Les photodommages d'ADN

Dimitra Markovitsi (*coordinatrice*), Nadia Chouini-Lalanne, Pascale Clivio, Thierry Douki, Thomas Gustavsson, Élodie Lazzarotto, Sylvie Marguet, Delphine Onidas, Jean-Luc Ravanat, Karine Steenkeste, Francis Talbot et Marie-Paule Teulade-Fichou

Résumé II est bien connu que le rayonnement UV provoque des cancers de la peau. Cela se produit parce que des réactions chimiques, susceptibles d'altérer l'information génétique, se déclenchent sous l'effet de l'énergie apportée par la lumière. Les photons absorbés par l'ADN donnent lieu à des dommages « directs » tandis que les photons absorbés par d'autres molécules présentes dans la cellule créent des dommages « indirects ». Les dimères de pyrimidine (thymine, cytosine) ainsi que les produits d'oxydation de la guanine constituent deux types des produits majeurs induits par l'UV. Chacun d'entre eux peut être détecté, même à des quantités infinitésimales, grâce au développement de méthodes spécifiques. L'élucidation des mécanismes impliqués dans leur formation fait appel à la synthèse et à l'étude photochimique des composés modèles mais aussi à des expériences de spectroscopie résolues en temps. Celles-ci ont permis récemment de mettre en évidence le comportement collectif des bases de l'ADN vis-à-vis du rayonnement UV. La recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques visant la réparation de l'ADN ou à optimiser sa destruction contrôlée est également basée sur des réactions faisant intervenir des photosensiblisateurs spécialement conçus à cet effet.

5-cles Lumiere solaire, dommages d'ADN, reactions photochimiques, photosensibilisation, reparation d'ADN, excitons, transfert d'énergie, potentiel d'ionisation.

Abstract DNA photodamages

UV radiation is well known to provoke skin cancers by triggering photochemical reactions potentially leading to an alteration of the genetic material. DNA damage may be « direct » if photons are absorbed by the DNA helix, or « indirect » if photons are absorbed by other molecules present within the cell. Pyrimidine (thymine, cytosine) dimers and guanine oxidation products constitute the major classes of the UV-induced DNA damage. Both of them can be detected, even in infinitesimal quantities, by means of specific analytical techniques. The approaches used for the elucidation of the mechanisms involved in their formation include the synthesis and the photochemical studies of model compounds as well as experiments performed by time-resolved spectroscopy. The latter investigations have revealed recently the collective behaviour of the DNA bases in respect to the UV radiation. Research of novel therapeutic strategies, aiming at the repair or at the controlled destruction of DNA, involves reactions with specially designed photosensitizers.

Keywords Sunlight, DNA damage, photoreactions, photosensitization, DNA repair, DNA fluorescence, excitons, energy transfer, ionization potential.

ous savons bien aujourd'hui que l'absorption du rayonnement UV par l'ADN provoque des cancers de la peau. Cela se produit parce que des réactions chimiques, susceptibles d'altérer le code génétique, se déclenchent sous l'effet de l'énergie apportée par la lumière. Les photons les plus énergétiques du spectre solaire, associés aux rayonnements UVB (280-320 nm) et UVC (100-280 nm), bien que peu abondants, sont absorbés par les bases de l'ADN et donnent lieu à des dommages « directs ». Par contre, les photons correspondant aux UVA (320-400 nm) provoquent des dommages « indirects » liés à une photosensibilisation de l'ADN par des composés endogènes ou exogènes [1]. Les premiers sont des constituants naturels de la cellule, tels que certains acides aminés, tandis que les seconds proviennent de l'extérieur (prise de médicaments, pollution...). Ces molécules, une fois excitées, peuvent endommager l'ADN par le biais de transferts d'énergie, de transferts de charges, ou encore par des attaques radicalaires.

Dans cet article, nous présentons tout d'abord quelques approches visant à élucider le mécanisme de formation de deux types de lésions majeures d'ADN. Il s'agit des dimères de pyrimidines (cyclobutanes et photo-adduits(6-4)) ainsi que des produits d'oxydation photosensibilisée de la guanine. Nous décrivons ensuite des études par spectroscopie optique résolue temporellement dont l'objectif est de caractériser les processus primaires ayant lieu entre l'absorption d'un photon par une hélice d'ADN jusqu'à la formation des lésions.

Les photoproduits bipyrimidiniques

Les mutations de l'ADN dans les tumeurs cutanées sont très majoritairement retrouvées dans des sites comportant deux bases pyrimidiniques adjacentes, thymine (T) et/ou cytosine (C). Cette signature s'explique par la capacité des photons UVB et UVA à induire la formation de photoproduits bipyrimidiniques.

Systèmes modèles pour comprendre

En utilisant des modèles simplifiés de l'ADN, il a été possible d'identifier la structure chimique des photoproduits (PP) et d'en étudier le mécanisme de formation. Ces



Figure 1 - Les deux classes de photoproduits primaires (noir) et secondaires (rouge) au niveau d'un site T-C (thymine-cytosine) dans l'ADN.

modèles, constitués de bases naturelles, des nucléosides et dinucléotides correspondants ou de leurs analogues, ont permis de démontrer que les photoproduits primaires générés entre deux pyrimidines appartiennent à deux classes distinctes : les cyclobutanes et les PP(6-4) (*figure 1*). Les premiers résultent d'une cycloaddition [2 + 2] au niveau des doubles liaisons C₅-C₆ de deux pyrimidines adjacentes, et les seconds sont issus de l'ouverture d'un intermédiaire hétérocyclique impliquant une cycloaddition entre la double liaison C₅-C₆ d'une pyrimidine et le carbonyle en C₄ (T) ou l'imine (C) d'une seconde pyrimidine.

L'étude de la stabilité chimique et photochimique de ces photoproduits modèles a permis de comprendre au niveau moléculaire les mécanismes qui pouvaient mener à la formation de photoproduits secondaires [2]. Il s'agit de réactions de désamination ou d'isomérisation photochimique (*figure 1*). Si ces photoproduits secondaires, comme les primaires, ont des propriétés mutagènes et carcinogènes, le potentiel néfaste de chacun est différent.

Tant dans un but fondamental que dans la perspective de contrôler leur formation, il est important de connaître les facteurs influencant leur formation. Toujours à l'aide de modèles, il a été démontré que la formation des photoproduits dépend de nombreux paramètres : l'aptitude intrinsèque des bases T et C à s'additionner photochimiquement, l'environnement du site bipyrimidinique et la longueur d'onde d'excitation. La conformation de l'ADN joue également un rôle majeur sans qu'il soit actuellement possible d'établir des règles précises. Une différence majeure entre l'ADN B (conformation générale de l'ADN cellulaire) et l'ADN A (conformation rencontrée lors de certains processus cellulaires) est la conformation du sucre : C2'-endo ou C3'-endo respectivement (figure 2). Une approche actuelle consiste à étudier l'influence de ce paramètre à l'aide de systèmes modèles dans lesquels les conformations des sucres sont imposées par leurs modifications chimiques en position C2' ou C3' [3]. Ces travaux ont permis de démontrer que l'accroissement de la population des conformères C3'-endo augmente la réactivité photochimique, alors que la forme C2'-endo la diminue. Ces



Figure 2 - Conformations C2'-endo et C3'-endo du sucre.

résultats ont été corrélés à l'état d'empilement intramoléculaire des pyrimidines.

Dimérisation des pyrimidines dans l'ADN double-brin

La quantification des photoproduits bipyrimidiniques dans l'ADN nécessite la mise au point de méthodes analytiques sensibles et spécifiques car le taux de lésions est faible (1 pour 10⁶ à 10⁴ en bases normales). La technique la plus répandue repose sur l'utilisation d'anticorps reconnaissant spécifiquement les cyclobutanes ou les PP(6-4). Par cette approche, il a été possible de montrer le lien entre la pénétration des différents types de rayonnement UV et la formation des photoproduits dans les noyaux des cellules des différentes couches de la peau. Pour localiser les sites où se forment les photoproduits dans un gène-cible, il est possible de convertir les dommages en coupures, par exemple avec des enzymes coupant l'ADN au niveau des dimères cyclobutanes, puis d'analyser les fragments générés par des techniques électrophorétiques. Enfin, des informations plus quantitatives et plus spécifiques sont accessibles en libérant les photoproduits de l'ADN par des traitements chimiques ou enzymatiques, puis en réalisant une analyse chromatographique du mélange. Grâce à l'utilisation, comme méthode de détection, de la spectrométrie de masse après séparation par chromatographie liquide de haute performance, il a été observé que les sites TC et TT sont plus réactifs que les sites CT et CC. De plus, le rapport entre les taux de photoproduits cyclobutanes et PP(6-4) dépend de la nature des deux pyrimidines; sa valeur moyenne dans l'ADN est de 3. La même distribution de photoproduits est observée dans l'ADN isolé, dans divers types de cellules et dans la peau humaine (figure 3) [4].

Le rayonnement UVA peut également induire la formation de photoproduits cyclobutanes, majoritairement les dimères de thymines, par le biais d'un photosensibilisateur. Ce dernier est un chromophore endogène ou exogène qui absorbe la lumière et interagit ensuite avec l'ADN. On suppose que l'énergie du photosensibilisateur est transférée vers l'état triplet de la thymine (figure 4). Le transfert est suivi d'une cycloaddition [2+2], identique à celle observée lors de l'irradiation directe. Peu de photosensibilisateurs sont susceptibles de donner lieu à un transfert d'énergie triplet-triplet avec l'ADN. En ce qui concerne la photosensibilisation endogène, ce mécanisme est important car le taux de cyclobutanes de thymines induits par les UVA est supérieur à celui des dommages d'origine oxydative, considérés jusqu'à récemment comme responsables des propriétés mutagènes de cette portion du spectre solaire.

Pour ce qui est des photosensibilisateurs exogènes, une série de molécules cétoniques telles que l'acétone,



Figure 3 - Rendement de formation des différents photoproduits bipyrimidiniques dans de l'ADN isolé exposé au rayonnement UVC. La même proportion entre les différents photoproduits est retrouvée au niveau cellulaire. DCP : cyclobutane ; 6-4 : PP(6-4).



Figure 4 - Formation du dimère cyclobutane de thymines par photosensibilisation.

l'acétophénone ou la benzophénone ont été décrites comme susceptibles d'introduire la formation de ce photoproduit. Par ailleurs, la formation photosensibilisée de cyclobutanes de thymines a été largement démontrée par différentes techniques électrophorétiques pour plusieurs classes de médicaments, en particulier les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Une mise en garde s'impose donc quant à leur utilisation chez des individus soumis à des surexpositions solaires répétées car elle pourrait entraîner à long terme des effets photomutagènes in vivo. Des études réalisées par photolyse éclair et par émission de phosphorescence ont permis de déterminer l'énergie de l'état triplet le plus bas et de confirmer la haute efficacité de peuplement de ce dernier [5]. Une étude comparative des différents processus impliqués dans ces réactions de photosensibilisation montre une nette prédominance du transfert d'énergie, à l'origine de la formation des cyclobutanes, sur le transfert d'électron, à l'origine de dommages oxydatifs, lorsque ces deux processus sont en compétition [6].

Réparation des dimères cyclobutanes

Dans les cellules, plusieurs processus permettent de détecter et de réparer les lésions induites dans l'ADN, en particulier la réparation par excision de nucléotides (ou système NER). Or dans certaines pathologies, ce système est déficient. C'est le cas de patients atteints de *Xeroderma pigmentosum*, affection génétique rare caractérisée par l'accumulation de mutations dans l'ADN entraînant un risque

deux mille fois plus élevé que la normale de développer des tumeurs cutanées. La conception de systèmes alternatifs de réparation constitue donc un véritable challenge, car il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement connu pour lutter contre cette pathologie. Outre le système NER, chez certains eucaryotes, ces photoproduits sont pris en charge par une enzyme, la photolyase, qui utilise l'énergie lumineuse pour cliver le cycle cyclobutane sans exciser la base, via une photoréduction à un électron. Cette enzyme très répandue chez de nombreuses bactéries, algues, champignons et chez la plupart des vertébrés n'est pas présente chez l'Homme, d'où la stratégie de concevoir des enzymes artificielles photo-activables et de potentiels redox modulables capables de mimer l'action de la photolyase. Ces composés doivent absorber à grande longueur d'onde pour ne pas altérer les chromophores cutanés et être fonctionnels même en profondeur dans la peau, qui arrête plus facilement les rayonnements de plus haute énergie. Il s'agit ainsi de disposer de systèmes potentiels de réparation intervenant soit comme donneurs soit comme accepteurs d'électron, et à terme de traiter des patients ayant une déficience dans leur système de réparation.

Réactions d'oxydation photosensibilisées de l'ADN

L'oxydation des bases nucléiques, et en particulier des guanines, constitue la réaction chimique prédominante de l'ADN en réponse à une photosensibilisation exogène ou endogène (UVA, visible).

Mécanismes d'oxydation photosensibilisée

Ces réactions d'oxydation induites par photosensibilisation peuvent mener à des transformations de l'ADN selon deux mécanismes distincts, impliquant soit un transfert d'électron (type I), soit la formation d'oxygène singulet (type II) (ces mécanismes sont plus amplement décrits dans l'article de M. Barberi-Heyob *et al.*, p. 26).

La photosensibilisation de l'ADN par un mécanisme de type I conduit à la formation de radicaux cations dans l'ADN par arrachement d'un électron par le photosensibilisateur excité. Les principaux produits de décomposition des radicaux cations des bases pyrimidines et purines ont été identifiés : la base guanine, possédant le potentiel d'ionisation le plus bas parmi les constituants de l'ADN, constitue une cible privilégiée de ces réactions de photosensibilisation de type I, d'autant plus que des phénomènes de transfert d'électron au sein de la molécule d'ADN sont efficaces. Les réactions de photosensibilisation de type II impliquent la formation initiale d'oxygène singulet, par un mécanisme de transfert d'énergie entre le photosensibilisateur et l'oxygène moléculaire. Cette espèce réactive de l'oxygène, électrophile, est capable de réagir au niveau de l'ADN principalement avec la base guanine, par addition (2 + 2) de type Diels-Alder.

Il faut également signaler que certains photosensibilisateurs sont capables de modifier l'ADN par des réactions ne pouvant être classées dans ces deux catégories. C'est par exemple le cas des psoralènes, qui peuvent générer des adduits avec l'ADN par cycloaddition.

La nature chimique ainsi que les mécanismes de formation de ces lésions photo-induites de l'ADN ont fait l'objet d'articles de revues récents [7]. Au niveau cellulaire, la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxoGua) (*figure 5*) est le



Figure 5 - Mécanisme de formation des principales lésions photoinduites de la base guanine.

8-oxoGua : 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine, Sp : spiroiminohydantoïnes.

produit majoritairement formé, quel que soit le mécanisme (type I ou II). Par contre, le dérivé Fapy n'est formé que par un mécanisme de type I. La possibilité de former des pontages ADN-protéine par attaque nucléophile d'un acide aminé sur le radical cation de la guanine a également été mise en évidence [8]. D'autres produits identifiés au niveau de l'ADN isolé (oxazolone, 4-OH-8-oxoGua et les spiroiminohydantoïnes) sont actuellement recherchés dans les cellules. Ces lésions peuvent éventuellement être mutagènes et engendrer aussi de nouvelles liaisons, issues de leur sur-oxydation secondaire. Ainsi, le 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine, qui possède notamment un potentiel d'oxydation bien plus bas que celui des nucléosides normaux, produit principalement des spiroiminohydantoïnes.

Analyse des photoproduits

Les réactions conduisant aux lésions oxydatives de l'ADN mettent en jeu des processus intramoléculaires de transfert d'énergie, de charge (électron, proton) et/ou de relaxation de structure dont l'étude nécessite l'utilisation conjointe de méthodes spectroscopiques à haute résolution temporelle. Le physico-chimiste a la possibilité de décomposer ces différents processus au moyen de diverses sources de photons. Il lui est ainsi possible de mimer des réactions d'ionisation (conduisant à la formation de radicaux) ou de photodissociation qui se produisent *in vivo* par oxydoréduction ou par voie enzymatigue.

Pour atteindre cet objectif, on a recours à la spectroscopie d'absorption transitoire dans le domaine temporel nano-microseconde qui fournit des informations sur les états triplets. En effet, les états triplets de molécules actives des médicaments sont très réactifs et sont souvent utilisés en photochimiothérapie. Leur interaction avec l'ADN peut conduire à des réactions de transfert de charge avec des guanines adjacentes, donnant ainsi naissance au radical oxydé de la guanine. Ce dernier est identifiable grâce à son spectre d'absorption dans le domaine du visible [9]. Par ailleurs, la spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde permet de suivre les réactions d'oxydation impliquant des transferts de charge à partir des états singulets; on peut ainsi caractériser les radicaux formés et déterminer la cinétique de leur formation [10].

On peut raisonnablement considérer que l'analyse in vitro de ces étapes élémentaires de la réactivité des biomolécules peut guider dans la compréhension des phénomènes se produisant *in vivo*, voire en être leur reflet. Par exemple, dans le cas de l'ADN photo-irradié, l'identité des produits d'oxydation formés en solution et en milieu cellulaire suggère une similitude des mécanismes moléculaires impliqués.

Un exemple d'application in vitro

L'endommagement de l'ADN par photosensibilisation à des fins thérapeutiques est conditionné par de nombreux critères pharmacochimiques et photophysiques. Par ailleurs, au niveau moléculaire, deux aspects doivent être pris en compte pour un ciblage sélectif et efficace : i) la fixation du photosensibilisateur sur un site précis de l'ADN, idéalement une séquence ou une structure caractéristique, et ii) la nécessité d'un rendement élevé de la réaction photochimique. Or la plupart des photosensibilisateurs de l'ADN se distribuent de façon aléatoire sur le biopolymère et présentent des rendements de photo-oxydation faibles, dépassant rarement quelques pourcents.

Grâce à une stratégie alliant la formation locale d'une triple hélice artificielle et un ligand photo-oxydant **PQ3** (*figure 6a*), il est possible d'endommager l'ADN proviral du virus HIV à un site unique. L'ADN de HIV contient une séquence apte à former une triple hélice par hybridation avec un troisième brin synthétique court (16-bases TFO, *figure 6b*). De plus, **PQ3** possède une affinité plus élevée pour l'ADN triple hélice que pour sa forme native double



Figure 6 - a) Structure de **PQ3**; b) Représentation d'ADN double hélice (3 300 paires de bases, bp) contenant l'ADN de HIV formant une triple hélice (en rouge) et taille des fragments obtenus par coupure enzymatique; c) Gel d'agarose après irradiation de pf47; ligne 1 : coupure d'ADN double hélice par l'enzyme Bbsl; ligne 2 : ADN double hélice seul; lignes 3-5 : + **PQ3**; lignes 6-8 : ADN + triple hélice formée + **PQ3**. Les fragments obtenus par photosensibilisation sont identiques à ceux obtenus par coupure enzymatique ligne 1.

hélice [11]. Par conséquent, il va se fixer exclusivement au niveau de la triple hélice formée localement (en rouge sur la figure 6b). Lorsque l'ADN modifié est irradié à 305 nm en présence de PQ3, on observe une coupure unique au niveau du site d'insertion du photosensibilisateur (lignes 6-8, figure 6c). En revanche, l'ADN non modifié ne fixe pas le photosensibilisateur et n'est pas affecté par l'irradiation (lignes 2-5, figure 6c). L'analyse moléculaire indique une oxydation exclusive des guanines adjacentes à la zone d'insertion de PQ3 et suggère un mécanisme de transfert d'électron. Par contre, le mécanisme menant des produits d'oxydation à la coupure directe du squelette phosphodiester reste à déterminer. La photosensibilisation par PQ3 s'effectue avec un rendement remarquablement élevé car l'ADN est endommagé à 50 %. Cette activité est comparable en termes de précision et d'efficacité à une coupure enzymatique (coupure par l'enzyme Bbsl, ligne 1, figure 6c) [12].

En conclusion, les lésions oxydantes au niveau des guanines peuvent se produire localement ou être l'ultime étape d'une migration des radicaux et/ou d'énergie le long de la double hélice de l'ADN. Malgré la profusion de travaux sur le sujet, le(s) mécanisme(s) de ces processus de formation et de migration de charge au sein de l'ADN et leur(s) dynamique(s) sont encore mal connus. Leur élucidation est donc indispensable, d'une part d'un point de vue fondamental pour la compréhension des mécanismes cellulaires engendrant les dommages et les réparations de l'ADN, et d'autre part sur le plan médical et pharmacologique pour permettre le développement de nouveaux outils chimiothérapeutiques et de diagnostic ciblant les acides nucléiques, les protéines ou les substances cancérigènes.

Dommages directs de l'ADN : études résolues en temps

Les études d'absorption et de fluorescence résolues temporellement sont difficiles à mettre en œuvre lorsque l'on excite directement des hélices d'ADN car ces systèmes sont très fragiles et les signaux à détecter extrêmement faibles. Ceci est compréhensible si l'on considère par exemple que le rendement quantique de fluorescence de l'ADN est de l'ordre de 10⁻⁴. Afin de parer à ces difficultés, nous avons développé au Laboratoire Francis Perrin des protocoles expérimentaux spécifiques, qui nous ont permis d'élucider certains processus fondamentaux se déroulant depuis l'absorption du photon jusqu'à la formation d'une lésion.

Effets coopératifs dans l'absorption du rayonnement UV par les bases de l'ADN

Les biologistes ont observé que les lésions créées par des réactions photochimiques ne sont pas distribuées au hasard le long de la double hélice, mais qu'elles dépendent de la séquence de bases autour de la lésion. Ces observations suggèrent l'existence d'effets coopératifs entre un certain nombre de bases. En étudiant en solution des doubles hélices-modèles constituées uniquement des paires « adénine-thymine », nous avons montré que de tels effets coopératifs peuvent se manifester au moment de l'absorption du photon UV. Ils se traduisent d'une part par des états excités délocalisés sur plusieurs bases (excitons), et d'autre part par l'ionisation des doubles hélices à des énergies plus faibles que celles nécessaires à l'ionisation des monomères en solution.

La ressemblance du spectre d'absorption de l'ADN avec celui du mélange de ses constituants monomères avait conduit, dans les années 60, à la conclusion qu'un photon UV était absorbé par une seule base. L'hypothèse sousjacente était que la formation d'excitons devait conduire à un fort déplacement spectral. Grâce à une modélisation, développée en collaboration avec K. Zakrzewska et R. Lavery (Laboratoire de biochimie théorique, Paris) et réalisée dans le cadre de la théorie excitonique, combinant des données de chimie quantique et de dynamique moléculaire, nous avons montré que cette hypothèse n'était pas correcte [13]. En fait, une délocalisation des états excités induite par le couplage dipolaire ne conduit qu'à de faibles déplacements spectraux, similaires à ceux observés expérimentalement. Guidés par ce travail théorique, nous avons alors cherché des preuves expérimentales fortes concernant la délocalisation de l'excitation [14]. Dans ce but, nous avons sondé la fluorescence intrinsèque des bases. induite par des impulsions femtoseconde, en utilisant deux techniques différentes de détection : la technique de la somme de fréquence et le comptage du photon unique résolu en temps. Les observations effectuées dans une gamme temporelle étendue (100 fs-100 ns) ont révélé la grande complexité des états excités mis en jeu [15]. Ces résultats, associés aux données de spectroscopie d'absorption et de fluorescence en régime stationnaire, nous ont permis d'invalider l'hypothèse d'absorption des photons par chaque base individuellement. Par contre, le modèle de formation d'un grand nombre d'états délocalisés sur plusieurs bases, suivie d'un transfert d'énergie par diffusion intrabande (conversion interne entre états délocalisés) qui a lieu en moins de 100 fs, permet d'interpréter l'ensemble des observations expérimentales (figure 7).

Les états excités des doubles hélices peuvent subir des transformations au cours du temps (réduction du degré de délocalisation, formation des excimères...). Ces aspects sont actuellement en discussion [15-16].



Figure 7 - Représentation schématique des processus d'absorption et de fluorescence pour une double hélice modèle : l'absorption d'un photon autour de 260 nm peuple les états supérieurs de la bande excitonique. La diffusion intrabande conduit à une émission de fluorescence à partir des états inférieurs de cette bande.



Figure 8 - Spectre d'absorption transitoire enregistré à 7 ms. La bande à 325 nm correspond aux PP(6-4). En suivant l'augmentation de l'absorption à 325 nm, on détermine le temps nécessaire pour la formation de ces photoproduits.

Abaissement de potentiel d'ionisation

Des études théoriques, apparues dans la littérature ces dernières années, prévoient un abaissement du potentiel d'oxydation des bases au sein des hélices par rapport aux valeurs déterminées en phase gazeuse. En solution aqueuse, cet effet peut être mis en évidence par des expériences d'absorption transitoire. Selon cette méthode. l'énergie apportée par une impulsion laser éjecte des électrons à partir des hélices d'ADN, qui sont ensuite solvatés par les molécules d'eau du milieu environnant. Les électrons solvatés possèdent une bande d'absorption caractéristique autour de 700 nm, ce qui permet de les quantifier. De la même façon, il est possible d'identifier les radicaux des bases formés. Les quelques expériences de ce type, effectuées sur des doubles hélices, n'avaient pas permis de détecter d'ionisation à un photon à des longueurs d'onde supérieures à 210 nm. Nous venons de montrer que des impulsions nanosecondes à 266 nm peuvent ioniser, à un photon, les doubles hélices (dAdT)₁₀(dAdT)₁₀, (dA)₂₀(dT)₂₀, avec un rendement quantique de l'ordre de 10⁻³. Ce rendement est supérieur d'au moins un ordre de grandeur à celui des nucléosides correspondants [17]. Il apparaît ainsi clairement que l'on peut éjecter un électron d'une double hélice, c'est-à-dire l'oxyder, en utilisant un photon de 4,7 eV. On comprend l'importance de ce phénomène si l'on considère que le potentiel d'oxydation des bases de l'ADN est un facteur clé pour les dommages oxydatifs induits non seulement par le rayonnement UV, mais également par différents agents oxydants.

Formation des dimères de thymines

Bien que de nombreux travaux soient dédiés à la caractérisation de lésions cancérigènes de l'ADN, les temps nécessaires à leur formation restaient complètement inconnus. En étudiant un simple brin d'ADN constitué de

vingt thymines, nous avons apporté les premières informations. Notre travail concerne deux types majeurs de lésions : les cyclobutanes et les PP(6-4). A l'aide d'un laser nanoseconde, nous avons pu suivre le spectre d'absorption des PP(6-4) au cours du temps (*figure 8*). Nous avons ainsi montré que leur formation a lieu en 4 ms et passe par un intermédiaire réactionnel. Par contre, les réactions qui donnent naissance aux cyclobutanes sont bien plus rapides : elles se déroulent en moins de 200 ns [18].

Références

- Ravanat J.-L., Douki T., Cadet J., Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2001, 63, p. 88.
- [2] Thomas M., Guillaume D., Fourrey J.-L., Clivio P., Further insight in the photochemistry of DNA: structure of a 2-imidazolone(5-4)pyrimidone adduct derived from the mutagenic pyrimidine (6-4)pyrimidone photolesion by UV irradiation, J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, p. 2400.
- [3] Ostrowski T., Maurizot J.-C., Adeline M.-T., Fourrey J.-L., Clivio P., Sugar conformational effects on the photochemistry of thymidylyl(3'-5') thymidine, *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, p. 6502.
- [4] Douki T., Court M., Sauvaigo S., Odin F., Cadet J., Formation of the main UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and cellular DNA as measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Biol. Chem., 2000, 275, p. 11678.
- [5] Lhiaubet-Vallet V., Trzcionka J., Encinas S., Miranda M.A., Chouini-Lalanne N., The triplet state of a N-phenylphthalimide with high intersystem crossing efficiency: characterisation by transient absorption spectroscopy and DNA sensitization properties, *J. Phys. Chem. B.*, **2004**, *108*, p. 14148.
- [6] Trzcionka J., Lhiaubet-Vallet V., Chouini-Lalanne N., DNA photosensitization by indoprofen. Is DNA damage photoinduced by indoprofen or by its photoproducts?, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, 3, p. 226.
- [7] Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J.-L., Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features, *Mutat. Res.*, 2003, 531, p. 5.
- [8] Perrier S., Hau J., Gasparutto D., Cadet J., Favier A., Ravanat J.-L., Characterization of lysine-guanine cross-links upon one-electron oxidation of a guanine-containing oligonucleotide in the presence of a trilysine peptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, p. 5703.
- [9] Steenkeste K., Guiot E., Tfibel F., Pernot P., Mérola F., Georges P., Fontaine-Aupart M.-P., Camptothecins-guanine interactions: mechanism of charge-transfer reaction upon photoactivation, *Chem. Phys.*, **2002**, 275, p. 93.
- [10] Steenkeste K., Enescu M., Tfibel F., Perrée-Fauvet M., Fontaine-Aupart M.-P., Ultrafast guanine oxidation by photoexcited cationic porphyrins intercalated into DNA, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, p. 12215.
- [11] Baudoin O., Marchand C., Teulade-Fichou M.-P., Vigneron J.-P., Sun J.-S., Garestier T., Hélène C., Lehn J.-M., Stabilization of DNA triple helices by crescent-shaped dibenzophenanthrolines, *Chem. Eur. J.*, **1998**, *4*, p. 1504.
- [12] Teulade-Fichou M.-P., Perrin D., Boutorine A., Polverari D., Vigneron J.-P., Lehn J.-M., Sun J.S., Garestier T., Hélène C., Direct photocleavage of HIV-DNA by quinacridine derivatives triggered by triplex formation, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, p. 9283.
- [13] Emanuele E., Zakrzewska K., Markovitsi D., Lavery R., Millié P., Exciton states of dynamic DNA double helices: alternating dCdG sequences, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, *109*, p. 16109.
- [14] Markovitsi D., Onidas D., Gustavsson T., Talbot F., Lazzarotto E., Collective behavior of Franck-Condon excited states and energy transfer in DNA double helices, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, p. 17130.
- [15] Markovitsi D., Talbot F., Gustavsson T., Onidas D., Lazzarotto E., Marguet S., Molecular spectroscopy: complexity of excited-state dynamics in DNA, *Nature*, **2006**, *441*, E7.
- [16] Crespo-Hernández C.E., Cohen B., Kohler B., Base stacking controls excited-state dynamics in A-T DNA, *Nature*, 2005, 436, p. 1141.
- [17] Marguet S., Markovitsi D., Talbot F., One- and two-photon ionization of DNA single and double helices studied by laser flash photolysis at 266 nm, J. Phys. Chem. B, 2006, 110, p. 11037.
- [18] Marguet S., Markovitsi D., Time-resolved study of thymine dimer formation, J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, p. 5780.





M-P. Teula Fichou

Dimitra Markovitsi (*coordinatrice*) est directrice de recherche CNRS, directrice du Laboratoire Francis Perrin, CEA Saclay¹. **Nadia Chouini-Lalanne** est professeur à l'Université Paul Sabatier, Laboratoire des Interactions moléculaires et réactivité chimique et photochimique (IMRCP), Toulouse².

Pascale Clivio est directrice de recherche CNRS au FRE 2715 CNRS (Isolement, structure, transformations et synthèse de substances naturelles), Reims³.

Thierry Douki et Jean-Luc Ravanat sont chercheurs au DRFMC/SCIB/LAN (Lésions des acides nucléiques), CEA Grenoble⁴.

Thomas Gustavsson est directeur de recherche CNRS, **Élodie Lazzarotto** est assistante ingénieur CNRS, **Sylvie Marguet** et **Francis Talbot** sont chargés de recherche CNRS, et **Delphine Onidas** a été doctorante au Laboratoire Francis Perrin, CEA Saclay¹.

Karine Steenkeste est chargée de recherche CNRS au Laboratoire de photophysique moléculaire, Université Paris-Sud, Orsay⁵.

Marie-Paule Teulade-Fichou est directrice de recherche CNRS à l'Institut Curie, Orsay⁶.

- ¹ Laboratoire Francis Perrin, CEA/DSM/DRECAM/SPAM, URA 2453 CNRS, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette. Courriel : dimitra.markovitsi@cea.fr
- ² Laboratoire des IMRCP, UMR 5623 CNRS, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 09. Courriel : lalanne@chimie.ups-tlse.fr
- ³ FRE 2715 CNRS (Isolement, structure, transformations et synthèse de substances naturelles), IFR 53, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex.
- Courriel : pascale.clivio@univ-reims.fr
- ⁴ DRFMC/SCIB/LAN (Lésions des acides nucléiques), CEA Grenoble, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9.
- Courriels : thierry.douki@cea.fr, jravanat@cea.fr
- ⁵ Laboratoire de photophysique moléculaire, UPR 3361 CNRS, Université Paris-Sud, 91405 Orsay. Courriel : karine.steenkeste@ppm.u-psud.fr
- ⁶ Institut Curie, UMR 176, Centre universitaire, Bât. 110, 91405 Orsay. Courriel : marie-paule.teulade-fichou@curie.fr

« Comment ça marche ? »

Agroalimentaire, carburants, colles, cosmétiques, matériaux, peintures, pharmacie, produits d'entretien...

La rubrique de L'Actualité Chimique qui répond à vos questions sur la chimie de votre quotidien.

Proposez-nous vos sujets, vos projets d'articles... Coordinatrice de la rubrique : Véronique Nardello-Rataj (Université de Lille) Courriel : veronique.rataj@univ-lille1.fr - Tél./fax : 03 20 33 63 69.

