids. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001 Feb 1;170(3):153--65.
26. Schriver-Mazzuoli. *Pollution chimique. La pollution de l'air intérieur*. Dunod; 2009.
27. Klein CB, Frenkel K, Costa M. The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*. 1991 Nov;4(6):592--604.
28. INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - Chrome et ses dérivés [Internet]. [cited 2014 Aug 28]. Available from: <http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/getDocument/2739>
29. Mattagajasingh S, Misra H. Analysis of EDTA-chelatable proteins from DNA-protein crosslinks induced by a carcinogenic chromium(VI) in cultured intact human cells. *Mol Cell Biochem*. 1999 Sep 1;199(1-2):149--62.
30. Fourrier L. Mécanisme d'action de la drogue anticancéreuse cis-dichlorodiammineplatine (II) : étude de l'interaction entre les protéines de réparation des mésappariements et l'ADN platiné. Orléans; 2003.
31. Yamamoto J, Miyagi Y, Kawanishi K, Yamada S, Miyagi Y, Kodama J, et al. Effect of cisplatin on cell death and DNA crosslinking in rat mammary. Adenocarcinoma in vitro. *Acta Med Okayama*. 1999 Oct;53(5):201--8.
32. Kohn KW, Grimek-Ewig RA. Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single-strand interruptions in cells. *Cancer Res*. 1973 Aug;33(8):1849--53.
33. Kohn KW, Ewig RAG. DNA-protein crosslinking by trans-platinum(II)diamminedichloride in mammalian cells, a new method of analysis. *Biochim Biophys Acta BBA - Nucleic Acids Protein Synth*. 1979 Mar;562(1):32--40.

Références bibliographiques

34. Zhitkovich A, Costa M. A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and in vivo. *Carcinogenesis*. 1992 Aug;13(8):1485–9.
35. Oleinick NL, Chiu SM, Ramakrishnan N, Xue LY. The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Br J Cancer Suppl*. 1987;8:135.
36. Strniste GF, Rall SC. Induction of stable protein-deoxyribonucleic acid adducts in Chinese hamster cell chromatin by ultraviolet light. *Biochemistry (Mosc)*. 1976 Apr;15(8):1712–9.
37. Liu LF, Rowe TC, Yang L, Tewey KM, Chen GL. Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem*. 1983 Dec 25;258(24):15365–70.
38. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. 2004 Mar;26(3):249–61.
39. Merk O, Speit G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environ Mol Mutagen*. 1999;33(2):167–72.
40. Merk O, Reiser K, Speit G. Analysis of chromate-induced DNA-protein crosslinks with the comet assay. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 2000 Nov;471(1-2):71–80.
41. Nakano T, Morishita S, Katafuchi A, Matsubara M, Horikawa Y, Terato H, et al. Nucleotide Excision Repair and Homologous Recombination Systems Commit Differentially to the Repair of DNA-Protein Crosslinks. *Mol Cell*. 2007 Oct;28(1):147–58.
42. Zhuang Z, Costa M. Development of an ¹²⁵I-postlabeling assay as a simple, rapid, and sensitive index of DNA-protein cross-links. *Environ Health Perspect*. 1994 Sep;102 Suppl 3:301–4.
43. Kiianitsa K, Maizels N. A rapid and sensitive assay for DNA-protein covalent complexes in living cells. *Nucleic Acids Res*. 2013 May 1;41(9):e104–e104.
44. Dizdaroglu M, Gajewski E, Reddy P, Margolis SA. Structure of a hydroxyl radical induced DNA-protein cross-link involving thymine and tyrosine in nucleohistone. *Biochemistry (Mosc)*. 1989 Apr 18;28(8):3625–8.
45. Dizdaroglu M, Gajewski E. Structure and mechanism of hydroxyl radical-induced formation of a DNA-protein cross-link involving thymine and lysine in nucleohistone. *Cancer Res*. 1989 Jul 1;49(13):3463–7.
46. Perrier S, Hau J, Gasparutto D, Cadet J, Favier A, Ravanat JL. Characterization of lysine-guanine cross-links upon one-electron oxidation of a guanine-containing oligonucleotide in the presence of a trilycine peptide. *J Am Chem Soc*. 2006 May 3;128:5703–10.
47. Voitkun V. Cr(III)-mediated crosslinks of glutathione or amino acids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells. *Nucleic Acids Res*. 1998 Apr 15;26(8):2024–30.
48. Dexheimer T. DNA Repair Pathways and Mechanism. *DNA Repair of Cancer Stem Cells*. p. 19–32.
49. Yu Z, Chen J, Ford BN, Brackley ME, Glickman BW. Human DNA repair systems: An overview. *Environ Mol Mutagen*. 1999;33(1):3–20.
50. Forestier A. Effets du peptide Amyloïde-2, caractéristique de la maladie d'Alzheimer, sur les systèmes de réparation de l'ADN. Grenoble; 2011.

Références bibliographiques

51. Fang Q. DNA–protein crosslinks processed by nucleotide excision repair and homologous recombination with base and strand preference in *E. coli* model system. *Mutat Res Mol Mech Mutagen*. 2013 Jan;741-742:1–10.
52. Zharkov DO. Base excision DNA repair. *Cell Mol Life Sci*. 2008 May;65(10):1544–65.
53. DNA Damage and Repair Sigma-Aldrich [Internet]. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/dna-damage-and-repair.html>
54. Wilson D, Bohr V. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair*. 2007 Apr 1;6(4):544–59.
55. Shuck SC, Short EA, Turchi JJ. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res*. 2008 Jan;18(1):64–72.
56. Costa R. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*. 2003 Nov;85(11):1083–99.
57. Truglio JJ, Croteau DL, Van Houten B, Kisker C. Prokaryotic Nucleotide Excision Repair: The UvrABC System. *Chem Rev*. 2006 Feb;106(2):233–52.
58. Lans H, Marteijn JA, Vermeulen W. ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics Chromatin*. 2012;5(1):4.
59. Li X, Heyer W-D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res*. 2008 Jan;18(1):99–113.
60. Dillingham MS, Kowalczykowski SC. RecBCD Enzyme and the Repair of Double-Stranded DNA Breaks. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008 Dec 1;72(4):642–71.
61. Kowalczykowski SC, Dixon DA, Eggleston AK, Lauder SD, Rehrauer WM. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*. 1994 Sep;58(3):401–65.
62. Wilson JH. CANCER: BRCA2 Enters the Fray. *Science*. 2002 Sep 13;297(5588):1822–3.
63. Salem AMH, Nakano T, Takuwa M, Matoba N, Tsuboi T, Terato H, et al. Genetic analysis of repair and damage tolerance mechanisms for DNA-protein cross-links in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2009 Sep;191(18):5657–68.
64. Quievryn G, Zhitkovich A. Loss of DNA-protein crosslinks from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteasome function. *Carcinogenesis*. 2000 Aug;21(8):1573–80.
65. Xu X, Muller JG, Ye Y, Burrows CJ. DNA–Protein Cross-links between Guanine and Lysine Depend on the Mechanism of Oxidation for Formation of C5 Vs C8 Guanosine Adducts. *J Am Chem Soc*. 2008 Jan;130(2):703–9.
66. Margolis SA, Coxon B, Gajewski E, Dizdaroglu M. Structure of a hydroxyl radical induced cross-link of thymine and tyrosine. *Biochemistry (Mosc)*. 1988 Aug;27(17):6353–9.
67. Altman SA, Zastawny TH, Randers-Eichhorn L, Cacciuttolo MA, Akman SA, Dizdaroglu M, et al. Formation of DNA-protein cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions. *Free Radic Biol Med*. 1995 Dec;19(6):897–902.

Références bibliographiques

68. Morimoto S, Hatta H, Fujita S, Matsuyama T, Ueno T, Nishimoto S. Hydroxyl radical-induced cross-linking of thymine and lysine: identification of the primary structure and mechanism. *Bioorg Med Chem Lett*. 1998 Apr 7;8(7):865–70.
69. Dizdaroglu M, Simic MG. Radiation-induced crosslinks between thymine and phenylalanine. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1985 Jan;47(1):63–9.
70. Gajewski E, Fuciarelli AF, Dizdaroglu M. Structure of hydroxyl radical-induced DNA-protein crosslinks in calf thymus nucleohistone in vitro. *Int J Radiat Biol*. 1988 Sep;54(3):445–59.
71. Charlton TS, Ingelse BA, Black DS, Craig DC, Mason KE, Duncan MW. A covalent thymine-tyrosine adduct involved in DNA-protein crosslinks: synthesis, characterization, and quantification. *Free Radic Biol Med*. 1999 Aug;27(3-4):254–61.
72. Johansen ME, Muller JG, Xu X, Burrows CJ. Oxidatively Induced DNA-Protein Cross-Linking between Single-Stranded Binding Protein and Oligodeoxynucleotides Containing 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine †. *Biochemistry (Mosc)*. 2005 Apr;44(15):5660–71.
73. Solivio MJ, Joy TJ, Sallans L, Merino EJ. Copper generated reactive oxygen leads to formation of lysine-DNA adducts. *J Inorg Biochem*. 2010 Sep;104:1000–5.
74. Hickerson RP, Chepanoske CL, Williams SD, David SS, Burrows CJ. Mechanism-Based DNA-Protein Cross-Linking of MutY via Oxidation of 8-Oxoguanosine. *J Am Chem Soc*. 1999 Oct;121(42):9901–2.
75. Luo W, Muller JG, Rachlin EM, Burrows CJ. Characterization of spiroiminodihydantoin as a product of one-electron oxidation of 8-Oxo-7,8-dihydroguanosine. *Org Lett*. 2000 Mar 9;2(5):613–6.
76. Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat J-L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res*. 2003 Oct 29;531(1-2):5–23.
77. Ye Y, Muller JG, Luo W, Mayne CL, Shallop AJ, Jones RA, et al. Formation of ¹³C-, ¹⁵N-, and ¹⁸O-Labeled Guanidinohydantoin from Guanosine Oxidation with Singlet Oxygen. Implications for Structure and Mechanism. *J Am Chem Soc*. 2003 Nov;125(46):13926–7.
78. Xu X, Fleming AM, Muller JG, Burrows CJ. Formation of Tricyclic [4.3.3.0] Adducts between 8-Oxoguanosine and Tyrosine under Conditions of Oxidative DNA-Protein Cross-Linking. *J Am Chem Soc*. 2008 Aug;130(31):10080–1.
79. Looi DW, Eyler JR, Brajter-Toth A. Electrochemistry-electrospray ionization FT ICR mass spectrometry (EC ESI MS) of guanine-tyrosine and guanine-glutathione crosslinks formed on-line. *Electrochimica Acta*. 2011 Feb;56(6):2633–40.
80. Baumann A, Lohmann W, Jahn S, Karst U. On-Line Electrochemistry/Electrospray Ionization Mass Spectrometry (EC/ESI-MS) for the Generation and Identification of Nucleotide Oxidation Products. *Electroanalysis*. 2010 Feb;22(3):286–92.
81. Milligan JR. Repair of oxidative DNA damage by amino acids. *Nucleic Acids Res*. 2003 Nov 1;31(21):6258–63.
82. Kasai H, Yamaizumi Z, Berger M, Cadet J. Photosensitized Formation of 7,8-Dihydro-8-Oxo-2'-Deoxyguanosine (8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine) in DNA by Riboflavin - a Nonsinglet Oxygen Mediated Reaction. *J Am Chem Soc*. 1992 Nov 18;114:9692–4.

Références bibliographiques

83. Morin B, Cadet J. Benzophenone photosensitization of 2'-deoxyguanosine: characterization of the 2R and 2S diastereoisomers of 1-(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)- 2-methoxy-4,5-imidazolidinedione. A model system for the investigation of photosensitized formation of DNA-protein crosslinks. *Photochem Photobiol.* 1994 Aug;60(2):102–9.
84. Morin B, Cadet J. Chemical Aspects of the Benzophenone-Photosensitized Formation of Two Lysine-2'-deoxyguanosine Cross-Links. *J Am Chem Soc.* 1995 Dec;117(50):12408–15.
85. Crean C, Uvaydov Y, Geacintov NE, Shafirovich V. Oxidation of single-stranded oligonucleotides by carbonate radical anions: generating intrastrand cross-links between guanine and thymine bases separated by cytosines. *Nucleic Acids Res.* 2007 Nov 21;36(3):742–55.
86. Madugundu GS, Wagner JR, Cadet J, Kropachev K, Yun BH, Geacintov NE, et al. Generation of guanine-thymine cross-links in human cells by one-electron oxidation mechanisms. *Chem Res Toxicol.* 2013 Jul 15;26(7):1031–3.
87. Ramani D, De Bandt JP, Cynober L. Aliphatic polyamines in physiology and diseases. *Clin Nutr.* 2014 Feb;33(1):14–22.
88. Pegg AE. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life.* 2009 Sep;61(9):880–94.
89. Moinard C, Cynober L, Debandt J. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr.* 2005 Apr;24(2):184–97.
90. Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J.* 2003 Nov 15;376(1):1.
91. Uemura T, Gerner EW. Polyamine transport systems in mammalian cells and tissues. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2011;720:339–48.
92. Lefèvre PLC, Palin M-F, Murphy BD. Polyamines on the reproductive landscape. *Endocr Rev.* 2011 Oct;32(5):694–712.
93. D'Agostino L, Di Luccia A. Polyamines interact with DNA as molecular aggregates. *Eur J Biochem.* 2002 Sep;269:4317–25.
94. D'Agostino L, Di Pietro M, Di Luccia A. Nuclear aggregates of polyamines are supramolecular structures that play a crucial role in genomic DNA protection and conformation: Polyamine aggregates and DNA. *FEBS J.* 2005 Jul 5;272(15):3777–87.
95. Iacomino G, Picariello G, Sbrana F, Di Luccia A, Raiteri R, D'Agostino L. DNA is Wrapped by the Nuclear Aggregates of Polyamines: The Imaging Evidence. *Biomacromolecules.* 2011 Apr 11;12(4):1178–86.
96. Iacomino G, Picariello G, D'Agostino L. DNA and nuclear aggregates of polyamines. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2012 Oct;1823(10):1745–55.
97. Iacomino G, Picariello G, Stillitano I, D'Agostino L. Nuclear aggregates of polyamines in a radiation-induced DNA damage model. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014 Feb;47:11–9.
98. Pignata S, Di Luccia A, Lamanda R, Menchise A, D'Agostino L. Interaction of putrescine with nuclear oligopeptides in the enterocyte-like Caco-2 cells. *Digestion.* 1999;60(3):255–61.
99. Brooks WH. Increased Polyamines Alter Chromatin and Stabilize Autoantigens in Autoimmune Diseases. *Front Immunol [Internet].* 2013 [cited 2014 Jun 25];4. Available from: <http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fimmu.2013.00091/full>

100. Wang AH, Quigley GJ, Kolpak FJ, Crawford JL, van Boom JH, van der Marel G, et al. Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature*. 1979 Dec 13;282(5740):680–6.
101. Ray RM, Zimmerman BJ, McCormack SA, Patel TB, Johnson LR. Polyamine depletion arrests cell cycle and induces inhibitors p21(Waf1/Cip1), p27(Kip1), and p53 in IEC-6 cells. *Am J Physiol*. 1999 Mar;276(3 Pt 1):C684–691.
102. Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR. Role of polyamines in p53-dependent apoptosis of intestinal epithelial cells. *Cell Signal*. 2009 Apr;21(4):509–22.
103. Gerner EW, Meyskens FL. Polyamines and cancer: Old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4:781–92.
104. Mäkitie LT, Kanerva K, Sankila A, Andersson LC. High expression of antizyme inhibitor 2, an activator of ornithine decarboxylase in steroidogenic cells of human gonads. *Histochem Cell Biol*. 2009 Dec;132(6):633–8.
105. Alcivar AA, Hake LE, Mali P, Kaipia A, Parvinen M, Hecht NB. Developmental and differential expression of the ornithine decarboxylase gene in rodent testis. *Biol Reprod*. 1989 Dec;41(6):1133–42.
106. Blackshear PJ, Manzella JM, Stumpo DJ, Wen L, Huang JK, Oyen O, et al. High level, cell-specific expression of ornithine decarboxylase transcripts in rat genitourinary tissues. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 1989 Jan;3(1):68–78.
107. Kaipia A, Toppari J, Mali P, Kangasniemi M, Alcivar AA, Hecht NB, et al. Stage- and cell-specific expression of the ornithine decarboxylase gene during rat and mouse spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 1990 Oct 1;73(1):45–52.
108. Guichaoua M-R, Bujan L, Guerin J-F, Hennebicq S. La méiose. *Biologie de la Reproduction et du développement*. Ellipses; 2011.
109. Kilpeläinen PT, Saarimies J, Kontusaari SI, Järvinen MJ, Soler AP, Kallioinen MJ, et al. Abnormal ornithine decarboxylase activity in transgenic mice increases tumor formation and infertility. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001 May;33(5):507–20.
110. Oefner PJ, Wongyai S, Bonn G. High-performance liquid chromatographic determination of free polyamines in human seminal plasma. *Clin Chim Acta*. 1992 Jan;205(1-2):11–8.
111. Vanella A, Pinturo R, Vasta M, Piazza G, Rapisarda A, Savoca S, et al. Polyamine levels in human semen of infertile patients: effect of S-adenosylmethionine. *Acta Eur Fertil*. 1978 Jun;9(2):99–103.
112. Shah GV, Sheth AR, Mugatwala PP, Rao SS. Effect of spermine on adenylyl cyclase activity of spermatozoa. *Experientia*. 1975 Jun 15;31(6):631–2.
113. Rubinstein S, Breitbart H. Role of spermine in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biochem J*. 1991 Aug 15;278 (Pt 1):25–8.
114. Giardiello FM, Hamilton SR, Hyland LM, Yang VW, Tamez P, Casero RA. Ornithine decarboxylase and polyamines in familial adenomatous polyposis. *Cancer Res*. 1997 Jan 15;57(2):199–201.
115. Erdman SH, Ignatenko NA, Powell MB, Blohm-Mangone KA, Holubec H, Guillén-Rodríguez JM, et al. APC-dependent changes in expression of genes influencing polyamine metabolism, and

Références bibliographiques

- consequences for gastrointestinal carcinogenesis, in the Min mouse. *Carcinogenesis*. 1999 Sep;20(9):1709–13.
116. Ignatenko NA, Babbar N, Mehta D, Casero RA, Gerner EW. Suppression of polyamine catabolism by activated Ki-ras in human colon cancer cells. *Mol Carcinog*. 2004 Feb;39(2):91–102.
117. Gerner EW, Meyskens FL. Polyamines and cancer: Old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4:781–92.
118. Takigawa M, Enomoto M, Nishida Y, Pan HO, Kinoshita A, Suzuki F. Tumor angiogenesis and polyamines: alpha-difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits B16 melanoma-induced angiogenesis in ovo and the proliferation of vascular endothelial cells in vitro. *Cancer Res*. 1990 Jul 1;50(13):4131–8.
119. Bachrach U. Polyamines and cancer: Minireview article. *Amino Acids*. 2004 Jul;26:307–9.
120. Wallace HM. Targeting polyamine metabolism: a viable therapeutic/preventative solution for cancer? *Expert Opin Pharmacother*. 2007 Sep;8(13):2109–16.
121. Spothem-Maurizot M, Ruiz S, Sabattier R, Charlier M. Radioprotection of DNA by polyamines. *Int J Radiat Biol*. 1995 Nov;68(5):571–7.
122. Chiu S, Oleinick NL. Radioprotection against the formation of DNA double-strand breaks in cellular DNA but not native cellular chromatin by the polyamine spermine. *Radiat Res*. 1997 Aug;148(2):188–92.
123. Chiu S, Oleinick NL. Radioprotection of cellular chromatin by the polyamines spermine and putrescine: preferential action against formation of DNA-protein crosslinks. *Radiat Res*. 1998 Jun;149(6):543–9.
124. Douki T, Bretonniere Y, Cadet J. Protection against radiation-induced degradation of DNA bases by polyamines. *Radiat Res*. 2000 Jan;153(1):29–35.
125. Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero RA. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 15;95(19):11140–5.
126. Hosford ME, Muller JG, Burrows CJ. Spermine participates in oxidative damage of guanosine and 8-oxoguanosine leading to deoxyribosylurea formation. *J Am Chem Soc*. 2004 Aug 11;126(31):9540–1.
127. Sodem RS, Nie G, Fiala ES. 8-Aminoguanine: A base modification produced in rat liver nucleic acids by the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Chem Res Toxicol*. 1993 May;6(3):269–76.
128. Frelon S, Douki T, Ravanat J-L, Pouget J-P, Tornabene C, Cadet J. High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Measurement of Radiation-Induced Base Damage to Isolated and Cellular DNA. *Chem Res Toxicol*. 2000 Oct;13(10):1002–10.
129. Traoré DAK, El Ghazouani A, Jacquamet L, Borel F, Ferrer J-L, Lascoux D, et al. Structural and functional characterization of 2-oxo-histidine in oxidized PerR protein. *Nat Chem Biol*. 2009 Jan;5(1):53–9.
130. Klug A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:213–31.

131. Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*. 1991 May 10;252(5007):809–17.
132. Fairall L, Schwabe JW, Chapman L, Finch JT, Rhodes D. The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition. *Nature*. 1993 Dec 2;366(6454):483–7.
133. Sera T. Zinc finger domain recognition code and uses thereof. San Diego, CA; US 2003/0082561 A1.
134. Krizek BA, Amann BT, Kilfoil VJ, Merkle DL, Berg JM. A consensus zinc finger peptide: design, high-affinity metal binding, a pH-dependent structure, and a His to Cys sequence variant. *J Am Chem Soc*. 1991 Jun;113(12):4518–23.
135. Church FC, Pratt CW, Noyes CM, Kalayanamit T, Sherrill GB, Tobin RB, et al. Structural and functional properties of human alpha-thrombin, phosphopyridoxylated alpha-thrombin, and gamma T-thrombin. Identification of lysyl residues in alpha-thrombin that are critical for heparin and fibrin(o)gen interactions. *J Biol Chem*. 1989 Nov 5;264(31):18419–25.
136. Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*. 1992 Feb 6;355(6360):564–6.
137. Paborsky LR, McCurdy SN, Griffin LC, Toole JJ, Leung LL. The single-stranded DNA aptamer-binding site of human thrombin. *J Biol Chem*. 1993 Oct 5;268(28):20808–11.
138. Meyer RR, Laine PS. The single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*. 1990 Dec;54(4):342–80.
139. Krauss G, Sindermann H, Schomburg U, Maass G. *Escherichia coli* single-strand deoxyribonucleic acid binding protein: stability, specificity, and kinetics of complexes with oligonucleotides and deoxyribonucleic acid. *Biochemistry (Mosc)*. 1981 Sep;20(18):5346–52.
140. Merrill BM, Williams KR, Chase JW, Konigsberg WH. Photochemical cross-linking of the *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein to oligodeoxynucleotides. Identification of phenylalanine 60 as the site of cross-linking. *J Biol Chem*. 1984 Sep 10;259(17):10850–6.
141. Khamis MI, Casas-Finet JR, Maki AH, Murphy JB, Chase JW. Investigation of the role of individual tryptophan residues in the binding of *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein to single-stranded polynucleotides. A study by optical detection of magnetic resonance and site-selected mutagenesis. *J Biol Chem*. 1987 Aug 15;262(23):10938–45.
142. Bandyopadhyay PK, Wu CW. Fluorescence and chemical studies on the interaction of *Escherichia coli* DNA-binding protein with single-stranded DNA. *Biochemistry (Mosc)*. 1978 Sep 19;17(19):4078–85.
143. Madison AL, Perez ZA, To P, Maisonet T, Rios EV, Trejo Y, et al. Dependence of DNA-Protein Cross-Linking via Guanine Oxidation upon Local DNA Sequence As Studied by Restriction Endonuclease Inhibition. *Biochemistry (Mosc)*. 2012 Jan 10;51(1):362–9.
144. Macaya RF, Schultze P, Smith FW, Roe JA, Feigon J. Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Apr 15;90(8):3745–9.
145. Huang C-C, Cao Z, Chang H-T, Tan W. Protein-protein interaction studies based on molecular aptamers by affinity capillary electrophoresis. *Anal Chem*. 2004 Dec 1;76(23):6973–81.

146. Iki N, Yeung ES. Non-bonded poly(ethylene oxide) polymer-coated column for protein separation by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*. 1996 Apr;731(1-2):273–82.
147. Wolfe JP, Wagaw S, Marcoux J-F, Buchwald SL. Rational Development of Practical Catalysts for Aromatic Carbon–Nitrogen Bond Formation. *Acc Chem Res*. 1998 Dec;31(12):805–18.
148. Hartwig JF. Transition Metal Catalyzed Synthesis of Arylamines and Aryl Ethers from Aryl Halides and Triflates: Scope and Mechanism. *Angew Chem Int Ed*. 1998 Aug 17;37(15):2046–67.
149. Johnson F, Bonala R, Tawde D, Torres MC, Iden CR. Efficient Synthesis of the Benzo[*a*]pyrene Metabolic Adducts of 2'-Deoxyguanosine and 2'-Deoxyadenosine and Their Direct Incorporation into DNA. *Chem Res Toxicol*. 2002 Dec;15(12):1489–94.
150. Elmquist CE, Stover JS, Wang Z, Rizzo CJ. Site-Specific Synthesis and Properties of Oligonucleotides Containing C8-Deoxyguanosine Adducts of the Dietary Mutagen IQ. *J Am Chem Soc*. 2004 Sep;126(36):11189–201.
151. Gillet LCJ, Schärer OD. Preparation of C8-Amine and Acetylamine Adducts of 2'-Deoxyguanosine Suitably Protected for DNA Synthesis. *Org Lett*. 2002 Nov;4(24):4205–8.
152. Takamura-Enya T, Ishikawa S, Mochizuki M, Wakabayashi K. Chemical Synthesis of 2'-Deoxyguanosine–C8 Adducts with Heterocyclic Amines: An Application to Synthesis of Oligonucleotides Site-Specifically Adducted with 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Chem Res Toxicol*. 2006 Jun;19(6):770–8.
153. Böge N, Gräsl S, Meier C. Synthesis and Properties of Oligonucleotides Containing C8-Deoxyguanosine Arylamine Adducts of Borderline Carcinogens †. *J Org Chem*. 2006 Dec;71(26):9728–38.
154. Regulus P, Spessotto S, Gateau M, Cadet J, Favier A, Ravanat J-L. Detection of new radiation-induced DNA lesions by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM*. 2004;18(19):2223–8.
155. Douki T, Bretonniere Y, Cadet J. Protection against radiation-induced degradation of DNA bases by polyamines. *Radiat Res*. 2000 Jan;153:29–35.
156. Tsutsui H, Mochizuki T, Inoue K, Toyama T, Yoshimoto N, Endo Y, et al. High-Throughput LC–MS/MS Based Simultaneous Determination of Polyamines Including N-Acetylated Forms in Human Saliva and the Diagnostic Approach to Breast Cancer Patients. *Anal Chem*. 2013 Dec 17;85(24):11835–42.
157. Latorre-Moratalla ML, Bosch-Fusté J, Lavizzari T, Bover-Cid S, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC. Validation of an ultra high pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. *J Chromatogr A*. 2009 Nov;1216(45):7715–20.
158. Loukou Z, Zotou A. Determination of biogenic amines as dansyl derivatives in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection and characterization of the dansylated amines by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2003 May;996(1-2):103–13.
159. Byun JA, Lee SH, Jung BH, Choi MH, Moon MH, Chung BC. Analysis of polyamines as carbamoyl derivatives in urine and serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*. 2008 Jan;22(1):73–80.
160. Gines G. Nanostructures d'ADN supportées sur billes magnétiques de nouveaux outils senseurs des systèmes de réparation de l'ADN. Grenoble; 2013.

161. Tang W, Fang S. Mono-acylation of symmetric diamines in the presence of water. *Tetrahedron Lett.* 2008 Oct;49(41):6003–6.
162. Nechev LV, Kozekov ID, Brock AK, Rizzo CJ, Harris TM. DNA Adducts of Acrolein: Site-Specific Synthesis of an Oligodeoxynucleotide Containing 6-Hydroxy-5,6,7,8-tetrahydropyrimido[1,2-*a*]purin-10(3*H*)-one, an Acrolein Adduct of Guanine. *Chem Res Toxicol.* 2002 May;15(5):607–13.
163. Giese B. Electron transfer in DNA. *Curr Opin Chem Biol.* 2002 Oct;6:612–8.
164. Nomura A, Okamoto A. Photoresponsive tandem zinc finger peptide. *Chem Commun.* 2009;(14):1906.
165. Shi Y, Berg JM. A direct comparison of the properties of natural and designed zinc-finger proteins. *Chem Biol.* 1995 Feb;2(2):83–9.
166. Iacomino G, Picariello G, Sbrana F, Di Luccia A, Raiteri R, D'Agostino L. DNA is Wrapped by the Nuclear Aggregates of Polyamines: The Imaging Evidence. *Biomacromolecules.* 2011 Apr;12:1178–86.
167. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1987 Nov;81(2):459–69.
168. Alvarez JG, Storey BT. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O₂ toxicity due to lipid peroxidation. *Biol Reprod.* 1983 Jun;28(5):1129–36.
169. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.* 2002 Feb;23(1):25–43.
170. Douki T, Ravanat J-L, Pouget J-P, Testard I, Cadet J. Minor contribution of direct ionization to DNA base damage induced by heavy ions. *Int J Radiat Biol.* 2006 Jan;82(2):119–27.
171. Yuan B-F, Feng Y-Q. Recent advances in the analysis of 5-methylcytosine and its oxidation products. *TrAC Trends Anal Chem.* 2014 Feb;54:24–35.
172. Nabel CS, Manning SA, Kohli RM. The curious chemical biology of cytosine: deamination, methylation, and oxidation as modulators of genomic potential. *ACS Chem Biol.* 2012 Jan 20;7(1):20–30.
173. Dahl C, Grønbaek K, Guldborg P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2011 May 12;412(11-12):831–6.
174. Chapman JD, Reuvers AP, Borsa J, Greenstock CL. Chemical radioprotection and radiosensitization of mammalian cells growing in vitro. *Radiat Res.* 1973 Nov;56(2):291–306.
175. Roots R, Chatterjee A, Chang P, Lommel L, Blakely EA. Characterization of hydroxyl radical-induced damage after sparsely and densely ionizing irradiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1985 Feb;47(2):157–66.
176. Ravanat J-L, Douki T, Duez P, Gremaud E, Herbert K, Hofer T, et al. 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.* 2002 Nov;23(11):1911–8.

Références bibliographiques

177. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Dec 15;88(24):11003–6.
178. Genies C. Génotoxicité des mélanges d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, une classe majeure de polluants atmosphériques. Grenoble; 2013.
179. Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC, et al. DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jan 6;95(1):288–93.
180. Barbier E. Caractérisation de l'interactome protéique des lésions de l'ADN : application aux lésions d'oxydation. Grenoble; 2013.

Table des matières

Remerciements.....	3
Liste des abréviations.....	7
Avant-propos : Stress oxydant et lésions oxydatives de l'ADN.....	11
Chapitre 1 : Etude bibliographique.....	14
1 Les pontages ADN-protéines	15
1.1 Généralités sur les pontages ADN-protéines	15
1.1.1 Classification	15
1.1.2 Les agents inducteurs et les principaux mécanismes de formation des DPCs.....	17
1.1.2.1 Les pontages indirects via un « linker ».....	17
1.1.2.2 Les pontages directs induits par les radiations ionisantes (et les ERO).....	20
1.1.2.3 Les pontages par coordination avec les métaux	20
1.1.3 Méthodes d'études des pontages ADN-protéines.....	22
1.1.3.1 Les méthodes indirectes.....	23
1.1.3.2 Les méthodes directes.....	26
1.1.4 Conséquences biologiques.....	29
1.1.4.1 Effets sur la réplication de l'ADN (8).....	29
1.1.4.2 Effets sur la transcription (8).....	30
1.1.4.3 Effets mutagènes.....	30
1.1.5 Réparation des DPCs.....	31
1.1.5.1 Les principaux systèmes de réparation.....	31
1.1.5.2 Le BER : « Base Excision Repair ».....	32
1.1.5.3 Le NER : « Nucléotide Excision Repair ».....	36
1.1.5.4 La recombinaison homologue (HR).....	39
1.1.5.5 Réparation des pontages ADN-protéines par le NER et la recombinaison homologue.....	41
1.2 Structure et mécanisme de formation des pontages induits par le stress oxydant.....	44
1.2.1 Mécanisme général	44
1.2.2 Formation d'adduits avec la thymine.....	45
1.2.3 Formation d'adduits par suroxydation de la 8-oxoguanine	47
1.2.4 Pontage sur la guanine	50
1.2.4.1 Addition radicalaire	50
1.2.4.2 Addition nucléophile.....	51

2	Les polyamines.....	58
2.1	Implications physiologiques des polyamines.....	58
2.1.1	Métabolisme	58
2.1.1.1	Biosynthèse.....	58
2.1.1.2	Catabolisme	59
2.1.1.3	Régulation du métabolisme des polyamines	60
2.1.1.4	Transport des polyamines (87,88,90,91).....	61
2.1.2	Fonctions biologiques des polyamines.....	62
2.1.2.1	Effets sur la structure de l'ADN.....	63
2.1.2.2	Régulation de l'expression des gènes.....	66
2.1.2.3	Effets sur la progression du cycle cellulaire, la croissance cellulaire et l'apoptose 68	
2.1.2.4	Polyamines et fonctions reproductrices mâles	69
2.1.3	Polyamines et cancer	71
2.1.3.1	Modification du métabolisme des polyamines lors de la cancérogenèse.....	71
2.1.3.2	Rôles des polyamines dans le développement des cancers.....	72
2.1.3.3	Les polyamines comme outil diagnostique	73
2.1.3.4	Métabolisme des polyamines et thérapeutique.....	73
2.2	Polyamines et lésions de l'ADN ?	74
2.2.1	Effet radioprotecteur des polyamines.....	74
2.2.2	Formation d'adduits avec la 8-oxoguanine	75
	Objectifs de l'étude	77
	Chapitre 2 : Partie expérimentale	79
1	Synthèse et caractérisation des standards.....	80
1.1	Réactifs.....	80
1.2	Bromation de la 2'-désoxyguanosine.....	80
1.3	Synthèse des adduits 8-polyamine-dGuo	81
1.4	Synthèse des adduits 8-lys-dGuo et 8-lys-Gua	84
1.5	Caractérisation des adduits	86
1.5.1	Détermination de la masse exacte.....	86
1.5.2	RMN et UV	86
2	Méthodes d'analyse par HPLC-MS/MS	87
2.1	Quantification des adduits 8-polyamines-dGuo.....	87
2.2	Quantification de l'adduit 8-lys-dGuo	88
2.3	Quantification de l'adduit 8-lys-Gua	88
3	Formation d'adduits dans l'ADN isolé.....	90

Table des matières

3.1	Photosensibilisation	90
3.2	Irradiation gamma	90
3.3	Exposition au rayonnement laser	90
3.4	Précipitation de l'ADN	91
3.5	Hydrolyse enzymatique des échantillons d'ADN (176)	91
3.6	Hydrolyse acide des échantillons d'ADN.....	92
4	Etude réalisée sur la lignée cellulaire THP1	93
4.1	Produits et matériel utilisés.....	93
4.2	Conditions de culture.....	93
4.3	Congélation	93
4.4	Traitement des cellules par différents agents exogènes.....	94
4.4.1	Photosensibilisation des cellules THP1	94
4.4.2	Irradiation gamma.....	94
4.4.3	Exposition au rayonnement laser à 266 nm	95
4.5	Test de cytotoxicité par le MTT.....	95
4.6	Extraction de l'ADN cellulaire.....	96
4.7	Détection des pontages ADN-protéines dans l'ADN cellulaire	97
4.7.1	Méthode des comètes (50,178)	97
4.7.2	Détection par marquage au FITC.....	98
5	Etude réalisée sur des échantillons de spermatozoïdes	99
5.1	Provenance des échantillons et réactifs	99
5.2	Exposition au rayonnement gamma.....	99
5.3	Traitement au peroxyde d'hydrogène	99
5.4	Extraction de l'ADN des spermatozoïdes	100
6	Réparation des adduits guanine-polyamines par le BER	101
7	Préparation du synthon phosphoramidite de 8-put-dGuo	103
7.1	Réactifs.....	103
7.2	Monoacétylation de la putrescine	103
7.3	Protection des hydroxyles 3' et 5' de la 8-Br-dGuo par des groupements TBDMS.....	104
7.4	Acétylation du nucléoside silylé	105
7.5	Substitution nucléophile du nucléoside silylé par la putrescine	106
7.6	Acétylation de l'adduit	107
8	Modèles de pontage peptide + oligonucléotide	108
8.1	Etude par gelshift après marquage radioactif.....	108
8.1.1	Marquage des oligonucléotides par le phosphore 32.....	108
8.1.2	Hybridation avec la séquence complémentaire et formation des G-quadruplex.....	108
8.1.3	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	109

8.2	Etude par HPLC-MS/MS.....	111
	Résultats.....	112
Chapitre 3 : Les pontages avec la lysine..... 113		
1	Introduction	114
2	Synthèse du standard	115
3	Caractérisation de l'adduit 8-lys-dGuo.....	117
3.1	Spectrométrie de masse	117
3.2	RMN.....	118
3.3	UV.....	120
4	Développement d'une méthode de quantification par HPLC-MS/MS.....	121
4.1	Le mode « MRM » : Multiple Reaction Monitoring.....	121
4.2	Optimisation des paramètres de détection par spectrométrie de masse.....	122
4.3	Optimisation des paramètres chromatographiques en HPLC-MS/MS.....	123
5	Formation d'adduits 8-lys-dGuo dans l'ADN isolé.....	125
5.1	Formation d'adduits après photosensibilisation.....	125
5.2	Formation d'adduits après irradiation par rayonnement γ	127
6	Mise au point d'une méthodologie pour détecter l'adduit lysine-guanine dans un pontage ADN-protéine.....	130
6.1	Stratégie.....	130
6.2	Synthèse du standard 8-lysine-guanine.....	130
6.3	Méthode de quantification de l'adduit 8-lys-Gua par HPLC-MS/MS.....	131
6.4	Choix des conditions d'hydrolyse.....	132
6.5	Validation de l'approche : détection de l'adduit 8-lys-Gua dans des pontages dG-KKK et dG-KYK.....	134
7	Quantification de l'adduit 8-lys-Gua dans des cellules irradiées	137
7.1	Etude après photosensibilisation.....	137
7.1.1	Viabilité cellulaire	137
7.1.2	Quantification de 8-lys-Gua et 8-oxodGuo.....	138
7.2	Etude après exposition au rayonnement ionisant	139
7.2.1	Viabilité cellulaire	139
7.2.2	Quantification de 8-lys-Gua et 8-oxodGuo.....	139
7.3	Etude après exposition à des impulsions laser à 266 nm.....	140
7.3.1	Viabilité cellulaire	140
7.3.2	Quantification de 8-lys-Gua et 8-oxodGuo.....	141
8	Détection des pontages ADN-protéines dans l'ADN cellulaire.....	143
8.1	Détection des pontages ADN-protéines par le test des comètes.....	143

8.2	Détection par marquage au FITC.....	144
9	Conclusion.....	145
Chapitre 4 : Modèles de pontages peptides-oligonucléotides 146		
1	Introduction	147
2	Le modèle « doigt de zinc CP1-Y2F + duplex 12-mer ».....	147
2.1	Présentation du modèle.....	147
2.2	Etude de la formation de pontages par Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)..	150
2.2.1	Détection du complexe par « gel shift ».....	151
2.2.2	Visualisation des pontages après photosensibilisation	152
2.3	Purification des produits de pontage	154
2.4	Caractérisation des produits de pontage par spectrométrie de masse	155
3	Les modèles « peptide + aptamère ».....	157
3.1	Présentation des modèles	157
3.1.1	Le modèle « thrombine + aptamère 15-mer »	157
3.1.2	Le modèle « Single Strand Binding protein + aptamère 49-mer»	158
3.2	Visualisation des complexes	159
3.2.1	Par gel shift.....	159
3.2.2	Par électrophorèse capillaire	160
3.3	Expérience d'irradiation	163
4	Conclusion.....	168
Chapitre 5 : Les pontages ADN-polyamines 169		
1	Introduction	170
2	Synthèse des adduits avec la putrescine, la spermidine et la spermine.....	171
2.1	Couplage pallado-catalysé de Buchwald-Hartwig	171
2.2	Substitution directe de la 8-bromo-2'-désoxyguanosine	173
2.3	Purification des adduits 8-polyamines-2'-désoxyguanosine	174
3	Caractérisation des adduits	177
3.1	RMN.....	177
3.2	Propriétés UV	178
3.2.1	Spectres d'absorption UV	178
3.2.2	Détermination du coefficient d'extinction molaire	179
3.3	Par spectrométrie de masse.....	180
3.3.1	Etude par électrospray (MS1 et MS2).....	180
3.3.2	Détermination de la masse exacte par MALDI	182
4	Optimisation d'une méthode de quantification par HPLC-MS/MS.....	184
5	Formation d'adduits dans l'ADN isolé.....	186

Table des matières

5.1	Etude de la formation d'adduits par photosensibilisation	186
5.2	Etude de la formation d'adduits par exposition au rayonnement ionisant	190
5.3	Etude de la formation d'adduits après exposition au rayonnement laser	191
6	Formation d'adduits dans l'ADN cellulaire	193
6.1	Etude réalisée sur lignée THP 1	193
6.2	Formation d'adduits dans l'ADN de spermatozoïdes	194
7	Optimisation d'une méthode de quantification plus sensible	200
7.1	Optimisation des phases mobile et stationnaire	202
7.2	Dérivation des polyamines	203
7.3	Saturation des silanols résiduels par un mix de polyamines.....	206
8	Réparation des adduits guanine-polyamines par le BER	208
9	Synthèse d'oligonucléotides modifiés	211
9.1	Stratégie de synthèse : intégration de la lésion par voie phosphoramidite	211
9.2	Choix des groupements protecteurs	212
9.3	Rétrosynthèse	214
9.4	Synthèse du synthon phosphoramidite par la voie 1	216
9.5	Synthèse du synthon phosphoramidite par la voie 2	217
10	Conclusion.....	220
Chapitre 6 : Discussion		221
1	Les pontages ADN-protéines	222
2	Les pontages ADN-polyamines	228
Conclusion & Perspectives.....		234
Références bibliographiques		239
Table des matières.....		252
Annexes		258
Annexe 1 : Liste des communications scientifiques.....		259
Annexe 2 : Article "DNA-polyamine crosslinks generated upon one electron oxidation of DNA", Chemical Research in Toxicology, 2014		260

Annexes

Annexe 1 : Liste des communications scientifiques

Publication

Silerme S., Bobyk L., Taverna-Porro M., Cuier C., Saint-Pierre C. and Ravanat J-L.

DNA-polyamine crosslinks generated upon one electron oxidation of DNA

Chemical Research and Toxicology, 2014, vol 27 (6), pp 1011–1018, (DOI: 10.1021/tx4004193).

Présentations orales

Silerme S., Saint-Pierre C., Taverna-Porro M. and Ravanat J-L.

DNA-protein and DNA-polyamine crosslinks generated upon one electron oxidation of DNA.

12th International Workshop on Radiation Damage to DNA, Prague, République Tchèque, 2-7 juin 2012.

Silerme S., Taverna-Porro M., Cuier C., Saint-Pierre C. and Ravanat J-L.

DNA-protein and DNA-polyamine crosslinks generated upon one electron oxidation of DNA.

European Young Investigator Conference, Slubice, Pologne, 26-30 juin 2013.

Posters

Silerme S., Miscioscia A., Taverna-Porro M. and Ravanat J-L.

DNA-protein and DNA-polyamine crosslinks generated upon one electron oxidation of DNA.

9th Winter Research Conference, Les Houches, France, 11-16 mars 2012.

Annexe 2 : Article “DNA-polyamine crosslinks generated upon one electron oxidation of DNA”, Chemical Research in Toxicology, 2014

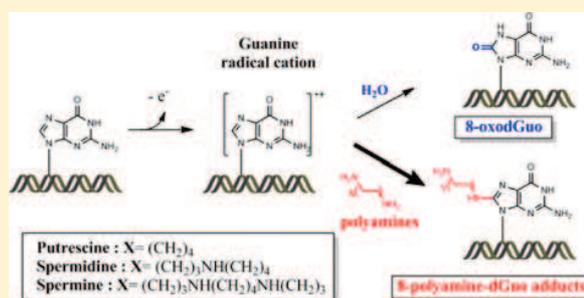
DNA-Polyamine Cross-Links Generated upon One Electron Oxidation of DNA

Stéphanie Silerme, Laure Bobyk, Marisa Taverna-Porro,[†] Camille Cuier, Christine Saint-Pierre, and Jean-Luc Ravanat*

Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques, Université Grenoble Alpes, INAC-SCIB, F-38000 Grenoble, France, CEA, INAC-SCIB, 17 rue des Martyrs, 38000 Grenoble cedex 9, France

Supporting Information

ABSTRACT: The possibility to induce the formation of covalent cross-links between polyamines and guanine following one electron oxidation of double stranded DNA has been evaluated. For such a purpose, a strategy has been developed to chemically synthesize the polyamine-C8-guanine adducts, and efforts have been made to characterize them. Then, an analytical method, based on HPLC separation coupled through electrospray ionization to tandem mass spectrometry, has been setup for their detection and quantification. Using such a sensitive approach, we have demonstrated that polyamine-C8-guanine adducts could be produced with significant yields in double stranded DNA following a one-electron oxidation reaction induced by photosensitization. These adducts, involving either putrescine, spermine, or spermidine, are generated by the nucleophilic addition of primary amino groups of polyamines onto the C8 position of the guanine radical cation. Our data demonstrate that such a nucleophilic addition of polyamines is much more efficient than the addition of a water molecule that leads to 8-oxo-7,8-dihydroguanine formation.



INTRODUCTION

The DNA molecule is constantly exposed to various kinds of genotoxic agents, including among others reactive oxygen species (ROS) produced during oxidative stress.¹ It is well established that normal cellular metabolism is a source of ROS, which may interact with DNA, leading to chemical modifications including single and double strand breaks or base and sugar lesions.² These oxidative damages could also be generated after exposure to ionizing radiation, UV light, or to different exogenous chemical agents and are known to be involved in mutagenesis and carcinogenesis.^{2,3}

For instance, photosensitization reactions are known to be able to induce oxidative DNA lesions through either the transient formation of singlet oxygen (Type II photosensitization reaction) or following a one electron oxidation reaction (Type I).⁴ The latter mechanism is one of the main processes involved in the formation of oxidized base lesions.³ Guanine is the preferential target of this reaction since it exhibits the lowest ionization potential among DNA components.⁵ Various agents and free radicals are able to abstract one electron from guanine,⁶ leading to the formation of a guanine radical cation $G^{\bullet+}$. The latter could also be produced following an electron transfer reaction from guanine to a radical cation initially generated on other DNA bases.⁷

Several nucleophilic addition reactions on the C8 position of the guanine radical cation have been already reported. The first described mechanism involves the formation of the well-known

8-oxo-7,8-dihydroguanine, through the addition of a water molecule onto C8 of guanine and subsequent oxidation of the latter generated radical.⁸ This hydration reaction could also be followed by a competitive reduction, with an opening of the imidazole ring, producing 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine.⁶ Other guanine decomposition products have been identified and are certainly generated through an initial nucleophilic addition at C8, involving either C5'-OH group,⁹ C5'-amino residues,¹⁰⁻¹² or even methanol as recently reviewed.¹³

Such a nucleophilic addition of amino or alcoholic residues onto C8 of guanine is of particular relevance in the issue of DNA-protein cross-links. In 2006, Perrier et al. described the formation of a covalent cross-link between a lysine moiety and 2'-deoxyguanosine (dGuo), after photosensitization of a TGT oligonucleotide in the presence of a trylisine peptide.¹⁴ The cross-link involves the nucleophilic addition of the ϵ amino group of the central amino acid residue of the peptide onto the C8 position of deprotonated guanine radical cation $G(-H)^{\bullet}$. Such a reaction has also been implicated in the formation of intrastrand cross-links through the addition of a neighboring thymine to $G(-H)^{\bullet}$.^{15,16} According to these observations, we hypothesized that other nucleophilic molecules would be able

Received: February 24, 2014

Published: May 5, 2014

to add to C8 of guanine upon one electron oxidation of double stranded (ds) DNA.

Thus, in the present work, attempts have been made to determine if small polyamine molecules could also be involved in such a reaction. Polyamines are organic cations localized in the nucleus of all eukaryotic cells¹⁷ at millimolar concentration ranges. They are biosynthesized by enzymatic decarboxylation of the amino acids ornithine and arginine by ornithine decarboxylase (ODC).¹⁸ It has been proposed that due to their affinity for anionic sites of nucleic acids, the polyamines' main role is to stabilize and condense DNA.¹⁹ They are also involved in several essential metabolic processes, such as regulation of RNA transcription, specific gene expression, and the progression of the cell cycle.¹⁸ They play a role in cell growth and cancer, and an increase in their cellular concentration correlates with a loss of cell proliferation control and could consequently lead to neoplasia.¹⁸ Furthermore, polyamines are present in a high concentration in several biological fluids in patients suffering from different types of cancer.²⁰ The assessment of their levels in urine, blood, or cerebrospinal liquid can be informative as a marker of tumor growth in treated patients. It has been used for the prediction of relapse as well as in the follow-up of chemotherapy efficiency.^{21,22} For these reasons, polyamines are a potential target in cancer treatment, and various inhibitors of their biosynthesis have been developed. The most studied is α -difluoromethylornithine, which is an irreversible inhibitor of ODC. Polyamine oxidase, an enzyme involved in the catabolism of polyamines, is also considered as an interesting outlook in the development of antineoplastic drugs.²³ Finally, recent studies have highlighted the interest of using a low polyamine diet in addition to chemotherapy.²⁴ Therefore, the link between polyamines and cancer has been widely described. Nevertheless, the exact mechanism in which the upregulation of their metabolism could be implicated in carcinogenesis is still unknown.

The aim of our study is to investigate the possible formation of adducts between polyamines and 2'-deoxyguanosine in dsDNA following a one electron oxidation reaction. For such a purpose, we have designed a chemical synthesis of the potentially generated DNA adducts involving either putrescine, spermine, or spermidine. In addition, we have optimized a HPLC-MS/MS method to quantify these adducts in DNA subsequent to enzymatic digestion into corresponding free nucleosides. Using such a strategy, we have demonstrated that polyamine-C8-guanine adducts could be generated following a type I photosensitization reaction involving riboflavin and UVA, a well-known approach to generate guanine radical cations²⁵ in dsDNA.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals. *N*-Bromosuccinimide, 1,4-diaminobutane (putrescine), spermidine, spermine, triethylamine, and solvents for organic synthesis were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). 2'-Deoxyguanosine (dGuo) and 2'-deoxythymidine were obtained from Pharma Waldhof (Düsseldorf, Germany), HPLC grade acetonitrile was purchased from VWR BDH Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France) and trifluoroacetic acid and heptafluorobutyric acid from Sigma-Aldrich. Enzymes for DNA digestion (nuclease P1, phosphodiesterase I and II, and alkaline phosphatase) and calf thymus DNA were purchased from Sigma-Aldrich. NMR solvents were obtained from Euriso-top (Gif-sur-Yvette, France).

Instrumentation. The HPLC-MS/MS analyses were performed with a triple quadrupole mass spectrometer TSQ Quantum Ultra from

Thermo Scientific equipped with a Thermo Accela Pump, an Accela autosampler, and an Accela photodiode array detector. The data were processed using Xcalibur software. HPLC purification was performed using an Agilent 1200 Series LC system. ¹H NMR spectra were recorded on Bruker Avance DMX 200 and Bruker Avance 500 spectrometers at 295 K in 400 μ L of either CD₃OD (isotope purity >99.8%) or D₂O (isotope purity: 99.95%).

Chemical Synthesis. *8-Bromo-2'-deoxyguanosine (8-Br-dGuo, 1)*. dGuo (4 g, 15 mmol) was suspended in a mixture of water (40 mL) and acetonitrile (160 mL). *N*-Bromo-succinimide (4g, 22.5 mmol) was added at 0 °C in three portions. The reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature and subsequently concentrated under reduced pressure. This material was then dissolved in acetone (80 mL) and stirred for 2 additional hours at room temperature. The resulting precipitate was collected by vacuum filtration with a Büchner funnel. The filtrate was rinsed twice with cold acetone and dried under vacuum to provide 3.85 g (11.1 mmol, 74%) of a slightly pink powder. This compound was used for the next reaction steps without further purification. ¹H NMR (D₂O, 200 MHz, δ): 2.13 (ddd, 1H, *J* = 2.3, 6.5, 13.6 Hz, H2''), 3.07 (ddd, 1H, *J* = 6.3, 8.1, 13.6 Hz, H2'), 3.64 (dd, 1H, *J* = 4.2, 12.0 Hz, H5''), 3.75 (dd, 1H, *J* = 3.4, 12.0 Hz, H5'), 3.89–3.95 (m, 1H, H4'), 4.48–4.54 (m, 1H, H3'), 6.30 (dd, 1H, *J* = 6.5, 8.1 Hz, H1').

8-((4-Aminobutyl)amino)-2'-deoxyguanosine (8-put-dGuo, 2). 8-Br-dGuo (1) (69 mg, 0.2 mmol) and 1,4-diaminobutane (100 μ L, 1 mmol) were dissolved in DMSO (1.2 mL). Triethylamine (135 μ L, 1 mmol) was added, and the reaction mixture was heated for 15 h at 110 °C. According to HPLC-UV monitoring, the substitution reaction afforded 25% of 8-put-dGuo. The crude material was diluted 10 times in water, neutralized with HCl, and then purified by C18 reverse phase HPLC. The elution was performed using a C18 column (Interchim upsphere 5 μ m ODB 250-4.6 mm), at a flow rate of 1 mL/min, with 0.1% trifluoroacetic acid as the mobile phase (eluent A) and a linear gradient of acetonitrile (eluent B, 0–14% over 21 min). The product which eluted at 15 min (*k'* = 3.41) was collected, concentrated, and lyophilized. ¹H NMR (D₂O, 500 MHz, δ): 1.70–1.78 (m, 4H, H_{putB,C}), 2.26 (ddd, 1H, *J* = 1.8, 6.6, 14.5 Hz, H2''), 2.77 (ddd, 1H, *J* = 6.6, 8.4, 14.5 Hz, H2'), 3.02–3.08 (m, 2H, H_{putD}), 3.34–3.42 (m, 2H, H_{putA}), 3.88 (dd, 1H, *J* = 2.3, 12.4 Hz, H5''), 3.92 (dd, 1H, *J* = 2.1, 12.4 Hz, H5'), 4.12–4.14 (m, 1H, H4'), 4.63–4.65 (m, 1H, H3'), 6.31 (dd, 1H, *J* = 6.6, 8.4 Hz, H1'). MALDI-HRMS *m/z* for C₁₄H₂₄N₇O₄⁺ ([M + H]⁺): calcd 354.1890; found 354.1883.

8-((3-((4-Aminobutyl)amino)propyl)amino)-2'-deoxyguanosine and 8-((4-((3-aminopropyl)amino)butyl)amino)-2'-deoxyguanosine (8-spd-dGuo 3a and 3b). The synthesis was performed following the same procedure as for compound 2, using 1 equiv of 8-Br-dGuo, 5 equiv of spermidine, and 5 equiv of triethylamine. The crude material was purified by HPLC, as described for compound 2, with a gradient of eluent B from 0 to 12% over 20 min. The two products **3a** and **3b** which eluted at 14.3 min (*k'* = 3.21) and 15.7 min (*k'* = 3.62), respectively, were collected. The two isomers exhibit identical ¹H NMR spectral features: ¹H NMR (D₂O, 500 MHz, δ): 1.76–1.80 (m, 3H, H_{spd}), 2.06–2.12 (m, 3H, H_{spd}), 2.34 (ddd, 1H, *J* = 2.2, 6.1, 14.3 Hz, H2''), 2.74 (ddd, 1H, *J* = 6.5, 9.1, 14.3 Hz, H2'), 3.09–3.12 (m, 4H, H_{spd}), 3.14–3.18 (m, 2H, H_{spd(C)}), 3.44–3.47 (m, 2H, H_{spd(A)}), 3.88 (dd, 1H, *J* = 2.8, 12.4 Hz, H5''), 3.94 (dd, 1H, *J* = 2.1, 12.4 Hz, H5'), 4.19–4.20 (m, 1H, H4'), 4.63–4.66 (m, 1H, H3'), 6.42 (dd, 1H, *J* = 6.1, 9.1 Hz, H1'). MALDI-HRMS *m/z* for C₁₇H₃₁N₈O₄⁺ ([M + H]⁺): calcd 411.2468; found 411.2534.

8-((3-((4-((3-Aminopropyl)amino)butyl)amino)propyl)amino)-2'-deoxyguanosine (8-spm-dGuo, 4). The synthesis was performed following the same procedure as that for compound 2, using 1 equiv of 8-Br-dGuo, 5 equiv of spermine, and 5 equiv of triethylamine. The crude material was purified by HPLC, as described for compound 2, with a gradient of eluent B from 0 to 14% over 21 min. The product which eluted at 13.8 min (*k'* = 3.06) was collected. ¹H NMR (D₂O, 500 MHz, δ): 1.36–1.39 (m, 4H, H_{spmE,F}), 1.64–1.72 (m, 4H, H_{spmB,I}), 1.94 (ddd, 1H, *J* = 2.0, 6.2, 14.3 Hz, H2''), 2.35 (ddd, 4H, *J* = 6.3, 8.6, 14.3 Hz, H2'), 2.68–2.72 (m, 8H, H_{spmC,D,G,H}), 2.74–2.77 (m, 2H, H_{spmJ}), 3.09–3.13 (m, 2H, H_{spmA}), 3.48 (dd, *J* = 2.6, 12.4 Hz, H5''),

3.53 (dd, $J = 2.4, 12.4$ Hz, H5'), 3.77–3.79 (m, 1H, H4'), 4.23–4.25 (m, 1H, H3'), 5.99 (dd, $J = 6.2, 8.6$ Hz, H1'). MALDI-HRMS m/z for $C_{20}H_{38}N_9O_4^+$ ($[M + H]^+$): calcd 468.3047; found 468.3094.

UV Characterization of Polyamine-dGuo Adducts. The concentration of the polyamine solutions was determined by quantitative 1H NMR and used for the determination of the molar extinction coefficients of the different adducts. For the 1H NMR quantification, the relaxation time t_1 of the anomeric proton of C8 polyamine adducts was measured between 2 and 3 s. Thus, acquisition was performed during 512 scans in D_2O ; the relaxation delay was set at 12 s. The concentration was calculated by comparing the integrals of the anomeric protons of the polyamine adducts to those of 2'-deoxythymidine in a calibrated solution (obtained by UV 3,0068 mM, $\epsilon = 9318$ L·mol $^{-1}$ ·cm $^{-1}$). A capillary containing a reference solution of 3-(trimethylsilyl)propionic acid sodium (Merck, Darmstadt, Germany) was inserted into each NMR tube in order to normalize integrations. The molar extinction coefficient was determined by measuring UV absorbance of the calibrated polyamine-dGuo adducts and applying the Beer–Lambert law.

UVA Irradiation and Digestion of Isolated DNA Samples. An aqueous solution of calf thymus DNA (0.1 mg/mL) containing NaCl (0.2 M), riboflavin (40 μ M), and 500 μ M of each of the three polyamines was irradiated at room temperature with a 500 W halogen lamp placed at a distance of 20 cm. The solution was kept saturated with oxygen by continuous air bubbling and maintained at room temperature by circulating water. Samples of 50 μ L (5 μ g of DNA) were collected at 0, 1, 2, 5, and 10 min. DNA was precipitated by adding 125 μ L of 100% cold ethanol and 10 μ L of NaCl (4 M), the DNA pellet was rinsed 3 times with 70% ethanol, dissolved in 50 μ L of water, and digested as follows:²⁶ to each sample of irradiated DNA (0.1 μ g/ μ L, 50 μ L), 0.025 U of phosphodiesterase II, 2.5 U of DNase II, 0.5 U of nuclease P1 in 2.5 μ L of buffer P1 (300 mM ammonium acetate and 1 mM $ZnSO_4$, pH 5.3), and 2.5 μ L of buffer MNSPDE (200 mM succinic acid, 100 mM $CaCl_2$, pH 6) were added. The samples were incubated for 2 h at 37 °C. Then, 0.015 U of phosphodiesterase I was added, together with 6 μ L of buffer Palk 10 \times (500 mM Tris and 1 mM EDTA, pH 8) and 2 U of alkaline phosphatase. The given solutions were incubated again for 2 h at 37 °C. Then, 3.5 μ L of hydrochloric acid 0.1 N was added. The resulting nucleoside mixture was then analyzed by HPLC-MS/MS.

HPLC-MS/MS Analysis. The separation of hydrolyzed nucleosides was achieved using a ODB uptisphere 3 μ m 150 \times 2.1 mm column from Interchim under linear gradient conditions as previously reported for measuring other DNA lesions.²⁷ The flow rate was set at 0.2 mL/min with 0.1% heptafluorobutyric acid in water as the mobile phase (eluent A) and acetonitrile from 0 to 45% (eluent B) over 30 min. Unmodified nucleosides were detected using a UV detector set at 280 nm. The multiple reactions monitoring mode (MRM) was used in order to detect two specific transitions for each adduct: 354.3 \rightarrow 221.2 and 354.3 \rightarrow 238.5 for 8-put-dGuo; 468.0 \rightarrow 207.2 and 468.0 \rightarrow 352.4 for 8-spm-dGuo; 411.5 \rightarrow 207.2 and 411.5 \rightarrow 221.2 for 8-spd-dGuo. Collision energies and ionization parameters have been optimized by infusing standard solutions of each adduct as reported for 8-oxodGuo.²⁸ For each series of samples, calibrated solutions of a mixture of normal nucleosides, 8-oxodGuo, or polyamine-dGuo adducts were first injected to check the sensitivity of the MS/MS system. Then, after an analysis of a maximum 12 samples, these standards were reinjected to make sure that no variation in the sensitivity of the detector occurred with time. The levels of normal nucleosides and lesions were calculated by external calibration for both UV and MS/MS detection, respectively, and results were expressed as the number of DNA lesions (8-oxodGuo or polyamine-dGuo adducts) per million normal nucleosides.

RESULTS

Synthesis of C8 Polyamine-2'-deoxyguanosine Adducts. Adducts between dGuo and polyamines (putrescine, spermidine, and spermine) have been prepared according to the strategy described in Scheme S1 (Supporting Information).

The synthesis consists first in the bromination of dGuo onto the C8 position using *N*-bromosuccinimide,²⁹ followed by the nucleophilic substitution of generated 8-Br-dGuo by the three polyamines under alkaline conditions as described previously for aromatic amines.³⁰ According to HPLC analysis, the estimated yield for the reaction was about 25%, whatever the nature of the polyamine.

The three adducts (8-put-dGuo, 8-spd-dGuo, and 8-spm-dGuo, Figure 1) were purified using C18 reverse phase HPLC.

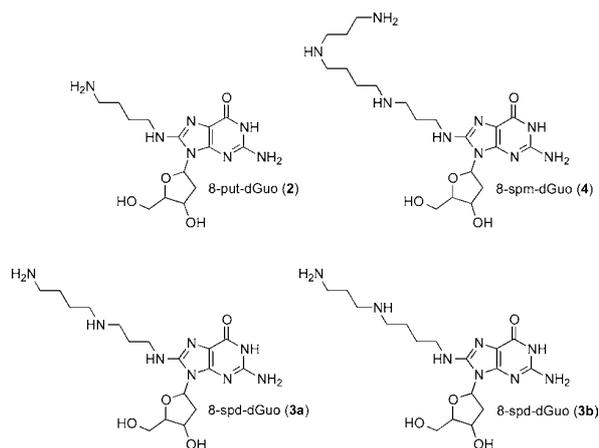


Figure 1. Chemical structures of C8 polyamine-dGuo adducts.

Interestingly, the substitution of 8-Br-dGuo by spermidine led to two possible isomers of 8-spd-dGuo (3a and 3b) with similar yields. The two isomers were isolated by HPLC purification and identified according to their fragmentation pattern (vide infra). Solutions of the three adducts were calibrated by NMR and were used as external standards for the HPLC-MS/MS determination of the amounts of adducts generated in dsDNA upon one electron mediated oxidation.

Characterization of Polyamine-dGuo Adducts. Structures of the three synthesized adducts have first been confirmed by 1H NMR. Besides hydrogen atoms of 2'-deoxyribose, on 1H NMR spectra one can observe additional signals attributed to methylene protons of the polyamine moiety. The lack of the signal corresponding to the H8 proton of the guanine base confirmed that the polyamine residues are bound to the C8 atom of guanine. Furthermore, the hydrogen atoms in the α position of the NH-guanine bond and those at the end of the polyamine chain are not equivalent confirming that one primary amino group is involved in the cross-link with C8 of guanine.

UV spectra exhibit a maximum absorption at around 260 nm (Figure S1, Supporting Information) and a shoulder at around 300 nm. A bathochromic shift is observed for the adducts compared to dGuo as was already observed for 8-lysine-2'-deoxyguanosine¹⁴ and for 8-oxodGuo. Molar extinction coefficients, determined by NMR quantification, have been found to be higher than that of the nonsubstituted 2'-deoxyguanosine and to slightly depend on the length of the polyamine chain, as shown in Table 1.

Mass spectra of the adducts in positive ionization mode (Figure 2) exhibit intense molecular ions at m/z 354, 411, and 468 for 8-put-dGuo, 8-spd-dGuo, and 8-spm-dGuo, respectively. These ions correspond to the protonated molecules $[M + H^+]$ (molecular weight = 353, 410, and 467, respectively).

Table 1. UV Spectral Features of 8-Polyamine-dGuo Adducts

compd name	λ_{\max} (nm)	ϵ (λ_{\max}) ($M^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
8-put-dGuo (2)	260	16 930
8-spd-dGuo (3a, 3b)	258	19 590
8-spm-dGuo (4)	258	20 820

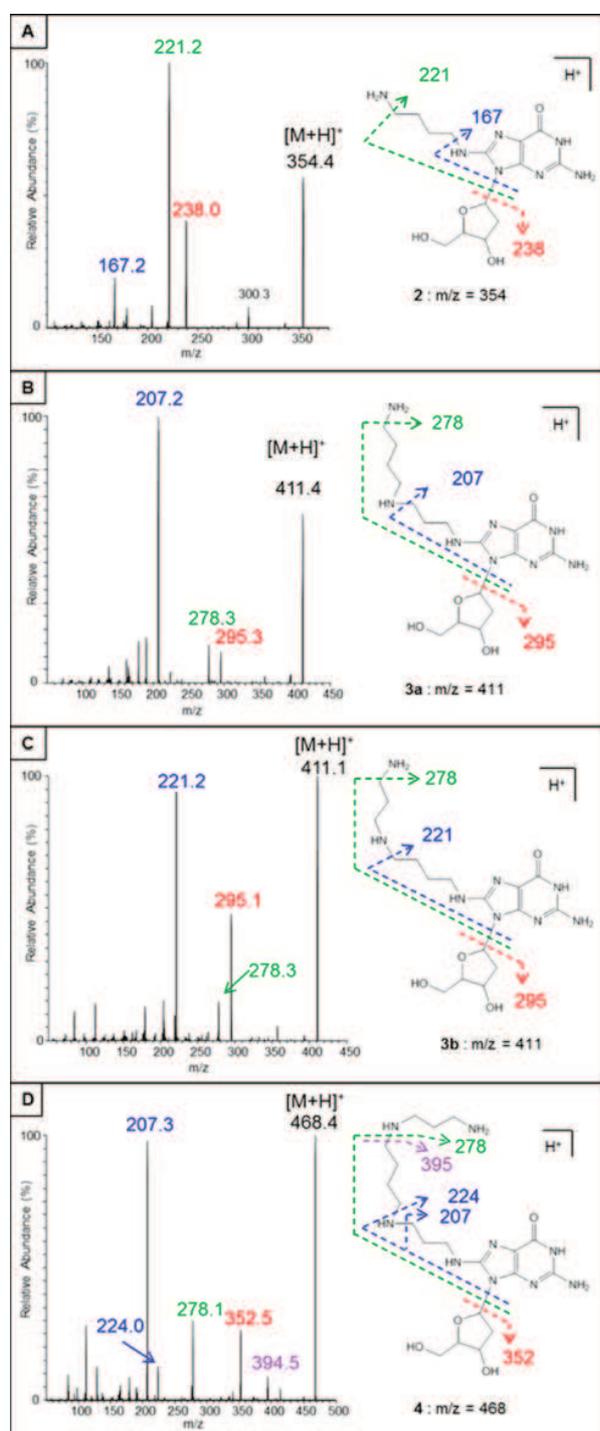


Figure 2. Collision-induced dissociation mass spectra of the $[M + H]^+$ pseudomolecular ion of the different 8-polyamine-dGuo adducts (positive ionization mode). A, 8-put-dGuo (2); B, 8-spd-dGuo 3a; C, 8-spd-dGuo 3b; and D, 8-spm-dGuo (4).

Fragmentation spectra obtained following collision induced dissociation of the pseudomolecular ion exhibit intense ions resulting from the loss of the sugar moiety (m/z 238, 295, and 352) as classically observed for 2'-deoxyribonucleosides.³¹ In addition, other ions resulting from fragmentations occurring along the polyamine chain in the α position of amino groups (m/z 221 for 8-put-dGuo; 278 and 207 for 8-spd-dGuo 3a; 278 and 221 for 8-spd-dGuo 3b; and 278, 224, and 207 for 8-spm-dGuo) are also observed. Interestingly, the two adducts 3a and 3b isolated after the substitution of 8-Br-dGuo with spermidine exhibit a different fragmentation pattern of the spermidine moiety, which is explained by the lack of symmetry of the polyamine residue, that, following the addition of one or the other amino residue, gives rise to two distinct isomers.

Development of an HPLC-MS/MS Method of Quantification. An analytical method to detect the three adducts was then developed, using HPLC coupled through electrospray ionization to tandem mass spectrometry. We used the so-called MRM mode in order to have a sensitive, specific, and quantitative detection method. Optimization of collision energies was performed for specific fragmentations of each adduct, as reported in Table 2. For the simultaneous

Table 2. Main Transitions Used for the Detection of the Different 8-Polyamine-dGuo Adducts in the Multiple Reaction Monitoring (MRM) Mode (Positive Ionization)

adduct	molecular weight	main transitions		
		precursor ion (m/z)	fragment ions (m/z)	relative intensity (%)
8-put-dGuo (2)	353.4	354.3	221.2	100
		354.3	238.5	6
8-spd-dGuo (3a, 3b)	410.5	411.5	207.2 (3a)	50
		411.5	221.3 (3b)	88
		411.5	295.2 (3a and 3b)	100
		411.5	295.2 (3a and 3b)	100
8-spd-dGuo (4)	467.6	468.0	207.2	100
		468.0	352.4	23

measurement of the three adducts we have defined common ionization parameters and optimized HPLC conditions for their separation. Strong acids, such as trifluoroacetic acid (TFA) or heptafluorobutyric acid (HBFA), were tested as the mobile phase in order to improve the chromatographic behavior of these molecules which contain primary and secondary amino groups.

To improve the specificity of detection, two main transitions were monitored simultaneously for each lesion (Figure 3), whereas normal nucleosides were quantified on line by UV detection set at 280 nm. The quantification was performed by considering the most intense transition for each adducts, and results were normalized compared to the amount of unmodified nucleosides. The second transition served as a qualifier (Table 2). For 8-spd-dGuo, the relative amounts of the two isomers were similar, and thus, the reported amounts of generated 8-spd-dGuo adducts were the sum of the two 3a and 3b isomers. The limit of detection of the assay was close to 1 pmol injected for each adduct. In parallel, 8-oxodGuo was also measured using the 284 \rightarrow 168 MRM transition as already reported.²⁸

8-Polyamine-dGuo Adduct Formation in Isolated DNA. In order to investigate the formation of 8-polyamine-2'-dGuo adducts, calf thymus dsDNA was exposed to UVA

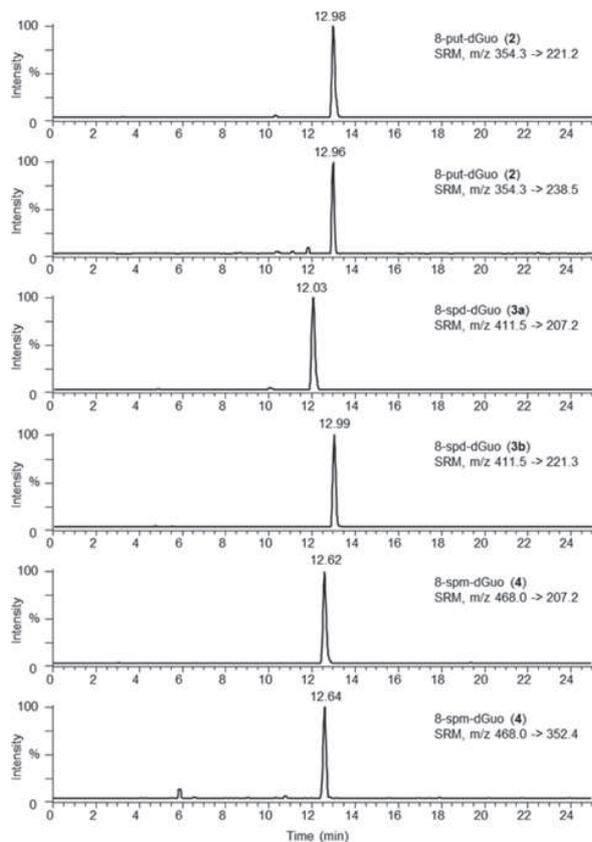


Figure 3. Typical HPLC chromatograms obtained for detection by HPLC-MS/MS of 8-polyamine-dGuo adducts. Chromatograms represent the analysis of a mixture of the 4 polyamine dGuo adducts, corresponding to the injection of 1 pmol of each adduct.

light in the presence of riboflavin. Such a photosensitization reaction is known to produce a high amount of 8-oxodGuo through the transient formation of a guanine radical cation.⁸ Thus, as expected under these conditions an increase in the level of 8-oxodGuo was observed when increasing the irradiation time. Levels as high as 5000 8-oxodGuo per million nucleosides were obtained following 10 min of irradiation (Figure 4). This photosensitization reaction was then

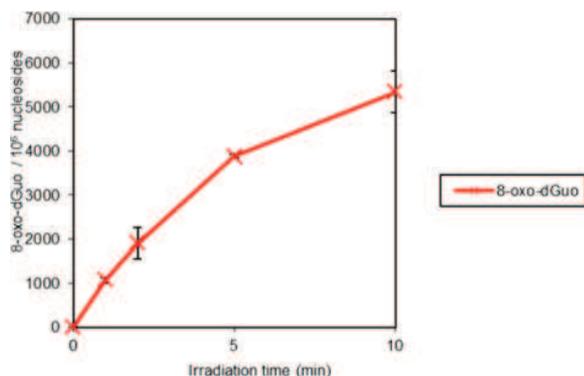


Figure 4. Kinetics of riboflavin and UVA-mediated formation of 8-oxodGuo in dsDNA. Data represent the average and standard deviation of at least three independent analyses and are expressed as the number of 8-oxodGuo per million normal nucleosides.

performed in the presence of the different polyamines at a concentration of 500 μM , which is below the concentration found in the nucleus of eukaryotic cells. Kinetics of formation of the different adducts are presented in Figure 5, for 8-put-

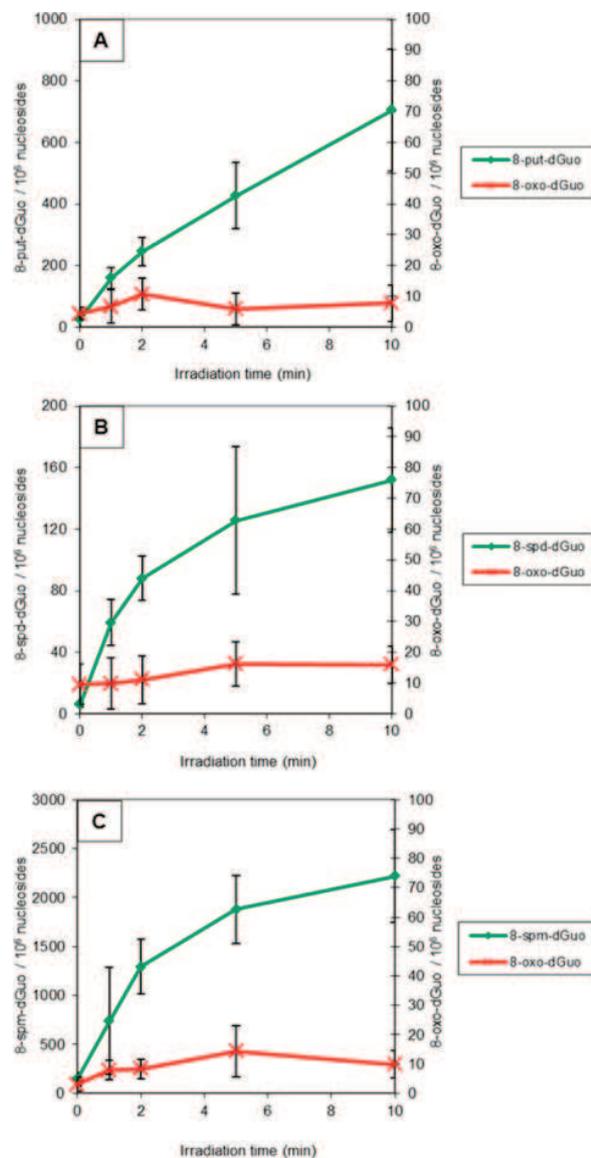


Figure 5. Kinetics of formation of 8-put-dGuo, 8-spd-dGuo, and 8-spm-dGuo in dsDNA exposed to riboflavin and UVA-mediated one electron oxidation in the presence of the corresponding polyamine at 500 μM . Data represent the average and standard deviation of at least three independent determinations and are expressed as the number of lesions per million normal nucleosides.

dGuo, 8-spd-dGuo, and 8-spm-dGuo. After 10 min of irradiation, yields of formation reach around 700, 150, and 2000 lesions per million normal nucleosides for 8-put-dGuo, 8-spd-dGuo, and 8-spm-dGuo, respectively. The kinetics of formation of adducts was almost linear with the irradiation time at least for short irradiation periods; however, a saturation occurred for long irradiation periods, as reported already for 8-oxodGuo and 8-lys-dGuo. Interestingly, when irradiation was performed in the presence of the polyamines, the yield of

formation of 8-oxodGuo was dramatically reduced (Figure 4 compared to Figure 5). Under these conditions, 8-oxodGuo formation never exceeded 20 lesions per million nucleosides. Thus, in the presence of the polyamine, the yield of formation of 8-oxodGuo was reduced by about 2 orders of magnitude, and the yield of polyamine-dGuo adducts was significantly higher than that of 8-oxodGuo, regardless of the polyamine's identity. It is notable that spermine was more prone to generate adducts compared to putrescine and spermidine.

DISCUSSION

The one electron induced oxidation of DNA is a complex process leading to the formation of numerous oxidative base damages, especially involving the guanine moiety. In this work, attempts have been made to determine the ability of polyamines, ubiquitous molecules found in contact with DNA in all eukaryotic cells, to react with the guanine radical cation, and thus to induce the formation of polyamine-guanine cross-links.

According to the literature, we anticipated that nucleophilic addition of polyamines could occur at the C8 position of $G^{\bullet+}$ or rather its deprotonated $G(-H)^{\bullet}$ form that should predominate at neutral pH to generate C8-guanine adducts. Thus, we developed a chemical synthesis of the different possible adducts, involving a nucleophilic addition of the amine onto 8-bromo-2'-deoxyguanosine, as reported previously for aromatic amines. The structure of the generated adducts was confirmed by the mean of mass spectrometry, UV, and NMR. NMR was also used to prepare calibrated solutions in order to be able to obtain quantitative data. Interestingly, spermidine being an asymmetric molecule, reaction of either the aminopropyl or aminobutyl moiety with Br-dGuo could produce the two different isomers **3a** and **3b**, respectively (Figure 1). These two isomers were undistinguishable by ^1H NMR but gave different fragmentation patterns. Indeed, when the polyamine is linked by the aminobutyl moiety, which is the case for putrescine, an intense ion at $m/z = 221$ is observed. When the cross-link involves the aminopropyl moiety, as observed for 8-spm-dGuo, an ion at 207 is detected. These ions which arose from the fragmentation of the glycosidic bond of the nucleoside and of the polyamine residue as described in Figure 3 allowed us to characterize the 8-spd-dGuo (**3a**) adduct as 8-((3-((4-aminobutyl)amino)propyl)amino)-2'-deoxyguanosine and **3b** as 8-((4-((3-aminopropyl)amino)butyl)amino)-2'-deoxyguanosine. However, since these two adducts are generated in a similar yield (not shown), reported data represent the sum of the two adducts **3a** and **3b**, named 8-spd-dGuo (**3**).

The quantification of C8 polyamine-dGuo was performed by HPLC coupled to tandem mass spectrometry in the classical MRM mode³² that provides a very low limit of detection (about 20 fmol injected for 8-oxodGuo³³). To improve specificity, two transitions were used for each lesion (Table 2). Quantification was performed by external calibration, and results were expressed as the number of lesions per million normal nucleosides quantified by UV detection set at 260 nm.

We performed type I photooxidation of dsDNA in the presence of polyamines, in order to determine if 8-polyamine-dGuo adducts are generated upon a one electron oxidation reaction. Under these conditions, we detected a significant formation of 8-put-dGuo, 8-spd-dGuo, and 8-spm-dGuo using the developed analytical HPLC-MS/MS method. Our results indicate that the three polyamines, putrescine, spermine, and spermidine, are able to react with the guanine radical cation.

We also noticed that spermine is more reactive than the other polyamines. Interestingly, we observed that formation of adducts is accompanied by a decrease in 8-oxodGuo formation. Indeed, the irradiation in the presence of a high concentration of polyamines (500 μM) was found to generate more polyamine adducts than 8-oxodGuo, especially in the case of spermine. These results highlight the competition between water and the polyamines as nucleophiles. However, the decrease in 8-oxodGuo formation is not completely compensated for by polyamine adduct formation, and thus the sum of damages (polyamine adducts + 8-oxodGuo, Figure 5) that is produced in the presence of the polyamines is lower than the yield of 8-oxodGuo (Figure 4) produced in the absence of any polyamine. This observation adds evidence to the radio-protective ability of polyamines in inhibiting the formation of 8-oxodGuo, as reported by Douki et al.³⁴

As a result, we hypothesize that the decrease in 8-oxodGuo formation could be explained by two processes: first, by the ability of polyamines to condense DNA³⁵ and in this way to protect it from oxidation; and second by the competitive nucleophilic addition of polyamines onto the guanine radical cation that reduces the yield of 8-oxodGuo formation but in the meantime produces other DNA adducts. Regarding this latter point, our data indicate that the addition of the amino group of polyamines is much more efficient than that of water. Indeed, in the presence of spermine at submillimolar concentration, the yield of 8-spm-dGuo formation is about 2 orders of magnitude higher than that of 8-oxodGuo. Interestingly, it has been demonstrated³⁵ that the B-structure of dsDNA is preserved even in the presence of high concentrations of polyamines, and thus, the decrease in 8-oxodGuo formation could not be attributed to a change in DNA structure but rather due to condensation. Moreover in the above-mentioned work, it has been shown that spermine and spermidine undergo hydrogen bonding interactions (or at least alter the existing interaction) with guanine N7, and this may explain why nucleophilic addition of one amino group of the polyamines with C8 of $G^{\bullet+}$ in dsDNA is more efficient than the addition of a water molecule to produce 8-oxodGuo. Extrapolating these observations to cells and taking into consideration that concentration of polyamines in the nuclei of eukaryotic cells is within the millimolar range, DNA-polyamine adducts might be generated in higher yield than 8-oxodGuo and thus may represent suitable biomarkers of oxidative stress. In addition, the high proportion of generated polyamine adducts compared to 8-oxodGuo could also be partly explained by the fact that these polyamines are positively charged at neutral pH and that this may favor their interaction with negatively charged DNA, promoting the formation of polyamine adducts. In that respect, we noticed that when dsDNA is photosensitized in 10 mM phosphate buffer, the yield of polyamine adduct formation is significantly reduced (data not shown) but is still higher than that of 8-oxodGuo. We have also noticed that the formation of polyamine-dGuo adducts is linear for short irradiation times but then reaches a plateau when a high amount of adduct is present in dsDNA (Figure 5). This could be certainly explained by the sensitivity of such C8 adducts to undergo secondary decomposition reactions as reported previously for 8-oxodGuo and also for the lysine-guanine adduct. Secondary decomposition reactions of the C8-polyamine-dGuo adducts probably generate spiro-related derivatives as reported for 8-oxodGuo^{36,37} through a second nucleophilic addition of polyamine at

C5. Additional work has to be performed to confirm that hypothesis.

Additional work will be performed to search for the formation of these new DNA lesions in irradiated cells. However, the limit of detection of our developed method for 8-polyamine-dGuo detection is around 1 pmol injected. Such a sensitivity is good enough to monitor the formation of these lesions in isolated irradiated DNA because the yield of cross-link formation with polyamines is relatively high. Nevertheless, in biological environments, the yield of formation of DNA lesions is generally much lower, and thus the investigation of polyamine adducts at the cellular level would require a higher sensitivity, with a limit of quantification of only a few fmol. It should be noted that the observed limit of detection for the polyamine-guanine adducts studied here is mostly explained by the nonclassical chromatographic behavior of this kind of molecule. The presence of a primary amino group in these adducts causes the compounds to elute as a broad peak, this effect being particularly important for low injected amounts (below 1 pmol under our conditions). Thus, efforts will be made to improve the sensitivity of the method, and for such a purpose, attempts to derivatize the primary free amino group are in progress.

CONCLUSIONS

This work demonstrates that polyamines are able to react onto the C8 position of guanine following one electron oxidation and that such a process generates polyamine-guanine cross-links. In the meantime, we demonstrated that the presence of polyamines inhibits the formation of 8-oxodGuo. This study suggests that besides the ability of polyamines to protect DNA from oxidation by condensation, the observed decrease of 8-oxodGuo formation in the presence of these molecules could be partially explained by the competitive formation of polyamine adducts. Thus, the observed protection effect of polyamine might be considered with caution.

Further work is in progress to improve the sensitivity of the HPLC-MS/MS method for the detection of such polyamine adducts, in order to be able to investigate their formation within cells. In addition, attempts will be made to determine their biological consequences and to identify repair mechanisms involved in the elimination of these specific DNA lesions.

The investigation of DNA-polyamine cross-links also represents a convenient model for the study of other more complex lesions involving nucleophilic addition onto C8 of the guanine radical cation or its deprotonated form. A similar strategy will be applied to search for cross-links between guanine and several amino acids, such as lysine, arginine, and serine. This outlook could be promising in the understanding of structural aspects of DNA-protein cross-links.³⁸

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Conditions for exact mass determination, general procedure for the chemical synthesis of the polyamine-C8 guanine adducts, UV absorption spectra of 8-put-dGuo compared to dGuo, and ¹H NMR spectra of 8-spm-dGuo. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +33 4 38 78 47 97. E-mail: jrvanat@cea.fr.

Present Address

[†](M.T.-P.) Department of Chemistry, Johns Hopkins University, 3400 North Charles Street, Baltimore, MD 21218.

Funding

This work was partly supported by Labex PRIMES (ANR-11-LABX-0063), COST action CM1201 "Biomimetic Radical Chemistry," and TODNAL project (ANR-09-PIRI-0022-01).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The contributions of Pierre-Alain Bayle (LRM/SCIB/CEA-Grenoble) to the NMR analysis and Hassan Kanso to the preliminary experiments are gratefully acknowledged.

ABBREVIATIONS

ROS, reactive oxygen species; dGuo, 2'-deoxyguanosine; G^{•+}, guanine radical cation; G(-H)^{•+}, deprotonated guanine radical cation; 8-Br-dGuo, 8-bromo-2'-deoxyguanosine; 8-oxodGuo, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine; 8-put-dGuo (**2**), 8-((4-aminobutyl)amino)-2'-deoxyguanosine; 8-spd-dGuo, 8-(((3-((4-aminobutyl)amino)propyl)amino)-2'-deoxyguanosine (**3a**) and 8-(((3-((3-aminopropyl)amino)butyl)amino)-2'-deoxyguanosine (**3b**); 8-spm-dGuo (**4**), 8-(((3-(((3-aminopropyl)amino)butyl)amino)propyl)amino)-2'-deoxyguanosine; ODC, ornithine decarboxylase; dsDNA, double stranded DNA; HPLC-MS/MS, HPLC coupled through electrospray ionization to tandem mass spectrometry

REFERENCES

- (1) Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–715.
- (2) Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17, 1195–1214.
- (3) Kanvah, S., Joseph, J., Schuster, G. B., Barnett, R. N., Cleveland, C. L., and Landman, U. (2010) Oxidation of DNA: damage to nucleobases. *Acc. Chem. Res.* 43, 280–287.
- (4) Foote, C. S. (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* 54, 659.
- (5) Pratiel, G., and Meunier, B. (2006) Guanine oxidation: one- and two-electron reactions. *Chem.—Eur. J.* 12, 6018–6030.
- (6) Cadet, J., Douki, T., and Ravanat, J. L. (2008) Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: Mechanistic aspects and formation in cells. *Acc. Chem. Res.* 41, 1075–1083.
- (7) Giese, B. (2002) Electron transfer in DNA. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 612–618.
- (8) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Berger, M., and Cadet, J. (1992) Photosensitized formation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in DNA by riboflavin: a non singlet oxygen mediated mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 9692–9694.
- (9) Buchko, G. W., Cadet, J., Ravanat, J.-L., and Labataille, P. (1993) Isolation and characterization of a new product produced by ionizing irradiation and type I photosensitization of 2'-deoxyguanosine in oxygen-saturated aqueous solution: (2S)-2,5'-anhydro-1-(2-deoxy- α -D-erythro-pentofuranosyl)-5-guanidinylidene-2-hydroxy-4-oxoimidazolidine. *Int. J. Radiat. Biol.* 63, 669–676.
- (10) Morin, B., and Cadet, J. (1995) Type I benzophenone-mediated nucleophilic reaction of 5'-amino-2',5'-dideoxyguanosine. A model system for the investigation of photosensitized formation of DNA-protein cross-links. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 792–799.
- (11) Morin, B., and Cadet, J. (1995) Chemical aspects of the benzophenone-photosensitized formation of two lysine-2'-deoxyguanosine cross-links. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 12408–12415.

- (12) Morin, B., and Cadet, J. (1994) Benzophenone photosensitization of 2'-deoxyguanosine: characterization of the 2R and 2S diastereoisomers of 1-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-2-methoxy-4,5-imidazolinedione. A model system for the investigation of photosensitized formation of DNA-protein crosslinks. *Photochem. Photobiol.* 60, 102–109.
- (13) Cadet, J., Douki, T., and Ravanat, J.-L. (2006) One-electron oxidation of DNA and inflammation processes. *Nat. Chem. Biol.* 2, 348–349.
- (14) Perrier, S., Hau, J., Gasparutto, D., Cadet, J., Favier, A., and Ravanat, J. L. (2006) Characterization of lysine-guanine cross-links upon one-electron oxidation of a guanine-containing oligonucleotide in the presence of a trylisine peptide. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 5703–5710.
- (15) Madugundu, G. S., Wagner, J. R., Cadet, J., Kropachev, K., Yun, B. H., Geacintov, N. E., and Shafirovich, V. (2013) Generation of guanine-thymine cross-links in human cells by one-electron oxidation mechanisms. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 1031–1033.
- (16) Rokhlenko, Y., Geacintov, N. E., and Shafirovich, V. (2012) Lifetimes and reaction pathways of guanine radical cations and neutral guanine radicals in an oligonucleotide in aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 4955–4962.
- (17) Sarhan, S., and Seiler, N. (1989) On the subcellular localization of the polyamines. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler* 370, 1279–1284.
- (18) Gerner, E. W., and Meyskens, F. L. (2004) Polyamines and cancer: Old molecules, new understanding. *Nat. Rev. Cancer* 4, 781–792.
- (19) Saminathan, M., Thomas, T., Shirahata, A., Pillai, C. K., and Thomas, T. J. (2002) Polyamine structural effects on the induction and stabilization of liquid crystalline DNA: potential applications to DNA packaging, gene therapy and polyamine therapeutics. *Nucleic Acids Res.* 30, 3722–3731.
- (20) Bachrach, U. (2004) Polyamines and cancer: Minireview article. *Amino Acids* 26, 307–309.
- (21) Moulinoux, J. P., Quemener, V., Havouis, R., Guille, F., Martin, C., and Seiler, N. (1991) Accumulation of polyamine analogs in red blood cells: a potential index of tumor proliferation rate. *Anticancer Res.* 11, 2143–2146.
- (22) Moulinoux, J. P., Quemener, V., and Khan, N. A. (1991) Biological significance of circulating polyamines in oncology. *Cell. Mol. Biol.* 37, 773–783.
- (23) Pegg, A. E., and Hu, R. H. (1995) Effect of polyamine analogues and inhibition of polyamine oxidase on spermidine/spermine N1-acetyltransferase activity and cell proliferation. *Cancer Lett.* 95, 247–252.
- (24) Demoor-Goldschmidt, C., and Raynard, B. (2009) How can we integrate nutritional support in medical oncology? *Bull. Cancer* 96, 665–675.
- (25) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Berger, M., and Cadet, J. (1992) Photosensitized formation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in DNA by riboflavin - a nonsinglet oxygen mediated reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 9692–9694.
- (26) Ravanat, J.-L., Douki, T., Duez, P., Gremaud, E., Herbert, K., Hofer, T., Lasserre, L., Saint-Pierre, C., Favier, A., and 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.
- (27) Frelon, S., Douki, T., Ravanat, J.-L., Pouget, J.-P., Tornabene, C., and Cadet, J. (2000) High performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry for the measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 1002–1010.
- (28) Ravanat, J.-L., Duret, B., Guiller, A., Douki, T., and 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* 715, 349–356.
- (29) Munzel, M., Szeibert, C., Glas, A. F., Globisch, D., and Carell, T. (2011) Discovery and synthesis of new UV-induced intrastrand C(4–8)G and G(8–4)C photolesions. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 5186–5189.
- (30) Johnson, F., Huang, C. Y., and Yu, P. L. (1994) Synthetic and oxidative studies on 8-(arylamino)-2'-deoxyguanosine and -guanosine derivatives. *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl 6), 143–149.
- (31) Regulusq, P., Spessotto, S., Gateau, M., Cadet, J., Favier, A., and 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.
- (32) Cadet, J., and Weinfeld, M. (1993) Detecting DNA damage. *Anal. Chem.* 65, 675A–682A.
- (33) Ravanat, J. L., Duret, B., Guiller, A., Douki, T., and 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* 715, 349–356.
- (34) Douki, T., Bretonniere, Y., and Cadet, J. (2000) Protection against radiation-induced degradation of DNA bases by polyamines. *Radiat. Res.* 153, 29–35.
- (35) Deng, H., Bloomfield, V. A., Benevides, J. M., and Thomas, G. J., Jr. (2000) Structural basis of polyamine-DNA recognition: spermidine and spermine interactions with genomic B-DNAs of different GC content probed by Raman spectroscopy. *Nucleic Acids Res.* 28, 3379–3385.
- (36) Johansen, M. E., Muller, J. G., Xu, X., and Burrows, C. J. (2005) Oxidatively induced DNA-protein cross-linking between single-stranded binding protein and oligodeoxynucleotides containing 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Biochemistry* 44, S660–S671.
- (37) Xu, X., Muller, J. G., Ye, Y., and Burrows, C. J. (2008) DNA-protein cross-links between guanine and lysine depend on the mechanism of oxidation for formation of C5 vs C8 guanosine adducts. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 703–709.
- (38) Barker, S., Weinfeld, M., and Murray, D. (2005) DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences. *Mutat. Res.* 589, 111–135.

Résumé

Un pontage ADN-protéine se forme lorsqu'une protéine se lie de façon covalente à l'ADN, ce qui a pour conséquence de bloquer certains processus biologiques tels que la réplication, la transcription, la réparation ou la recombinaison. Ces travaux de thèse consistent en l'étude des pontages se produisant lors d'une oxydation à un électron de l'ADN. La guanine possède le potentiel d'ionisation le plus bas parmi les composants de l'ADN; elle est donc facilement oxydée pour former un radical cation, lui-même impliqué dans la formation de nombreuses lésions oxydatives. Des travaux antérieurs ont permis de mettre en évidence la formation d'un adduit entre la guanine et la lysine, résultant de l'oxydation à un électron d'un oligonucléotide TGT en présence d'un peptide trilycine. Le mécanisme de cette réaction est une addition nucléophile de l'acide aminé central par le groupement amine ϵ , en position C8 du radical cation de la guanine. L'objectif de cette thèse a été de caractériser l'adduit guanine-lysine, de le quantifier dans l'ADN isolé puis dans l'ADN cellulaire, et d'étudier son implication dans la formation des pontages ADN-protéines. Différentes espèces nucléophiles sont capables de s'ajouter sur le radical cation de la guanine. Nous nous sommes intéressés au cas des polyamines endogènes, qui sont des cations organiques présents en particulier dans le noyau des cellules. Ces molécules interviennent dans la stabilisation et la condensation de l'ADN, mais elles participent également à de nombreux processus cellulaires. Le lien entre polyamines et cancer a été largement décrit. Cependant le mécanisme par lequel la perturbation de leur métabolisme est impliquée dans le processus de cancérogenèse reste à ce jour peu connu.

Dans un premier temps, ces lésions ont été synthétisées chimiquement, sous la forme de nucléosides modifiés, afin de les caractériser. Par la suite des méthodes de quantification de ces dommages par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem ont été développées. Ces méthodes analytiques nous ont permis de démontrer que les adduits guanine-lysine et guanine-polyamines pouvaient se former dans l'ADN isolé suite à une oxydation à un électron. Des pontages entre guanine et lysine ont été mis en évidence dans l'ADN extrait de cellules THP1 irradiées par impulsions laser à 266 nm. Nous avons ensuite développé différents modèles de pontages entre un peptide et un oligonucléotide, afin d'étudier la structure chimique du pontage, et de déterminer si celui-ci pouvait se produire entre la guanine et la lysine. Des adduits guanine-polyamines ont également été détectés dans de l'ADN extrait de spermatozoïdes. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension du rôle physiologique des polyamines ainsi que de leur implication dans la fertilité masculine.

Mot-clés : pontages ADN-protéines, polyamines, stress oxydant, photo-oxydation, HPLC-MS/MS

Abstract

A DNA-protein crosslink (DPC) occurs when a protein becomes covalently bound to DNA. This kind of lesions seems to affect several metabolic processes, including DNA replication, transcription, repair and recombination. This PhD work deals with crosslinks which are formed through a one-electron oxidation of DNA. Guanine exhibits the lowest ionization potential among DNA components, therefore it is readily oxidized leading to the formation of a radical cation, which is involved in the formation of numerous oxidative DNA lesions. In a previous study, a crosslink between guanine moiety and a lysine residue, generated subsequently to a one electron oxidation of a TGT oligonucleotide in the presence of a trilycine peptide, has been described. The mechanism of formation of this adduct relies on the nucleophilic addition of the ϵ amino group of lysine onto the C8 position of the guanine radical cation. The aim of the present work was to characterize the guanine-lysine adduct and to quantify this lesion in isolated DNA and then in cellular DNA, and to investigate their implication in DNA-protein crosslinks. Several nucleophilic species are able to react with the guanine radical cation. We focused on polyamines, which are organic cations localized in the nucleus of cells at millimolar concentration ranges. These molecules are involved in stabilization and condensation of DNA, and participate also in numerous cellular processes. The relation between polyamine and cancer has been widely described. The mechanism by which dysregulation in their metabolism is related to carcinogenesis is still unknown.

In the first part of this project, we focused on the synthesis and the characterization of these lesions as modified nucleosides. Subsequently, we have developed and optimized methods of quantification of these damages, using HPLC coupled with tandem mass spectrometry. Thanks to these analytical methods, we have demonstrated that guanine-lysine and guanine-polyamines adducts could be formed in isolated DNA following a one electron oxidation. Crosslinks between guanine and lysine have been highlighted in DNA extracted from THP1 cells exposed to laser pulses at 266 nm. We have then developed several crosslinks models between a peptide and an oligonucleotide, in order to investigate the chemical structure of the crosslink and determine whether it could occur between guanine and lysine. Guanine-polyamines adducts have also been detected in DNA extracted from sperm cells. These results open new prospects in the understanding of the physiological role of polyamines as well as their involvement in male fertility.

Keywords : DNA-protein crosslinks, polyamines, oxidative stress, photooxidation, HPLC-MS/MS