

# **Oxydation de l'ADN, mécanismes moléculaires d'oxydation des guanines sous stress oxydant**

Geneviève PRATVIEL  
directeur de recherche CNRS  
*Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS*  
*205 route de Narbonne*  
*31077 Toulouse cedex4*  
*France*  
Tel : +33561 33 31 46  
Fax : +33 561 55 30 03  
genevieve.pratviel@lccc-toulouse.fr

## **Introduction**

L'intégrité chimique de l'ADN est extrêmement importante pour la vie. En conséquence il est très résistant à l'hydrolyse mais malheureusement, il est sensible à l'oxydation. Le stress oxydant est responsable de nombreuses pathologies humaines ou de processus de dégénérescence. De plus il est maintenant communément admis que des lésions générées par oxydation de l'ADN sont impliquées dans le vieillissement, la mutagenèse, la carcinogenèse, les maladies neuro-dégénératives et la mort cellulaire.

Les radiations ionisantes ont pour principal effet l'oxydation de l'ADN. Les dommages de l'ADN par oxydation constituent donc un souci majeur. Les bases guanines sont les sites privilégiés d'oxydation de l'ADN. Ce sont les cibles préférentielles des réactions de transfert d'électron, elles sont également modifiées par les radicaux hydroxyles.

Un certain nombre de produits d'oxydation de la guanine ont été caractérisés in vitro au niveau moléculaire. Cependant il est possible que toutes les lésions n'aient pas encore été décrites et leur valeur prédictive en termes de viabilité cellulaire pose encore des questions. D'autre part, il convient de mieux connaître la stabilité des lésions de l'ADN pour prévoir les lésions secondaires qui peuvent se former à partir des lésions primaires et dans quelles conditions (oxydation, réduction, hydrolyse...).

Quels sont les produits d'oxydation de l'ADN sous stress oxydant que l'on peut attendre in vivo ? La connaissance au niveau moléculaire des produits de dégradation de l'ADN (leur nature, le ou les mécanismes de leur formation) est nécessaire pour mieux comprendre leurs

conséquences biologiques. En effet, on peut envisager de les rechercher in vivo lorsqu'on dispose de standards. On peut étudier leur réparation de manière individuelle. On peut mieux prédire lesquels se formeront dans telles conditions.

La base nucléique guanine (G) étant la plus oxydable, nous nous sommes focalisés sur les produits d'oxydation de la guanine dans l'ADN en cherchant à décrire quels produits sont issus d'un événement d'oxydation initial et isolé par rapport aux produits issus d'oxydations successives de la lésion initiale et cela par quels chemins réactionnels.

Nous avons utilisé un catalyseur d'oxydation dont la réactivité est bien connue dans le groupe. Il est basé sur l'association d'une métalloporphyrine avec l'oxone (Mn-TMPyP/KHSO<sub>5</sub>). Ce réactif ne produit pas de radicaux hydroxyle HO° et simplifie donc l'interprétation des chemins réactionnels. Nous avons caractérisé un nouveau produit primaire d'oxydation de la guanine. Nous avons pu décrire des mécanismes originaux par lesquels une lésion initiale (ou primaire) se transforme en lésions secondaires.

## **Matériel et méthodes**

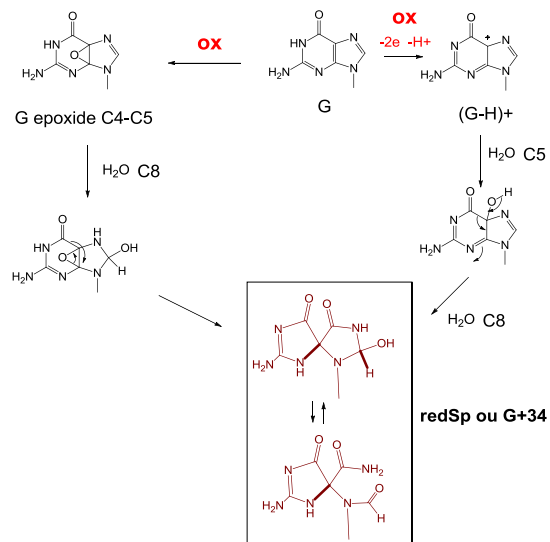
L'analyse des lésions de l'ADN a été réalisée par chromatographie HPLC couplée à la spectrométrie de masse (electrospray) sur des modèles d'ADN comme des oligonucléotides ou des dinucléosides (LC/ESI-MS). Cette méthode permet l'analyse de tout type de dommage (et notamment des lésions primaires instables) car les brins d'ADN endommagés sont détectés directement dans le milieu réactionnel et identifiés sans traitement supplémentaire. Pour une détermination structurale de lésion particulière mise en évidence dans un premier temps en LC/ESI-MS), la RMN est nécessaire. Elle a été réalisée sur des modèles d'ADN simplifiés : des dinucléosides.

## **Principaux résultats scientifiques**

### **1- *Produit de mono-oxydation de la guanine***

Le produit d'oxydation de la guanine « RedSp » ou « G+34 », car résultant d'un incrément de masse de 34 uma par rapport à G, est un produit d'oxydation primaire de G. Il était considéré comme résultant d'une attaque d'une molécule d'eau sur le C5 d'une guanine ayant été oxydée dans un premier temps par transfert d'électrons. Dans le cas de Mn-TMPyP/KHSO<sub>5</sub>, le transfert d'un atome d'oxygène sur la double liaison C4-C5 de la

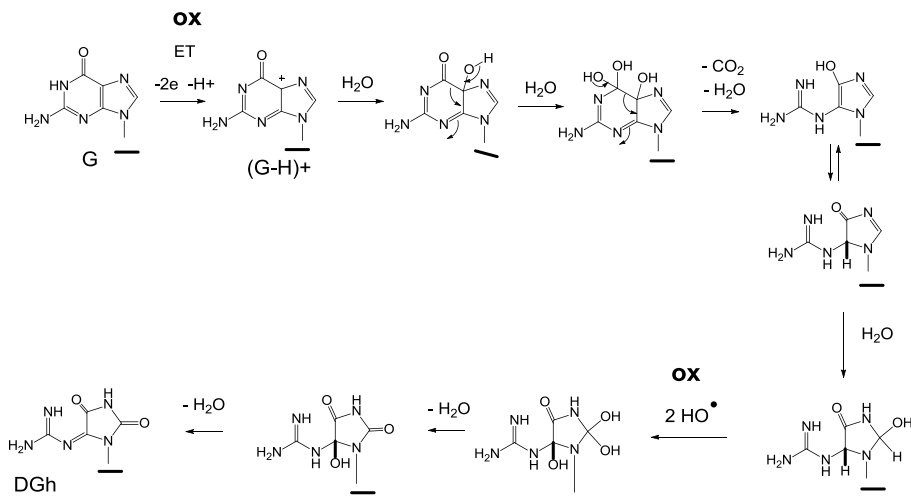
guanine conduit à un dérivé époxyde intermédiaire instable qui évolue spontanément et rapidement vers la lésion de l'ADN stable (RedSp). Le mécanisme de formation de ce produit a été démontré par marquage isotopique et sa structure confirmée par RMN (publication en cours de rédaction).



## 2- Analyse moléculaire du mécanisme de formation des lésions dues au radical cation de G par piégeage du radical cation par H<sub>2</sub>O

La lésion guanidinohydantoin ou « DGh » est un produit bien connu d'oxydation de G. Cependant, c'est un exemple typique de produit résultant de plusieurs événements d'oxydation successifs et par conséquent considéré comme peu probable in vivo.

Nous avons étudié le mécanisme de sa formation et montré que DGh résulte d'une première oxydation par un mécanisme de transfert d'électron (ET) mais que les autres étapes d'oxydation peuvent être réalisées par des radicaux HO<sup>•</sup> en solution, ce qui augmente la probabilité de sa formation in vivo sous stress oxydant.

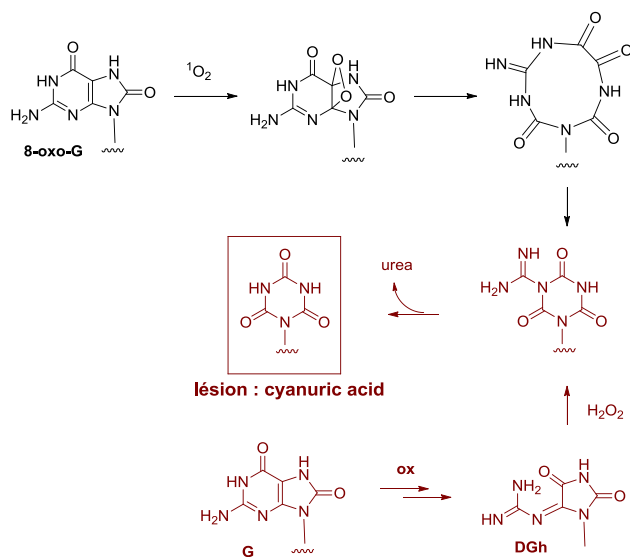


### 3- Analyse moléculaire du mécanisme de formation des lésions dues au radical cation de G, le piégeage du radical cation par des nucléophiles du milieu

Dans l'étude du mécanisme d'oxydation de la guanine, nombreux laboratoires insistent sur le fait que le radical cation de G est piégé sur le carbone C8 par des nucléophiles biologiques comme l'eau ou des réactifs amines présents sur des protéines interagissant avec l'ADN. Le piégeage sur la position C8 de G conduit à la 8-oxo-guanine. Nous avons montré que dans le cas d'oxydants puissants (Mn-TMPyP/KHSO<sub>5</sub>) capable d'arracher deux électrons sur une guanine le piégeage par les amines a lieu sur la position C5 de G.

### 4- Mise en évidence d'une nouvelle voie de formation de la lésion « cyanuric acid »

Nous avons pu mettre en évidence l'action de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), un réactif nucléophile clé du stress oxydant, sur des lésions de guanine et pu montrer que certaines lésions décrites pour se former à partir de 8-oxo-G et en présence d'oxygène singulet comme le dérivé cyanuric acid pouvaient également se former dans une situation d'oxydation de l'ADN par transfert d'électron.



## Conclusion

Ce travail nous a permis de progresser dans la compréhension au niveau moléculaire de la formation des lésions de l'ADN sous stress oxydant par la découverte de nouvelles

voies de formation de certains produits déjà connus ou par la caractérisation de nouveaux produits.

## **Principales publications**

1- Incorporation of oxidized guanine nucleoside 5'-triphosphate in DNA with DNA polymerases and preparation of single-lesion carrying DNA.

S. Mourgues, J. Trzcionka, J.-J. Vasseur, G. Pratviel, B. Meunier  
*Biochemistry*, 47, 4788-4799 (2008)

2- Mechanism of guanine oxidation: electron transfer and oxygen atom transfer reactions.

J. Irvoas, J. Trzcionka, G. Pratviel  
*Manuscript en cours de rédaction*

3- Guanine oxidation by electron transfer leads to the guanine lesion cyanuric acid

J. Irvoas, J. Trzcionka, G. Pratviel  
*Manuscript en cours de rédaction*

4- Double stranded DNA as a substrate for high-valent metal-oxo porphyrins, electron transfer versus oxygen atom transfer modulated by the nature of the axial ligand.

J. Trzcionka, G. Pratviel  
*Manuscript en cours de rédaction*

5- Characterization of a primary product of guanine oxidation

A. Tomaszewska, J. Trzcionka, B. Nawrot, G. Pratviel  
*Manuscript en cours de rédaction*

## **Perspectives de valorisation**

recherche fondamentale.