

La radiolyse de l'ADN : études expérimentales et théoriques

Résumé Étant donné les conséquences biologiques des effets du rayonnement ionisant sur l'homme, notamment en ce qui concerne les cancers radio-induits, de nombreux travaux ont été entrepris pour étudier les modifications chimiques radio-induites de l'ADN, molécule support de notre information génétique. La radiolyse de l'ADN a donc consisté à étudier la structure chimique et les mécanismes de formation de ces dommages, appelés lésions, et à les rechercher au niveau cellulaire. Un très grand nombre de lésions différentes ont ainsi été mises en évidence *in vitro* et des propositions ont été faites pour expliquer leur mécanisme de formation impliquant des réactions radicalaires. Des approches de chimie théorique ont alors été d'une grande aide pour confirmer ou infirmer ces mécanismes, montrant qu'une collaboration entre expérimentateurs et théoriciens est primordiale. Cette complémentarité est illustrée par des exemples concrets récents soulignant ainsi la complexité des mécanismes qui peuvent être mis en jeu, notamment au niveau de l'ADN double-brin.

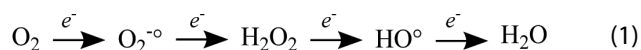
Mots-clés Radiolyse, lésions de l'ADN, chimie radicalaire, chimie théorique.

Abstract Radiation damage to DNA: experimental and theoretical approaches

Ionizing radiations are harmful to human and in particular are known to induce cancers. Thus, a considerable amount of work has been carried out to determine the effects of ionizing radiation on DNA, the biopolymer that supports our genetic information. Nowadays, several DNA lesions have been identified and works have been initiated to search for the presence of such lesions in cellular DNA. According to experimental data, mechanisms of formation of radiation-induced DNA lesions have been hypothesized. In addition, theoretical approaches were found to be particularly helpful to confirm or not such mechanisms. The complementarity of experimental and theoretical approaches in delineating the mechanism of formation of radiation-induced DNA lesions is illustrated using recent examples highlighting the complexity of radical chemical reactions taking place especially in double-stranded DNA.

Keywords Radiation chemistry, DNA damage, radical chemistry, theoretical chemistry.

La molécule d'ADN (acide désoxyribonucléique), support de l'information génétique, est continuellement modifiée par des agents exogènes ou endogènes, qualifiés d'agents génotoxiques car susceptibles de modifier notre patrimoine génétique. Savoir comment ces modifications chimiques de la molécule d'ADN peuvent être formées suite à un stress est par conséquent une priorité afin de mieux comprendre leurs conséquences biologiques. Parmi tous les agents génotoxiques, une attention particulière a été portée au stress oxydatif. Ce stress peut induire des réactions radicalaires de l'ADN par le biais des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Nos organismes aérobies tirent leur énergie de la réduction de l'oxygène en eau. Cette réduction nécessite quatre électrons et est effectuée dans les mitochondries de nos cellules en plusieurs étapes successives, comme illustré dans l'équation (1) :



La majeure partie de l'oxygène que nous respirons est ainsi réduite en eau, ce qui permet de produire de l'énergie sous la forme d'ATP (adénosine triphosphate). Cependant, une faible proportion de cet oxygène moléculaire n'est pas réduite complètement, conduisant alors à la formation d'ERO telles que le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , l'eau oxygénée) et le radical hydroxyle (HO^\bullet). Ces ERO, et notamment HO^\bullet , qui sont continuellement produites dans nos cellules, peuvent réagir avec les molécules biologiques et ainsi les endommager en modifiant leur structure chimique ; c'est ce que l'on appelle le stress oxydatif endogène. La réactivité du radical hydroxyle est liée à la présence d'un électron célibataire qui cherche justement à ne pas rester célibataire,

ce qui le rend très réactif. Nos cellules ont développé des systèmes dits « antioxydants », enzymatiques ou non, afin de réduire l'effet délétère de ces ERO pour éviter l'endommagement des biomolécules. En dehors du stress oxydatif endogène, les ERO peuvent également être produites par d'autres processus exogènes, comme la lumière UV-visible ou le rayonnement ionisant. Par exemple, l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), correspondant à un état excité de l'oxygène moléculaire (qui peut être assimilé à un bi-radical), peut être produit par des réactions de photosensibilisation, impliquant l'excitation par le rayonnement UV ou visible d'une molécule appelée photosensibilisateur. Le photosensibilisateur dans son état excité est alors capable de transférer son excédent d'énergie à l'oxygène moléculaire et ainsi produire l'oxygène singulet. $^1\text{O}_2$ est réactif vis-à-vis des molécules riches en électrons, comme l'ADN. Le rayonnement ionisant, comme son nom l'indique, est également capable de produire des espèces réactives de l'oxygène via la radiolyse des molécules d'eau, ou peut directement induire une oxydation à un électron des molécules biologiques, notamment l'ADN. Ceci explique que de très nombreux travaux ont été entrepris afin d'étudier les modifications chimiques induites par les ERO sur l'ADN et leurs conséquences biologiques [1-2].

Études des dommages de l'ADN induits par les radiations ionisantes

Approches expérimentales

D'un point de vue moléculaire, les effets d'un rayonnement ionisant peuvent être directs, en induisant une oxydation de l'ADN en une seule étape, par l'éjection d'un électron. Lorsque

cet effet se produit sur les molécules d'eau omniprésentes dans le milieu biologique, l'effet est dit « indirect ». Il conduit à l'ionisation de molécules de H₂O et à la production d'ERO, notamment du radical hydroxyle. Pour comprendre l'effet du rayonnement ionisant sur l'ADN, il est donc nécessaire d'identifier et d'étudier les modifications chimiques de la molécule d'ADN produites par ces réactions. Dans cet objectif, l'approche expérimentale a été utilisée [3-4]. Elle consistait à étudier les effets des radiations sur les quatre nucléosides impliqués dans l'ADN (deux bases puriniques, adénine et guanine, et deux bases pyrimidiniques, thymine et cytosine) indépendamment les uns des autres. En effet, l'ADN est une chaîne polymère formée de ces quatre motifs élémentaires, répétés des milliards de fois. En pratique, ces nucléosides solubilisés en milieu aqueux étaient irradiés avec des rayonnements ionisants, avec des doses assez élevées pour pouvoir isoler des quantités suffisantes de nucléosides modifiés formés lors de l'irradiation. Les nucléosides chimiquement modifiés, appelés lésions de l'ADN, ont ensuite été séparés par chromatographie. Des techniques de physico-chimie ont aussi été utilisées pour déterminer la structure de ces lésions. La difficulté d'identification des produits radio-induits provenait également de leur faible rendement de formation, du nombre important de produits différents et de leur forte polarité qui les rend difficiles à purifier, notamment par chromatographie liquide (HPLC). Ceux qui ont été isolés en assez grande quantité ont pu être caractérisés et identifiés par des techniques de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire (RMN). En parallèle, des mécanismes réactionnels ont été proposés pour tenter d'expliquer les réactions radicalaires mises en jeu pour former ces différentes lésions. Ces propositions s'appuyaient également sur des résultats de spectrométrie résolue dans le temps pour identifier les espèces radicalaires transitoirement formées lors de l'irradiation [5]. Enfin, des approches analytiques ont été développées [6] pour permettre de rechercher les produits ainsi identifiés dans l'ADN double-brin exposé au rayonnement ionisant (qui était hydrolysé après irradiation en nucléosides), puis, si la sensibilité de la méthode le permettait, dans l'ADN cellulaire après son extraction.

Approches théoriques

Les méthodes de modélisation moléculaire employées pour étudier les réactions d'endommagement de l'ADN reposent sur l'utilisation de la dynamique moléculaire, dans laquelle l'évolution structurale peut être suivie sur les bases des lois de Newton (mécanique classique) et à l'aide de paramètres spécifiques regroupés dans un champ de forces. Elles permettent de proposer des structures d'oligonucléotides contenant une lésion ou d'oligonucléotides non endommagés mais mis en présence de réactifs oxydants ou de photosensibilisateurs. Il est également possible de décrire une voie réactionnelle en explicitant quels atomes sont traités avec un hamiltonien électronique au moyen de dynamiques multi-échelles [7]. La précision de ces méthodes s'est continuellement améliorée depuis les travaux pionniers de Warshel, Levitt et Karplus et permet désormais la comparaison avec des données expérimentales. Si les dynamiques moléculaires classiques peuvent être menées sur des systèmes comportant des centaines de milliers d'atomes (e.g. un nucléosome), elles restent limitées dans le temps (typiquement de 1 à 10 microsecondes). Des méthodes récentes permettent cependant de biaiser les simulations (métadynamique, échange de répliques...) pour

assurer un meilleur échantillonnage conformationnel. Cela permet de sonder des événements biologiques complexes, comme le repliement de structures originales de G quadruplexes, de tétraboucles d'ADN et des queues d'histones autour du nucléosome [8].

Réaction de la guanine avec l'oxygène singulet

Pour illustrer la difficulté d'identification des lésions de l'ADN, nous allons nous intéresser dans un premier temps à la réaction de l'oxygène singulet ¹O₂ avec l'ADN. Même si cette ERO n'est pas produite par le rayonnement ionisant, mais plutôt par des réactions de photosensibilisation, son étude paraissait a priori plus simple, notamment parce que dans l'ADN, ¹O₂ ne réagit qu'avec la base guanine. Cependant, la réactivité de ¹O₂ avec la guanine n'est pas très efficace et les produits formés sont très polaires et donc difficile à isoler. Au début des années 1990, les produits issus de la réactivité de ¹O₂ avec la 2'-désoxyguanosine (dGuo) ont pu être isolés, notamment en développant de nouvelles conditions de séparation par HPLC [9]. Les deux principaux produits ainsi isolés, qui sont les deux diastéréoisomères de la 4-OH-8-oxodGuo, ont été caractérisés par des approches physico-chimiques incluant la spectrométrie de masse et la RMN de différents noyaux. À partir des résultats de ces analyses, une structure et un mécanisme ont été proposés pour décrire la réactivité de ¹O₂ avec la dGuo (*figure 1*) [10]. Ce mécanisme implique l'addition de ¹O₂ sur deux doubles liaisons conjuguées par une addition [2+4] de type Diels-Alder bien établie pour décrire la réactivité de ¹O₂ avec les diènes conjugués. Le 4,8-endoperoxyde ainsi produit, qui avait été identifié par RMN à basse température [11], est instable à température ambiante et sa décomposition conduit à la formation des deux diastéréoisomères de la 4-OH-8-oxodGuo par rupture de la liaison O-O. Une autre voie de décomposition (rupture de la liaison C-O) peut également expliquer la formation de 8-oxodGuo, modification produite de façon minoritaire au niveau du nucléoside isolé. De plus, il a également été montré que la 8-oxodGuo peut réagir avec ¹O₂ pour former différents nucléosides, et notamment les deux diastéréoisomères des spironucléosides (dSp) indiqués *figure 1*. Comme la 8-oxodGuo est environ cent fois plus réactive que la dGuo, la formation de 8-oxodGuo par réaction de dGuo avec ¹O₂ reste minoritaire alors que ses produits de suroxydation sont formés en quantités non négligeables, ce qui a compliqué l'identification des produits primaires. Cependant, il a été montré expérimentalement que dans l'ADN double-brin, la formation de 8-oxodGuo devient majoritaire.

Tout semblait donc simple et en accord avec la réactivité connue de l'oxygène singulet jusqu'à ce qu'une dizaine d'années plus tard, il soit montré que les deux produits majoritairement formés par réaction de ¹O₂ avec dGuo sont en fait les deux diastéréoisomères des dSp et non les 4-OH-8-oxodGuo [12]. Ces informations remettaient en question le mécanisme de formation de ces deux nucléosides oxydés impliquant l'oxygène singulet, car si les dSp avaient été identifiés comme étant issus de l'oxydation à un électron de la 8-oxodGuo, expliquer leur formation par réaction de ¹O₂ avec dGuo n'était pas trivial. La complexité grandissait encore quand il a été montré un peu plus tard que les composés dSp et 4-OH-8-oxodGuo étaient en fait formés conjointement lors de l'oxydation de la dGuo avec l'oxygène singulet, mais qu'il était de surcroît très difficile de les séparer

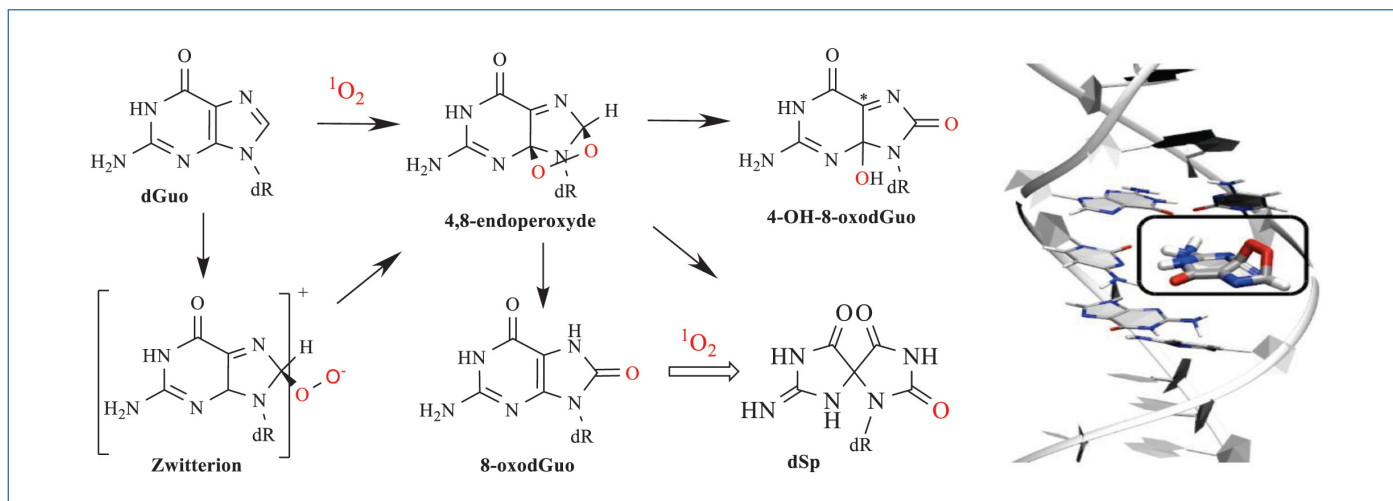


Figure 1 - À gauche : mécanismes réactionnels proposés pour la réactivité de l'oxygène singulet avec la dGuo et son produit d'oxydation, la 8-oxodGuo. À droite : 4,8-endopéroxyde au sein d'une hélice d'ADN, obtenu par simulations QM/MM.

expérimentalement. D'autre part, le mécanisme de formation de 4-OH-8-oxodGuo initialement proposé, impliquant l'addition de $^1\text{O}_2$ sur la guanine via une réaction type Diels-Alder, n'expliquait pas l'absence de réactivité avec les autres bases puriniques, et en particulier l'adénine qui possède le même cycle imidazole.

Pour mieux comprendre la réactivité de $^1\text{O}_2$ avec l'ADN, des études théoriques ont alors été initiées et ont apporté de nouvelles informations pertinentes [13-14]. La modélisation a tout d'abord permis de modéliser l'attaque de l'oxygène singulet sur une guanine et une adénine implicitement solvatées, ce qui a mis en évidence une barrière énergétique significativement plus grande pour l'adénine, en lien avec les données expérimentales, et que nous avons pu attribuer à un transfert de charge important entre la guanine et $^1\text{O}_2$ lors de l'approche de ce dernier, produisant dans un premier temps un zwitterion. La première étape de réaction, qui n'est donc pas de type Diels-Alder, implique l'addition d'un des deux atomes d'oxygène sur le carbone en position 8 de la purine ; le zwitterion ainsi produit est stabilisé par le potentiel d'oxydation bas de la guanine. Ceci permet d'expliquer la réactivité préférentielle de $^1\text{O}_2$ avec cette base nucléique. L'endopéroxyde est ensuite formé par cyclisation du zwitterion. L'addition de $^1\text{O}_2$ sur une guanine située au milieu d'un dodécamère en formant un intermédiaire endopéroxyde se fait très facilement, mais l'évolution vers les dérivés spironucléosides est bloquée par l'environnement hydrophobe de l'ADN et par l'éloignement des molécules d'eau que nous avons identifiées comme étant impliquées dans le mécanisme de formation du dérivé dSp (figure 1). Ceci est en accord avec les données expérimentales qui ont montré que dans l'ADN double-brin, contrairement à ce qui est observé avec le nucléoside libre, la formation des dSp est minoritaire par rapport à la 8-oxodGuo.

Formation des lésions en tandem de l'ADN

Comme mentionné au début, l'identification des lésions de l'ADN a été entreprise en utilisant les nucléosides comme composés modèles. Cette simplification ne permet cependant pas d'étudier les éventuelles réactions des radicaux initialement formés, ou de leurs éventuels intermédiaires de décomposition, avec les nucléosides voisins de l'ADN double-brin.

Par conséquent, il n'est pas exclu que des lésions pouvant se former dans l'ADN double-brin, voire dans l'ADN cellulaire qui est compacté autour de protéines, n'aient pas encore été identifiées.

En effectuant des travaux sur de courts fragments d'ADN appelés oligonucléotides, plusieurs lésions dites « en tandem » ont été identifiées. Ce type de dommage est constitué de deux modifications de bases de l'ADN adjacentes, d'où le nom de « en tandem ». Les premiers travaux sur ces lésions ont montré que leur formation ne résultait pas de deux événements individuels car la quantité formée était proportionnelle à la dose de radiation. Les premières lésions identifiées étaient des pontages covalents entre deux bases nucléiques adjacentes, obtenus par irradiation en absence d'oxygène [15]. Ces travaux montraient donc bien que les radicaux formés dans l'ADN peuvent réagir avec des bases voisines. Ces phénomènes ne pouvaient pas être mis en évidence en travaillant avec les nucléosides isolés. Ainsi, il a été montré qu'il était possible de former un pontage covalent entre une pyrimidine et une purine situées sur le même brin d'ADN (figure 2). Le mécanisme proposé impliquait dans un premier temps la formation d'un radical pyrimidinique, localisé sur le C5 de la cytosine ou sur le groupement méthyle de la thymidine [16]. Ce radical, en absence d'oxygène, peut alors réagir avec le C8 d'une purine adjacente pour former les pontages G^AT (ou G^AC), comme illustré dans la figure 2. Néanmoins, il est connu que les radicaux carbo-centrés réagissent rapidement avec l'oxygène, ce qui devrait empêcher la réaction de pontage avec les bases voisines. Cependant, des lésions en tandem impliquant deux bases oxydées de l'ADN positionnées l'une à côté de l'autre ont été également mises en évidence sous irradiation en présence d'oxygène [17]. Dans un premier temps, des lésions en tandem impliquant la formylamine (dF, issue de la décomposition d'une pyrimidine) et la 8-oxodGuo ont été détectées à la suite d'une irradiation de l'ADN double-brin en milieu aéré (figure 2). L'approche analytique mise en œuvre a permis de montrer que la formation de cette lésion en tandem dF/8-oxodGuo représentait environ 10 % de la formation de 8-oxodGuo totale, ce qui semblait être déjà beaucoup. De plus, un fort effet de séquence avait été observé, avec une plus forte proportion de lésions en tandem lorsque la purine oxydée est localisée en 5' de la pyrimidine. Peu après, il a été montré que la formation de lésions en

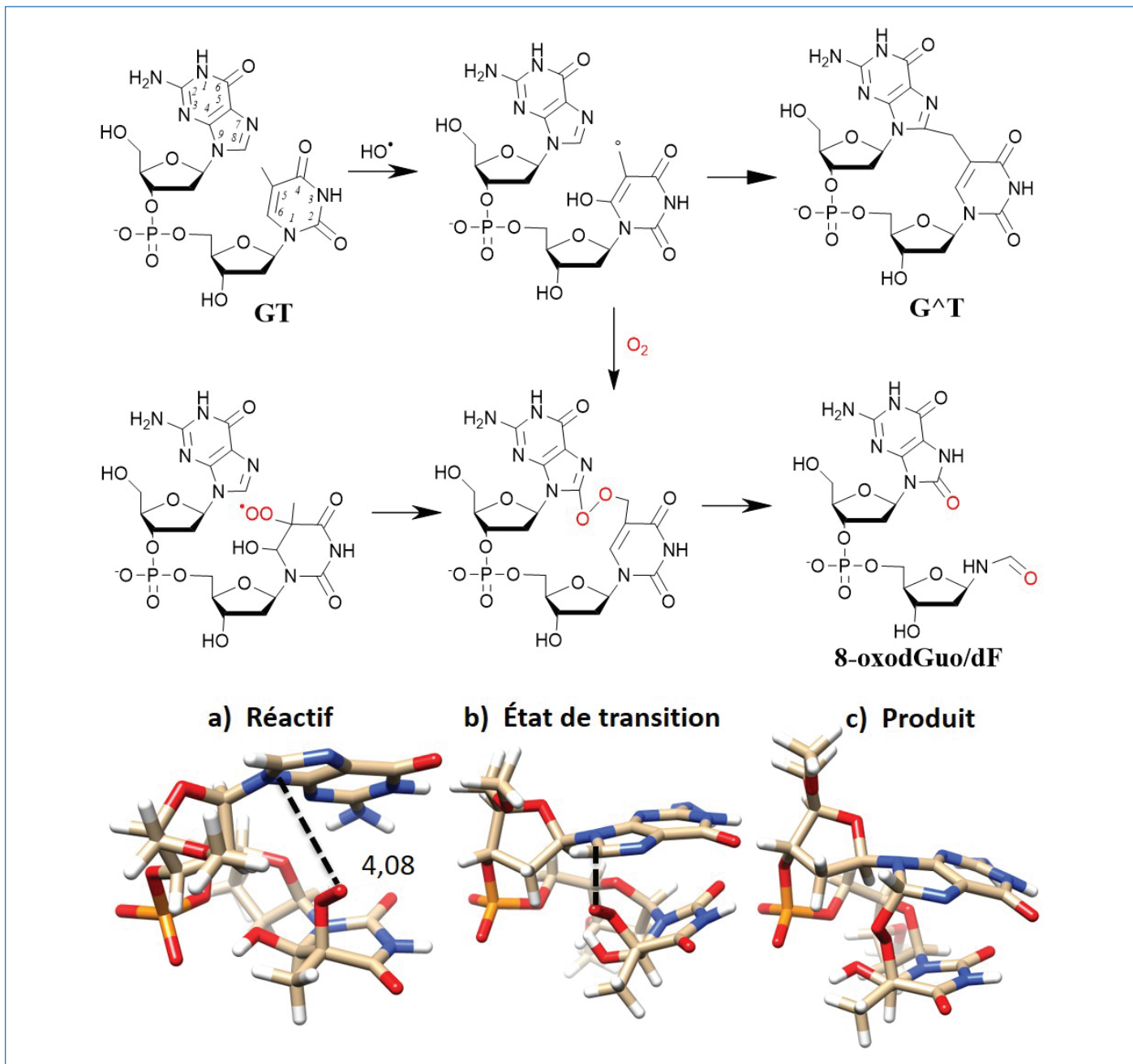


Figure 2 - En haut : mécanismes réactionnels conduisant à la formation de lésions tandem, G^{AT} en absence d'oxygène et 8-oxodGuo/dF en présence de O_2 , dans une séquence d'ADN GC. En bas : formation du pontage entre la 5-hydroperoxylthymidine et le carbone C8 d'une purine adjacente.

tandem impliquant la 8-oxodGuo représentait dans l'ADN isolé double-brin au moins 50 % de la formation de la 8-oxodGuo totale. De façon plus générale, il a été même démontré que le mécanisme initialement proposé pour la formation de la 8-oxodGuo impliquant l'addition du radical HO^\bullet en position 8 de la base guanine est très minoritaire, car seulement 10 % de la 8-oxodGuo produite est formée par ce mécanisme [18]. Ces informations ont permis pour la première fois d'expliquer la formation majoritaire de 8-oxodGuo par rapport à la 8-oxodAdo. Pour expliquer la formation de ces lésions en tandem, il a été proposé, sans preuve expérimentale, que le radical peroxyde formé par réaction d'un radical pyrimidinique avec l'oxygène moléculaire est capable de s'ajouter sur la position 8 d'une purine voisine. Cette hypothèse a été confortée par des approches théoriques [19-20] qui ont notamment mis en évidence la préférence de réactivité des radicaux peroxyde avec la guanine par rapport à l'adénine et ont permis d'expliquer l'effet de séquence.

L'un des avantages d'une approche numérique a été de comparer au même niveau de théorie trente-deux chemins réactionnels pour appréhender cette chimie combinatoire. La distance d'approche entre le radical initialement formé et le C8 d'une purine s'avère un des facteurs qui induit une première différence de réactivité. Elle vient s'ajouter à des différences de réactivité intrinsèques entre nucléobases (la guanine étant plus réactive que l'adénine), également mises en évidence par les calculs basés sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT). Les modélisations permettent notamment de suivre la délocalisation du caractère radicalaire le long du chemin de réaction. Un dernier facteur entrant en jeu pour établir une hiérarchie de la facilité de formation de ces adduits est la contrainte mécanique s'exerçant lors de la formation de la liaison covalente inter-nucléobases. Les simulations multi-échelles soulignent d'ailleurs la flexibilité structurale dont bénéficie l'ADN pour se déformer et ainsi faciliter la formation de ces lésions intra-brins.

Pontages inter-brins

En utilisant une méthode basée sur la spectrométrie de masse permettant de détecter sans a priori tous les nucléosides, une nouvelle lésion radioinduite de l'ADN, jusqu'alors non encore identifiée, a été mise en évidence dans de l'ADN double-brin exposé au rayonnement ionisant [21-22]. La première surprise était que cette lésion avait un poids moléculaire (341 uma) beaucoup plus élevé que les nucléosides normaux et qu'elle existait sous la forme de quatre diastéréoisomères. Encore plus surprenant, cette lésion de l'ADN n'était pas formée lorsque l'on exposait le mélange des quatre nucléosides constituant l'ADN à du rayonnement ionisant, ce qui signifie que la structure double-brin de l'ADN est nécessaire à sa formation. Identifier cette lésion qui ne pouvait pas être produite en grande quantité n'a pas été simple, de sorte que l'approche a consisté à étudier dans quelles conditions expérimentales la lésion pouvait être produite afin de pouvoir proposer un mécanisme. Le mécanisme émis impliquait la formation transitoire d'un aldéhyde réactif pouvant réagir avec la cytosine pour produire un adduit. L'aldéhyde en

question a alors été synthétisé chimiquement et sa réaction avec la cytosine a permis de confirmer le mécanisme, et également de produire en grande quantité les quatre diastéréoisomères du nucléoside modifié dont la structure a été déterminée à l'aide de la RMN. Le mécanisme de formation de cette lésion, appelée dCyd341, est décrit dans la figure 3. Il montre pour la première fois qu'une espèce réactive, ici un aldéhyde, est capable de réagir avec des bases voisines pour former des pontages covalents, notamment avec le brin complémentaire, produisant ainsi des pontages inter-brins, difficilement réparables par les cellules. Néanmoins, l'approche expérimentale qui avait été utilisée ne permettait pas de confirmer que le pontage impliquait les deux brins ; une étude théorique a alors été initiée pour confirmer cette hypothèse et étudier la réactivité de l'aldéhyde au sein d'une double hélice d'ADN [23].

L'hypothèse d'une réaction de l'aldéhyde avec la 2-déoxycytidine (dCyd) a pu être validée par dynamique moléculaire. Nos simulations ont permis de suivre le repositionnement de l'aldéhyde au sein d'un oligonucléotide de treize paires de bases. L'aldéhyde peut soit chercher à créer des interactions

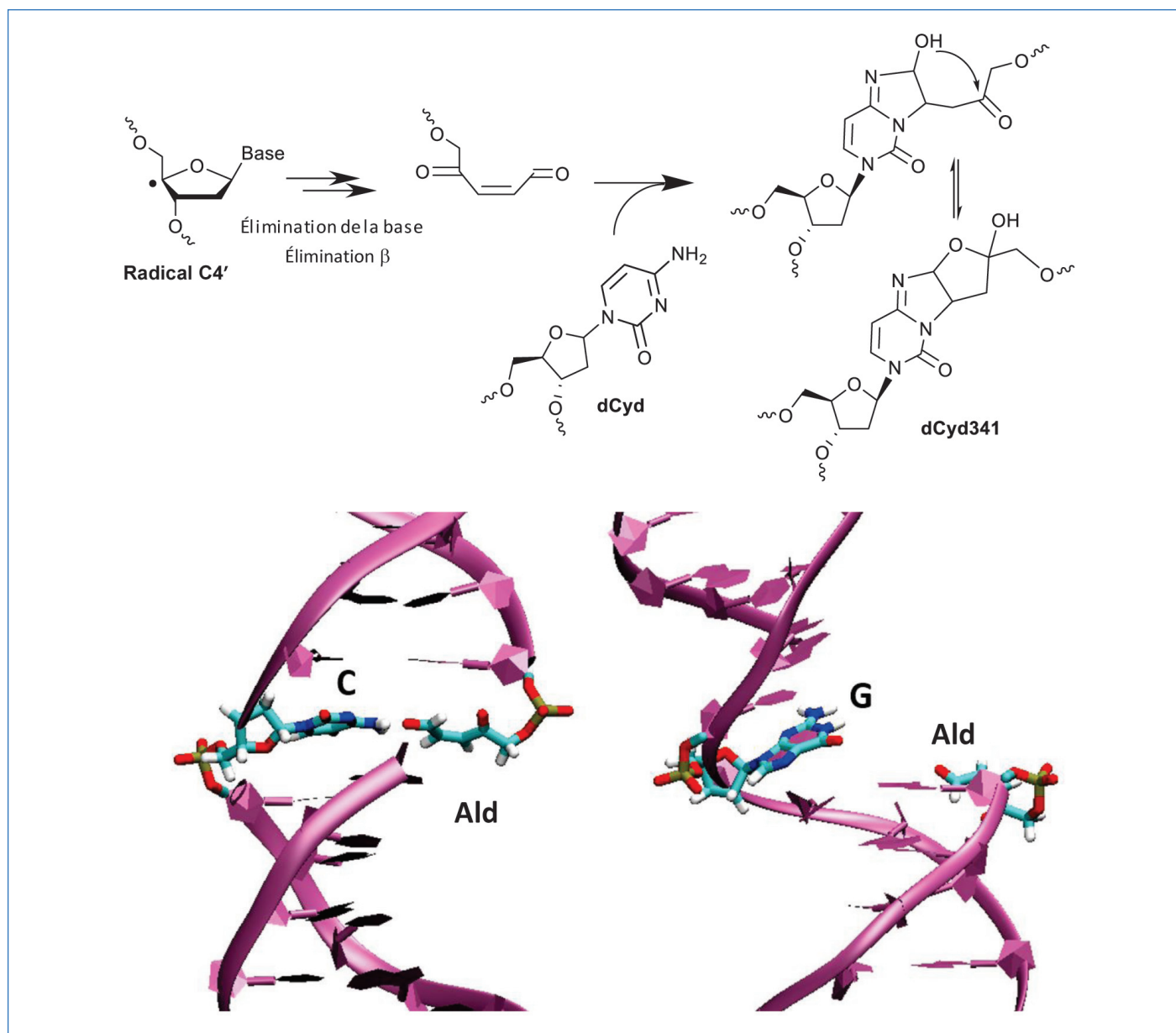


Figure 3 - En haut : mécanisme de formation de la lésion dCyd341 suite à une formation initiale du radical C4' et du dérivé aldéhydique. En bas : positionnement du dérivé aldéhydique (Ald) au sein d'une double hélice d'ADN, contenant sur le brin complémentaire une cytosine (C, à gauche) ou une guanine (G, à droite).

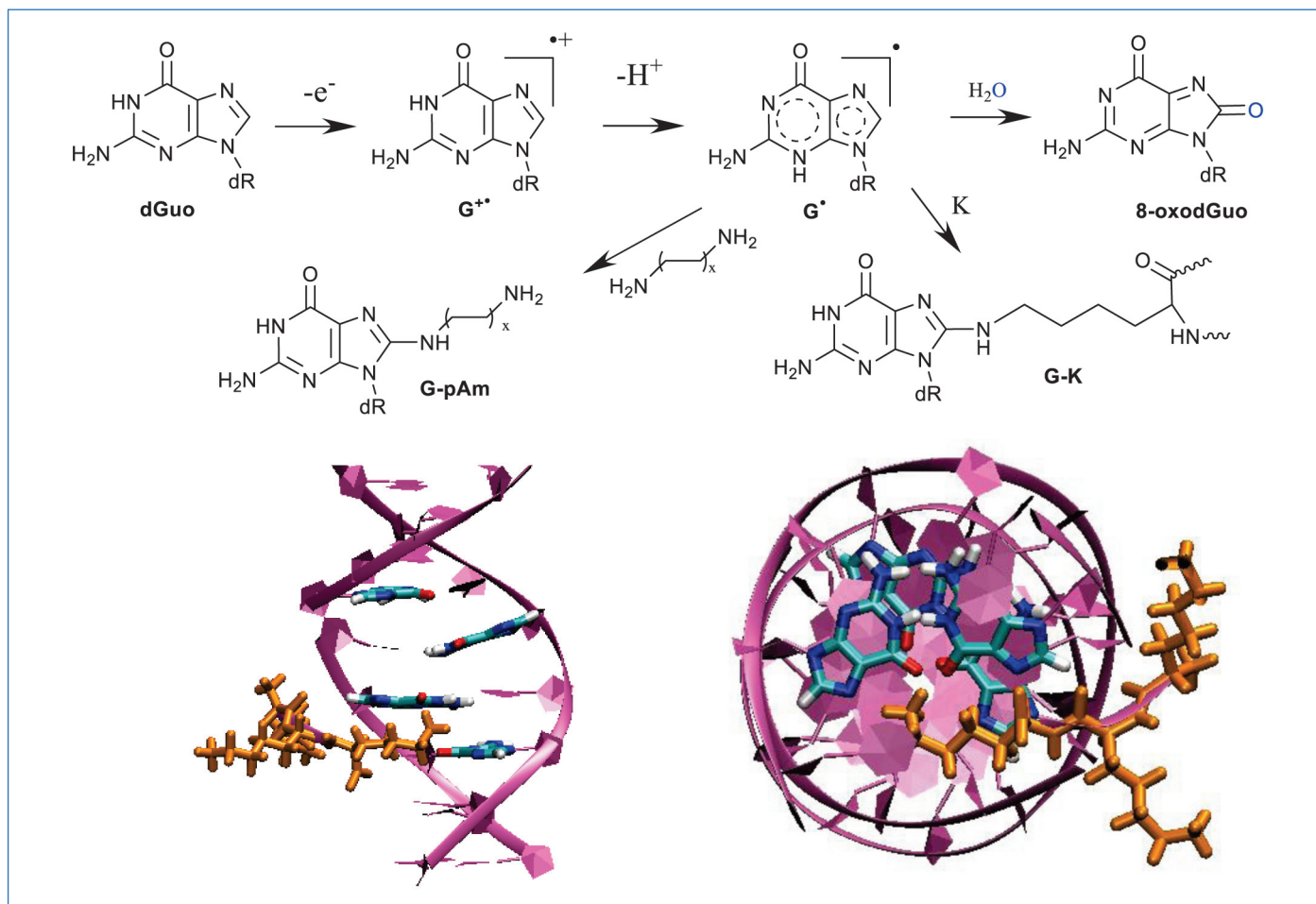


Figure 4 - En haut : réactivité du radical cation de la guanine $G^{\bullet+}$, produisant par hydratation la 8-oxodGuo et par addition nucléophile de groupements amino des adduits avec les polyamines (G-pAm) ou avec la lysine (G-K). En bas : interaction d'un peptide trilycine au sein d'une double hélice d'ADN.

non covalentes avec d'autres nucléobases, soit adopter une position extra-hélicale pour bénéficier d'une stabilisation énergétique par solvataion. Nos dynamiques moléculaires permettent de « tester » *in silico* cette réponse structurale et de mettre en évidence que la cytosine est la seule nucléobase qui donne lieu à une interaction stable avec deux liaisons hydrogène non Watson-Crick, rendant possible une approche des partenaires propice à la réaction de condensation. A contrario, les purines ne donnent pas lieu à des associations fortes avec l'aldéhyde et ne peuvent que difficilement attaquer l'aldéhyde qui est en moyenne distant de plus de 8 Å.

Pontages ADN avec d'autres molécules biologiques

Dans la cellule, l'ADN n'est pas nu ; il forme des complexes avec de nombreuses molécules biologiques, notamment des protéines et des polyamines. Ces interactions jouent un rôle dans de nombreux processus biologiques. La formation de pontages covalents radio-induits entre l'ADN et les molécules biologiquement présentes dans le noyau cellulaire ont été peu étudiées du fait de la multitude de mécanismes réactionnels possibles. Une exception concerne l'oxydation à un électron de l'ADN et la possible réactivité du radical cation de la guanine ($G^{\bullet+}$) ainsi produit (figure 4). La guanine a le potentiel d'oxydation le plus bas parmi les constituants de l'ADN. Une oxydation à un électron de l'ADN va potentiellement conduire dans un premier temps à la formation de radicaux cations sur les quatre bases de l'ADN. Ensuite, par un

mécanisme de transfert d'électron à travers le double-brin d'ADN, de la guanine vers les radicaux cations initialement formés, ces derniers vont être alors « réparés » et le radical cation de la guanine ($G^{\bullet+}$) sera majoritairement formé. Il a été montré que ce radical réagit avec l'eau pour former la 8-oxodGuo, qui est donc le principal produit formé par oxydation à un électron de l'ADN double-brin. Il a cependant été montré que cette réaction d'hydratation est en compétition avec l'addition sur le carbone 8 de la guanine de molécules nucléophiles. Ainsi, en utilisant un court oligonucléotide de trois bases de long, TGT, il a été montré expérimentalement que la formation du radical cation au sein de cet oligomère pouvait entraîner la formation de pontages avec la lysine (K) d'un court peptide (KKK) [24]. De la même manière, l'oxydation à un électron de l'ADN en présence de polyamines (pAm) peut entraîner la formation de pontages covalents par addition nucléophile d'une fonction amine des polyamines, sur le C8 de la guanine [25]. Il faut noter cependant que ces réactions de pontage ont été mises en évidence dans l'eau et que l'addition d'eau conduit à la formation de la 8-oxodGuo. Il est donc surprenant de constater que lorsque le radical cation de la guanine est produit en présence de 100 μ M de polyamines, la formation de 8-oxodGuo, et donc l'addition d'eau, est complètement inhibée. Ceci suggère que l'addition des polyamines (comme celle de la lysine) est très nettement majoritaire. Pour expliquer ce résultat surprenant, des études théoriques ont été initiées afin d'étudier la réactivité de $G^{\bullet+}$ au sein d'un duplex d'ADN en présence des polyamines [26] ou de la lysine [27].

La dynamique moléculaire a été mise en œuvre pour proposer une structure représentative de l'association entre des polyamines ou des trilyssines KKK et TGT (soit isolé, soit placé au centre d'une séquence double-brin de quinze paires de bases). Les simulations ont permis de mettre en évidence une association forte, basée sur une complémentarité de charges, mais qui, du point de vue structural, est singulièrement complexe. Nous observons sur les structures représentatives une diminution de l'accessibilité au solvant au voisinage du carbone 8 qui subit l'attaque nucléophile, ce qui constitue un premier facteur pour interpréter une plus forte réactivité des amines par rapport à l'eau a priori omniprésente. L'identification précise des modes d'interaction constitue un point de départ pour les modélisations multi-échelles où une lysine et une guanine sont incluses dans la partie quantique. Ceci a permis de mettre en évidence que l'interaction du radical cation de la guanine avec un groupement amine donne rapidement lieu à un transfert de proton de la guanine vers l'amine pour produire le radical neutre G°. Ceci constitue très probablement la première étape du mécanisme de formation de l'adduit covalent protéine-ADN. De plus, cela permet d'expliquer la préférence d'addition nucléophile de groupements amino en C8 par rapport à l'addition de l'eau.

Éviter à terme les lésions radio-induites

Les exemples présentés ici illustrent parfaitement les difficultés expérimentales que l'on peut rencontrer lors de l'étude des mécanismes de formation des lésions radio-induites de l'ADN. Cela montre que les approches théoriques sont un apport précieux pour étudier à la fois les mécanismes réactionnels et l'influence de la structure 2D et 3D de l'ADN sur la formation des lésions radio-induites. Cette collaboration entre expérimentateurs et théoriciens est indispensable pour percer les mécanismes réactionnels complexes qui conduisent à la formation de ces dommages chimiques à la molécule d'ADN, dont les conséquences biologiques sont multiples et parfois fatales.

Ce travail collaboratif entre expérimentateurs et théoriciens a été possible au travers du Labex PRIMES (ANR-11-LABX-0063) porté par l'Université de Lyon.

- [1] J. Cadet *et al.*, Radiation-induced DNA damage: formation, measurement, and biochemical features, *J. Env. Path. Toxicol. Oncol.*, **2004**, *23*, p. 33-43.
 [2] J. Cadet, T. Douki, J.-L. Ravanat, Oxidatively generated base damage to cellular DNA, *Free Radic. Biol. Med.*, **2010**, *49*, p. 9-21.
 [3] C. von Sonntag, *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor & Francis, New York, **1987**.
 [4] M. Dizdaroglu, Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin, *Mutat. Res.*, **1992**, *275*, p. 331-42.
 [5] S. Steenken, Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cation and e- and OH adducts, *Chem. Rev.*, **1989**, *89*, p. 503-20.
 [6] J.-L. Ravanat, Chromatographic methods for the analysis of oxidatively damaged DNA, *Free Radic. Res.*, **2012**, *46*, p. 479-91.
 [7] N. Ferré, X. Assfeld, Les méthodes hybrides : comment modéliser les phénomènes électroniques dans les systèmes complexes de grande taille ?, *L'Act. Chim.*, **2014**, *382-383*, p. 43-48.
 [8] M. Havrila *et al.*, Structural dynamics of propeller loop: towards folding of RNA G-quadruplex, *Nucleic Acids Res.*, **2018**, *46*, p. 8754-71.

- [9] J.-L. Ravanat, T. Douki, M.-F. Incardona, J. Cadet, HPLC separations of normal and modified nucleobases and nucleosides on an amino silica gel column, *J. Liq. Chromatog.*, **1993**, *16*, p. 3185-202.
 [10] J.-L. Ravanat, J. Cadet, Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products, *Chem. Res. Toxicol.*, **1995**, *8*, p. 379-88.
 [11] C. Sheu, C.S. Foote, Endoperoxide formation in a guanosine derivative, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, p. 10446-47.
 [12] J.C. Niles, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, Spiroiminodihydroantoin is the major product of the 8-oxo-7,8-dihydroguanosine reaction with peroxyxynitrite in the presence of thiols and guanosine photooxidation by methylene blue, *Org. Lett.*, **2001**, *3*, p. 963-66.
 [13] E. Dumont *et al.*, Singlet oxygen attack on guanine: reactivity and structural signature within the B-DNA helix, *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, p. 12358-62.
 [14] E. Dumont *et al.*, Probing the reactivity of singlet oxygen with purines, *Nucleic Acids Res.*, **2016**, *44*, p. 56-62.
 [15] H.C. Box, J.B. Dawidzik, E.E. Budzinski, Free radical-induced double lesions in DNA, *Free Radic. Biol. Med.*, **2001**, *31*, p. 856-68.
 [16] S. Bellon, J.-L. Ravanat, D. Gasparutto, J. Cadet, Cross-linked thymine-purine base tandem lesions: synthesis, characterization, and measurement in gamma-irradiated isolated DNA, *Chem. Res. Toxicol.*, **2002**, *15*, p. 598-606.
 [17] A.-G. Bourdat, T. Douki, S. Frelon, D. Gasparutto, J. Cadet, Tandem base lesions are generated by hydroxyl radical within isolated DNA in aerated aqueous solution, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, p. 4549-56.
 [18] F. Bergeron, F. Auvré, J.P. Radicella, J.-L. Ravanat, HO° radicals induce an unexpected high proportion of tandem base lesions refractory to repair by DNA glycosylases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, *107*, p. 5528-33.
 [19] C. Patel, J. Garrec, C. Dupont, E. Dumont, What singles out the G[8-5]C intrastrand DNA cross-link? Mechanistic and structural insights from quantum mechanics/molecular mechanics simulations, *Biochemistry*, **2013**, *52*, p. 425-31.
 [20] C. Dupont, C. Patel, J.-L. Ravanat, E. Dumont, Addressing the competitive formation of tandem DNA lesions by a nucleobase peroxy radical: a DFT-D screening, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *14*, p. 3038-45.
 [21] P. Regulus *et al.*, Oxidation of the sugar moiety of DNA by ionizing radiation or bleomycin could induce the formation of a cluster DNA lesion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, p. 14032-37.
 [22] P. Regulus *et al.*, Detection of new radiation-induced DNA lesions by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **2004**, *18*, p. 2223-28.
 [23] C. Patel, T. Drsata, F. Lankas, E. Dumont, Structure, dynamics and interactions of a C4'-oxidized abasic site in DNA: a concomitant strand scission reverses affinities, *Biochemistry*, **2013**, *12*, p. 8015-25.
 [24] S. Perrier *et al.*, Characterization of lysine-guanine cross-links upon one-electron oxidation of a guanine-containing oligonucleotide in the presence of a trilyssine peptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, p. 5703-10.
 [25] S. Silerme *et al.*, DNA-polyamine crosslinks generated upon one electron oxidation of DNA, *Chem. Res. Toxicol.*, **2014**, *27*, p. 1011-18.
 [26] E. Bignon *et al.*, Molecular dynamics insights into polyamine-DNA binding modes: implications for cross-link selectivity, *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, p. 12845-52.
 [27] C.-H. Chan, A. Monari, J.-L. Ravanat, E. Dumont, Probing interaction of a trilyssine peptide with DNA behind formation of guanine-lysine cross-links: insights from molecular dynamics, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2019**, *21*, p. 23418-24.

Jean-Luc RAVANAT¹, directeur de recherche, et Élise DUMONT², professeure.

¹Université Grenoble Alpes, CEA, CNRS IRIG/SyMMES/CIBEST, Grenoble.

²Université de Lyon, ENS de Lyon, CNRS UMR 5182, Université Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire de Chimie.

*Courriels : jrvanat@cea.fr ; elise.dumont@ens-lyon.fr