



HAL
open science

**Les lésions des acides nucléiques: détection par
CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et
intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de
l'inflammation.**

Carine Badouard

► **To cite this version:**

Carine Badouard. Les lésions des acides nucléiques: détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00134563

HAL Id: tel-00134563

<https://theses.hal.science/tel-00134563>

Submitted on 2 Mar 2007

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

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

**Les lésions des acides nucléiques : détection par
CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques
humains et intérêt comme biomarqueurs du stress
oxydant et de l'inflammation.**

THESE

Présentée par

Carine DAUM-BADOUARD

Née le 21 avril 1976 à STRASBOURG (67)

Date de soutenance : 20 octobre 2006

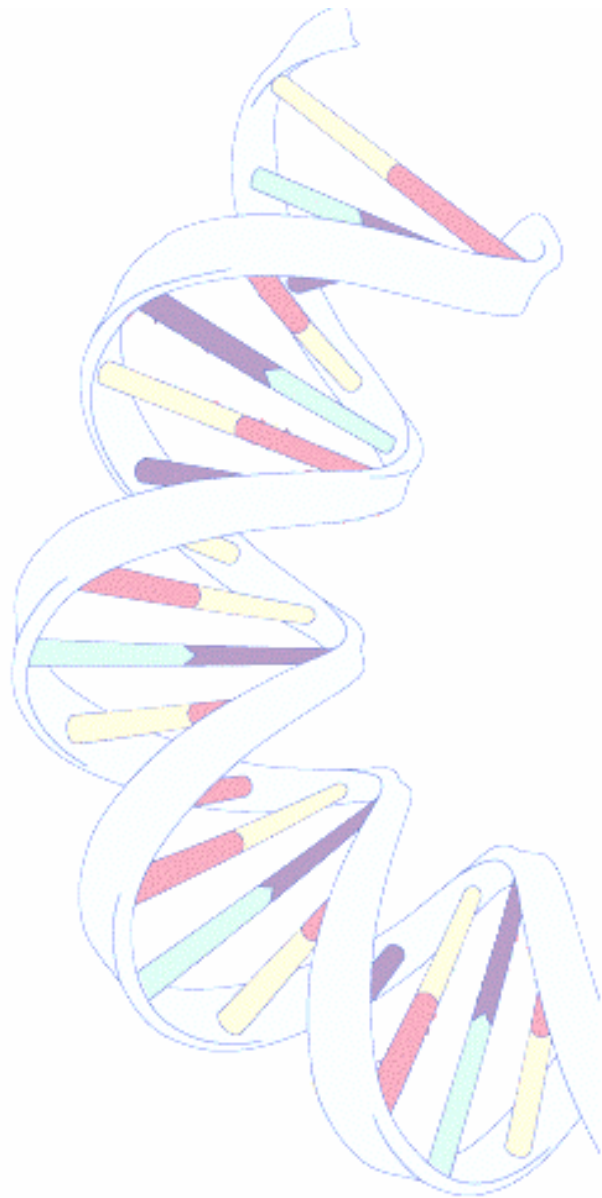
DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Pr Alain Favier (UJF Grenoble/Faculté de Pharmacie)	: Président
Pr Josiane Cillard (Faculté de Pharmacie de Rennes)	: Rapporteur
Dr. Denis Blache (Directeur de recherche INSERM-Dijon)	: Rapporteur
Dr Véronique Ducros (DBI, CHU Grenoble)	: Examineur
Dr Jean-Luc Ravanat (LAN/CEA Grenoble)	: Directeur de thèse

Thèse préparée au sein des laboratoires suivants :

Le Laboratoire des lésions des Acides Nucléiques au CEA de Grenoble.

Le Département de Biologie Intégrée au CHU de Grenoble.



*A mes très chers parents, pour leur amour et leur présence qui me manquent tant.
A Christian, pour sa force, son amour et son soutien de tous les jours.*

Remerciements

- ❖ A M. le Professeur Alain Favier qui m'a donnée l'opportunité de venir au laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques (LAN) pour réaliser ma thèse de sciences. Il m'a ainsi permis d'apprécier le milieu de la recherche fondamentale et d'en comprendre les implications au niveau de la recherche appliquée. Je tiens également à le remercier pour son soutien dans les demandes d'aides financières au cours de ces 4 années de thèse.
- ❖ A M. P. Rey et Mme P. Maldivi, successivement à la tête du Service de Chimie Inorganique et biologique (SCIB) dont dépend le LAN.
- ❖ A l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) qui m'a accordé une bourse de 4^{ème} année de thèse.
- ❖ A mon directeur de thèse, Jean-Luc Ravanat, qui m'a aidé à prendre confiance en moi comme chercheuse et à surmonter les difficultés de la recherche et d'en apprécier les efforts.
- ❖ A M. Jean Cadet pour sa relecture précieuse des différents articles parus.
- ❖ A Zohra, pour sa bonne humeur et son soutien journalier.
- ❖ A tous les volontaires qui ont accepté de donner leur sang pour la science...
- ❖ A toutes les techniciennes du Département de Biologie Intégré (DBI) qui ont piqué pour moi les volontaires.
- ❖ A tous mes collaborateurs au DBI et notamment à Fabienne et Mylène de l'UF d'Hormonologie qui m'ont apporté leur aide pour les dosages des patients diabétiques.
- ❖ A tous mes collaborateurs au LAN, merci de votre soutien personnel et scientifique tout au long de cette thèse.
- ❖ A M^{me} le Dr S. Sauvaigo pour ses conseils avisés sur le travail d'étude en « COMETES »
- ❖ A M^{lles} B. Bin et C. Durand, stagiaires en IUT pour leur participation à mes travaux de thèse.
- ❖ A M^{lle} L. Mollard, étudiante en BTS, pour son excellent travail de synthèse de la lésion dGMGO.
- ❖ A M. le Professeur P. Faure, M. le Professeur S. Halimi et J. Lopez-Giovanelli et les infirmières et les patients diabétiques du service d'Endocrinologie-Diabétologie (CHU Grenoble).
- ❖ A M. le Professeur J. Balosso et M. le Dr M. Rastkha, les infirmières, les « manips radio » et les patients du service de radiothérapie (CHU Grenoble) ayant accepté de participer à cette étude.
- ❖ A M. les Dr G. Panteix et Y. Menezo du laboratoire Marcel Merieux à Lyon pour les échantillons de spermatozoïdes.
- ❖ A l'équipe du CNAM de Paris et plus particulièrement M^{lle} S. Bertrais et M. D. Ruffieux (DBI, CHU Grenoble) pour sa collaboration sur le projet SUVIMAX.
- ❖ A M^{me} le Dr C. Garrel (DBI, CHU Grenoble) pour les dosages des TBARS.

SOMMAIRE

1 ABREVIATIONS	5
2 INTRODUCTION	9
3 PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE	13
3.1 Le stress oxydant	13
3.2 L'inflammation	19
3.3 La peroxydation lipidique	22
3.4 La production de méthylglyoxal	25
3.5 Les radiations ionisantes	28
3.6 Action ciblée sur les acides nucléiques	29
3.7 Moyens de lutte contre le stress oxydant	42
3.8 Implication du stress oxydant dans les pathologies	46
3.9 Les biomarqueurs du stress oxydant	51
4 OBJECTIFS DU PROJET DE THESE	56
5 DIFFERENTES METHODES DE DOSAGE DES LESIONS DES ACIDES NUCLEIQUES	60
5.1 Méthodes indirectes	60
5.2 Méthodes directes	63
5.3 Comparaison des méthodes directes et indirectes	66
5.4 Comparaison des méthodes chromatographiques	68
5.5 Mesures chez l'homme	69
6 MATERIEL ET METHODES	82
6.1 Matériel analytique de quantification des lésions	82
6.2 Mesure des lésions par CLHP-SM/SM	87
6.3 Synthèse de HOCl	91
6.4 Chloration de l'ADN isolé.	91
6.5 Chloration de l'ADN cellulaire.	91
7 RESULTATS	95
7.1 Mise au point analytique du dosage des lésions	95
7.2 Optimisation des dosages dans les fluides biologiques	110
7.3 Les lésions mesurées dans la pathologie du diabète	128
7.4 Les lésions mesurées dans l'étude des cancers traités par radiothérapie	136
7.5 Les lésions mesurées dans l'étude SUVIMAX	140
7.6 Les lésions mesurées dans le cas des infertilités masculines	145
8 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	150
9 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	154
10 ANNEXES	167

1 ABREVIATIONS

AcN : Acétonitrile

ADN : Acide 2-désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

AGEs : “Advanced Glycation Endproducts” = Produits de Maillard

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine Triphosphate

CG-SM : Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance

CLHP-EC : Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à une détection électrochimique

CLHP-SM/SM : Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem

CPT : “Cell Preparation Tube” : Tube de préparation cellulaire (Becton Dickinson®)

CSB : Cassures simples brins

CDB : Cassures doubles brins

DBI : Département de Biologie Intégrée

DHOH : Dihydroorotate deshydrogénase

DNPH : dinitrophénylhydrazine

DNTB : acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman

DSB: Double Strand Breaks : Cassures doubles brins

DTT : Dithiothréitol

EA : Elution alcaline

ELISA : “Enzyme Like ImmunoSorbent Assay”

Endo III : Endonuclease III

EOAs : Les Espèces Oxygénées Activées

ERNs : Les Espèces Réactives de l'Azote

EROs : Les Espèces Réactives de l'Oxygène

ESCODD : “European Standards Committee on Oxidative DNA Damage”

ESI : “Electrospray Ionisation” : Ionisation par electrospray

FA : Formiate d'Ammonium

FADH et FADH₂: Flavine Adénine Dinucléotide

FIA : “Flow Injection Analysis” : Analyse en injection directe

Fpg : Formamidopyrimidine ADN *N*-glycosylase
FITR : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
GPX : La Glutathion peroxydase
GSH : Le glutathion
Gy : Gray
HBSS : « Hanks' Balanced Salt Solution »
 $\text{H}_2\text{O}^{\bullet+}$: cation radical de l'eau
 H_2O_2 : Le peroxyde d'hydrogène
IPPA : « Immunoaffinity/³²P-postlabelling » : Immunoaffinité couplée à un marquage au ³²P
IR : Infra-Rouge
LDL : «Low Density Lipoproteins» : Les Lipoprotéines de basse densité
LPO : les peroxydes lipidiques
m/z : masse/charge
MAO(A) et MAO(B) : Monoamine oxydase A et B
MDA : Le Malondialdéhyde
MGO : Le Méthylglyoxal
MPO : La Myéloperoxydase
MRM : «Multiple Reaction Monitoring»
NAD(P)H : Nicotinamide adénine phosphodinucléotide
NAD(P)Hoxydase : Nicotinamide adénine phosphodinucléotide oxydase
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide
NaI : Iodure de sodium
NOSynthase : Enzyme synthétisant le NO
PBS : «Phosphate Buffer Saline» : tampon salin phosphate
Pi : Phosphate inorganique
PNN : Les polynucléaires neutrophiles
PTG : Les Produits terminaux de glycation
PUFAs: «Poly Unsaturated Fatty Acids»: Les Acides gras polyinsaturés
REB : La réparation par excision de bases
REN : La réparation par excision de nucléotides
RI : Une radiation ionisante
RIA : «Radioimmunoassay»
RNAses : Enzymes clivant les ARN
SIM : «Single Ion Monitoring»
SOD : Superoxyde dismutase

SPE : “Solid Phase Extraction” : Extraction sur Phase Solide

SSB : Single Strand Breaks : Cassures simples brins

Sv : Sievert

TBA : “2-Thiobarbituric acid” : L’acide thiobarbiturique

TBARs : “TBA Reactive substance”

TNB : L’acide 5-thio(2-nitrobenzoïque)

TNF α : “Tumor necrosis factor α ”

uma : unité de masse atomique

UV : ultraviolet

Vacutainer : Tube de prélèvement sanguin

INTRODUCTION

2 INTRODUCTION

Au cours de l'évolution, les organismes aérobies se sont adaptés à l'oxygène atmosphérique par la mise en place de systèmes métabolisant la molécule d'oxygène. Cette molécule présente la particularité d'être à la fois un élément indispensable et toxique pour l'Homme. Ainsi, l'oxygène moléculaire peut se transformer dans l'organisme pour générer d'autres espèces oxygénées réactives de nature radicalaire ou non. Les *radicaux libres* sont des molécules comportant des électrons libres sur la couche orbitale la plus externe qui cherchent à se stabiliser par appariement avec des électrons arrachés sur d'autres molécules situées dans un environnement proche. Il se crée alors une réaction en chaîne où la neutralisation d'un radical passe par la création d'un autre. Cette réaction en chaîne va engendrer des modifications moléculaires puis structurales pouvant avoir des conséquences sur de nombreux constituants biologiques de la cellule. Toutefois, le métabolisme de l'oxygène est primordial car il permet la production d'énergie sous forme d'ATP dans les mitochondries : c'est la respiration mitochondriale. Les radicaux libres participent également à la défense contre des microorganismes pathogènes et à la détoxification de molécules délétères. Par conséquent, la production des espèces radicalaires est incontournable et les organismes aérobies se sont adaptés pour se protéger contre ces radicaux libres ainsi produits.

Dans ce contexte, le **STRESS OXYDANT** se définit par une situation de déséquilibre entre la production des espèces réactives (oxygénées et azotées) et les mécanismes de défense et de détoxification de ces dernières. Ainsi, les acteurs du stress oxydant peuvent également avoir des effets délétères sur de nombreux constituants des cellules comme les protéines, les lipides ou encore les acides nucléiques. Pour faire face à ces effets négatifs, la cellule dispose de différents moyens de lutte dits « antioxydants ». Les systèmes de défense sont très variés car ils permettent soit de capter, soit de neutraliser les molécules réactives ou bien encore d'éliminer et de remplacer les molécules endommagées. Les éléments constitutifs de ce potentiel antioxydant peuvent être distingués selon leur nature chimique (protéique ou non) et selon leur origine endogène ou exogène (apport par l'alimentation par exemple). L'évaluation du stress oxydant peut être réalisée à différents niveaux. D'une part, le dosage des molécules biologiques modifiées, telles que les protéines oxydées, peut être réalisé par diverses techniques. D'autre part, le potentiel antioxydant peut également être apprécié par la détermination des activités enzymatiques des superoxydes dismutases (SOD), de la glutathion peroxydase (GPX) et des catalases. Ces enzymes représentent une des premières lignes de défense au même titre que les éléments non protéiques comme le glutathion réduit (GSH) et les micronutriments antioxydants (Vitamines, Sélénium, etc...) dont la mesure peut également être effectuée.

L'apparition de pathologies liées au stress oxydant implique bien souvent un déséquilibre entre production des espèces oxydantes et systèmes d'élimination de ces dernières. C'est le cas de certains cancers, de maladies cardio-vasculaires et de maladies inflammatoires. C'est pourquoi il paraît judicieux de développer la détection de nombreux *biomarqueurs* permettant de faire état du « statut oxydatif » de l'organisme et de suivre leur évolution au cours d'un traitement anticancéreux ou anti-inflammatoire par exemple. Un *biomarqueur* peut être considéré comme toute molécule biologique de l'organisme permettant de suivre un état physiopathologique.

Les acides nucléiques d'une cellule (ADN et ARN) sont continuellement soumis à ce stress oxydant entraînant la formation de modifications appelées "lésions". La cellule a mis en place différents systèmes de réparation chargés d'éliminer les dommages ainsi formés afin de permettre la préservation de l'ADN, « molécule mère » de l'hérédité. Par conséquent, l'ADN cellulaire contient en permanence un taux faible de lésions que l'on pourrait appeler "taux basal". Ainsi, il semble légitime de penser qu'un nombre important de lésions pourrait résulter soit d'un excès de production dû à une attaque plus importante des espèces pro oxydantes soit d'un défaut de réparation de ces lésions. En outre, il s'agira par la suite d'élucider les implications de ces lésions dans des pathologies où participe le stress oxydant et plus précisément de savoir si ces lésions peuvent être utiles dans le diagnostic ou le suivi de ces pathologies.

L'objectif de ce travail de thèse vise à mettre en place des outils pour quantifier **les lésions de l'ADN et de l'ARN dans les milieux biologiques humains** (comme l'urine, le plasma, les cellules mononuclées circulantes et les spermatozoïdes) pouvant avoir un intérêt comme **biomarqueurs du stress oxydant et/ou de l'inflammation**. Dans une partie bibliographique, sera tout d'abord décrit le contexte de génération des différentes lésions de l'ADN et de l'ARN étudiées. Seront également détaillées dans cette même partie bibliographique les différentes techniques de dosage des lésions utilisées à ce jour ainsi que les concentrations obtenues dans divers milieux biologiques pour les lésions connues. Une seconde partie, dite de validation analytique, a pour but de décrire la mise au point des méthodes de dosage par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem. Enfin, une dernière partie sera consacrée aux travaux obtenus dans le cas de certaines pathologies en vue de réaliser une validation biologique du dosage de ces biomarqueurs chez l'homme.

PRESENTATION
BIBLIOGRAPHIQUE

3 PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE	13
3.1 Le stress oxydant	13
3.1.1 Généralités	13
3.1.2 Production d'espèces réactives lors du stress oxydant	15
3.1.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène	15
3.1.2.2 Les espèces réactives de l'azote	18
3.1.2.2.1 <i>Le NO• et ses dérivés : les ERNs</i>	18
3.1.2.2.2 <i>Mécanismes d'action des ERNs</i>	19
3.2 L'inflammation	19
3.2.1 Généralités	19
3.2.2 Rôles de la MPO	20
3.3 La peroxydation lipidique	22
3.3.1 Généralités	22
3.3.1.1 Espèces actives	23
3.3.1.1.1 <i>Le malondialdéhyde (MDA)</i>	23
3.3.1.1.2 <i>Le 4-hydroxynonéanal (4-HNE)</i>	24
3.4 La production de méthylglyoxal	25
3.5 Les radiations ionisantes	28
3.6 Action ciblée sur les acides nucléiques	29
3.6.1 Les molécules d'ADN et d'ARN : structure et rôles	29
3.6.2 Les lésions oxydatives de l'ADN.	31
3.6.3 Les lésions issues de la réaction avec les ERNs	33
3.6.4 Les lésions chlorées issues des réactions inflammatoires	35
3.6.5 Les lésions issues de la peroxydation lipidique	36
3.6.6 Les lésions issues de la réaction avec le méthylglyoxal.	39
3.6.7 Les lésions issues des rayonnements ionisants.	39
3.6.8 Récapitulatif des différentes lésions mises en évidence dans la cellule.	41
3.6.9 La place des lésions de l'ARN dans la cellule.	41
3.7 Moyens de lutte contre le stress oxydant	42
3.7.1 Préventif : molécules antioxydantes	42
3.7.2 Action directe sur les espèces réactives de l'oxygène	43
3.7.2.1 Systèmes enzymatiques	43
3.7.2.2 Molécules antioxydantes exogènes	43
3.7.3 Réparation des lésions de l'ADN	44
3.8 Implication du stress oxydant dans les pathologies	46
3.8.1 Le diabète	47
3.8.2 Les cancers et la radiothérapie	48
3.8.3 L'infertilité masculine	50
3.9 Les biomarqueurs du stress oxydant	51
3.9.1 Définition d'un biomarqueur	51
3.9.2 Différents types de biomarqueurs de l'oxydation cellulaire	52
3.9.2.1 Les biomarqueurs de l'oxydation lipidique	52
3.9.2.2 Les biomarqueurs de l'oxydation protéique	53
3.9.2.3 Les biomarqueurs de l'oxydation des acides nucléiques	53

3 PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE

3.1 *Le stress oxydant*

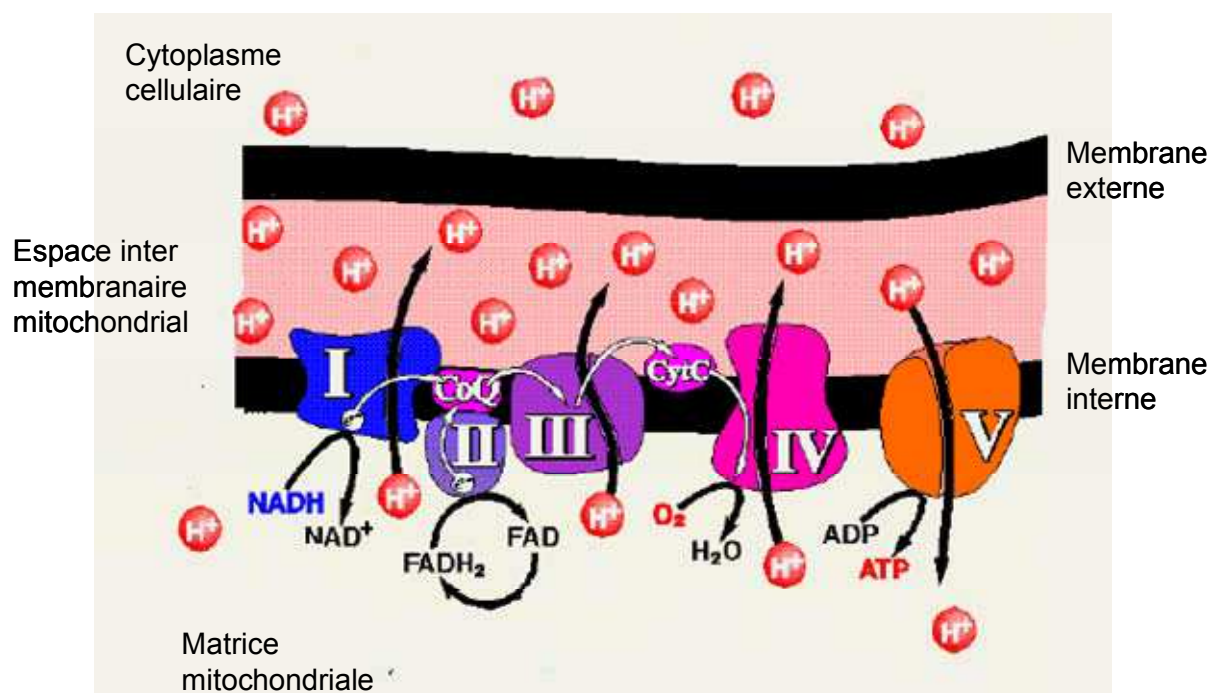
3.1.1 Généralités

Le stress oxydant est largement accepté comme étant un composant critique de plusieurs pathologies. En effet, il est, par exemple, lié au développement des maladies coronariennes, des accidents vasculaires cérébraux, du cancer et de la maladie d'Alzheimer. Le diabète, aussi bien de type I que de type II, est caractérisé par une augmentation du nombre de radicaux libres et une réduction des défenses antioxydantes, tout en ayant également une composante inflammatoire [1]. D'autre part, certains traitements anticancéreux par radiothérapie peuvent également entraîner une augmentation des espèces réactives (ex des radicaux libres) liés au stress oxydant [2].

D'une manière générale, le stress oxydant peut être défini comme un déséquilibre de la balance des espèces prooxydantes et des systèmes de défense dits antioxydants avec comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule. Pour expliquer ce phénomène, il faut décrire les facteurs favorisant la production d'espèces prooxydantes et ceux diminuant l'efficacité des antioxydants. De nombreuses voies sont possibles pour la production des radicaux libres mais nous nous limiterons ici à détailler la voie de la respiration mitochondriale.

Le métabolisme de l'oxygène [3] est effectué principalement au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (*Figure 1*) et aboutit à la formation de deux molécules d'eau avec une considérable production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Cette chaîne respiratoire est formée de 4 complexes (I à IV) permettant le transport des électrons et le pompage des protons à l'intérieur de la mitochondrie. Environ 0,4 à 4% de l'oxygène ne sont pas entièrement transformés dans la mitochondrie et donnent naissance aux espèces réactives de l'oxygène (EROs), comprenant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle ($\bullet OH$). Ainsi, la phosphorylation oxydative du NADH ou du FADH, nécessaire pour générer le gradient de protons de part et d'autre de la membrane mitochondriale, entraîne la production d'EROs. En effet, au long des différents sites de la chaîne des cytochromes constitutifs de la chaîne respiratoire, les électrons dérivés du NADH ou du FADH peuvent directement réagir avec l'oxygène ou d'autres accepteurs d'électrons pour générer les radicaux libres.

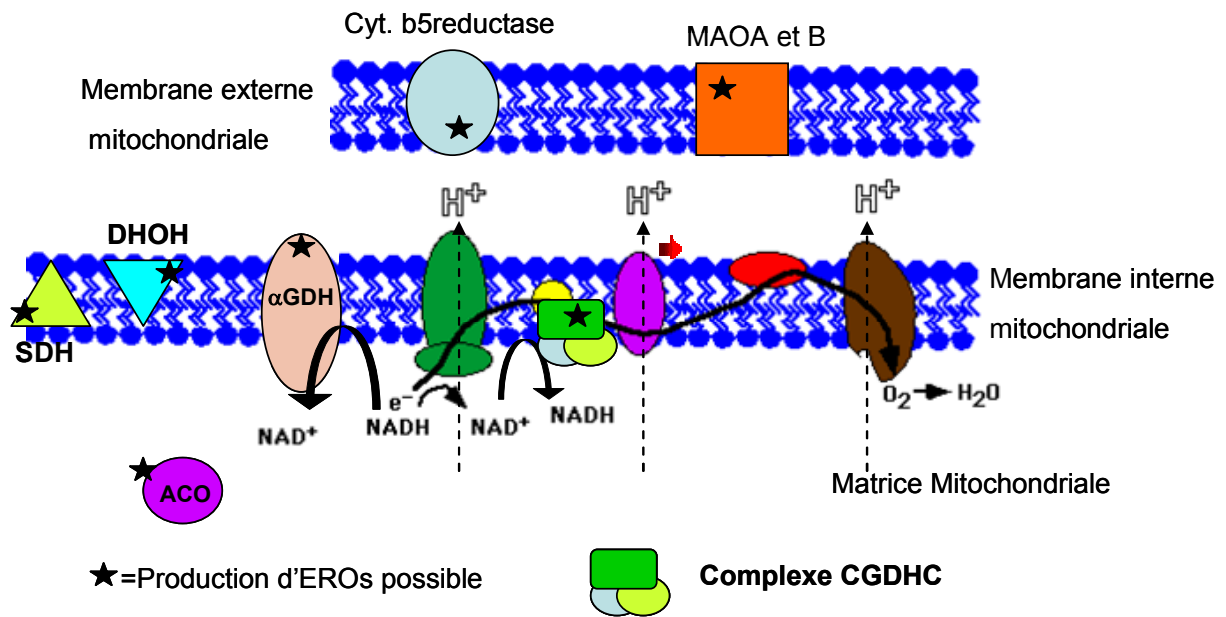
Figure 1 : Respiration mitochondriale [3].



Ainsi, au niveau de la membrane mitochondriale, on peut dénombrer 9 enzymes [3] impliquées dans la formation des EROs comme indiqué sur la *figure 2*.

1. La première enzyme impliquée est la **cytochrome b5 réductase (Cyt b5 réductase)** située dans la membrane externe de la mitochondrie et responsable de l'oxydation du NAD(P)H et de la réduction du cytochrome b5.
2. Les **MAO A et B** (Monoamines oxydases A et B) sont responsables de l'oxydation des amines avec génération de H_2O_2 .
3. La **dihydroorotate deshydrogénase (DHOH)**, localisée dans la membrane interne, catalyse la conversion de dihydrorotate en orotate avec possibilité de production de $O_2^{\bullet-}$.
4. La **deshydrogénase de l' α -glycérophosphate (α GDH)** permet d'oxyder le glycérol-3-phosphate en dihydroxyacétone phosphate avec régénération de NAD^+ à partir de NADH.
5. La **Succinate deshydrogénase (SDH)** oxyde le succinate en fumarate et peut produire des EROs via la voie des FAD.
6. L'**aconitase (ACO)** catalyse la conversion du citrate en isocitrate. Si cette enzyme est inhibée par oxydation, ceci induit la production d' $^{\bullet}OH$ principalement via la voie de Fe^{2+} .
7. Le **Complexe de l' α -cétoglutarate deshydrogénase (CGDHC)** permet l'oxydation de l' α -cétoglutarate en succinyl-CoA utilisant le NAD^+ comme accepteur d'électron. Il est constitué de 3 enzymes : l' α -cétoglutarate deshydrogénase, la dihydrolipoamide succinyltransferase et la lipoamide deshydrogénase. Certains travaux récents évoquent la production de $O_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 par ce complexe.

Figure 2 : Génération d'EROs dans la mitochondrie.



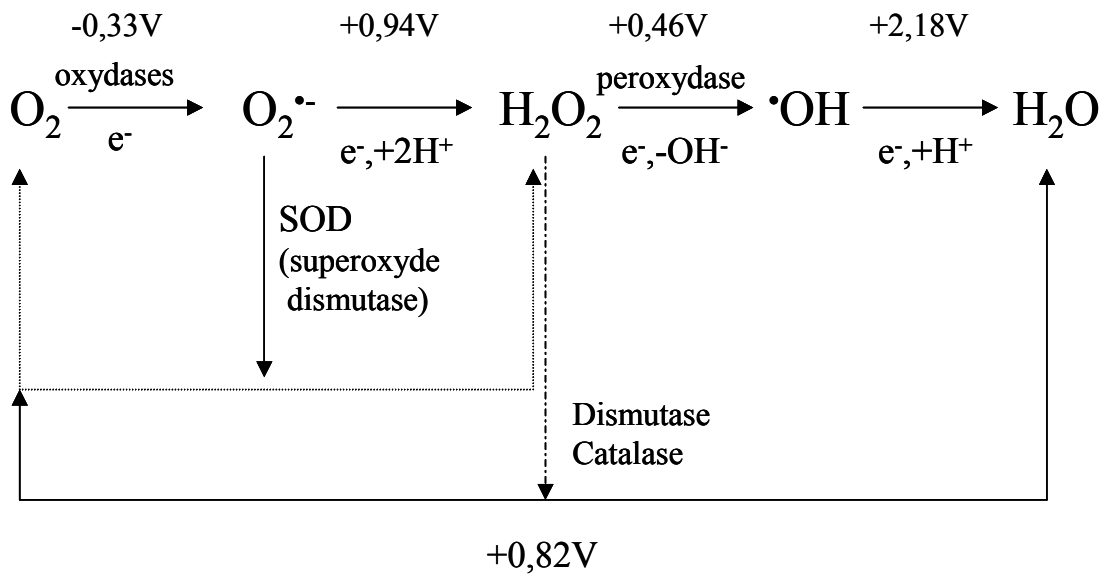
Les EROs, les espèces réactives de l'azote (ERNs) et l'acide hypochloreux (HOCl), représentent l'ensemble des espèces oxygénées activées : les EOAs. Le rôle exact de cette production basale d'EOAs n'est pas totalement connu mais certaines de ces molécules, lorsqu'elles sont produites en faibles quantités, pourraient avoir un rôle de messagers secondaires dans l'activation de diverses voies de signalisation intracellulaire (comme l'apoptose). Produites en trop grandes quantités, ces EOAs sont délétères et vont réagir avec les constituants de la cellule, menaçant leur intégrité structurale. Les cellules sont capables de lutter contre ces espèces oxydantes grâce à divers systèmes de défense dits « antioxydants ».

3.1.2 Production d'espèces réactives lors du stress oxydant

3.1.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène

Parmi les EROs, on peut distinguer quatre espèces principales : **l'oxygène singulet** ($^1\text{O}_2$), **l'anion superoxyde** ($\text{O}_2^{\bullet-}$), **le peroxyde d'hydrogène** (H_2O_2) et **le radical hydroxyle** ($^{\bullet}\text{OH}$). La réduction partielle de l' O_2 à un, deux ou trois électrons génère les différentes espèces citées ci-dessus au lieu des quatre électrons nécessaires pour réduire O_2 en H_2O (Figure 3).

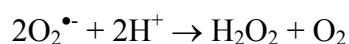
Figure 3 : Réduction de l'O₂ en H₂O



L'¹O₂ représente l'état excité de l'oxygène moléculaire dans sa forme ¹Δg et se caractérise par la présence d'électrons périphériques à spin antiparallèle. De ce fait, il est très instable et extrêmement réactif vis à vis des molécules riches en électrons. Dans la cellule, il est généralement généré par transfert d'énergie entre un photosensibilisateur dans un état excité triplet et l'oxygène moléculaire.

L'O₂^{•-} est le produit de la réduction monoélectronique de l'oxygène moléculaire (c'est-à-dire de l'addition d'un électron) lors de la respiration mitochondriale. De plus, il peut être produit dans la membrane plasmique de cellules immunitaires comme les globules blancs et participer ainsi à la phagocytose (lors des réactions inflammatoires). Dans ce cas, l'oxydase permettant sa production est la NAD(P)Hoxydase. Toutefois, comme O₂^{•-} est un radical anion, il est susceptible de réagir avec des molécules environnantes ; sa réactivité est variable selon que l'on se trouve dans un milieu aqueux ou non. Dans l'environnement de membranes biologiques (apolaires), il se comportera comme une base ou un agent réducteur ; il peut aussi se dismuter pour donner spontanément du H₂O₂ et de l'O₂. En présence de composés tels que la vitamine E, l'ascorbate ou le catéchol, il se comportera d'avantage comme un nucléophile ou un agent oxydant. Lorsqu'il se trouve en milieu aqueux, il agit comme un réducteur de radicaux peroxydes par exemple.

Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (appelé également eau oxygénée) est formé par l'addition d'un second électron sur l'O₂^{•-} donnant comme intermédiaire l'anion peroxyde O₂²⁻ qui se protone facilement pour donner H₂O₂. Toutefois, la principale production de H₂O₂ résulte de la dismutation de l'O₂^{•-} selon la réaction suivante :

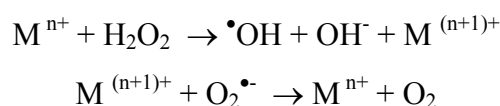


Cette réaction est catalysée par les superoxyde-dismutases (SOD) qui font partie des défenses antioxydantes en limitant ainsi l'effet des O₂^{•-}. Bien que H₂O₂ ait une réactivité modérée (ce n'est

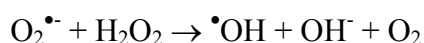
pas un radical), il est tout de même considéré comme un dérivé toxique et peut diffuser dans le milieu extracellulaire. Ce dernier pourra être éliminé en O_2 et H_2O par l'action de la catalase.

En présence d'ions métalliques tels que les ions ferreux (Fe^{2+}) ou cuivreux (Cu^+), H_2O_2 se décomposera en radicaux hydroxyles ($\bullet OH$) qui sont les oxydants les plus puissants de l'organisme. La durée de vie de $\bullet OH$ est très courte (moins de 1 nanoseconde) ce qui fait qu'il réagira avec les molécules environnantes et non pas à distance. L' $\bullet OH$ peut être généré de plusieurs manières différentes : coupure homolytique de H_2O_2 sous l'influence de rayonnements UV, réaction de l'acide hypochloreux avec l' $O_2^{\bullet -}$, décomposition des ions peroxytrinites ($ONOO^-$). Toutefois, les principales voies de production d' $\bullet OH$ sont dues aux réactions de Fenton et d'Haber-Weiss.

Décomposition de H_2O_2 en présence de métaux M^{n+} (comme le $Fe(II)$ ou le $Cu(I)$, le $Co(II)$, le $Ti(III)$ ou le $Cr(V)$) selon la réaction de Fenton :



Interaction de H_2O_2 avec $O_2^{\bullet -}$ selon la réaction d'Haber-Weiss :



Bien que les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss se produisent facilement in vitro, leur participation dans l'organisme est moins bien établie et ceci étant du notamment à la séquestration du fer par de nombreuses protéines. Cependant, dans le cas où l'on serait en présence d'une surcharge ferrique comme dans les hémochromatoses, on peut penser que ces réactions se produisent plus fréquemment [4]. D'autre part, l'autooxydation du Fe^{2+} est activé par l'EDTA tandis qu'elle est inhibée par la desferoxamine.

La réactivité d' $\bullet OH$ est telle qu'il réagit immédiatement avec toutes les molécules biologiques à proximité produisant des radicaux organiques. Les réactions sont principalement représentées par l'arrachement d'un hydrogène sur un groupement alkyle et l'addition sur des structures aromatiques telles que les bases puriques ou pyrimidiques constitutives des acides nucléiques.

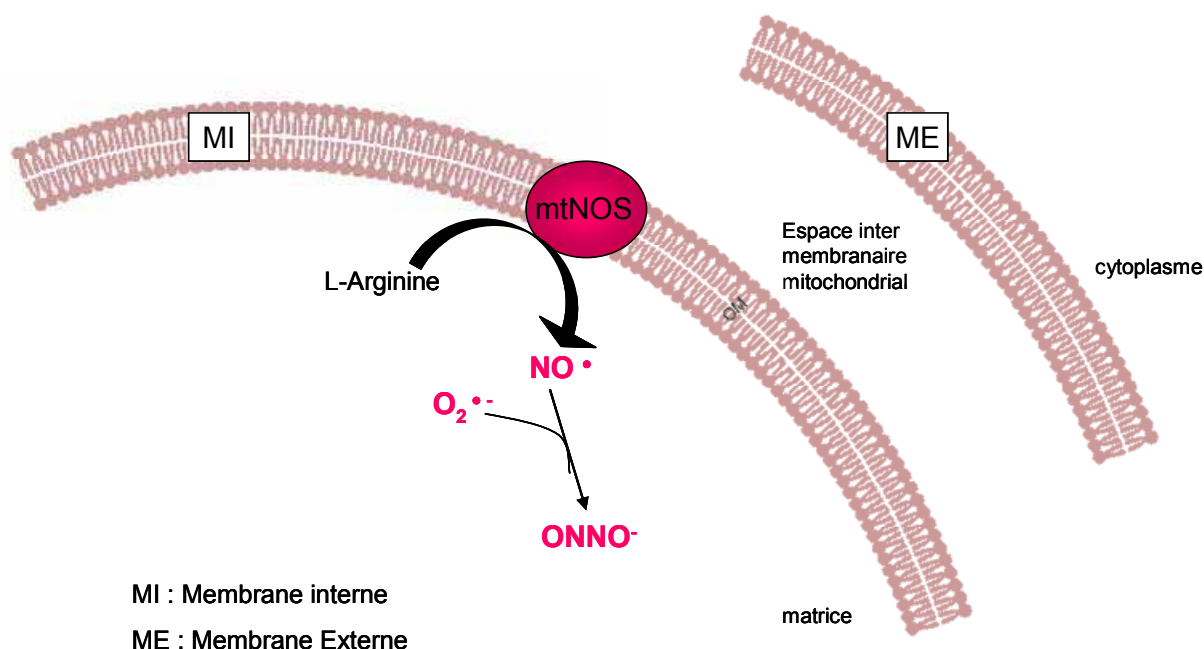
3.1.2.2 Les espèces réactives de l'azote

3.1.2.2.1 Le NO^\bullet et ses dérivés : les ERNs

Les espèces réactives de l'azote issues du métabolisme de l'azote (via les NOSynthases [5]) sont représentées principalement par l'oxyde nitrique (NO^\bullet) qui est un radical, les oxydes de l'azote, comme l'anhydride nitreux N_2O_3 et l'ion peroxydinitrite (ONOO^-). La présence en excès de ces ERNs semble avoir des effets carcinogènes.

NO^\bullet provient notamment de la réaction catalysée par la NOSynthase mitochondriale (**mtNOS**) [6] entre l'atome d'azote appartenant à la L-Arginine (un acide aminé) et une molécule d'oxygène (*Figure 4*).

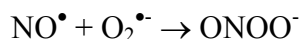
Figure 4 : NOSynthase mitochondriale.



NO^\bullet est peu réactif et diffusible dans les milieux biologiques. Sa durée de vie est de l'ordre de quelques secondes en système aérobie et de plus de 15 secondes lorsqu'il se trouve dans un milieu pauvre en O_2 . Il est oxydable en ion nitrosonium NO^+ et peut être réduit en ion nitroxyle NO^- . De plus, NO^\bullet peut être produit par la NOS endothéliale et possède dans ce cas des capacités vasodilatatrices au niveau cardiovasculaire. De plus, il a de nombreux autres rôles (notamment dans la signalisation intra et intercellulaire ou dans l'apoptose, dans les mécanismes de défense et dans la relaxation des cellules musculaires lisses).

Cependant, le NO^\bullet n'est pas dénué de toxicité car il est capable de générer des ions nitrites (NO_2^-) ou de fixer un groupement nitroxyle sur les acides aminés, comme la tyrosine, pour générer la

nitrotyrosine. Lorsque l'on se trouve en présence d'un excès de NO^\bullet , on parle souvent de « **stress nitrant** ». La réaction de NO^\bullet avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ entraîne la formation de l'ion peroxy-nitrite (ONOO^-) selon la réaction suivante :



L'ion ONOO^- est considéré comme une espèce réactive de l'azote mais aussi de l'oxygène. Sa protonation en acide peroxy-nitrique (ONOOH) donne une espèce très oxydante.

L'autooxydation du NO^\bullet par O_2 est à l'origine de la formation d'anhydride nitreux, le N_2O_3 .

Ainsi, chaque ERN possède une réactivité qui lui est propre et peut agir sur divers constituants cellulaires [7] comme décrit dans la *figure 5*.

3.1.2.2 Mécanismes d'action des ERNs

Le NO^\bullet est capable de moduler l'activité de nombreuses enzymes impliquées dans diverses voies métaboliques. Indirectement, le NO^\bullet est capable de nitrosyler le GSH ce qui entraîne un déficit des défenses antioxydantes, la réserve de GSH s'épuisant. De plus, il peut engendrer un stress oxydant intracellulaire, interagir avec l'ADN et réguler certains phénomènes comme la transcription, la traduction ou encore l'apoptose.

Le N_2O_3 est un agent nitrant très puissant qui réagit avec les groupements sulfhydryles des protéines et des amines secondaires pour former des *N*-nitrosamines.

D'autre part, les ERNs peuvent également avoir une action sur d'autres constituants cellulaires comme les lipides et les protéines. A nouveau, c'est l'ion ONOO^- qui est responsable de réactions de peroxydation et de nitration.

Les réactions des ERNs avec l'ADN peuvent être classées en trois catégories : désamination, oxydation et nitration [8]. La formation de ces lésions de l'ADN dues aux ERNs sera détaillée ultérieurement.

3.2 L'inflammation

3.2.1 Généralités

L'inflammation est un phénomène physiologique de l'organisme plutôt bénéfique qui vise à restaurer l'intégrité de l'organisme. Cependant, elle peut aussi être en relation directe avec certains cancers lorsque cette inflammation est de type chronique et donc considérée comme "pathologique". Les maladies inflammatoires chroniques représentent la troisième cause de mortalité en France, juste après les affections cardiovasculaires et les cancers.

Elle est généralement caractérisée par 4 signes cliniques cardinaux qui sont la rougeur, l'œdème, la chaleur et la douleur. Elle fait intervenir de nombreux acteurs comme les cellules polynucléaires ou les macrophages. Trois séquences d'évènements complexes composent la réponse inflammatoire [7]. Une première phase dite d'*initiation*, faisant suite au signal de danger (exogène ou endogène) met en jeu des effecteurs dits primaires. Ensuite, la réaction inflammatoire passe par une phase d'*amplification* entraînant la mobilisation et l'activation d'effecteurs secondaires. Enfin, une phase de *résolution et de réparation* permet de restaurer l'intégrité du tissu agressé.

Prenons l'exemple d'une réaction inflammatoire déclenchée à la suite d'une infection bactérienne. L'intrusion bactérienne entraîne l'activation des cellules du système immunitaire avec libération de $\text{TNF}\alpha$ et de certaines interleukines. Suite à cette arrivée de monocytes et de macrophages, la phase d'amplification permet de recruter d'autres effecteurs et d'amplifier le foyer inflammatoire. Il y a alors un afflux préférentiel de polynucléaires neutrophiles. Ces derniers exercent surtout des activités d'endocytose et de phagocytose et participent ainsi à la destruction locale des microorganismes extracellulaires comme les bactéries.

Dans les mécanismes de défense dirigés contre les microorganismes, trois systèmes enzymatiques ont été décrits :

- ✓ Le système NAD(P)H-Oxydase [9] permettant aux cellules polynucléaires neutrophiles et éosinophiles de produire des espèces réactives telles que $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet\text{OH}$ et $^1\text{O}_2$.
- ✓ La voie de la NO synthase qui est inductible par les cytokines proinflammatoires et certaines hormones vasoactives. Cette voie peut aboutir à la production de dérivés oxydés de l'azote comme le NO^\bullet qui est toxique pour les microorganismes. Les réactions inflammatoires, qu'elles soient aiguës ou chroniques, entraînent une forte production de NO^\bullet et de NO^{2-} .
- ✓ Le système peroxydase avec la myéloperoxydase (MPO) des polynucléaires neutrophiles et la peroxydase spécifique des polynucléaires éosinophiles.

Ainsi, lors des réactions inflammatoires, il y a production des espèces précédemment décrites, à savoir des EROs et des ERNs.

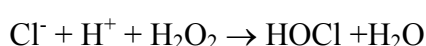
3.2.2 Rôles de la MPO

La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme initialement présente dans les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les monocytes mais absente dans les macrophages. Lorsque les PNN sont activés, ils sont capables de sécréter la MPO, présente dans les granules primaires de ces cellules, les lysosomes [10]. Les macrophages sont alors capables de capturer la MPO devenue extracellulaire par dégranulation ou par lyse des PNN.

La MPO est une enzyme hémique possédant deux activités enzymatiques, à savoir une activité de peroxydase et une activité de chloration. Ces deux activités participent notamment à la lutte contre les agents infectieux.

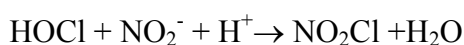
Il se peut qu'il existe une relation entre les phénomènes d'inflammation chronique et la production de NO^\bullet par les PNN activés. En effet, l'activité de peroxydase de la MPO entraîne l'oxydation de l'ion NO_2^- en $^\bullet\text{NO}_2$ en présence de H_2O_2 [11].

Concernant sa deuxième activité, la MPO est capable de catalyser la production d'acide hypochloreux (HOCl) à partir de la réaction entre le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les ions chlorures (Cl^-) (en concentration physiologique dans l'organisme) selon la réaction suivante :



HOCl et sa base conjuguée (ClO^-) sont deux puissants agents oxydants et bactéricides. Les lipides sont les cibles majeures de l'action de ces espèces chlorées. En particulier, elles réagissent avec la double liaison des acides gras polyinsaturés entraînant la formation de chlorhydrines cytotoxiques et ceci en modifiant la fluidité membranaire. Ce type de réaction se produit également avec le cholestérol non estérifié ou les lipoprotéines. De plus, les réactions de HOCl se font avec les amines primaire (comme l'arginine, la taurine et la lysine) pour former des *N*-chloramines (R-NHCl) mais également avec les bases de l'ADN [12].

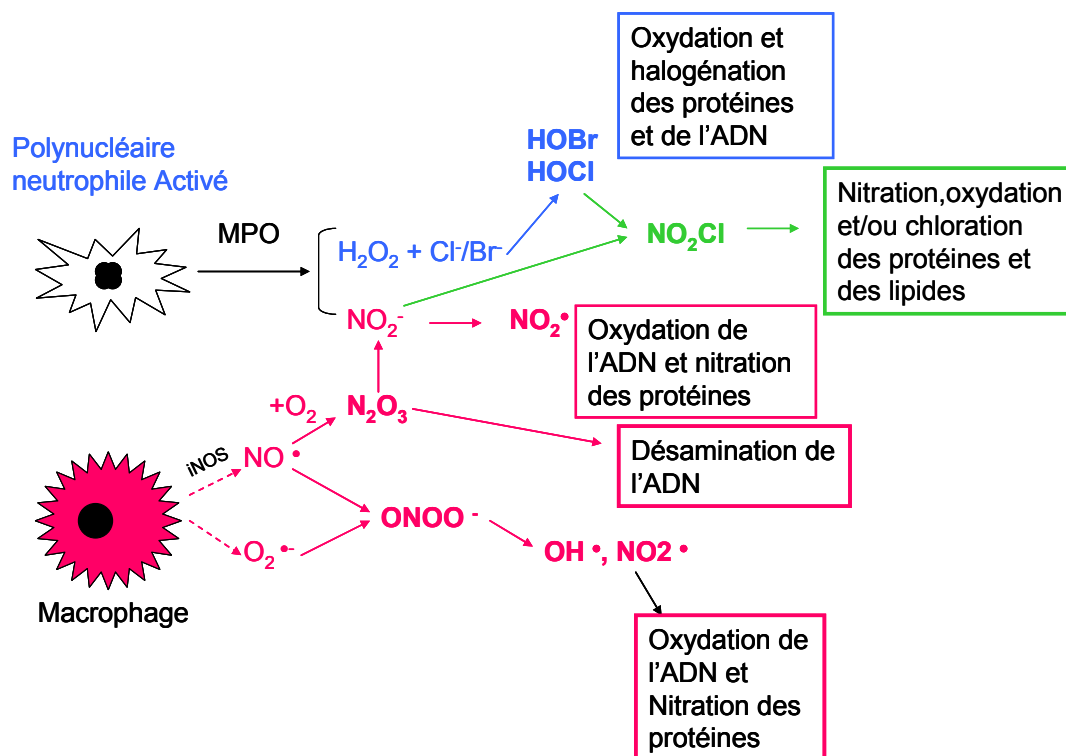
D'autre part, la réaction de HOCl avec l'ion NO_2^- entraîne la formation de chlorure de nitrite (NO_2Cl) selon la réaction suivante [13] :



Cette réaction a été démontrée dans les PNN in vitro par ajout de NO_2^- [11]. NO_2Cl est capable de nitrer et de chlorer les composés phénoliques comme la tyrosine mais peut également induire l'oxydation et la nitration des lipoprotéines de faible densité (LDL) [14].

On peut alors résumer l'action des espèces actives de l'azote et des espèces chlorées dans un schéma récapitulatif de l'inflammation présentée dans la *figure 5*.

Figure 5 : EROs et ERNs produits lors de l'inflammation



3.3 La peroxydation lipidique

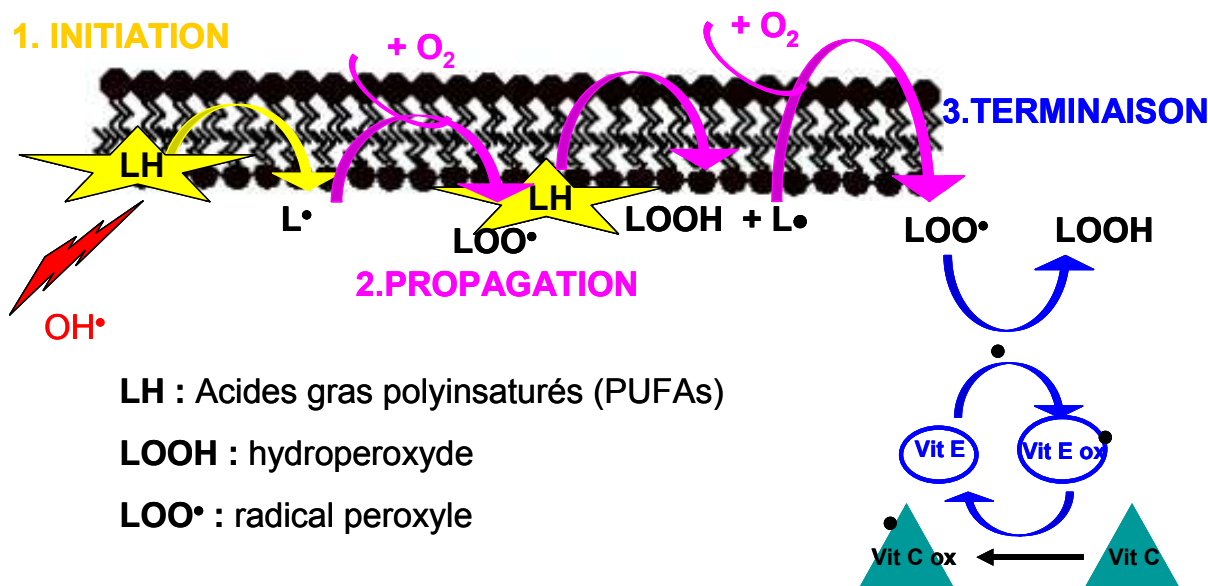
3.3.1 Généralités

Le stress oxydant concerne tous les constituants cellulaires mais ce sont les lipides qui sont les plus touchés par ce phénomène. La peroxydation lipidique concerne les acides gras polyinsaturés ou estérifiés des membranes cellulaires (ou PUFAs pour « Poly Unsaturated Fatty Acids », exemple des esters de cholestérols, phospholipides et triglycérides), cibles des EROs. Ce phénomène de peroxydation lipidique peut se produire dans des conditions physiologiques et il se trouve exacerbé dans des conditions pathologiques comme l'athérosclérose.

La peroxydation lipidique débute par une phase d'**initiation** qui implique l'attaque des espèces réactives (hydroxyles, alcoxydes, peroxydes, oxygène singulet, peroxyde nitrite) entraînant l'arrachement d'un hydrogène du PUFA (**LH**). Ceci aboutit à la formation d'un radical pentadiényle qui après addition avec O_2 donne le radical peroxyde (LOO^\bullet). Ensuite, ce radical peut réagir avec un autre PUFA et former un hydroperoxyde (**LOOH**), c'est la phase dite de **propagation** de la peroxydation lipidique. Ces hydroperoxydes appartiennent à la famille des peroxydes lipidiques : les LPO. La réaction en chaîne de la peroxydation lipidique peut être prévenue par la vitamine E (α -tocophérol) intercalée dans la bicouche lipidique des membranes qui joue le rôle de donneur d'hydrogène. En effet, la vitamine E transforme les radicaux peroxydes en hydroperoxydes et met fin

à la réaction en chaîne de peroxydation des PUFAs. Cette dernière étape est alors désignée comme phase de **terminaison**. Ces réactions sont résumées dans la *figure 6*.

Figure 6 : Réactions de la peroxydation lipidique



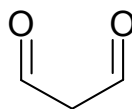
Les LPO sont susceptibles de se décomposer en produits secondaires c'est-à-dire en aldéhydes très réactifs pouvant être considérés comme des messagers secondaires toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres. Les plus réactifs vis à vis des bases de l'ADN sont représentés par le malondialdéhyde (MDA), le trans-4-hydroxy-2-nonéanal (4-HNE) et le crotonaldéhyde. Le MDA et le 4-HNE peuvent former des adduits avec l'ADN. D'autre part, le MDA et le 4-HNE réagissent avec des antioxydants comme le GSH entraînant une diminution de la concentration de ce dernier, se traduisant ainsi par une diminution des défenses cellulaires.

3.3.1.1 Espèces actives

3.3.1.1.1 Le malondialdéhyde (MDA)

Le MDA fait partie des aldéhydes réactifs issus de la décomposition des LPO. En raison de son caractère mutagène [15] et atherogène, il est le produit le plus étudié de la dégradation des LPO. Il a été proposé comme biomarqueur du stress oxydant dans l'urine de rats traités avec des agents toxiques pour le foie [16]. Il est sans doute le plus mutagène des produits de la peroxydation lipidique. C'est pourquoi il est considéré comme ayant une implication dans l'initiation des cancers. Sa structure chimique est représentée dans la *figure 7*.

Figure 7 : Structure chimique du MDA



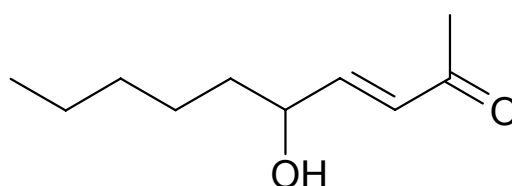
Les principales origines [17] du MDA dans les échantillons biologiques proviennent de la peroxydation des acides gras polyinsaturés avec au moins 3 doubles liaisons C=C adjacentes comme par exemple dans l'acide arachidonique (20:4) ou l'acide docosahexaénoïque (22:6). Le MDA peut aussi provenir de la décomposition des LPO plaquettaires ou de la biosynthèse des eicosanoïdes.

De nombreuses méthodes de dosage [18] ont été mises en œuvre pour rechercher le MDA dans les milieux biologiques ; toutefois elles manquent de spécificité. La méthode la plus utilisée fait appel à une mesure par spectrophotométrie d'un produit absorbant fortement à 532 nm résultant de la réaction du MDA avec l'acide thiobarbiturique (TBA). L'inconvénient de cette approche est que le TBA peut réagir avec de nombreuses autres molécules.

3.3.1.1.2 Le 4-hydroxynonéanal (4-HNE)

Le 4-HNE est le produit de la peroxydation lipidique le plus génotoxique [19]. Dans l'organisme, il se forme en quantités plus importantes que le MDA. Sa structure chimique est représentée dans la *figure 8*.

Figure 8 : Structure chimique du 4-HNE



Le 4-HNE est majoritairement produit lors de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés en $\omega 6$, comme les acides gras linoléique (18:2) et arachidonique (20:4). On peut également trouver le 4-HNE dans la nourriture après oxydation des acides gras. Sa méthode de dosage fait appel à une détection par une méthode colorimétrique.

Le 4-HNE est une molécule électrophile qui peut réagir avec de nombreuses protéines. Ainsi, trois types de réactions sont essentiellement observées [20] :

De façon majoritaire des réactions d'addition de type Michael.

Des réactions avec les amines primaires pour donner des bases de Schiff.

La formation d'époxyde de HNE.

Les effets biochimiques du 4-HNE sont principalement liés à sa réaction avec les groupements thiol et amino. En effet, le 4-HNE peut réagir en milieu neutre avec les groupements thiols comme par exemple ceux du GSH, modifiant ainsi l'état rédox de la cellule. D'autre part, il peut activer la voie des MAPKinasés, les mécanismes de détoxification, la réponse inflammatoire ou encore inactiver certaines enzymes.

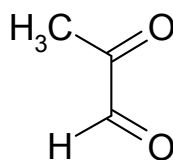
Ces deux aldéhydes réactifs, 4-HNE et MDA, issus de la dégradation des acides gras de l'organisme, sont tous deux capables de générer des adduits avec les bases de l'ADN. La formation de ces adduits sera détaillée ultérieurement.

Il a été montré que d'autres aldéhydes réactifs, générés dans l'organisme, peuvent réagir avec les bases de l'ADN, comme c'est le cas du glyoxal [21].

3.4 La production de méthylglyoxal

D'autres aldéhydes réactifs sont présents dans l'organisme, c'est notamment le cas du méthylglyoxal (MGO). Il appartient à la catégorie des dérivés α -dicarbonylés réactifs. Sa structure chimique est présentée dans la *figure 9*.

Figure 9 : Structure chimique du MGO



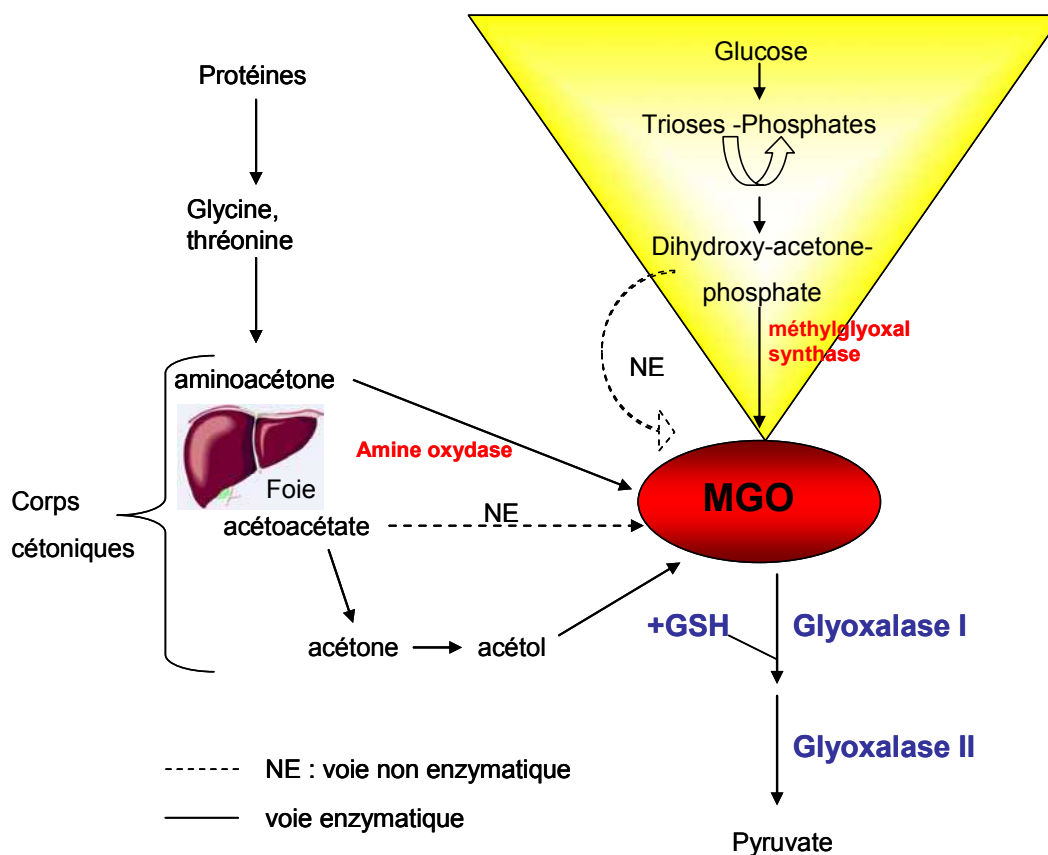
Le MGO peut provenir de nombreuses réactions cellulaires. Il est formé majoritairement lors de la métabolisation du glucose par la voie des trioses-phosphates ou provient du métabolisme des corps cétoniques dans le foie. Il est présent dans de nombreux constituants comme le tabac, le pain grillé, le café ou le whisky.

De plus, l'autoxydation du glucose en radical ènediol, catalysée par les ions métalliques entraîne également la formation des dérivés α -dicarbonylés [22]. En effet, il a été montré que cette réaction d'autooxydation du glucose n'est pas possible lorsque l'on ajoute des chélateurs de métaux [23].

La littérature rapporte différentes méthodes de dosage du MGO dans le plasma. Parmi ces dernières, une mesure a été effectuée par chromatographie liquide associée à une détection par ultraviolet ; les niveaux de MGO ainsi déterminés sont respectivement de 708 +/- 125 nM (n=29

diabétiques) et de 520 +/- 41,8 nM (n=10 contrôles). Un récapitulatif des différentes voies de formation du MGO est présenté dans la *figure 10*.

Figure 10 : Métabolisme du MGO.



Le MGO, tout comme le 4-HNE, peut réagir avec le GSH et le produit de sa réaction est ensuite dégradé par la voie des glyoxalases I et II (enzymes à cofacteur métallique Zn^{2+}). De nombreux microorganismes du tractus gastro-intestinal (comme *Helicobacter pylori*) sont capables de produire la triade MGO/Glyoxalases et GSH.

Lors de l'hyperglycémie, la vitesse de formation du MGO chez les diabétiques dépasse les capacités de détoxification de ce produit par les cellules, via le système des glyoxalases, ce qui explique qu'il se retrouve en excès dans le sang circulant. Chez l'homme, deux études ont permis de mettre en évidence un taux plus élevé de MGO plasmatique chez un groupe de patients diabétiques par rapport à des individus sains [24,25]. De plus, il semblerait que cette augmentation soit plus importante dans le cas du diabète de type I que pour le type II [26]. Cette étude a également montré que l'activité des glyoxalases des érythrocytes circulants était augmentée dans le cas des patients diabétiques (type I et II) par rapport à un groupe d'individus sains.

Le MGO participe à la formation des produits de la glycation puisqu'il est l'un des intermédiaires de cette réaction. Une des conséquences principales de l'hyperglycémie observée au cours du diabète est la glycosylation non enzymatique ou glycation des protéines. Celle-ci consiste en une modification post-traductionnelle ubiquitaire. Ce processus se déroule selon trois étapes. La première étape aboutit à la formation d'une base de Schiff par réaction de la fonction aldéhyde d'un sucre réducteur, comme le glucose, avec les résidus aminés de la protéine, principalement la lysine et la fonction *N*-terminale. Un réarrangement d'Amadori se produit ensuite, atteignant un équilibre après quelques semaines, ces deux étapes aboutissant à la formation des produits de glycation dits précoces ou produits d'Amadori, comme l'hémoglobine glyquée HbA1c. Ces adduits possèdent un groupement céto, qui, en présence de métaux de transition, peuvent céder un électron à l'O₂ pour générer des radicaux O₂^{•-}. Il existe une hypothèse suggérant que les α -oxoaldéhydes seraient formés avant et après la formation des produits d'Amadori [27]. Ceci laisse à penser que de courtes périodes d'hyperglycémie seraient suffisantes pour faire augmenter le taux de ces α -oxoaldéhydes.

Une dégradation des produits d'Amadori est possible conduisant à la formation de composés α -dicarbonylés et de désoxyglucosones. Finalement, une série de réarrangements par transfert d'hydrogène, aboutit à la formation des produits terminaux de glycation (PTG) dits produits de Maillard et encore désignés sous le terme d'AGEs "Advanced Glycation Endproducts". Ces derniers ont une durée de vie longue, une pigmentation brune et une fluorescence importante. La pentosidine est une de ces molécules actuellement les plus étudiées.

La formation des produits de Maillard, outre le cas du diabète, est un phénomène accru dans diverses pathologies comme l'insuffisance rénale terminale ou au cours du vieillissement. De plus, d'autres sucres peuvent participer à ces réactions comme le galactose ou le fructose. Les conséquences fonctionnelles de la glycation des protéines peuvent concerner par exemple une altération de leurs activités enzymatiques.

Afin de mieux comprendre les conséquences de cette glycation, il a été proposé de quantifier certains produits pour disposer de marqueurs *in vivo*. C'est pour cette raison que certains PTG sont quantifiés par fluorescence au niveau de prélèvements tissulaires, sériques ou urinaires.

L'implication des PTG dans la pathologie du diabète concerne plus particulièrement ses complications cardiovasculaires [28]. L'aminoguanidine (pimagedine) est un agent thérapeutique prototype qui empêche la formation des AGEs par réaction avec les dérivés α -dicarbonylés [29].

Ainsi, le MGO serait impliqué indirectement dans les complications cardiovasculaires du diabète. Il a été montré le rôle prépondérant du MGO dans la pathologie du diabète, de part sa possible implication dans la « résistance à l'insuline » évoquée dans le cas du diabète de type II. En effet, Potier et al [30] ont montré que la réaction de l'insuline avec le MGO donnait lieu à la formation d'un dérivé possédant une activité hypoglycémisante de 40% inférieure à l'insuline. D'autre part, il

semble jouer un rôle également dans la cicatrisation des plaies. En effet, l'application d'une crème à base de metformine (un antidiabétique capable de diminuer la formation des AGEs en complexant le MGO) permet d'obtenir une meilleure cicatrisation, notamment au niveau des lésions du « pied diabétique » [31].

D'autre part, comme le MGO est un aldéhyde réactif, sa réaction est donc envisageable avec les bases de l'ADN [32].

3.5 Les radiations ionisantes

Lorsqu'un rayonnement ionisant (RI) pénètre dans un organisme, il engendre des réactions radicalaires. L'unité de dose absorbée est exprimée en Gray (Gy) qui représente l'équivalent d'un joule (J) absorbé par kilogramme de matière. Cependant, il existe différents types de RI (plus ou moins pénétrants) dont l'efficacité biologique pour une même dose est différente. Ainsi, pour rendre compte de la nocivité des rayonnements à dose absorbée égale, une autre notion a été introduite, dite de « facteur de qualité ». En multipliant cette dose absorbée (Gy) par ce facteur, on détermine une mesure de l'effet biologique d'un rayonnement dont l'unité est alors le Sievert (Sv). Les êtres humains sont continuellement soumis à des expositions de RI, qu'ils soient d'origine naturelle (tellurique, cosmique), médicale (radiographie, radiothérapie, médecine nucléaire) ou industrielle. Dans ce contexte de dangerosité d'une exposition excessive à ces rayonnements, des normes de doses d'expositions ont été établies (en France, on estime que la limite est de 5 mSv par an pour la population).

Au sein de la cellule, les RI peuvent provoquer des dommages à l'ADN. Le mécanisme d'action impliqué est double : soit direct en ionisant l'ADN, soit indirect via l'ionisation d'une molécule d'eau avoisinante. En présence d'eau, le rayonnement ionisant entraîne la radiolyse de l'eau qui conduit à la formation du cation radical $\text{H}_2\text{O}^{+\bullet}$ et d'un électron. Une cascade de réactions génère notamment l'espèce $\bullet\text{OH}$ qui est responsable de 65% des effets des RI. Les dommages de l'ADN sont ainsi en partie de même nature que ceux générées par les EROs, incluant des lésions des bases, des sites alcali-labiles et des coupures simples et doubles-brins.

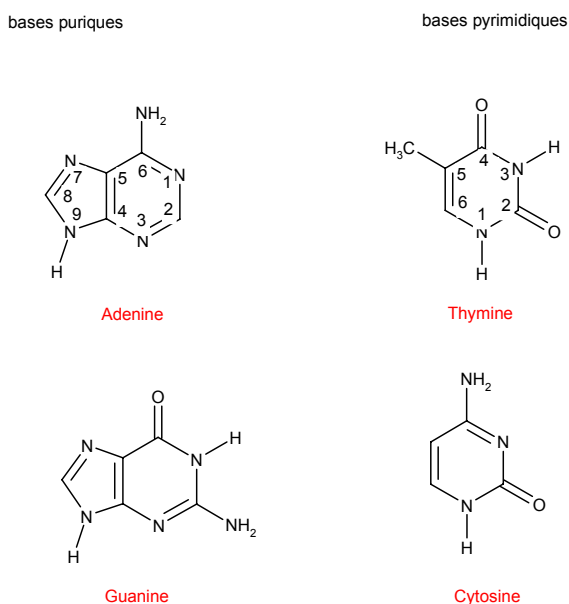
3.6 Action ciblée sur les acides nucléiques

3.6.1 Les molécules d'ADN et d'ARN : structure et rôles

L'acide 2'-désoxyribonucléique (ADN) est le détenteur de l'information génétique de toute cellule. Il permet à la cellule de synthétiser continuellement ses protéines et sa réplication assure la transmission du message pour les générations suivantes. L'ADN est tout d'abord transcrit en ARNm dit messenger, puis c'est l'étape de traduction qui permet la synthèse des acides aminés constitutifs des protéines à partir de cet ARNm.

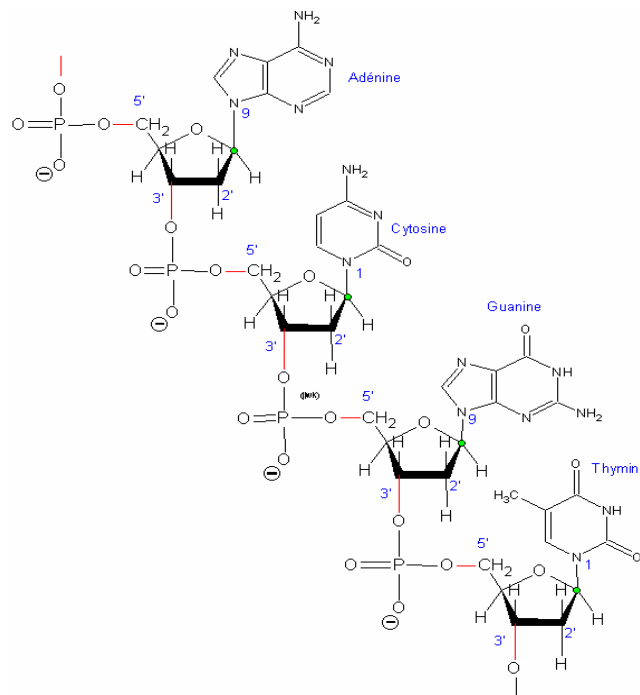
Un brin d'ADN est constitué par un enchaînement de motifs élémentaires dénommés nucléosides. Un nucléoside comprend un sucre (le 2-désoxyribose) relié par une liaison *N*-glycosidique à l'une des quatre bases suivantes : l'adénine (Ade) ou la guanine (Gua) qui constituent les bases puriques, la thymine (Thy) ou la cytosine (Cyt) qui représentent les bases pyrimidiques (voir structure chimique des bases en *figure 11*).

Figure 11 : les quatre bases constitutives de l'ADN :



Les nucléosides sont reliés entre eux par l'intermédiaire d'un pont phosphodiester entre les carbones 3' et 5' des 2-désoxyriboses, représentés dans la *figure 12*.

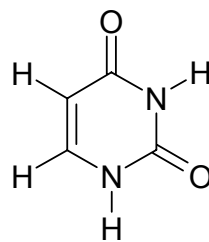
Figure 12 : Pont phosphodiester reliant les nucléosides



Ainsi, un brin d'ADN est associé à son brin complémentaire à l'aide de liaisons hydrogène présentes entre les bases, sachant que l'appariement de ces dernières est spécifique, puisque seule une adénine est complémentaire d'une thymine et une guanine d'une cytosine.

Quant à la molécule d'ARN, celle-ci est principalement monocaténaire, le sucre est un ribose et la thymine est remplacée par l'uracile (Ura). La structure de l'uracile est présentée en *figure 13*.

Figure 13 : Structure chimique de l'uracile.



Le rôle biologique de l'ADN est de permettre la synthèse protéique. Cette synthèse s'effectue en deux étapes, la première étant la transcription et la deuxième la traduction. La transcription est initiée par la fixation d'une ARN polymérase sur une partie située en amont du gène appelé promoteur. C'est alors qu'on obtient une copie du gène en ARN messager (ARNm). Une étape intermédiaire permet d'éliminer les parties non codantes (introns) de l'ARNm pour ne garder que les parties codantes (exons) : c'est l'épissage de l'ARNm. Ce dernier peut alors sortir du noyau et sera

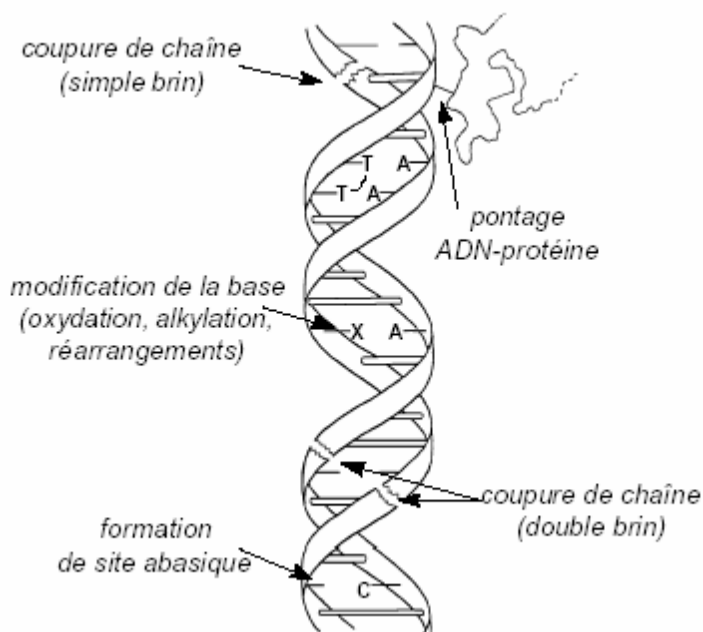
traduit en protéines par les ribosomes et à l'aide des ARN de transfert (ARNt) dans le cytoplasme. La traduction consiste à passer du code à quatre bases de l'ADN à celui des protéines qui est constituée de 20 acides aminés. Chaque acide aminé est codé pour une séquence de trois bases adjacentes dans l'ADN.

3.6.2 Les lésions oxydatives de l'ADN.

Les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres ou d'autres agents endommageant l'ADN ont des implications dans les phénomènes de mutagenèse, dans la mort des cellules (somatiques et reproductrices) et dans le vieillissement. Les mécanismes de génération de ces dommages sont de plusieurs types.

Rappelons ici que H_2O_2 et $O_2^{\bullet-}$ ne sont pas assez réactifs pour altérer directement l'ADN mais ils peuvent tous deux générer le radical $\bullet OH$. Comme le radical $\bullet OH$ est l'espèce la plus réactive de l'oxygène, sa réaction avec l'ADN est susceptible de conduire à divers processus, tels que l'oxydation des bases et des résidus des sucres ou la formation de cassures de chaîne par arrachement d'un atome d'hydrogène du 2-désoxyribose [33]. De plus, le radical $\bullet OH$ est responsable de la formation de pontages ADN-protéines dans les nucléoprotéines. Les différentes catégories de lésions sont représentées dans la *figure 14*.

Figure 14 : Différentes catégories de lésions de l'ADN



Les diverses lésions sont donc majoritairement produites par l'action d' $\bullet OH$. Les mécanismes de formation de ces lésions sont très bien décrits dans la littérature [34]. La réaction d' $\bullet OH$ avec les

doubles liaisons des hétérocycles des bases se traduit par une addition. L'arrachement d'un atome d'hydrogène est possible à partir du groupement méthyle de la thymine ou d'un sucre adjacent. On se retrouve en présence de radicaux carbonés des bases ou du sucre qui donnent lieu à la formation aux diverses lésions. Notons ici que la base lésée la plus étudiée est la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua), encore désigné 8-hydroxyguanine. Le ribonucléoside correspondant (présent dans l'ARN) est appelé la 8-oxo-7,8-dihydroguanosine (8-oxoGuo) tandis que le 2'-désoxyribonucléoside correspond à la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosine (8-oxodGuo) (présent dans l'ADN).

A ce jour, de nombreuses lésions de l'ADN ont été identifiées dont les principales sont représentées en *figure 15*. On décompte environ une centaine de bases modifiées de l'ADN sachant que seulement un petit nombre d'entre elles a été détecté et quantifié dans les cellules humaines.

Figure 15 : Principales lésions oxydatives de l'ADN [34]

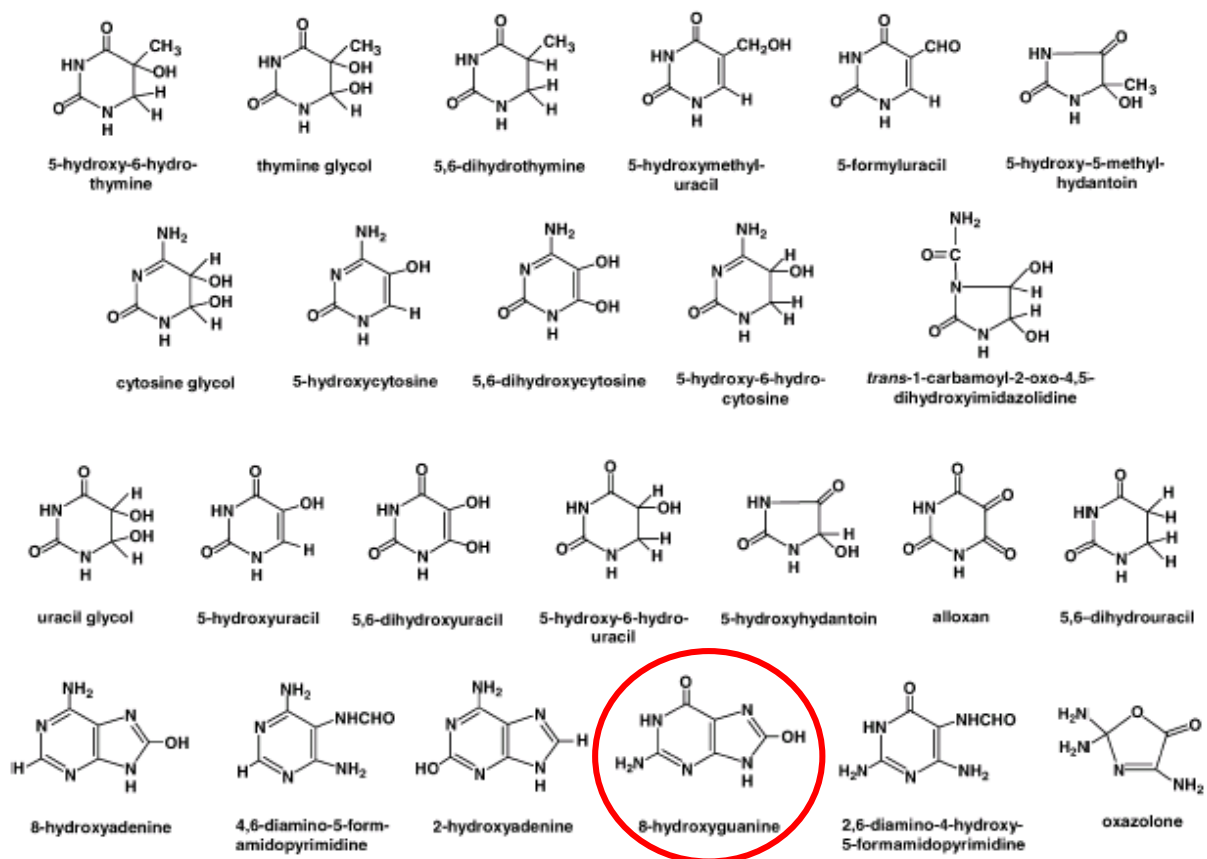


Fig. 8. Major products of oxidative damage to the DNA bases.

Les dommages oxydatifs des sucres [34] des nucléosides proviennent également de l'action d' $\bullet\text{OH}$. De nombreuses modifications sont alors possibles. Cependant, il est à noter que la conséquence de ces dommages au 2-désoxyribose consiste généralement en une cassure de brin d'ADN.

De plus, une autre catégorie de dommages oxydatifs appelés les 8,5'-cyclopurine-2'-désoxyribonucléosides résulte de la formation d'une liaison covalente entre la base et le sucre. On parle alors de lésions « tandem ».

Enfin, les bases de l'ADN peuvent former des liaisons avec certains acides aminés des protéines créant des pontages ADN-protéine.

3.6.3 Les lésions issues de la réaction avec les ERNs

Parmi les ERNs, certains agissent directement ou indirectement avec la molécule d'ADN. C'est plus particulièrement l'action du ONOO^- qui va générer les lésions liées au stress oxydant au niveau des protéines, des lipides et des acides nucléiques (ADN et ARN). Son action est double car il entraîne à la fois des dommages d'oxydation tout comme de nitration. Il peut également être à l'origine de cassures de brin en attaquant le sucre des nucléotides. Ainsi, trois types de réactions avec l'ADN ont été répertoriés.

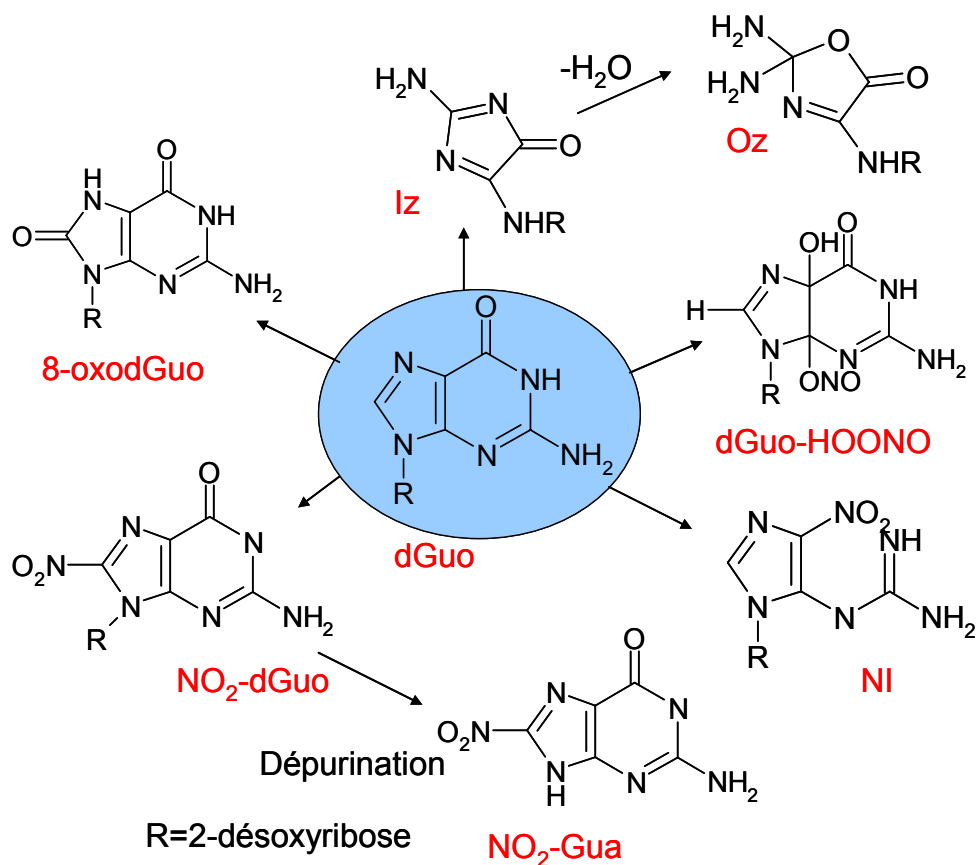
Tout d'abord, sa réaction avec la guanine va entraîner la formation de 4 produits d'oxydation : majoritairement la 8-oxoGua et l'oxazolone (Oz), et de façon moindre la spiroiminodihydroantoiné (SPh) et la guanidinohydroantoiné [8,35]. L'Oz provient de l'hydrolyse à pH physiologique de l'Imidazolone (Iz) initialement formée. D'autre part, la réaction de nitration avec la guanine entraîne la formation de la 8-nitro-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosine ($\text{NO}_2\text{-dGuo}$). Cette dernière va rapidement se dépuriner en 8-nitro-7,8-dihydro-2'-guanine ($\text{NO}_2\text{-Gua}$) [36] en laissant dans l'ADN un site abasique considéré également comme une lésion de l'ADN. C'est à ce titre que l'on considère que $\text{NO}_2\text{-Gua}$ est mutagène étant donné qu'un site apurinique est responsable d'une transversion de type $\text{G} \rightarrow \text{T}$.

D'autres réactions de nitration ont été mises en évidence comme la 5-nitro-4-guanidinohydroantoiné (NI) [37] qui est stable et ne se dépurine pas, persistant ainsi dans l'ADN au contraire de $\text{NO}_2\text{-dGuo}$. Il est rapporté dans la littérature la formation du 4,5-dihydro-5-hydroxy-4-(nitrosooxy)guanine (dGuo-HOONO) [38].

La troisième catégorie de réaction concerne cette fois-ci l'oxydation du 2-désoxyribose ce qui entraîne alors des cassures de brins et des sites abasiques. C'est d'ailleurs la réaction majoritairement produite avec ONOO^- .

Ces différentes réactions sont résumées dans une revue très récente [39]. Les principaux produits de réaction avec ONOO^- sont représentés dans la *figure 16*.

Figure 16 : Principaux produits de réaction de la dGuo avec ONOO⁻



Finalement, la formation de ces différentes lésions peut entraîner des mutations au niveau de l'ADN. Par exemple, 8-oxodGuo et Oz induisent des mutations du type G:C→T:A. NI.

Quant au N₂O₃, sa réaction va entraîner essentiellement des réactions de désamination, avec les amines primaires et hétérocycliques des bases de l'ADN. Ceci a pour conséquence la transformation de Cyt en Ura, de Gua en xanthine et oxanosine [40] et de Ade en hypoxanthine. Il est à noter que la xanthine et l'hypoxanthine sont des produits mutagéniques. De plus, NO peut être à l'origine de réactions de pontage inter ou intrabins (adduits Gua-Gua).

Très récemment, quelques publications font état du dosage de NO₂-Gua et dérivés chez l'homme. Les techniques de détection font majoritairement appel à un marquage par immunohistochimie à l'aide d'anticorps polyclonaux. Ainsi, la formation de NO₂-Gua a été détectée dans l'épithélium buccal de sujets atteints de tumeurs suggérant son implication mutagène à ce niveau [41].

D'autre part, certains auteurs se sont intéressés à l'importance de NO₂-Gua étant donné que NO₂-dGuo est instable et se désamine en NO₂-Gua [42]. Enfin, la mesure de NO₂-Gua a été effectuée récemment dans l'urine humaine dans le cadre d'une étude comparative impliquant des sujets fumeurs et non fumeurs [43]. Une prépurification de NO₂-Gua est tout d'abord effectuée à l'aide de colonnes d'immunoaffinité avec un anticorps monoclonal. Ensuite, le dosage est réalisé par

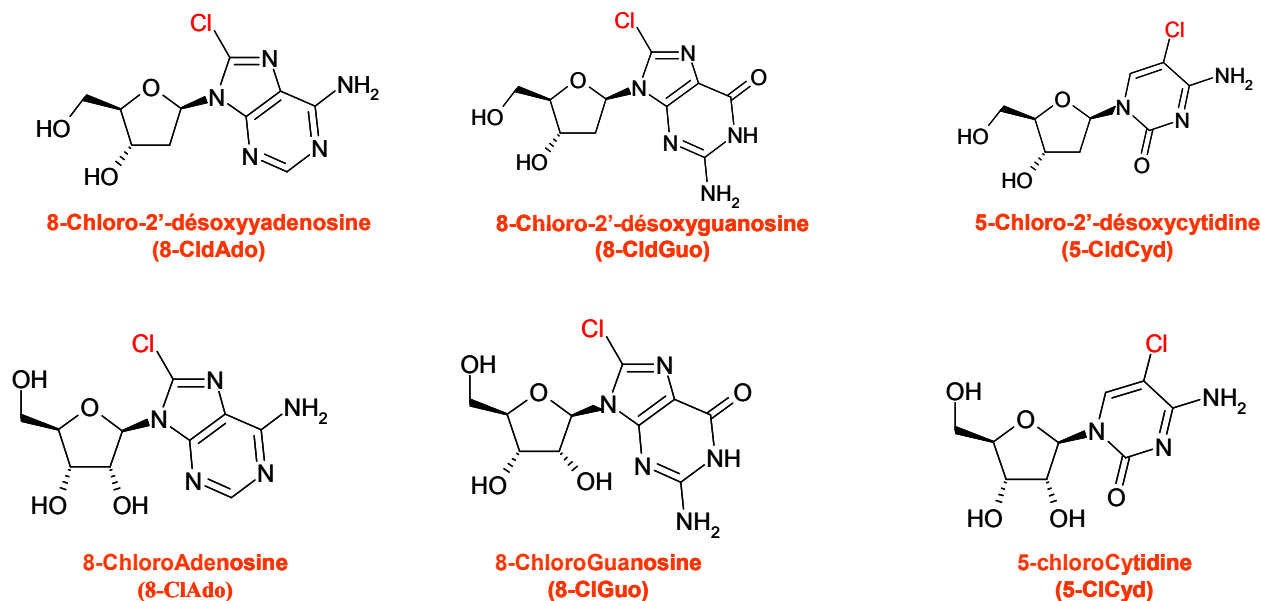
CLHP-EC. Il a été montré que le taux urinaire de NO₂-Gua rapporté à la créatinine est significativement plus élevé chez les sujets fumeurs comparativement au groupe témoin des sujets non fumeurs.

3.6.4 Les lésions chlorées issues des réactions inflammatoires

Parmi les lésions issues des réactions inflammatoires, nous décrivons de manière détaillée les effets de HOCl sur l'ADN. En effet, les polynucléaires activés au cours des processus inflammatoires synthétisent du HOCl par l'intermédiaire de la MPO qui est sécrétée activement.

La réaction de HOCl ou du système H₂O₂-MPO-Cl⁻ en présence d'ADN entraîne majoritairement la formation des 3 nucléosides chlorés suivants [12] : la 5-chloro-2'-déoxycytidine (5-CldCyd), la 8-chloro-2'-déoxyguanosine (8-CldGuo) et la 8-chloro-2'-déoxyadénosine (8-CldAdo). D'autre part, la réaction de HOCl en présence d'ARN génère la formation des ribonucléosides chlorés correspondants, à savoir la 5-chlorocytidine (5-ClCyd), la 8-chloroguanosine (8-ClGuo) et la 8-chloroadénosine (8-ClAdo). L'ensemble des structures chimiques de ces lésions chlorées est représenté dans la *figure 17*.

Figure 17 : Principaux nucléosides chlorés



On peut ajouter que des produits minoritaires peuvent être formés comme la 2,5-diimino-4-[(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyle)amino]5H-imidazole (dDiz) et l' amino-imidazolone (dIz) lorsque la dGuo réagit avec HOCl [44]. De plus, la réaction de la 8-oxodGuo avec les mêmes systèmes entraîne cette fois-ci la formation de spiroiminodihydroantoinine 2'-déoxyribonucléoside

(Sph) dont les deux diastéréoisomères ont été caractérisés [45] ce qui témoigne de l'implication de réactions d'oxydation.

Une autre étude montre la formation de 5-chlorouracile (5-ClUra) lorsque l'Ura est mise en présence de MPO *in vitro* [46]. Cette étude fait également part du fait que la 5-ClUra proviendrait également de la désamination de la 5-ClCyt.

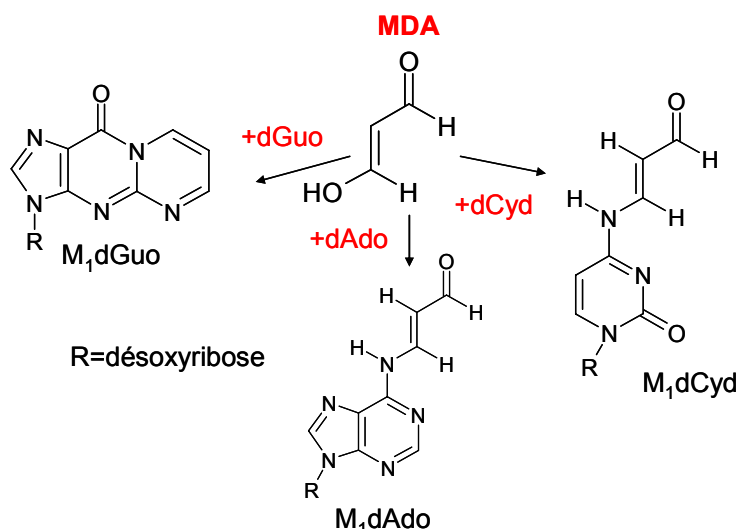
D'autre part, l'exposition de cellules en culture à HOCl et NO₂⁻ entraîne une augmentation de l'oxydation de l'ADN avec toutefois une diminution de l'importance des réactions de désamination [47].

3.6.5 Les lésions issues de la peroxydation lipidique

Les lésions de l'ADN issues de la peroxydation lipidique proviennent d'une oxydation indirecte. En effet, les EROs peuvent réagir avec les lipides membranaires contenus dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires et nucléaires. La réaction de peroxydation lipidique s'y produisant entraîne la formation d'aldéhydes réactifs [48] décrits précédemment (ex du MDA et du 4-HNE). De nombreux adduits [49] de ces aldéhydes avec les bases de l'ADN ainsi que leur mécanisme de formation ont été décrits dans la littérature. Les adduits formés avec le MDA sont représentés dans la *figure 18*.

Les groupements aldéhydiques du MDA réagissent efficacement avec les groupements amines et thiol. La réaction de condensation du MDA avec les groupements SH est irréversible. Par contre, dans le cas de la réaction avec les amines, une base de Schiff est formée, caractérisée par une liaison labile en milieu acide ou alcalin. Cette réaction [50] se produit *in vitro* avec les amines des nucléosides de l'ADN et aboutit à la formation majoritaire des adduits suivants : le M1dGuo (3-(2-désoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)pyrimido[1,2-a]purin-10-one) et le M1dAdo (N⁶-(3-oxo-propenyl)désoxyadénosine). Il est à remarquer que le M1dGuo se forme en quantité 5 fois plus importante que le M1dAdo.

Figure 18: Les adduits du MDA avec les 2'-désoxyribonucléosides.



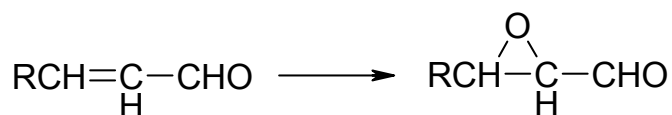
Les premiers travaux concernant la mesure de la M₁dGuo dans l'ADN de leucocytes humains ont été effectués par l'équipe de Marnett en 1997 [51]. Quelques années plus tard, la même équipe a détecté la présence de cet adduit dans une lignée de cellules en culture de colon humain [52]. Par la suite, des données ont été obtenues chez l'homme dans différents tissus et leucocytes circulants [53].

La quantification du M₁dGuo dans l'urine humaine a aussi été effectuée [54]. Très récemment, le produit de métabolisation de M₁dGuo a été mis en évidence dans l'urine de rats : il s'agit de la 6-oxo-M₁dGuo [55].

L'origine endogène de la catégorie des lésions appelées « **éthénonucléosides** » provient probablement de l'action du 4-HNE. Le produit majoritairement formé est l'adduit propano de la dGuo avec le 4-HNE : le 1,N²-propano-2'-désoxyguanosine (HNE-dGuo), qui fait intervenir une addition de Michael.

D'autre part, le 4-HNE comme d'autres aldéhydes insaturés peuvent se convertir en epoxyaldéhydes en présence de H₂O₂ ou d'hydroperoxydes d'acides gras (*Figure 19*). Ces epoxyaldéhydes sont plus réactifs vis-à-vis de l'ADN, et peuvent entraîner la formation d'adduits du type « **éthénonucléosides** ».

Figure 19 : Formation des epoxyaldéhydes



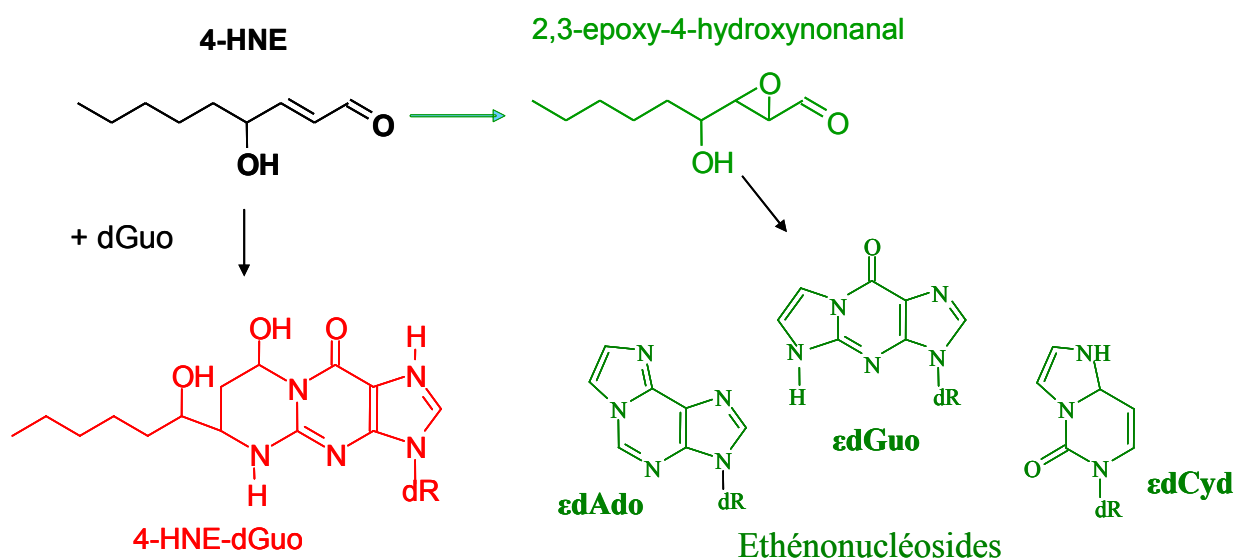
Ainsi, les trois « **éthénonucléosides** » provenant de l'epoxy-HNE (le 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal) sont majoritairement représentés par la 1,N²-éthéno-2'-désoxyguanosine (**edGuo**),

et à un degré moindre la 1,N⁶-éthéno-2'-désoxyadénosine (**εdAdo**) et la 3,N⁴-éthéno-2'-désoxycytidine (**εdCyd**) [56-59].

La première mise en évidence de la formation dans l'ADN cellulaire de ces lésions a été effectuée par l'équipe de Nair en 1995 [60]. L'étude consistait à induire la peroxydation lipidique de microsomes de foie de rat dans lesquels l'εdAdo et l'εdCyd ont été quantifiés.

Toutefois, une étude très récente a montré que l'exposition de cellules en culture au 4-HNE dans des conditions de peroxydation entraîne la formation majoritaire de HNE-dGuo [61]. La *figure 20* regroupe les structures des différentes lésions majoritairement formées en présence de 4-HNE.

Figure 20 : Les adduits des bases de l'ADN avec le 4-HNE.



Il faut toutefois que les origines oxydatives supposées de la formation in vivo des éthénonucléosides soient confirmées. En effet, d'autres possibilités sont envisagées, comme l'action du chlorure de vinyle ou de l'uréthane [62,63] qui serait en relation avec l'apparition de certains cancers.

De plus, il semble qu'une relation soit possible entre la formation des éthénonucléosides in vivo et la production de NO lors des infections chroniques ou des inflammations [60]. Parmi ces nombreux travaux impliquant la peroxydation lipidique, l'équipe de Nair a mis en évidence une augmentation de l'εdAdo et de l'εdCyd dans la rate de souris lors de l'ajout d'un activateur de la production de NO. Le rôle de NO semble être confirmé puisque l'ajout d'un inhibiteur de NOSynthase fait baisser le taux de ces mêmes lésions.

Très récemment, il a été montré l'existence d'une relation entre les phénomènes d'inflammation et le taux cellulaire d'éthénonucléosides ; le taux d'εdCyd étant de 5 à 9 fois plus élevé que celui de l'εdAdo (Maladie de Crohn, pancréatite chronique ou colique ulcéraire) [64].

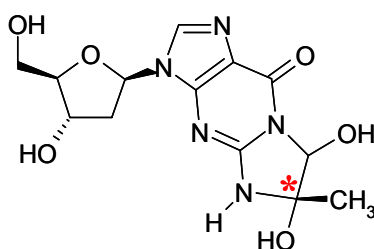
Les effets promutagènes des éthénonucléosides ont été étudiés depuis quelques années. Ces travaux montrent que ces adduits sont essentiellement responsables d'inversions de bases dans l'ADN [62].

3.6.6 Les lésions issues de la réaction avec le méthylglyoxal.

Quelques travaux ont fait part de la réactivité des bases de l'ADN avec le MGO [32,65]. Les auteurs évoquent des réactions qui conduisent à la formation de produits de la glycation de l'ADN. En effet, la réaction du MGO avec la 9-méthylguanine engendre la formation d'un adduit dit de glycosylation avancé de l'ADN : le CEmG (N²-(1-carboxyethyl)-9-méthylguanine [66].

Il semble que ce soit l'adduit du MGO avec la dGuo qui se forme préférentiellement aux autres nucléosides de l'ADN. L'adduit dG-MGO est présent sous la forme de deux diastéréoisomères, dont la structure est présentée dans la *figure 21*.

Figure 21 : Structure de l'adduit dG-MGO



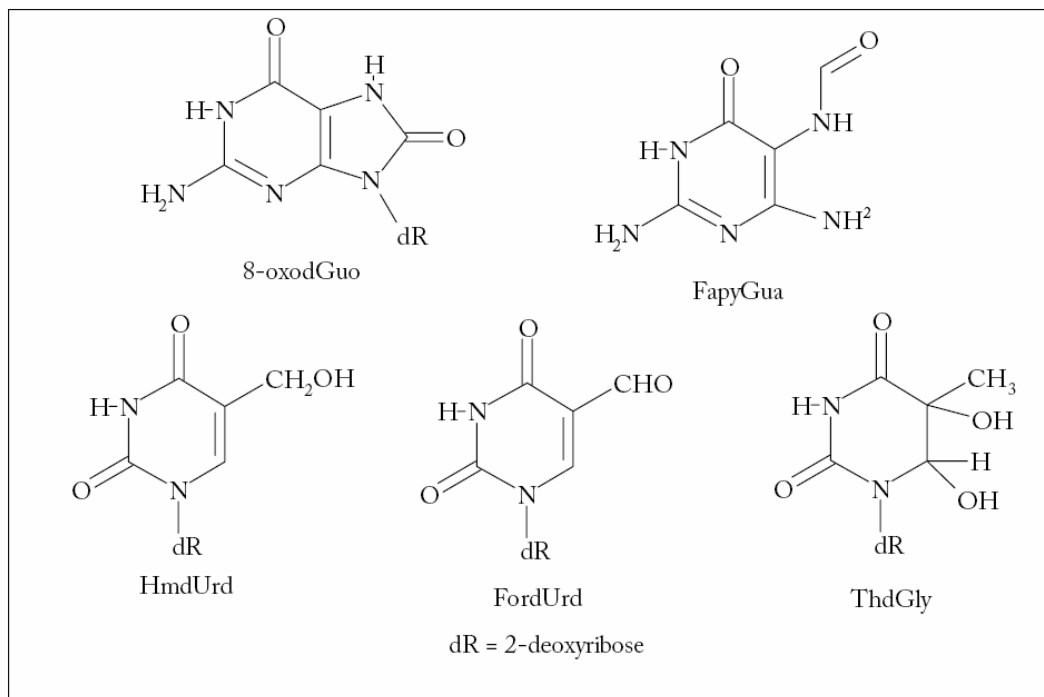
Structure du dG-MGO (C₁₃H₁₇N₅O₆ MM= 339 g.mol⁻¹)

A ce jour, aucun de ces adduits n'a été mesuré dans l'ADN de leucocytes circulants chez l'homme. Néanmoins, il a été déjà mis en évidence la formation d'un adduit entre MGO et la dGuo de l'ADN d'une lignée cellulaire en culture [67].

3.6.7 Les lésions issues des rayonnements ionisants.

La mise en évidence des effets des rayonnements ionisants sur l'ADN cellulaire est assez récente. On dénombre seulement 9 lésions oxydatives correctement quantifiées : la 8-oxodGuo, la 8-oxodAdo, les 4 diastéréoisomères (cis et trans) de la 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine, la 5-formyl-2'-désoxyuridine, la 5-(hydroxyméthyl)-2'-désoxyuridine et la 5-hydroxy-2'-désoxyuridine (28). D'autre part, ont également été mesurées les deux lésions suivantes [68,69] : la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua) et la 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapyAde). L'ensemble de ces lésions est présentée dans la *figure 22*.

Figure 22 : Structure chimique des différentes lésions radio induites [70]



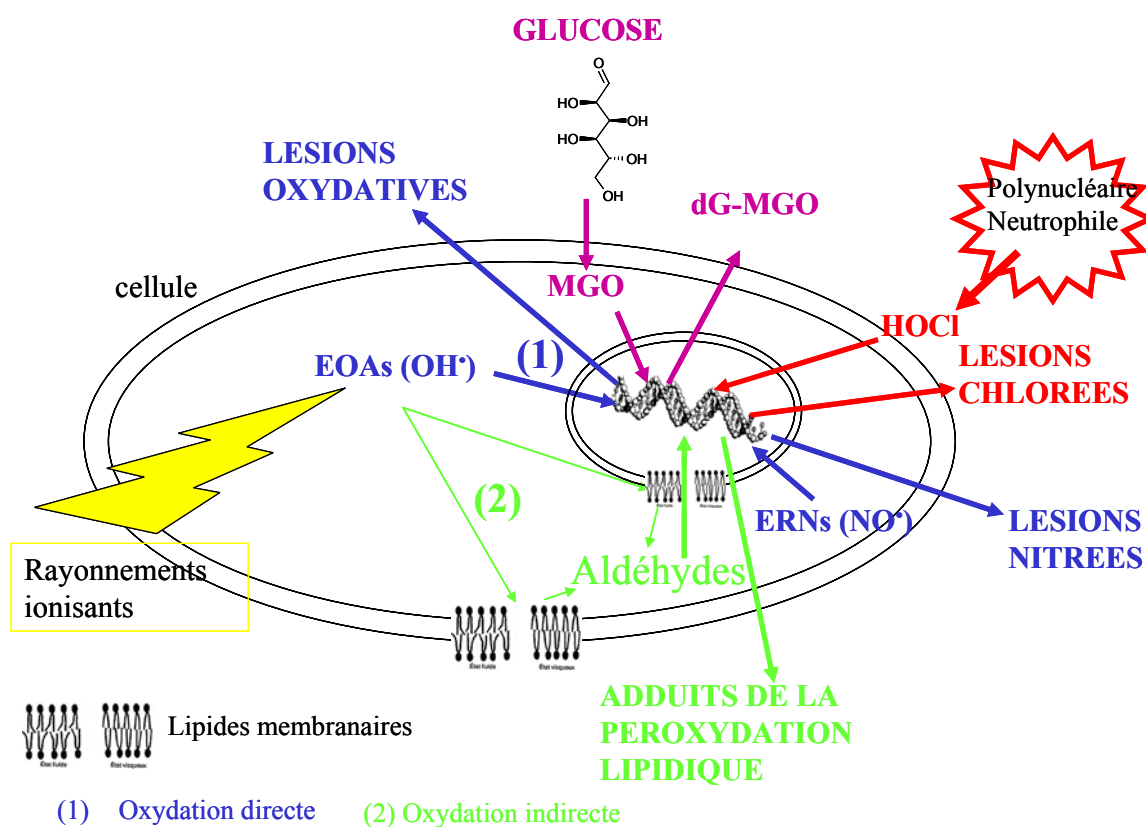
L'association d'enzymes de réparation de type formamidopyrimidine ADN *N*-glycosylase (Fpg) ou endonuclease III (Endo III) à la technique des « COMETES » permet de détecter des taux de lésions proches de 2 lésions pour 10⁷ bases normales dans l'ADN de monocytes humains irradiés [71]. Ainsi, on a pu établir les taux de formation des différentes classes de dommages : 0,48 sites sensibles à la Fpg, 0,53 sites sensibles à l'Endo III et 1,3 cassures de brins. Ces résultats sont rapportés par Gy pour 10⁷ bases normales [72]. Ces travaux ont été effectués en exposant les cellules à des rayonnements gamma compris entre 2 et 10 Gy.

D'autres lésions ont été mises en évidence comme les lésions tandem [73] ou les adduits ADN-Protéines [74] dans l'ADN isolé ou dans des oligonucléotides. Toutefois, ces dommages n'ont pas encore été mesurés dans l'ADN cellulaire. Quelques essais ont été effectués pour tenter de séparer ces adduits ADN-Protéines du reste de l'ADN afin de les caractériser [75]. De nombreuses protéines ont été identifiées comme intervenant dans la formation de ces adduits lors d'une exposition à des RI [76].

3.6.8 Récapitulatif des différentes lésions mises en évidence dans la cellule.

A ce jour, de nombreuses lésions de l'ADN ont été étudiées dans des systèmes modèles mais peu ont été mesurées dans les cellules humaines circulantes. Dans la *figure 23* sont exposés les différents types d'agressions auxquels les acides nucléiques peuvent être exposés et qui sont susceptibles de causer la formation de lésions. Il est à noter que toutes ces lésions n'ont pas encore été quantifiées au niveau des cellules humaines circulantes. Pour ne pas alourdir le schéma, nous n'avons pas représenté les lésions tandem ni les adduits ADN-protéine.

Figure 23 : Génération cellulaire des différents types de lésions de l'ADN



3.6.9 La place des lésions de l'ARN dans la cellule.

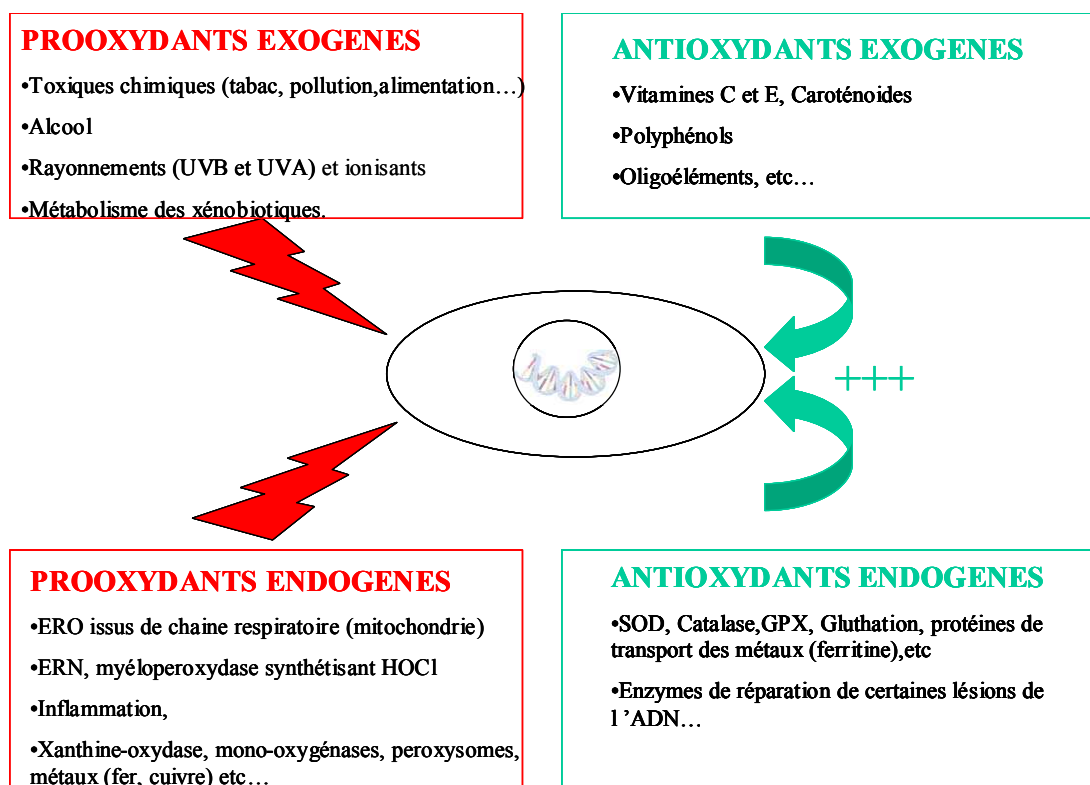
L'ARN, tout comme l'ADN est capable de subir les mêmes types de stress. La différence majeure est à relier au fait que l'ARN peut se trouver soit dans le noyau soit dans le cytoplasme. Les divers types d'ARN regroupés sous le terme d'ARN nucléaire (ARNnuc) sont les ARNr et les ARNt et dans le cytoplasme désigné sous le terme ARNcyt essentiellement représenté par l'ARNm. Peu de travaux ont été effectués à ce jour sur la recherche des lésions de l'ARN dans la cellule. D'autre part, peu de données concernent la réparation des dommages de l'ARN.

3.7 Moyens de lutte contre le stress oxydant

3.7.1 Préventif : molécules antioxydantes

L'organisme dispose de différents types de défenses antioxydantes face aux EOAs générées. L'ADN situé dans le noyau semble être protégé par la membrane nucléaire qui représente une barrière supplémentaire à franchir pour les EOAs. Dans une première approche, nous considérerons les composés ou molécules protecteurs représentés par les vitamines C et E, les caroténoïdes, les polyphénols et les oligo-éléments (comme le Zn ou le Se). D'autre part, l'organisme possède un système enzymatique endogène détoxifiant composé des superoxyde-dismutases (SOD), des catalases (CAT), des glutathion peroxydases (GPX), des protéines de transport des métaux (ferritine, etc...) et aussi de substances endogènes comme le glutathion (GSH). Cependant, dans le cas où ces systèmes n'auraient pas neutralisé suffisamment les EOAs et que ces derniers ont eu la possibilité d'induire des lésions dans les protéines, les lipides et les acides nucléiques, l'organisme possède encore un moyen d'éliminer ces lésions comme les systèmes de réparation de l'ADN. Les différents prooxydants et antioxydants sont présentés dans la *figure 24*.

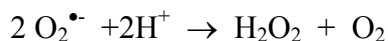
Figure 24 : Principaux prooxydants et antioxydants



3.7.2 Action directe sur les espèces réactives de l'oxygène

3.7.2.1 Systèmes enzymatiques

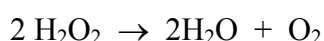
Les SOD évitent l'accumulation de l' $O_2^{\bullet-}$ en catalysant la dismutation du $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 selon la réaction suivante :



Les SOD à manganèse (SOD-Mn) sont principalement mitochondriales tandis que les SOD à zinc ou cuivre (SOD-Cu-Zn) sont présentes dans le cytoplasme, le noyau, le plasma ou dans la membrane des cellules endothéliales. La SOD-Mn permet la dismutation quasi instantanée de l' $O_2^{\bullet-}$. Cette dernière est de ce fait, indispensable à la vie, ce qui n'est pas le cas de la forme cytosolique. Sachant que H_2O_2 est également toxique pour la cellule, il est pris en charge par les catalases.

Quant aux GPX, elles sont complémentaires des SOD puisqu'elles prennent en charge le H_2O_2 produit à leur niveau en réduisant ce dernier en H_2O . Les GPX font partie d'un système complet qui joue un rôle central, non seulement dans le mécanisme d'élimination de H_2O_2 mais également dans la prise en charge des lipides peroxydés. La mise en œuvre de ce système nécessite la présence de glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électron. Le glutathion disulfite (GSSG) ainsi produit est à nouveau réduit en GSH par la glutathion réductase qui utilise le NADH comme donneur d'électron. Ainsi, le rapport GSH/GSSG est un index de l'oxydation cellulaire.

Concernant les CAT (principalement situées au niveau des peroxysomes), elles ont comme rôle de dégrader le H_2O_2 en catalysant la réaction suivante :



Toutefois, ces enzymes semblent jouer un rôle important en présence d'une forte concentration de H_2O_2 , à la différence des GPX qui l'éliminent même en faible quantité.

3.7.2.2 Molécules antioxydantes exogènes

Ces molécules agissent principalement en réagissant avec les radicaux libres pour générer ainsi des radicaux plus stables mais également en séquestrant les métaux empêchant ainsi les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss.

La **vitamine E** (ou α -tocophérol), molécule lipophile, inactive les radicaux issus de la peroxydation lipidique en raison de son intégration dans les membranes lipidiques comme ceci a été discuté précédemment. Cette réaction entraîne ainsi la formation du radical tocophéryle. Il est nécessaire que la vitamine E agisse en synergie avec d'autres systèmes antioxydants (vitamine C, GSH et Se),

capables de régénérer la vitamine E à partir de ce radical tocophéryle. On trouve la vitamine E essentiellement dans les huiles végétales, le germe de blé, les noix et certains légumes verts.

La **vitamine C** (acide L-ascorbique) intervient en piégeant très efficacement les radicaux superoxydes et hydroxyles, le H_2O_2 , le HOCl et l' 1O_2 . Il y a cependant certains cas particuliers où la vitamine C peut acquérir des propriétés prooxydantes (déficit en vitamine E ou surcharge en fer). La vitamine C est contenue dans les fruits et les légumes.

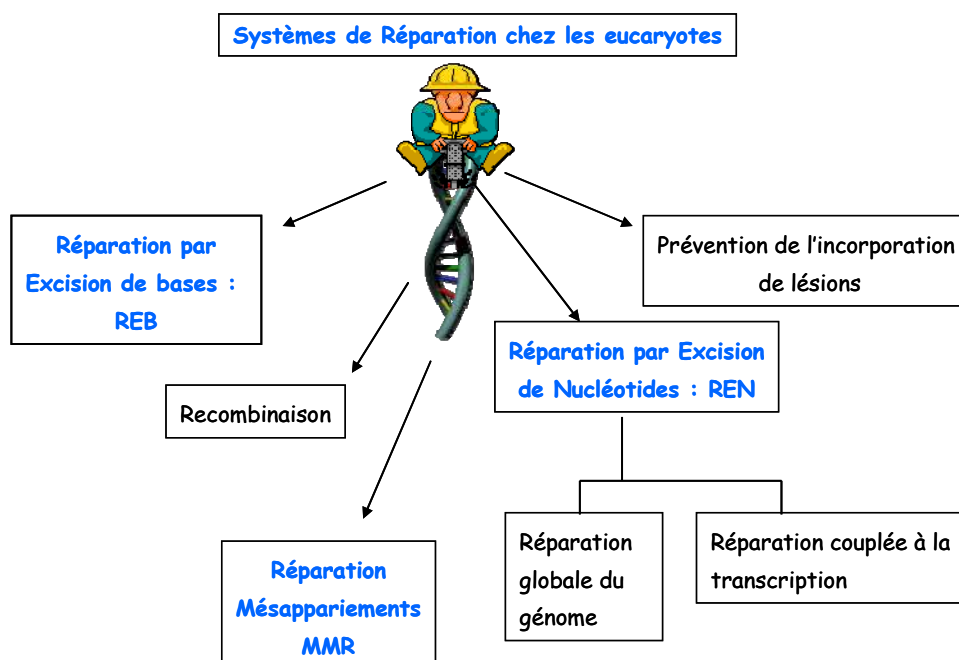
Les **caroténoïdes** (β -carotène, lycopène) permettent de désactiver l' 1O_2 car leur structure comporte de nombreuses doubles liaisons.

3.7.3 Réparation des lésions de l'ADN

Les deux systèmes de lutte contre le stress oxydant exposés dans les deux paragraphes précédents ont plus un rôle de prévention contre la formation des dommages dans les biomolécules et en particulier l'ADN. Cependant, lorsque ces systèmes s'avèrent « insuffisants » ou défaillants, la cellule possède un autre moyen pour réparer les lésions créées et empêcher ainsi le risque de mutagenèse et donc éventuellement de cancer.

La *figure 25* illustre les différentes voies de réparation des lésions de l'ADN chez les eucaryotes.

Figure 25 : Les différentes voies de réparation des lésions de l'ADN.



L'ensemble du système de réparation des lésions de l'ADN comprend 5 mécanismes dont les trois principaux sont la réparation par excision de bases (REB), la réparation par excision des nucléotides (REN) [77] et la réparation des mésappariements.

Les systèmes de la REB et de la REN utilisent des enzymes de réparation plus ou moins spécifiques des lésions présentes.

Dans le cas de la **REB**, ce sont des enzymes du type ADN-*N*-glycosylases qui vont exciser les lésions par coupure de la liaison *N*-glycosidique (exemple de la 8-oxoGuanine et des éthénobases). Le site abasique (AP) qui en résulte est ensuite éliminé de la chaîne nucléotidique par coupure du pont phosphodiester en 3' et éventuellement en 5' par l'action d'une AP endonucléase. Finalement, l'ADN polymérase remplace la base manquante par une base normale, une ligase achève le travail en reliant les deux brins. Dans ce type de réparation, c'est la base lésée qui est éliminée de l'ADN cellulaire et qui se retrouve dans le milieu extracellulaire. La plupart des ADN-*N*-glycosylases possèdent une activité AP lyase. Les enzymes d'origine bactérienne les plus utilisées pour étudier la réparation *in vitro* des lésions sont la formamidopyrimidine ADN *N*-glycosylase (**Fpg**) et l'endonucléase III (**Endo III** ou Nth) permettant l'excision respectivement des purines et des pyrimidines modifiées. Chez l'homme, l'équivalent de la **Fpg** est la « human 8-oxoguanine DNA-glycosylase » : **hOGG1**. HOGG1 semble l'enzyme humaine préférentiellement utilisée pour éliminer la 8-oxoGua. Une comparaison des différentes activités enzymatiques des trois enzymes suivantes : Fpg, Endo III et hOGG1 a été effectuée récemment [78]. Elle met en évidence une différence d'activité notamment entre Fpg et hOGG1 donnant à cette dernière une plus grande spécificité vis-à-vis de la réparation de la 8-oxoGua.

Dans le cas de la **REN**, ce n'est pas une seule base lésée qui est éliminée mais un oligonucléotide contenant la lésion. Le système REN intervient principalement dans la réparation des lésions entraînant une distorsion de la double hélice comme les dimères de pyrimidine qui sont des lésions volumineuses. Ce système plus complexe, fait intervenir un nombre important d'enzymes. Le défaut ou l'absence d'une d'entre elles peut être à l'origine de maladies génétiques graves. Par exemple, nous pouvons citer le cas d'un défaut de réparation REN pour les patients souffrant de la pathologie de Xeroderma pigmentosum (XP) qui sont très sensibles aux ultraviolets B et C et ne peuvent s'exposer au soleil. Ces déficiences du REN conduisent généralement à des cancers cutanés.

Il est à remarquer ici que la stratégie mise en œuvre pour la détection des lésions éliminées par ces deux systèmes de réparation dans les fluides biologiques sera différente. En effet, si l'on souhaite s'intéresser aux lésions excisées par la REB, il s'agira de chercher à quantifier les bases modifiées. Par contre, si l'on souhaite quantifier les lésions issues de la réparation par la REN, il faudrait plutôt purifier les oligonucléotides éliminés puis les hydrolyser enzymatiquement pour quantifier les 2'-désoxyribonucléosides correspondants.

Les autres systèmes de réparation qui semblent concerner un moins grand nombre de lésions sont les suivantes :

La **recombinaison** peut être de deux types. En phases S ou G2 du cycle cellulaire, il s'agit d'une recombinaison de type homologue qui est impliquée dans la réparation des cassures simples (CSB) et doubles brins (CDB) de l'ADN induites par le RI en particulier. Par contre, lorsque les cellules se trouvent en phase G1, il s'agit plutôt d'une recombinaison de type non-homologue par jointure des extrémités (NHEJ).

La **réparation des mésappariements** (MMR pour « Mismatch Repair ») est un système fonctionnant sur le mode excision/resynthèse des fragments d'ADN comportant le mésappariement. La première étape permet la reconnaissance du brin par un complexe enzymatique constitué de nombreuses protéines. Il est à noter que le mésappariement peut concerner soit des bases normales, soit des délétions ou encore des petites insertions. Parmi les protéines du complexe, certaines vont permettre la coupure du brin. Ensuite, les exonucléases du complexe dégradent le brin d'ADN jusqu'à une centaine de bases après le mésappariement. Finalement, une ADN polymérase resynthétise le fragment d'ADN manquant puis une ADN ligase achève le processus. Ce mécanisme est d'une grande importance puisque la déficience d'une des enzymes du complexe peut être considérée comme létale.

Enfin, le dernier mécanisme de réparation est le système de **prévention de l'incorporation des bases oxydées**. En effet, l'enzyme humaine appelée hMTH1, qui est une 8-oxodGTPase (nucléotide triphosphatase) hydrolyse le 8-oxodGTP (8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate) et représente le premier niveau de protection en éliminant le 8-oxodGTP du pool de 2'-désoxynucléotides 5'-triphosphates. Ceci permet d'éviter l'incorporation de 8-oxoGua lors de la néosynthèse de l'ADN.

3.8 Implication du stress oxydant dans les pathologies

Le stress oxydant peut être considéré comme une réponse biologique entre nos cellules à une agression externe. Le plus important est en fait le **maintien de la balance pro et antioxydants**. En effet, une surproduction d'EOAs peut entraîner la cellule vers l'apoptose ou la réparation des lésions pour redevenir normale. Dans certains cas, la lésion peut persister et entraîner une mutation dans l'ADN de la cellule avec la possibilité de développer par la suite un cancer. La production de radicaux libres est présente dans de nombreux phénomènes physiopathologiques : exemple dans le cas de la maladie d'Alzheimer, du diabète, de cancers, de l'athérosclérose, de l'ischémie-reperfusion, etc.... De plus, certains médicaments ou traitements thérapeutiques comme la radiothérapie entraînent la formation de radicaux libres.

Avec l'âge, on observe une modification de l'équilibre entre pro et antioxydants, conduisant à privilégier l'incidence de stress oxydant, d'où son implication dans de nombreuses pathologies liées au vieillissement (cataracte, sclérose latérale amyotrophique, etc...).

3.8.1 Le diabète

Le coût humain et financier du diabète en fait un problème de santé public majeur aux Etats-Unis et en Europe, notamment en raison de ses conséquences vasculaires. Le diabète peut être de deux types, à savoir le type I dit insulino-dépendant et le type II dit non insulino-dépendant, ce dernier représentant la majorité des cas de diabète. L'augmentation de son incidence sans cesse croissante suggère que des facteurs environnementaux pourraient être impliqués, au contraire de certains facteurs héréditaires qui sembleraient plutôt protecteurs. Plusieurs facteurs interviennent dans l'apparition et l'évolution de l'état diabétique avec notamment un déséquilibre de la balance pro/antioxydants. Une étude épidémiologique [79] a montré qu'une concentration plus élevée en ferritine est associée à un plus grand risque d'apparition du diabète. Très récemment, une étude portant sur les femmes enceintes a montré qu'un fort taux de ferritine et de CRP représente un risque de développer un diabète gestationnel [80].

L'implication du stress oxydant dans la pathologie du diabète repose sur les 4 hypothèses suivantes, entraînant chacune une augmentation de production de radicaux libres :

1. L'augmentation de la voie des polyols

En effet, les voies habituelles de métabolisation du glucose (glycolyse et voie des pentoses phosphate) sont dépassées en situation d'hyperglycémie ce qui entraîne l'activation de la voie des polyols. Les conséquences de cette activation sont une baisse des défenses antioxydantes (consommation de NAD(P)H et de GSH) et une accumulation de H₂O₂. Cette voie est notamment impliquée dans l'apparition de la cataracte chez le diabétique.

2. La formation des protéines glyquées

La glycation des protéines est une des conséquences majeures de l'hyperglycémie. Lors de ce mécanisme de glycation, les produits d'Amadori et les α -cétaldéhydes, intermédiairement formés, peuvent céder un électron à O₂ pour générer O₂^{•-} en présence de métaux de transition. D'autre part, ce phénomène de glycation se produit également au niveau des LDL de basse densité ce qui entraîne une augmentation de leur durée de vie plasmatique et donc leur risque de subir une attaque oxydative. Cette susceptibilité des LDL et des VLDL à l'oxydation en présence de Cu²⁺ [81] a été récemment confirmée chez des patients diabétiques de type I dans le cas où ils présentent une hyperglycémie sévère et/ou des complications vasculaires.

3. L'activation du système rénine-angiotensine

L'activation du système rénine angiotensine est en relation directe avec l'hypertension des diabétiques de type II. En effet, l'insuline active ce système via la stimulation du récepteur à l'angiotensine du type AT1. Or, il est bien connu que l'angiotensine II est l'un des plus importants stimuli endogènes pour la génération de l' $O_2^{\bullet-}$ via la NAD(P)H oxydase endogène [9]. Comme la source majoritaire de production de l' $O_2^{\bullet-}$ provient de cette activation de la NAD(P)H oxydase et que cette dernière est majoritairement présente dans les cellules vasculaires et les myocytes, ceci nous permet de mieux comprendre les complications cardiovasculaires associées au diabète.

4. La production de radicaux libres par la mitochondrie.

La principale source de production des EROs dans les états hyperglycémiques est la respiration mitochondriale. En effet, il a été montré que l'hyperglycémie favorise le gradient électrochimique de la membrane interne mitochondriale suite à une activation des donneurs d'électrons [82]. Ceci induit en retour une forte production d' $O_2^{\bullet-}$ par la cellule endothéliale.

Ainsi, il a déjà été rapporté une augmentation des dommages de l'ADN dans le cas du diabète de type II à l'aide d'une technique « COMETE » [83]. Cette étude a permis également de mettre en évidence une susceptibilité plus importante des leucocytes circulants à une exposition à H_2O_2 ou à la doxorubicine par rapport à un groupe d'individus sains. De plus, cette étude a mis en évidence une moins bonne capacité de réparation de l'ADN endommagé pour les patients diabétiques de type II.

Une autre étude [84], également par la technique « COMETE » sur des lymphocytes de patients diabétiques de type I, a montré une forte corrélation entre le nombre de sites sensibles à Fpg et les concentrations sériques de glucose.

Par ailleurs, il semblerait que la glycation du MGO avec la lysine en présence de Fe^{3+} [85] favorise l'émergence de réactions de type Fenton produisant des $\bullet OH$ à l'origine des dommages de l'ADN. Ceci a été également montré pour Cu^{2+} qui induit des cassures de l'ADN [86].

3.8.2 Les cancers et la radiothérapie

Le traitement des cancers par radiothérapie recourt essentiellement aux rayons X délivrés par des accélérateurs linéaires et appliqués aussi précisément que possible à la tumeur. Un scanner permet de délimiter exactement la zone à irradier. La radiothérapie est ensuite administrée par série de 5 jours consécutifs, pendant plusieurs semaines. Cette technique permet de soigner efficacement de nombreux cancers de plus en plus souvent avec une chimiothérapie concomitante. Le principal inconvénient de ce traitement est représenté par l'irradiation des cellules saines situées à proximité

de la tumeur, et dont la sensibilité limite la dose qui peut être administrée par le traitement. Le mode d'action de la radiothérapie, passant par l'action de radiations ionisantes (rayon gamma, X, particules tels qu'électrons, protons, neutrons) entraîne la radiolyse de l'eau et la production d'espèces radicalaires oxydantes. L'action sur le cytoplasme, la membrane et l'ADN induit des altérations de la cellule avec trois conséquences :

- ✓ soit une mort instantanée.
- ✓ soit une mort différée, plus fréquente, ou une mort par apoptose à la suite d'une altération du génome.
- ✓ Formation de lésions sublétales qui peuvent être réparées.

La dosimétrie d'une radiothérapie est non seulement systématique mais aussi particulièrement précise puisque la dose absorbée par les tissus cibles est connue à environ 3 à 5% près. Il est possible de calculer cette dose pour tout volume élémentaire irradié (en pratique chaque voxel d'une imagerie numérisée de type scanner ou IRM) ainsi que pour l'ensemble de l'organisme comprenant ce volume cible.

Les progrès techniques de la radiothérapie cherchent en particulier à augmenter le plus possible la différence de dose entre tissus sains et tissus tumoraux. En pratique, on peut à cet égard distinguer deux grandes orientations techniques : la première est le développement de l'IMRT (Intensity Modulated Radiation Therapy) qui recourt à un très grand nombre de faisceaux d'incidence, de forme et d'intensité variée pour optimiser le plus possible la conformation du volume irradié à celle de la cible. Cette technique très complexe à mettre en œuvre permet effectivement d'effectuer des progrès en matière de conformation et d'incrément de dose mais a l'inconvénient notable d'augmenter nettement le volume de tissus irradiés à faible dose (cela peut être une cause favorisante de cancers radioinduits chez des sujets très jeunes). La seconde approche s'appelle l'hadronthérapie et fait appel à des particules chargées de masse suffisante pour faire apparaître un pic de Bragg qui s'arrête à la profondeur voulue (au millimètre près) dans la tumeur sans faisceau de sortie. Cette condition est réalisée par les protons et toutes les particules chargées de masse supérieure au proton. Dans ce cas, le volume de tissu sain irradié est très réduit et la conformation encore meilleure, mais les installations de radiothérapie par particules chargées sont rares car extrêmement onéreuses. Face à ces deux voies très différentes, on peut se poser la question de savoir s'il est moins dommageable de toucher plus de cellules saines à dose plus faible ou un beaucoup plus petit nombre de cellules avec une dose de radiations plus forte.

Quelques travaux ont été dédiés à l'étude des relations entre la radiothérapie, avec ou sans chimiothérapie concomitante, et les lésions de l'ADN pouvant être formées. En 1996, le taux lymphocytaire [87] de 8-oxodGuo était plus important dans le cas de patients traités par radiothérapie. En 1997 [88], la mesure du taux urinaire de 8-oxodGuo rapportée à la créatinine a

montré une diminution de ce taux chez les patients répondant partiellement et totalement à la chimiothérapie. Cependant, certains types de cancers, dites « non à petites cellules » ont un taux plus élevé que ceux à petites cellules qui sont identiques à ceux des témoins.

Une étude, plus récente (2004) de l'excrétion urinaire de 8-oxodGuo et de MDA a été effectuée pour 11 patients recevant une irradiation corporelle totale et une chimiothérapie [89]. Dans ces conditions, il est observé une augmentation simultanée de ces deux produits excrétés après plusieurs jours suivant l'irradiation (12 Gy).

3.8.3 L'infertilité masculine

L'infertilité masculine est un problème de santé public inquiétant puisqu'il est difficile de cerner la notion de « responsabilité masculine » étant donné que l'on dispose de peu de moyens pour quantifier avec certitude le « pouvoir fécondant » du sperme. A l'heure actuelle, environ 14% des couples sont hypo ou infertiles, avec dans 1/3 des cas une origine masculine. L'exploration des causes d'hypofécondité est basée sur l'évaluation classique des paramètres spermatiques (spermogramme, spermocytogramme, spermocultures, test de migration ou de survie). Ces explorations biologiques restent les examens de première intention à effectuer. Néanmoins, 25% des infertilités avec un spermogramme normal restent inexplicables. Certains auteurs évoquent la possibilité d'une relation entre cette baisse de fertilité et un stress oxydant généré au niveau des spermatozoïdes [90].

Dans un souci de compréhension, il devient nécessaire de se poser la question de l'implication de la qualité de l'ADN des spermatozoïdes. Il semble que l'ADN des spermatozoïdes d'hommes infertiles soit d'avantage fragmenté [91]. Pour se faire, de nombreuses études sont en cours pour tenter de comprendre notamment les raisons de fragmentation de l'ADN observées dans certains cas, comme pour les hommes fumeurs. De plus, le dosage d'un adduit de l'ADN avec le benzo[a]pyrène contenu dans le tabac, a montré une corrélation significative entre ce taux et le nombre de cigarettes fumées par le père [92]. Il est d'ailleurs utile de rappeler que le tabac comporte de nombreux composants pouvant créer un stress oxydant important. En effet, les EROs produits au niveau du plasma séminal pourraient être mises en cause dans ces cas d'infertilités [93].

Pour évaluer la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, plusieurs techniques sont disponibles. La première méthode utilise une technique indirecte dite de « Sperm chromatin Structure assay » (SCSA) qui permet de mesurer la résistance à la dénaturation de l'ADN par la chaleur ou un traitement acide. Elle fait appel à un fluorochrome, l'acridine orange qui s'intercale entre les bases de l'ADN permettant d'évaluer les quantités d'ADN natif-double brin et d'ADN dénaturé-simple brin. Plus la dénaturation de l'ADN est importante et plus l'acridine orange

s'intercale, entraînant un signal fluorescent plus intense. Ainsi, après traitement informatique des données, on définit un index de fragmentation de l'ADN, dit « DNA fragmentation index » (DFI).

La deuxième méthode la plus utilisée pour évaluer la fragmentation de l'ADN est la technique « TUNEL ». Cette dernière consiste à marquer l'ADN à l'aide de la « *terminal deoxynucléotidyl transférase* » qui permet de fixer en 3' des nucléotides marqués par la fluorescéine. Une étude récente [94] a montré que lors d'une supplémentation vitaminique (vitamine C et E) de 2 mois chez des patients hypofertiles non fumeurs, la fragmentation de l'ADN de leurs spermatozoïdes était moindre.

Enfin, une des méthodes très utilisées pour évaluer cette fragmentation est la technique des « COMETES » dont le principe est légèrement différent de celui des cellules somatiques du fait de l'hypercondensation de l'ADN. Les travaux les plus récents font état, par exemple, d'une différence entre les hommes selon leur âge. Les hommes de plus de 35 ans auraient un ADN comportant plus de dommages que des hommes plus jeunes [95]. Une autre étude visant à déterminer l'effet de l'exposition à des produits chimiques chlorés montre qu'il n'y a pas de relation significative entre le niveau de ces toxiques chlorés et les dommages de l'ADN mesurés par la technique des « COMETES » [96].

3.9 Les biomarqueurs du stress oxydant

3.9.1 Définition d'un biomarqueur

Le terme de biomarqueur a été transposé de l'épidémiologie moléculaire par les biologistes des radicaux libres pour décrire un changement moléculaire dans une molécule biologique provenant d'une attaque des espèces réactives de l'oxygène, de l'azote et de composés halogénés. Il peut être défini comme toute molécule biologique de l'organisme susceptible de servir de marqueur d'un phénomène physiopathologique (ex : l'inflammation).

Les critères d'un bon biomarqueur [97] peuvent être définis comme suit :

- ✓ Un produit majeur de modification oxydative qui peut être directement impliqué dans le développement de la maladie.
- ✓ Un produit stable non susceptible d'induction artéfactuelle ou de perte durant la conservation des échantillons.
- ✓ Représentatif de la balance entre la génération des dommages oxydatifs et leur élimination.
- ✓ Déterminé par une analyse spécifique, sensible, reproductible et robuste.
- ✓ Libre des facteurs confondants venant d'une prise alimentaire.
- ✓ Accessible dans un tissu cible comme les lymphocytes et cellules mononuclées.
- ✓ Mesurable dans les limites de détection d'une procédure analytique fiable.

Ce terme de biomarqueur concerne aussi bien les produits dérivés des lipides que ceux impliquant l'ADN ou les protéines. Les biomarqueurs peuvent apporter des informations sur trois niveaux de progression d'une maladie ; comme des **marqueurs d'exposition** : ex des produits finaux des dommages aux protéines, aux acides aminés, aux lipides oxydés, aux bases oxydées de l'ADN ; comme des **marqueurs fonctionnels** par exemple du flux sanguin ou de l'agrégation plaquettaire ou encore comme des **marqueurs spécifiques** d'une maladie. Il reste encore une étape parfois difficile à établir qui est de définir une association entre le biomarqueur et la maladie.

Quant aux biomarqueurs du stress oxydant, certains sont connus comme les biomarqueurs protéiques de type protéines carbonylées. Toutefois, peu de biomarqueurs des acides nucléiques ont été utilisés à ce jour, excepté la 8-oxodGuo. L'ADN étant le support de l'information génétique, il est très intéressant de développer la détection de tels biomarqueurs afin de tenter d'établir une relation entre les lésions de l'ADN et leur implication dans les processus cancéreux par exemple.

3.9.2 Différents types de biomarqueurs de l'oxydation cellulaire

Lorsqu'une cellule subit une attaque oxydative, ses différents constituants sont touchés de façon plus ou moins importante selon leur localisation. Ainsi, il semble raisonnable d'envisager que les lipides de la membrane seront les premières cibles et que l'ADN enfermé dans le noyau sera le plus protégé.

3.9.2.1 Les biomarqueurs de l'oxydation lipidique

Les triglycérides dans les LDL (Low Density Lipoproteins) et les phospholipides des membranes sont fortement sensibles aux attaques des radicaux libres. Le processus de peroxydation lipidique est initié par la formation d'un radical peroxy et se termine finalement par la formation d'aldéhydes [98]. Les deux principaux aldéhydes sont le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE).

Durant ce processus de peroxydation, d'autres produits sont formés comme le pentane et l'éthane, les 2-3 diènes conjugués, les isoprostanes et les cholesteroxydes.

Une des méthodes utilisées pour déterminer la quantité de MDA est représentée par le test des « TBA reactive substance » (TBARS) dans lequel l'acide 2-thiobarbiturique (TBA) forme un adduit avec le MDA. Le désavantage de ce test est son manque de spécificité qui entraîne une surestimation du dommage dû aux radicaux libres car d'autres substances réagissent facilement avec le TBA (comme la biliverdine, la méthionine etc...). La spécificité de cette technique a été améliorée depuis par l'utilisation d'une séparation chromatographique permettant de séparer les différents adduits des autres substances avec le TBA de celui du MDA avec le TBA.

3.9.2.2 Les biomarqueurs de l'oxydation protéique

L'oxydation protéique induit l'apparition de nouveaux groupements chimiques comme des hydroxyles et des carbonyles qui contribuent à altérer les fonctions des protéines. Ces modifications structurales peuvent entraîner des modifications fonctionnelles avec perte d'activité enzymatique par exemple. Les acides aminés contenant des chaînes aromatiques ou des groupements thiols sont plus susceptibles à l'attaque oxydative. L'oxydation de l'histidine peut entraîner une inactivation enzymatique [99]. D'autres acides aminés sont sensibles à l'attaque oxydative comme la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine.

La présence de métabolites oxydés dans l'urine est un élément indicateur d'une dégradation d'une protéine modifiée. De nombreux produits de l'oxydation protéique ont été étudiés mais il en ressort que ceux susceptibles d'être les meilleurs candidats pour être des biomarqueurs, sont représentés par les protéines carbonylées, la bityrosine, la L-Dopamine et l'ortho-tyrosine.

Les groupements thiols peuvent être dosés relativement facilement par une méthode colorimétrique. Il s'agit d'une réaction d'oxydoréduction basée sur l'utilisation du DTNB (acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman. Le groupement SH réduit le DTNB en TNB (l'acide 5-thio(2-nitrobenzoïque), produit jaune de la réaction ayant une absorption importante à 412-415 nm.

Les carbonyles protéiques sont dosés par une méthode colorimétrique après réaction avec la dinitrophénylhydrazine (DNPH). Il se forme la dinitrophénylhydrazone qui absorbe à 380 nm.

Il est à noter que le dosage des thiols et des carbonyles nécessite de grandes précautions lors du traitement de l'échantillon (manipulation dans la glace, centrifugation réfrigérée, etc...) pour ne pas provoquer d'oxydation artéfactuelle.

3.9.2.3 Les biomarqueurs de l'oxydation des acides nucléiques

Comme nous l'avons vu dans un des paragraphes précédents, de nombreuses lésions de l'ADN sont générées par l'attaque des radicaux libres. L'intérêt d'étudier les dommages oxydatifs de l'ADN est bien plus marqué que pour les protéines ou les lipides dans la mesure où l'ADN est d'avantage impliqué dans les phénomènes de cancérogenèse. La lésion la plus étudiée est représentée par la 8-oxoGua. En effet, sa présence dans l'ADN peut aboutir à des transversions de GC vers TA, lorsqu'elle n'est pas réparée avant la réplication de l'ADN. Ainsi, la présence de la 8-oxoGua peut mener à une mutation. De plus, il a été montré une corrélation directe entre la 8-oxoGua et les phénomènes de carcinogenèse in vivo [100].

D'autres lésions sont potentiellement mutagènes : c'est le cas de la 2-hydroxyadénine (2-OH-Ade) qui peut entraîner des transversions de A vers T ou de A vers C et des transitions de A à G. La 5-

hydroxycytosine (5-OH-Cyt) semble également avoir des propriétés de lésions prémutagéniques conduisant à une transition de GC vers AT et d'une transversion de GC vers CG. Les glycols de thymine sont des lésions dites bloquantes qui empêchent la réplication de l'ADN [101].

***OBJECTIFS
DU PROJET
DE THESE***

4 OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

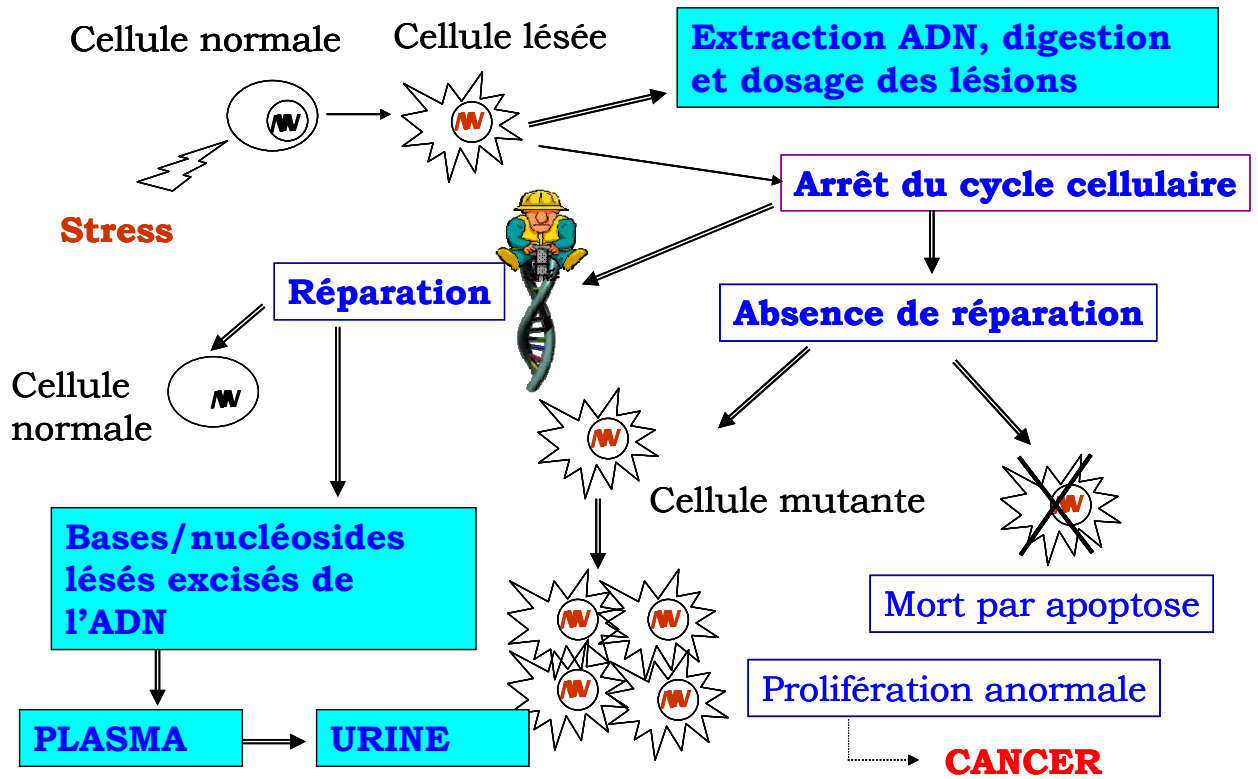
Le but de ce travail de thèse était de déterminer si les lésions de l'ADN quantifiables chez l'Homme pourraient être utilisées en tant que biomarqueurs du stress oxydant et/ou de l'inflammation. Pour se faire, une première partie a tout d'abord été dédiée à la mise au point analytique du dosage de différentes lésions de l'ADN par méthode CLHP-SM/SM dans divers fluides biologiques concernés. En effet, la CLHP-SM/SM est l'outil analytique le plus adapté pour ces mesures en raison de sa très grande sensibilité et de sa très grande spécificité. De nombreux auteurs s'intéressent au dosage de la 8-oxodGuo à l'aide des différentes techniques citées précédemment. C'est la lésion la plus étudiée étant donné qu'il a été reconnu que cette dernière est mutagène et pourrait être impliquée dans de nombreux phénomènes cancéreux. Cependant, ce n'est pas la seule lésion de l'ADN. Un des avantages de la CLHP-SM/SM est d'effectuer un dosage simultané de plusieurs lésions. Afin de mettre en évidence les biomarqueurs de l'ADN en relation avec le stress oxydant, nous nous sommes intéressés aux lésions oxydatives suivantes : les diols de thymidine, la 5(-hydroxyméthyle)-2'-désoxyuridine (5-HMdUrd), la 8-oxodGuo, la 8-oxoGuo, la 8-oxoGua et la 8-oxodAdo. Cependant, d'autres lésions des acides nucléiques comme les lésions chlorées peuvent être générées dans des pathologies impliquant l'inflammation. De ce fait, elles présentent un intérêt tout particulier dans la compréhension de nombreuses pathologies. En effet, lors des phénomènes inflammatoires, l'activation des neutrophiles humains entraîne la production de HOCl. Ce dernier peut réagir avec l'ADN ou l'ARN pour donner les (2'-désoxy)ribonucléosides chlorés. Ces lésions chlorées pourraient donc servir de biomarqueurs de l'inflammation. Elles sont représentées par : la 5-ClIdCyd, la 8-ClIdGuo, la 8ClIdAdo et les ribonucléosides correspondants, la 5-ClCyd, la 8-ClGuo et la 8ClAdo. D'autre part, afin de disposer d'un panel élargi de biomarqueurs des acides nucléiques, nous avons également décidé d'étudier les lésions de l'ADN issues de la peroxydation lipidique qui sont représentées par les éthénonucléosides dont l'édGuo, l'édAdo, le M1-dGuo et le HNE-dGuo. (Les différentes structures des lésions étudiées sont décrites en **Annexe 1**).

Afin de valider l'utilisation de ces biomarqueurs en pathologie humaine, une deuxième partie de thèse a été dédiée à la validation biologique de ces dosages dans le cas de pathologies choisies en raison des liens avec le stress oxydant. Ainsi, la première étude concerne des patients diabétiques et la deuxième s'intéresse aux traitements par radiothérapie de patients cancéreux. En outre, un travail concernant l'infertilité masculine a également été initié ainsi que certains dosages en relation avec l'étude SUVIMAX.

Les hypothèses de travail soutenant ces travaux peuvent être résumées dans la *figure 26*.

Figure 26 : Hypothèses du travail de thèse

Hypothèse de Travail



***DIFFERENTES METHODES DE
DOSAGE DES LESIONS DES
ACIDES NUCLEIQUES***

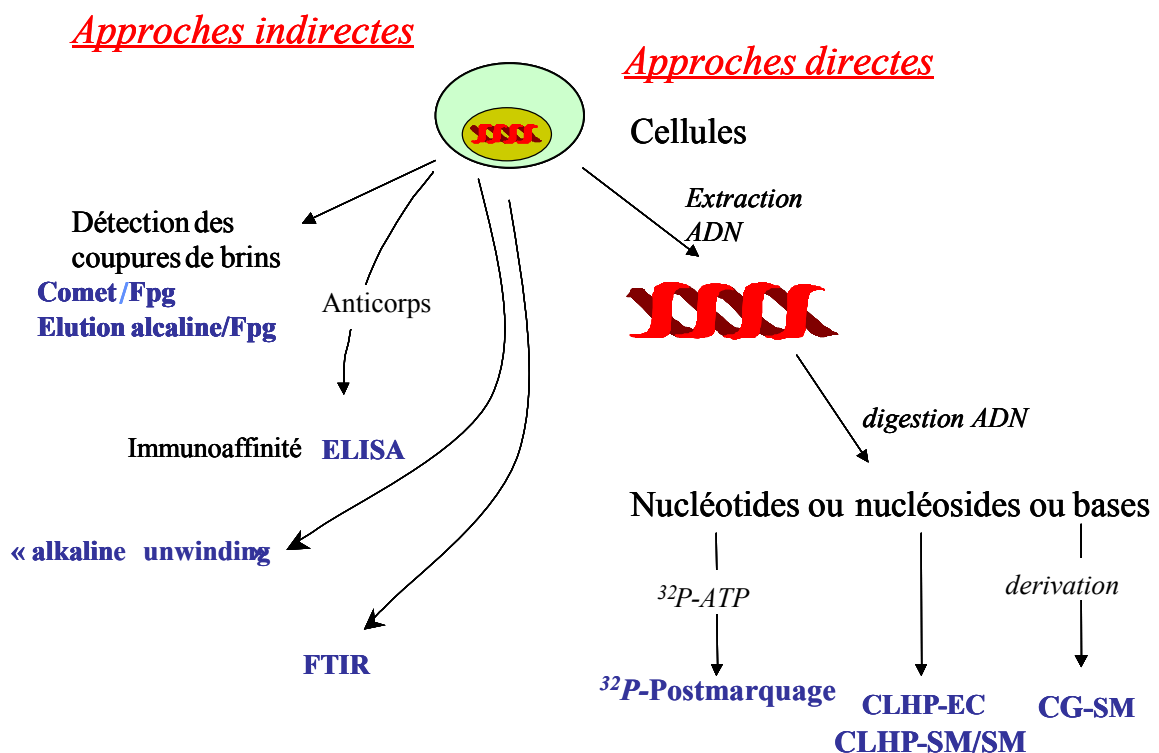
5 DIFFERENTES METHODES DE DOSAGE DES LESIONS DES ACIDES NUCLEIQUES 60

5.1 Méthodes indirectes	60
5.1.1 Technique COMETE	60
5.1.2 Elution alcaline	62
5.1.3 « Alkaline Unwinding » : déroulement en milieu alcalin	62
5.1.4 Techniques d'immunoaffinité	62
5.1.5 FITR : Spectroscopie Infrarouge à Transformé de Fourier	63
5.2 Méthodes directes	63
5.2.1 Post marquage au ³² P (CLHP- ³² P)	64
5.2.2 Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)	64
5.2.3 Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur électrochimique (CLHP-EC)	65
5.2.4 Chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse en mode tandem (CLHP-SM/SM).	65
5.3 Comparaison des méthodes directes et indirectes	66
5.3.1 Avantages et inconvénients des méthodes directes et indirectes	66
5.4 Comparaison des méthodes chromatographiques	68
5.5 Mesures chez l'homme	69
5.5.1 Urine humaine	69
5.5.2 Leucocytes circulants et autres cellules	73
5.5.3 Sperme	77
5.5.4 Plasma	79
5.5.5 Liquide céphalo-rachidien (LCR)	79

5 DIFFERENTES METHODES DE DOSAGE DES LESIONS DES ACIDES NUCLEIQUES

A ce jour, il existe de nombreuses méthodes de dosage des lésions de l'ADN. Deux catégories différentes peuvent être distinguées ; à savoir des dosages directs et indirects des lésions. On présente dans la *figure 27* les différentes méthodes utilisées pour ces deux catégories de dosages.

Figure 27 : Méthodes de dosages directes et indirectes des lésions de l'ADN.



5.1 Méthodes indirectes

Les méthodes indirectes de dosage des lésions de l'ADN permettent généralement de mesurer un groupe de lésions plutôt qu'une lésion individuellement. Elles ne nécessitent généralement pas d'extraction et de digestion de l'ADN, les expériences sont effectuées directement sur des cellules entières.

5.1.1 Technique COMETE

Décrite pour la première fois par Ostling et Johansen en 1984, la méthode COMETE permet de mesurer les cassures (simple et double brin) de l'ADN de façon simple, rapide et sensible [102]. Son

principe (**Annexe 2**) consiste à déposer une suspension de cellules dans de l'agarose sur une lame de microscope puis à lyser ces cellules avec un tampon de lyse contenant notamment un agent détergent permettant d'isoler l'ADN nucléaire. Par la suite, une électrophorèse alcaline permet de mettre en évidence des différences de mobilité de l'ADN selon son état d'endommagement. Après l'étape d'électrophorèse, l'ADN ayant migré est révélé par une coloration avec du bromure d'éthidium (BET) qui est un intercalant des bases de l'ADN. Enfin, la lecture est faite à l'aide d'un microscope à fluorescence.

On obtient alors l'image d'une « comète » (*Figure 28*) représentant l'état de l'ADN.

Figure 28 : Images « Comete » en Microscopie à fluorescence



La tête de cette « comète » représente donc l'ADN non endommagé. La formation de cassures dans l'ADN se traduit par la génération de fragments d'ADN de poids moléculaire plus faible qui sont présents dans la queue de la comète.

L'image de gauche montre l'ADN de cellules témoins tandis que celle de droite concerne des cellules dont l'ADN a subi des dommages, présents dans la queue des comètes.

Il existe aujourd'hui plusieurs variantes de cette technique pour cibler différemment les lésions que l'on cherche à mettre en évidence. Une des techniques COMETE utilisées dite « alcaline » car le tampon de lyse a un pH > 13, permet de détecter les CSB, les CDB et les sites alcali-labiles [103]. L'ajout d'enzymes de réparation permet de mettre en évidence la présence ou non de groupes de lésions reconnues et excisées par ces enzymes (ex : la formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) permet de mettre en évidence les purines modifiées) [104].

L'intérêt de cette technique est tout d'abord lié à sa praticabilité et son faible coût doublé du fait qu'elle ne nécessite qu'une très faible quantité de cellules. Cependant, elle ne permet pas de doser quantitativement les lésions.

De nombreuses mesures par la technique COMETE ont été effectuées à ce jour incluant environ une cinquantaine sur les lymphocytes humains au cours des trois dernières années [105]. Celles-ci ont concerné l'étude de l'effet d'agents génotoxiques tels que le tabac ou la pollution par exemple.

5.1.2 Elution alcaline

Développée par Kohn et coll en 1976 [106], l'élution alcaline permet également de doser les cassures de l'ADN [107]. Tout d'abord, les cellules sont déposées sur une membrane « filtre » de polycarbonate de diamètre de pore de 2 μm , où elles sont lysées. Les constituants de la cellule sont élués à travers le filtre avec la solution de lyse tandis que l'ADN est retenu sur le filtre. La vitesse d'élution de l'ADN dépend de la longueur du fragment : les petits fragments sont élués plus rapidement que les gros. L'ajout d'enzyme de réparation sur le filtre avant l'étape d'élution alcaline permet de mettre en évidence les lésions reconnues spécifiquement par cette enzyme.

5.1.3 « Alkaline Unwinding » : déroulement en milieu alcalin

Cette technique est utilisée pour quantifier les cassures de l'ADN et les sites Fpg sensibles. Après isolement des cellules, celles-ci sont traitées par un agent physique ou chimique (comme le TRITON X100) pour être lysées. Ensuite, un traitement salin permet de séparer les histones de l'ADN. L'incubation alors avec la Fpg permet d'obtenir les CSB qui sont quantifiés par la procédure d'« alkaline unwinding » décrite par Hartwig en 1996 [108]. Ainsi, l'incubation de l'ADN à pH 12,3 pendant 30 minutes à température ambiante sur des colonnes d'hydroxyapatite, à l'obscurité et par addition de concentrations croissantes de tampons phosphate de potassium, permet la séparation de l'ADN simple et double-brin. L'éluat est incubé avec le colorant HOECHST 33258 qui est un fluorophore qui se fixe spécifiquement sur les paires de bases A-T. La fluorescence relative est mesurée par spectrofluorimétrie.

5.1.4 Techniques d'immunoaffinité

Les méthodes de dosage d'immunoaffinité font appel à des anticorps mono ou polyclonaux dirigés contre des lésions connues (exemple : les anticorps anti-8-oxoGua). Les lésions jouent alors le rôle d'antigènes. Cette technique permet de doser les lésions directement dans le tissu : c'est l'immunohistochimie [109]. De plus, elle permet aussi de détecter les lésions dans l'ADN extrait des cellules, puis digéré en nucléosides. La principale difficulté consiste à obtenir des anticorps spécifiques. L'anticorps peut en effet avoir des réactions croisées avec les bases normales de l'ADN. La littérature a rapporté par exemple l'utilisation d'anticorps anti 8oxoAde [110] et anti diols de thymidine [110,111]. Les dosages sont effectués le plus souvent à l'aide d'une technique ELISA (« Enzyme Like ImmunoSorbent Assay ») compétitive [112]. Pour la mise en œuvre de cette technique ELISA appelée également « en sandwich », les puits d'une microplaque sont tapissés avec

un anticorps dit de capture capable de lier spécifiquement l'antigène recherché. Lors de cette opération appelée « coating », l'anticorps de capture se fixe au plastique des puits par interaction électrostatique. La solution à tester est ensuite déposée dans les puits, et si l'antigène est présent, il va se lier spécifiquement à l'anticorps. Une étape de rinçage permet ensuite d'éliminer le restant de la solution. Ensuite, un deuxième anticorps, dénommé « traceur », capable de se lier à l'antigène capturé est ajouté dans les puits. Très souvent, l'anticorps traceur est couplé à une enzyme catalysant la formation d'un produit coloré. La réaction peut être ainsi quantifiée par colorimétrie à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues d'antigène puisque le nombre de molécules d'anticorps traceur fixées dépend du nombre de molécules d'antigène immobilisées par l'anticorps de capture.

Une autre technique d'immunoaffinité appelée RIA (« Radioimmuno Assay ») fait appel à un radionucléide (exemple de l'iode 125) couplé à l'anticorps. Dans ce cas, la quantité de lésion reconnue par l'anticorps marqué est proportionnelle au signal radioactif du radionucléide.

5.1.5 FITR : Spectroscopie Infrarouge à Transformé de Fourier

Comme toutes les molécules organiques, l'ADN a un spectre infrarouge (IR) caractéristique. Ce spectre IR est caractérisé par des pics d'absorption étroits et très rapprochés qui résultent de transitions entre les différents niveaux quantiques de vibration des liaisons de type CO ou NH. Malins fut un des premiers chercheurs à utiliser la FTIR pour quantifier les lésions de l'ADN. En 1994, il s'intéressa aux lésions de l'ADN et observa les changements du spectre IR [113]. L'objectif est de relier les modifications du spectre IR avec les variations structurales de l'ADN comme la présence d'une lésion. En 2003, Malins observa les changements structuraux dans l'ADN extrait de la prostate d'hommes cancéreux [114]. L'inconvénient de cette méthode concerne son manque de spécificité car il est très difficile d'observer un changement lié à la présence d'une base lésée car la modification du spectre IR est non significative dans ce cas. Cette méthode pourrait s'appliquer à la détection d'importantes modifications de structure.

5.2 Méthodes directes

Les méthodes directes permettent de doser plus précisément les lésions connues que les méthodes indirectes puisqu'elles sont appliquées à chaque lésion individuellement.

5.2.1 Post marquage au ^{32}P (CLHP- ^{32}P)

La technique du postmarquage [115] consiste à marquer en position 5'-OH les nucléotides libérés après digestion ménagée de l'ADN. Ce marquage est obtenu enzymatiquement par l'introduction d'un groupement phosphate radioactif en utilisant comme donneur le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (le marquage peut également être effectué chimiquement à l'aide de groupements acétyles tritiés). La séparation et la quantification des nucléosides contenant les lésions sont réalisées à l'aide de la chromatographie sur couche mince (CCM). Une fois que les différents nucléosides ont migré sur la plaque de chromatographie, on révèle par autoradiographie l'emplacement des produits radioactifs et l'intensité du signal mesuré est proportionnelle à la quantité de lésions présentes. La méthode est potentiellement très sensible et permet de détecter une lésion pour 10^7 ou 10^9 bases normales lorsqu'on dispose de quelques μg d'ADN. Toutefois, cette méthode reste peu spécifique car la CCM est peu résolutive sans compter qu'elle fait appel à trois réactions enzymatiques successives qui ne sont pas toujours quantitatives. En effet, la première enzyme permet de libérer la lésion à étudier, puis la deuxième enzyme phosphoryle radioactivement cette dernière et enfin il est nécessaire d'hydrolyser le groupement phosphate froid du nucléoside 3',5'-diphosphate. Plus récemment, certains auteurs utilisent la CLHP [116] à la place de la CCM rendant la technique plus résolutive. Il est à noter que cette technique convient pour la mesure des gros adduits de l'ADN mais ne peut pas être considéré comme une méthode précise pour le dosage des bases oxydées. En effet, l'autoradiolyse due au ^{32}P peut entraîner une oxydation artéfactuelle des bases et conduire à une surestimation des lésions recherchées.

5.2.2 Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)

La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été une des premières techniques chromatographiques mise en œuvre pour le dosage des lésions oxydatives de l'ADN. Les premiers travaux basés sur l'utilisation de cette technique datent des années 1980.

Le principe de cette technique est le suivant. Après hydrolyse acide de l'ADN en bases, ces dernières sont rendues volatiles par une étape de silylation. Ensuite, les différentes bases silylées sont séparées par chromatographie gazeuse sur une colonne capillaire à l'aide d'un gradient de température. La détection est effectuée par spectrométrie de masse (SM) en mode SIM (Single Ion Monitoring) qui repose sur la détection d'un ou deux fragments spécifiques des produits issus de la chambre d'ionisation placée en amont du SM. D'autre part, un étalonnage interne avec des standards marqués isotopiquement peut être effectué.

Ainsi, cette technique a comme avantage la mesure simultanée de plusieurs lésions séparées au préalable par CG. A l'aide de la CG-SM [117], Didzaroglu en 1985 étudia les lésions de l'ADN

irradié en gamma. Aruoma et coll en 1989 [118] s'intéressa aux dommages oxydatifs de l'ADN produits par les radicaux libres générés par des systèmes biologiques de type xanthine-oxydase/hypoxanthine. Jackson et coll. en 1989 [119] étudièrent les dommages obtenus après stimulation des neutrophiles.

5.2.3 Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur électrochimique (CLHP-EC)

La méthode CLHP-EC est une technique basée sur l'utilisation d'une séparation chromatographique couplée à une détection électrochimique permettant la mesure des molécules selon leur potentiel redox. De ce fait, elle nécessite que les molécules soient électroactives ce qui est le cas de certaines lésions de l'ADN. Elle est couramment utilisée pour le dosage de la 8-oxodGuo dans l'ADN cellulaire. La première utilisation a été effectuée par les équipe de Kasaï [120] et de Floyd en 1984 [121]. La mesure de la 8-oxodGuo est réalisée couramment par cette technique ; le dosage de la 5-hydroxycytosine, de la 5-OHdUrd [122] et de la 8-oxoAde [123] est aussi réalisable par CLHP-EC.

L'électrode de détection est placée à un potentiel supérieur au potentiel d'oxydation du composé à détecter. Ainsi, il y a oxydation du composé, libération d'électrons qui sont alors détectés. Le potentiel d'oxydation des nucléosides normaux se situe aux alentours de 1,2 V tandis que celui de la 8-oxodGuo est de 450 mV. En fixant le potentiel de l'électrode à 500 mV, on ne détectera que la 8-oxodGuo. De plus, le système comporte généralement en ligne un détecteur UV pour quantifier les bases normales de l'ADN.

5.2.4 Chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse en mode tandem (CLHP-SM/SM).

L'intérêt pour la technique de CLHP-SM/SM n'a cessé de croître au cours de ces dernières années. Les molécules sont tout initialement séparées par CLHP avant d'arriver dans une source d'ionisation. Parmi les différentes méthodes d'ionisation existantes, nous mentionnerons uniquement celle du type « electrospray » (ESI) dont est équipée l'API 3000 utilisée dans ce travail de thèse. Cette technique d'ionisation est actuellement la plus utilisée car elle permet une ionisation douce des molécules. Une fois les molécules ionisées, ces dernières sont détectées en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) dans un premier analyseur de type quadripôle. L'utilisation de la spectrométrie de masse en mode tandem consiste à fragmenter ces molécules ainsi isolées dans le premier quadripôle à l'aide d'une cellule de collision, puis à détecter leurs fragments, appelés ion fils, dans un deuxième quadripôle. L'utilisation de spectromètres de masse en tandem permet d'être

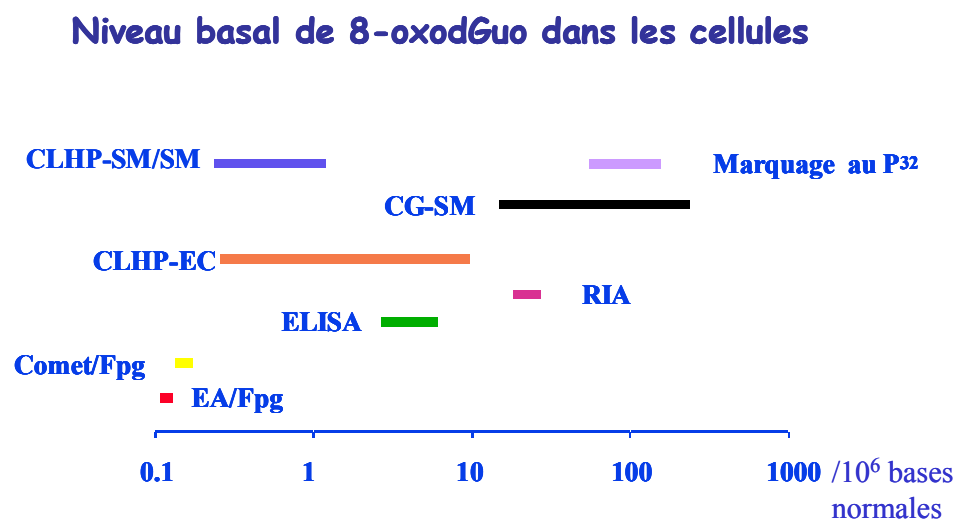
à la fois plus sensible et plus spécifique qu'un système de CHLP-SM simple. De nombreux modes de fonctionnement du spectromètre en tandem permettent notamment de rendre la méthode très diversifiée dans ses applications. Cette technique de CLHP-SM/SM sera décrite plus en détails dans le paragraphe matériel et méthodes.

5.3 Comparaison des méthodes directes et indirectes

5.3.1 Avantages et inconvénients des méthodes directes et indirectes

Les différentes techniques de dosage des lésions de l'ADN dans les milieux biologiques conduisent parfois à des résultats très discordants. Les valeurs obtenues pour la 8-oxodGuo sont comprises entre 0,1 et 1000 lésions par million de nucléosides normaux selon les méthodes utilisées (*Figure 29*). Ainsi, les méthodes directes donnent des résultats généralement plus élevés que les méthodes indirectes. Le réseau ESCODD (« European Standards Committee on Oxidative DNA Damage ») [124] a permis d'effectuer une standardisation des dosages concernant la 8-oxodGuo.

Figure 29 : Taux de 8-oxodGuo en fonction du type de méthode de dosage.



Une comparaison des différentes méthodes de dosage est nécessaire pour expliquer la discordance des mesures effectuées au cours des 20 dernières années. Etant donné les différentes techniques utilisées, il paraît nécessaire de les comparer entre elles en termes de sensibilité, spécificité, praticabilité et également d'applications.

En ce qui concerne les **avantages des méthodes indirectes**, l'on peut citer tout d'abord, leur facilité de mise en œuvre. En effet, la technique COMETE, par exemple, ne nécessite qu'un petit appareillage (cuve d'électrophorèse, microscope, lames) et surtout peu de cellules soit une faible quantité d'ADN. Il en est de même pour les techniques d'éluion alcaline ou d'« alkaline-

unwinding ». Par contre, les techniques d'immunoaffinité et de FITR sont un peu plus complexes et nécessitent des moyens plus importants que les deux précédentes (synthèse des anticorps, etc.) Le deuxième avantage des méthodes indirectes concerne le fait de ne pas extraire l'ADN au préalable avant son analyse. Ce point est primordial puisqu'il est établi qu'une oxydation artéfactuelle peut se produire si on multiplie les étapes préliminaires avant l'analyse proprement dite. En termes de sensibilité, l'élution alcaline est comparable aux techniques chromatographiques de la CLHP-EC et de la CG-SM. La sensibilité de l'"alkaline-unwinding" permet de quantifier 0,08 Fpg sites sensibles pour 10^6 paires de bases ou 500 sites sensibles à la Fpg dans une cellule isolée. **L'inconvénient majeur de ces techniques indirectes** concerne le manque de précision puisqu'il n'est pas possible de quantifier une lésion précisément par rapport à une autre mais simplement un groupe de lésions. Ceci est amélioré lors de l'utilisation d'enzymes de réparation de type Fpg ou Endo III, mais toutefois, il n'est pas toujours établi que ces dernières aient un rendement d'excision de 100%. De ce fait, il est possible que le nombre de lésions soit alors sous-estimé.

Les techniques d'immunoaffinité sont des techniques très sensibles mais font appel à l'utilisation d'anticorps ce qui oblige à avoir un anticorps spécifique de chaque lésion. Il est très difficile d'obtenir des anticorps spécifiques contre les lésions oxydatives puisque ce sont des modifications faiblement antigéniques. Les anticorps anti-dimères de thymidine sont plus spécifiques car il s'agit d'une lésion plus volumineuse que la 8-oxodGuo qui entraîne des modifications structurales dans l'ADN. D'autre part, il faut disposer d'une grande quantité d'anticorps pour faire des colonnes d'immunoaffinité. Ce sont généralement des kits commerciaux d'un coût important et non réutilisables. Peu de lésions sont mesurées spécifiquement par des méthodes immunologiques car les anticorps actuellement disponibles sur le marché souffrent d'un manque de spécificité.

La FITR permet d'obtenir des informations plus qualitatives que quantitatives. En effet, les modifications structurales de l'ADN et donc du spectre IR ne permettent pas de déterminer précisément la nature de la lésion.

Parmi les **avantages des méthodes directes**, on peut noter qu'elles permettent d'effectuer des mesures individuelles. La sensibilité de ces méthodes est voisine des précédentes, ainsi le postmarquage au ^{32}P permet de mesurer 1 lésion pour 10^7 bases normales. Cependant, les **inconvénients** sont liés à la lourdeur des appareillages nécessaires, leur coût et à la préparation des échantillons. En effet, la nécessité de l'extraction de l'ADN ajoute une étape supplémentaire pouvant entraîner une oxydation artéfactuelle à l'origine d'une surestimation de la quantité de lésions présentes. La digestion enzymatique représente également un biais supplémentaire si la réaction n'est pas quantitative. De plus, la quantité d'ADN nécessaire pour le dosage par les méthodes directes est très nettement supérieure à celui nécessaire pour le dosage par la technique COMETE

par exemple puisqu'il faut environ 50 µg d'ADN. La radioactivité utilisée dans la technique de postmarquage au ^{32}P , entraîne des contraintes supplémentaires avec un bruit de fond élevé et une oxydation artéfactuelle due au marquage radioactif. De plus, il se peut que la phosphorylation enzymatique servant à marquer l'ADN ne soit pas totale. Ceci entraîne une sous ou surestimation du taux des lésions par ces biais.

5.4 Comparaison des méthodes chromatographiques

Si on s'intéresse cette fois uniquement aux techniques de chromatographie, que ce soit CG-SM, CLHP-EC et CLHP-SM/SM, l'avantage primordial est de permettre une analyse individuelle de chaque lésion. Un des inconvénients de ces techniques par rapport aux méthodes indirectes concerne la quantité d'ADN devant être utilisée. En effet, environ 50 µg d'ADN sont nécessaires. Cependant, il existe des discordances faisant apparaître des différences entre ces techniques.

En ce qui concerne la CG-SM, l'ajout de standards internes marqués isotopiquement avant l'hydrolyse de l'ADN permet d'effectuer un étalonnage interne rendant la technique très précise. Toutefois, l'étape de silylation (c'est-à-dire de dérivation) pour rendre les bases volatiles et stables lors de l'analyse CG-SM entraîne leur oxydation artéfactuelle [125,126]. Ceci conduit à une surestimation de la quantité des bases oxydées (cas de la 8-oxoGua, de la 8-hydroxyAde et de la 5-hydroxyCyt par exemple). Pour cette raison, cette technique tend à être abandonnée pour le dosage des lésions oxydatives de l'ADN.

La CLHP-EC est aujourd'hui très utilisée pour le dosage de certaines lésions car elle ne génère pas d'artéfact lors de l'analyse des échantillons contrairement à ce qui est observé pour la CG-SM. La limite de sensibilité est de 0,2 lésion pour 10^6 bases normales à partir de 50 µg d'ADN. Un des désavantages de cette technique concerne la possibilité de mesure d'un nombre restreint de lésions. Il n'est pas possible d'appliquer un gradient de CLHP car les cellules du détecteur électrochimique sont sensibles aux variations de la composition de la phase mobile.

La CLHP-SM/SM présente de nombreux avantages par rapport à la détection électrochimique, comme par exemple sa spécificité qui est bien meilleure. D'autant plus que cette technique permet une analyse simultanée de plusieurs lésions de l'ADN. L'inconvénient majeur reste encore son coût très nettement supérieur à celui d'un détecteur électrochimique représentant un investissement élevé pour un laboratoire de recherche.

Enfin, il est nécessaire de rappeler qu'une oxydation artéfactuelle peut se produire lors de l'extraction des acides nucléiques à partir des cellules. Pour cela, un important travail a été réalisé pour optimiser les méthodes d'extraction afin de minimiser le risque de cette oxydation artéfactuelle.

Ainsi, le réseau ESCODD a permis l'amélioration de cette optimisation en comparant les résultats des mesures de mêmes échantillons réalisés par différents groupes de recherche [127].

C'est pourquoi nous avons retenu pour notre travail de thèse la méthode CLHP-SM/SM. Cette technique est plus précisément décrite dans le chapitre matériel et méthodes.

5.5 Mesures chez l'homme

5.5.1 Urine humaine

L'urine humaine est un milieu biologique facile à obtenir et c'est pourquoi de nombreux travaux ont été réalisés à ce jour pour mesurer des lésions de l'ADN. Ce fluide représente le lieu d'élimination de nombreux métabolites du corps humain. Cela peut être le cas pour les produits de réparation de l'ADN comme les bases oxydées éliminées par la REB ou des oligonucléotides contenant les lésions éliminées par la REN si ces derniers sont capables de franchir la membrane cellulaire. Toutefois, on peut aussi retrouver également les acides nucléiques provenant des cellules mortes. L'interprétation des résultats des mesures de bases et nucléosides oxydés est difficile en raison d'un manque d'information sur l'origine de celles-ci. En effet, l'alimentation comporte également des acides nucléiques dont les unités élémentaires peuvent à terme se retrouver dans l'urine. Cependant, une étude récente [128] a montré que l'ingestion par des volontaires sains d'ADN marqué à l'¹⁵N préalablement irradié pour créer notamment la 8-oxoGua et la 8-oxodGuo, n'a pas permis de mettre en évidence ces lésions marquées isotopiquement ces lésions dans l'urine. Le tableau suivant montre une analyse comparative des différents dosages ayant été réalisés dans l'urine humaine.

Lésions mesurées	Méthode de dosage	Valeurs/concentrations	Année de parution	Référence bibliographique
8-oxodGuo	SPE+CLHP-EC	7,8+/-4,6 ng.mg-1 de créatinine (n=4)	1988	[129]
8-oxodGuo	SPE+CG-SM	4+/-1,3 ng.mg-1 de créatinine (n=23)	1988	[130]
8-oxodGuo	SPE+CLHP-CLHP-EC	2,7+/-1,1 ng.mg-1 de créatinine (n=53 non-fumeurs) 4,4+/-0,1 ng.mg-1 de créatinine (n=30 fumeurs)	1992	[131]
8-oxodGuo	SPE+CL-CL-EC	2,7 à 4,1 ng.mg-1 de créatinine (n=168)	1993	[132]
8-oxodGuo	CL-CLHP-EC	2,7+/-1,0 ng.mg-1 de créatinine (n=41)	1993	[133]

8-oxodGuo	CL-CLHP-EC	2,8+/-1,2 ng.mg-1 de créatinine (n=71 hommes) 3,2+/-1,2 ng.mg-1 de créatinine (n=58 femmes)	1995	[134]
8-oxodGuo	SPE+CL-CL-EC	4,0 à 5,8 ng.mg-1 de créatinine (n=10 femmes)	1995	[135]
8-oxodGuo	SPE+CL-CL-EC	3,6+/-1,8 ng.mg-1 de créatinine (n=37 hommes non fumeurs) 3,1+/-1,4 ng.mg-1 de créatinine (n=63 femmes non fumeuses) 4,5+/-2,0 ng.mg-1 de créatinine (n=12 hommes fumeurs) 3,6+/-1,6 ng.mg-1 de créatinine (n=31 femmes fumeuses)	1996	[136]
8-oxodGuo	SPE+CLHP-EC	6,8+/-4,7 ng.mg-1 de créatinine (n=60)	1997	[137]
8-oxodGuo	ELISA avec un anticorps monoclonal (N45.1)	27,2+/- 17,4 ng/mg de créatinine (n=14 cancéreux « à petites cellules ») 19,8+/- 8,6 ng/mg de créatinine (n=23 cancéreux « à petites cellules ») 19,4+/- 8,5 ng/mg de créatinine (n=52 contrôles)	1997	[88]
8-oxoGua 5-HMUra 5-OHUra 8-oxoAde 8-oxodGuo	CLHP+CG-SM	583 +/- 376 pmol/ml 121 +/- 56 pmol/ml 58 +/- 23 pmol/ml 7 +/- 4 pmol/ml 30 +/- 15 pmol/ml	1999	[138]
8-oxodGuo	SPE+CLHP-EC	281,7 +/- 179,1 pmol/jour/kg homme 333,2 +/- 47,4 pmol/jour/kg urine de rats.	2000	[139]
8-oxoGua 8-oxoGuo 8-oxodGuo	CLHP-SM/SM	136 +/- 12 nmol/24h urine (n=20) 48 +/- 6 nmol/24h urine (n=20) 28 +/- 2 nmol/24h urine (n=20)	2002	[140]
8-oxodGuo	CLHP-EC	2,03+/-1,21 μ mol/mol de créatinine pour un échantillon d'urine (n=148)	2002	[141]

		1,86+/-1,09 $\mu\text{mol/mol}$ de créatinine sur 24 h (n =67)		
8-oxoGua	CLHP+CG-SM	138 +/- 82 nmol/24h (n=38 sujets sains) 202 +/- 102 nmol/24h (n=42 sujets cancéreux)	2002	[142]
8-oxoGua 8-oxodGuo	CLHP+CG-SM	104-193 nmol/L (n= 30 patients) 14-21 nmol/L (n= 30 patients)	2003	[143]
8-oxodGuo	ELISA anticorps monoclonal	12 à 16 $\mu\text{g/g}$ de créatinine (91 sujets)	2004	[144]
8-oxodGuo	CLHP-EC	2 à 1193 nmol/L avec une moyenne de 53 nmol/L (n= 11 patients cancéreux)	2004	[89]
8-oxodGuo	SPE+CG-SM	3,58-115,24 nM	2004	[145]
8-oxodGuo 8-oxoGua 5HMUra	CLHP puis CG-SM	8,4+/-1,21 nmol/mmol de créatinine 2,1+/-0,44 nmol/mol de créatinine 9,20+/-1,62 nmol/mmol de créatinine	2004	[146]
8-oxodGuo	CLHP-EC	2,08 ng/mg de créatinine (n=15 non exposés au Hg) 242,9 ng/mg de créatinine (n=33 exposés au Hg)	2005	[147]
8-oxodGuo	SPE Electrophorese Capillaire-EC	35,26+/-27,96nM (n= 28 cancéreux) 13,51+/-5,08nM (n=9 témoins sains)	2005	[148]
8-oxodGuo 8-oxoGua	CLHP-EC	3,9 +/-2,0 $\mu\text{g/g}$ de créatinine (n=19 hô) 11 +/-2,4 $\mu\text{g/g}$ de créatinine (n=19 hô)	2006	[149]
NO₂-Gua	Immunoaffinité puis CLHP-EC	0-9,2 fmol/mg de créatinine (n= 17 non fumeurs) 0-151,6 fmol/mg de créatinine (n= 12 fumeurs)	2006	[43]
M₁dGuo	Immunoaffinité puis CLHP-SM/SM	0,23-0,96 pmol/L (n=3 hommes volontaires sains et 3 femmes volontaires saines)	2004	[54]

εGua	CLHP-CLHP- SM/SM et CG- SM	0,3-8 nmol/L	2002	[150]
εGua	SPE+CLHP- SM/SM	64 +/- 28 pmol/mmol de créatinine (n=17 fumeurs) 26 +/- 16 pmol/mmol de créatinine (n=13 non fumeurs)	2005	[151]
εdAdo	Immunoaffinité et CLHP –Fluo (standard interne ³ H-εdAdo)	0,27-4,4 fmol/μmol de créatinine (n=9 hommes et 9 femmes)	1999	[152]
εAde	SPE+GC/NICI/S M	401+/-115 pmol/g de créatinine (n=10 hommes fumeurs) 135+/-44 pmol/g de créatinine (n=10 hommes non fumeurs) 577+/-344 pmol/g de créatinine (n=3 femmes non fumeuses)	2003	[153]
εAde	SPE+CLHP- SM/SM	42 +/- 40 pg/mL (n=10 non fumeurs) 112 +/- 57 pg/mL(n=8 fumeurs)	2004	[154]
εdAdo	SPE+CLHP- SM/SM	30,5 +/-8,5 pmol/24H (n=5 fumeurs) 38,6 +/-2,4 pmol/24H (n=28 non fumeurs)	2004	[155]
εdAdo	Immuno +CLHP/Fluoresc ence	Augmentation de 90 fois dans le cas de patients infectés par le virus de l'hépatite B et ayant une hépatite chronique en comparaison à des porteurs sains de cette même hépatite (pas de valeurs)	2005	[156]
εAde εdCyd εdAdo	SPE puis CLHP- SM/SM	45,8 pmol/24 h (n=6 volontaires sains) 96,8 pmol/24 h (n=6 volontaires sains) 18,1 pmol/24h (n=6 volontaires sains)	2006	[157]

Cette liste exhaustive des différentes analyses de lésions dans l'urine humaine reflète la variété des méthodes de dosage utilisées, ainsi que les manières d'exprimer les résultats (unités).

Certains auteurs donnent les résultats en quantité de lésions soit en fonction du volume d'urine soit en fonction de la créatinine urinaire. Il paraît important de faire le point sur ces données afin de comprendre les raisons de ces variations. Comme cela a déjà été mentionné précédemment, les méthodes de dosage diffèrent sur de nombreux points et peuvent expliquer ces variations dans certains cas.

D'autre part, une seule étude fait part de la présence d'oligonucléotides dans les urines, qui pourraient être représentatifs de la réparation par la REN. Dans ces travaux, il a été montré que ces oligonucléotides ne contiennent pas de 8-oxodGuo, cela suggère qu'il y a bien excrétion d'oligonucléotides urinaires mais qu'ils sont dépourvus de lésions de type oxydative [158].

5.5.2 Leucocytes circulants et autres cellules

De nombreuses études ont été réalisées sur les lymphocytes et cellules mononuclées circulants ainsi que d'autres types cellulaires. Dans ces expériences, les cellules sont isolées du sang circulant ou du tissu concerné, puis l'ADN est extrait de leur noyau. Il existe aussi des dosages par immunohistochimie directement appliqués sur les tissus étudiés. Ces deux étapes initiales des méthodes chromatographiques doivent être effectuées dans des conditions optimales afin de minimiser l'oxydation artéfactuelle pouvant avoir lieu. Ces étapes sont très importantes. Le tableau ci-dessous résume différentes études sur divers types cellulaires et l'on peut remarquer les valeurs très variables du taux de la 8-oxodGuo d'une étude à l'autre [159].

Lésions mesurées	Méthode de dosage	Milieux biologiques étudiés	Valeurs/concentrations pour des cellules humaines	Année de parution	Référence bibliographique
8-oxodGuo	CLHP-EC	lymphocytes	0,2-0,35/10 ⁶ nucléotides normaux (NN) avant irradiation (4 patients cancéreux) 0,46 –0,72/10 ⁶ NN après la dernière irradiation 30 Gy au total (4 patients cancéreux)	1996	[87]
8-oxodGuo	CLHP-SM/SM	ADN cellulaire exposé à une irradiation gamma	0,75/10 ⁶ NN	2000	[160]

8-oxodGuo	CLHP-EC	ADN de leucocytes	3-20/10 ⁶ NN (n=81 sujets)	2002	[161]
8-oxodGuo M₁dGuo εdAdo εdCyd	CLHP-SM/SM	ADN de foie humain (4 sujets)	3,28/10 ⁶ NN ND 7,0 10 ⁻⁴ -17,0 10 ⁻⁴ /10 ⁶ NN 5,0 10 ⁻⁴ -10,0 10 ⁻⁴ /10 ⁶ NN	2003	[162]
8-oxodGuo	CLHP-EC	Leucocytes humains	0,66/10 ⁶ NN avant tabac 1,01/10 ⁶ NN après tabac	2004	[159]
8-oxodGuo	CLHP-EC	Leucocytes humains	1,15/10 ⁶ NN	2004	[159]
8-oxodGuo	³² P-CLHP et CLHP-EC	Leucocytes humains	15,92/10 ⁶ NN	2004	[159]
8-oxodGuo	CLHP-EC	PMN leucocytes	23,48/10 ⁶ NN	2004	[159]
8-oxodGuo	CLHP-EC	Lymphocytes	13,52/10 ⁶ NN	2004	[159]
8-oxodGuo	CLHP-EC	Cellules Hela	0,07/10 ⁶ NN	2004	[159]
8-oxodGuo	CLHP-EC	Leucocytes humains	7,76/10 ⁶ NN	2004	[159]
8-oxodGuo	CG-SM	Lymphocytes périphériques humains	59,70/10 ⁶ NN	2004	[159]
8-oxodGuo	CLHP-EC	Lymphocytes	0,90/10 ⁶ NN	2004	[159]
8-oxodGuo	CLHP-EC	Lymphocytes	0,24-0,43/10 ⁶ NN	2004	[159]
8-oxodGuo	CLHP-EC	Cerveau (ADN m)	31,40-54,41/10 ⁶ NN	2004	[159]
8-oxodGuo	CLHP-EC	Cerveau (ADN nuc)	2,49-5,37/10 ⁶ NN	2004	[159]
8-oxodGuo	CLHP-EC	Cerveau (ADN m)	30,45-71,04/10 ⁶ NN	2004	[159]
8-oxodGuo	CLHP-EC	Cerveau (ADN nuc)	2,39-5,17/10 ⁶ NN	2004	[159]
8-oxodGuo	CG-SM (SIM)	Epithélium Bronchique	145,25/10 ⁶ NN	2004	[159]
8-oxodGuo	Fpg et Southern	ADN m	5,00/10 ⁶ NN	2004	[159]

	Blot				
8-oxodGuo	CLHP-EC	spermatozoïde	4,26/10 ⁶ NN	2004	[159]
8-oxodGuo	CLHP-EC	Pancréas	0,19/10 ⁶ NN	2004	[159]
8-oxodGuo	CLHP-EC	Cellules mononucléaires du sang périphérique de cas contrôles	22,09/10 ⁶ NN	2004	[159]
εdAdo εdCyd	IPPA	Foie	0-27 lésions/10 ⁹ NN	1995	[163]
εdAdo εdCyd	IPPA	Leucocytes circulants	0,13-90,15/10 ⁷ dAdo 0,06-71/10 ⁷ dCyd	1997	[164]
M1dGuo	Purification par immunoaffinité puis CG-SM	Leucocytes circulants	5,1+/-0,4/10 ⁸ NN (n= 3 femmes saines) 6,7+/-1,1/10 ⁸ NN (n= 7 hommes sains)	1997	[51]
εdAdo εdCyd 8-oxodGuo M1dGuo	IPPA IPPA CLHP-EC CG-SM	Pancréas	1,8+/-1,3 10 ⁸ NN 1,2+/-0,52 10 ⁸ NN 19+/-6,1 10 ⁸ NN 32+/-23 10 ⁸ NN	1998	[165]
εdAdo εdCyd	IPPA	Foie (sujets sains, maladie de Wilson, ou hémochromatose)	19,3-61,03/10 ⁹ NN 27,5-91,5/10 ⁹ NN	1998	[166]
εdAdo εdCyd	IPPA	Tissus humains (foie, œsophage, pancréas,) et leucocytes	0,05-25/10 ⁸ dAdo 0,01-11/10 ⁸ dCyd	1999	[167]
εdAdo et εdCyd	IPPA	Tissus humains (foie, œsophage, pancréas, colon)	<0,05-9 lésions /10 ⁸ NN 0,3-25 lésions /10 ⁸ NN	2000	[168]

		leucocytes			
εdAdo εdCyd	CLHP-SM	Placenta	2,7+/-1,7 /10 ⁸ NN <limite de quantification	2000	[169]
εdAdo	Immunohisto chimie	Foie : pourcentage des noyaux des cellules fixant l'anticorps anti εdAdo	3,1% (foies normaux) 15% (foies « gras » alcooliques) 50,7% (maladie de Wilson) 33%(hémochromatose) 6,2%(hépatites non alcooliques)	2004	[170]
M₁dGuo	³² P-CLHP	Leucocytes circulants Tissu mammaire	2,6+/-1,7/10 ⁷ NN (n=26) 3,0+/-1,3/10 ⁷ NN (n=7)	1995	[171]
M₁dGuo	³² P-CLHP	Leucocytes totaux circulants	7,4+/-8,7/10 ⁷ NN (n=23 régime riche en acides gras polyinsaturés) 1,6+/-1,9/10 ⁷ NN (n=26 régime riche en acides gras monoinsaturés)	1996	[172]
M₁dGuo et M₁dAdo	nuclease P1- ³² P- postlabeling	Tissu mammaire	42,5/10 ⁹ NN (n= 51 cancers) 15,67/10 ⁹ NN (n= 28 contrôles)	1996	[173]
M₁dGuo	Immunoslotb lot	Leucocytes circulants Biopsie gastrique	5,6-9,5/10 ⁸ NN (n=8) 3,1-64,3/10 ⁸ NN (n=42)	1998	[174]
M₁dGuo	Immunoslotb lot	Culture de cellules de colon humain	77 à 148/10 ⁸ NN	2001	[52]

M₁dGuo	IEP-CLHP	Foie	5,2+/-2,8 /10 ⁸ NN (n=2)	2004	[175]
	Immuno	Sein	1,7+/-1,3 /10 ⁸ NN (n=4)		
	enriched-	Leucocytes	9,5+/- 8,6 /10 ⁸ NN (n=		
	postlabeling	circulants	26)		
	³² P-CLHP				

La conclusion première de l'étude comparative de cette liste exhaustive de dosages des lésions de l'ADN dans l'urine ou dans les leucocytes circulants est que les résultats sont très divergents avec parfois des unités de mesures non comparables. On observe aussi que les taux de 8-oxodGuo cellulaires mesurés par CG-SM ou ³²P-CLHP sont beaucoup plus élevés que ceux obtenus par CLHP-EC ou CLHP-SM/SM. Ceci s'explique par l'oxydation artéfactuelle créée par ces 2 premières techniques. De plus, on peut remarquer que très peu de ces études tentent de corréler le taux urinaire au taux leucocytaire d'une même lésion. Une seule équipe a mesuré les taux de 8-oxoGua urinaire et de 8-oxodGuo leucocytaire de patients atteints de cancer du poumon [176]. Trois groupes de sujets ont été étudiés : (a) 51 patients tous fumeurs et cancéreux pulmonaires, (b) 26 fumeurs non atteints de cancers et (c) 38 sujets sains non fumeurs. De plus, il a été évalué l'activité de réparation de la 8-oxoGua dans les leucocytes des sujets sains et cancéreux et a déterminé que cette activité est plus faible pour les cancéreux. Ainsi, ils ont émis l'hypothèse suivante : comme le taux urinaire de 8-oxoGua est similaire dans les deux groupes (a) et (b) de même statut fumeur, le taux élevé de 8-oxodGuo leucocytaire dans les cancers pulmonaires pourrait s'expliquer par un défaut de réparation dans ces deux groupes de sujets.

5.5.3 Sperme

La mesure des lésions de l'ADN de spermatozoïdes a fait l'objet d'un nombre restreint de publications qui concernent le dosage de la 8-oxodGuo. On peut noter l'absence de mesure d'autres lésions oxydatives dans l'ADN des spermatozoïdes humains.

Lésions mesurées	Méthode de dosage	Milieux biologiques étudiés	Valeurs/concentrations pour des cellules non traitées	Année de parution	Référence bibliographique
8-oxodGuo	CLHP-EC	spermatozoïdes	13 fmol/μg d'ADN (n=24)	1991	[177]

8-oxodGuo	CLHP-EC	spermatozoïdes	1,3/10 ⁵ dGuo (n= 22 non fumeurs) 1,976/10 ⁵ dGuo (n=19 fumeurs)	1996	[178]
8-oxodGuo	CLHP-EC	spermatozoïdes	4,5-20/10 ⁵ dGuo (n= 67)	1997	[179]
8-oxodGuo	CLHP-EC	spermatozoïdes	6,19 +/- 1,71/10 ⁵ dGuo (n= 28 fumeurs) 3,93 +/- 1,33/10 ⁵ dGuo (n= 32 non fumeurs)	1997	[180,181]
8-oxodGuo	CLHP-EC	spermatozoïdes	1,0 +/-0,1/10 ⁵ dGuo (n= 17 contrôles sains) 1,5 +/-0,2/10 ⁵ dGuo (n= 19 hommes infertiles) 1,1 +/-0,1/10 ⁵ dGuo (n= 19 hommes infertiles après 2 mois de traitement antioxydant)	1997	[181]
8-oxodGuo	CLHP-EC	spermatozoïdes	10,03/10 ⁵ dGuo (n= 60 hommes infertiles) 4,79/10 ⁵ dGuo (n= 54 hommes sains)	1999	[182]
8-oxodGuo	CLHP-EC	spermatozoïdes	8,91/10 ⁵ dGuo	2000	[183]
8-oxodGuo	ELISA Anticorps monoclonal	Plasma séminal	4,8 +/- 1,0 ng/ml (n= 8 contrôles) 7,8 +/- 3,7 ng/ml (n= 16 asthenozoospermie) 7,7 +/- 3,0 ng/ml (n= 21 normozoospermie)	2002	[184]
8-oxodGuo	CLHP-EC	spermatozoïdes	51,4/10 ⁶ dGuo (n= 56 non fumeurs)	2003	[185]
8-oxodGuo	CLHP-EC	spermatozoïdes	6 à 12000/10 ⁶ dGuo (n=64 patients hypofertiles)	2003	[186]
8-oxodGuo	CLHP-EC	spermatozoïdes	4,26/10 ⁶ nucléotides normaux	2004	[159]

Cette liste montre une disparité des résultats de la 8-oxodGuo dans l'ADN des spermatozoïdes humains avec toutefois une tendance à l'augmentation du taux dans les cas d'hypo ou d'infertilité.

5.5.4 Plasma

La mesure des lésions de l'ADN dans le plasma a fait l'objet de quelques publications concernant essentiellement la 8-oxodGuo. Dans une étude effectuée en 1999, le taux mesuré par CLHP-EC a montré des variations de 4,28 à 21,19 pg/mL (n= 28 volontaires sains) [187]. Ces valeurs sont très faibles, d'où la difficulté de la mesure plasmatique.

Très récemment, la 8-oxodGuo a été mesuré dans le plasma de sujets atteints de la maladie de Huntington [188]. Les patients non traités ont un taux moyen de 45,29 pg/mL par comparaison avec celui des sujets sains qui est en moyenne de 13,5 pg/mL. Lorsque que ces patients reçoivent un traitement à la créatine, le taux diminue fortement pour atteindre des valeurs moyennes de 9,11 pg/mL.

5.5.5 Liquide céphalo-rachidien (LCR)

La mesure dans le LCR des lésions de l'ADN n'a fait l'objet que de peu d'études à l'heure actuelle. Les rares références bibliographiques que l'on peut trouver du taux de 8-oxoGua et de 8-oxodGuo sont respectivement de 1,1 à 2,3 nmol/L et de 0,6 à 1,3 nmol/L dans le LCR de 30 sujets atteints de tumeurs intracrâniennes [143].

Bogdanov et coll. ont mesuré un taux de 8-oxodGuo compris entre 0,64 à 1,54 pg/ml de LCR (n= 16 volontaires sains) [187]. D'autre part, la même équipe a également montré une augmentation de 8-oxodGuo dans les urines, le plasma et le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (2,1 +/- 0,2 pg/mL patients ; 1,5 +/- 0,2 pg/mL sujets sains).

MATERIEL
ET
METHODES

6 MATERIEL ET METHODES	82
6.1 Matériel analytique de quantification des lésions	82
6.1.1 Descriptif de l'appareillage utilisé : la CLHP-SM/SM	82
6.1.1.1 La pompe de la CLHP	82
6.1.1.2 L'injecteur automatique	83
6.1.2 La colonne de chromatographie	83
6.1.3 Le détecteur ultra-violet (UV)-visible	83
6.1.4 Le spectromètre de masse en mode tandem (SM/SM)	83
6.1.4.1 La source d'ionisation	83
6.1.4.2 Les quadripôles	84
6.2 Mesure des lésions par CLHP-SM/SM	87
6.2.1 Etalonnage par standardisation interne	87
6.2.2 Etalonnage par standardisation externe	87
6.2.3 Conditions chromatographiques d'analyse des différentes lésions	88
6.3 Synthèse de HOCl	91
6.4 Chloration de l'ADN isolé.	91
6.5 Chloration de l'ADN cellulaire.	91

6 MATERIEL ET METHODES

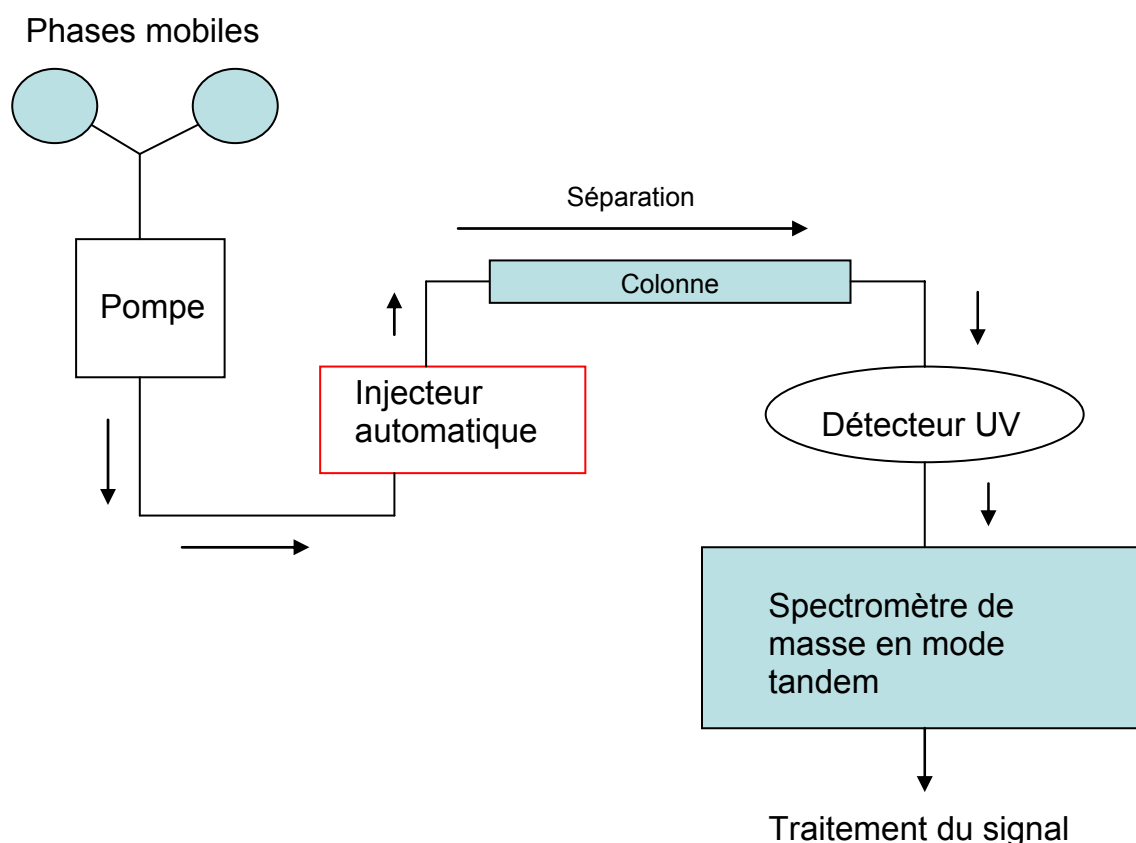
6.1 Matériel analytique de quantification des lésions

6.1.1 Descriptif de l'appareillage utilisé : la CLHP-SM/SM

La plus grande partie de ce travail de thèse a été réalisé à l'aide d'un appareillage de chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem : la CLHP-SM/SM. Après une description de cet outil analytique, la mise au point analytique du dosage des différentes lésions de l'ADN étudiées sera décrite.

La CLHP-SM/SM est composée de la partie chromatographique proprement dite permettant la séparation des produits à analyser couplée à deux détecteurs représentés par la cellule Ultraviolet-visible (UV) et le spectromètre de masse en mode tandem (SM/SM). Le type d'appareil utilisé est un API 3000 de la marque Applied Biosystems. La *figure 30* schématise l'ensemble de la CLHP-SM/SM.

Figure 30 : CLHP-SM/SM



6.1.1.1 La pompe de la CLHP

Il s'agit d'une pompe de type Hewlett Packard® (HP®) 1100 series. Les phases mobiles utilisées sont le formiate d'ammonium 5 mM et l'acétonitrile (Baker). La pompe nous permet

d'obtenir un gradient de phase permettant la séparation des différents nucléosides. Le débit de travail est de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$.

6.1.1.2 L'injecteur automatique

Cet injecteur automatique de type HP[®] 1100 series possède un portoir permettant d'injecter une centaine d'échantillons. Le portoir peut être thermostaté pour permettre une meilleure conservation des échantillons. Les volumes d'injection peuvent varier de moins de 0,1 μL à 1 mL selon le volume maximum de la boucle dont on dispose. Le grand intérêt de posséder un tel injecteur est de pouvoir automatiser les analyses.

6.1.2 La colonne de chromatographie

Différentes colonnes peuvent être utilisées et placées dans le four à colonne. Ce dernier permet de thermostatier le système pour ne pas influencer la séparation des produits selon la température régnant dans la pièce.

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé plusieurs types de colonnes à polarité de phase inversée. Pour les dosages dans l'urine, une colonne C18 Alltima 5 μ de 250 mm/2,1 mm de la marque Alltech[®] est utilisée tandis que les dosages dans les lymphocytes et cellules mononuclées et autres cellules sont réalisées à l'aide d'une colonne Lichrocart[®] RP 18e 3 μ de 125 mm/2 mm de la marque Merck[®]. Cette dernière colonne permet d'obtenir une meilleure séparation des différentes lésions pour les cellules en comparaison à la colonne Alltima.

6.1.3 Le détecteur ultra-violet (UV)-visible

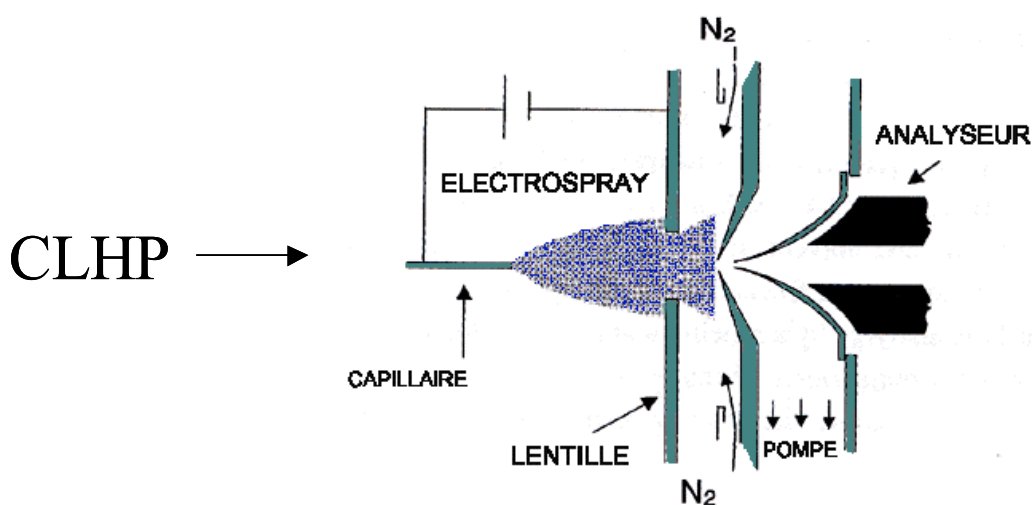
Le détecteur UV est de type HP 1100 series et permet le dosage des nucléosides normaux de l'ADN tandis que le spectromètre de masse détecte les lésions. La longueur d'onde de travail est habituellement de 260 nm et représente le maximum d'absorption des nucléosides.

6.1.4 Le spectromètre de masse en mode tandem (SM/SM)

6.1.4.1 La source d'ionisation

Les nucléosides séparés à l'aide de la colonne de chromatographie sont élués l'un après l'autre et atteignent la source d'ionisation. Celle-ci, de type electrospray (ESI) permet l'ionisation des molécules à pression atmosphérique au moyen d'un fort champ électrique. L'ionisation peut être de type positive (+H⁺) ou négative (-H⁺). La source d'ionisation de type electrospray est représentée en *figure 31*.

Figure 31 : Electrospray.

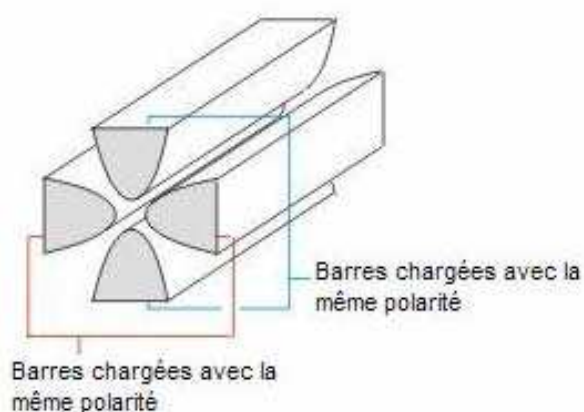


Le champ électrique est obtenu par une différence de potentiel de 3 à 5,5 kV appliquée entre le capillaire et la contre-électrode. Il s'ensuit une accumulation de charges à la surface du liquide qui va entraîner la rupture des gouttelettes hautement chargées. Les gouttelettes deviennent alors de plus en plus petites jusqu'à ce que le champ électrique à leur surface devienne suffisant pour provoquer une désorption des ions. Les ions produits sont porteurs d'un grand nombre de charges s'il existe plusieurs sites ionisables sur la molécule. De nombreux paramètres permettent d'optimiser l'ionisation.

6.1.4.2 Les quadripôles

Après la production des ions à l'aide de l'ESI, ils doivent être analysés selon leur rapport masse sur charge (m/z). Les analyseurs dont nous disposons sont de type quadripolaire. Dans son principe établi par Paul et Steinweger en 1953, le quadripôle utilise la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon leur rapport masse sur charge : m/z . Ils se présentent sous forme de 4 barres ayant une section hyperbolique (*figure 32*)

Figure 32 : Quadripôles

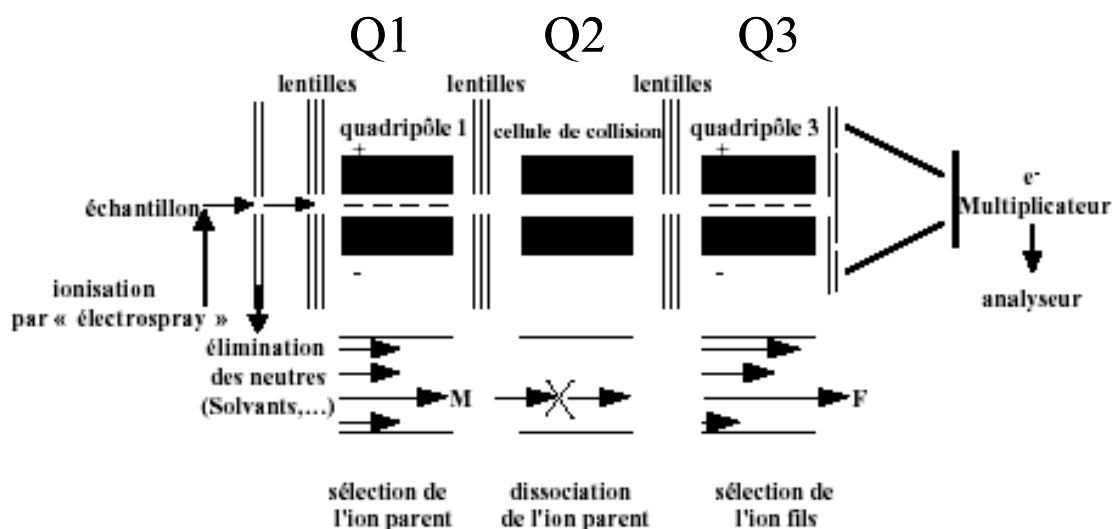


Un ion positif pénétrant entre les barres sera attiré vers une barre négative et si le potentiel change de signe avant qu'il se soit déchargé sur cette barre, il changera de direction. En fait, la trajectoire des ions est dirigée par l'influence du champ alternatif quadripolaire et du champ constant résultant de l'application de potentiels définis sur les barres.

La gamme de masse maximale qui peut être atteinte est de 3000 uma (unités de masse atomique). On travaille généralement en résolution unitaire c'est-à-dire que l'on sépare les ions qui diffèrent seulement d'une unité de masse. La vitesse de balayage d'un ion à l'autre étant très élevée, il est bien adapté aux couplages chromatographiques.

Le grand intérêt de posséder des quadripôles en série (*figure 33*) est de pouvoir disposer de l'obtention d'un spectre de masse résultant de la décomposition d'un ion sélectionné dans le premier analyseur. Dans notre cas, nous disposons de trois quadripôles en série (Q1, Q2 et Q3). L'on peut dire que Q1 et Q3 peuvent être considérés comme des filtres de masses et Q2 comme une cellule de collisions.

Figure 33 : Représentation de l'enchaînement des quadripôles



Après sélection de l'ion d'intérêt au niveau de Q1, dans le quadripôle central Q2 est introduit un gaz de collision à une pression suffisante pour que l'ion subisse les collisions. Les fragments obtenus seront alors analysés dans Q3.

Il existe de nombreux modes de balayage permettant d'obtenir différentes données concernant une molécule.

Le « Q1 scan » : Il permet d'obtenir les spectres de masse des molécules.

Le « daughter scan » : après sélection d'un ion en Q1, on fragmente en Q2 et on analyse tous les ions fils obtenus en Q3.

Le mode « parent scan » ou « précurseur » consiste à sélectionner un ion en Q3 et à balayer en masse avec Q1 : c'est le cas où l'on cherche à trouver tous les parents susceptibles du fils obtenu.

Le dernier mode permet de balayer en masse sur Q1 et Q3 mais en imposant entre les deux un décalage de masse. Tous les ions se fragmentant perdent une masse constante égale à la différence de masse entre les deux spectromètres. Ce mode est appelé perte de neutre ou « neutral loss scan ». Par exemple, tous les nucléosides sont susceptibles de perdre le 2-désoxyribose correspondant à une masse de 116 uma. Ainsi, si on choisit 116 comme différence de masse, on pourra analyser tous les nucléosides pouvant perdre leur sucre.

Pour utiliser le système en tant que détecteur, on peut choisir de travailler en mode SIM (« Single Ion Monitoring ») c'est-à-dire que seul le premier quadripôle est utilisé pour l'analyse ; ceci est l'équivalent d'un appareillage CLHP-SM simple. Le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) fait appel aux trois quadripôles, ce qui permet d'augmenter la sensibilité et surtout la spécificité du dosage. Dans son principe, Q1 permet de sélectionner l'ion qui nous intéresse, Q2 sert de cellule de collision pour le fragmenter et Q3 sélectionne le ou les ions fils de la molécule parent

ionisée en Q1. En effet, la sensibilité est meilleure en mode MRM puisque le bruit de fond est fortement diminué.

6.2 Mesure des lésions par CLHP-SM/SM

La quantification des lésions est réalisée par étalonnage interne avec ajout de standards internes enrichis isotopiquement, lorsque ces derniers sont disponibles. Lorsque nous ne disposons pas de ces étalons internes, un étalonnage externe est réalisé.

Voici les différents étalons internes utilisés au cours de cette thèse : la 8-oxodGuo M+5, la 8-oxoGuo M+5, la 8-oxoGua M+4, les Gly-Thd M+3, la 5-HMdUrd M +3, l'édGuo M+5, l'édAdo M+5, la HNE-dGuo M+5 et la dG-MGO M+5. La synthèse de ces standards a été majoritairement réalisée au laboratoire et sont pour la plupart enrichis en isotopes ^{15}N ou ^{13}C .

6.2.1 Etalonnage par standardisation interne

Lorsque nous disposons du standard interne (désigné SI), ce dernier est ajouté à l'échantillon avant son prétraitement. La quantité est choisie au départ afin de se retrouver avec un signal de détection en SM/SM proche des valeurs de la lésion à détecter.

Lors du traitement des données, le calcul suivant nous permet de déterminer la quantité de la lésion en fonction de la quantité du SI par la relation suivante :

(Aire du SI/Aire de l'échantillon) = (quantité du SI/quantité de l'échantillon) soit :

Quantité de lésion = (Aire du SI/Aire de l'échantillon)/quantité du SI

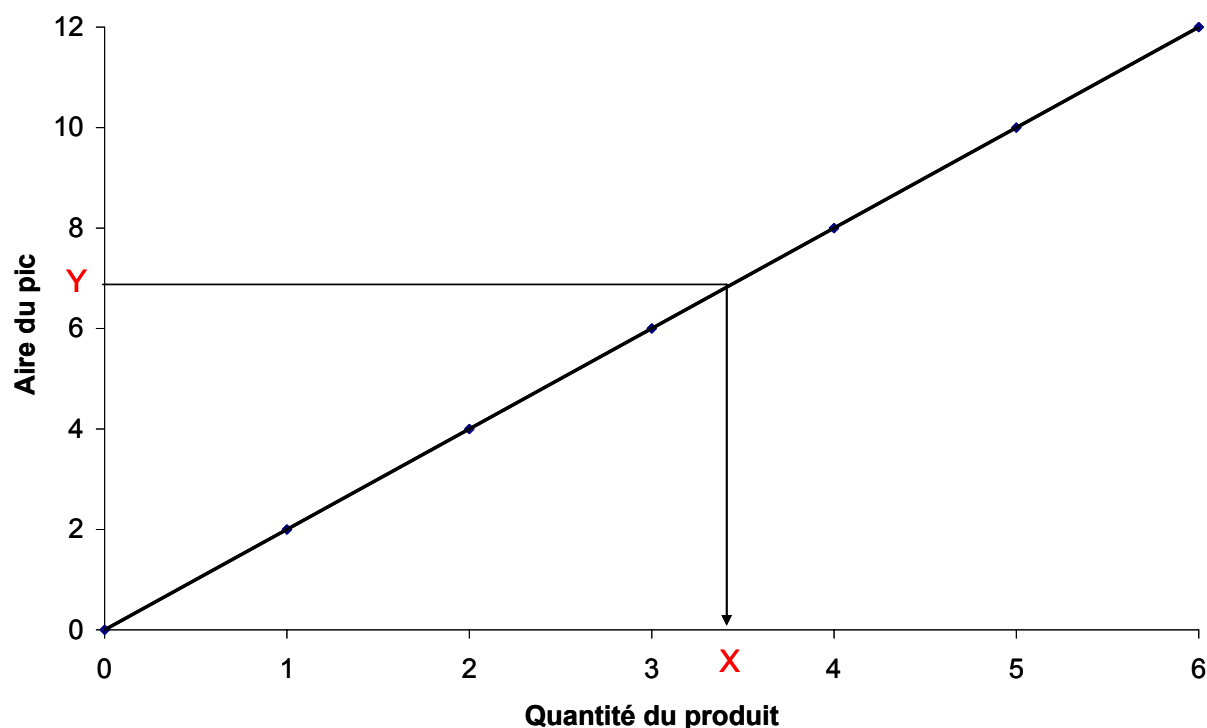
L'ajout du SI avant tout prétraitement permet ainsi de s'affranchir de la perte éventuelle d'une petite quantité de l'échantillon, qui sera la même que pour le SI.

6.2.2 Etalonnage par standardisation externe

Dans le cas où l'on ne disposerait pas du SI (cas des lésions chlorées par exemple), on réalise généralement une gamme de concentration croissante pour lesquels on détermine les aires sous les pics obtenus. La droite de calibration des aires des pics obtenue en fonction de la quantité de la lésion est réalisée à chaque série d'analyse.

L'aire du pic **Y** est alors reportée sur cette droite pour déterminer la quantité **X** de lésion de l'échantillon (*figure 34*).

Figure 34 : Droite de calibration de l'étalonnage externe



6.2.3 Conditions chromatographiques d'analyse des différentes lésions

Les phases mobiles de la CLHP sont : l'acétonitrile (AcN) et le formiate d'ammonium (FA) à 5 mM. La colonne chromatographique utilisée est une C₁₈ en phase inverse de type Lichrocart[®] RP 18e 3 μ de 125 mm/2 mm de la marque Merck[®]. Le débit de travail utilisé est de 200 μ L/min. Cette colonne a servi pour toutes les analyses dans les différents milieux biologiques sauf pour les analyses des urines pour lesquelles nous avons pris une C₁₈ en phase inverse de type Alltima C₁₈ 5 μ de 250 mm/2,1 mm de la marque Alltech[®]. D'autre part, l'analyse des lésions de l'ARN a été réalisée sur une colonne C₁₈ en phase inverse de type uptisphère 3 μ de 150 mm/2 mm de la marque Interchim[®]. Six conditions chromatographiques différentes ont été utilisées selon le groupe de lésions séparées :

Conditions A :

Gradient de 0 à 30 min : 13 % AcN et 87 % FA.

De 31 à 50 min : 100% FA.

Conditions B :

Gradient de 0 à 25 min : 25 % AcN et 75 % FA.

De 25,1 à 30 min : 50 % AcN.

De 31 à 50 min : 100% FA.

Conditions C :

Gradient de 0 à 30 min : 20 % AcN et 80 % FA.

De 31 à 45 min : 100% FA.

Conditions D :

Gradient de 0 à 28 min : 37,3 % AcN et 62,7 % FA.

De 28,1 à 50 min : 100% FA.

Conditions E :

Gradient de 0 à 24 min : 16 % AcN et 84 % FA.

Conditions F :

Gradient de 0 à 20 min : 15 % AcN et 85 % FA.

Les conditions chromatographiques des différentes lésions sont regroupées dans le tableau suivant :

Lésion	Conditions chromatographiques
Gly-Thd Gly-Thd M+3	Conditions A
5-HmdUrd 5-HmdUrd M+3	Conditions A
8-oxodGuo 8-oxodGuo M+5	Conditions A ou F
8-oxoGuo 8-oxoGuo M+4	Conditions A ou F
8-oxoGua 8-oxoGua M+4	Conditions A
8-oxodAdo	Conditions A
5-ClcCyd	Conditions B
8-ClcGuo	Conditions B
8-ClcAdo	Conditions B
5-ClcCyd	Conditions C
8-ClcGuo	Conditions C
8-ClcAdo	Conditions C
ϵ dGuo ϵ dGuo M+5	Conditions D
ϵ dAdo ϵ dAdo M+5	Conditions D
M1dGuo	Conditions D

HNE-dGuo HNE-dGuo M+5	Conditions D
dGMGO red dGMGO red M+5	Conditions E

Les caractéristiques des différentes lésions et de leurs standards internes sont regroupées dans le tableau suivant :

Bases, ribonucléosides, 2'- désoxyribonucléosides modifiés et standards internes	Masse molaire (uma)	Ionisation	Transitions étudiées
Gly-Thd	276	négative	275→116
Gly-Thd M+3	279	négative	278→118
5-HMdUrd	258	négative	257→124
5-HMdUrd M+3	261	négative	260→126
8-oxodGuo	283	positive	284→168
8-oxodGuo M+5	288	positive	289→173
8-oxoGuo	299	positive	300→168
8-oxoGuo M+4	303	positive	304→172
8-oxoGua	150	positive	151→112
8-oxoGua M+4	154	positive	155→116
8-oxodAdo	267	positive	268→152
5-Cl dCyd	261	positive	262→146
8-Cl dGuo	301	positive	302→186
8-Cl dAdo	285	positive	286→170
5-Cl dCyd	277	positive	278→146
8-Cl dGuo	317	positive	318→186
8-Cl dAdo	301	positive	302→170
εdGuo	291	positive	292→176
εdGuo M+5	296	positive	297→181
εdAdo	275	positive	276→160
εdAdo M+5	280	positive	281→165
M1 dGuo	303	positive	304→188

HNE-dGuo	423	positive	424→308
HNE-dGuo M+5	428	positive	429→313
dGMGO red	325	positive	326→210
dGMGO red M+5		positive	331→215

6.3 Synthèse de HOCl

Le HOCl ($\epsilon = 350 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 293 nm à pH 11) est préparé de la façon suivante : Un volume de 100 mL de NaOCl a été ajouté à 100 mL d'acétate d'éthyle, ce mélange est acidifié sous agitation par de l'acide orthophosphorique (H_3PO_4) jusqu'à ce que le pH soit de 5. On laisse alors décanter la solution organique devenue jaune. Deux lavages successifs avec 100 mL d' H_2O de cette phase organique sont réalisés. Enfin, l'ajout de 100 mL de NaOH 1N permet d'obtenir la solution de HOCl. Cette dernière est dégazée afin d'éliminer l'acétate d'éthyle résiduel. La solution de HOCl est calibrée (par rapport à une solution de NaOH 1N) avant chaque utilisation pour en vérifier la concentration de part son instabilité au cours du temps.

6.4 Chloration de l'ADN isolé

Une solution d'ADN à 1 mg/mL a été traitée par différentes concentrations de HOCl pendant 15 minutes. L'ADN est alors précipité avec de l'éthanol à 100 % à froid pour éliminer le HOCl en excès, lavé avec de l'éthanol à 70% puis repris dans de l' H_2O . Enfin, sa digestion enzymatique puis son analyse en CLHP-SM/SM a permis de quantifier les lésions chlorées formées. Les résultats sont exprimés en nombre de lésions par millions de nucléosides normaux.

6.5 Chloration de l'ADN cellulaire.

La lignée cellulaire utilisée est la SKM1 (lignée myéloïde). Chaque traitement a été réalisé sur une quantité de 10 millions de cellules traitées par un mélange HOCl/HBSS (de concentration fixée) préparée extemporanément. L'incubation s'est déroulée pendant 10 minutes à $+37^\circ\text{C}$ et l'ajout de N-acétylcystéine (NAC) a permis de stopper la réaction. En effet, comme la NAC possède des groupements thiols, elle capte les $\bullet\text{OH}$ de HOCl. Après deux lavages successifs, l'utilisation de kits commerciaux (Qiagen[®]) a permis d'extraire l'ADN nucléaire et l'ARN cytoplasmique. Seules les

étapes de digestion enzymatique et d'analyse CLHP-SM/SM ont été faites au sein de notre laboratoire.

RESULTATS

7 RESULTATS	95
7.1 Mise au point analytique du dosage des lésions	95
7.1.1 Les lésions oxydatives de l'ADN : 2'-désoxyribonucléosides.	97
7.1.2 Les lésions de la peroxydation lipidique	98
7.1.3 Les lésions de la réaction avec les ERNs	99
7.1.4 Les lésions chlorées de l'ADN et de l'ARN.	99
7.1.5 Limite de quantification des différentes lésions	100
7.1.6 Expression des résultats dans les fluides biologiques circulants ou les cellules	101
7.1.7 Mise en évidence de la formation des lésions chlorées	102
7.1.7.1 Traitement d'ADN isolé par le HOCl	102
7.1.7.2 Formation cellulaire des (2'-désoxy)ribonucléosides chlorés	103
7.1.7.3 Influence de la nicotine sur la formation cellulaire des (2'-désoxy)ribonucléosides chlorés	105
7.1.7.4 Essai de réparation des lésions chlorées	108
7.2 Optimisation des dosages dans les fluides biologiques	110
7.2.1 Préparation des échantillons de fluides biologiques étudiés	110
7.2.2 Echantillons d'urine humaine	110
7.2.3 Echantillons de plasma	112
7.2.4 Echantillons de LCR	113
7.2.5 Lymphocytes et cellules mononuclées	114
7.2.5.1 Différentes méthodes de séparation des cellules à partir du sang total	114
7.2.5.2 Méthode d'extraction d'ADN à partir des cellules isolées	115
7.2.5.3 Digestion enzymatique des acides nucléiques	115
7.2.5.4 Comparaison CPT-Ficoll	116
7.2.5.5 Comparaison CPT-« NH ₄ Cl »	118
7.2.5.6 Comparaison CPT-« PAXgene »	119
7.2.5.7 Raisons du choix des CPT et étude de répétabilité de la méthode CPT.	120
7.2.6 Les lésions oxydatives de l'ARN	121
7.2.6.1 Optimisation de l'extraction simultanée d'ADN et d'ARN cellulaire.	123
7.2.6.1.1 Irradiation de cellules THP1.	123
7.2.7 L'adduit de la dGuo avec le MGO : le dGMGO	125
7.2.7.1 Synthèse de l'adduit et de son standard interne	125
7.2.7.2 .Cellules traitées avec du MGO et optimisation de son extraction	126
7.3 Les lésions mesurées dans la pathologie du diabète	128
7.3.1 Etude préliminaire	129
7.3.2 Etude randomisée, diabétiques de type II	131
7.3.2.1 Lésions de l'ADN mesurées dans les leucocytes circulants.	132
7.3.2.2 Lésions de l'ADN mesurées dans les urines	135
7.4 Les lésions mesurées dans l'étude des cancers traités par radiothérapie	136
7.4.1 Objectifs de l'étude	136
7.4.2 Lésions de l'ADN mesurées dans les cellules	137
7.4.3 Lésions de l'ADN mesurées dans l'urine	140
7.5 Les lésions mesurées dans l'étude SUVIMAX	140
7.5.1 Etude des lésions	141
7.6 Les lésions mesurées dans le cas des infertilités masculines	145
7.6.1 Taux des lésions dans l'ADN des spermatozoïdes	146

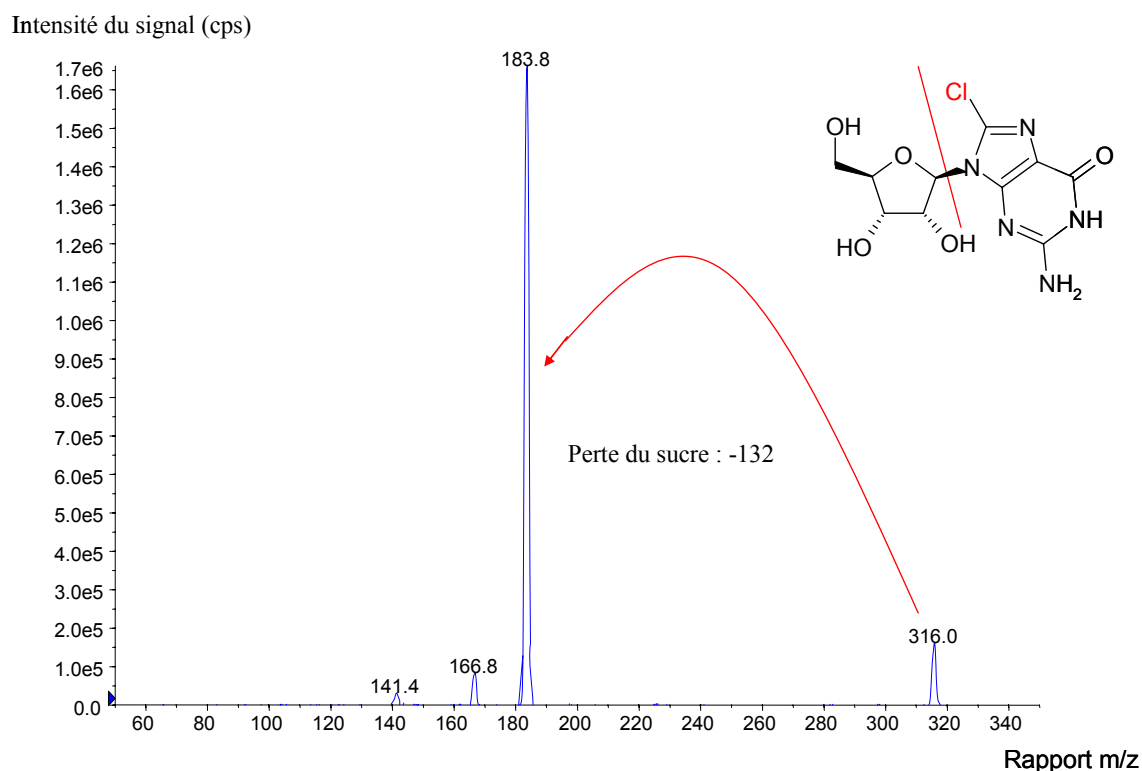
7 RESULTATS

7.1 Mise au point analytique du dosage des lésions

Les premières étapes de la mise au point du dosage des lésions concernent l'optimisation des paramètres d'ionisation de la molécule en infusant directement dans la source d'ionisation une solution de concentration connue (en général μM). Il s'agit de tester si l'ionisation donne un meilleur signal soit en mode positif soit en mode négatif. Cette optimisation est effectuée pour chaque molécule étudiée.

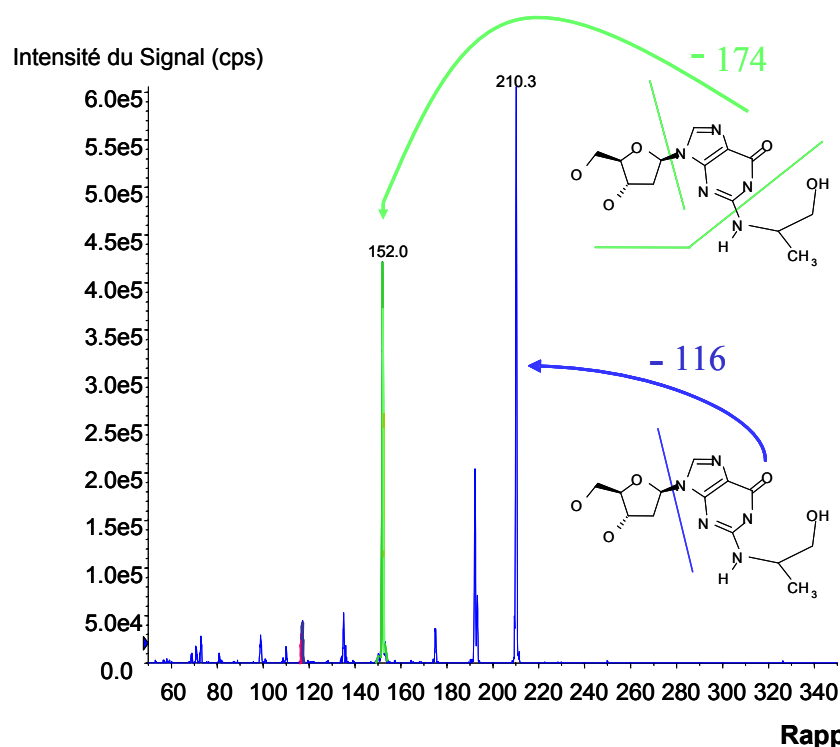
Cette étape permet également l'obtention d'un spectre de masse de fragmentation comme celui de la 8-ClGuo présenté dans la *figure 35*. Ce spectre est caractéristique de chaque lésion et peut mettre en évidence plusieurs fragments. Par exemple, dans le cas de la 8-ClGuo, la perte du ribose lors de la fragmentation nous permet d'utiliser la transition 316 \rightarrow 184 pour détecter spécifiquement cette lésion.

Figure 35 : Spectre de masse de la 8-ClGuo (ionisation en mode négatif)



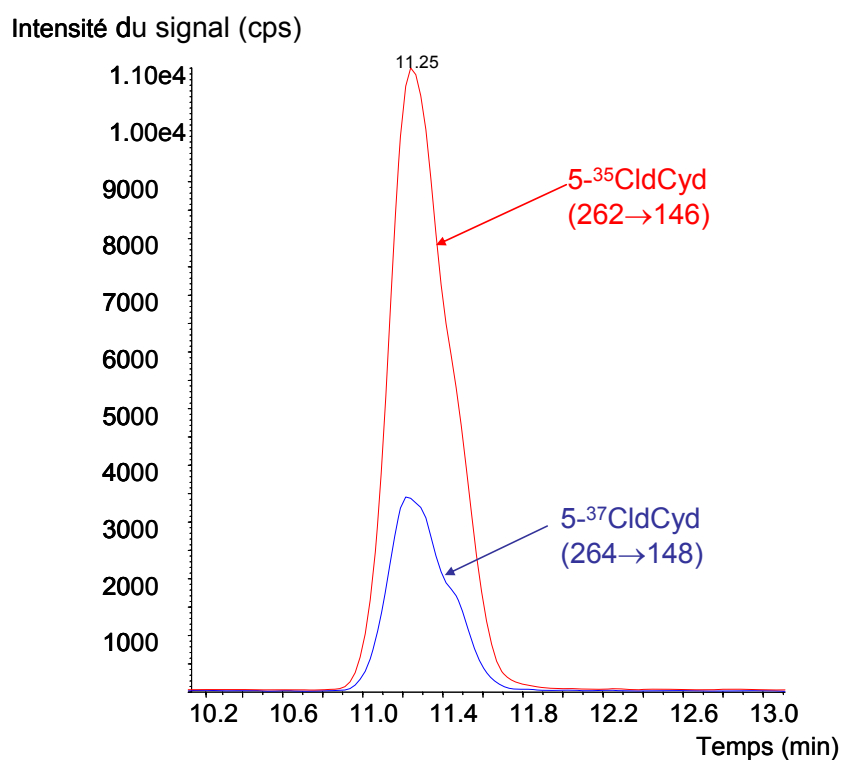
Pour d'autres molécules comme par exemple le dGMGO red (*figure 36*), deux fragments (m/z de 210,3 et de 152,0) présentent une intensité de signal importante et serviront simultanément pour la détection de cette lésion. L'intérêt de disposer de plusieurs transitions pour une seule lésion est de renforcer la spécificité de la détection.

Figure 36 : Spectre de masse de la dGMGO red (ionisation en mode positif)



Dans le cas précis des lésions chlorées, un avantage supplémentaire de spécificité s'offre à nous étant donné que l'atome de Cl existe sous deux formes isotopiques, à savoir le ^{35}Cl et le ^{37}Cl . Comme l'on peut le constater sur le chromatogramme de la *figure 37*, les deux pics correspondant à la 5-CldCyd présentent une intensité relative de 1 et 3 respectivement pour le ^{37}Cl et le ^{35}Cl . Les deux transitions utilisées pour détecter la 5-CldCyd sont $264 \rightarrow 148$ et $262 \rightarrow 146$.

Figure 37 : Chromatogramme représentant les deux transitions utilisées pour détecter la 5-CldCyd



Une fois que cette étape est réalisée, le mode FIA (« Flow Injection Analysis ») permet d'optimiser l'ionisation dans les conditions proches de la détection, c'est-à-dire dans les conditions analytiques, mais sans colonne chromatographique. La lésion de concentration connue est prélevée par l'injecteur automatique et le logiciel nous permet d'optimiser d'autres paramètres comme la température, le gaz turbo de l'ionisation par exemple.

Enfin, l'injection de la molécule sur la colonne chromatographique nous permet de déterminer cette fois-ci les conditions chromatographiques (temps de rétention, gradient d'acétonitrile à utiliser pour améliorer la séparation, température du four à colonne, etc...).

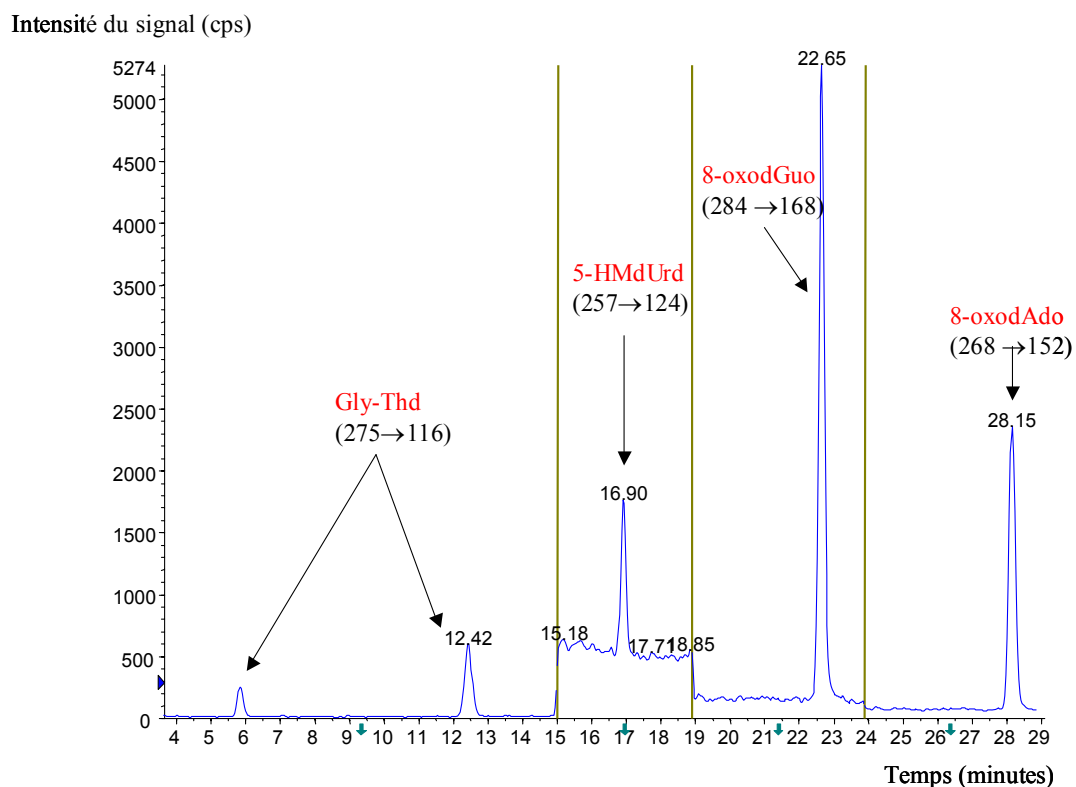
Le travail de mise au point précédemment décrit est réalisé sur chaque lésion individuellement, une méthode analytique de dosage est créée pour doser simultanément plusieurs lésions. Chaque méthode comporte des périodes d'analyse permettant la détection d'un ou de plusieurs produits par période. Dans l'exemple de la figure 38, on peut remarquer que 4 lésions distinctes sont détectées au cours d'une même analyse (injection de 0,5 pmol de chaque standard).

7.1.1 Les lésions oxydatives de l'ADN : 2'-désoxyribonucléosides.

Les différentes lésions oxydatives qui ont été étudiées simultanément sont les suivantes :

- Pour les 2'-désoxyribonucléosides : les **glycols de thymidine (Gly-Thd)** (4 diastéréoisomères), **la 5-HMdUrd**, **la 8-oxodGuo**, et **la 8-oxodAdo** (figure 38).

Figure 38 : Chromatogramme de 4 lésions oxydatives (0,5pmol injecté par standard)

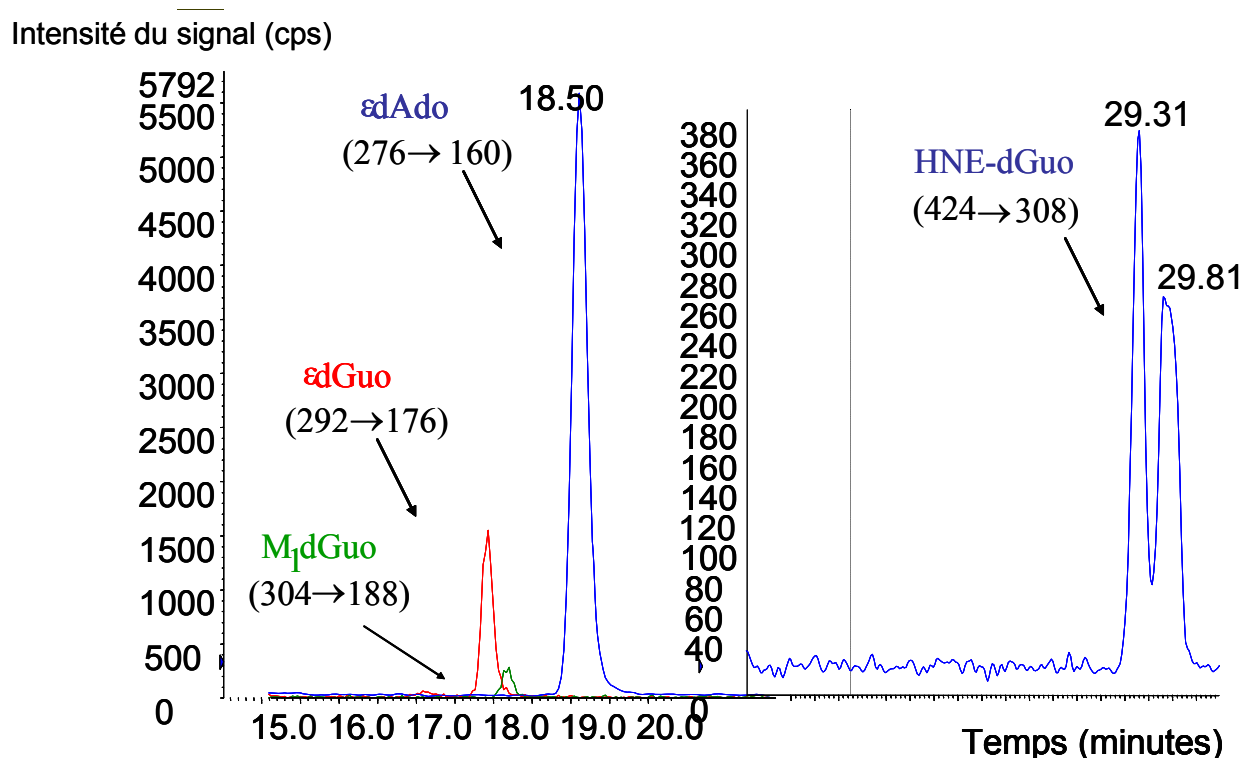


L'optimisation de l'analyse simultanée de ces lésions oxydatives a été réalisée assez rapidement. En effet, comme nous disposions de toutes ces molécules, il suffisait de trouver les bonnes conditions chromatographiques. Comme l'on peut le voir sur ce chromatogramme, 4 périodes correspondent à l'analyse des 4 lésions étudiées. Chaque période est optimisée pour détecter au mieux chaque lésion (les limites de quantification obtenues pour ces différentes lésions sont reportées dans le tableau de la *figure 41*, voir page 101 du manuscrit).

7.1.2 Les lésions de la peroxydation lipidique

Les 4 principaux 2'-désoxyribonucléosides susceptibles d'être en relation avec les phénomènes de peroxydation lipidique qui ont été étudiés sont les suivants : l'**8dGuo**, le **M₁dGuo**, l'**8dAdo** et le **HNE-dGuo** (4 diastéréoisomères) (*figure 39*).

Figure 39 : Chromatogramme des 4 lésions en relation avec la peroxydation lipidique (25 fmol injecté par standard)



Dans ce cas, comme les trois premières lésions ont un temps de rétention très proche, la méthode ne comporte que deux périodes. Le M₁dGuo, l'édGuo et l'édAdo sont tous trois détectés dans la même période. La mise au point du dosage de ces lésions ainsi que la synthèse des standards internes ont été réalisés au LAN par le Dr Thierry Douki [61] (les limites de quantification obtenues pour ces différentes lésions sont reportées dans le tableau de la *figure 41*, page 101 du manuscrit).

7.1.3 Les lésions de la réaction avec les ERNs

Afin de pouvoir étudier les lésions dues au stress généré par les ERNs, un travail de synthèse de la dGuo-HOONO a été initié au cours de cette thèse selon le protocole décrit dans la littérature [38]. Cette synthèse a consisté à faire réagir une solution de dGuo (2mM) avec une solution de ONOO⁻ préalablement préparée de la façon suivante : le NaNO₂ (nitrite de sodium) a réagit avec du H₂O₂ dans un bain de glace et l'ajout d'une solution de HCl puis de NaOH a permis d'obtenir une solution de couleur jaune caractéristique du ONOO⁻.

Le brut de synthèse de la réaction de la dGuo avec le ONOO⁻ a ensuite été analysé en CLHP couplé à un détecteur de type barette de diodes pour séparer les produits de la réaction. Une analyse en masse par trappe d'ions a été envisagée pour confirmation de la masse du dGuo-HOONO. Le travail de synthèse a été répétée afin d'obtenir une quantité suffisante de produit permettant de réaliser successivement un spectre UV puis une analyse en RMN.

Le spectre obtenu en RMN n'a pas permis de confirmer la structure attendue de la dGuo-HOONO. En fait, nous avons obtenu un des produits isolés par l'équipe de Tannenbaum et collaborateurs [8] désigné comme étant la 5-nitro-4-guanidinohydantoine (NI) de masse molaire 286 g.mol⁻¹. Ceci remet en question les travaux réalisés précédemment sur la caractérisation de la dGuo-HOONO. De plus, la méthode de dosage mise au point en CLHP-SM/SM manque de sensibilité pour la détection de la NI.

7.1.4 Les lésions chlorées de l'ADN et de l'ARN.

La plus grande partie du travail analytique de ce travail de thèse a été consacrée à la mise au point du dosage des lésions chlorées de l'ADN et de l'ARN.

Les différents (2'-désoxy)ribonucléosides chlorés qui ont été étudiés sont les suivants : **la 5-Cl(d)Cyd**, **la 8-Cl(d)Guo** et **la 8-Cl(d)Ado** et leurs bases correspondantes : **la 5-ClCyt**, **la 8-ClGua** et **la 8-ClAde**.

Dans un premier temps, l'encadrement d'une stagiaire en IUT, M^{elle} Céline Durand, a permis la réalisation des solutions calibrées des différentes lésions étudiées. La plupart de ces molécules sont commerciales (Biolog[®]) et leur coefficient d'extinction molaire est connu (*figure 40*).

Figure 40 : Caractéristiques des (2'-désoxy)ribonucléosides chlorés et de leurs bases correspondantes

Nom de la lésion	Coefficient d'extinction molaire : ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)	Longueur d'onde d'absorbance maximum
5-CldCyd	10000	286 nm à pH 7
8-CldGuo	15000	258 nm à pH 7
8-CldAdo	17000	262 nm à pH 7
5-ClCyd	10000	274 nm à pH 7
8-ClGuo	15000	258 nm à pH 7
8-ClAdo	17000	262 nm à pH 7
5-ClCyt	10000	286 nm à pH 7
8-ClGua	15000	258 nm à pH 7
8-ClAde	17000	268 nm à pH 7

Il est à noter que pour les lésions qui ne sont pas commerciales, la synthèse a été réalisée au laboratoire (**Annexe 3**), en collaboration avec l'équipe du Dr M. Masuda [12] (IARC : « International Agency for Research on Cancer », Lyon, France). Ainsi, ont été obtenues la 5-CldCyd, et la 5-ClCyt par chloration respectivement de la dCyd et de la Cyt. D'autre part, l'hydrolyse acide de la 5-CldCyd permet de donner également la 5-ClCyt. En ce qui concerne les standards internes, seule la 5-ClCyt M+3 a été synthétisée à partir de Cyt M+3.

Ensuite, la mise au point des méthodes de dosage des lésions chlorées en CLHP-SM/SM a été réalisée (les limites de quantification obtenues pour ces différentes lésions sont reportées dans le tableau de la *figure 41*, , page 101 du manuscrit). Ce travail a d'ailleurs donné lieu à une publication [189].

7.1.5 Limite de quantification des différentes lésions

Ainsi, il a été établi une limite de quantification pour chacune des lésions étudiées qui sont présentées dans le tableau de la *figure 41*.

Figure 41 : Limite de quantification des lésions étudiées

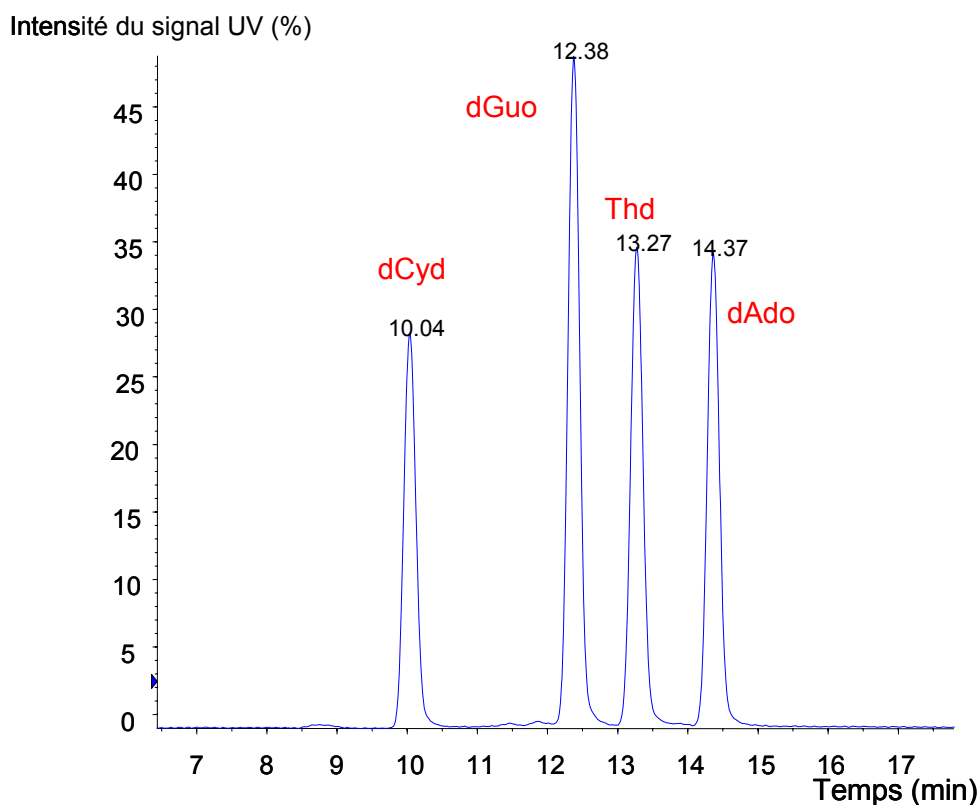
Lésions étudiées	Quantité pour S/N >10
Gly-Thd	80 fmol
5-HmdUrd	80 fmol
8-oxodGuo	20 fmol
8-oxoGuo	17 fmol
8-oxoGua	400 fmol
8-oxodAdo	100 fmol
5-CldCyd	5 fmol
8-CldGuo	25 fmol
8-CldAdo	2 fmol
5-CICyd	5 fmol
8-CIGuo	15 fmol
8-CIAdo	2 fmol
ϵ dGuo	3 fmol
ϵ dAdo	2,5 fmol
M1dGuo	30 fmol
HNE-dGuo	12 fmol
dGMGO red	50 fmol

Ces limites sont très basses puisqu'il est possible de détecter des quantités de l'ordre de la fmol (soit 10^{-15} mol). Avec une limite de quantification de 20 fmol comme pour la 8-oxodGuo et une quantité de 50 μ g d'ADN, nous pouvons théoriquement doser 0,2 lésions par million de nucléosides normaux.

7.1.6 Expression des résultats dans les fluides biologiques circulants ou les cellules

Les résultats ne seront pas présentés de la même manière suivant qu'il s'agisse de fluides biologiques circulants ou de cellules. Ainsi, dans l'urine, le plasma ou le LCR, les taux des lésions sont rapportés en concentration. De plus, lorsque cette donnée est disponible, la quantité des lésions urinaire est exprimée en rapport avec la créatinine urinaire, c'est-à-dire en nmol de lésions par mmol de créatinine. Pour l'ADN des lymphocytes et cellules mononuclées et des spermatozoïdes, les résultats sont donnés en nombre de lésions par million de nucléosides normaux. Le détecteur UV permet la quantification des nucléosides normaux de l'ADN (figure 42) et/ou de l'ARN en utilisant une calibration externe.

Figure 42 : Chromatogramme UV des nucléosides normaux de l'ADN (5 nmol dCyd, 7,4 nmol dGuo, 5,6 nmol Thd et 4,6 nmol de dAdo injectés)



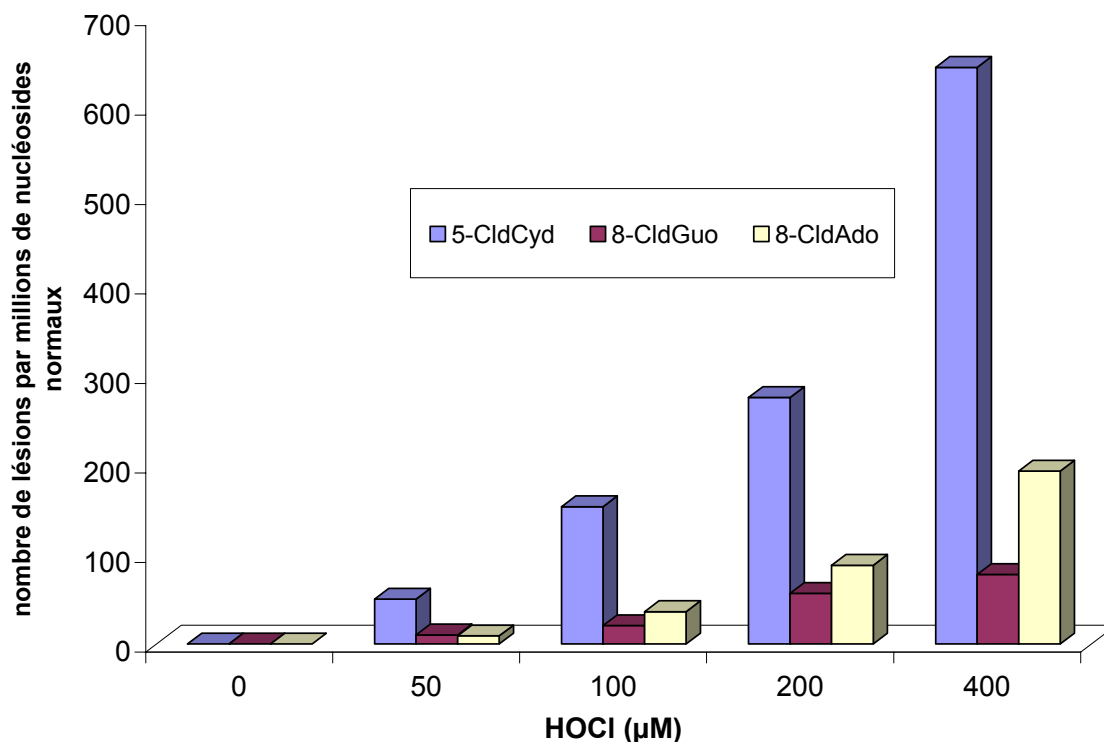
7.1.7 Mise en évidence de la formation des lésions chlorées

7.1.7.1 Traitement d'ADN isolé par le HOCl

Afin de savoir si la génération des lésions chlorées au sein de l'ADN est possible, ce dernier a été traité par une solution de HOCl (sa préparation a été détaillée dans la partie matériel et méthodes).

Cette expérience a permis de mettre en évidence qu'il se forme majoritairement de la 5-CldCyd puis la 8-CldAdo et enfin la 5-CldGuo (*figure 43*). Cette formation des lésions chlorées est proportionnelle à la concentration de HOCl appliquée.

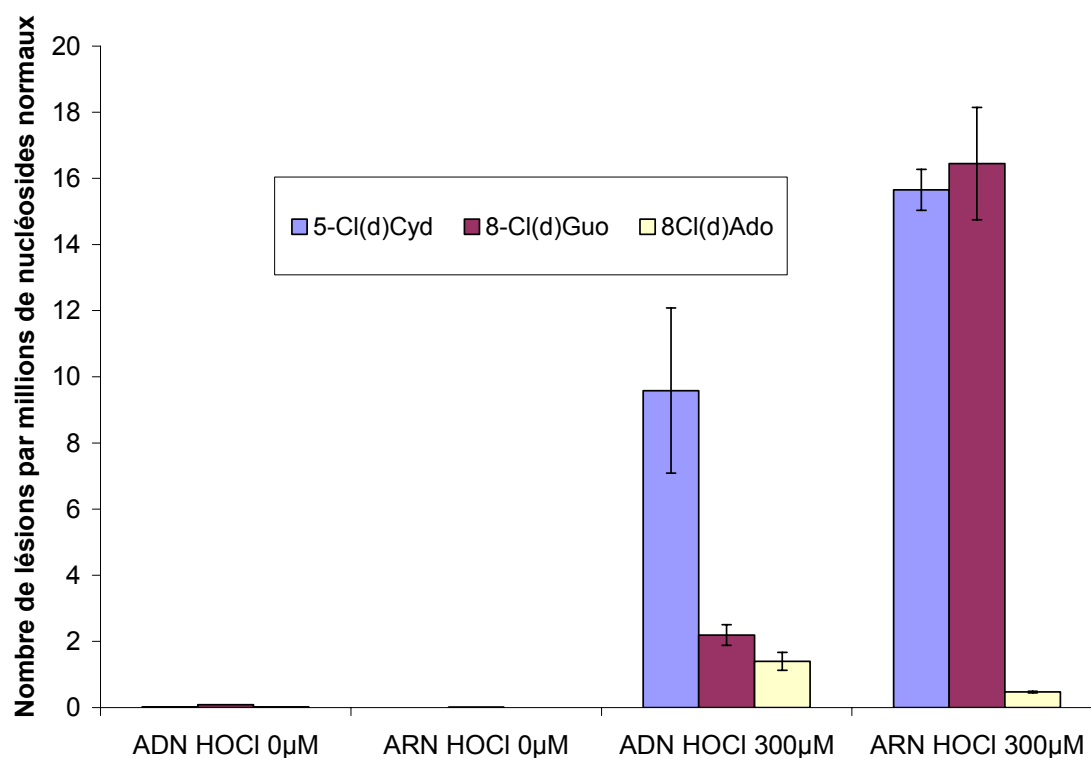
Figure 43 : Formation des 2'-désoxyribonucléosides chlorés de l'ADN isolé.



7.1.7.2 Formation cellulaire des (2'-désoxy)ribonucléosides chlorés

La collaboration avec l'équipe du Dr M. Masuda nous a permis de mettre en évidence la formation des (2'-désoxy)ribonucléosides chlorés dans l'ADN et l'ARN cytoplasmique par traitement avec HOCl de cellules SKM1 en culture. La *figure 44* représente la formation cellulaire de ces (2'-désoxy)ribonucléosides chlorés. Ici, nous avons choisi de ne représenter que la concentration de 300 μM de HOCl. Il est à remarquer que la formation majoritaire dans l'ADN concerne la 5-CldCyd, tandis que la 8-CldGuo semble se former d'avantage dans l'ARN cytoplasmique. Chaque point de l'expérience a été réalisé en triplicat.

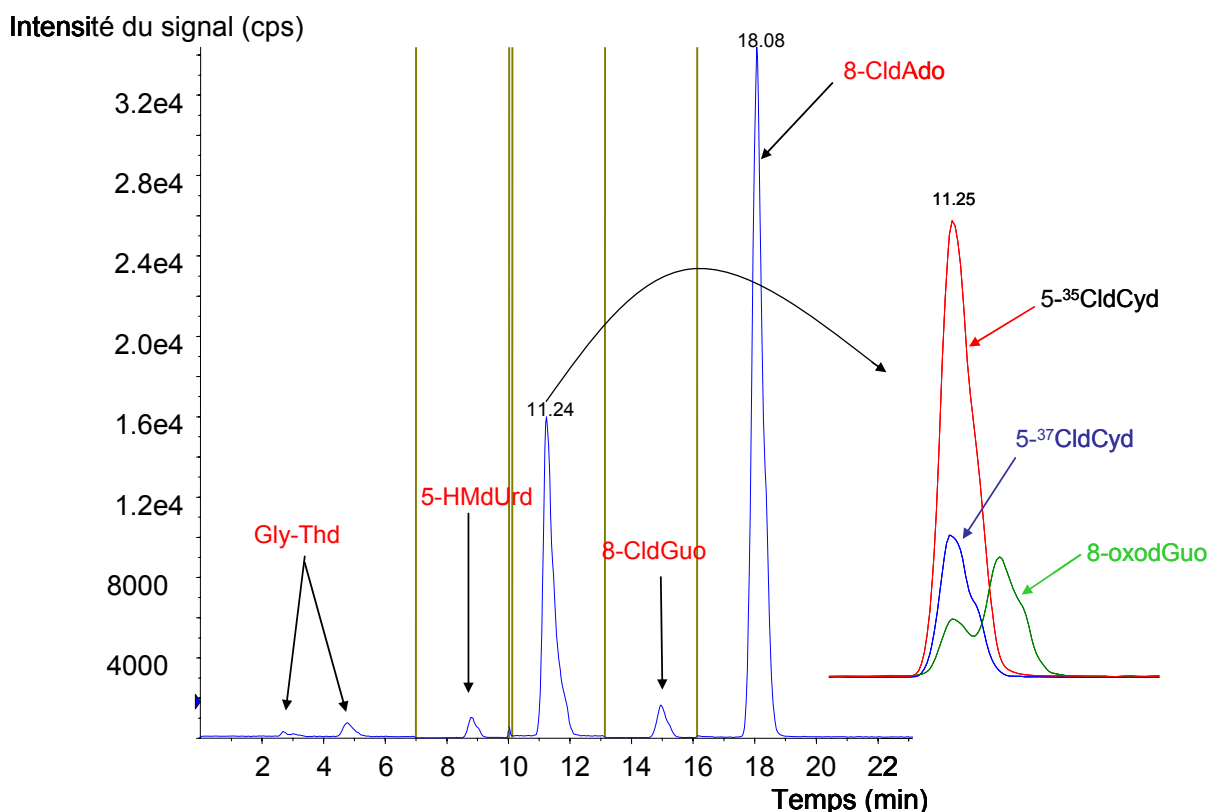
Figure 44 : Formation cellulaire des (2'-désoxy)ribonucléosides chlorés pour une concentration de 300 μ M de HOCl



Comme on peut le constater sur cet histogramme, le taux des lésions varie de 2 à 16/millions de nucléosides normaux, soit environ 10 fois moins que celui obtenu lors de l'exposition d'ADN isolé aux mêmes concentrations de HOCl (de 50 à 400 μ M).

Afin de pouvoir détecter les lésions oxydatives et chlorées au cours de la même analyse, une méthode a été optimisée en ce sens. La *figure 45* donne l'exemple d'un chromatogramme d'un standard comportant les différentes lésions oxydées et chlorées détectées simultanément.

Figure 45 : Chromatogramme d'une solution standard de lésions oxydatives et chlorées (0,5 pmol injecté)



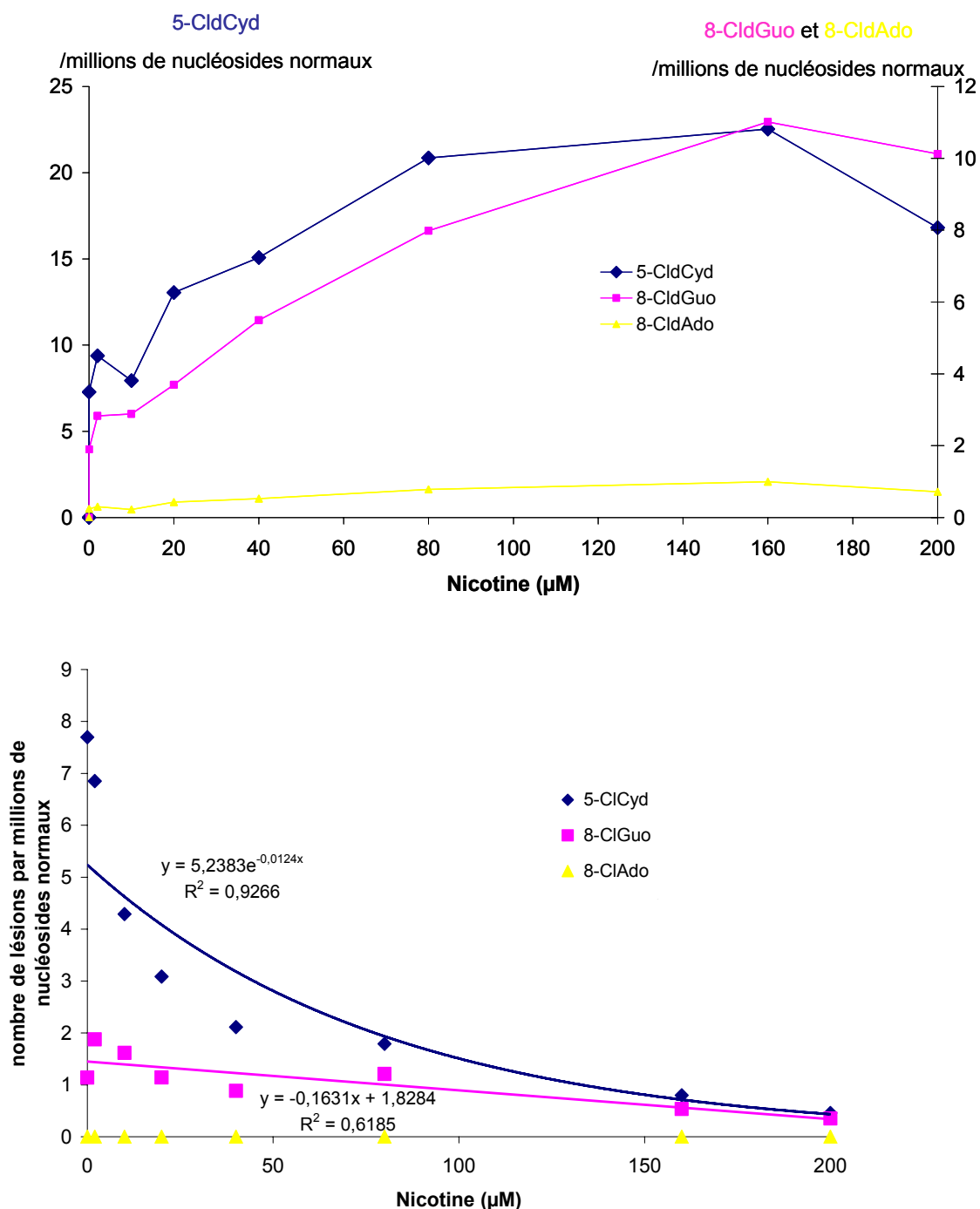
Comme l'on peut le voir sur le chromatogramme, une des périodes comporte l'analyse simultanée de la 8-oxodGuo et de la 5-ClCyd dont les temps de rétention sont très proches, tandis que les autres périodes ne comportent qu'une lésion.

7.1.7.3 Influence de la nicotine sur la formation cellulaire des (2'-désoxy)ribonucléosides chlorés

Dans le cas de sujets fumeurs, il est observée une inflammation importante de la muqueuse pulmonaire. C'est pourquoi nous avons souhaité évaluer l'effet de la nicotine sur la génération des (2'-désoxy)ribonucléosides chlorés en présence de HOCl. Pour ce faire, les cellules SKM1 ont été soumises à des concentrations fixes de HOCl en plus de concentrations croissantes de nicotine.

Dans un premier temps, seul l'effet de la nicotine a été évalué, sur des cellules non traitées puis avec une gamme de concentration croissante de nicotine allant de 0 à 200µM sur des cellules traitées avec du HOCl 200µM. La *figure 46* représente le nombre de lésions par millions de nucléosides normaux formées par l'action de la nicotine sur des cellules traitées par une concentration fixe de HOCl.

Figure 46 : Effet de la nicotine sur la formation des (2'-désoxy)ribonucléosides chlorés dans la cellule



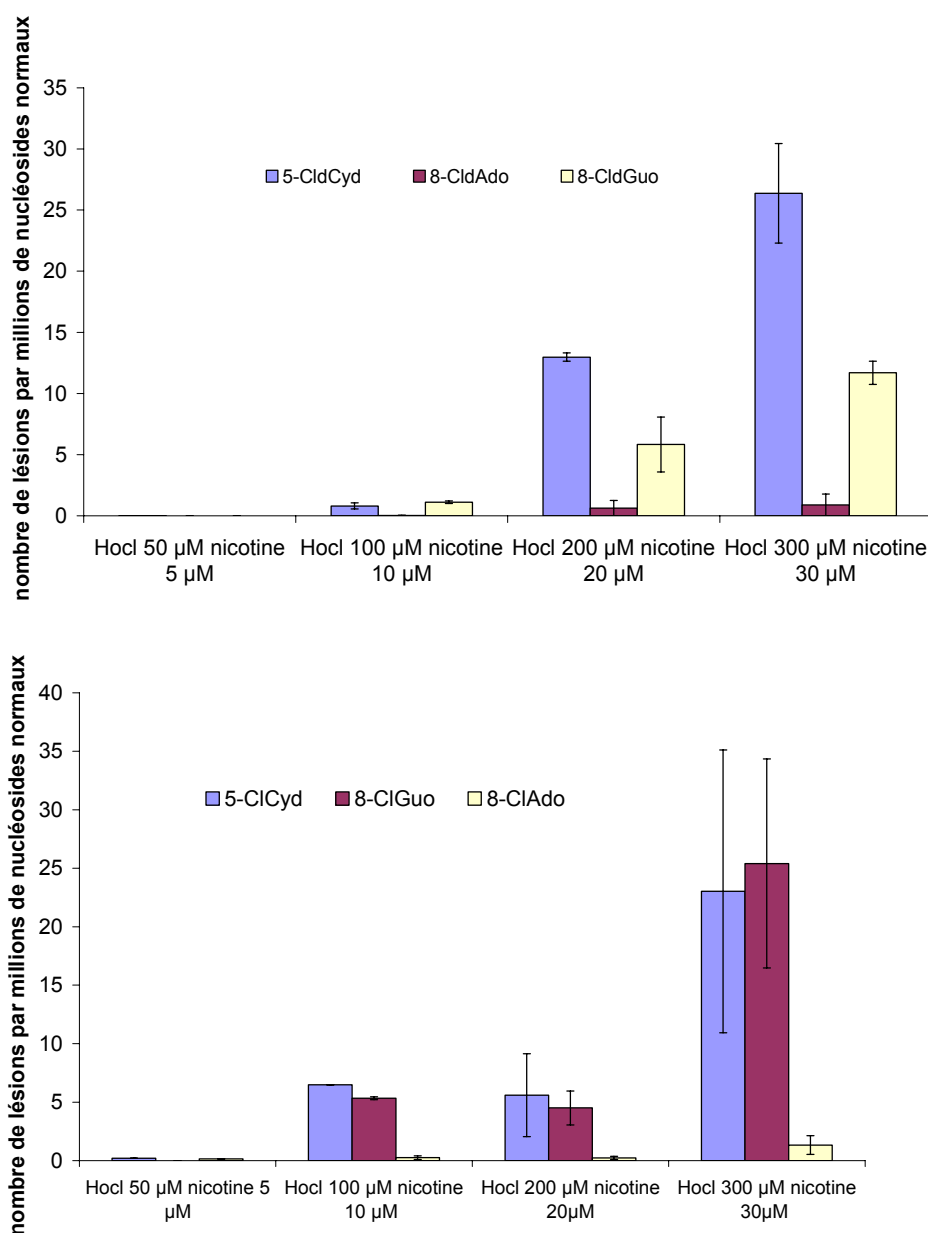
Dans le cas de l'ADN (graphique du haut), la nicotine entraîne une augmentation majoritairement de la 5-CldCyd, mais aussi de la 8-CldGuo lorsqu'elle est ajoutée à des concentrations croissantes à des cellules traitées par 200µM de HOCl. En ce qui concerne la 8-CldAdo, son taux augmente très légèrement avec l'ajout de concentration croissante de nicotine.

Dans le cas de l'ARN (graphique du bas), cette observation n'est pas valable puisque les taux de 5-CldCyd et 8-CldGuo diminuent lorsque les concentrations de nicotine ajoutée augmentent. Quant

à la 8-ClAdo, pour une concentration de HOCl de 200 μ M, son taux était déjà faible et il ne semble pas varier avec l'ajout de nicotine.

Dans une étude suivante, nous avons alors décidé de regarder l'effet cumulé d'une augmentation de HOCl et de nicotine sur des cellules SKM1 en culture. Les concentrations appliquées sont respectivement de 50, 100, 200 et 300 μ M de HOCl et de 5, 10, 20 et 30 μ M de nicotine. Les histogrammes de la *figure 47* représentent la formation cellulaire des (2'-désoxy)ribonucléosides chlorés.

Figure 47 : Formation cellulaire de (2'-désoxy)ribonucléosides chlorés en présence de HOCl et de nicotine



Comme l'on peut le remarquer sur ces deux histogrammes de la *figure 47*, les taux des différentes lésions augmentent tous avec la dose de HOCl et de nicotine appliquée. Ces résultats

nous permettent de dire que la nicotine semble avoir un effet potentialisateur de la génération cellulaire des lésions chlorées mais n'agit pas seule pour entraîner leur formation. Le tableau de la *figure 48* récapitule les données (moyenne +/- écart-type).

Figure 48 : Quantité des des(2'-désoxy)ribonucléosides chlorés en fonction des concentrations de HOCl et de nicotine

Lésion (/millions de nucléosides normaux)	200 µM HOCl	200 µM HOCl et nicotine 2 µM	200 µM HOCl et nicotine 160 µM
5-ClIdCyd	24,7+/-2,09	9,38+/-0,314	22,5+/-7,02
5-ClCyd	8,46+/-3,45	6,86+/-2,02	0,79+/-0,65
8-ClIdGuo	3,31+/-0,29	2,83+/-0,30	11,01+/-3,2
8-ClGuo	3,76+/-2,2	1,87+/-0,51	0,53+/-0,38
8-ClIdAdo	0,51+/-1,49	0,30+/-0,03	0,999+/-0,44
8-ClAdo	0,23+/-0,8	0,00	0,00

7.1.7.4 Essai de réparation des lésions chlorées

Une dernière série d'expériences concernant les lésions chlorées a consisté à étudier leur mécanisme de réparation au sein de la molécule d'ADN. Pour se faire, nous avons travaillé avec de l'ADN isolé traité par différentes concentrations de HOCl auquel nous avons appliqué deux enzymes de réparation, représentées respectivement par la Fpg et l'Endo III. Il est rappelé ici que ces deux enzymes sont des enzymes bactériennes impliquées dans la réparation de type REB. La Fpg est en charge de la réparation des purines modifiées (8-oxodGuo, acide oxalurique) tandis que l'Endo III répare plutôt les pyrimidines modifiées.

Les premiers essais de réparation consistaient à incuber l'ADN isolé traité avec HOCl avec Fpg ou Endo III à 37°C pendant une heure. Après précipitation de l'ADN, ce dernier était digéré enzymatiquement puis l'analyse des 2'-désoxyribonucléosides chlorés faite par CLHP-SM/SM.

Aucune baisse du taux des lésions chlorées n'était constatée, évoquant l'hypothèse que ces dernières ne devaient pas être réparées par ces deux enzymes. Le plus surprenant était que le taux de 8-oxodGuo présent initialement dans l'ADN traité par HOCl augmentait lors de l'ajout de concentrations croissantes de Fpg. En effet, la Fpg est une enzyme qui excise la 8-oxoGua et le taux résiduel de 8-oxodGuo présent dans l'ADN aurait donc diminué. Nous avons alors vérifié la bonne activité de réparation de ces enzymes sur de l'ADN lésé par une irradiation en gamma et comportant de la 8-oxodGuo.

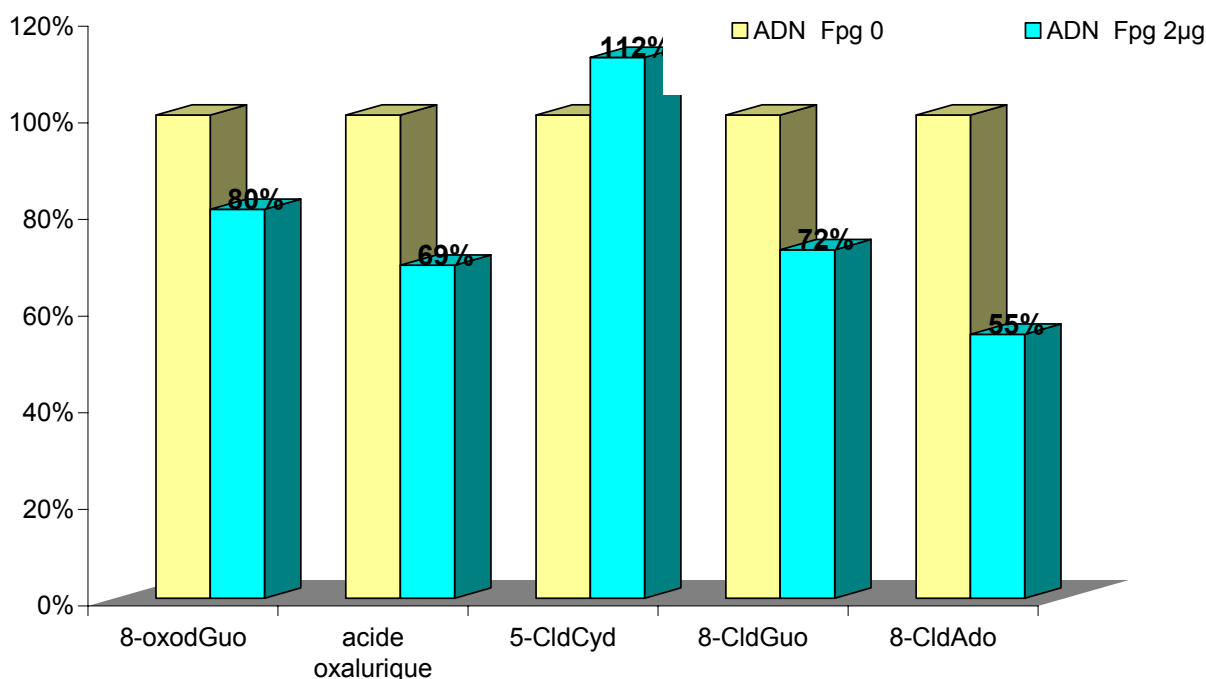
L'hypothèse émise était de penser qu'il devait rester du HOCl dans le milieu de l'ADN traité par ce dernier. Ce HOCl résiduel pourrait alors entraîner la formation de la 8-oxodGuo par un mécanisme d'attaque radicalaire par le $\bullet\text{OH}$ généré. Ceci permettrait d'expliquer l'augmentation de la 8-oxodGuo. Ainsi, nous avons décidé de dialyser l'ADN traité par HOCl pour éliminer complètement le HOCl résiduel.

Ensuite, nous avons incubé pendant 1H à 37°C par Fpg ou Endo III (1ou 2 μg ajouté)

- ✓ de l'ADN lésé par irradiation gamma,
- ✓ de l'ADN traité par HOCl 400 μM ,
- ✓ un mélange 50/50 des deux ADN précédents.

La figure 49 présente les résultats obtenus en pourcentage de lésions résiduelles après incubation avec Fpg 2 μg du mélange 50/50 des deux ADN afin d'utiliser la 8-oxodGuo connue étalon pour vérifier l'efficacité de la Fpg. En ce qui concerne les résultats obtenus avec Endo III, ils ne sont pas présentés ici car ils n'ont pas permis de mettre en évidence des résultats concluants.

Figure 49 : Pourcentage des lésions résiduelles après réparation par la Fpg



Au vu de ces résultats, on constate bien que la 8-oxodGuo et l'acide oxalorique sont bien réparés par la Fpg puisque leurs pourcentages résiduels diminuent. Quant aux lésions chlorées, il semble que la 8-CldAdo et la 8-CldGuo soient réparées par la Fpg puisque leurs pourcentages résiduels diminuent également. Quant à la 5-CldCyd, il n'est pas encore possible de conclure au vu

de ces résultats préliminaires quant au mécanisme de réparation possible de cette lésion qui ne semble pas être prise en charge par la Fpg.

Cependant, ces résultats restent à confirmer par des essais supplémentaires en faisant varier la quantité ajoutée de Fpg et la concentration des lésions chlorées au départ. De plus, il serait intéressant de quantifier les bases chlorées pouvant être issues de la réparation dans le surnageant après incubation avec Fpg ou Endo III.

7.2 Optimisation des dosages dans les fluides biologiques

7.2.1 Préparation des échantillons de fluides biologiques étudiés

Les différents fluides biologiques (cellules circulantes, urine, plasma, LCR et sperme) doivent subir un prétraitement avant d'être analysés par CLHP-SM/SM. En effet, ce sont souvent des milieux complexes comprenant de nombreuses molécules telles que des protéines. Il est donc nécessaire de purifier les lésions de l'ADN pour notamment augmenter la durée de vie des colonnes chromatographiques. Selon le fluide biologique étudié, la méthode de prétraitement sera différente.

7.2.2 Echantillons d'urine humaine

Lorsque l'urine a été conservée à -80°C ou -20°C , cette dernière est décongelée dans un bain-marie à 37°C pendant 10 minutes (permettant une meilleure resolubilisation). Ensuite, les échantillons d'urine sont centrifugés à 15000g pendant 5 minutes à $+20^{\circ}\text{C}$.

Les lésions oxydatives que nous avons tenté de détecter sont les suivantes : les Gly-Thd, la 5-HMdUrd, la 8-oxoGua, la 8-oxoGuo et la 8-oxodGuo et leurs bases correspondantes les glycols de thymine, la 5-HMUra, la 8-oxoGua et la 8-oxoAde.

Afin de concentrer d'avantage les lésions, les échantillons d'urine ont été purifiés à l'aide de divers systèmes, à savoir,

A. Plusieurs type de **colonne d'extraction en phase solide désignées SPE** (« Solid Phase Extraction ») et de différentes marques (C_{18} Bondelut, Varian[®] et C_{18} Alltech[®] 600mg). Ces colonnes C_{18} sont constituées de phase inverse permettant la séparation des molécules selon leur polarité. L'élution réalisée par différents mélanges acétate d'ammonium/méthanol doit permettre de récupérer les molécules les unes après les autres selon leur polarité.

B. **Colonne d'immunoaffinité**. Pour se faire, nous avons utilisé des anticorps monoclonaux (3F10) qui permettent de reconnaître toutes les formes de 8-oxoGua. Les lésions retenues sur les colonnes ont été éluées par le méthanol. Les différentes fractions d'élution ont été séchées au speed-vac pour enlever le méthanol résiduel puis lyophilisées plusieurs fois. Enfin, les résidus à sec ont été

repris avec un volume de 50 μL de FA 5mM avant analyse en CLHP-SM/SM. Cette étude avait pour but de voir s'il était possible de purifier la 8-oxoGua, la 8-oxoGuo, la 8-oxodGuo, la 8-oxodGuomonophosphate et la 8-oxodGuo contenue dans des oligonucléotides.

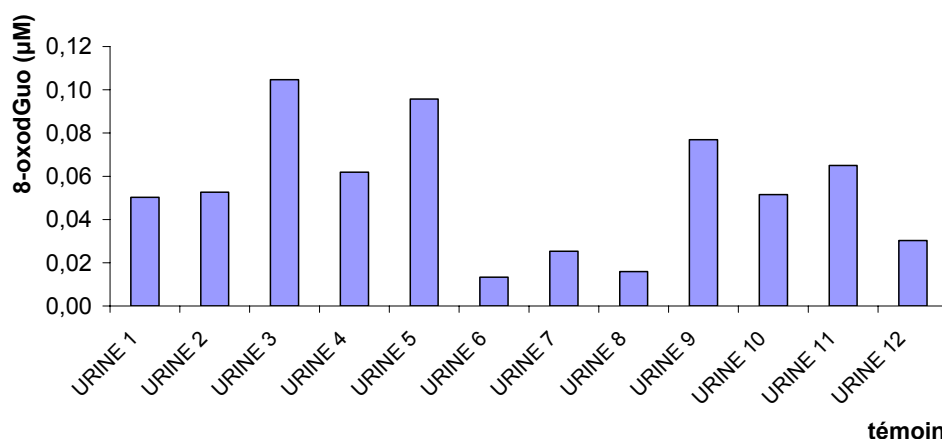
C. et par **NAP** (Pharmacia Biotech®). Ce type de colonne est généralement utilisé pour désaler et purifier rapidement les acides nucléiques ou les oligonucléotides de plus de 10 paires de bases. Le but était de rechercher l'éventuelle présence dans l'urine d'oligonucléotides contenant des lésions.

Aucun de ces systèmes précédents n'a permis de purifier d'autres formes que la 8-oxodGuo libre. D'autre part, une collaboration a été initiée avec l'équipe de S. Toyokuni qui possède des anticorps monoclonaux N45.1 plus spécifiques de la 8-oxodGuo [190,191]. Il était prévu de réaliser des colonnes d'immunoaffinité avec ces anticorps afin de tenter de prépurifier les différentes formes de 8-oxodGuo dans l'urine.

Comme les diols de thymidine sont peu retenus sur une colonne de type C_{18} , nous avons également tenté de les purifier sur une colonne de type Boronate (Affi-Gel, Biorad Laboratories®) mais là encore il n'a pas été possible de les quantifier.

Ces différents essais de purification des lésions dans l'urine humaine nous ont amenés à en conclure que seule la 8-oxodGuo peut être mesurée avec une limite de quantification acceptable. Dans ce cas, il n'est même pas nécessaire de réaliser une prépurification pour quantifier cette dernière. Après ajout du standard interne de 8-oxodGuo M+5 à une concentration connue, l'urine est diluée au demi avec la phase mobile de la CLHP c'est-à-dire avec du FA 5mM. Les échantillons mis dans des flacons placés sur le portoir de l'injecteur automatique sont ensuite analysés par CLHP-SM/SM. Une colonne de chromatographie est réservée au dosage de la 8-oxodGuo urinaire. L'histogramme de la *figure 50* montre une variation interindividuelle du taux urinaire de 8-oxodGuo avec des valeurs comprises entre 0,01 et 0,1 μM .

Figure 50 : Taux de 8-oxodGuo urinaire de volontaires sains.



Au vu de ces résultats, nous pouvons constater que ces variations sont importantes. En effet, l'urine du témoin numéro 3 par exemple a un taux deux fois plus important que celui de l'urine numéro 2. Il est à noter ici que les volontaires sains ayant accepté de participer à l'étude constituent un groupe très hétérogène (sexe, âge, etc.)

En guise de conclusion au sujet des autres lésions oxydatives, on peut dire que les limites de détection sont trop élevées pour permettre leur quantification dans les urines, même après purification sur colonne de type SPE C₁₈ ou boronate. Il serait envisageable de quantifier la 8-oxoGuo mais les résultats obtenus sont trop proches de la limite de détection. Quant à la 8-oxoGua, nous avons constaté une instabilité du standard interne 8-oxoGua M+4 mettant en doute la possibilité de sa quantification dans l'urine. Si les autres lésions sont présentes dans l'urine humaine, leurs concentrations sont probablement inférieures à 0,1 µM.

En ce qui concerne cette fois le dosage des lésions chlorées dans l'urine, une nouvelle purification a été tentée sur SPE. Comme nous avons synthétisé le standard marqué de la 5-ClCyt M+3, il a été ajouté avant purification sur les colonnes SPE. Aucune des lésions chlorées n'a pu être quantifiée dans les urines des volontaires sains. Si cette lésion est présente dans l'urine, sa quantité doit être inférieure à 1 nM.

7.2.3 Echantillons de plasma

Afin de prépurifier les lésions présentes dans le plasma, plusieurs approches ont été testées. Au préalable, il s'est avéré nécessaire de filtrer le plasma sur un "centricon" de la gamme AMICON (Millipore®), pour éliminer les macromolécules et les protéines qui gênent la détection des lésions en générant notamment un important bruit de fond. Le mode d'utilisation de ce centricon se trouve en **Annexe 4**. Ce genre de dispositif permet de filtrer les molécules de poids moléculaire inférieur à 10000 uma.

D'autres tests pour se débarrasser des protéines du plasma ont fait appel à la précipitation des protéines par d'un mélange acétone/méthanol (50/50 V/V) ou digestion avec une protéase (protéinase K, Qiagen®). Cependant, ces essais n'ont pas permis d'améliorer le signal obtenu.

Suite à la filtration par les centricons, deux méthodes différentes de purification des lésions ont été testées. La première consistait à utiliser des colonnes C₁₈ de type SPE selon la même démarche que les essais réalisés pour l'urine. La deuxième possibilité a été de réaliser des colonnes d'immunoaffinité avec l'anticorps monoclonal 3F10. Le principe d'utilisation est également le même que pour l'urine.

L'ajout des standards internes a été réalisé au moment de la phase de purification.

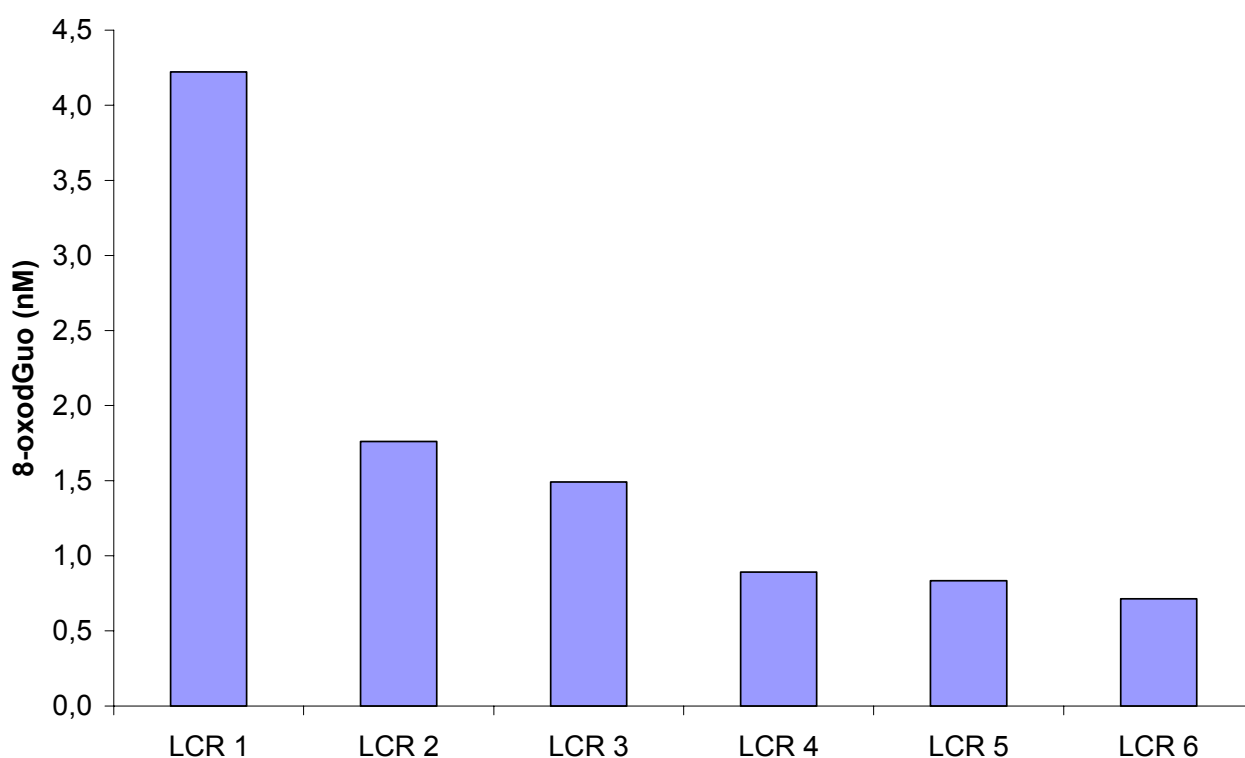
Les essais de purification des lésions à partir du plasma de volontaires sains ne nous permettent pas d'obtenir des résultats satisfaisants. En effet, aucune des lésions oxydatives n'a pu être quantifiée. Les essais de prépurification de la 8-oxodGuo par colonne d'immunoaffinité n'ont pas permis de quantifier cette lésion dans le plasma.

Si les lésions étudiées sont présentes dans le plasma, les concentrations doivent être très basses et sans doute nettement inférieures à 0,1 nM. Ceci confirme ce qui est déjà décrit dans la littérature, notamment par l'équipe de Bogdanov et collaborateurs qui mesure la 8-oxodGuo plasmatique par CLHP-EC à des concentrations calculées de l'ordre de 0,015 nM [187].

7.2.4 Echantillons de LCR

Un essai de dosage de la 8-oxodGuo sur un petit nombre de LCR (n=6) a été initié au cours de cette thèse. Les échantillons provenaient du DBI et aucune donnée de pathologie précise n'a été communiquée. Les LCR ont été dilués comme l'urine au demi avec du FA 5mM avec ajout de 0,5 pmol de 8-oxodGuo M+5 avant d'être filtré sur centricon. Les résultats du dosage sont représentés sur la *figure 51*.

Figure 51 : Taux de 8-oxodGuo dans 6 LCR.



Il est à noter que les taux obtenus de 8-oxodGuo sont très faibles et variables suivant les sujets. Il paraît nécessaire de confirmer ces résultats en réalisant au moins une vingtaine de dosages.

Cependant, les concentrations mesurées semblent être en accord avec les récentes données de la littérature qui sont de 1,1 à 2,3 nM [143].

7.2.5 Lymphocytes et cellules mononuclées

7.2.5.1 Différentes méthodes de séparation des cellules à partir du sang total

Dans un premier temps, la séparation des cellules circulantes a été la première étape à mettre en œuvre afin de disposer de suffisamment de cellules. Pour se faire, deux techniques différentes ont été testées : l'utilisation de vacutainers **CPT** (Becton Dickinson®) et une séparation plus classique par l'utilisation d'un **Ficoll**. La différence entre ces techniques concerne le type de cellules obtenues après cette séparation et la mise en œuvre de leur utilisation.

Concernant les vacutainers **CPT**®, la technique (**Annexe 5**) est rapide et permet d'isoler toutes les cellules mononuclées à l'exception des granulocytes. Une fois le sang prélevé dans ce tube, il est centrifugé à 1650g pendant 20 minutes à +20°C pour séparer les cellules du reste du sang par un gel interne au tube. Dans ce cas, nous obtenons une suspension cellulaire facilement séparable du plasma. Ce type de vacutainer nous a paru plus facile d'utilisation, notamment lors de la participation à des études cliniques. Les cellules sont alors rincées à l'aide de 5mL d'une solution saline de type PBS (« Phosphate Buffer Saline ») puis centrifugées pendant 5 minutes à 2000g à +4°C. Cette opération de rinçage est répétée une nouvelle fois avant de congeler les cellules à sec à -80°C.

La technique **Ficoll** (**Annexe 6**) est basée sur le principe de sédimentation permettant la séparation des lymphocytes selon leur différence de densité par rapport aux autres cellules sanguines. A partir d'un prélèvement réalisé avec un vacutainer EDTA de 7 mL, le sang est dilué au demi avec une solution de HANKS (sans Ca ni Mg). Le sang ainsi dilué est déposé le plus doucement possible et sans mélanger sur la solution de **Ficoll** placée dans un autre tube. C'est une centrifugation de 30 minutes à 1100g qui permet de séparer les lymphocytes et cellules mononuclées qui se retrouvent dans un anneau à l'interface entre les deux phases obtenues. Le plus délicat est de récupérer cet anneau de cellules et fait appel à une dextérité acquise avec de l'expérience. L'étape de lavage des cellules est la même que précédemment. Les cellules sont également conservées à sec à -80°C.

Dans un troisième essai, nous avons comparé une autre méthode différente des deux précédentes qui vise à lyser les globules rouges pour récupérer les autres cellules. Cette technique, désignée comme la méthode « **NH₄Cl** », a été réalisée à partir d'une prise de sang classique (vacutainer EDTA de 7 mL) à laquelle on ajoute 35 mL de tampon de lyse **NH₄Cl** à 0,9%. Une centrifugation à 215g pendant 20 minutes suivie de deux lavages avec 5mL de PBS sont suffisants pour obtenir un culot de cellules que l'on congèle à sec à -80°C.

Un dernier essai a été réalisé pour comparer le vacutainer CPT et un kit commercial comprenant des vacutainers de prélèvement sanguin spécifiques de l'ADN et un ensemble pour l'extraire. Ce kit est commercialisé par Qiagen et désigné sous le nom de « **PAXgene** ».

7.2.5.2 Méthode d'extraction d'ADN à partir des cellules isolées

L'extraction des acides nucléiques à partir de cellules isolées a fait l'objet de nombreux modes opératoires. Au LAN depuis quelques années et dans le souci d'optimisation de cette extraction, il a été mis au point un protocole permettant de minimiser l'oxydation de l'ADN [127]. En effet, une suroxydation, pouvant principalement être due à la réaction de Fenton, crée une surestimation du taux des lésions oxydatives.

La méthode d'extraction est détaillée en **Annexe 7**. Le premier tampon de lyse (appelé lyse A) permet de casser les membranes cytoplasmiques et d'isoler les noyaux tandis que le tampon (appelé lyse B) permet de briser la membrane nucléaire pour libérer l'ADN nucléaire. Afin de se débarrasser des ARN nucléaires et des protéines, deux RNAses A et T1 ainsi qu'une protéase sont ajoutés. Les étapes qui suivent cette digestion d'ARN et de protéines permettent la précipitation de l'ADN grâce au NaI (iodure de sodium) et aux alcools (isopropanol et éthanol). L'ajout de desferoxamine dans les différents tampons permet de capter le Fer et autres métaux de transition pour ne pas oxyder l'ADN via des réactions de type Fenton.

L'avantage de ce protocole est double : il est rapide (environ deux heures et demi par série d'au moins 12 échantillons) et il minimise l'oxydation artéfactuelle de l'ADN contrairement aux autres protocoles. L'ADN ainsi extrait peut être conservé à -20°C en attendant de réaliser l'étape de digestion suivie de l'analyse CLHP-SM/SM.

7.2.5.3 Digestion enzymatique des acides nucléiques

Une fois l'ADN et/ou l'ARN extraits des cellules, une étape de digestion enzymatique (**Annexe 8**) avant analyse CLHP-SM/SM est réalisée pour les hydrolyser en unités constitutives, les (2'-désoxy)ribonucléosides.

Une première incubation de deux heures à +37°C permet de libérer les nucléotides. Elle est obtenue par l'ajout des trois enzymes suivantes. Les deux premières sont des endonucléases, la DNase II et la nucléase P1 qui vont scinder les acides nucléiques pour donner respectivement des résidus 3'phosphates et 5'phosphates. La phosphodiésterase II, une 3'-exonucléase permet d'obtenir des mononucléotides 3'phosphates.

La deuxième étape consiste à éliminer les phosphates et à digérer les lésions éventuelles résistantes à la nucléase P1 et à la DNase II. La première enzyme utilisée est la phosphodiésterase I qui est une

5'-exonucléase permettant d'obtenir des nucléosides 5'monophosphates. Ensuite, la phosphatase alcaline (Palk) éliminant le groupement phosphate des 3' et 5'monophosphates.

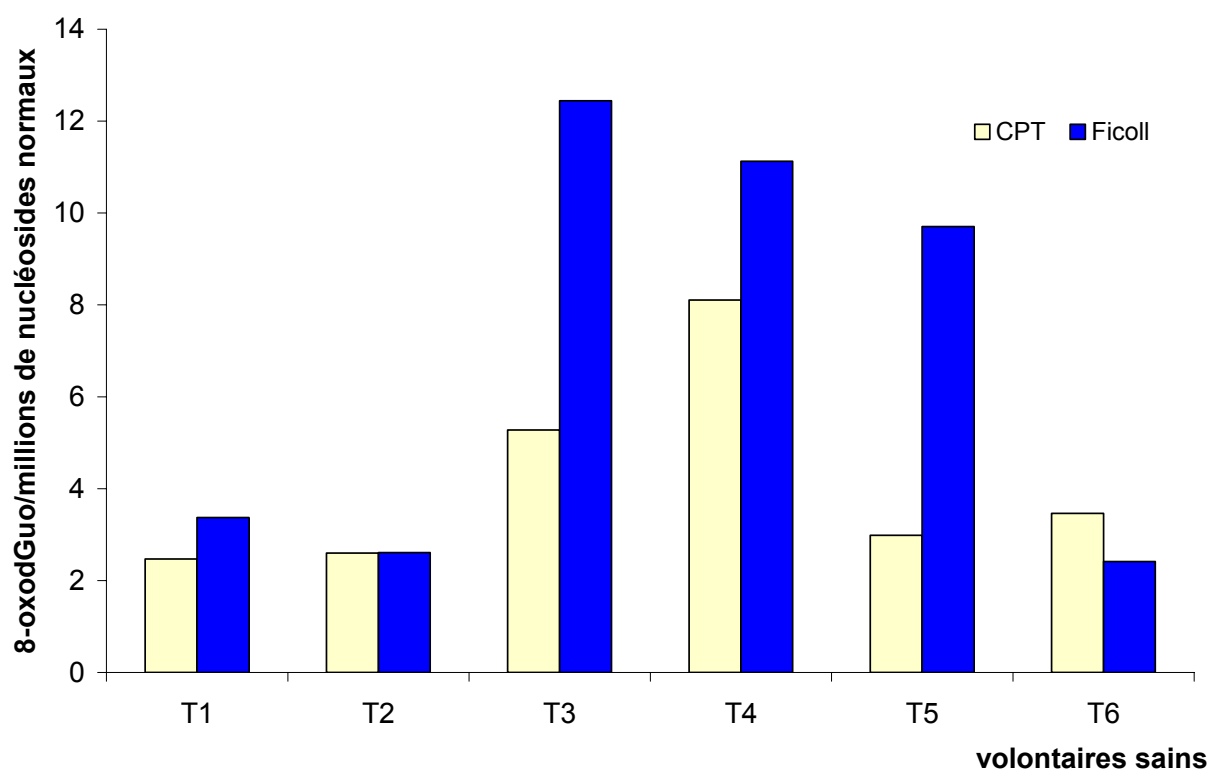
Les acides nucléiques sont ainsi hydrolysés en (2'-désoxy)ribonucléosides. L'utilisation simultanée d'endo et d'exonucléases permet l'hydrolyse quantitative des acides nucléiques, et ceci même en présence des lésions [160].

7.2.5.4 Comparaison CPT-Ficoll

Il est à noter ici que la quantité d'ADN obtenu à partir de 7 à 8 mL de sang recueilli dans un vacutainer CPT a été calculée comme étant comprise entre 100 et 150 µg.

Les résultats de comparaison des deux méthodes CPT et Ficoll dans le cas de volontaires sains (n=6) sont représentés par le dosage de la 8-oxodGuo sur l'histogramme de la *figure 52*.

Figure 52 : 8-oxodGuo cellulaire de 6 volontaires sains.



La moyenne et l'écartype des taux de 8-oxodGuo obtenues sont de 4,15+/-2,19 et de 6,94+/-4,64 lésions par millions de nucléosides normaux respectivement pour la technique CPT et la technique Ficoll.

Au vu de ces résultats, il semble qu'il existe une différence interindividuelle parmi les volontaires, additionnée d'une variabilité entraînée par la méthode utilisée pour séparer les cellules

sanguines. Il semble également que l'utilisation du Ficoll entraîne une augmentation du taux de 8-oxodGuo. On peut noter ici que ce taux varie de 2 à 12 8-oxodGuo par millions de nucléosides normaux. Quant au dosage des lésions chlorées et des éthénonucléosides parmi ces mêmes volontaires, les taux obtenus sont représentés sur les *figures 53 et 54*.

Figure 53 : Taux des 2'-désoxyribonucléosides chlorés de 6 volontaires sains.

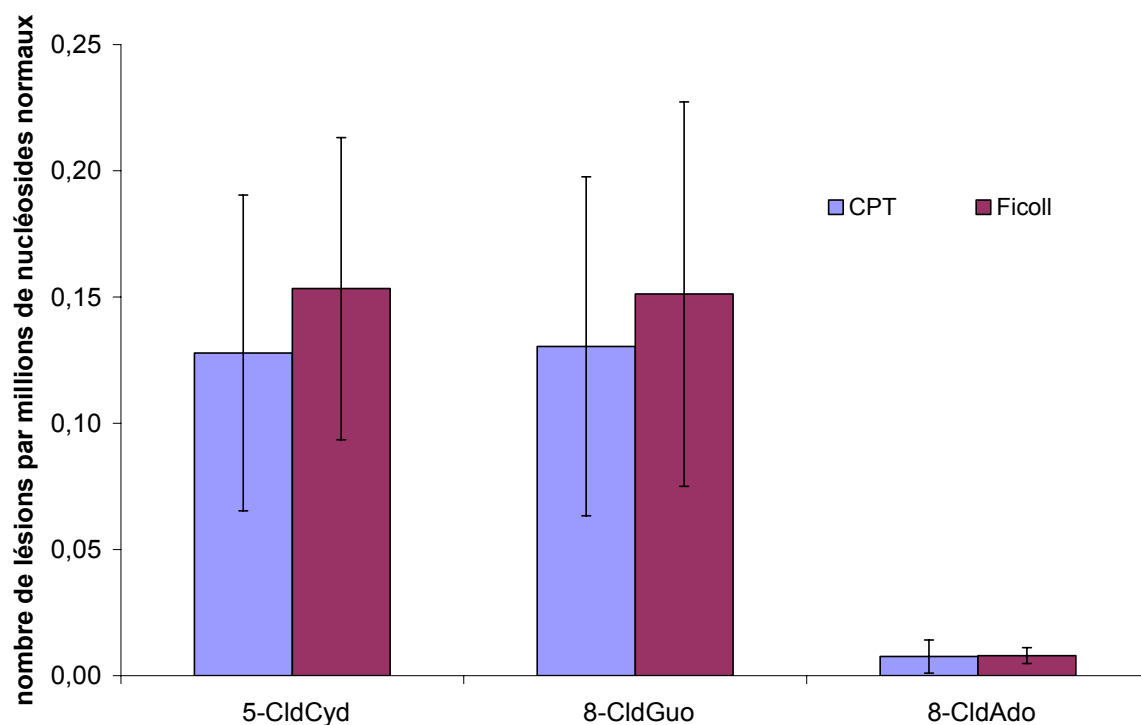
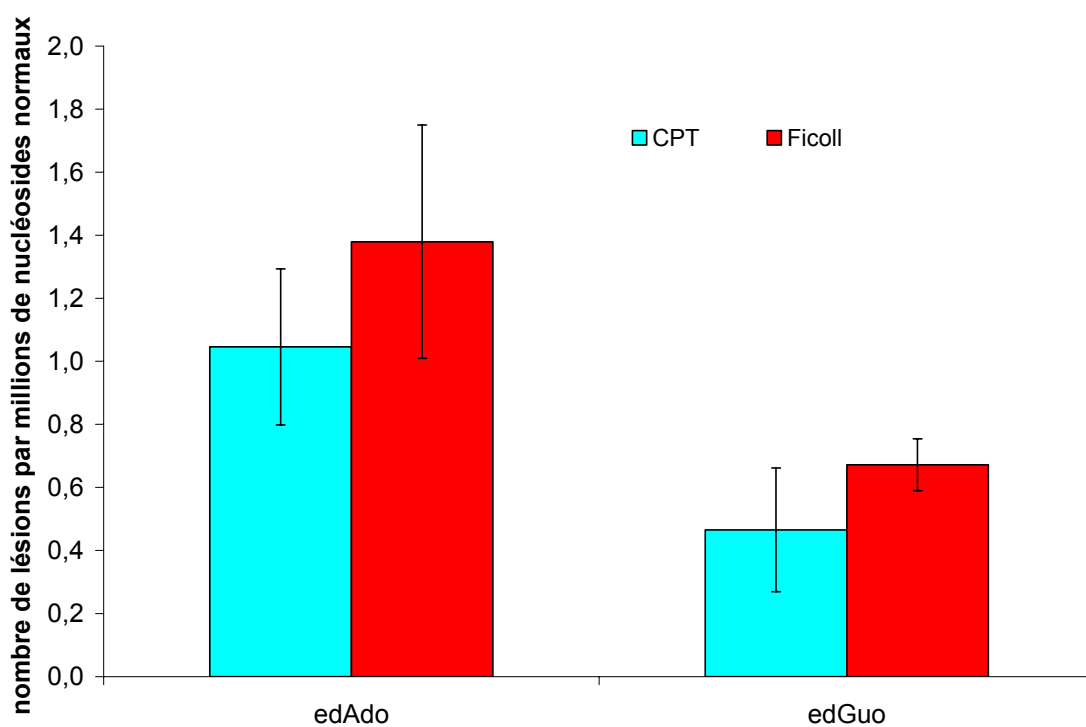


Figure 54 : Taux des éthénonucléosides de 6 volontaires sains.



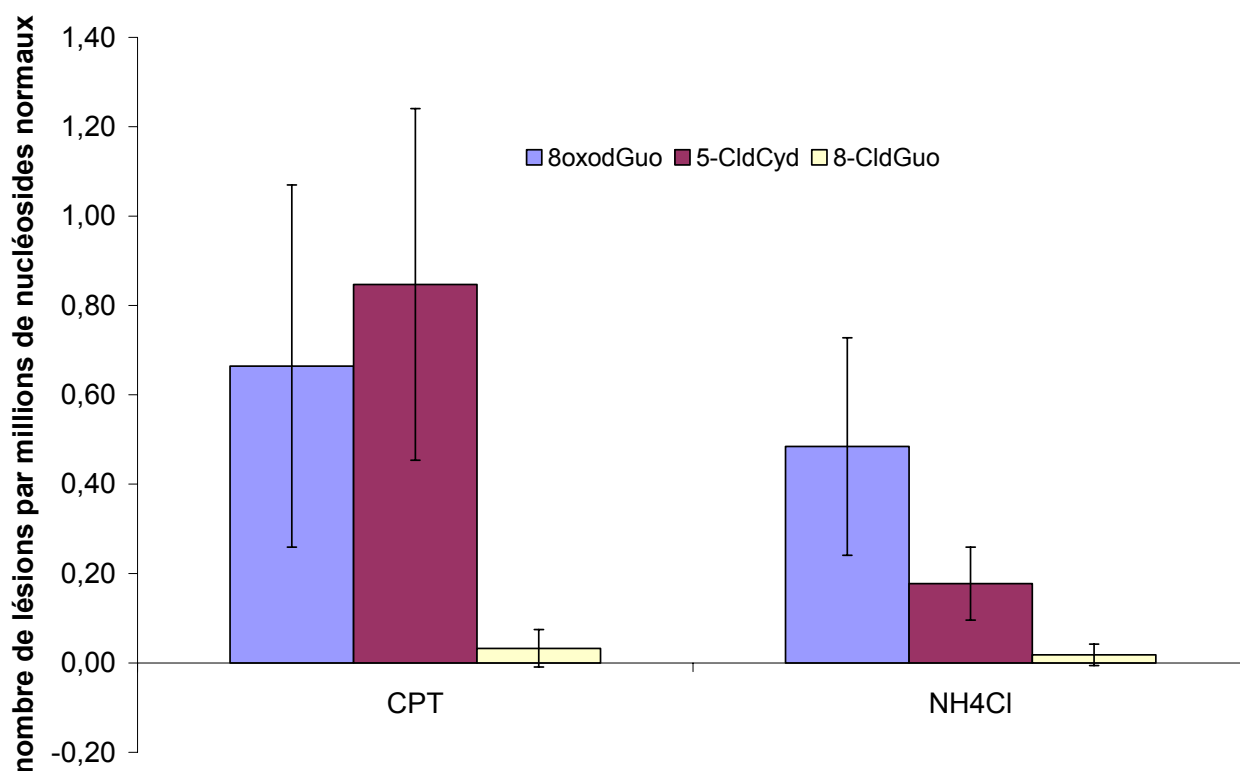
En ce qui concerne le groupe des lésions chlorées, il ne semble pas exister de différence importante entre les deux techniques de séparation. Le taux de ces lésions est situé entre 0,01 et 0,3 par millions de nucléosides normaux. Par contre, il apparaît que dans le cas des éthénonucléosides dont le taux est compris entre 0,2 et 2 lésions par millions de nucléosides normaux, la technique Ficoll entraîne une augmentation des taux d'édAdo et d'édGuo.

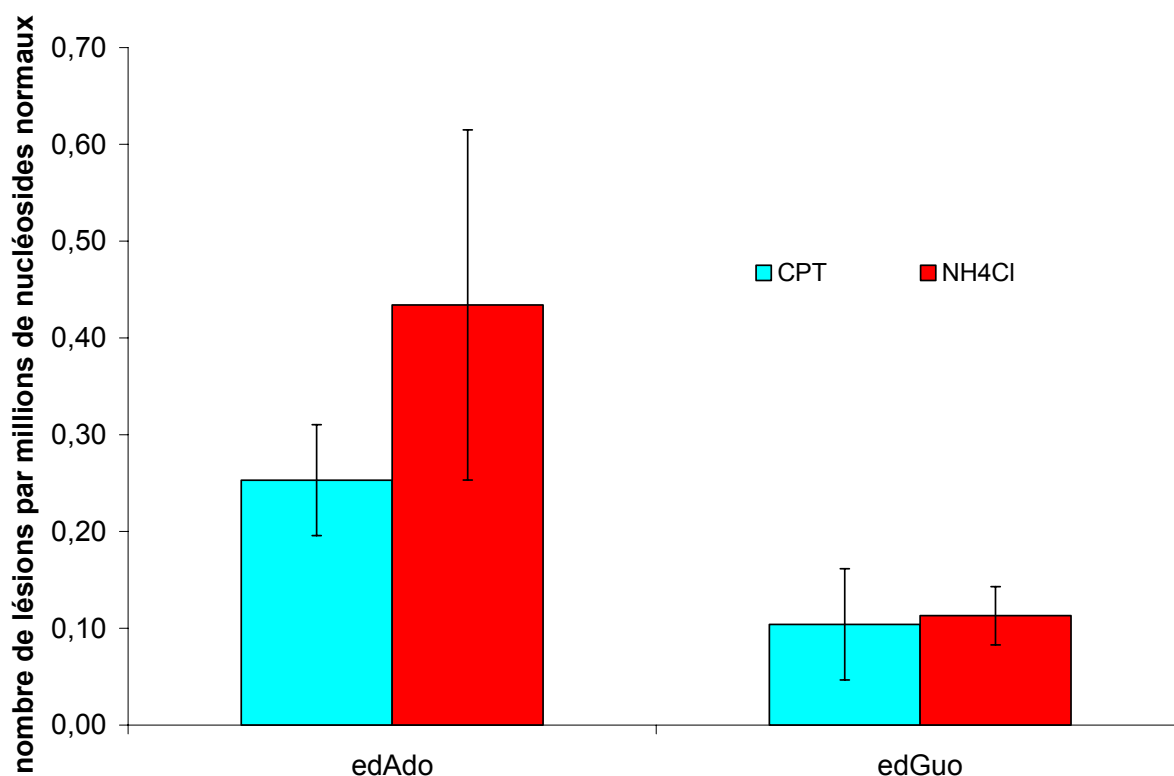
7.2.5.5 Comparaison CPT-« NH₄Cl »

Une deuxième étude pour un nombre de 12 volontaires sains a été réalisée afin de comparer les méthodes de séparation des cellules de type CPT et « NH₄Cl ».

Les résultats des différentes lésions sont représentés sur les deux histogrammes de la *figure 55*.

Figure 55 : Taux des lésions oxydées, chlorées et éthénonucléosides : CPT/NH₄Cl





Dans ce groupe de 12 volontaires, on peut constater que les résultats sont assez hétérogènes et qu'il y a tout de même une tendance à l'augmentation des taux dans le cas des éthénonucléosides (plus marquée pour l'edAdo) avec la méthode NH₄Cl.

En guise de conclusion, nous pouvons dire que les résultats obtenus chez les différents volontaires sains (n=6 et n=12) ont permis de rendre compte d'une variation interindividuelle du taux de lésions oxydées, chlorées et des éthénonucléosides.

7.2.5.6 Comparaison CPT-« PAXgene »

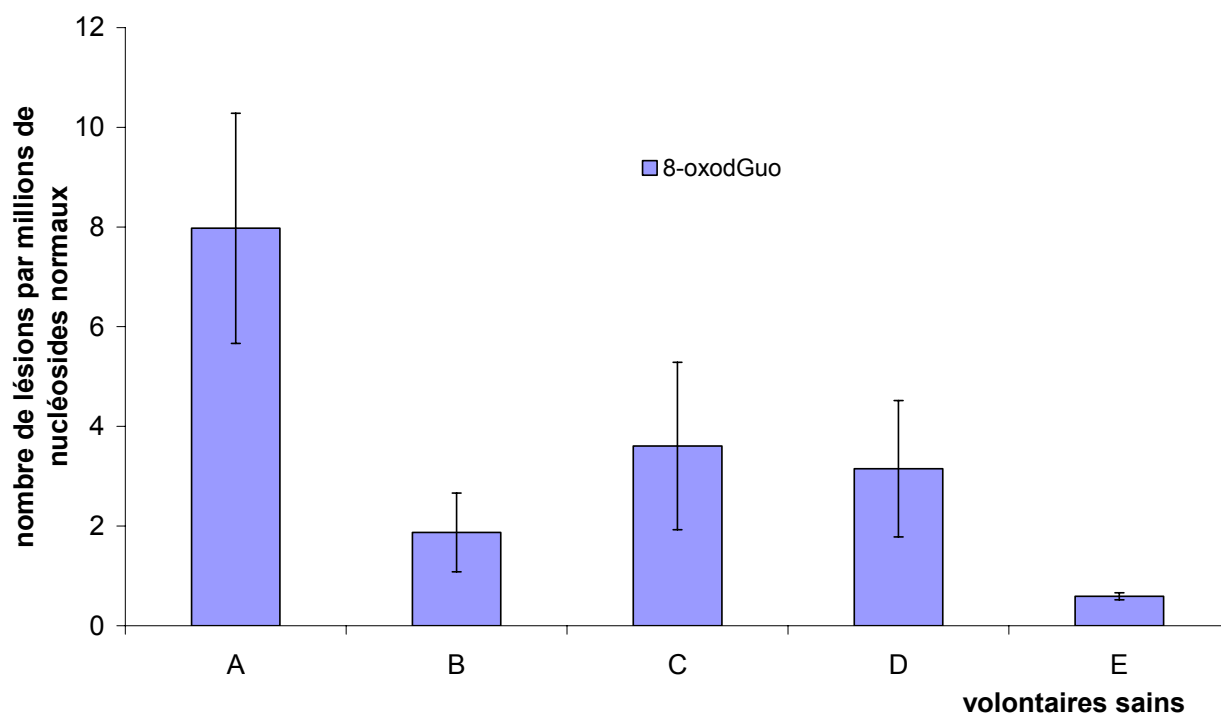
Le prélèvement de 3 vacutainers CPT en comparaison avec 3 tubes de prélèvements du kit PAXgene a été réalisé chez le même individu. Les résultats obtenus sont proches puisque les taux mesurés de 8-oxodGuo sont respectivement pour les CPT de 1,64±0,63 et pour le PAXgene de 1,63±0,84 lésions/10⁶ nucléosides normaux. Cependant, il aurait fallu réaliser le dosage dans le cas de plusieurs volontaires sains en dosant également les autres lésions, ce qui n'a pas été fait étant donné le coût important du kit.

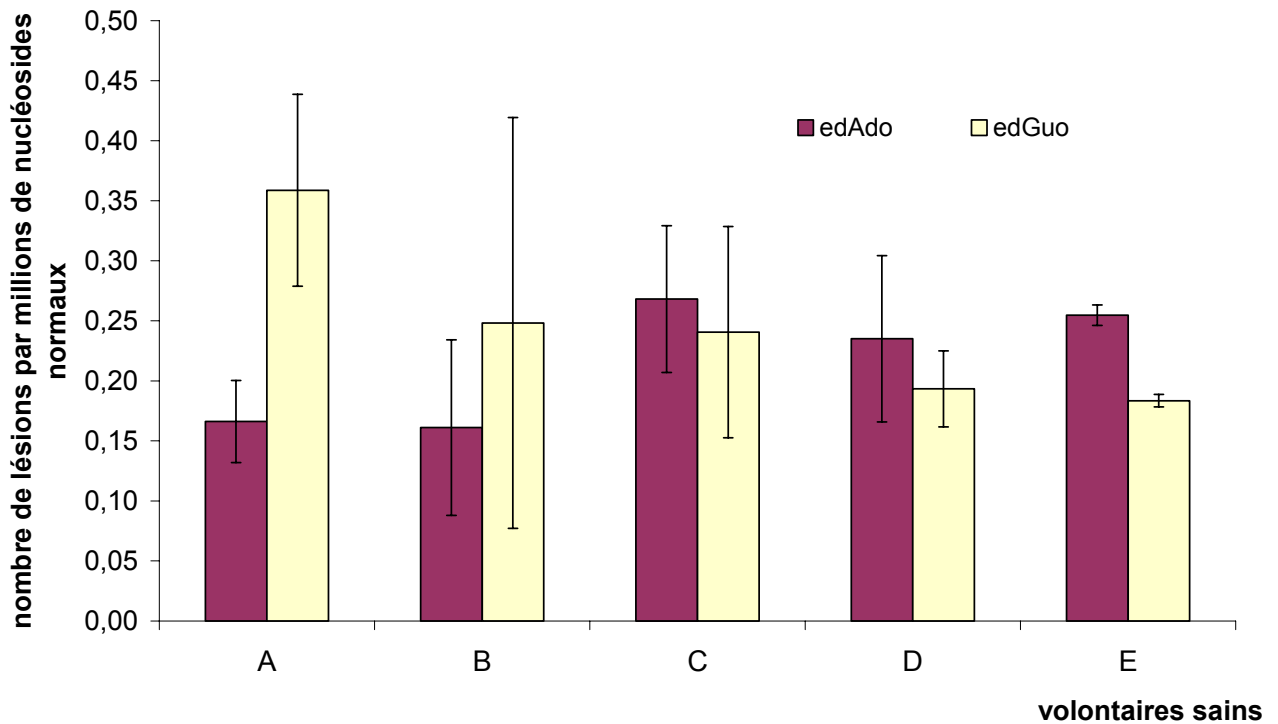
7.2.5.7 Raisons du choix des CPT et étude de répétabilité de la méthode CPT.

A l'issue de cette comparaison des techniques, nous avons choisi d'utiliser le tube CPT pour les différents protocoles d'étude des pathologies. En effet, il semble que cette technique donne des résultats moins variables que les autres techniques, au vu des écart-type obtenus. De plus, il semble que son utilisation soit plus adaptée à la participation à des études cliniques de part sa facilité d'utilisation d'autant plus qu'il est possible de récupérer également le plasma, ce qui n'est pas possible avec les autres techniques. En outre, les autres protocoles utilisent une lyse des globules rouges du sang prélevé pour récupérer les autres cellules circulantes, ce qui n'est pas le cas avec la méthode CPT. Ce point me paraît important dans la mesure où la lyse des globules rouges entraîne la libération du Fer contenu dans ces derniers et donc une possibilité d'oxydation artéfactuelle de l'ADN cellulaire via une réaction de Fenton.

Puisque nous avons choisi d'utiliser les vacutainers CPT dans les études cliniques qui ont été réalisées, il nous a paru nécessaire de réaliser une étude de répétabilité des dosages, à raison d'un prélèvement de 4 CPT par volontaire sain (n=5). Les résultats du taux de 8-oxodGuo et d'éthénonucléosides mesurés sont représentés sur la *figure 56*. Dans ce cas, il n'a pas été possible de quantifier les 2'-désoxyribonucléosides chlorés.

Figure 56 : Répétabilité du dosage des lésions par la méthode CPT.



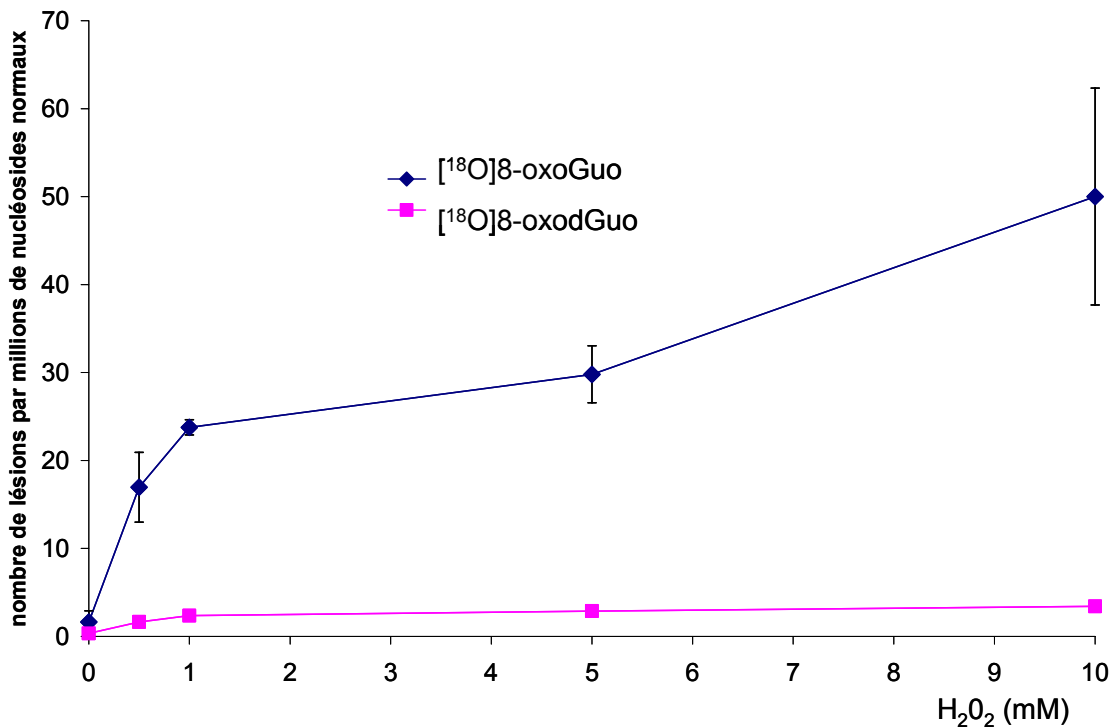


Comme il est remarquable de le constater sur ces deux histogrammes, la répétabilité est assez bonne pour le dosage des différentes lésions mais il serait peut-être nécessaire de réaliser plus que 4 dosages par sujet pour confirmer cette répétabilité.

7.2.6 Les lésions oxydatives de l'ARN

La première étude en collaboration avec l'équipe de I. Cotgreave a consisté à traiter des cellules A549 (lignée de cellules épithéliales de carcinome pulmonaire) avec du H_2O_2 marquée à ^{18}O désignée de cette façon : $H_2^{18}O_2$. L'extraction simultanée de l'ADN et de l'ARN a été obtenue à l'aide d'un kit Qiagen (DNA/RNA extraction kit No. 14142, Qiagen, Hilden, Germany). La mesure des molécules correspondantes marquées à ^{18}O , $[^{18}O]8\text{-oxodGuo}$ (286→170) et $[^{18}O]8\text{-oxoGuo}$ (302→172), soit M+2 par rapport aux molécules non marquées, 8-oxodGuo et 8-oxoGuo, a été réalisée par CLHP-SM/SM dans notre laboratoire. La *figure 57* représente les résultats obtenus en quantité de $[^{18}O]8\text{-oxo(d)Guo}$ par millions de nucléosides normaux.

Figure 57 : Formation cellulaire de [^{18}O]8-oxo(d)Guo en fonction de concentrations croissantes de H_2O_2



On peut constater que la formation de [^{18}O]8-oxoGuo est plus importante que celle de la [^{18}O]8-oxodGuo lorsque la concentration de H_2O_2 augmente. Ceci ne peut pas être lié à une oxydation artéfactuelle de la dGuo ou de la Guo lors de l'extraction puisque l'on mesure uniquement les produits isotopiquement marqués à l' ^{18}O issus de la réaction avec $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$. De plus, si on calcule le rapport de la formation de 8-oxoGuo par rapport à la formation de 8-oxodGuo, on constate que celui-ci est de 25. Ceci implique que l'ARN serait donc 25 fois plus oxydé que l'ADN. Ces résultats ont donné lieu à une publication [192].

Il est à remarquer que dans la cellule, la molécule d'ARN semble être plus oxydée et/ou chlorée que l'ADN. Ces deux précédentes études (HOCl et H_2O_2) montrent qu'il semble nécessaire de s'intéresser également à l'état de l'ARN cellulaire. C'est pourquoi nous avons tenté de développer une méthode d'extraction des acides nucléiques nous permettant de détecter simultanément les lésions de l'ADN et de l'ARN. Ce travail a été réalisé en collaboration avec une autre thésarde du LAN, M^{elle} Peggy Regulus.

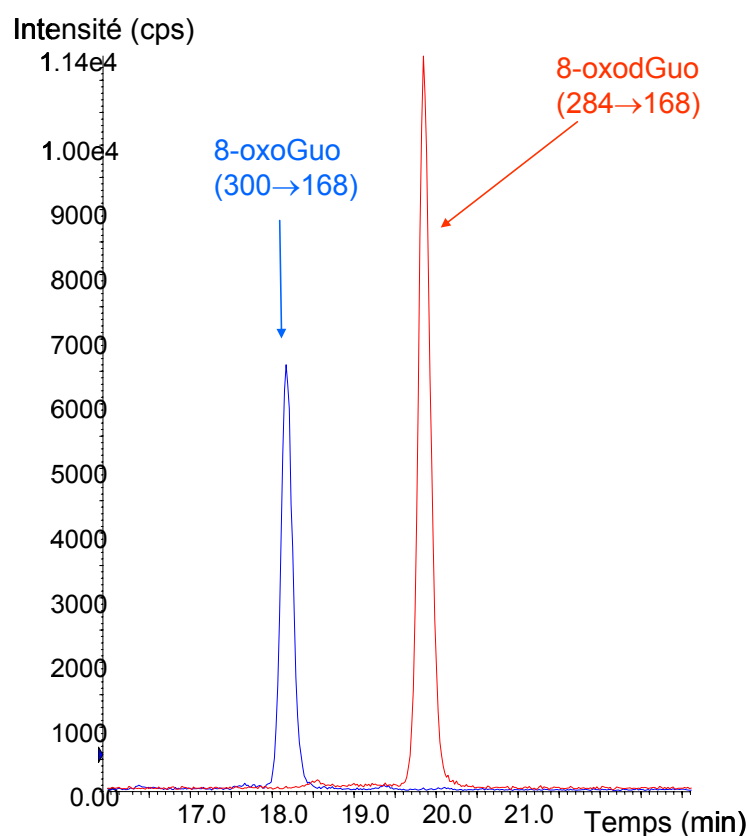
7.2.6.1 Optimisation de l'extraction simultanée d'ADN et d'ARN cellulaire.

7.2.6.1.1 Irradiation de cellules THP1.

Lors de la mise au point de l'extraction des lésions de l'ARN, nous avons traité des cellules de type THP1 par une irradiation gamma (source au cobalt).

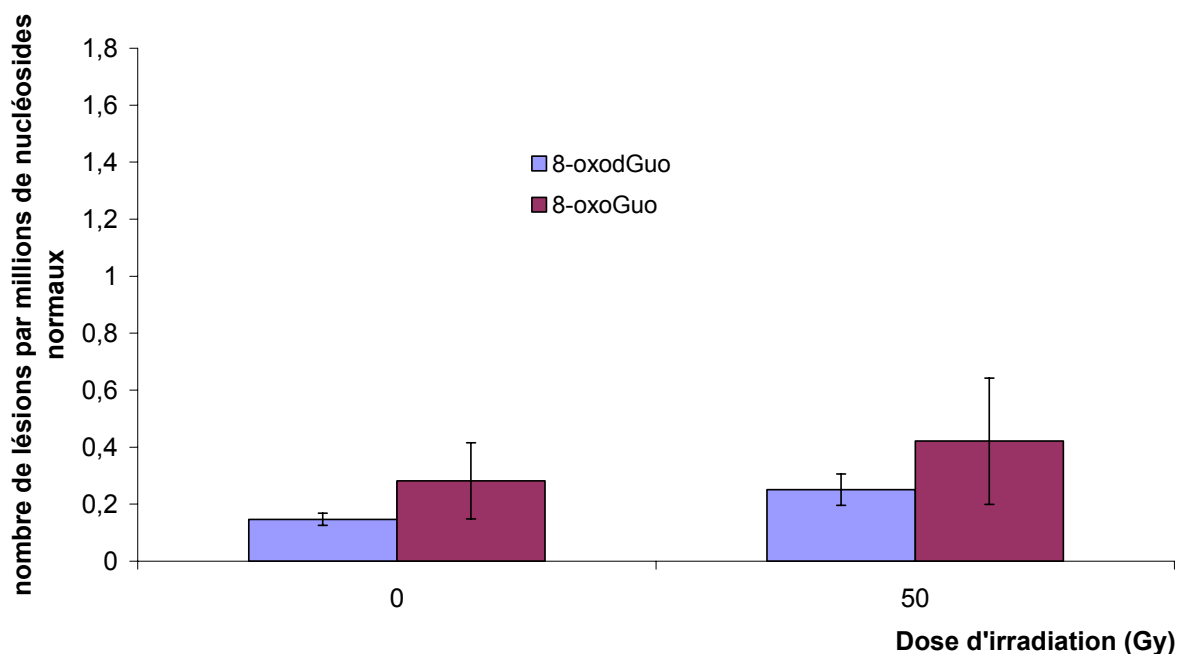
Les premiers essais ont consisté à ne pas ajouter les RNAses A et T1 dans la méthode classique d'extraction d'ADN afin de doser simultanément les lésions de l'ADN et de l'ARN. La *figure 58* représente un chromatogramme d'un standard de la 8-oxodGuo et de la 8-oxoGuo.

Figure 58 : Chromatogramme de la 8-oxodGuo et de la 8-oxoGuo (1 pmol injecté)



Plusieurs doses d'irradiation ont été réalisées (de 0 à 250 Gy) mais les résultats obtenus sont très variables. Ceux qui ont donné des valeurs acceptables semblent montrer que le taux cellulaire de 8-oxoGuo dans l'ARN nucléaire est très légèrement supérieur à celui de la 8-oxodGuo dans l'ADN (*Figure 59*). Un point important concerne le fait que la $\frac{1}{2}$ vie de l'ARN est plus courte que pour l'ADN. De plus, il n'est pas encore connu qu'il existerait des systèmes de réparation de l'ARN.

Figure 59 : Formation cellulaire de 8-oxodGuo et 8-oxoGuo en fonction de la dose d'irradiation.



Comme on peut le remarquer, il semble que le taux des lésions formées avec la dose d'irradiation augmente de façon identique pour l'ADN et l'ARN. L'effet des rayonnements ionisants n'est donc pas comparable avec celui obtenu lors du traitement par H₂O₂.

Par la suite, nous nous sommes rendus compte qu'il était plus judicieux de travailler avec du matériel qui n'a pas été en contact avec les RNAses. En effet, les RNAses sont présentes un peu partout et notamment sur les mains. De plus, nous avons décidé de garder le premier tampon de lyse A et de réduire son volume à 600 µL afin de quantifier les lésions de l'ARN cytoplasmique. Ce dernier est traité par la protéase puis précipité en même temps que le mélange ADN/ARN nucléaire. Ainsi, une variante (**Annexe 9**) du protocole standard a été établie pour extraire l'ADN et les ARN cytoplasmique et nucléaire. Les premiers essais de quantification montrent que les taux de 8-oxoGuo dans l'ARN nucléaire et cytoplasmique sont voisins de ceux de la 8-oxodGuo dans l'ADN nucléaire. Ce travail doit être poursuivi pour confirmer ces données.

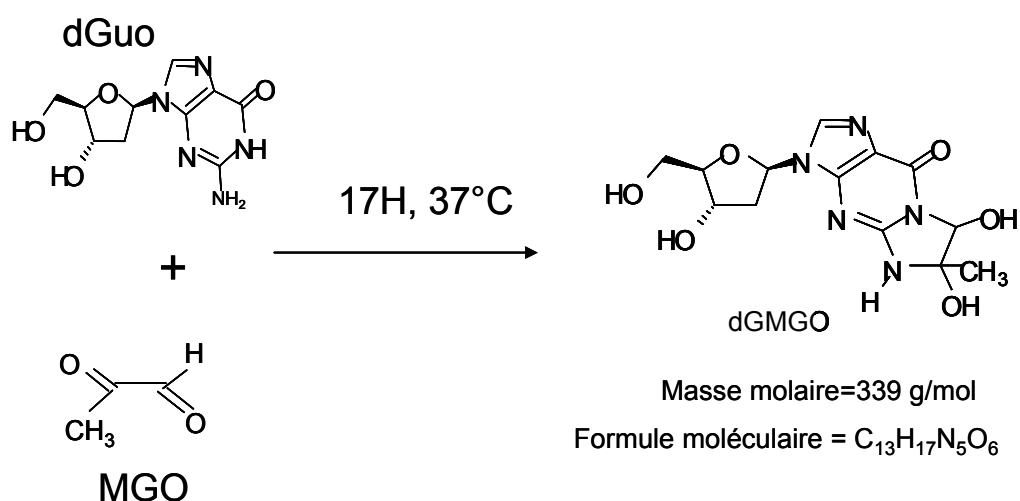
7.2.7 L'adduit de la dGuo avec le MGO : le dGMGO

7.2.7.1 Synthèse de l'adduit et de son standard interne

Le travail de synthèse de cet adduit dGMGO ainsi que sa caractérisation chimique par RMN a été réalisé au laboratoire par M^{elle} Lucie Mollard, étudiante en BTS.

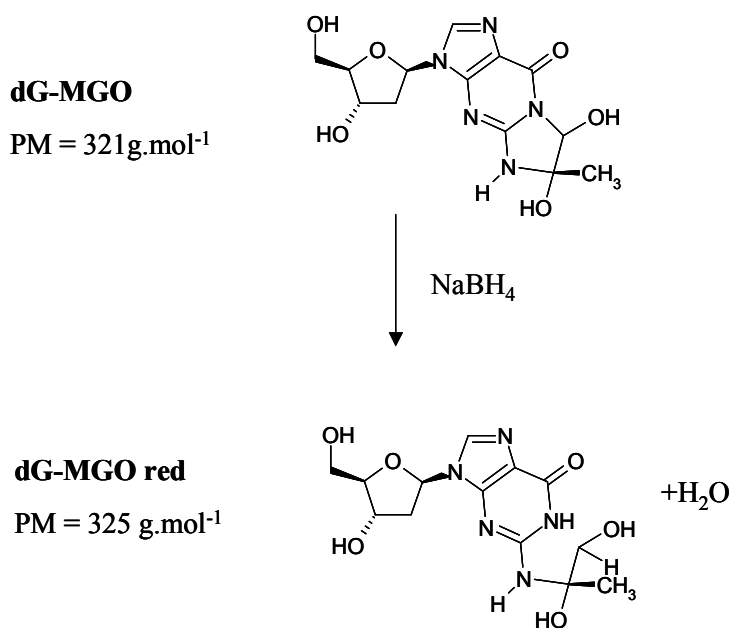
Cette synthèse est le résultat de la réaction entre le MGO (Sigma[®]) et la dGuo pendant 17heures à 37°C (*Figure 60*)

Figure 60 : Synthèse du dGMGO.



Ayant purifié une quantité importante de dGMGO par CLHP-UV ($\lambda=260\text{nm}$), un spectre RMN a pu être réalisé afin de déterminer la structure chimique du produit synthétisé. Cependant, les résultats obtenus ont permis ensuite de mettre en évidence une instabilité de cette lésion qui tend à redonner spontanément de la dGuo et du MGO ($1/2$ vie estimée de 2h30). Il est apparu alors nécessaire de trouver une solution pour stabiliser cet adduit avant de l'analyser. Cette stabilisation a été obtenue en réduisant cet adduit par le NaBH₄ (*figure 61*).

Figure 61: Réduction du dGMGO par le NaBH₄.

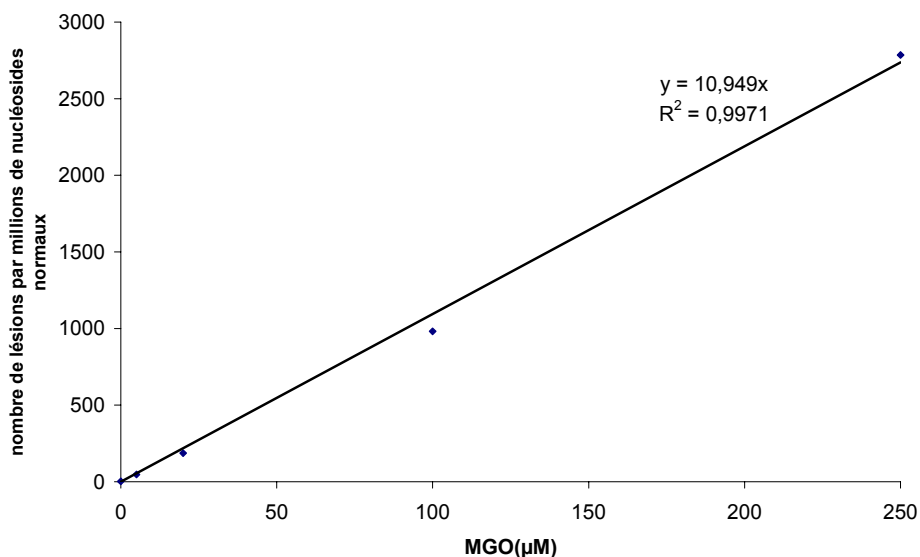


C'est alors que les analyses réalisées par CLHP-SM/SM ont été faites non pas sur le dGMGO mais sur le produit de réduction appelé **dGMGO red**. Ces deux produits possèdent tous deux un carbone asymétrique et donc deux diastéréoisomères. Ils seront désignés ainsi dGMGO iso 1 et iso2. De plus, l'excellent travail de M^{lle} Lucie Mollard a aboutit également à la synthèse et la purification du standard interne dGMGO red M+5 à partir de dGuo M+5, c'est-à-dire avec 5 azotes ¹⁵N.

7.2.7.2 .Cellules traitées avec du MGO et optimisation de son extraction

Suite à une mise en évidence de la formation du dGMGO par application de MGO sur de l'ADN isolé (*Figure 62*), nous nous sommes penchés sur la question de sa formation cellulaire.

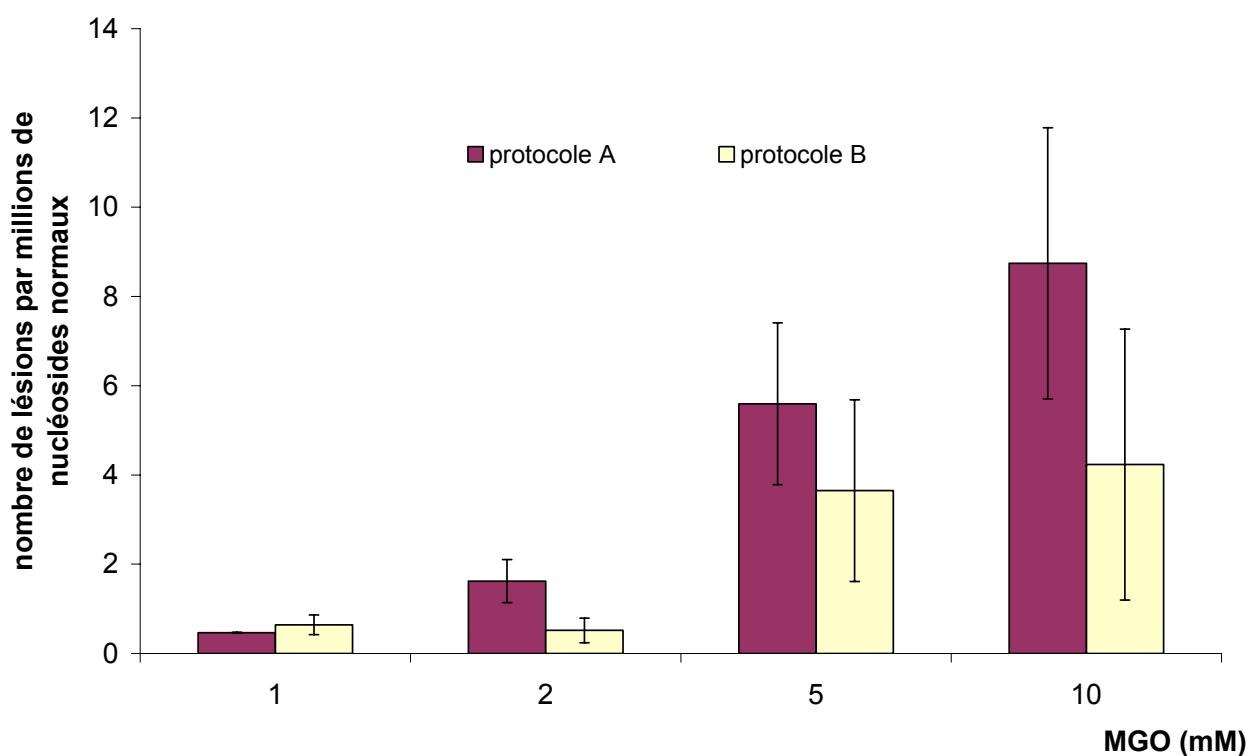
Figure 62: Formation de dGMGO par action de MGO sur l'ADN isolé



Il est remarquable de constater que la formation de l'adduit dGMGO par traitement d'ADN isolé à l'aide de concentrations μ Molaire de MGO donne des taux de l'ordre de 100 à 2500 lésions par millions de bases normales.

Afin de rendre compte de la formation cellulaire du dGMGO, nous avons traité des cellules en culture, de type THP1, avec différentes concentrations de MGO (de 0 à 10mM). L'optimisation de cette mesure de dGMGO cellulaire a concerné notamment le moment de la réduction. En effet, comme l'adduit dGMGO est instable, il a paru nécessaire de le réduire le plus rapidement possible. La *figure 63* montre le taux de dGMGO formé dans les cellules THP1 lorsque ces dernières sont exposées à une concentration croissante de MGO et que la réduction est faite soit après le tampon B (**protocole A**), soit à la fin de l'extraction (**protocole B**).

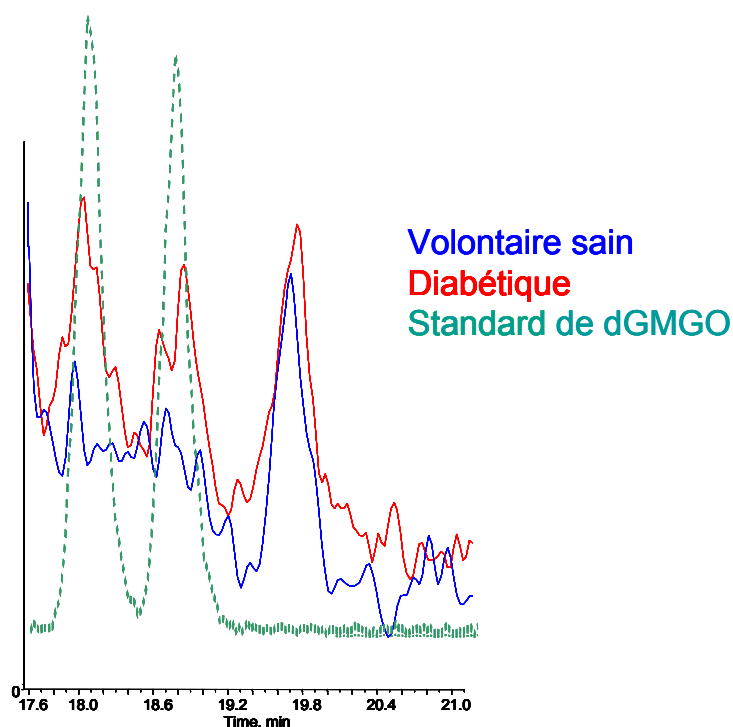
Figure 63 : dGMGO cellulaire en fonction de la quantité de MGO et du moment de la réduction.



Les différents essais réalisés montrent qu'il est nécessaire de faire plutôt la réduction après la lyse des noyaux, c'est-à-dire au moment du tampon B. Dans le cas du dosage de l'adduit du dGMGO, le protocole standard d'extraction est de ce fait légèrement modifié (**Annexe 10**). Les taux obtenus dans l'ADN cellulaire sont de l'ordre de 10 lésions par millions de bases normales pour des concentrations de l'ordre de 10 mM de MGO, soit 100 fois plus importante que pour générer cette lésion au niveau de l'ADN isolé.

La *figure 64* représente le chromatogramme du dosage du dGMGO fait dans le cas d'un patient diabétique et dans le cas d'un volontaire sain par extraction de l'ADN de leucocyte en utilisant la méthode appropriée (Annexe 10).

Figure 64 : Chromatogramme du dGMGO red



Comme on peut le constater, les deux pics des diastéréoisomères du dGMGO red sont superposés dans le cas du patient diabétique et du standard de dGMGO red, alors qu'il n'y a pas de pic pour le volontaire sain. Ceci laisse à supposer qu'il est possible de quantifier le dGMGO dans le cas de sujets diabétiques.

7.3 Les lésions mesurées dans la pathologie du diabète

La pathologie du diabète a un rôle direct avec le stress oxydant, comme évoqué précédemment. Il se trouve également que le diabète comporte un caractère inflammatoire et dans le cas du type II une dyslipidémie souvent associée. Ainsi, le candidat « diabète » paraît être l'exemple idéal pour ce travail de validation biologique de l'utilisation des différents types de biomarqueurs puisqu'il comporte les trois origines possibles des lésions formées dans ses caractéristiques pathologiques. De plus, un autre point de vue le concernant nous a amené à étudier un autre type de lésion concernant le dGMGO puisqu'il est observé une forte augmentation du MGO dans le diabète,

ceci pourrait alors en faire un biomarqueur spécifique du diabète et de ses complications, notamment cardiovasculaires.

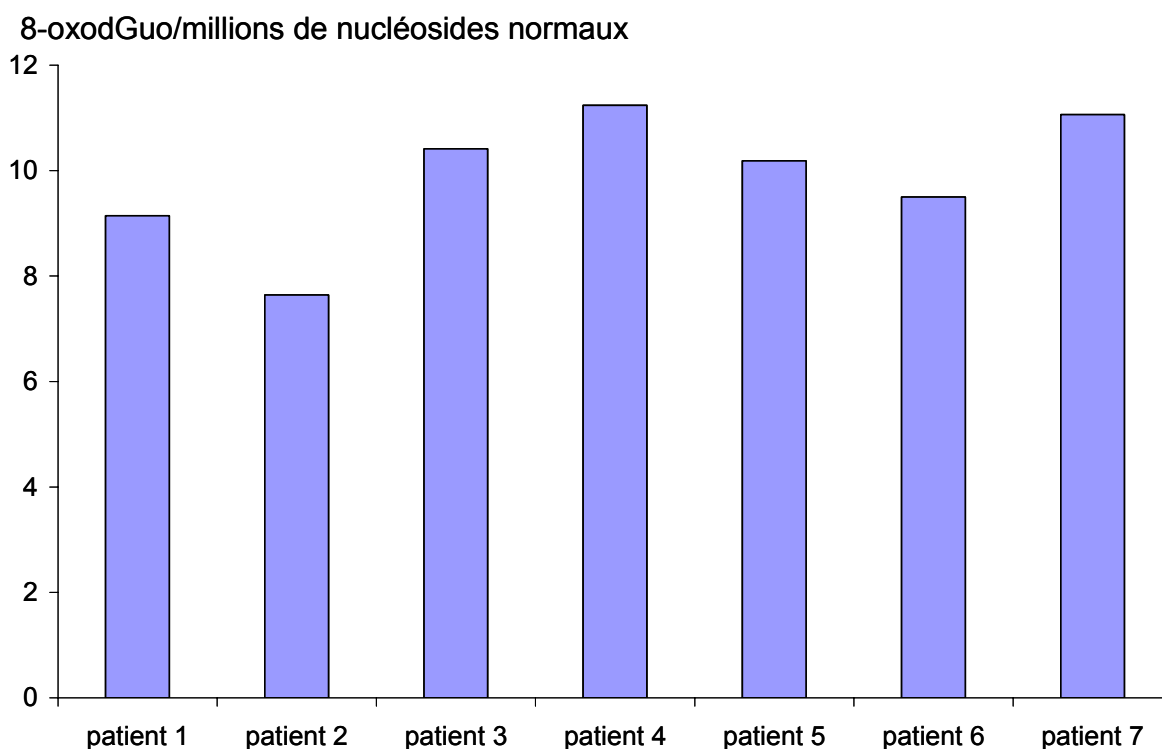
7.3.1 Etude préliminaire

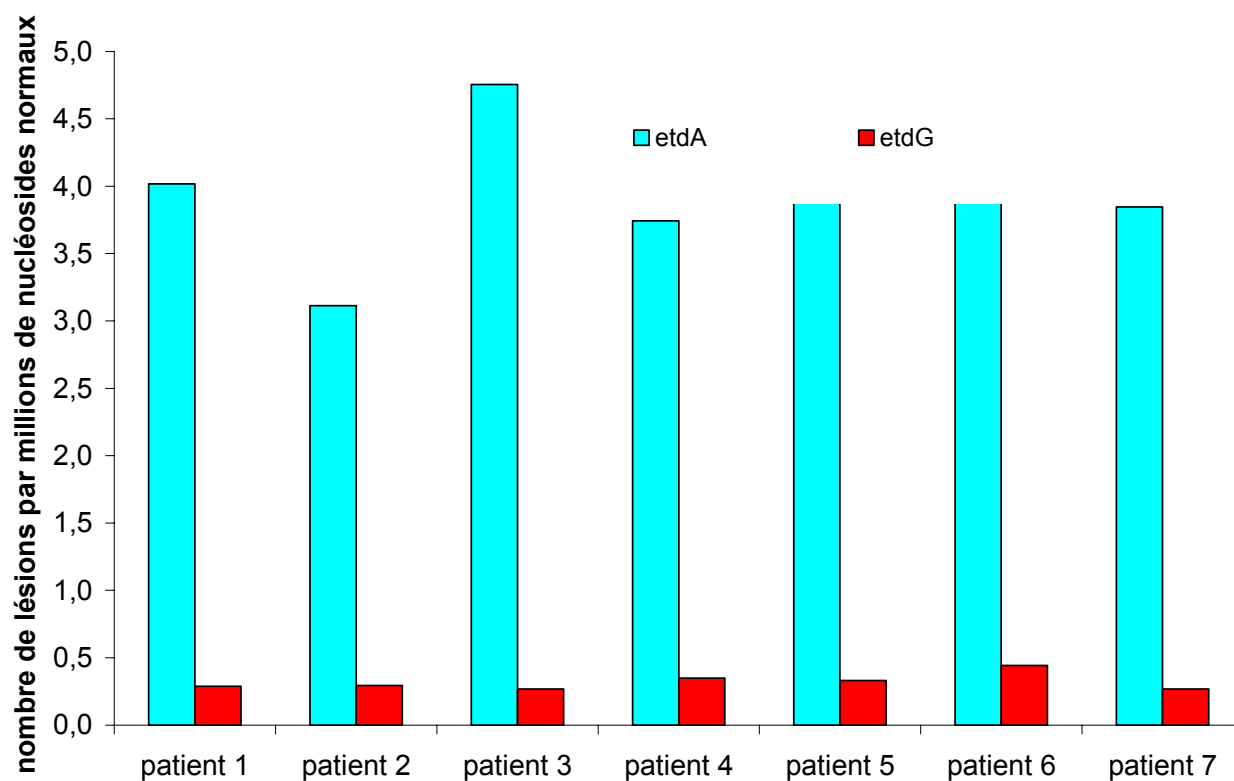
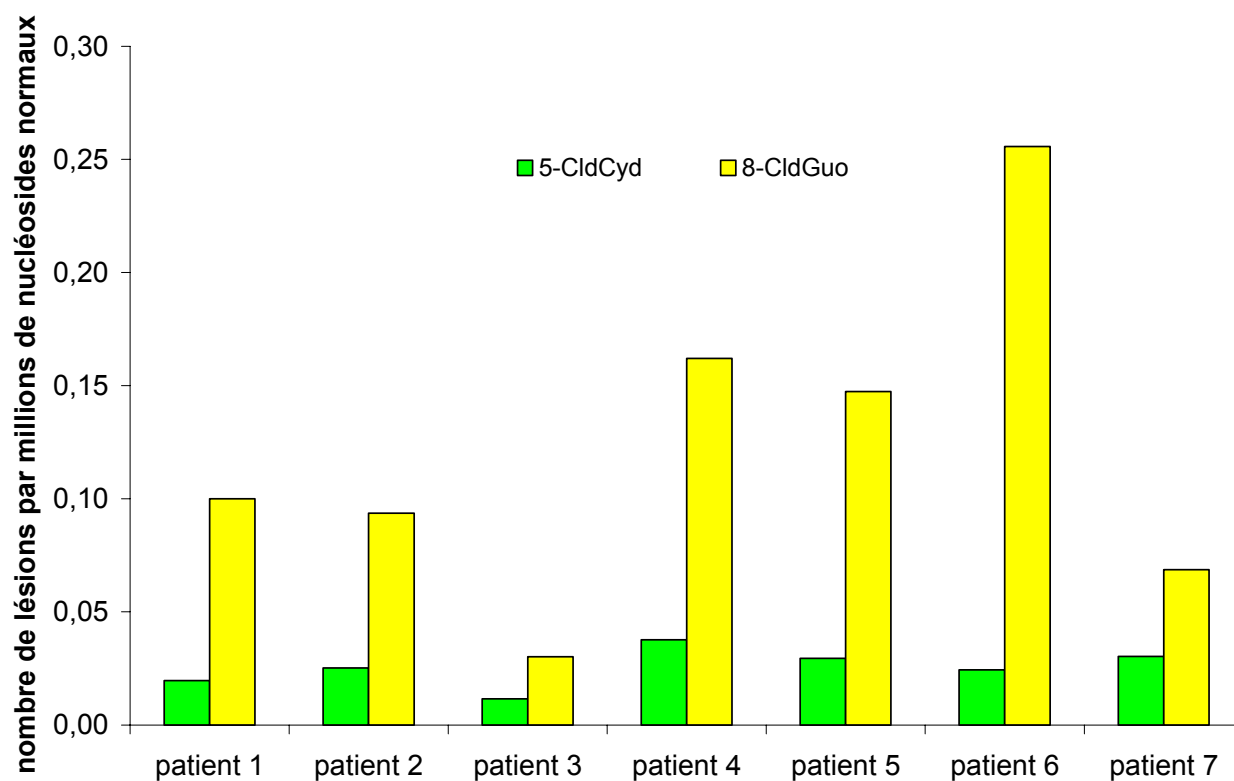
Dans un premier temps, une première étude a été réalisée sur un petit groupe de patients diabétiques (type I et II confondus) hospitalisés dans le service de diabétologie du Pr S. Halimi au CHU de Grenoble.

Chaque prélèvement d'un CPT a été réalisé tôt le matin à jeun et techniqué au DBI par un technicien du secteur de Mr Patrice Faure. La méthode d'extraction de l'ADN utilisée dans ce cas est la méthode classique (Annexe 7), sans la réduction par la NaBH_4 pour le dosage de dGMGO qui n'était pas encore mis au point.

Les taux des différentes lésions mesurées sont regroupés sur la *figure 65*.

Figure 65 : Taux de 8-oxodGuo, de 5-CldCyd, de 8-CldGuo et des éthénonucléosides mesurés





Dans le cas de ces patients diabétiques (n=7), les résultats varient inter-individuellement avec des taux allant cette fois-ci de 7 à 11 8-oxodGuo pour 10^6 nucléosides normaux ce qui est environ deux fois supérieur aux taux mesurés chez les volontaires sains étudiés auparavant.

Le taux de la 5-CldCyd des ces patients varie de 0,02 à 0,03 par millions de nucléosides normaux pour 7 patients diabétiques, ce qui est nettement inférieurs aux données des volontaires sains.

Quant au dosage des autres lésions oxydatives et chlorées dans les lymphocytes et cellules mononuclées (Gly-Thd, 5-HMUrđ, 8-oxoGuo, 8-oxoGua, 8-oxoAdo, 8-CldGuo et 8-CldAdo), la quantité doit être inférieure à 0,2 lésions par million de nucléosides normaux.

En ce qui concerne le taux des éthénonucléosides, celui de l'εdAdo est en moyenne bien plus élevé que celui de l'εdGuo. Si on compare ces données aux valeurs obtenues chez les volontaires sains, le taux d'εdGuo est proche de celui des témoins tandis que celui de l'εdAdo est environ 4 fois plus élevé chez ces patients diabétiques.

Le tableau de la figure 66 récapitule les moyennes et écart-types des lésions mesurées chez ces patients diabétiques par rapport aux volontaires sains mesurés auparavant :

Figure 66 : Taux des lésions mesurées dans l'étude préliminaire du diabète en comparaison avec des volontaires sains non apparentés

Lésions	Patients diabétiques : taux moyen/10 ⁶ nucléosides normaux	Volontaires sains : taux moyen/10 ⁶ nucléosides normaux	
8-oxoGuo	9,88+/-1,24 (n= 7)	4,15+/-2,19(n=6)	0,664+/-0,405(n=12)
5-CldCyd	0,025+/-0,008(n= 7)	0,128+/-0,06(n=6)	0,847+/-0,393(n=12)
8-CldGuo	0,123+/-0,074(n= 7)	0,130+/-0,06(n=6)	0,033+/-0,04(n=12)
εdGuo	0,32+/-0,06(n= 7)	0,47+/-0,2(n=6)	0,104+/-0,058(n=12)
εdAdo	3,93 +/- 0,49(n= 7)	1,05+/-0,25(n=6)	0,253+/-0,057(n=12)

Les taux des patients diabétiques paraissent ici très élevés par rapport à ceux des témoins précédemment dosés et peuvent être du à la pathologie du diabète. Cependant, les témoins ne sont pas apparentés aux sujets diabétiques et ceci peut créer un biais supplémentaire de la différence observée entre ces deux groupes. Il reste donc à confirmer ces valeurs, et ceci a été réalisé lors d'une deuxième étude, plus précise et réalisée entièrement par mes soins.

7.3.2 Etude randomisée, diabétiques de type II

Dans le but d'essayer de confirmer les résultats obtenus dans l'étude préliminaire, une nouvelle étude clinique a été menée sur un groupe de 20 patients diabétiques, avec cette fois-ci des témoins apparentés. Les patients sont des sujets diabétiques hospitalisés dans le service de diabétologie du Pr S. Halimi au CHU de Grenoble. Un prélèvement d'un tube CPT et d'une miction

urinaire ont été réalisés à leur entrée et sera désigné **J0**. Afin de voir si le taux de lésions peut varier au cours de leur séjour à l'hôpital, un deuxième prélèvement identique a été réalisé 8 jours plus tard : c'est le prélèvement **J8**.

Nous avons décidé de choisir les critères suivants d'inclusion dans l'étude : sujets de 50 à 60 ans, une dizaine d'hommes et une dizaine de femmes, tous non fumeurs. Les sujets diabétiques qui ont été inclus dans cette deuxième étude sont majoritairement de type II avec une HbA1c supérieure à 8%. Par ailleurs, d'autres dosages biochimiques ont été réalisés au DBI : la glycémie, un bilan lipidique (cholestérol total, LDL, HDL, triglycérides) et la créatinine urinaire.

7.3.2.1 Lésions de l'ADN mesurées dans les leucocytes circulants.

Chaque prélèvement d'un CPT a été réalisé tôt le matin à jeun et techniqué au DBI par mes soins dans l'heure qui a suivi le prélèvement, ce qui n'était pas le cas dans l'étude préliminaire.

Dans cette étude, les patients ont été inclus au fur et à mesure. Quant tous les prélèvements des 20 patients ont été réalisés (20 J0 et 20 J8), l'extraction de l'ADN a été réalisée selon le protocole réduit avec le NaBH₄ (Annexe 10) et ceci afin de tenter de mesurer le dGMGO. Il est à noter ici que des essais préliminaires d'extraction simultanée par la méthode classique et la méthode réduite ont été réalisés chez 5 volontaires sains afin de voir si la réduction n'influencerait pas le taux des lésions oxydatives, chlorées et des éthénonucléosides. Ces résultats ne sont pas présentés ici mais il n'a pas été mis en évidence de variation des taux de ces lésions d'une méthode d'extraction à l'autre. Il n'a pas également été possible de quantifier le dGMGO chez ces volontaires. Finalement, la digestion enzymatique a été faite en même temps pour les témoins et les diabétiques afin de ne pas entraîner de biais de manipulation.

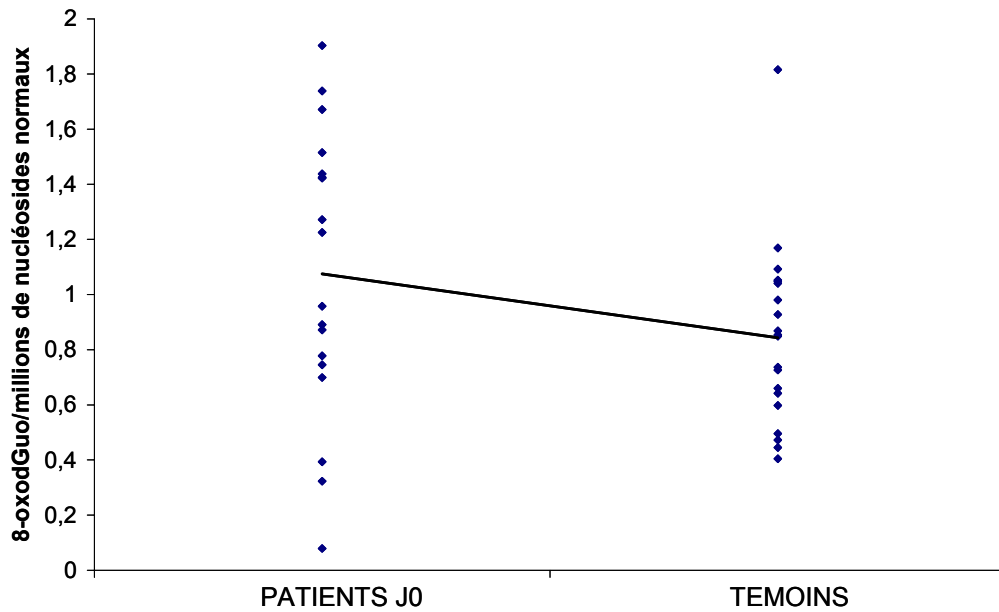
Les résultats obtenus concernant les différentes lésions et groupe de sujets étudiés sont comparés de la manière suivante :

- Valeurs des lésions des Témoins comparés aux Patients à J0
- Valeurs des lésions des Patients à J0 comparés aux Patients à J8

Les différents graphiques des *figures 67,68 et 69* représentent les taux des lésions suivantes : 8-oxodGuo, εdGuo et εdAdo en nombre de lésions par millions de nucléosides normaux dans les leucocytes circulants. Concernant le taux des lésions chlorées et du dGMGO, les résultats sont en dessous de la limite de quantification, c'est-à-dire :

- <0,01 5-CldCyd/millions de nucléosides normaux
- <0,07 8-CldGuo/millions de nucléosides normaux
- <0,09 8-CldAdo/millions de nucléosides normaux
- <0,2 dGMGO/millions de nucléosides normaux

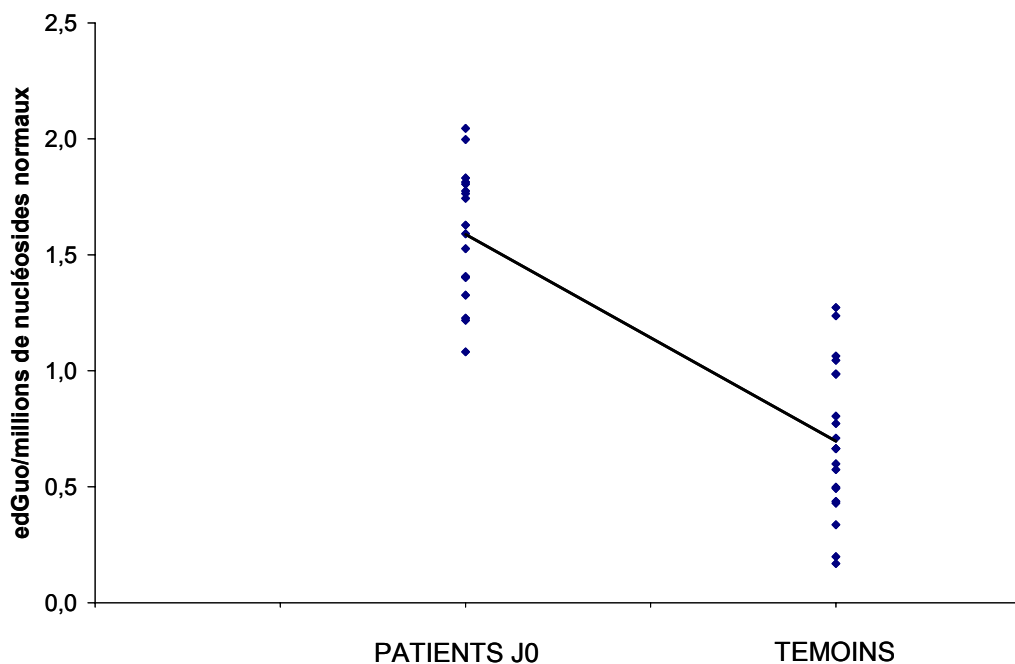
Figure 67 : Taux de 8-oxodGuo cellulaire.



Le taux de 8-oxodGuo obtenu est plus fort dans le groupe de patients à J0 par rapport au taux obtenus dans le groupe de témoins. De plus, il semble que ce taux diminue 8 jours après l'entrée dans le service de diabétologie pour se rapprocher de celui des témoins (voir valeurs *figure 70*).

Ce qui est assez surprenant dans cette étude concerne le taux de 8-oxodGuo puisqu'il varie seulement de 1 à 2 lésions par millions de nucléosides normaux tandis que dans l'étude préliminaire, il était en moyenne de 10. Il est possible que ceci soit dû au type de diabète ou plutôt au temps attendu avant de techniquer les CPT.

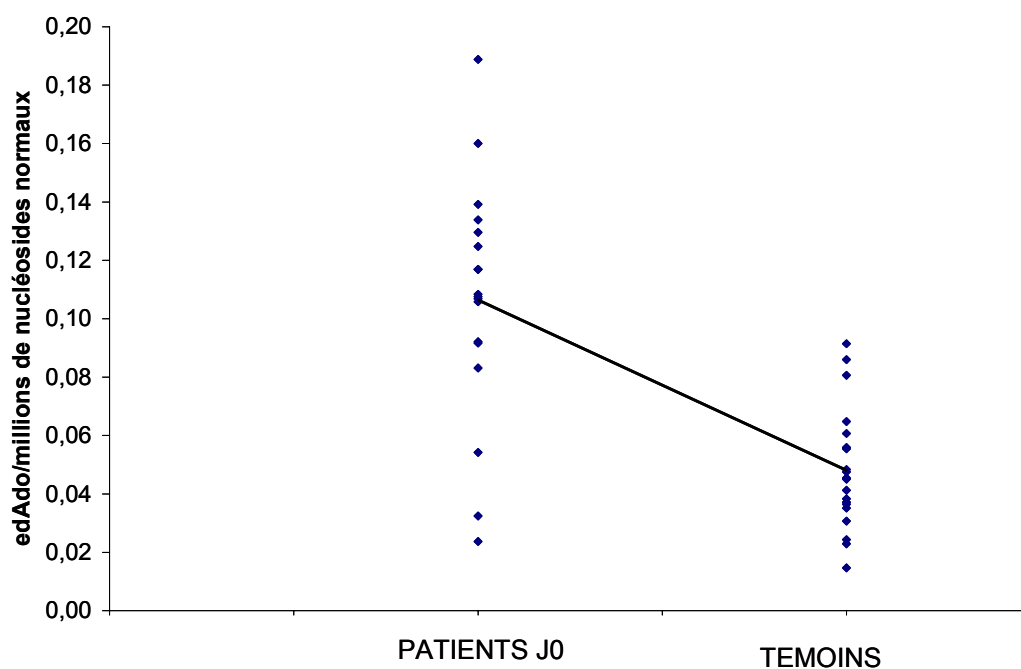
Figure 68 : Taux d'edGuo cellulaire



Le taux d'édGuo obtenu est presque deux fois plus fort dans le groupe de patients à J0 par rapport au taux obtenus dans le groupe de témoins. De plus, il semble que ce taux diminue 8 jours après l'entrée dans le service de diabétologie, comme pour la 8-oxodGuo.

Ce qui est à remarquer également concerne le taux d'édGuo précédemment obtenu pour l'étude préliminaire qui était proche puisqu'il était de 0,32 lésions par millions de nucléosides normaux dans le groupe des 7 sujets diabétiques.

Figure 69 : Taux d'édAdo cellulaire



Le taux d'édAdo obtenu est presque deux fois plus fort dans le groupe de patients à J0 par rapport au taux obtenus dans le groupe de témoins et suit donc la même évolution que celui de l'édGuo. De plus, il semble que ce taux diminue 8 jours après l'entrée dans le service de diabétologie.

Par contre, il existe une très nette différence entre le taux d'édAdo obtenu dans l'étude préliminaire puisque celui-ci était d'environ 4 lésions par millions de nucléosides normaux et que dans ce cas, il est 100 fois plus faible. Il est surprenant de constater une telle différence difficilement explicable.

Le tableau de la *figure 70* résume les valeurs obtenues dans le cas des deux études chez les patients diabétiques.

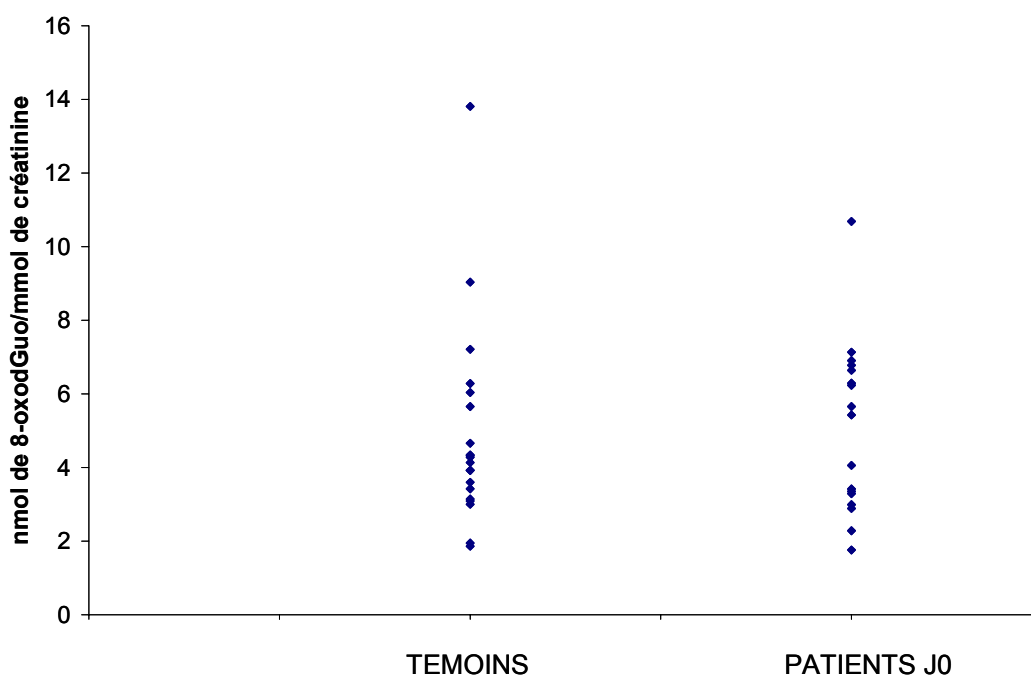
Figure 70 : Taux des lésions mesurées dans les deux études réalisées sur le diabète.

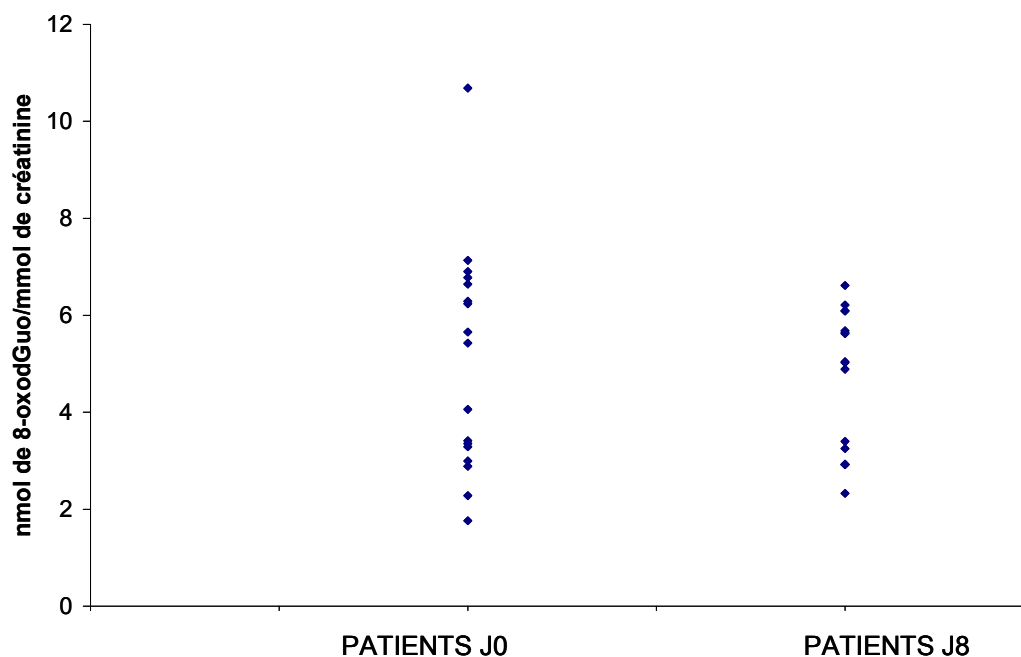
Lésions	Patients diabétiques : taux moyen/10 ⁶ nucléosides normaux	Volontaires sains
ETUDE PRELIMINAIRE		
8-oxodGuo	9,88+/-1,24 (n= 7)	Pas de volontaires sains apparentés.
5-CldCyd	0,025+/-0,008(n= 7)	
8-CldGuo	0,123+/-0,074(n= 7)	
εdGuo	0,32+/-0,06(n= 7)	
εdAdo	3,93 +/- 0,49(n= 7)	
20 PATIENTS DIABETIQUES DE TYPE II ET TEMOINS APPARENTES		
8-oxodGuo	J0 : 1,075 +/- 0,518 et J8 : 0,844 +/-0,310	0,787 +/- 0,206
εdGuo	J0 : 1,561 +/-0,262 et J8 : 0,812 +/- 0,614	0,612 +/- 0,287
εdAdo	J0 : 0,105 +/- 0,042 et J8 : 0,078 +/- 0,136	0,045 +/- 0,018

7.3.2.2 Lésions de l'ADN mesurées dans les urines

Le dosage de la 8-oxodGuo et de la créatinine urinaire ont permis d'obtenir les résultats représentés en figure 71.

Figure 71 : 8-oxodGuo urinaire (nmol/mmol de créatinine)





Comme nous pouvons le constater sur ces figures, il ne semble pas y avoir de variation importante du taux urinaire dans aucun des groupes de sujets. Nous avons également tenté de doser les éthénonucléosides dans l'urine mais leur taux est sans doute en dessous de la limite de quantification.

7.4 Les lésions mesurées dans l'étude des cancers traités par radiothérapie

7.4.1 Objectifs de l'étude

La capacité d'obtenir des données quantitatives et qualitatives sur le stress oxydant subit par les tissus irradiés et ses conséquences en termes de lésions moléculaires mérite d'être évaluée dans la perspective des questions suivantes :

- Après irradiation, la quantité de lésions obtenues peut-elle être prédictive du rapport bénéfice/risque encouru par le patient traité et notamment en ce qui concerne l'éventualité de développer un cancer secondaire de part la nature des lésions mutagènes ou non et de leur quantité mesurée dans les cellules saines circulantes ?
- A distance de l'irradiation, la persistance ou la disparition de la production de lésions pourrait-elle avoir une valeur prédictive de l'apparition de complications tardives de la radiothérapie ? Serait-il possible d'établir une relation entre les volumes irradiés et les taux de lésions observées ? Et, si oui, quelle serait la signification en terme de réponse ou de risque de complication des écarts importants par rapport aux moyennes qui pourraient être définis ?

La plupart des patients traités par radiothérapie reçoivent aussi un traitement par chimiothérapie agissant principalement sur l'ADN des cellules tumorales. Comme les cellules saines sont également affectées par ces médicaments anticancéreux, il a été choisi d'évaluer le taux de lésions chez des patients recevant une radiothérapie sans chimiothérapie concomitante pour évaluer le signal dû aux seuls rayons X.

Ainsi, il a été choisi d'inclure une vingtaine de patients recevant une radiothérapie sans chimiothérapie. Les doses reçues par séance pourront être variables.

La chronologie du suivi a donc été la suivante :

- Le prélèvement désigné « **1/4** » a été effectué immédiatement **avant** la première séance de radiothérapie.
- Le prélèvement désigné « **2/4** » a été effectué immédiatement **après** la première séance de radiothérapie, soit environ 30 minutes à 1 heure après la séance.
- Le prélèvement désigné « **3/4** » a été effectué immédiatement **avant** la dernière séance de la première semaine de radiothérapie, c'est-à-dire en général à la fin de la première semaine de traitement.
- Le prélèvement désigné « **4/4** » a été effectué immédiatement **avant** la dernière séance de radiothérapie et correspond en général à une durée de 4 semaines totales de traitement.

Chaque prélèvement comportait un tube CPT et une miction urinaire.

Les tubes CPT ont été techniqués au DBI par mes soins environ 1 heure après chaque prélèvement.

7.4.2 Lésions de l'ADN mesurées dans les cellules

Les mesures des différentes lésions de l'ADN des leucocytes circulants n'ont été faites que pour 8 des 20 patients car il n'a pas été possible d'inclure plus de patients dans l'étude jusqu'à ce jour. Les *figures 72, 73 et 74* représentent les taux obtenus pour la 8-oxodGuo, l'édAdo et l'édGuo pour les 4 prélèvements de chaque patient.

Concernant le taux des lésions chlorées, les résultats sont en dessous de la limite de quantification, c'est-à-dire :

<0,01 5-CldCyd/millions de nucléosides normaux

<0,07 8-CldGuo/millions de nucléosides normaux

<0,09 8-CldAdo/millions de nucléosides normaux

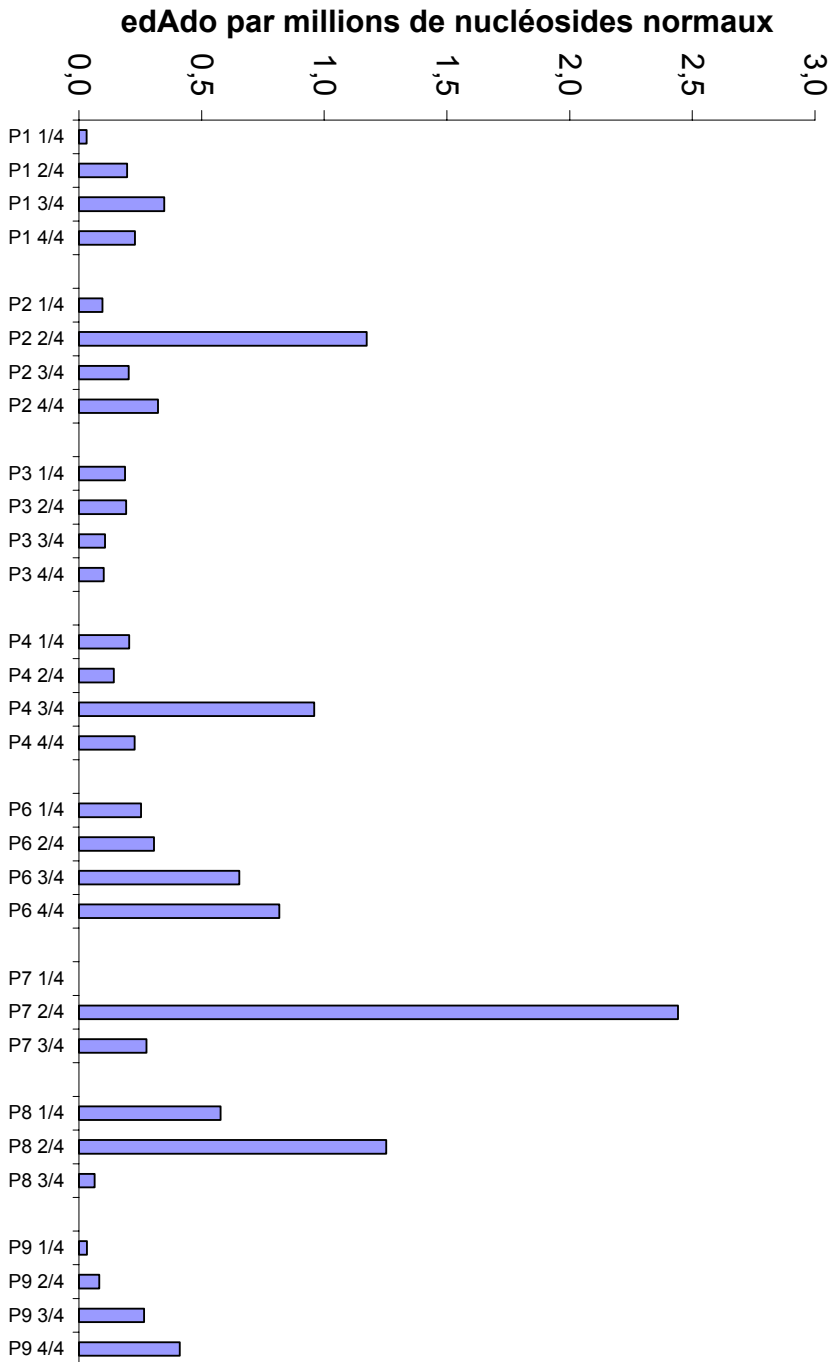


Figure 73 : Taux d'edAdo dans les leucocytes circulants.

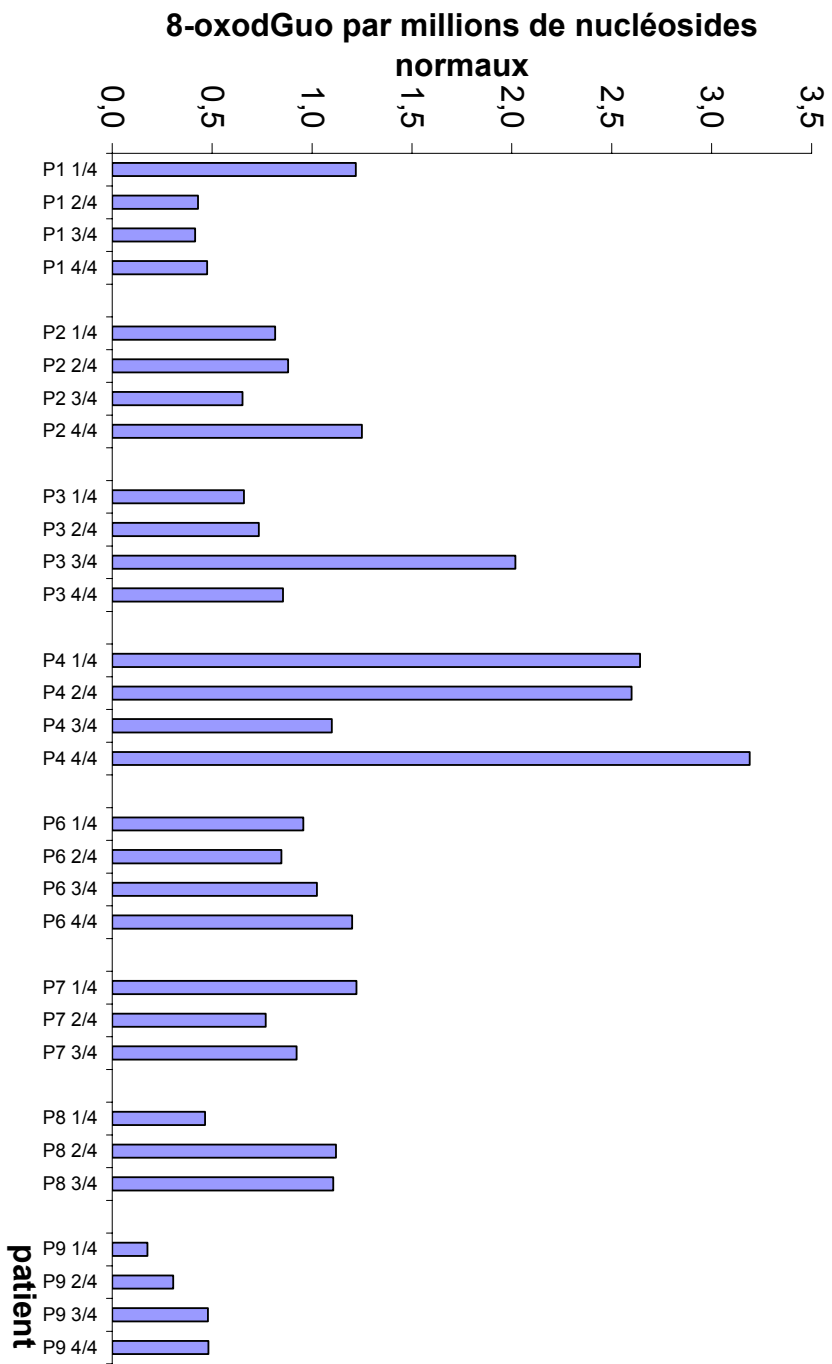
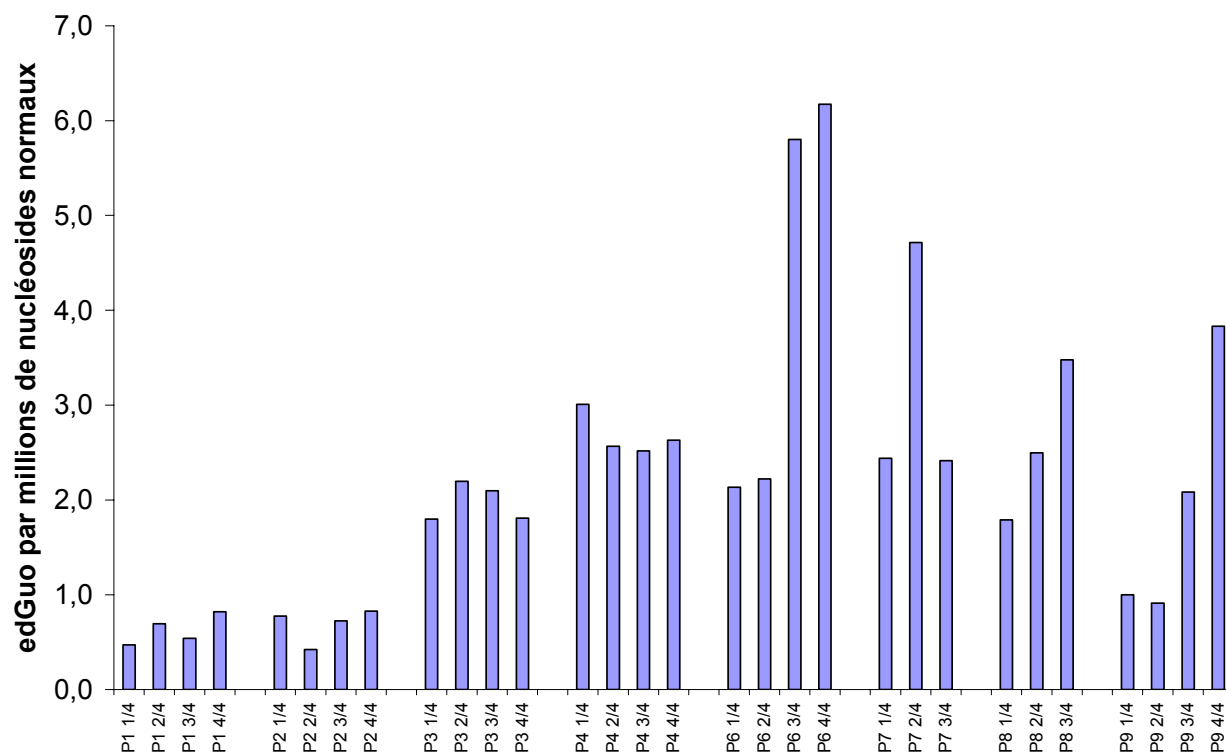


Figure 72 : Taux de 8-oxodGuo dans les leucocytes circulants.

Figure 74 : Taux d'édGuo dans les leucocytes circulants.



Les trois histogrammes précédents permettent de mettre en évidence une variation du taux des lésions mesurées au cours du traitement de radiothérapie. Quant à la 8-oxodGuo, il ne semble pas que ce taux augmente avec la dose d'irradiation cumulée. En ce qui concerne les éthénonucléosides, il semble que le taux d'édAdo augmente jusqu'au prélèvement 3/4 puis semble diminuer ensuite. Les données obtenues pour l'édGuo montrent d'avantage une augmentation du taux au fur à mesure du traitement.

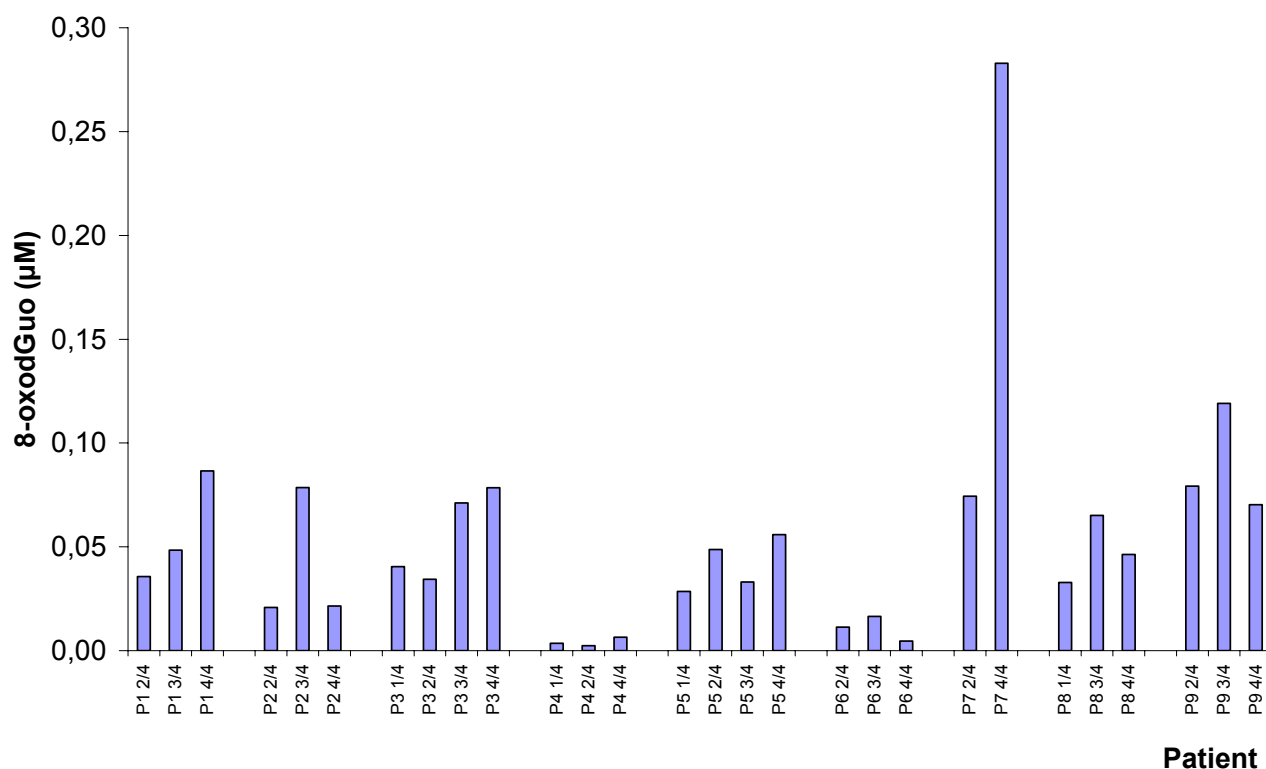
Il serait intéressant de tenter de corrélérer ces données avec la dose d'irradiation accumulée et le volume irradié mais ces données ne sont pas encore toutes disponibles. De plus, il serait intéressant de refaire un prélèvement post traitement c'est-à-dire au moins un mois après le prélèvement 4/4 afin de se rendre compte si le taux des lésions est revenu à la normale ou bien s'il reste élevé. Ceci n'a pas été possible car il aurait fallu reconvoqué les patients de cette étude car ils ne reviennent plus à dans le service de radiothérapie après leur traitement.

Suite à la présentation des résultats obtenus dans les deux études cliniques du diabète et de la radiothérapie, on peut donc en conclure qu'il semble que le taux des éthénonucléosides varie plus que les autres lésions de l'ADN.

7.4.3 Lésions de l'ADN mesurées dans l'urine

Comme pour la deuxième étude des patients diabétiques, nous avons réalisé un dosage de la 8-oxodGuo urinaire. Les données de la créatinine urinaire n'étant pas encore disponibles, les résultats sont ici présentés en concentration μM de 8-oxodGuo urinaire dans la *figure 75*.

Figure 75 : Taux de 8-oxodGuo urinaire pour les 9 patients étudiés.



Les taux mesurés sont compris entre 0,01 et 0,25 μM , ce qui n'est pas très différent de celles obtenues pour les volontaires sains. On observe également une variation interindividuelle. De plus, il ne semble pas que les taux augmentent beaucoup avec la dose cumulée. Ceux-ci sont assez variables comme dans le cas de la 8-oxodGuo des leucocytes. Il faudra néanmoins recalculer ses valeurs en fonction de la créatinine pour pouvoir les comparer avec les taux obtenus dans le cas des patients diabétiques.

7.5 Les lésions mesurées dans l'étude SUVIMAX

En 1994, débutait l'étude **SU.VI.MAX** ayant pour but d'évaluer l'effet de la **SU**plémentation en **VI**tamines et **MI**néraux **AntioX**ydants dans une population de 12735 sujets (femmes âgées de 35 à 60 ans et hommes de 45 à 60 ans). Cette étude a duré 8 ans, soit jusqu'en 2002. Elle consistait à mesurer de très nombreuses données, tant cliniques que biologiques [193]. Les participants de

l'étude fournissaient également des renseignements en termes de santé et de régime alimentaire. De plus, l'apparition éventuelle d'un cancer au cours de l'étude a été prise en compte. Les sujets sont encore suivis pour certains, même si la supplémentation s'est achevée en 2002. Les premiers résultats de l'étude [194] ont montré qu'un régime pauvre en vitamines et minéraux antioxydants augmentait l'incidence des maladies cardiovasculaires et de cancers. Cependant, il n'a pas été démontré de différences majeures entre les groupes, placebo ou supplémenté, à la seule exception d'un effet protecteur pour les hommes uniquement. L'établissement d'un taux sérique limite de vitamine C et E a permis de montrer que le risque de développer un cancer est plus important uniquement pour les hommes ayant un taux inférieur à cette limite [195].

Nous avons émis le souhait de participer à cette étude alors qu'elle s'achevait lorsque ma thèse avait déjà débuté. Cependant, nous avons tout de même initié une étude sur des sujets sélectionnés de la manière suivante : sujets SU.VI.MAX rappelés pour lesquels des prélèvements sanguins ont été réalisés en 2003. Les paramètres d'entrée de cette étude concernaient le statut fumeur et la supplémentation.

7.5.1 Etude des lésions

Le choix des sujets rappelés regroupe les critères d'inclusion suivants : hommes ou femmes, statut fumeur ou non fumeur et recevant un complément antioxydant ou placebo.

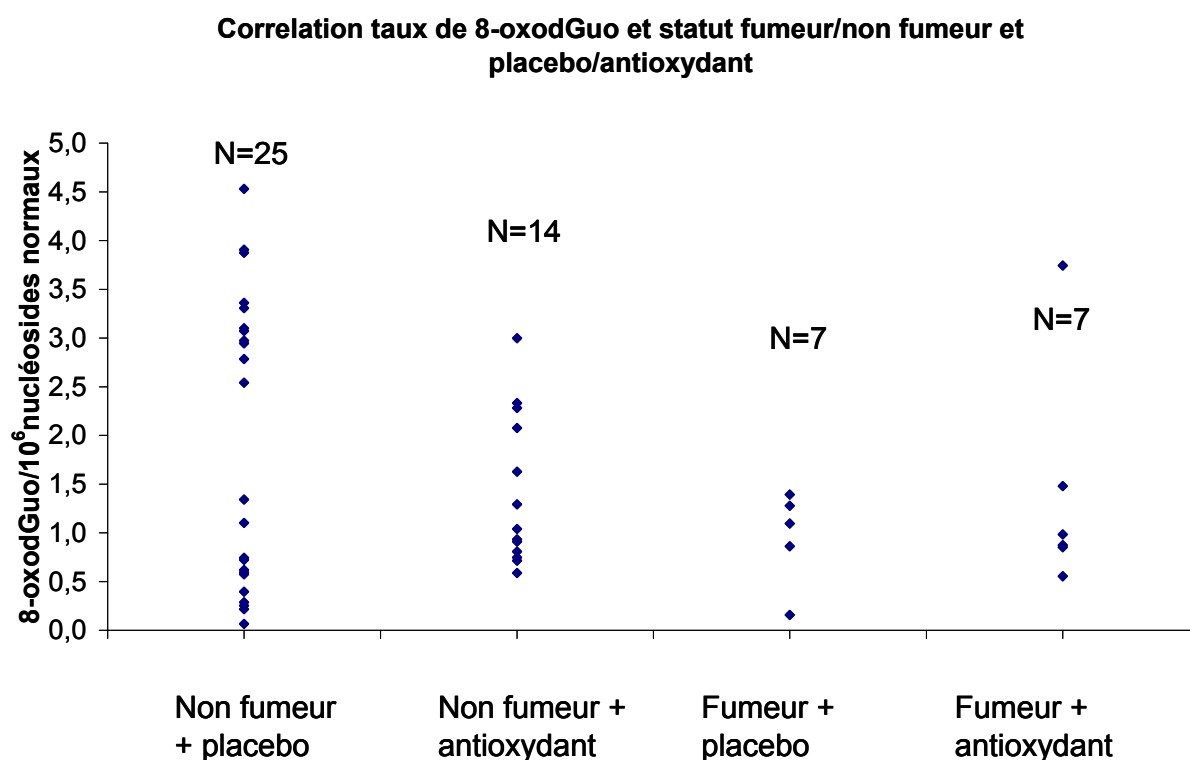
Environ une 60aine de sujets a été ainsi inclus dans cette étude dont le but était de voir si une corrélation peut être mise en évidence entre le taux des lésions dosées et les différents critères d'inclusion. Chaque sujet a été prélevé d'un vacutainer CPT par l'équipe du CNAM de Paris en charge de l'étude SUVIMAX, techniques sur place et les culots cellulaires m'ont été ensuite envoyés. L'extraction, la digestion et l'analyse CLHP-SM/SM ont été réalisées par mes soins au LAN. Les lésions qui ont été quantifiées dans cette étude sont la 8-oxodGuo, la 5-CldCyd, la 8-CldGuo, l'édAdo et l'édGuo. Le tableau de la *figure 76* représente les moyennes et écartype des lésions mesurées.

Figure 76 : Lésions leucocytaires mesurées.

Lésions	Nombre de lésion/10⁶ nucléosides normaux
8-oxodGuo	1,54+/-1,22 (n= 53)
5-CldCyd	0,016+/-0,009 (n= 53)
8-CldGuo	0,049+/-0,045 (n= 53)
édAdo	9,30+/-7,84 (n= 53)
édGuo	0,43+/-0,35 (n= 53)

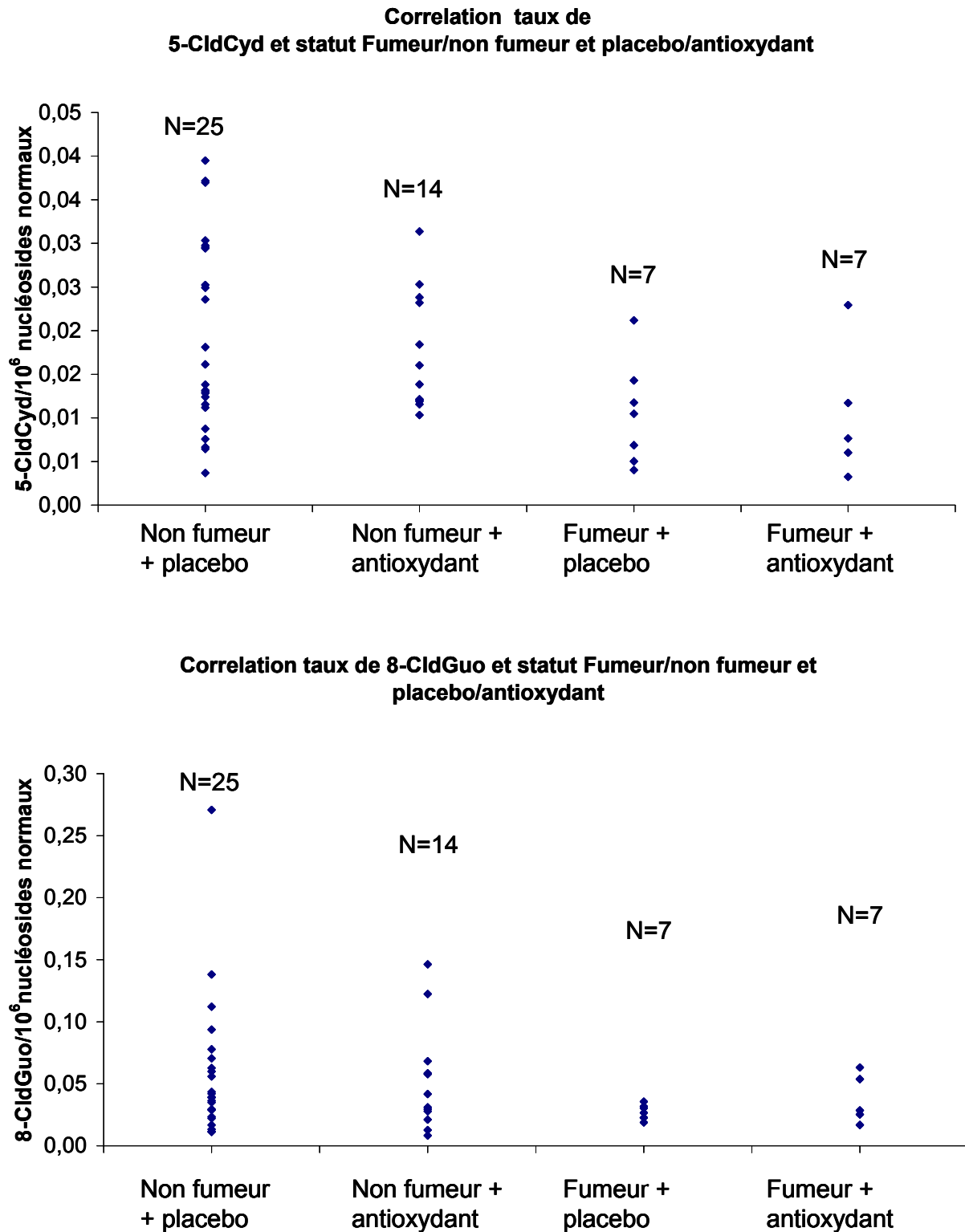
Comme nous pouvons le remarquer dans ce tableau, les valeurs sont très variables et les écartypes sont très importants, c'est pourquoi nous avons tenté de voir s'il était possible de mettre en évidence une corrélation entre les taux obtenus et les caractéristiques des sujets : statut fumeur ou non fumeur, groupe placebo ou antioxydant. Ainsi 4 groupes de sujets sont ainsi distingués. Les figures 77, 78 et 79 représentent respectivement la répartition des taux de 8-oxodGuo, des lésions chlorées, 5-CldCyd et 8-CldGuo et des éthénonucléosides εdAdo et εdGuo dans les différents groupes.

Figure 77 : Taux de 8-oxodGuo cellulaire dans les différents groupes.



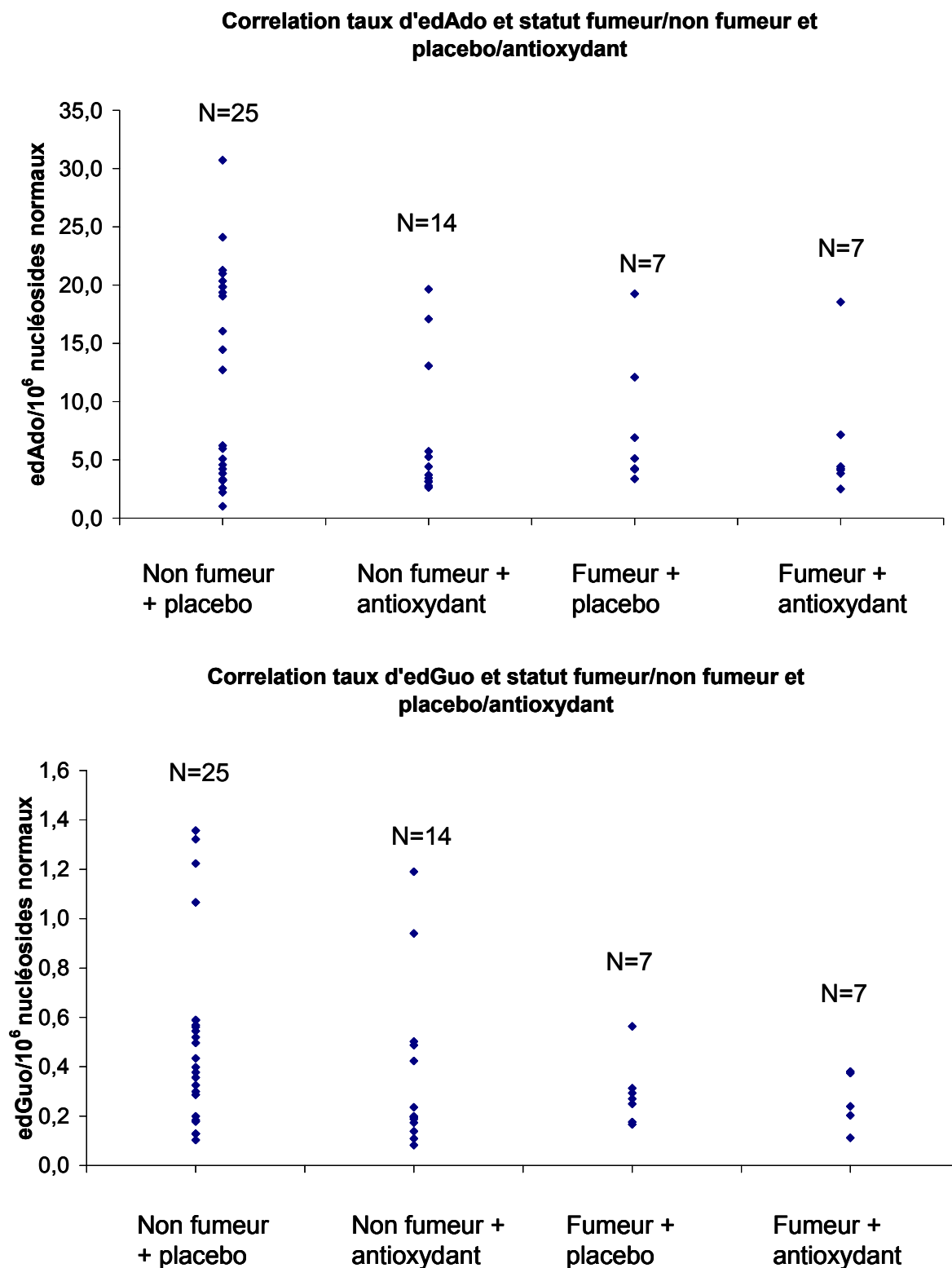
Au vu des ces résultats, il paraît difficile de conclure sur la relation entre le taux de 8-oxodGuo dans les différents groupes. Il semble que le traitement antioxydant permette de diminuer le taux de 8-oxodGuo chez les fumeurs mais le nombre de sujets (7) est insuffisant pour conclure.

Figure 78 : Taux de 5-CldCyd et 8-CldGuo cellulaire dans les différents groupes.



Dans le cas des lésions chlorées, les résultats ne permettent pas de dire si le statut fumeur ou la prise d'antioxydants influence le taux de la 5-CldCyd ou de la 8-CldGuo.

Figure 79 : Taux d'édAdo et d'édGuo cellulaire dans les différents groupes.



Il en est de même dans le cas des éthénonucléosides, les résultats ne permettent pas de dire si le statut fumeur ou la prise d'antioxydants influence le taux d'édAdo ou d'édGuo.

Il semble que cette étude ne permette pas de mettre en évidence une relation entre la supplémentation de sujets et les taux de certaines lésions de l'ADN. Ceci peut être dû notamment au

petit nombre de sujets étudiés par groupe. De plus, comme les sujets ne recevaient plus de supplémentation depuis un an, ceci pourrait également expliquer le fait que l'on ne constate pas de différence importante entre les groupes.

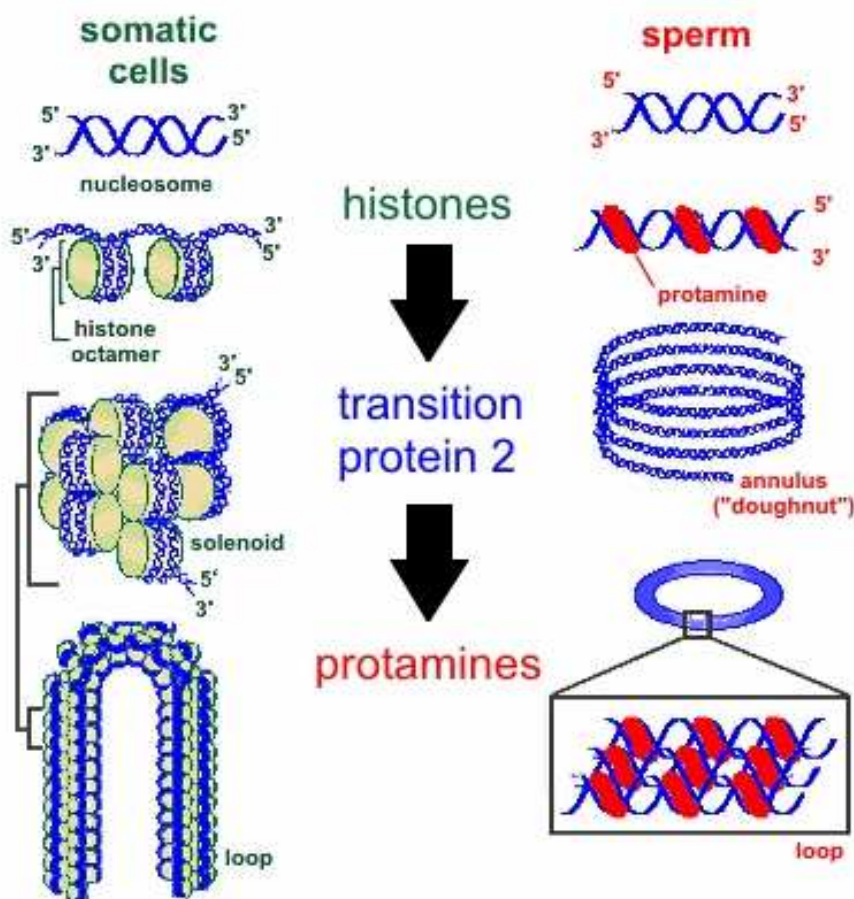
7.6 Les lésions mesurées dans le cas des infertilités masculines

Le manque de compréhension face à des infertilités inexplicables a conduit à se demander s'il est possible de mettre en évidence certains dommages de l'ADN dans les spermatozoïdes. En effet, il est admissible de penser que si ces dommages sont trop importants ou mutagènes, la fécondation ne puisse pas se dérouler dans des bonnes conditions. La question toute naturelle de quantification des lésions vient de l'observation d'une implication possible du stress oxydant dans l'infertilité masculine.

Après obtention des échantillons de sperme, les spermatozoïdes sont isolés à l'aide d'une double séparation par Percoll. Dans ce cas, la technique est tout à fait particulière car il faut être rapide et précis pour perdre le moins possible de spermatozoïdes, très fragiles dans le milieu extérieur. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Messieurs G. Panteix et Y. Menezo de l'Institut Marcel Merieux (Lyon) qui nous ont permis de disposer d'échantillons de spermatozoïdes de patients ayant des difficultés de procréation. Les spermatozoïdes sont conservés à -80°C dans un milieu de culture adapté évitant leur agglutination. Ils ont ensuite été dégelés à température ambiante, rincés plusieurs fois successivement avec une solution de PBS et centrifugés à 3000g pendant 10 minutes.

Le travail d'optimisation d'extraction de l'ADN des spermatozoïdes a constitué une difficulté toute particulière basée sur la remarque suivante. En effet, dans les spermatozoïdes, les histones sont remplacées par les protamines qui sont responsables d'une hypercondensation de la molécule d'ADN (*figure 80*).

Figure 80 : Structure de la chromatine des spermatozoïdes



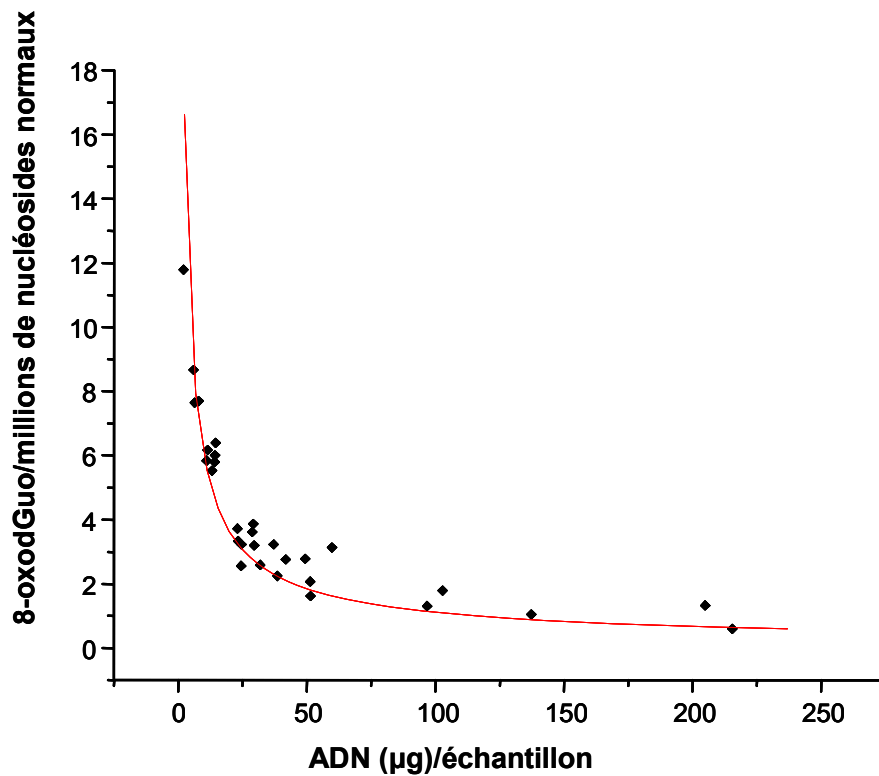
Le protocole standard d'extraction d'ADN ne pouvait pas être applicable aux spermatozoïdes. L'hypothèse émise d'utiliser un agent réducteur des ponts disulfures des protamines a permis d'établir un nouveau protocole d'extraction de l'ADN des spermatozoïdes. La seule différence par rapport au protocole standard d'extraction est l'ajout d'un agent réducteur, le dithiothréitol (DTT), ajouté extemporanément aux tampons de lyse A et B à la concentration finale de 10mM. Quant au protocole de digestion enzymatique, il est le même qu'utilisé précédemment.

7.6.1 Taux des lésions dans l'ADN des spermatozoïdes

Une fois le protocole établi, plusieurs dosages ont été réalisés sur différents échantillons de sujets hypofertiles.

La difficulté de la mesure des lésions des spermatozoïdes d'hommes infertiles concerne notamment la quantité de cellules disponibles. Afin d'évaluer la quantité limite de cellules nécessaire pour réaliser un dosage exact sans oxyder l'ADN, quatre dilutions en cascade avant extraction ont été réalisées à partir d'échantillons d'environ 15 millions de spermatozoïdes. Les résultats des dosages de la 8-oxodGuo sont représentés dans la *figure 81*.

Figure 81 : Taux de 8-oxodGuo en fonction de la quantité d'ADN extrait



Comme on peut le constater sur cette figure, le taux de 8-oxodGuo n'est pas linéaire en fonction de la quantité d'ADN. Il a une tendance à augmenter pour des quantités inférieures à 50 µg d'ADN. Hors, 50µg d'ADN correspondent environ à 3 millions de spermatozoïdes. Nous avons donc admis cette quantité limite de cellules pour un dosage correct de la 8-oxodGuo dans les spermatozoïdes.

Le tableau de la *figure 82* représente les différents taux des lésions par millions de nucléosides normaux dans le cas de 21 échantillons de patients.

Figure 82 : Lésions mesurées dans 21 échantillons de sujets hypofertiles.

SUJETS	Lésions oxydatives	Lésions chlorées			Lésions de la peroxydation lipidique	
	8-oxodGuo	5-CldCyd	8-CldGuo	8-CldAdo	ethenodAdo	ethenodGuo
S1	1,05	0,12	<LQ	<LQ	0,13	0,80
S2	0,84	0,40	<LQ	<LQ	0,14	0,63
S3	0,58	ND	ND	ND	ND	ND
S4	1,11	0,10	<LQ	<LQ	0,11	1,18
S5	0,70	0,00	<LQ	<LQ	0,15	0,41
S6	1,23	0,09	<LQ	<LQ	0,10	1,36
S7	0,84	0,19	<LQ	<LQ	0,17	1,24
S8	1,00	0,19	<LQ	<LQ	0,16	0,96
S9	0,65	0,05	<LQ	<LQ	0,16	0,76
S10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S12	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S13	1,20	0,08	<LQ	<LQ	0,16	1,41
S14	1,22	0,35	<LQ	<LQ	0,15	1,34
S15	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S16	0,53	0,00	<LQ	<LQ	0,16	0,55
S17	0,81	0,07	<LQ	<LQ	0,15	1,01
S18	0,72	0,03	<LQ	<LQ	0,17	1,67
S19	2,10	0,05	<LQ	<LQ	0,14	0,98
S20	0,68	0,02	<LQ	<LQ	0,14	0,92
S21	0,39	0,02	<LQ	<LQ	0,18	0,65
ND quand quantité d'ADN insuffisant			LQ=0,07	LQ=0,09		

Ces résultats préliminaires ont permis d'établir les taux de différentes lésions dans l'ADN des spermatozoïdes humains de sujets hypofertiles. On peut également constater que ces taux sont proches des taux obtenus dans le cas de pathologies étudiés précédemment.

En parallèle, l'encadrement de M^{elle} Bin Blandine, stagiaire en IUT, a permis d'initier la mise au point de la technique des comètes sur les spermatozoïdes de patients hypofertiles. Le travail a essentiellement porté sur l'adaptation du protocole standard des cellules somatiques pour les spermatozoïdes avec comme principale difficulté de trouver les bonnes conditions de décondensation de l'ADN spermatique. L'utilisation de la technique Comète sur les spermatozoïdes présente l'avantage de ne pas nécessiter de grosses quantités de cellules et peut être un bon moyen d'évaluer les dommages de leur ADN. Ce travail doit être poursuivi.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

8 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ADN, support de l'information génétique de chaque cellule, peut subir des modifications suite à des agressions endogènes ou exogènes (rayonnements UVA, UVB ou ionisants, médicaments, radicaux libres générés lors du métabolisme mitochondrial de l'oxygène, etc.). La cellule a développé de nombreux mécanismes de défense pour prévenir ces dommages ou les réparer. Ainsi, lorsque les lésions de l'ADN sont générées, elles peuvent être prises en charge puis éliminées par ces mécanismes internes de la cellule. Cependant, lorsque les lésions sont trop nombreuses ou trop dommageables pour la cellule, celle-ci peut s'engager dans la voie de l'apoptose. C'est pourquoi il devient très intéressant de déterminer le taux cellulaire de lésions sachant que celui-ci est représentatif de l'équilibre qui s'établit entre formation et réparation de ces dernières. Lorsque le taux de lésions augmente, cela peut provenir soit d'un défaut de réparation soit d'un excès de formation des lésions. Quand une lésion mutagène comme la 8-oxodGuo persiste dans l'ADN de la cellule, ceci peut entraîner une mutation et ainsi participer à l'initiation du processus de cancérisation. Sachant que le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies, il nous a paru fondamental de disposer de biomarqueurs des acides nucléiques de la cellule. En effet, l'ADN étant la « molécule mère » de toute autre molécule de l'organisme, les lésions causées à l'ADN prennent un intérêt tout particulier dans la compréhension de la maladie comme le cancer ou les maladies inflammatoires. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au dosage simultané de plusieurs lésions de l'ADN dans différents fluides biologiques tels que les lymphocytes et cellules mononucléées, l'urine ou encore le sperme.

A la vue des différentes techniques de dosage des lésions de l'ADN décrites dans la partie bibliographique, la CLHP-SM/SM semblait être la meilleure candidate pour détecter et quantifier simultanément plusieurs lésions. C'est pourquoi nous avons choisi cet outil analytique fiable, sensible et rapide. Comme présenté dans les résultats, il nous a permis d'obtenir des limites de quantification de l'ordre de la dizaine de fmol. Afin de faire le point sur la quantification des lésions dans les différents milieux biologiques étudiés, nous pouvons dresser le constat suivant :

Les essais réalisés sur **l'urine** nous ont permis de doser uniquement la 8-oxodGuo. Comme présenté dans les résultats, les taux urinaires de 8-oxodGuo sont très variables ce qui suppose que l'élimination de cette lésion n'est pas égale entre les individus. Cependant, il ne semble pas que cette élimination soit influencée par la pathologie car les taux mesurés ne sont pas significativement différents de ceux obtenus chez les volontaires sains. Quant aux autres lésions recherchées dans l'urine, la sensibilité reste problématique. On peut alors se demander si la 8-oxodGuo est réellement un bon biomarqueur dans l'urine humaine. L'avantage de disposer d'urine comme milieu biologique

est lié à sa facilité d'obtention par rapport au plasma ou aux leucocytes et cellules mononuclées (obtenus par méthode invasive).

Les essais réalisés dans le **plasma** ne nous ont pas permis de doser les différentes lésions étudiées malgré les essais de prépurification réalisés. Ceci peut s'expliquer par le fait que le plasma est un fluide biologique où les lésions sont présentes de façon transitoire avant d'être directement éliminées dans les urines. Ceci pourrait être l'explication du fait que nous ne parvenons pas à les quantifier. Cependant, une autre hypothèse reste plausible : les lésions pourraient se fixer aux protéines de transport plasmatique et être éliminées en même temps que ces dernières lorsque l'on traite les échantillons. Finalement, on peut dire que le plasma ne représente pas pour l'instant un milieu biologique satisfaisant pour le dosage des biomarqueurs de l'ADN.

Concernant les dosages des lésions dans l'ADN des **leucocytes et cellules mononuclées circulantes**, les résultats obtenus sont très encourageants. Un des inconvénients de la CLHP-SM/SM concerne la quantité d'ADN nécessaire. En effet, nous devons disposer de 50 µg d'ADN au minimum, ce qui représente une quantité d'environ 10 millions de cellules, au contraire des techniques indirectes comme la méthode COMET pour lesquels seulement 10000 cellules par lame suffisent. Cet aspect limitatif est d'autant plus gênant lorsque les dosages sont réalisés sur l'ADN des spermatozoïdes puisque ces derniers contiennent deux fois moins d'ADN qu'un leucocyte. C'est pourquoi nous avons envisagé de réaliser des essais de COMET sur les spermatozoïdes afin de comparer les résultats obtenus avec la CLHP-SM/SM mais la méthode reste encore à optimiser.

Quant aux premiers résultats observés dans l'ADN des spermatozoïdes, on peut dire que la méthode d'extraction semble bien optimisée, avec une quantité minimale de 3 millions de cellules par analyse. Ce dernier point limite les analyses possibles des lésions de l'ADN chez certains patients hypofertiles pour lesquels le nombre de cellules est inférieur à 3 millions. Les premiers résultats sont néanmoins très satisfaisants car c'est la première fois que plusieurs lésions sont quantifiées dans les spermatozoïdes humains.

La question de la **validation biologique** semble la plus intéressante. En effet, pouvons-nous conclure sur l'utilisation des lésions de l'ADN mesurées en tant que biomarqueurs ? La réponse est double à mon avis. A prime abord, il semblait que dans l'étude préliminaire du diabète, c'était le cas puisque les taux des lésions variaient nettement par rapport aux individus sains. Cependant, la deuxième étude révèle que le taux de 8-oxodGuo n'est pas significativement différent chez les patients et les témoins apparentés, suggérant à nouveau qu'il est possible que la 8-oxodGuo ne soit pas le meilleur biomarqueur à utiliser dans cette pathologie. De même, dans l'étude des traitements par radiothérapie, il ne semble pas y avoir de corrélation entre le taux mesuré de 8-oxodGuo et la dose d'irradiation cumulée. Au contraire des éthénonucléosides dont les taux semblent varier plus

nettement, que ce soit dans la pathologie du diabète ou dans les traitements par radiothérapie, ces derniers pourraient donc représenter de meilleurs biomarqueurs que la 8-oxodGuo.

Quant aux biomarqueurs de l'inflammation représentés ici par les lésions chlorées, nous pouvons dire que les premiers résultats sont très prometteurs. Cependant, les taux cellulaires sont très bas. Il n'a d'ailleurs pas toujours été possible de les déterminer. Les perspectives de ce travail au niveau des lésions chlorées sont d'une part de synthétiser les autres standards internes et d'autre part de continuer à explorer des pathologies à caractère très inflammatoire comme la polyarthrite rhumatoïde par exemple.

D'autre part, les premiers résultats obtenus pour les lésions oxydatives et chlorées de l'ARN suggèrent leur utilisation également comme biomarqueurs. En effet, l'ARN semble plus exposé aux agresseurs car moins protégé que l'ADN et subirait visiblement plus de dommages. L'étude de l'effet de H₂O₂ sur des cellules en culture réalisée en collaboration avec l'équipe suédoise de T. Hofer a montré que les taux de 8-oxoGuo de l'ARN sont 25 fois plus importants que ceux de la 8-oxodGuo de l'ADN. De même, l'étude, réalisée avec l'équipe japonaise de M. Masuda, de la chloration des acides nucléiques par HOCl dans les cellules, a montré un taux 2 fois plus important des lésions chlorées de l'ARN par rapport à l'ADN. C'est pourquoi il paraît très intéressant de continuer les études simultanément sur les lésions de l'ADN et de l'ARN afin de déterminer les meilleurs biomarqueurs parmi les acides nucléiques et selon les pathologies étudiées.

Finalement, ce travail de validation biologique montre qu'il doit être encore poursuivi pour conclure sur l'utilisation des lésions de l'ADN et de l'ARN comme biomarqueurs dans certaines pathologies. Pour ce faire, l'utilisation des vacutainers CPT est, à mon avis, la meilleure solution pour participer à d'autres études clinique de part sa facilité d'utilisation. D'autre part, il est à remarquer ici que les évolutions actuelles des générations d'appareillage permettent encore d'augmenter la sensibilité des détecteurs de spectromètre de masse en mode tandem. Une meilleure sensibilité pourrait permettre la détection plus précise de nombreuses lésions ce qui valoriserait le travail d'optimisation (séparation des cellules, extraction et digestion des acides nucléiques) effectués au cours de ces travaux de thèse.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

9 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. King, D.E., Mainous, A.G., 3rd, Buchanan, T.A. and Pearson, W.S. (2003) C-reactive protein and glycemic control in adults with diabetes. *Diabetes Care*, **26**, 1535-9.
2. Facorro, G., Sarrasague, M.M., Torti, H., Hager, A., Avalos, J.S., Foncuberta, M. and Kusminsky, G. (2004) Oxidative study of patients with total body irradiation: effects of amifostine treatment. *Bone Marrow Transplant*, **33**, 793-8.
3. Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E. and Starkov, A.A. (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*, **70**, 200-14.
4. Kakhlon, O. and Cabantchik, Z.I. (2002) The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med*, **33**, 1037-46.
5. Alderton, W.K., Cooper, C.E. and Knowles, R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, **357**, 593-615.
6. Ghafourifar, P. and Cadenas, E. (2005) Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci*, **26**, 190-5.
7. Dedon, P.C. and Tannenbaum, S.R. (2004) Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Arch Biochem Biophys*, **423**, 12-22.
8. Niles, J.C., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (2005) Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: Structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide*.
9. Griendling, K.K., Sorescu, D. and Ushio-Fukai, M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, **86**, 494-501.
10. Serteyn, D.G., S.; Franck, T.; Mouithys-Mickalad, A.; Deby-Dupont, G. (2003) La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes., *Ann. Méd. Vét.*, vol. 147, pp. 79-93.
11. van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Halliwell, B. and Cross, C.E. (1997) Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem*, **272**, 7617-25.
12. Masuda, M.S., T.;Friesen, M.D.;Ravanat, J.L.;Cadet, J.;Pignatelli, B.;Nishino, H.;Ohshima H. (2001) Chlorination of guanosine and other nucleosides by hypochlorous acid and myeloperoxidase of activated human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, **276(44)**, 40486-40496.
13. Eiserich, J.P., Cross, C.E., Jones, A.D., Halliwell, B. and van der Vliet, A. (1996) Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Biol Chem*, **271**, 19199-208.
14. Panasenko, O.M., Briviba, K., Klotz, L.O. and Sies, H. (1997) Oxidative modification and nitration of human low-density lipoproteins by the reaction of hypochlorous acid with nitrite. *Arch Biochem Biophys*, **343**, 254-9.
15. Niedernhofer, L.J., Daniels, J.S., Rouzer, C.A., Greene, R.E. and Marnett, L.J. (2003) Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem*, **278**, 31426-33.
16. de Zwart, L.L., Vermeulen, N.P., Hermanns, R.C., Commandeur, J.N., Salemink, P.J. and Meerman, J.H. (1999) Urinary excretion of biomarkers for radical-induced damage in rats treated with NDMA or diquat and the effects of calcium carbimide co-administration. *Chem Biol Interact*, **117**, 151-72.
17. Del Rio, D., Stewart, A.J. and Pellegrini, N. (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **15**, 316-28.
18. Lefevre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol, J.P., Therond, P. and Torreilles, J. (1998) [Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances]. *Ann Biol Clin (Paris)*, **56**, 305-19.

19. Uchida, K. (2003) 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res*, **42**, 318-43.
20. Schaur, R.J. (2003) Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med*, **24**, 149-59.
21. Olsen, R., Molander, P., Ovrebø, S., Ellingsen, D.G., Thorud, S., Thomassen, Y., Lundanes, E., Greibrokk, T., Backman, J., Sjøholm, R. and Kronberg, L. (2005) Reaction of glyoxal with 2'-deoxyguanosine, 2'-deoxyadenosine, 2'-deoxycytidine, cytidine, thymidine, and calf thymus DNA: identification of DNA adducts. *Chem Res Toxicol*, **18**, 730-9.
22. Wolff, S.P. and Dean, R.T. (1987) Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J*, **245**, 243-50.
23. Wells-Knecht, K.J., Zyzak, D.V., Litchfield, J.E., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. (1995) Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry*, **34**, 3702-9.
24. Odani, H., Shinzato, T., Matsumoto, Y., Usami, J. and Maeda, K. (1999) Increase in three alpha,beta-dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific in vivo determination of intermediates in advanced Maillard reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, **256**, 89-93.
25. Nemet, I., Varga-Defterdarovic, L. and Turk, Z. (2004) Preparation and quantification of methylglyoxal in human plasma using reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Clin Biochem*, **37**, 875-81.
26. McLellan, A.C., Thornalley, P.J., Benn, J. and Sonksen, P.H. (1994) Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci (Lond)*, **87**, 21-9.
27. Thornalley, P.J., Langborg, A. and Minhas, H.S. (1999) Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J*, **344 Pt 1**, 109-16.
28. Bourajjaj, M., Stehouwer, C.D., van Hinsbergh, V.W. and Schalkwijk, C.G. (2003) Role of methylglyoxal adducts in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Biochem Soc Trans*, **31**, 1400-2.
29. Thornalley, P.J. (2003) Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys*, **419**, 31-40.
30. Potier, P., Sasaki, A., Bakala, J., Garcia-Alvarez, M.C., Franck, G., Nhiri, N., Wang, Q., Ermolenko, L., Nguefeu, Y., Calvo, F. and Gautier, J.F. (2005) [New aspects of diabetes]. *Ann Pharm Fr*, **63**, 371-84.
31. Ruggiero-Lopez, D., Lecomte, M., Moinet, G., Patereau, G., Lagarde, M. and Wiernsperger, N. (1999) Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. *Biochem Pharmacol*, **58**, 1765-73.
32. Schneider, M., Quistad, G.B. and Casida, J.E. (1998) N2,7-bis(1-hydroxy-2-oxopropyl)-2'-deoxyguanosine: identical noncyclic adducts with 1,3-dichloropropene epoxides and methylglyoxal. *Chem Res Toxicol*, **11**, 1536-42.
33. Guetens, G.D.B., G.;Highley, M.;T.van Oosterom, A.;A.de Bruijn, E. (2002) Oxidative DNA damage : biological significance and methods of analysis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **39**, 331-457.
34. Evans, M.D., Dizdaroglu, M. and Cooke, M.S. (2004) Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*, **567**, 1-61.
35. Yu, H., Venkatarangan, L., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (2005) Quantitation of four Guanine oxidation products from reaction of DNA with varying doses of peroxyxynitrite. *Chem Res Toxicol*, **18**, 1849-57.
36. Yermilov, V., Rubio, J. and Ohshima, H. (1995) Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxyxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett*, **376**, 207-10.

37. Niles, J.C., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (2001) A novel nitroimidazole compound formed during the reaction of peroxyxynitrite with 2',3',5'-tri-O-acetyl-guanosine. *J Am Chem Soc*, **123**, 12147-51.
38. Douki, T., Cadet, J. and Ames, B.N. (1996) An adduct between peroxyxynitrite and 2'-deoxyguanosine: 4,5-dihydro-5-hydroxy-4-(nitrosooxy)-2'-deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol*, **9**, 3-7.
39. Ohshima, H., Sawa, T. and Akaike, T. (2006) 8-nitroguanine, a product of nitrative DNA damage caused by reactive nitrogen species: formation, occurrence, and implications in inflammation and carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal*, **8**, 1033-45.
40. Suzuki, T., Ide, H., Yamada, M., Endo, N., Kanaori, K., Tajima, K., Morii, T. and Makino, K. (2000) Formation of 2'-deoxyoxanosine from 2'-deoxyguanosine and nitrous acid: mechanism and intermediates. *Nucleic Acids Res*, **28**, 544-51.
41. Ma, N., Tagawa, T., Hiraku, Y., Murata, M., Ding, X. and Kawanishi, S. (2006) 8-Nitroguanine formation in oral leukoplakia, a premalignant lesion. *Nitric Oxide*, **14**, 137-43.
42. Akuta, T., Zaki, M.H., Yoshitake, J., Okamoto, T. and Akaike, T. (2006) Nitrative stress through formation of 8-nitroguanosine: insights into microbial pathogenesis. *Nitric Oxide*, **14**, 101-8.
43. Sawa, T., Tatemichi, M., Akaike, T., Barbin, A. and Ohshima, H. (2006) Analysis of urinary 8-nitroguanine, a marker of nitrative nucleic acid damage, by high-performance liquid chromatography-electrochemical detection coupled with immunoaffinity purification: association with cigarette smoking. *Free Radic Biol Med*, **40**, 711-20.
44. Suzuki, T.M., M.;Friesen, M.D.;Fenet, B.;Ohshima, H. (2002) Novel products generated from 2'-deoxyguanosine by hypochlorous acid or a myeloperoxidase-H₂O₂-Cl⁻ system : identification of diimino-imidazole and amino-imidazolone nucleosides. *Nucleic Acids Research*, **30**, 2555-2564.
45. Suzuki, T., Masuda, M., Friesen, M.D. and Ohshima, H. (2001) Formation of spiroiminodihydantoin nucleoside by reaction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine with hypochlorous acid or a myeloperoxidase-H(2)O(2)-Cl(-) system. *Chem Res Toxicol*, **14**, 1163-9.
46. Henderson, J.P.B., J.;Takeshita, J.; Heinecke, J.W. (2003) Phagocytes produce 5-chlorouracil and 5-bromouracil, two mutagenic products of myeloperoxidase, in human inflammatory tissue. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 23522-23528.
47. Spencer, J.P., Whiteman, M., Jenner, A. and Halliwell, B. (2000) Nitrite-induced deamination and hypochlorite-induced oxidation of DNA in intact human respiratory tract epithelial cells. *Free Radic Biol Med*, **28**, 1039-50.
48. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, **160**, 1-40.
49. Luczaj, W. and Skrzydlewska, E. (2003) DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell Mol Biol Lett*, **8**, 391-413.
50. Golding, B.T., Slaich, P.K., Kennedy, G., Bleasdale, C. and Watson, W.P. (1996) Mechanisms of formation of adducts from reactions of glycidaldehyde with 2'-deoxyguanosine and/or guanosine. *Chem Res Toxicol*, **9**, 147-57.
51. Rouzer, C.A., Chaudhary, A.K., Nokubo, M., Ferguson, D.M., Reddy, G.R., Blair, I.A. and Marnett, L.J. (1997) Analysis of the malondialdehyde-2'-deoxyguanosine adduct pyrimidopurinone in human leukocyte DNA by gas chromatography/electron capture/negative chemical ionization/mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*, **10**, 181-8.
52. Sharma, R.A., Gescher, A., Plastaras, J.P., Leuratti, C., Singh, R., Gallacher-Horley, B., Offord, E., Marnett, L.J., Steward, W.P. and Plummer, S.M. (2001) Cyclooxygenase-2, malondialdehyde and pyrimidopurinone adducts of deoxyguanosine in human colon cells. *Carcinogenesis*, **22**, 1557-60.
53. Marnett, L.J. (2002) Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, **181-182**, 219-22.

54. Hoberg, A.M., Otteneder, M., Marnett, L.J. and Poulsen, H.E. (2004) Measurement of the malondialdehyde-2'-deoxyguanosine adduct in human urine by immuno-extraction and liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, **39**, 38-42.
55. Otteneder, M.B., Knutson, C.G., Daniels, J.S., Hashim, M., Crews, B.C., Remmel, R.P., Wang, H., Rizzo, C. and Marnett, L.J. (2006) In vivo oxidative metabolism of a major peroxidation-derived DNA adduct, M1dG. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6665-9.
56. el Ghissassi, F., Barbin, A., Nair, J. and Bartsch, H. (1995) Formation of 1,N6-ethenoadenine and 3,N4-ethenocytosine by lipid peroxidation products and nucleic acid bases. *Chem Res Toxicol*, **8**, 278-83.
57. Sodum, R.S. and Chung, F.L. (1989) Structural characterization of adducts formed in the reaction of 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal with deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol*, **2**, 23-8.
58. Sodum, R.S. and Chung, F.L. (1988) 1,N2-ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by trans-4-hydroxy-2-nonenal. *Cancer Res*, **48**, 320-3.
59. Sodum, R.S. and Chung, F.L. (1991) Stereoselective formation of in vitro nucleic acid adducts by 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal. *Cancer Res*, **51**, 137-43.
60. Nair, J., Gal, A., Tamir, S., Tannenbaum, S.R., Wogan, G.N. and Bartsch, H. (1998) Etheno adducts in spleen DNA of SJL mice stimulated to overproduce nitric oxide. *Carcinogenesis*, **19**, 2081-4.
61. Douki, T., Odin, F., Caillat, S., Favier, A. and Cadet, J. (2004) Predominance of the 1,N²-propano 2'-deoxyguanosine adduct among 4-hydroxy-2-nonenal-induced DNA lesions. *Free Radic Biol Med*, **37**, 62-70.
62. Barbin, A. (2000) Etheno-adduct-forming chemicals: from mutagenicity testing to tumor mutation spectra. *Mutat Res*, **462**, 55-69.
63. Bartsch, H., Barbin, A., Marion, M.J., Nair, J. and Guichard, Y. (1994) Formation, detection, and role in carcinogenesis of ethenobases in DNA. *Drug Metab Rev*, **26**, 349-71.
64. Nair, J., Gansauge, F., Beger, H., Dolara, P., Winde, G. and Bartsch, H. (2006) Increased Etheno-DNA Adducts in Affected Tissues of Patients Suffering from Crohn's Disease, Ulcerative Colitis, and Chronic Pancreatitis. *Antioxid Redox Signal*, **8**, 1003-10.
65. Frischmann, M., Bidmon, C., Angerer, J. and Pischetsrieder, M. (2005) Identification of DNA adducts of methylglyoxal. *Chem Res Toxicol*, **18**, 1586-92.
66. Papoulis, A., al-Abed, Y. and Bucala, R. (1995) Identification of N2-(1-carboxyethyl)guanine (CEG) as a guanine advanced glycosylation end product. *Biochemistry*, **34**, 648-55.
67. Vaca, C.E., Nilsson, J.A., Fang, J.L. and Grafstrom, R.C. (1998) Formation of DNA adducts in human buccal epithelial cells exposed to acetaldehyde and methylglyoxal in vitro. *Chem Biol Interact*, **108**, 197-208.
68. Douki, T., Riviere, J. and Cadet, J. (2002) DNA tandem lesions containing 8-oxo-7,8-dihydroguanine and formamido residues arise from intramolecular addition of thymine peroxy radical to guanine. *Chem Res Toxicol*, **15**, 445-54.
69. Pouget, J.P., Frelon, S., Ravanat, J.L., Testard, I., Odin, F. and Cadet, J. (2002) Formation of modified DNA bases in cells exposed either to gamma radiation or to high-LET particles. *Radiat Res*, **157**, 589-95.
70. Cadet, J.D., T.; Gasparutto, D.; Ravanat, J. L. (2005) Radiation-induced damage to cellular DNA: measurement and biological role. *Radiation Physics and Chemistry*, **72**, 293-299.
71. Pouget, J.P., Douki, T., Richard, M.J. and Cadet, J. (2000) DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and Comet assay. *Chem Res Toxicol*, **13**, 541-9.
72. Sauvaigo, S., Petec-Calin, C., Caillat, S., Odin, F. and Cadet, J. (2002) Comet assay coupled to repair enzymes for the detection of oxidative damage to DNA induced by low doses of gamma-radiation: use of YOYO-1, low-background slides, and optimized electrophoresis conditions. *Anal Biochem*, **303**, 107-9.

73. Cadet, J., Bellon, S., Douki, T., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., Romieu, A. and Sauvaigo, S. (2004) Radiation-induced DNA damage: formation, measurement, and biochemical features. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **23**, 33-43.
74. 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**, 792-9.
75. Barker, S., Murray, D., Zheng, J., Li, L. and Weinfeld, M. (2005) A method for the isolation of covalent DNA-protein crosslinks suitable for proteomics analysis. *Anal Biochem*, **344**, 204-15.
76. Barker, S., Weinfeld, M., Zheng, J., Li, L. and Murray, D. (2005) Identification of mammalian proteins cross-linked to DNA by ionizing radiation. *J Biol Chem*, **280**, 33826-38.
77. Scharer, O.D. (2003) Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl*, **42**, 2946-74.
78. Smith, C.C., O'Donovan M, R. and Martin, E.A. (2006) hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis*, **21**, 185-90.
79. Ford, E.S. and Cogswell, M.E. (1999) Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care*, **22**, 1978-83.
80. Chen, X., Scholl, T.O. and Stein, T.P. (2006) Association of elevated serum ferritin levels and the risk of gestational diabetes mellitus in pregnant women: The Camden study. *Diabetes Care*, **29**, 1077-82.
81. Jain, S.K., McVie, R., Jaramillo, J.J. and Chen, Y. (1998) Hyperketonemia (acetoacetate) increases the oxidizability of LDL + VLDL in Type-I diabetic patients. *Free Radic Biol Med*, **24**, 175-81.
82. Du, X.L., Edelstein, D., Dimmeler, S., Ju, Q., Sui, C. and Brownlee, M. (2001) Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest*, **108**, 1341-8.
83. Blasiak, J., Arabski, M., Krupa, R., Wozniak, K., Zadrozny, M., Kasznicki, J., Zurawska, M. and Drzewoski, J. (2004) DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat Res*, **554**, 297-304.
84. Collins, A.R., Raslova, K., Somorovska, M., Petrovska, H., Ondrusova, A., Vohnout, B., Fabry, R. and Dusinska, M. (1998) DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic Biol Med*, **25**, 373-7.
85. Kang, J.H. (2003) Oxidative damage of DNA by the reaction of amino acid with methylglyoxal in the presence of Fe(III). *Int J Biol Macromol*, **33**, 43-8.
86. Kang, J.H. (2003) Oxidative damage of DNA induced by methylglyoxal in vitro. *Toxicol Lett*, **145**, 181-7.
87. Bialkowski, K., Kowara, R., Windorbska, W. and Olinski, R. (1996) 8-Oxo-2'-deoxyguanosine level in lymphocytes DNA of cancer patients undergoing radiotherapy. *Cancer Lett*, **99**, 93-7.
88. Erhola, M., Toyokuni, S., Okada, K., Tanaka, T., Hiai, H., Ochi, H., Uchida, K., Osawa, T., Nieminen, M.M., Alho, H. and Kellokumpu-Lehtinen, P. (1997) Biomarker evidence of DNA oxidation in lung cancer patients: association of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion with radiotherapy, chemotherapy, and response to treatment. *FEBS Lett*, **409**, 287-91.
89. Bergman, V., Leanderson, P., Starkhammar, H. and Tagesson, C. (2004) Urinary excretion of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde after high dose radiochemotherapy preceding stem cell transplantation. *Free Radic Biol Med*, **36**, 300-6.
90. Aitken, R.J. and Baker, M.A. (2006) Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol*, **250**, 66-9.

91. Moustafa, M.H., Sharma, R.K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M.A., Thomas, A.J., Jr. and Agarwal, A. (2004) Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod*, **19**, 129-38.
92. Zenzes, M.T., Puy, L.A., Bielecki, R. and Reed, T.E. (1999) Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in embryos from smoking couples: evidence for transmission by spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, **5**, 125-31.
93. Sepaniak, S., Forges, T. and Monnier-Barbarino, P. (2005) Conséquences du tabac sur la fertilité masculine. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, **34**, 3S102-3S111.
94. Greco, E., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S. and Tesarik, J. (2005) Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl*, **26**, 349-53.
95. Trisini, A.T., Singh, N.P., Duty, S.M. and Hauser, R. (2004) Relationship between human semen parameters and deoxyribonucleic acid damage assessed by the neutral comet assay. *Fertil Steril*, **82**, 1623-32.
96. Hauser, R., Singh, N.P., Chen, Z., Pothier, L. and Altshul, L. (2003) Lack of an association between environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE and DNA damage in human sperm measured using the neutral comet assay. *Hum Reprod*, **18**, 2525-33.
97. Griffiths, H.R., Moller, L., Bartosz, G., Bast, A., Bertoni-Freddari, C., Collins, A., Cooke, M., Coolen, S., Haenen, G., Hoberg, A.M., Loft, S., Lunec, J., Olinski, R., Parry, J., Pompella, A., Poulsen, H., Verhagen, H. and Astley, S.B. (2002) Biomarkers. *Mol Aspects Med*, **23**, 101-208.
98. de Zwart, L.L., Meerman, J.H., Commandeur, J.N. and Vermeulen, N.P. (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med*, **26**, 202-26.
99. Lewisch, S.A. and Levine, R.L. (1995) Determination of 2-oxohistidine by amino acid analysis. *Anal Biochem*, **231**, 440-6.
100. Russo, M.T., De Luca, G., Degan, P., Parlanti, E., Dogliotti, E., Barnes, D.E., Lindahl, T., Yang, H., Miller, J.H. and Bignami, M. (2004) Accumulation of the oxidative base lesion 8-hydroxyguanine in DNA of tumor-prone mice defective in both the Myh and Ogg1 DNA glycosylases. *Cancer Res*, **64**, 4411-4.
101. McNulty, J.M., Jerkovic, B., Bolton, P.H. and Basu, A.K. (1998) Replication inhibition and miscoding properties of DNA templates containing a site-specific cis-thymine glycol or urea residue. *Chem Res Toxicol*, **11**, 666-73.
102. Aruoma, O. and Halliwell, B. (1998) The comet assay : a novel approach to measuring DNA oxidation. In B.Halliwell, O.I.A.a. (ed.), *DNA & Free Radicals : Techniques, Mechanisms & Applications*, Saint Lucia, London, pp. 241-258.
103. Kim, B.S., Park, J.J., Edler, L., Von Fournier, D., Haase, W., Sautter-Bihl, M.L., Gotzes, F. and Thielmann, H.W. (2002) New measure of DNA repair in the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. *Environ Mol Mutagen*, **40**, 50-6.
104. Speit, G., Schutz, P., Bonzheim, I., Trenz, K. and Hoffmann, H. (2004) Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol Lett*, **146**, 151-8.
105. Faust, F., Kassie, F., Knasmuller, S., Boedecker, R.H., Mann, M. and Mersch-Sundermann, V. (2004) The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res*, **566**, 209-29.
106. Kohn, K.W., Erickson, L.C., Ewig, R.A. and Friedman, C.A. (1976) Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry*, **15**, 4629-37.
107. Lunec, J. and Griffiths, H.R. (2000) Measuring Oxidative DNA Damage by Alkaline Elution. In John Wiley & Sons, L. (ed.), *Measuring in vivo Oxidative Damage*, Chichester, England, pp. 95-104.
108. Hartwig, A., Dally, H. and Schlepegrell, R. (1996) Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicol Lett*, **88**, 85-90.

109. Won, M.H., Kang, T.C., Jeon, G.S., Lee, J.C., Kim, D.Y., Choi, E.M., Lee, K.H., Choi, C.D., Chung, M.H. and Cho, S.S. (1999) Immunohistochemical detection of oxidative DNA damage induced by ischemia-reperfusion insults in gerbil hippocampus in vivo. *Brain Res*, **836**, 70-8.
110. West, G.J., West, I.W. and Ward, J.F. (1982) Radioimmunoassay of 7,8-dihydro-8-oxoadenine (8-hydroxyadenine). *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, **42**, 481-90.
111. Leadon, S.A. and Hanawalt, P.C. (1983) Monoclonal antibody to DNA containing thymine glycol. *Mutat Res*, **112**, 191-200.
112. Shimoi, K., Kasai, H., Yokota, N., Toyokuni, S. and Kinae, N. (2002) Comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11**, 767-70.
113. Malins, D.C. and Gunselman, S.J. (1994) Fourier-transform infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry reveal a remarkable degree of structural damage in the DNA of wild fish exposed to toxic chemicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 13038-41.
114. Malins, D.C., Johnson, P.M., Barker, E.A., Polissar, N.L., Wheeler, T.M. and Anderson, K.M. (2003) Cancer-related changes in prostate DNA as men age and early identification of metastasis in primary prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5401-6.
115. Aruoma, O. and Halliwell, B. (1998) Measurement of oxidative base damage to DNA : HPLC/32P-postlabeling, immunological and non invasive assay. In B.Halliwell, O.I.A.a. (ed.), *DNA & Free Radicals : Techniques, Mechanisms & Applications*, Saint Lucia, London, pp. 285-296.
116. Zeisig, M., Hofer, T., Cadet, J. and Moller, L. (1999) 32P-postlabeling high-performance liquid chromatography (32P-HPLC) adapted for analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Carcinogenesis*, **20**, 1241-5.
117. Dizdaroglu, M. (1985) Application of capillary gas chromatography-mass spectrometry to chemical characterization of radiation-induced base damage of DNA: implications for assessing DNA repair processes. *Anal Biochem*, **144**, 593-603.
118. Aruoma, O.I., Halliwell, B. and Dizdaroglu, M. (1989) Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J Biol Chem*, **264**, 13024-8.
119. Jackson, J.H., Gajewski, E., Schraufstatter, I.U., Hyslop, P.A., Fuciarelli, A.F., Cochrane, C.G. and Dizdaroglu, M. (1989) Damage to the bases in DNA induced by stimulated human neutrophils. *J Clin Invest*, **84**, 1644-9.
120. Kasai, H. and Nishimura, S. (1984) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res*, **12**, 2137-45.
121. Floyd, R.A., Lewis, C.A. and Wong, P.K. (1984) High-pressure liquid chromatography--electrochemical detection of oxygen free radicals. *Methods Enzymol*, **105**, 231-7.
122. Wagner, J.R., Hu, C.C. and Ames, B.N. (1992) Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 3380-4.
123. Berger, M., Anselmino, C., Mouret, J.F. and Cadet, J. (1990) High performance liquid chromatography-electrochemical assay for monitoring the formation of 8-oxo-7,8-dihydroadenine and its related 2'-deoxyribonucleoside. *Journal of liquid chromatography*, **13**, 929-940.
124. Gedik, C.M. and Collins, A. (2004) Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *Faseb J*.
125. Hamberg, M. and Zhang, L.Y. (1995) Quantitative determination of 8-hydroxyguanine and guanine by isotope dilution mass spectrometry. *Anal Biochem*, **229**, 336-44.
126. Ravanat, J.L., Turesky, R.J., Gremaud, E., Trudel, L.J. and Stadler, R.H. (1995) Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography--mass spectrometry and HPLC--electrochemical detection: overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography--mass spectrometry assay. *Chem Res Toxicol*, **8**, 1039-45.

127. 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**, 1911-8.
128. Cooke, M.S., Evans, M.D., Dove, R., Rozalski, R., Gackowski, D., Siomek, A., Lunec, J. and Olinski, R. (2005) DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutat Res*, **574**, 58-66.
129. Cundy, K.C., Kohen, R. and Ames, B.N. (1988) Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in human urine: a possible assay for in vivo oxidative DNA damage. *Basic Life Sci*, **49**, 479-82.
130. Bergtold, D.S., Simic, M.G., Alessio, H. and Cutler, R.G. (1988) Urine biomarkers for oxidative DNA damage. *Basic Life Sci*, **49**, 483-9.
131. Loft, S., Vistisen, K., Ewertz, M., Tjonneland, A., Overvad, K. and Poulsen, H.E. (1992) Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis*, **13**, 2241-7.
132. Loft, S., Fischer-Nielsen, A., Jeding, I.B., Vistisen, K. and Poulsen, H.E. (1993) 8-Hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage. *J Toxicol Environ Health*, **40**, 391-404.
133. Tagesson, C., Chabiuk, D., Axelson, O., Baranski, B., Palus, J. and Wyszynska, K. (1993) Increased urinary excretion of the oxidative DNA adduct, 8-hydroxydeoxyguanosine, as a possible early indicator of occupational cancer hazards in the asbestos, rubber, and azo-dye industries. *Pol J Occup Med Environ Health*, **6**, 357-68.
134. Tagesson, C., Kallberg, M., Klintenberg, C. and Starkhammar, H. (1995) Determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by automated coupled-column high performance liquid chromatography: a powerful technique for assaying in vivo oxidative DNA damage in cancer patients. *Eur J Cancer*, **31A**, 934-40.
135. Verhagen, H., Poulsen, H.E., Loft, S., van Poppel, G., Willems, M.I. and van Bladeren, P.J. (1995) Reduction of oxidative DNA-damage in humans by brussels sprouts. *Carcinogenesis*, **16**, 969-70.
136. Tagesson, C., Kallberg, M. and Wingren, G. (1996) Urinary malondialdehyde and 8-hydroxydeoxyguanosine as potential markers of oxidative stress in industrial art glass workers. *Int Arch Occup Environ Health*, **69**, 5-13.
137. Germadnik, D., Pilger, A. and Rudiger, H.W. (1997) Assay for the determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **689**, 399-403.
138. Ravanat, J.L., Guicherd, P., Tuce, Z. and Cadet, J. (1999) Simultaneous determination of five oxidative DNA lesions in human urine. *Chem Res Toxicol*, **12**, 802-8.
139. Lengger, C., Schoch, G. and Topp, H. (2000) A high-performance liquid chromatographic method for the determination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in urine from man and rat. *Anal Biochem*, **287**, 65-72.
140. Weimann, A., Belling, D. and Poulsen, H.E. (2002) Quantification of 8-oxo-guanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in human urine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Nucleic Acids Res*, **30**, E7.
141. Pilger, A., Ivancsits, S., Germadnik, D. and Rudiger, H.W. (2002) Urinary excretion of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine measured by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **778**, 393-401.
142. Rozalski, R., Gackowski, D., Roszkowski, K., Foksinski, M. and Olinski, R. (2002) The level of 8-hydroxyguanine, a possible repair product of oxidative DNA damage, is higher in urine of cancer patients than in control subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11**, 1072-5.

143. Rozalski, R., Winkler, P., Gackowski, D., Paciorek, T., Kasprzak, H. and Olinski, R. (2003) High concentrations of excised oxidative DNA lesions in human cerebrospinal fluid. *Clin Chem*, **49**, 1218-21.
144. Kim, J.Y., Mukherjee, S., Ngo, L.C. and Christiani, D.C. (2004) Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to fine particulates. *Environ Health Perspect*, **112**, 666-71.
145. Lin, H.S., Jenner, A.M., Ong, C.N., Huang, S.H., Whiteman, M. and Halliwell, B. (2004) A high-throughput and sensitive methodology for the quantification of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: measurement with gas chromatography-mass spectrometry after single solid-phase extraction. *Biochem J*, **380**, 541-8.
146. Foksinski, M., Rozalski, R., Guz, J., Ruszkowska, B., Sztukowska, P., Piwowarski, M., Klungland, A. and Olinski, R. (2004) Urinary excretion of DNA repair products correlates with metabolic rates as well as with maximum life spans of different mammalian species. *Free Radic Biol Med*, **37**, 1449-54.
147. Chen, C., Qu, L., Li, B., Xing, L., Jia, G., Wang, T., Gao, Y., Zhang, P., Li, M., Chen, W. and Chai, Z. (2005) Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. *Clin Chem*, **51**, 759-67.
148. Mei, S., Yao, Q., Wu, C. and Xu, G. (2005) Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by two approaches-capillary electrophoresis and GC/MS: an assay for in vivo oxidative DNA damage in cancer patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **827**, 83-7.
149. Svoboda, P., Maekawa, M., Kawai, K., Tominaga, T., Savela, K. and Kasai, H. (2006) Urinary 8-hydroxyguanine may be a better marker of oxidative stress than 8-hydroxydeoxyguanosine in relation to the life spans of various species. *Antioxid Redox Signal*, **8**, 985-92.
150. Gonzalez-Reche, L.M., Koch, H.M., Weiss, T., Muller, J., Drexler, H. and Angerer, J. (2002) Analysis of ethenoguanine adducts in human urine using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Toxicol Lett*, **134**, 71-7.
151. Chen, H.J. and Chiu, W.L. (2005) Association between cigarette smoking and urinary excretion of 1,N2-ethenoguanine measured by isotope dilution liquid chromatography-electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*, **18**, 1593-9.
152. Nair, J. (1999) Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in humans. *IARC Sci Publ*, 55-61.
153. Chen, H.J. and Chiu, W.L. (2003) Detection and quantification of 1,N6-ethenoadenine in human urine by stable isotope dilution capillary gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*, **16**, 1099-106.
154. Chen, H.J. and Chang, C.M. (2004) Quantification of urinary excretion of 1,N6-ethenoadenine, a potential biomarker of lipid peroxidation, in humans by stable isotope dilution liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: comparison with gas chromatography-mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*, **17**, 963-71.
155. Hillestrom, P.R., Hoberg, A.M., Weimann, A. and Poulsen, H.E. (2004) Quantification of 1,N6-etheno-2'-deoxyadenosine in human urine by column-switching LC/APCI-MS/MS. *Free Radic Biol Med*, **36**, 1383-92.
156. Bartsch, H. and Nair, J. (2005) Accumulation of lipid peroxidation-derived DNA lesions: Potential lead markers for chemoprevention of inflammation-driven malignancies. *Mutat Res*, **591**, 34-44.
157. Hillestrom, P.R., Weimann, A. and Poulsen, H.E. (2006) Quantification of Urinary Etheno-DNA Adducts by Column-Switching LC/APCI-MS/MS. *J Am Soc Mass Spectrom*, **17**, 605-10.
158. Weimann, A., Riis, B. and Poulsen, H.E. (2004) Oligonucleotides in human urine do not contain 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanosine. *Free Radic Biol Med*, **36**, 1378-82.

159. De Bont, R. and van Larebeke, N. (2004) Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*, **19**, 169-85.
160. Frelon, S., Douki, T., Ravanat, J.L., Pouget, J.P., Tornabene, C. and Cadet, J. (2000) High-performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. *Chem Res Toxicol*, **13**, 1002-10.
161. Foksinski, M., Gackowski, D., Rozalski, R. and Olinski, R. (2003) Cellular level of 8-oxo-2'-deoxyguanosine in DNA does not correlate with urinary excretion of the modified base/nucleoside. *Acta Biochim Pol*, **50**, 549-53.
162. Churchwell, M.I., Beland, F.A. and Doerge, D.R. (2002) Quantification of multiple DNA adducts formed through oxidative stress using liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*, **15**, 1295-301.
163. Nair, J., Barbin, A., Guichard, Y. and Bartsch, H. (1995) 1,N6-ethenodeoxyadenosine and 3,N4-ethenodeoxycytine in liver DNA from humans and untreated rodents detected by immunoaffinity/³²P-postlabeling. *Carcinogenesis*, **16**, 613-7.
164. Nair, J., Vaca, C.E., Velic, I., Mutanen, M., Valsta, L.M. and Bartsch, H. (1997) High dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **6**, 597-601.
165. Kadlubar, F.F., Anderson, K.E., Haussermann, S., Lang, N.P., Barone, G.W., Thompson, P.A., MacLeod, S.L., Chou, M.W., Mikhailova, M., Plastaras, J., Marnett, L.J., Nair, J., Velic, I. and Bartsch, H. (1998) Comparison of DNA adduct levels associated with oxidative stress in human pancreas. *Mutat Res*, **405**, 125-33.
166. Nair, J., Carmichael, P.L., Fernando, R.C., Phillips, D.H., Strain, A.J. and Bartsch, H. (1998) Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in the liver of patients with the genetic metal storage disorders Wilson's disease and primary hemochromatosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **7**, 435-40.
167. Nair, J., Barbin, A., Velic, I. and Bartsch, H. (1999) Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutat Res*, **424**, 59-69.
168. Bartsch, H. and Nair, J. (2000) New DNA-based biomarkers for oxidative stress and cancer chemoprevention studies. *Eur J Cancer*, **36**, 1229-34.
169. Doerge, D.R., Churchwell, M.I., Fang, J.L. and Beland, F.A. (2000) Quantification of etheno-DNA adducts using liquid chromatography, on-line sample processing, and electrospray tandem mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*, **13**, 1259-64.
170. Frank, A., Seitz, H.K., Bartsch, H., Frank, N. and Nair, J. (2004) Immunohistochemical detection of 1,N6-ethenodeoxyadenosine in nuclei of human liver affected by diseases predisposing to hepato-carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **25**, 1027-31.
171. Vaca, C.E., Fang, J.L., Mutanen, M. and Valsta, L. (1995) ³²P-postlabelling determination of DNA adducts of malonaldehyde in humans: total white blood cells and breast tissue. *Carcinogenesis*, **16**, 1847-51.
172. Fang, J.L., Vaca, C.E., Valsta, L.M. and Mutanen, M. (1996) Determination of DNA adducts of malonaldehyde in humans: effects of dietary fatty acid composition. *Carcinogenesis*, **17**, 1035-40.
173. Wang, M., Dhingra, K., Hittelman, W.N., Liehr, J.G., de Andrade, M. and Li, D. (1996) Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **5**, 705-10.
174. Leuratti, C., Singh, R., Lagneau, C., Farmer, P.B., Plastaras, J.P., Marnett, L.J. and Shuker, D.E. (1998) Determination of malondialdehyde-induced DNA damage in human tissues using an immunoslot blot assay. *Carcinogenesis*, **19**, 1919-24.
175. Sun, X., Nair, J. and Bartsch, H. (2004) A modified immuno-enriched ³²P-postlabeling method for analyzing the malondialdehyde-deoxyguanosine adduct, 3-(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)- pyrimido[1,2-alpha]purin-10(3H)one in human tissue samples. *Chem Res Toxicol*, **17**, 268-72.

176. Gackowski, D., Speina, E., Zielinska, M., Kowalewski, J., Rozalski, R., Siomek, A., Paciorek, T., Tudek, B. and Olinski, R. (2003) Products of oxidative DNA damage and repair as possible biomarkers of susceptibility to lung cancer. *Cancer Res*, **63**, 4899-902.
177. Fraga, C.G., Motchnik, P.A., Shigenaga, M.K., Helbock, H.J., Jacob, R.A. and Ames, B.N. (1991) Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 11003-6.
178. Fraga, C.G., Motchnik, P.A., Wyrobek, A.J., Rempel, D.M. and Ames, B.N. (1996) Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res*, **351**, 199-203.
179. Ni, Z.Y., Liu, Y.Q., Shen, H.M., Chia, S.E. and Ong, C.N. (1997) Does the increase of 8-hydroxydeoxyguanosine lead to poor sperm quality? *Mutat Res*, **381**, 77-82.
180. Shen, H.M., Chia, S.E., Ni, Z.Y., New, A.L., Lee, B.L. and Ong, C.N. (1997) Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reprod Toxicol*, **11**, 675-80.
181. Kodama, H., Yamaguchi, R., Fukuda, J., Kasai, H. and Tanaka, T. (1997) Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril*, **68**, 519-24.
182. Shen, H.M., Chia, S.E. and Ong, C.N. (1999) Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J Androl*, **20**, 718-23.
183. Shen, H. and Ong, C. (2000) Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med*, **28**, 529-36.
184. Nakamura, H., Kimura, T., Nakajima, A., Shimoya, K., Takemura, M., Hashimoto, K., Isaka, S., Azuma, C., Koyama, M. and Murata, Y. (2002) Detection of oxidative stress in seminal plasma and fractionated sperm from subfertile male patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **105**, 155-60.
185. Xu, D.X., Shen, H.M., Zhu, Q.X., Chua, L., Wang, Q.N., Chia, S.E. and Ong, C.N. (2003) The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutat Res*, **534**, 155-63.
186. Oger, I., Da Cruz, C., Panteix, G. and Menezo, Y. (2003) Evaluating human sperm DNA integrity: relationship between 8-hydroxydeoxyguanosine quantification and the sperm chromatin structure assay. *Zygote*, **11**, 367-71.
187. Bogdanov, M.B., Beal, M.F., McCabe, D.R., Griffin, R.M. and Matson, W.R. (1999) A carbon column-based liquid chromatography electrochemical approach to routine 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine measurements in urine and other biologic matrices: a one-year evaluation of methods. *Free Radic Biol Med*, **27**, 647-66.
188. Hersch, S.M., Gevorkian, S., Marder, K., Moskowitz, C., Feigin, A., Cox, M., Como, P., Zimmerman, C., Lin, M., Zhang, L., Ulug, A.M., Beal, M.F., Matson, W., Bogdanov, M., Ebbel, E., Zaleta, A., Kaneko, Y., Jenkins, B., Hevelone, N., Zhang, H., Yu, H., Schoenfeld, D., Ferrante, R. and Rosas, H.D. (2006) Creatine in Huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH²'dG. *Neurology*, **66**, 250-2.
189. Badouard, C., Masuda, M., Nishino, H., Cadet, J., Favier, A. and Ravanat, J.L. (2005) Detection of chlorinated DNA and RNA nucleosides by HPLC coupled to tandem mass spectrometry as potential biomarkers of inflammation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **827**, 26-31.
190. Toyokuni, S., Tanaka, T., Hattori, Y., Nishiyama, Y., Yoshida, A., Uchida, K., Hiai, H., Ochi, H. and Osawa, T. (1997) Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest*, **76**, 365-74.
191. Toyokuni, S., Iwasa, Y., Kondo, S., Tanaka, T., Ochi, H. and Hiai, H. (1999) Intranuclear distribution of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. An immunocytochemical study. *J Histochem Cytochem*, **47**, 833-6.

192. Hofer, T., Badouard, C., Bajak, E., Ravanat, J.L., Mattsson, A. and Cotgreave, I.A. (2005) Hydrogen peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA. *Biol Chem*, **386**, 333-7.
193. Hercberg, S., Preziosi, P., Briancon, S., Galan, P., Triol, I., Malvy, D., Rousset, A.M. and Favier, A. (1998) A primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers in a general population: the SU.VI.MAX study--design, methods, and participant characteristics. *Supplementation en Vitamines et Mineraux Antioxydants. Control Clin Trials*, **19**, 336-51.
194. Hercberg, S., Galan, P., Preziosi, P., Bertrais, S., Mennen, L., Malvy, D., Rousset, A.M., Favier, A. and Briancon, S. (2004) The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med*, **164**, 2335-42.
195. Galan, P., Briancon, S., Favier, A., Bertrais, S., Preziosi, P., Faure, H., Arnaud, J., Arnault, N., Czernichow, S., Mennen, L. and Hercberg, S. (2005) Antioxidant status and risk of cancer in the SU.VI.MAX study: is the effect of supplementation dependent on baseline levels? *Br J Nutr*, **94**, 125-32.

ANNEXES

10 ANNEXES

Annexe 1 : Abréviations relatives aux acides nucléiques et à leurs lésions et structures chimiques.

Bases	Ribonucléosides	2'-désoxyribonucléosides
Guanine : G ou Gua	Guanosine : Guo	2'-désoxyguanosine : dGuo
Adénine : A ou Ade	Adénosine : Ado	2'-désoxyadénosine : dAdo
Cytosine : C ou Cyt	Cytidine : Cyd	2'-désoxycytidine : dCyd
Thymine : T ou Thy		2'-désoxythymidine : Thd
Uracile : U ou Ura	Uridine : Urd	2'-désoxyuridine : dUrd

8-oxoGua : 8-hydroxyguanine

5-HMUra : (5-hydroxyméthyl)uracile

Gly-Thy : Glycols de thymine

2-OH-Ade : 2-hydroxyadénine

5-OH-Cyt : 5-hydroxycytosine

NO₂-Gua : 8-nitroguanine

8-oxodGTP : 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate

8-oxodGuo : 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine

dIiz : 2,5-diimino-4-[(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyle)amino]-2H,5H-imidazole.

Iz : Imidazolone (5-diamino-4H-imidazolone)

NI : 5-nitro-4-guanidinohydantoine

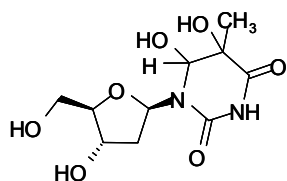
NO₂dGuo : 8-nitro-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosine

Oz : Oxazolone : 2,2-diamino-4-[(3,5-di-o-acétyl-2-désoxy-β-D-érythro-pentofuranosyl)amino]-5-(2H)-oxazolone

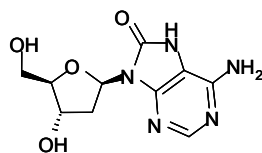
Sph : spiroiminodihydantoine désoxyribonucléoside

M₁-dGuo : 3-(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)pyrimido[1,2-a]purin-10-one

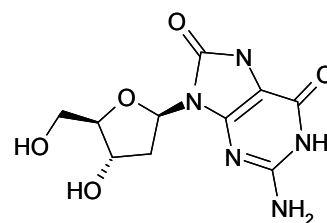
Bases lésées	Ribonucléosides lésés	2'-désoxyribonucléosides lésés
8-oxoGua	8-oxoGuo	8-oxodGuo
5-HMUra	5-HMUrd	5-HMdUrd
Gly-Thy		Gly-Thd
2-OHAde	2-OHAdo	2-OHdAdo
5-OHCyt	5-OHCyd	5-OHdCyd
NO₂-Gua	NO₂-Guo	NO₂-dGuo
5-ClCyt	5-ClCyd	5-Cl dCyd
8-ClGua	8-ClGuo	8-Cl dGuo
8-ClAde	8-ClAdo	8-Cl dAdo
5-ClUra	5-ClUrd	
εGua	εGuo	εdGuo
εAde	εAdo	εdAdo
εCyt	εCyd	εdCyd
M₁-Gua	M₁-Guo	M₁-dGuo
M₁-Ade	M₁-Ado	M₁-dAdo
HNE-Gua	HNE-Guo	HNE-dGuo



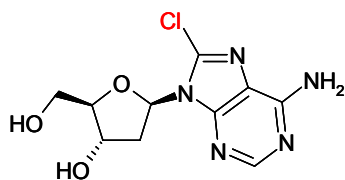
**Diols de thymidine
(Gly-Thd)**



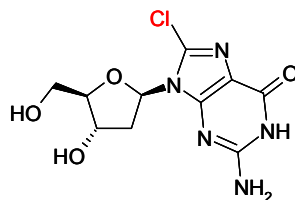
**8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyadénosine
(8-oxodAdo)**



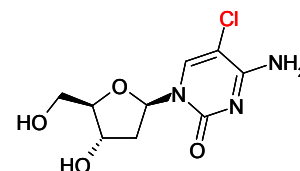
**8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine
(8-oxodGuo)**



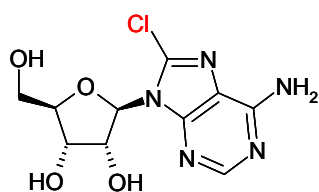
**8-Chloro-2'-désoxyAdénosine
(8-ClAdo)**



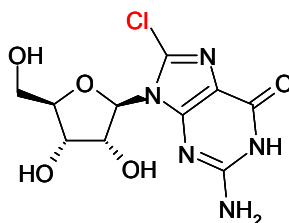
**8-Chloro-2'-désoxyGuanosine
(8-ClGuo)**



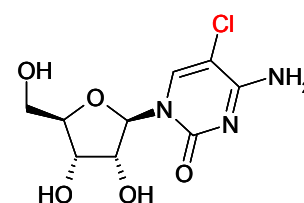
**5-Chloro-2'-désoxyCytidine
(5-ClCyd)**



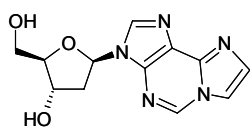
**8-ChloroAdénosine
(8-ClAdo)**



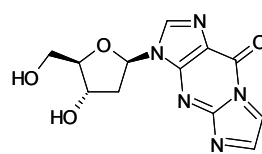
**8-ChloroGuanosine
(8-ClGuo)**



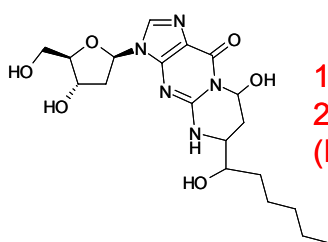
**5-chloroCytidine
(5-ClCyd)**



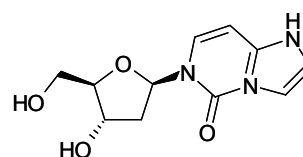
**1,N⁶-éthéno-2'-désoxyadénosine
(εdAdo)**



**1,N²-éthéno-2'-désoxyguanosine
(εdGuo)**

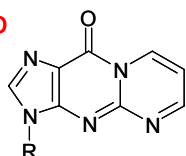


**1,N²-propano-
2'-désoxyguanosine
(HNE-dGuo)**



3,N⁴-éthéno-2'-désoxycytidine (εdCyd)

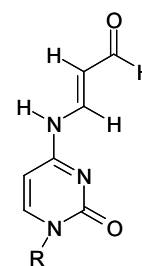
M₁-dGuo



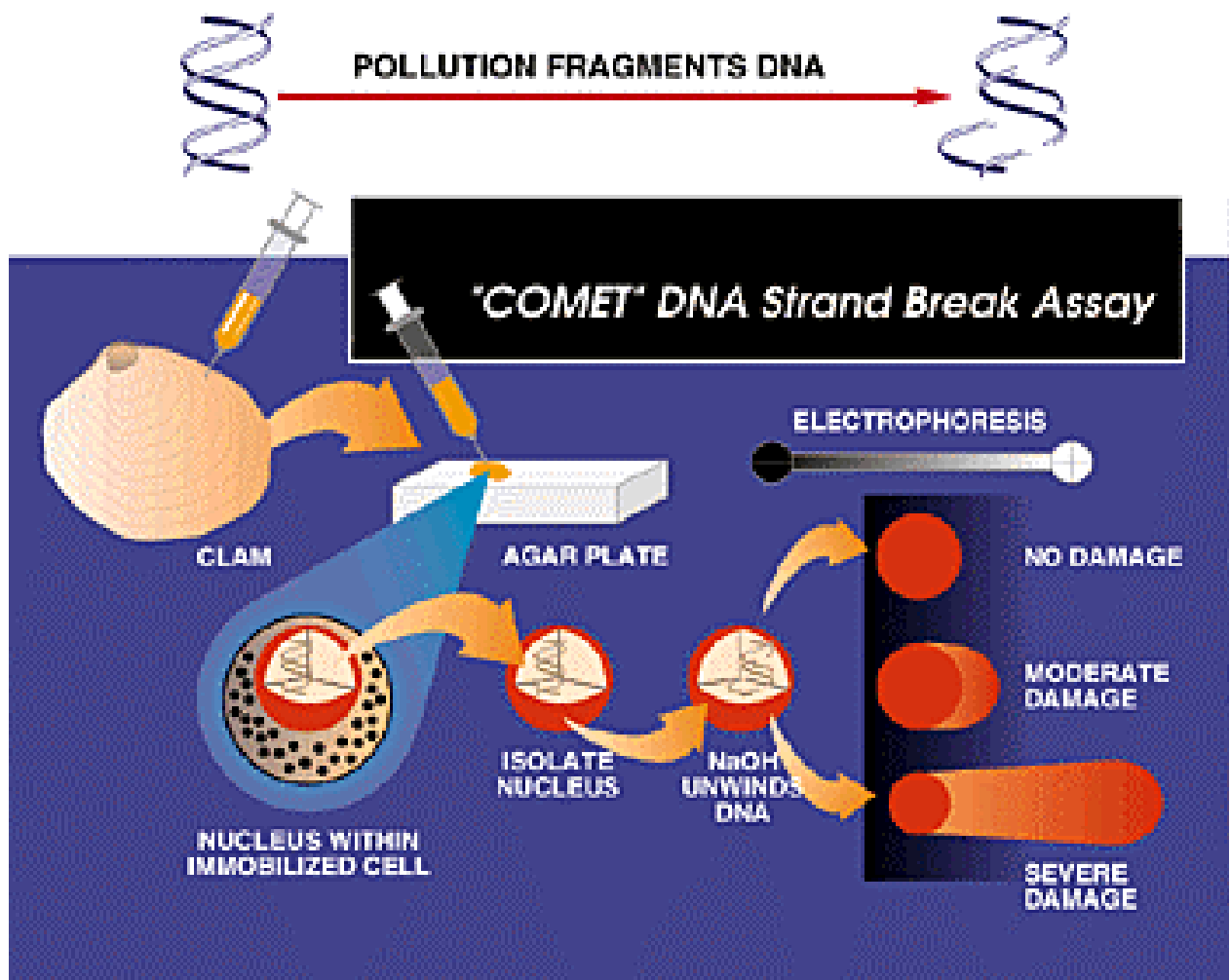
M1-dAdo



M1-dCyd



Annexe 2: Essai Comet



CLAM : Palourde

Annexe 3 : Synthèse de certaines lésions chlorées et standard interne

➤ **Synthèse de 5-Cl(d)Cyd :**

100 µM de dCyd mélangée à 2,2 M de NaCl dans du tampon phosphate 50 mM à pH 2,5
Vortexer

Ajouter une solution de HOCl pour avoir une concentration finale de 2000 µM.

Le mélange réactionnel est gardé 15 minutes à température ambiante

Finalement, ajouter la N-acétylcystéine pour avoir une concentration finale de 20 mM

La formation de la 5-Cl(d)Cyd est effective au bout de 3 heures.

Le pH réactionnel est neutralisé avant de purifier la 5-Cl(d)Cyd par CLHP-UV (à 260nm).

➤ **Synthèse de 5-ClCyt :**

La synthèse de cette base chlorée est réalisée de la même façon que la 5-Cl(d)Cyd en partant cette fois-ci de Cyt et non de dCyd.

Toutefois, l'hydrolyse acide de la 5-Cl(d)Cyd nous permet également d'obtenir la 5-ClCyt.

➤ **Synthèse de 8-Cl(d)Ado :**

500 µM de dAdo mélangée à 2,2 M de NaCl dans du tampon phosphate 50 mM à pH 4,5
Vortexer

Ajouter une solution de HOCl pour avoir une concentration finale de 3000 µM.

Le mélange réactionnel est gardé 15 minutes à température ambiante

Finalement, ajouter la N-acétylcystéine pour avoir une concentration finale de 20 mM

La formation de la 8-Cl(d)Ado est effective dès l'ajout de N-acétylcystéine.

Le pH réactionnel est neutralisé avant de purifier la 8-Cl(d)Ado par CLHP-UV(à 260nm).

➤ **Synthèse de 8-Cl(d)Guo :**

500 µM de dGuo mélangée à 100µM de Nicotine dans du tampon phosphate 50 mM à pH 10
Vortexer

Ajouter une solution de HOCl pour avoir une concentration finale de 1000 µM.

Le mélange réactionnel est gardé 15 minutes à température ambiante

Finalement, ajouter la N-acétylcystéine pour avoir une concentration finale de 20 mM

La formation de la 8-Cl(d)Guo est effective dès l'ajout de N-acétylcystéine.

Le pH réactionnel est neutralisé avant de purifier la 8-Cl(d)Guo par CLHP-UV(à 260nm).

Annexe 4 : Utilisation d'un centricon

Amicon® Ultra

Urine Concentration Prior to Agarose Gel Electrophoresis and Immunofixation Electrophoresis

The measurement of specific proteins in urine is important for the diagnosis and management of disease states. In most cases, the content of these proteins in urine is too low to be detected and needs to be concentrated. Amicon Ultra devices can be used to concentrate urine samples prior to clinical laboratory analyses. For example, patients with Multiple Myeloma exhibit a proliferation of one antibody-producing plasma cell, which leads to excess production of free immunoglobulin light chains known as Bence-Jones proteins. After staining enrichment in the Amicon Ultra-4 device, immunofixation electrophoresis can be used to identify free light chains (Bence-Jones proteins) in urine by forming a light chain/antibody complex. Also, agarose electrophoresis can be used to quantify light chains and identify additional low molecular weight proteins such as albumin, α -1 globulins, transferrin and IgG that can be present in tubular disorders. Ultrafiltration of urine samples in Amicon Ultra-4 devices provides reproducible, high sample recovery for electrophoretic analyses, usually in 45 minutes or less.

protocol note



Protocol

Materials

- Amicon Ultra-4 4 mL device, 10,000 NMWL
- Centrifuge with fixed angle or swinging bucket rotor capable of 3400 x g
- Kit for microprotein determination (i.e. Sigma # 610-A/ Brillast blue G/Coomassie® Blue)
- Pipette with 200 microliter tip
- Electrophoresis (agarose gel) and immunofixation equipment with apparatus and reagents.

Procedure

1. Determine the total protein in a 24-hour urine specimen.
2. Fill Amicon Ultra-4 device with 4 mL of urine.
3. Centrifuge at 3400 x g for 30–45 minutes (approximately 25–50 μ L concentrate volume). This produces up to a 160-fold increase in concentration.
4. Insert a pipette into the bottom of the filter unit and withdraw 4 concentrated sample.
5. Perform an agarose electrophoresis on the concentrate to quantify light chains and identify other proteins. Determine the percent of light chains with respect to the total number of components in 1 urine. Then multiply the percent of light chains by the total 24-h protein concentration (grams/24-hour volume).
6. Perform immunofixation electrophoresis** on the concentrate to identify light chains.

Acknowledgements

Research using Amicon Ultra devices for urine concentration in this protocol was conducted by Mark Merchant, Ph.D., at Helena Laboratories, Beaumont, TX.

References

1. Tetz, N.W. **Clinical Guide to Laboratory Tests**, 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1990. p. 362–363
2. Kahn, L. **Clinical Chemistry**, 1991; (37), p. 1557–1558
3. Cleveland Clinic homepage. Accessed July 2002. www.clevelandclinic.org/myeloma/DiagnosisAndTreatment/OMultipleMyeloma.html
4. Christenson, R.H., et al. **Clinical Chemistry**, 1983; 29(6), p. 1028–1030
5. Christenson, R.H., and Russell, M.E., **Clinical Chemistry**, 1985; 31(6), p. 923

Additional Notes

- a. Amicon Ultra devices can also be used to concentrate serum, plasma and cerebrospinal fluid for similar analyses. A concentration of approximately 20 mg/mL is required in order to detect free light chains from diseased patients by agarose electrophoresis. Detection by immunofixation electrophoresis is 10 times more sensitive than by agarose electrophoresis.
- b. Normal heterogeneous immunoglobulins may also be seen in urine concentrate with immunofixation electrophoresis. This "ladder effect" is comprised of microheterogeneous light chains. Bence-Jones proteins may be within this ladder. To verify the presence of Bence-Jones proteins requires additional analysis by 2-dimensional electrophoresis.
- c. If there is antigen excess, dilution of the concentrate will be required until equilibrium is achieved between the antigen (Bence-Jones protein) and the antibody.

Ordering Information

Amicon Ultra-4 mL Centrifugal Filter Units with 10,000 NMWL membrane were used in this protocol. Additional volume sizes and membranes are available for other applications. See www.millipore.com/amicon for product information.

Description	Qty/Pk	Catalogue No.
Amicon Ultra-4 with 10K Ultraal™ membrane	8	UFC8 010 08
	24	UFC8 010 24
	96	UFC8 010 96

MILLIPORE

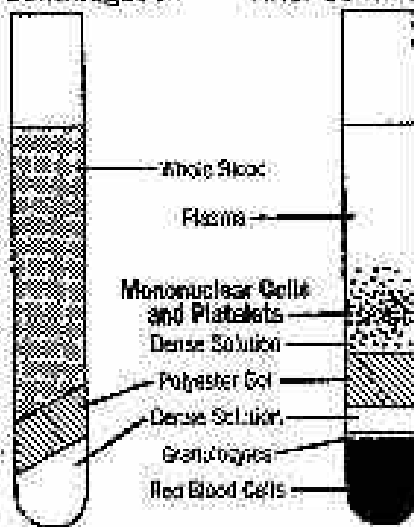
Millipore and Amicon are registered trademarks of Millipore Corporation. Ultraal is a trademark of Millipore Corporation. Coomassie is a trademark of BASF Aktiengesellschaft. U. No. PC 10350P-000 Rev. 07/02 00 0490 Printed in the U.S.A. © 2002 Millipore Corporation, Bedford, MA, U.S.A. All rights reserved.

MILLIPORE

Annexe 5 : Utilisation des CPT

Layering of Formed Elements in the VACUTAINER® CPT™ Tube

Before Centrifugation After Centrifugation



Protocole d'utilisation des vacutainers CPT pour le dosage des lésions de l'ADN dans les leucocytes.

Avant traitement de l'échantillon :

1. S'assurer d'être en possession d'une centrifugeuse adéquate pour ces vacutainers qui sont de grande taille (16mm de diamètre pour 130 mm de hauteur). Le risque est bien souvent que le tube touche le centre du rotor et se casse pendant la centrifugation !
2. **Matériel nécessaire :**
 - Falcons de 15 mL
 - PBS (phosphate buffer saline sans Ca ni Mg) à +4°C
3. **Acheminement :**

Arrivée des prélèvements dans du papier aluminium pour éviter leur exposition à la lumière. Les vacutainers doivent être stockés entre +18°C et +25°C. Ils peuvent être conservés 2 heures au maximum avant d'être centrifugés.

Traitement de l'échantillon :

1. Réaliser une agitation douce des tubes pendant 10 minutes (par retournement).
2. Centrifuger alors les tubes pendant 20 minutes à 1650 g à +20°C.
3. Réaliser alors un aliquotage du plasma se trouvant dans la couche supérieure (environ 5 Eppendorfs de 500 µL de plasma). Congeler directement dans la carboglace.
4. Récupérer la couche lymphocytaire dans un Falcon de 15 ml en versant simplement le CPT dans le Falcon)
5. Ajouter 5mL de PBS puis centrifuger à 400g pendant 5 minutes à +4°C
6. Se débarrasser du surnageant.
7. Ajouter à nouveau 5 mL de PBS et remettre doucement en suspension les cellules.
8. Centrifuger à nouveau à 400g pendant 5 minutes à +4°C
9. Se débarrasser du surnageant et congeler directement dans la carboglace. Les prélèvements seront alors prêts pour réaliser l'extraction de l'ADN des cellules.

Annexe 6 : Technique Ficoll



ONE LAMBDA, INC.

21001 Kittridge Street, Canoga Park, CA 91303-2801 États-Unis Tél : +1 (818) 702-0042 Fax: +1 (818) 702-6904 www.onelambda.com

NOTICE DE PRODUIT

LYMPHO-KWIK® LYMPHOCYTE ISOLATION REAGENTS B, T, T/B, AND MONONUCLEAR (MN)

REF

Références catalogue : LK-50B, LK-25T, LK-50T, LK-50TB, LK-50MN

Utilisation Générale au Laboratoire.



APPLICATION

Le Lympho-Kwik® fournit une méthode simple d'isolement des lymphocytes pour le typage HLA.

RESUMÉ ET EXPLICATION

Le Lympho-Kwik® est un cocktail d'un mélange d'anticorps monoclonaux, d'un gradient de densité stable, et de complément, qui a été développé pour l'isolement de populations lymphocytaires spécifiques. Cette méthode permet un isolement rapide et une pureté cellulaire maximum. Il consiste en une courte incubation suivie d'une centrifugation.

PRINCIPE(S)

Les cellules indésirables sont d'abord lysées par le mélange anticorps monoclonaux et complément, puis séparées par centrifugation sur gradient de densité.

RÉACTIFS

A. Identification

Tous les réactifs Lympho-Kwik® contiennent des anticorps monoclonaux anti-globules rouges, des anti-granulocytes, un gradient de densité et du complément.

- Le Lympho-Kwik® B contient également des anticorps monoclonaux anti-monocytes et anti-lymphocytes T.
- Le Lympho-Kwik® T contient également des anticorps monoclonaux anti-monocytes et anti-lymphocytes B.
- Le Lympho-Kwik® T/B contient également des anticorps monoclonaux anti-monocytes.

Les anticorps monoclonaux sont tous d'origine murine.



B. Avertissement et précaution

1. Tous les produits à base de sang doivent être manipulés comme des produits potentiellement infectieux. Le matériel source dont est dérivé ce produit s'est révélé négatif aux tests requis par la FDA. Toutefois, aucune méthode d'analyse connue ne peut garantir que des produits dérivés du sang humain ne transmettront pas d'agents infectieux.
2. Se reporter à la Fiche de Sécurité pour plus d'information.

C. Mode d'emploi

Se reporter au « Mode d'emploi ».



D. Mode de conservation

Conserver les réactifs à la température indiquée sur l'emballage, et les utiliser avant la date de péremption imprimée sur le coffret.

E. Purification ou traitement nécessaire

1. Pour tous les réactifs Lympho-Kwik® :
 - a. **Ne pas recongeler plus d'une fois !**
 - b. Décongeler à l'eau froide et utiliser immédiatement.
 - c. Garder le réactif sur la glace après décongélation pour conserver leur pouvoir actif.
 - d. Le Lympho-Kwik® peut être filtré sur filtre de 0,2 µ.
 - e. Se reporter au « Mode d'emploi » page 2 ou 3, selon ce qui convient.
2. Pour 50 isollements avec le Lympho-Kwik® :

Suivre les instructions ci-dessus et aliquoter par fraction de 0,8 ml. Utiliser immédiatement ou conserver à une température de -65 °C ou inférieure.

- F. Indications d'instabilité
Ne pas utiliser en présence de précipité.

MATERIEL NÉCESSAIRE

Aucun

COLLECTE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

A. Mode de prélèvement des échantillons

Prélever environ 10 ml de sang total de préférence sur ACD ou CPDA. L'Héparine de Sodium peut aussi être utilisé.

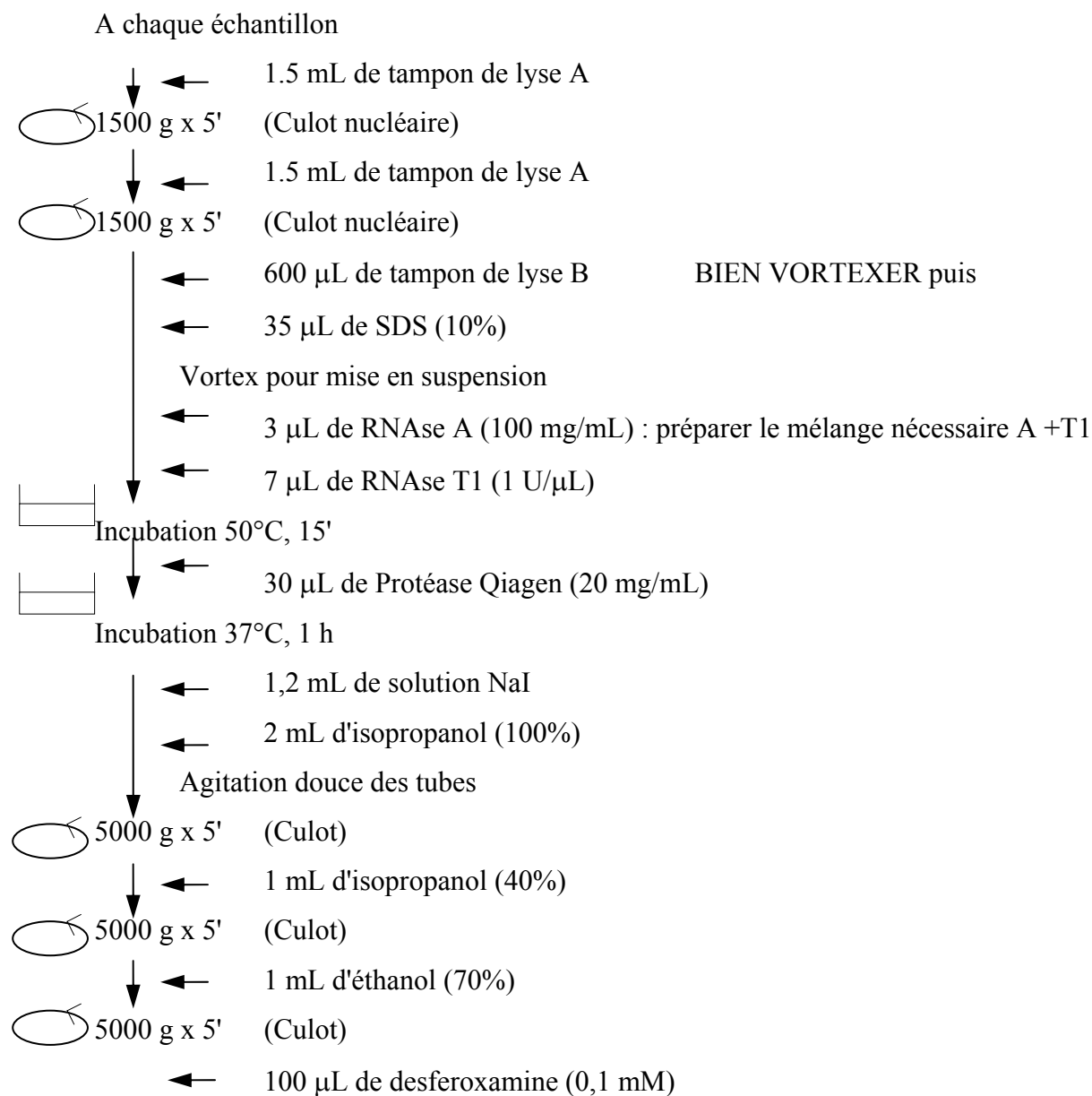
Attention : Ne pas utiliser de l'Héparine de lithium.

Les Lymphocytes B doivent être isolés dans les 24 heures pour obtenir un rendement optimum, mais un prélèvement de sang de 3 jours maximum pourra être utilisé. Conserver en position horizontale à température ambiante jusqu'à l'isolement.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS : PROBLÈMES ET SOLUTIONS

Problèmes	Solutions
Quantité trop importante de buffy coat	Si plus de 0,1 ml de buffy coat a été prélevé, centrifuger les lymphocytes dans du PBS pendant 1,5 minutes, à 1 500 g. Rejeter le surnageant et transférer la couche blanche dans un tube Fisher contenant 0,8 ml de Lympho-Kwik®. Continuer avec les étapes normales.
Quantité trop importante de globules rouges indiquée par un surnageant trouble.	Cela peut être dû à une durée d'incubation incorrecte ou à une température d'incubation trop basse. Vérifier la durée et la température, et répéter avec 10 minutes d'incubation.
Contamination par des globules rouges après séparation sur Ficoll.	Si la contamination est excessive après la séparation sur Ficoll, OLI recommande d'éliminer les globules rouges par lyse avec une solution de chlorure d'ammonium ou par agglutination avec un anticorps anti-globules rouges approprié. De faibles quantités de globules rouges peuvent être lysées par le Lympho-Kwik®.
Quantité importante de granulocytes	Cela peut être dû à une surcharge du réactif par le buffy coat. Retraiter le culot au Lympho-Kwik®, en commençant à l'étape 1c du protocole d'isolement des cellules.
Quantité importante de plaquettes	Centrifuger les lymphocytes pendant 1 minutes à 750 g. Rejeter le surnageant et remettre en suspension dans du McCoy.
Agrégats de globules rouges ou de granulocytes pendant le lavage.	Centrifuger les lymphocytes pendant 1 seconde à 1 000 g. Transférer le surnageant (lymphocytes) dans un autre tube.
Pour le Lympho-Kwik® B seulement :	
Bruit de fond trop élevé. Le rendement en cellules B est supérieur à 20% de la population lymphocytaire totale.	<ul style="list-style-type: none"> • Les échantillons ne doivent pas dater de plus de 2 jours. • La préparation initiale des lymphocytes totaux doit être propre. Une contamination excessive par des globules rouges et des granulocytes diminue l'efficacité du réactif d'isolement des cellules B. • Incuber à 37 °C, une température plus élevée peut abîmer les cellules B. • Ne pas utiliser plus de 10×10^6 lymphocytes totaux, ce qui risque de surcharger le réactif. Action Corrective : renouveler une dose du Réactif 1 et du Réactif 2.

Annexe 7 : Protocole standard d'extraction d'ADN



PREPARATION DES TAMPONS D'EXTRACTION :

Tampon de lyse de la membrane plasmique : Tampon A, pH 7.5

Composé	Concentration	Masse Molaire	pour 100 mL
Sucrose	320 mM	342.3	10.97 g
MgCl ₂	5 mM	203.3	101 mg
Tris/HCl	10 mM	121.4	121 mg
Desferoxamine	0.1 mM	656.8	6.5 mg
Triton X100			1 mL

Tampon de lyse de la membrane nucléaire : Tampon B, pH 8

Composé	Concentration	Masse Molaire	Pour 100 mL
EDTA-Na ₂	5 mM	372.24	186 mg
Tris/HCl	10 mM	121.4	121 mg
Desferoxamine	0.15 mM	656.8	9.8 mg

Solution NaI, pH 8

Composé	Concentration	Masse Molaire	Pour 100 mL
EDTA-Na ₂	20 mM	372.24	740 mg
NaI	7.6 M	149.9	113.9 g
Tris/HCl	40 mM	121.4	484 mg
Desferoxamine	0.30 mM	656.8	19.6 mg

Nb : Dissoudre lentement le NaI dans un minimum d'eau (ne pas ajouter de l'eau directement sur le NaI)

Annexe 8 : Digestion enzymatique des ADN et ARN

Enzymes utilisées :

DNase II : Endonucléase libérant des oligonucléotides 3'-phosphate. Stockée à -20°C

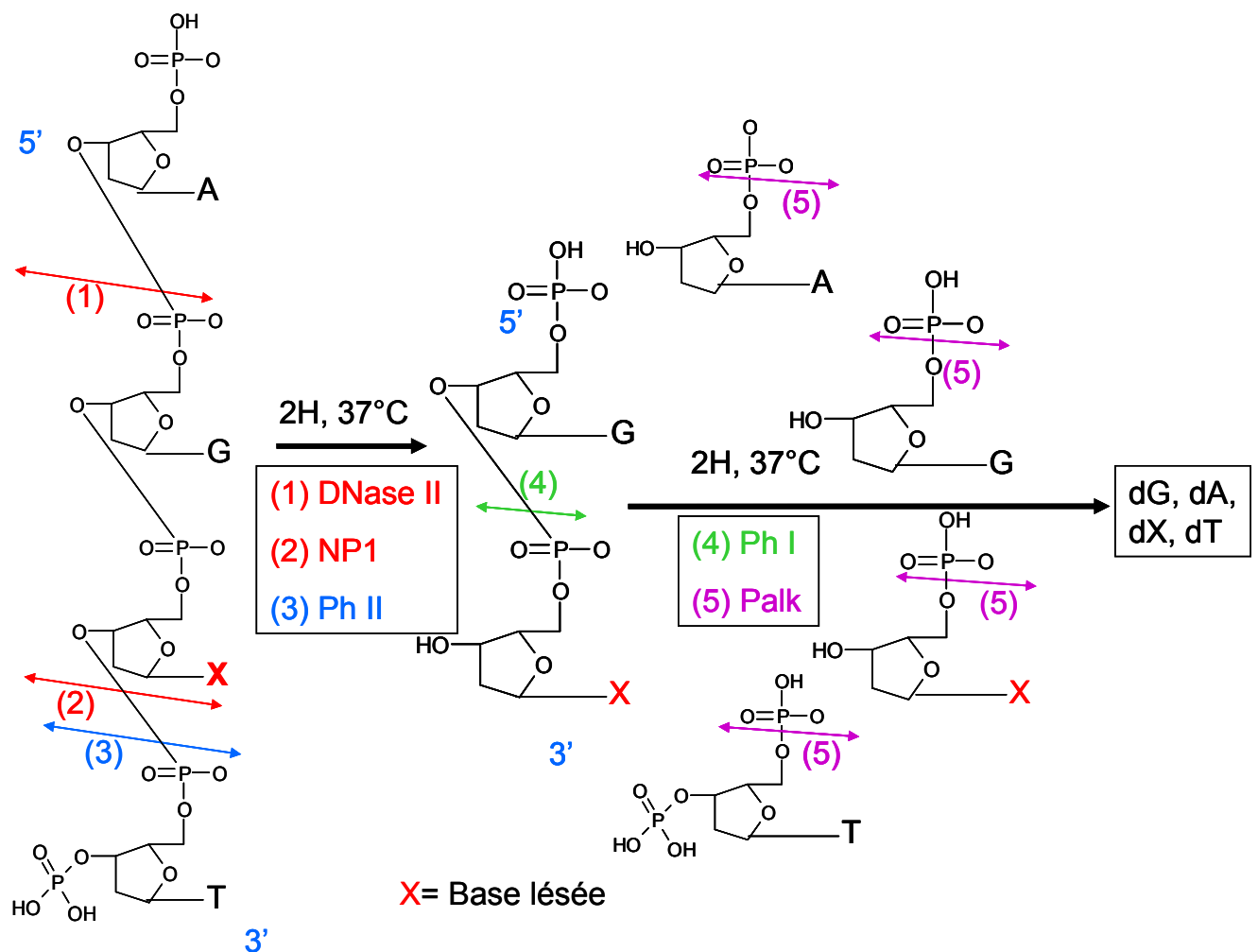
Phosphodiesterase II : 3'-exonucléase, attaque l'ADN de 5' vers 3' en libérant des nucléotides 3'-phosphate (inactive si extrémité 5' phosphorylée) notée PhII conc stockée à -20°C.

Nucléase P1 : endonucléase et exonucléase libérant 5'-phosphates; 3'-phosphatase

Phosphodiesterase I : 5'-exonucléase, attaque l'ADN de 3' vers 5' en libérant des nucléotides 5'-phosphate (inactive si extrémité 3' phosphorylée). Stockée à -20°C

Phosphatase alcaline : 3'- et 5-phosphatase. Stockée à +4°C

Remarque : pour faciliter la mesure des petits volumes, il est souvent utile de préparer le mélange d'enzymes pour l'ensemble des échantillons à digérer.



Protocole:

-L'ADN est en solution dans 100 µl de desferoxamine à 0,1 mM. Il doit être le MIEUX solubilisé possible, au besoin par des pipetages répétés.

-Ajouter dans chaque échantillon :

0.5 µL de phosphodiesterase II à 0.1 U/µl notée PhII conc stockée à -20°C.

0.5 µL de DNase II à 10 U/µL stockée à -20°C.

5 µL de nucléase P1 (0.2 U/µl dans son tampon : 300 mM acétate d'ammonium, 1 mM ZnSO₄, pH 5,3)

5 µL de tampon MNSPDE (200 mM acide succinique, 100 mM CaCl₂, pH 6)

-Incuber 2 h à 37°C, en vortexant après 30 min.

Ajouter 12 µL de tampon de phosphatase alcaline (Tampon Palk 10X: 500 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8)

1 µL de phosphodiesterase I à 0.03U/µL.

Ajouter 4 unités de phosphatase alcaline. Attention : selon les fournisseurs, les concentrations changent. Elles peuvent varier de 1 à 100 U/µL. Adapter les volumes à la concentration !!

-Incuber 2h à 37°C

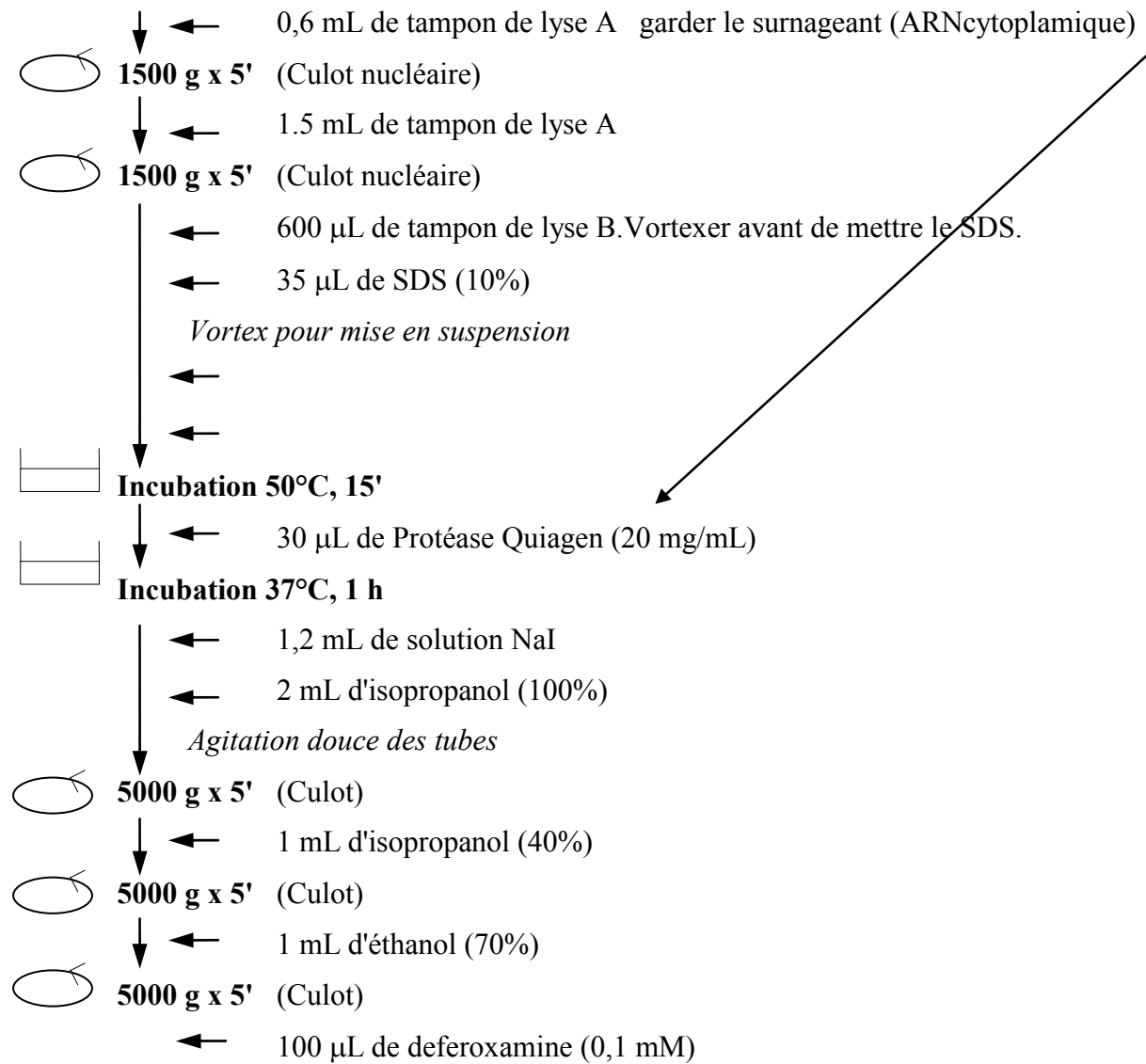
Ajouter 7 µL d'HCl 0,1 N

Centrifuger 5min à 5000 g.

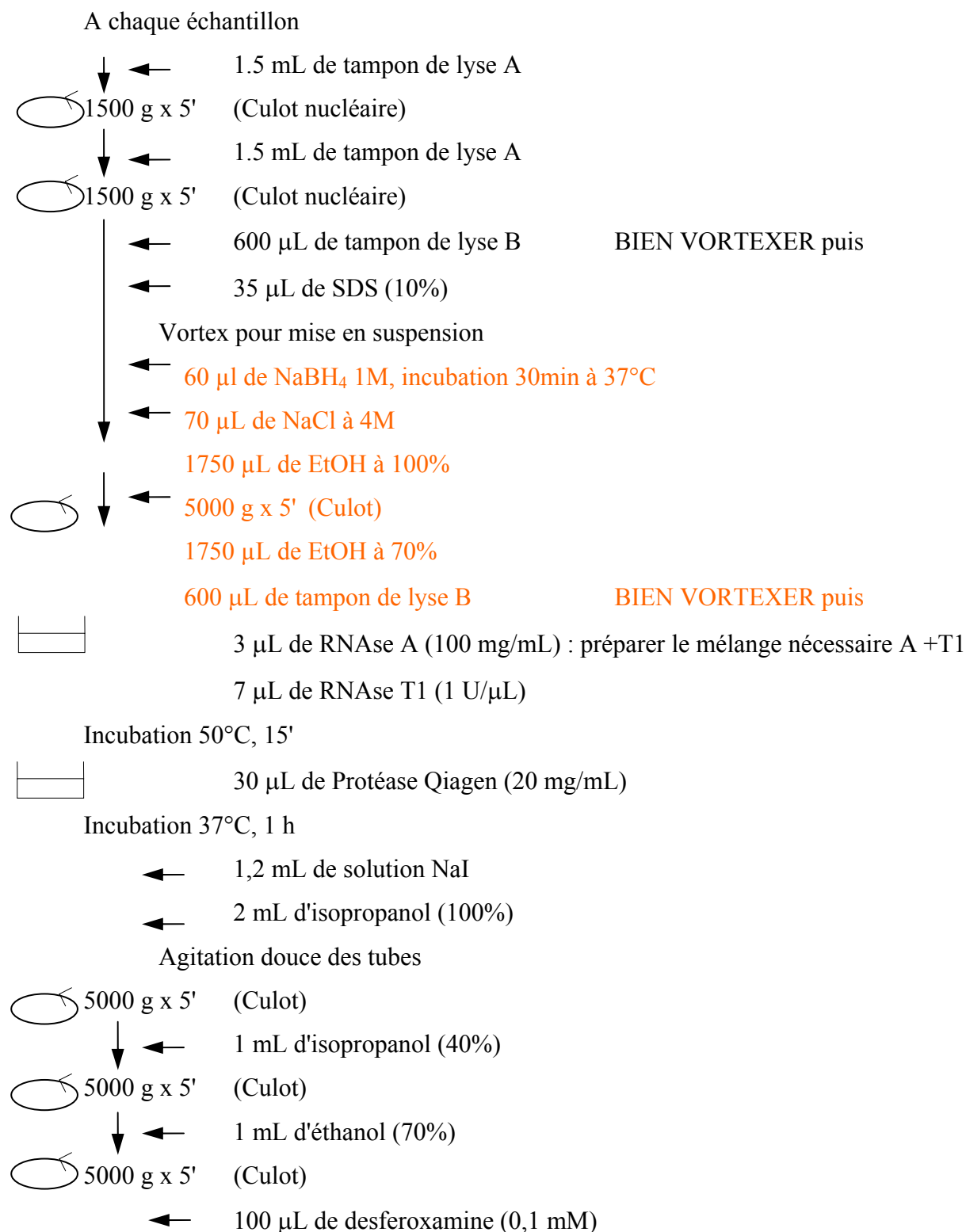
Passer en vial CLHP. Evaporer l'éthanol au speed-vac à trompe à eau, ceci permet également de concentrer les échantillons.

Annexe 9 : Protocole d'extraction d'ADN et d'ARN

A chaque échantillon



Annexe 10 : Protocole d'extraction cellulaire du dGMGO



PUBLICATIONS

Oxidatively generated damage to cellular DNA: mechanistic aspects

Jean Cadet,^{*} Thierry Douki, Carine Badouard, Alain Favier and Jean-Luc Ravanat

Laboratoire "Lésions des Acides Nucléiques", SCIB-UMR-E n°3 (CEA/UJF) Département de Recherche

Fondamentale sur la Matière Condensée, CEA/Grenoble, F-38054 Grenoble Cedex 9, France

Corresponding Author : Jean Cadet - Laboratoire "Lésions des Acides Nucléiques, DRFMC/SCIB-UMR-E n°3 (CEA/UJF), CEA/Grenoble, F-38054 Grenoble Cedex 9, France

Abstract

In this short survey emphasis was placed on recent aspects of the oxidative formation of several classes of modified bases in cellular DNA that arise from the reaction of $\cdot\text{OH}$ radical, singlet oxygen and hypochlorous acid. Degradation compounds were detected quantitatively and specifically after suitable DNA hydrolysis into either nucleosides or bases by HPLC-tandem mass spectrometry. Thus, 6 oxidized nucleosides including the 4 *cis* and *trans* diastereomers of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine, 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine and 5-formyl-2'-deoxyuridine were found to be formed as the result of $\cdot\text{OH}$ radical mediated oxidation of thymidine. In addition γ -irradiation of cellular DNA was found to generate 8-oxo-7,8-dihydropurine derivatives and related formamidopyrimidine compounds as the result of $\cdot\text{OH}$ radical oxidation of the guanine and adenine bases. In addition singlet oxygen oxidation of guanine was found to give rise exclusively to 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine while HOCl reaction with cytosine, adenine and guanine led to the formation of 5-chlorocytosine, 8-chloroadenine and 8-chloroguanine nucleosides respectively in the DNA and RNA of human white blood cells. Interestingly, formation of these various degradation products was rationalized in terms of existing mechanisms that were previously proposed from model studies involving mostly free nucleosides.

Introduction

Relevant information has been gained during the last two decades on various oxidation reactions mediated by $\cdot\text{OH}$ radical, singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), one-electron oxidants and hypochlorite from model studies including nucleobases, nucleosides and oligonucleotides. Thus, more than 70 modified nucleosides including diastereomeric forms and thymidine hydroperoxides have been isolated and characterized (reviewed by ref. 1,2). In addition relevant structural, chemical features and kinetic data on radical precursors of most of the oxidised nucleobases have become available from electron spin resonance, laser flash and pulse radiolysis analyses (reviewed by ref. 3). Altogether this has allowed in conjunction with dedicated mechanistic studies to propose comprehensive degradation pathways for most of the oxidation reactions of purine and pyrimidine DNA bases. However, the situation is not as clear for cellular DNA since only a few oxidized 2'-deoxyribonucleosides including the 4 *cis* and *trans* diastereomers of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine (ThdGly), 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine (5-HmdUrd), 5-formyl-2'-deoxyuridine (5-FordUrd), 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine (8-oxodGuo) and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyadenosine (8-oxodAdo) have been so far accurately detected and measured. It may be added that 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua) and 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapyAde) together with halogenated 2'-deoxyribonucleosides were also shown to be formed in the DNA of cultured cells (reviewed by ref. 4). This has been made possible by the use of appropriate methods involving

high performance liquid chromatography as the suitable analytical tool that may be associated to either the frequently used electrochemical detection technique (ECD) or the more recently became available tandem mass spectrometry (MS/MS).⁵ HPLC-ECD which was introduced 20 years ago⁶ is a robust method whose application in the oxidation detection mode is however restricted to electroactive DNA lesions⁷ including 8-oxodGuo, 8-oxodAdo and 5-hydroxypyrimidine compounds. HPLC-MS/MS that operates in the electrospray ionization mode is more versatile and on the average more sensitive than HPLC-ECD, allowing the measurement of numerous lesions, more often as nucleosides. It may be pointed out that previously reported gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) measurements of oxidized bases⁸⁻¹² have been shown to be overestimated by factors varying between 2 and 3 orders of magnitude. The main origin of the latter drawback is the occurrence of artefactual oxidation of the overwhelming normal nucleobases during the derivatization step prior to the GC-MS analysis.¹³⁻¹⁶ A second source of spurious oxidation of DNA components which concerns all the assays involving DNA isolation has been identified more recently.¹⁶ This is likely to involve Fenton type reactions during the DNA extraction step and subsequent work-up due to the presence of transition metal contaminants. Optimized DNA extraction methods involving in particular the use of metal chelators are now available, allowing the significant reduction of the contribution of adventitious oxidation processes.^{17,18} It may be emphasized that comparative evaluation and optimization of the available HPLC and biochemical assays aimed at measuring 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) in both isolated and cellular DNA have been the subject of targeted studies within the recent ESCODD European network.²⁰⁻²³ One of the main recommendations from these cooperative investigations which have involved 28 laboratories is that studies reporting levels of 8-oxodGuo higher than 5 lesions per 10⁶ normal guanines in cellular DNA are questionable and therefore should be reassessed. This explains why in the present survey devoted to mechanistic aspects of the formation of oxidatively generated base damage in the DNA of isolated cells only the measurements of oxidized bases and nucleosides that are based on the use of HPLC-ECD and HPLC-MS/MS are reported. It may be added that appropriate physical and chemical sources of oxidizing and halogenating species were used in order to induce a significant increase above the oxidative metabolism-mediated steady-state level of investigated oxidized bases. This was achieved in an acute way under conditions where DNA repair was minimized. Hydroxyl radical was efficiently generated by ionizing radiation whereas endogenous photosensitizers and a thermolabile naphthalene endoperoxide were used to produce singlet oxygen (¹O₂). Chemically prepared HOCl was utilized for the halogenation of the three aminobases of DNA and RNA in SKM-1 cells.

Hydroxyl radical-mediated oxidation of thymine

Exposure of THP-1 human monocytes to gamma rays has been shown to induce the formation of 6 oxidized pyrimidine nucleosides that were detected and quantitatively measured by HPLC-ECD and HPLC-MS/MS assays²⁴⁻²⁷ using in the latter case the accurate isotopic dilution technique after suitable enzymic digestion of extracted DNA.²⁸ Thus 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine (5-HmdUrd), 5-formyl-2'-deoxyuridine (5-FordUrd) and the four *cis* and *trans* diastereomers of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine (ThdGly) were found to be generated linearly with the dose within the dose range 90 - 450 Gy of low-LET gamma rays. It may be noted that in contrast to earliest data and recent HPLC-MS measurements the yields of formation of these oxidized nucleosides that is comprised between 29 and 97 lesions per 10⁹ bases Gy⁻¹ is relatively low (Table 1). The three groups of modified nucleosides that all arose from the radiation-induced degradation of thymidine are produced upon exposure of the monocytes to high-LET ¹²C⁶⁺ particles, however with a lower efficiency. A further decrease in the radiation chemical yield of ThdGly, 5-HmdUrd and 5-FordUrd is noted upon exposure to ³⁶Ag¹⁸⁺ that exhibits a higher LET value than ¹²C⁶⁺ heavy ions.

Fig 1

Table 1

The formation of ThdGly, 5-HmdUrd and 5-FordUrd may be mostly rationalized in terms of indirect effects of ionizing radiation that implicate the generation of •OH radical. This was inferred by considering the effects of LET on the efficiency of formation of oxidized nucleosides. Interestingly, it was shown that the increase in LET led to a lower level of radiation-induced generation of the oxidized nucleosides that is concomitant with the decrease in the yield of •OH radical produced. The formation of the 4 diastereomers of ThdGly in cellular DNA may be accounted for by initial addition of •OH at C5 and to a lesser extent at C6 of the thymine moiety as supported by the redox titration pulse radiolysis experiments on the isolated base.^{3,29,30} In a subsequent step, fast addition of molecular oxygen take place to the resulting reducing 6-yl and oxidizing 5-yl pyrimidine radicals in a reaction controlled by diffusion.³¹ This gives rise to related transient peroxy radicals that are subsequently reduced by superoxide radical³² into the corresponding diastereomeric 5- and 6-hydroperoxides.^{33,34} The latter relatively instable peroxidic compounds that have been fully characterized as the base and nucleoside derivatives can be easily reduced into the corresponding alcohols, namely ThdGly,^{35,36} in a highly stereospecific way according to a S_N2 mechanism involving the peroxidic bond.³⁷ Mechanistic insights gained from model studies including Thd and isolated DNA^{38,39} allow to depict the formation pathways of 5-HmdUrd and 5-FordUrd in cellular DNA. Thus •OH-mediated hydrogen abstraction from the

methyl group of thymidine gives rise to 5-(2'-deoxyuridilyl) methyl radical which is converted into 5-(hydroperoxymethyl)-2'-deoxyuridine through the intermediacy of the related peroxy radical and subsequent reduction. Loss of a water molecule from the peroxidic function leads to the generation of 5-FordUrd whereas competitive reduction gives rise to 5-HmdUrd (Fig. 1). It is also likely that ionization processes associated with direct effects of gamma rays would contribute, however, at a low extent to the oxidation reactions of the thymine moiety. The pyrimidine radical cation thus generated has been shown in model studies involving thymidine and type I photosensitizers^{40,41} to lead to the formation of ThdGly as the result of hydration reaction giving rise to the transient 6-hydroxy-5,6-dihydrothym-5-yl radical. Competitive deprotonation of the thymine radical cation has been found to generate 5-(2'-deoxyuridilyl) methyl radical, a likely precursor of 5-HmdUrd and FordUrd in aqueous aerated solutions.^{42,43}

Degradation pathways of purine bases by $\cdot\text{OH}$ radical

8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo), an ubiquitous oxidatively generated damage of DNA that may be produced by $\cdot\text{OH}$ radical, one-electron oxidation, peroxy nitrite, $^1\text{O}_2$ ^{2,3} or as a result of intrastrand addition with thymine 5(6)-hydroxy-6(5)-hydroperoxides⁴⁴ has been found to be generated in cellular DNA upon exposure to gamma rays and high LET-heavy ions.^{26,27} This was achieved after suitable enzymatic digestion of the extracted DNA and subsequent quantitative measurement by HPLC-MS/MS using the suitable isotopic dilution method. 2,6-Diamino-4-hydroxy-6-formamidopyrimidine (FapyGua), the related opened imidazole ring compound was also found to be efficiently generated in the DNA of irradiated human cells still using HPLC-MS/MS measurements. For this purpose a dedicated protocol that takes into account the instability of the *N*-glycosidic bond of formamidopyrimidines derived from purine 2'-deoxyribonucleosides in order to obtain a quantitative release of the related free base was designed.²⁸ Interestingly, as for thymidine oxidation products, the radiation-induced formation yields of both 8-oxodGuo and FapyGua were found to decrease with the increase in the LET of the incident photon or particle (Table 1). This again is suggestive of the major implication of $\cdot\text{OH}$ radical in the molecular effects of ionizing radiation on the guanine moiety of cellular DNA. Taking into consideration the available mechanistic information that has been gained from radical oxidation studies of model systems, the following radiation-induced degradation pathway of the guanine DNA base in cells may be proposed (Fig. 2). Addition of $\cdot\text{OH}$ to the purine ring at C8 leads to the formation of reducing 8-hydroxy-7,8-dihydro-7-yl radical which in the presence of oxidants such as O_2 give rise to 8-oxo-7,8-dihydroguanine. A competitive reaction of the 7-yl radical is one-electron reduction that leads to the formation of FapyGua through the scission of the C8-N9 imidazole bond.⁴⁵ This was found to

occur efficiently in model compounds with a high unimolecular rate ($k = 2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$) that was inferred from pulse radiolysis measurements.⁴⁶

It may be added that ionization processes associated with the direct effect of gamma rays are likely to contribute also to the overall radiation-induced degradation of the guanine moieties of cellular DNA. The reactions of the guanine radical cation arising from direct or indirect ionization as inferred from numerous model studies are now well documented. Hydration reaction of the radical cation of guanine residues produced by one-electron oxidants within double-stranded DNA also leads to the formation of 8-hydroxy-7,8-dihydroguanyl radical^{47,48} and therefore to 8-oxoGua and FapyGua in double stranded DNA.

Fig. 2

Exposure of human monocytes to gamma rays has been shown to generate in the DNA 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyadenosine (8-oxodAdo) and the related imidazole ring opened compound, namely 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapyAde) that were measured by HPLC-MS/MS analysis. The radiation-induced formation of the two latter degradation products mimics that of the guanine base both in isolated and cellular DNA. However, we may note that the efficiency of the radiation-induced formation of each of the two adenine lesions is about 10-fold lower than that of related guanine modifications. It may be also possible to rationalize the formation of 8-oxodAdo and FapyAde mostly in term of $\cdot\text{OH}$ radical contribution (Fig. 3). Thus, 8-hydroxy-7,8-dihydroadenyl radical thus formed by $\cdot\text{OH}$ addition at C8 is the precursor of 8-oxodAdo after an oxidizing step.⁴⁹ On the other hand one-electron reduction of the latter radical⁵⁰ gives rise to FapyAde⁵¹ subsequently to the scission the 7,8-bond. Similarly to what has been observed for the guanine components, hydration of the adenine radical cation generated by one-electron oxidation, has been shown to lead to the formation of 8-oxodAdo and FapyAde in double stranded DNA through the oxidation and reduction of the 8-hydroxy-7,8-dihydroadenyl radical precursor respectively. It may be added that the formation of 2-hydroxy-2'-deoxyadenosine (2-OHdAdo) is at the best barely detectable in the DNA of γ -irradiated human monocytes as inferred from sensitive HPLC-MS/MS measurements.⁵² This contrasts with the significant yield of radiation-induced formation of 2-OHdAdo as assessed by CG-MS analysis of the DNA of γ -irradiated cells and mice.^{53,54}

Fig. 3

Singlet oxygen oxidation of the guanine moiety.

$^1\text{O}_2$ in the $^1\Delta_g$ state ($E = 22.4 \text{ kcal mol}^{-1}$) may be produced in biological environment as the result of photodynamic effects provided by type II photosensitizers or enzymatic reactions involving myeloperoxidase.^{2,40} An alternative approach that allows the generation of a clean and specific source of $^1\text{O}_2$ is provided by the use of a suitable protected naphthalene endoperoxide.⁵⁵ Thus the release of $^1\text{O}_2$ from the thermolabile endoperoxide precursor within the cell has shown to lead to the selective oxidation of DNA guanine base moieties by producing 8-oxodGuo whose formation was assessed by HPLC-MS/MS.⁵⁶ It was further confirmed that the increase of 8-oxodGuo was essentially due to singlet oxygen and not to a putative oxidative stress as inferred from labeling experiments involving a synthetically prepared [$^{18}\text{O}_2$]-endoperoxide. In addition it was found on the basis of the results of comet assay experiments that is not to induce significant amount of either direct DNA strand breaks or alkali-labile sites.⁵⁷ The formation of 8-oxodGuo in cellular DNA may be rationalized in term of initial Diels-Alder [4 + 2] cycloaddition of $^1\text{O}_2$ across the imidazole ring of the guanine moiety leading to the generation of a pair of diastereomeric 4,8-endoperoxides. Support for the occurrence of the latter mechanism was provided by NMR characterization at low temperature in CD_2Cl_2 of the endoperoxide as arising from type II photosensitization of the 2',3',5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl derivative of 8-methylguanosine.⁵⁸ The latter intermediate has been proposed to rearrange into a linear 8-hydroperoxide.^{58,59} Further support for the latter process was provided by a recent NMR analysis of the content of the photosensitized organic solution of a 2',3',5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl derivative of 8- ^{13}C -guanosine performed at low temperature.⁶⁰ A similar situation is likely to occur in double-stranded DNA since only the formation of 8-oxodGuo has been detected.⁶¹ It has been proposed that initially generated diastereomeric 4,8-endoperoxides are able to rearrange into 8-hydroperoxy-2'-deoxyguanosine prior to be reduced into 8-oxodGuo. It was also found that FapyGua is not formed at least in detectable amount within isolated DNA upon exposure to a chemical source of $^1\text{O}_2$ ruling out the possibility for the latter reactive oxygen species to act by charge transfer reaction.⁶¹ As a final remark it may be mentioned that the 4*R* and 4*S* diastereomers of spiroiminodihydantoin (dSp), which are the main $^1\text{O}_2$ oxidation products of dGuo⁶²⁻⁶⁴ are not generated at least in detectable amount in double stranded DNA.

UVA irradiation has been shown to generate 8-oxodGuo in DNA of several cell lines⁶⁵⁻⁷³ that are likely to differ in their content of the endogenous photosensitizers at the origin of the observed photodynamic effects.⁷⁴ It was shown, at least, in human monocytes that the formation of 8-oxodGuo in the DNA of UVA-irradiated cells was due for about 80%, to $^1\text{O}_2$ oxidation as the result of type II photosensitization mechanism.²⁵ It may be added that under these conditions, the 20% remaining UVA-induced formation of 8-oxodGuo was accounted for by Fenton type reactions as the result of initially generated superoxide radical and subsequent spontaneous or enzymic dismutation into H_2O_2 .²⁵

Fig. 4

Halogenation reactions of nucleobases by HOCl

Hypochlorous acid (HOCl), both a halogenating and one-electron oxidation agent⁷⁵ that is enzymatically produced by myeloperoxidase during inflammation⁷⁶ has been shown to induce the formation of 5-chlorocytosine (5-ClCyt), 8-chloroguanine (8-ClGua) and 8-chloroadenine (8-ClAde) in the DNA and RNA of SKM-1 cells.⁷⁷ This was achieved using an optimized HPLC-ESI-MS/MS assay that was found to detect each of the halogenated ribo and 2'-deoxyribonucleosides in the subfemtomole range.⁷⁷ Interestingly it was shown that 5-chloro-2'-deoxycytidine (5-Cl dCyd) was generated predominantly over 8-chloro-2'-deoxyguanosine (8-Cl dGuo) and 8-chloro-2'-deoxyadenosine (8-Cl dAdo) in the DNA of SKM-1 cells upon exposure to HOCl (Table 3).⁷⁷ We may note that RNA is most susceptible than nuclear DNA to HOCl-mediated halogenation of aminobases with much higher levels of 5-chlorocytidine (5-ClCyd) and 8-chloroguanosine (8-ClGua) with respect to 8-chloroadenosine (8-ClAdo) (Table 3). It was also shown using the sensitive and specific HPLC-MS/MS assay that the level of 5-Cl dCyd was significantly more elevated in the DNA of diabetic patients with respect to healthy volunteers, suggesting the possibility of using the latter chlorinated 2'-deoxyribonucleoside as a biomarker of inflammation.⁷⁸ It may be added that the halogenation of aminobases in cellular DNA and RNA is in agreement with the results of model studies on nucleosides^{79,80} and the formation of 5-chlorocytosine in bacterial DNA by myeloperoxidase-H₂O₂-Cl⁻ system of phagocytes.⁸¹

Fig. 5

Table 2

Secondary radical oxidation reactions of 8-oxo-7,8-dihydroguanine.

The possible occurrence of secondary oxidation reactions of 8-oxodGuo within cellular DNA⁸² has been recently highlighted by the observed accumulation of diastereomeric spiroiminodihydroantoin 2'-deoxyribonucleosides (dSp) in the DNA of Nei deficient *E. coli* cells upon exposure to chromate.⁸³ The average level of dSp that was assessed by HPLC-MS in the selective ion monitoring (SIM) mode as close to 6 dSp residues per 10³ guanines upon treatment of TK3D11 bacterial cells to 500 μM Cr(VI) is about 20-fold higher than in wild type cells. In both cases the level of 8-oxodGuo that was supposed to be the precursor of dSp is much lower. It was also previously shown that dSp is a main degradation product of the guanine moieties of isolated DNA upon exposure to Cr(VI) in the presence of reducing ascorbic acid.⁸⁴ There is a growing body of evidence from various model studies that 8-oxodGuo the likely initial Cr(VI)-mediated degradation product

of guanine, whose oxidation potential is about 0.5 eV lower than that of dGuo⁸⁵ is a preferential target for numerous one-electron oxidizing agents and radicals.⁸⁶⁻⁹⁰ Interestingly, the *R* and *S* diastereomers of the spiroiminodihydantoin (Sp) nucleosides have been shown to be the predominant one-electron oxidation products of 8-oxodGuo and 8-oxoGuo at neutral pH as the result of an acyl shift of the transiently produced 5-hydroxy-8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine or the related ribonucleoside derivatives, initially proposed as a relatively stable oxidation 8-oxodGuo product. However it seems quite unlikely that secondary oxidation of 8-oxodGuo leading to dSp would explain the preferential formation of the latter secondary oxidation product over that of the precursor, particularly in the wild type cells.⁸³ A more reasonable alternative could involve a more direct mechanism of dSp formation mediated by chromate that however remains to be elucidated. It would be also of interest to search for the formation of dSp using for example the HPLC-MS/MS technique which in the MRM mode is more accurate than the HPLC-MS/SIM method that has been shown to lead to overestimated values of radiation-induced 8-oxodGuo and 8-oxodAdo in the DNA of human cells.⁹¹⁻⁹³ In a more general way this should clarify the debate about the sacrificial role of 8-oxodGuo that may protect normal nucleobases within DNA against the damaging effects of one-electron oxidants^{94,95} and that has been recently questioned.⁹⁶ How 8-oxodGuo which steady state level at the best does not exceeds a few residues per 10⁶ could be preferentially oxidized with respect to overwhelming nucleobases by one-electron oxidants when hole transfer process within DNA helix does not occur at distance higher than 20 bp.

Fig 6.

Conclusion and perspectives.

Evidence is provided in this survey on the formation of several oxidized nucleosides and modified bases within cellular DNA upon exposure to physical and chemical oxidizing agents. This validates at least partly the mechanisms of degradation of nucleobases by •OH radical, one-electron oxidants, ¹O₂ and HOCl. This was achieved using mostly accurate and specific HPLC-MS/MS assays that have also involved optimization of DNA extraction protocols in order to minimize artefactual oxidation to occur. Efforts should be made for the search of still missing lesions including cytosine oxidation products and tandem modifications such as cyclopurine nucleosides. This should benefit at least partly of the recent availability of more sensitive HPLC-MS/MS instruments.

References

1. Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat J-L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1997; 131:1-87.

2. **Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat J-L. Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* 2003; 531:5-23.**
3. von Sonntag C. *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor Francis, London, 1987.
4. **Cadet I, Douki T, Gasparutto D, Ravanat J-L. Radiation-induced damage to cellular DNA: Measurement and biological role. *Radiat Phys Chem* 2005; 72:293-9.**
5. Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have a clinical significance? *Clin Chim Acta* 2006; 365:30-49.
6. Floyd RA, Watson JJ, Wong PK, Altmiller DH, Rickard RC. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanism of formation. *Free Rad Res Commun* 1986; 1:163-72.
7. Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 1997; 387:147-63.
8. **Fuciarelli A F, Wegher BJ, Blakely WF, Dizdaroglu M. Quantitative measurement of radiation-induced base products in DNA using gas-chromatography-mass spectrometry. *Int J Radiat Biol* 1990; 58:397-415.**
9. Dizdaroglu M. Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS Lett* 1993; 315:1-6.
10. Halliwell B, Dizdaroglu M. The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. *Free Rad Res Commun* 1992; 16:75-88.
11. Malins DC, Johnson PM, Wheeler TM, Barker EA, Polissar NL, Vinson MA. Age-related radical-induced DNA damage is linked to prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 6:6025-8.
12. Malins DC, Hellstrom KE, Anderson KM, Johnson PM, Vinson MA. Antioxidant-induced changes in oxidized DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:5937-41.
13. Hamberg M, Zhang L-Y. Quantitative determination of 8-hydroxyguanosine and guanine by isotope dilution mass spectrometry. *Anal Biochem* 1995; 229:336-44.
14. Ravanat J-L, Turesky RJ, Gremaud E, Trudel LJ, Stadler RH. Determination of 8- detection. Overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography-mass spectrometry assay. *Chem Res Toxicol* 1995; 8:1039-45.
15. **Douki T, Delatour T, Bianchini F, Cadet J. Observation and prevention of an artefactual formation of oxidized DNA bases and nucleosides in the GC-EIMS method. *Carcinogenesis* 1996; 17:347-53.**
16. Cadet J, D'Ham C, Douki T, Pouget JP, Ravanat J-L, Sauvaigo S. Facts and artifacts in the measurement of oxidative base damage to DNA. *Free Radic Res* 1998; 2:541-50.
17. Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC Ames BN. DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:283-93.
18. **Ravanat J-L, Douki T, Duez P, Gremaud E, Herbert K, Hofer T, Lassere L, Saint-Pierre C, Favier A, Cadet J. Cellular background 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; 23:1911-8.**
19. Ravanat JL, Duret B, Guiller A, Douki T, Cadet J. 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* 1998; 715:349-56.
20. **ESCODD. Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. *Carcinogenesis* 2002; 23:2129-133.**
21. **ESCODD. Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:1089-99.**
22. Collins AR, Cadet J, Möller L, Poulsen H, Viña J. Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch Biochem Biophys* 2004; 423:57-65.

23. ESCODD. Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an inter-laboratory validation study. *FASEB J* 2005; 19:82-4.
24. Pouget J-P, Ravanat J-L, Douki T, Richard M-J, Cadet J. Measurement of DNA base damage in cells exposed to low doses of gamma radiation: comparison between the HPLC/ECD and the comet assays. *Int J Radiat Biol* 1999; 75:51-8
25. Pouget J-P, Douki T, Richard M-J, Cadet J. DNA damage induced in cells by γ and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and comet assay. *Chem Res Toxicol* 2000; 13:541-9.
26. Pouget JP, Frelon S, Ravanat J-L, Testard I, Odin F, Cadet J. Formation of modified DNA to DNA in cells exposed to either gamma radiation or high-LET particles. *Radiat Res* 2002; 157:589-95.
27. 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; 82:119-127.
28. **Frelon S, Douki T, Ravanat JL, Pouget JP, 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; 13:1002-10.**
29. Fujita S, Steenzen S. Pattern of OH radical addition to uracil and methyl- and carboxyl-substituted uracils. Electron transfer of OH adducts with *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine and tetranitromethane. *J Am Chem Soc* 1981; 103:2540-5.
30. Jovanovic SV, Simic MG. Mechanism of OH radical reactions with thymine and uracil derivatives. *J Am Chem Soc* 1986; 108:5968-72.
31. Isildar M, Schuchmann MN, Schulte-Frohlinde D, von Sonntag C. Oxygen uptake in the radiolysis of aqueous solutions of nucleic acids and their constituents. *Int J Radiat Biol* 1982; 41: 525-33.
32. Wagner JR, van Lier JE, Johnston LJ. Quinone sensitized electron transfer photooxidation of nucleic acids: chemistry of thymine and thymidine radical cations in aqueous solution. *Photochem. Photobiol.* 1990; 52: 333-43.
33. Cadet J, Téoule R. Radiolyse gamma de la thymidine en solution aqueuse aérée. 1. - Identification des hydroperoxydes. *Bull. Soc. Chim. Fr* 1975:879-84.
34. Wagner JR, van Lier JE, Berger M, Cadet J. Thymidine hydroperoxides. Structural assignment, conformational features, and thermal decomposition in water. *J Am Chem Soc* 1994; 116:2235-42.
35. Lutsig MJ, Cadet J, Boorstein RJ, Teebor GW. Synthesis of the diastereomers of thymidine glycol, determination of concentrations and rates of interconversion of their *cis-trans* epimers at equilibrium and demonstration of differential alkali lability within DNA. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:4839-45.
36. Douki T, Delatour T, Paganon F, Cadet J. Measurement of oxidative damage at pyrimidine bases in gamma-irradiated DNA. *Chem Res Toxicol* 1996; 9:1145-51.
37. Davies AG. O-O heterolysis: intermolecular nucleophilic substitution at oxygen. In: *Organic peroxides*, Butterworths, London, 1961: 128-42.
38. Kasai H, Iida, A., Yamaizumi Z, Nishimura S, Tanooka, H. 5-Formyldeoxyuridine: a new type of DNA damage induced by ionizing radiation and its mutagenicity in *Salmonella* strain TA102. *Mutat Res* 1990; 243:249-53.
39. Frenkel K, Zhong Z, Wei H, Karkoszka J, Patel U, Rashid K, Georgescu, M., and Solomon, J.J. (1991) Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of DNA oxidized *in vitro* and *in vivo*. *Anal Biochem* 1991;196:126-36.
40. Cadet J, Vigny P. The photochemistry of nucleic acids. In: Morrison H, Ed. *Bioorganic Photochemistry*. Vol. 1. New York: Wiley and Sons, 1990, 1-272.
41. Douki T, Cadet J. Modification of DNA bases by photosensitized one-electron oxidation. *Int J Radiat Biol* 1997; 75: 571-81.

42. Decarroz C, Wagner JR, van Lier JE, Krishna CM, Riesz P, Cadet J (1986). Sensitized photooxidation of thymidine by 2-methyl-1,4-naphthoquinone. Characterization of the stable photoproducts. *Int J Radiat Biol* 1986; 50:491-505.
43. Krishna CM, Decarroz C, Wagner JR, Cadet J, Riesz P. Menadione sensitized photooxidation of nucleic acid and protein constituents. An ESR and spin-trapping study. *Photochem Photobiol* 1987; 46:175-82.
44. Bourdat AG, Douki T, Frelon S, Gasparutto D, Cadet J. Tandem base lesions are generated by hydroxyl radical within isolated DNA in aerated aqueous solution. *J Am Chem Soc*, 2000; 122:4549-56.
45. Douki T, Martini R, Ravanat JL, Turesky RJ, Cadet J. Measurement of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine in isolated DNA exposed to gamma radiation in aqueous solution. *Carcinogenesis* 1997; 18:2385-91.
46. Candeias LP, Steenken S. Reaction of HO· with guanine derivatives in aqueous solution: formation of two different redox-active OH-adduct radical and their unimolecular transformation reactions. Properties of G(-H)·. *Chem Eur J* 2000; 6:475-84.
47. 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 non singlet oxygen mediated reaction. *J Am Chem Soc* 1992; 114: 9692-4.
48. Cullis PM, Malone ME, Merson-Davies LA. Guanine radical cations are precursors of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine but are not precursors of immediate strand breaks in DNA. *J Am Chem Soc* 1996; 118: 2775-81.
49. Berger M., de Hazen M, Nejari A, Fournier J, Guignard J, Pezerat H, Cadet J. Radical oxidation reactions of the purine moiety of 2'-deoxyribonucleosides and DNA by iron-containing minerals. *Carcinogenesis* 1993; 14: 41-6.
50. Steenken S. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e⁻ and OH adducts. *Chem Rev* 1989; 89:503-20.
51. Raoul S, Bardet M, Cadet J. Gamma irradiation of 2'-deoxyadenosine in oxygen-free aqueous solutions: Identification and conformational features of formamidopyrimidine nucleoside derivatives. *Chem Res Toxicol* 1995; 8: 924-33.
52. Frelon S, Douki T, Cadet J. Radical oxidation of the adenine moiety of nucleoside and DNA: 2-hydroxy-2'-deoxyadenosine is a minor decomposition product. *Free Radic Res* 2002; 36:499-508.
53. Mori T, Dizdaroglu M. Ionizing radiation causes greater DNA base damage in radiation-sensitive mutant M10 cells than in parent mouse lymphoma L5178Y cells. *Radiat Res* 1994; 140:65-90.
54. Mori T, Hori Y, Dizdaroglu M. DNA base damage generated *in vivo* in hepatic chromatin of mice upon whole body γ -irradiation. *Int J Radiat Biol* 1993; 64:645-650.
55. Martinez GR, Ravanat J-L, Medeiros MHG, Cadet J, Di Mascio P. Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of ¹⁸O-labeled singlet oxygen for mechanistic studies. *J Am Chem Soc* 2000; 122:10212-3.
56. Ravanat JL, Di Mascio P, Martinez GR, Medeiros MH, Cadet J. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *J Biol Chem* 2000; 275: 40601-4.
57. Ravanat J-L, Sauvaigo S, Caillat S, Martinez GR, Medeiros MHG, Di Mascio P, Favier A, Cadet J. Singlet-oxygen-mediated damage to cellular DNA determined by the comet assay associated with DNA repair enzymes. *Biol Chem* 2004; 385:17-20.
58. Sheu C, Foote C S. Endoperoxide formation in a guanosine derivative. *J Am Chem Soc* 1993; 115:10446-7.

59. Sheu C, Kang P, Khan S, Foote CS. Low-temperature photosensitized oxidation of a guanosine derivative and formation of an imidazole ring-opened product. *J Am Chem Soc* 2002; 124:3905-13.
60. Kang P, Foote CS. Formation of transient intermediates in low-temperature photosensitized oxidation of an 8-(13)C-guanosine. *J Am Chem Soc* 2002; 124:4865-73.
61. Ravanat J-L, Saint-Pierre C, Di Mascio P, Martinez GR, Medeiros MHG, Cadet J. Damage to isolated DNA mediated by singlet oxygen. *Helv Chim Acta* 2001; 84:3702-9.
62. Ravanat J-L, Cadet J. Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Identification and characterization of the main oxidation products. *Chem Res Toxicol* 1995; 8:379-88.
63. Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Spiroiminodihydantoin is the major product of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine with peroxyxynitrite in the presence of thiols and guanosine oxidation by methylene blue. *Org Lett* 2001; 3:963-6.
64. Ravanat J-L, Martinez GR, Medeiros MHG, Di Mascio P, Cadet J. Mechanistic aspects of the oxidation of DNA constituents mediated by singlet molecular oxygen. *Arch Biochem Biophys* 2004; 423: 23-30.
65. Fisher-Nilsen A, Loft S, Jensen KG. Effect of ascorbate and 5-aminolevulinic acid on light-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation in V79 Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 1993; 14:2431-3.
66. Rosen JE, Prahalad AK, Williams GM. 8-Oxodeoxyguanosine formation in the DNA of cultured cells after exposure alone or with UVB or UVA irradiation. *Photochem Photobiol* 1996; 64:117-22.
67. Zhang X, Rosenstein BS, Wang Y, Lebowitz M, Mitchell DL, Wei H. Induction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by ultraviolet radiation in calf thymus DNA and HeLa cells. *Photochem Photobiol* 1997; 65:119-24.
68. Kvam E, Tyrrell RM. Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis* 1997; 18:2379-84.
69. Douki T, Perdiz D, Grof P, Kuluncsics Z, Moustacchi E, Cadet J, Sage E. Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role. *Photochem Photobiol* 1999; 70:184-90.
70. Duez P, Hanocq M, Dubois J. Photodynamic DNA damage mediated by δ -aminolevulinic acid-induced porphyrin. *Carcinogenesis* 2001; 22:771-8.
71. Courdavault S, Baudoin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T. Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells. *Mutat Res* 2004; 556:135-42.
72. Besaratinia A, Synold TW, Chen H-H, Chang C, Xi B, Riggs AD, Pfeifer GP. DNA lesions induced by UV A1 and B radiation in human cells: Comparative analyses in the overall genome and in the *p53* tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:10058-63.
73. Kozmin S, Slezak G, Reynaud-Angelin A, Elie C, de Rycke Y, Boiteux S, Sage E. UVA radiation is highly mutagenic in cells that are unable to repair 7,8-dihydro-8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:13538-43.

74. Cadet J, Sage E, Douki T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res* 2005; 571:3-17.
75. Suzuki T, Friesen MD, Ohshima H. Identification of products formed by reaction of 3',5'-di-O-actyl-2'-deoxyguanosine with hypochlorous acid or a myeloperoxidase -H₂O₂-Cl⁻ system. *Chem Res Toxicol* 2003; 16:382-9.
76. Henderson JPB, Heinecke JW. Molecular chlorine generated by the myeloperoxidase hydrogen-chloride system of phagocytes produces 5-chlorocytosine in bacterial DNA. *J Biol Chem* 1999; 274:33440-8.
77. Badouard C, Masuda M, Nishino H, Cadet J, Favier A, Ravanat J-L. Detection of chlorinated DNA and RNA nucleosides by HPLC coupled to mass spectrometry as potential biomarkers of inflammation. *J. Chromatogr B* 2005; 827: 26-31.
78. Badouard C, Douki T, Faure P, Halimi S, Cadet J, Favier A, Ravanat J-L. DNA lesions as biomarkers of inflammation and oxidative stress: a preliminary evaluation. In Grune T, ed. *Free Radicals and Diseases; Gene Expression, Cellular Metabolism and Pathophysiology*, IOS Press, 2005:1-9.
79. Masuda M, Suzuki T, Friesen MD, Ravanat J-L, Cadet J, Pignatelli B, Nishino H, Ohshima H. Chlorination of guanosine and other nucleosides by hypochlorous acid and myeloperoxidase of activated human neutrophils. *J Biol Chem* 2001; 276:40486-96.
80. Buyn J, Henderson JP, Heinecke JW. Identification and quantification of mutagenic halogenated cytosines by gas chromatography, fast atom bombardment, and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2003; 317:201-9.
81. Henderson JP, Buyn J, Heinecke JW. Molecular chlorine generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system of phagocytes produces 5-chlorocytosine in bacterial DNA. *J Biol Chem* 1999; 274:33440-8.
82. Neeley WL, Essigmann JM. Mechanism of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem Res Toxicol* 2006 (in press).
83. Hailer M K, Slade P G, Martin B D, Sugden K D. Nei deficient *Escherichia coli* are sensitive to chromate and accumulate the oxidized guanine lesion spiroiminodihydantoin. *Chem Res Toxicol* 2005; 18:1378-83.
84. Slade PG, Hailer MK, Martin BD, Sugden KD. Guanine-specific oxidation of double-stranded DNA by Cr(VI) and ascorbic acid forms spiroiminodihydantoin and 8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol* 2005; 18:1140-9.
85. Bernstein R, Prat F, Foote CS. On the mechanism of DNA cleavage by fullerenes investigated in model systems. Electron transfer from guanosine and 8-oxoguanosine to C₆₀. *J Am Chem Soc* 1999; 121:464-5.
86. Luo W, Muller JG, Rachlin EM, Burrows C J. Characterization of spiroiminodihydantoin as a product of one-electron oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine. *Org. Lett* 2000; 2:613-6.
87. Luo W, Muller JG, Rachlin EM, Burrows CJ. Characterization of hydantoin products from one-electron oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine in a nucleoside model. *Chem Res Toxicol* 2001; 14:927-38.
88. Luo W, Muller JG, Burrows CJ. The pH-dependent role of superoxide in riboflavin-catalyzed photooxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine. *Org Lett* 2001; 3:2801-4.
89. Ye Y, Muller J G, Burrows C J. Synthesis and characterization of the oxidized dGTP lesions spiroiminodihydantoin-2'-deoxynucleoside-5'-triphosphate and guanidinohydantoin-2'-deoxynucleoside-5'-triphosphate. *J Org Chem* 2006; 71:2181-4.
90. Ravanat J-L, Saint-Pierre C, Cadet J. One-electron oxidation of the guanine moiety of 2'-deoxyguanosine: influence of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 2030-1.

91. Tuo J, Muftuoglu M, Chen C, Jaruga P, Selzer RR, Brosh RM Jr, Rodriguez H, Dizdaroglu M, Bohr VA. The Cockayne Syndrome group B gene product is involved in general genome base excision repair of 8-hydroxyguanine in DNA. *J Biol Chem* 2001; 276:45772-9.
92. Tuo J, Jaruga P, Rodriguez H, Dizdaroglu M, Bohr VA. The Cockayne syndrome group B gene product is involved in cellular repair of 8-hydroxyadenine in DNA. *J Biol Chem*, 2002; 277:30832-7.
93. Tuo J, Jaruga P, Rodriguez H, Bohr WA, Dizdaroglu M. Primary fibroblasts of Cockayne syndrome patients are defective in cellular repair of 8-hydroxyguanine and 8-hydroxyadenine from oxidative stress. *FASEB J* 2003; 17:668-74.
94. Friedman KA, Keller A. On the non-uniform distribution of guanine in introns of human genes: possible protection of exons against oxidation by proximal introns poly-G sequences. *J Phys Chem B* 2001; 105:11859-65.
95. Friedman KA, Keller A. Guanosine distribution and oxidation resistance in eight eukaryotic genomes. *J Am Chem Soc* 2004; 126:2368-71.
96. Kanvah S, Schuster G B. The sacrificial role of easily oxidizable sites in the protection of DNA from damage. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:5133-8.

Figure legends

Figure 1. Hydroxyl radical-mediated oxidation of the thymine moiety in DNA

Figure 2. Hydroxyl radical-mediated oxidation of the guanine moiety in DNA

Figure 3. Hydroxyl radical-mediated oxidation of the adenine moiety in DNA

Figure 4. Singlet oxygen oxidation of the guanine moiety in DNA

Figure 5. Chlorinated nucleosides formed in DNA and RNA

Figure 6. One-electron oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine.

Figure 1

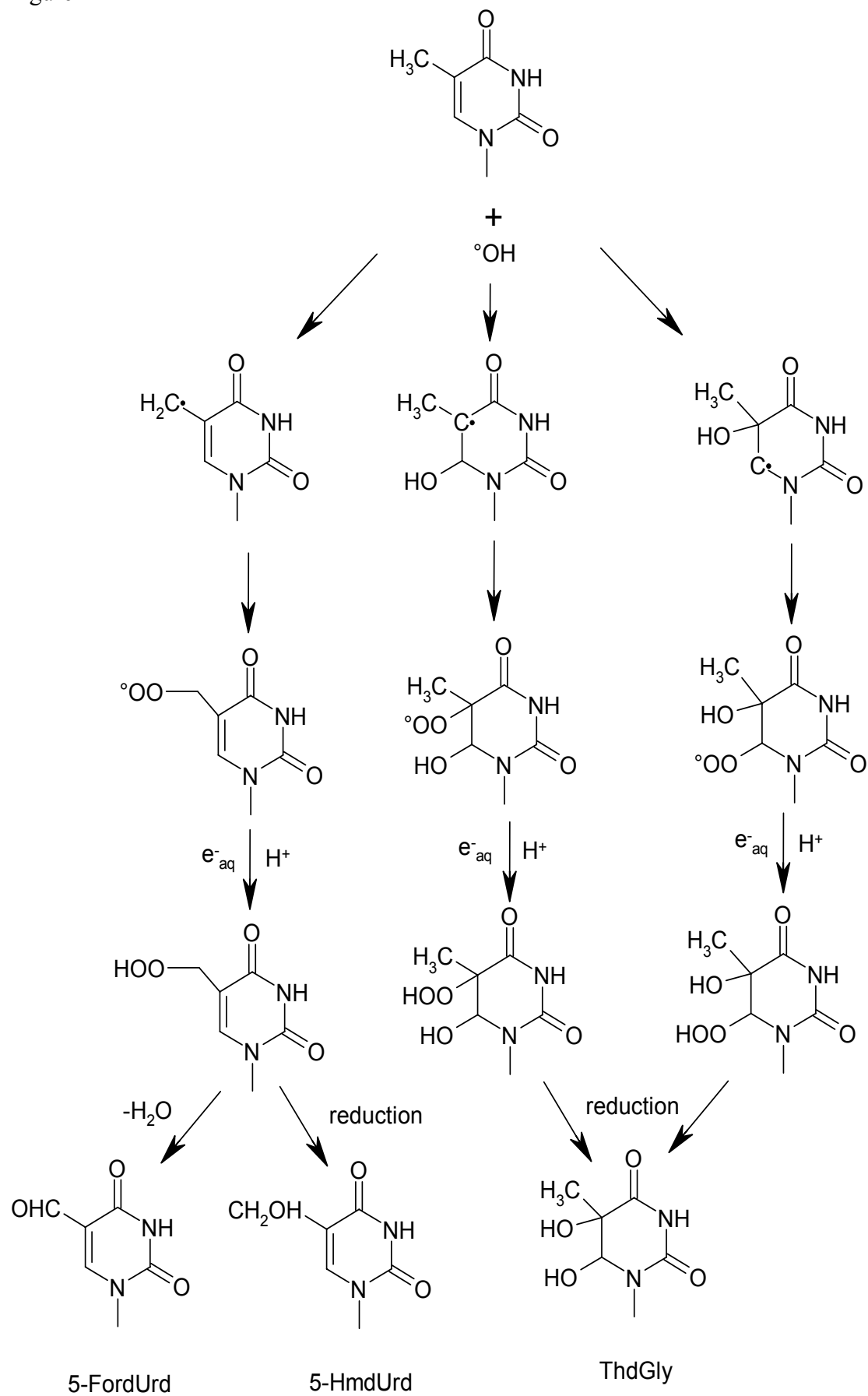


Figure 2:

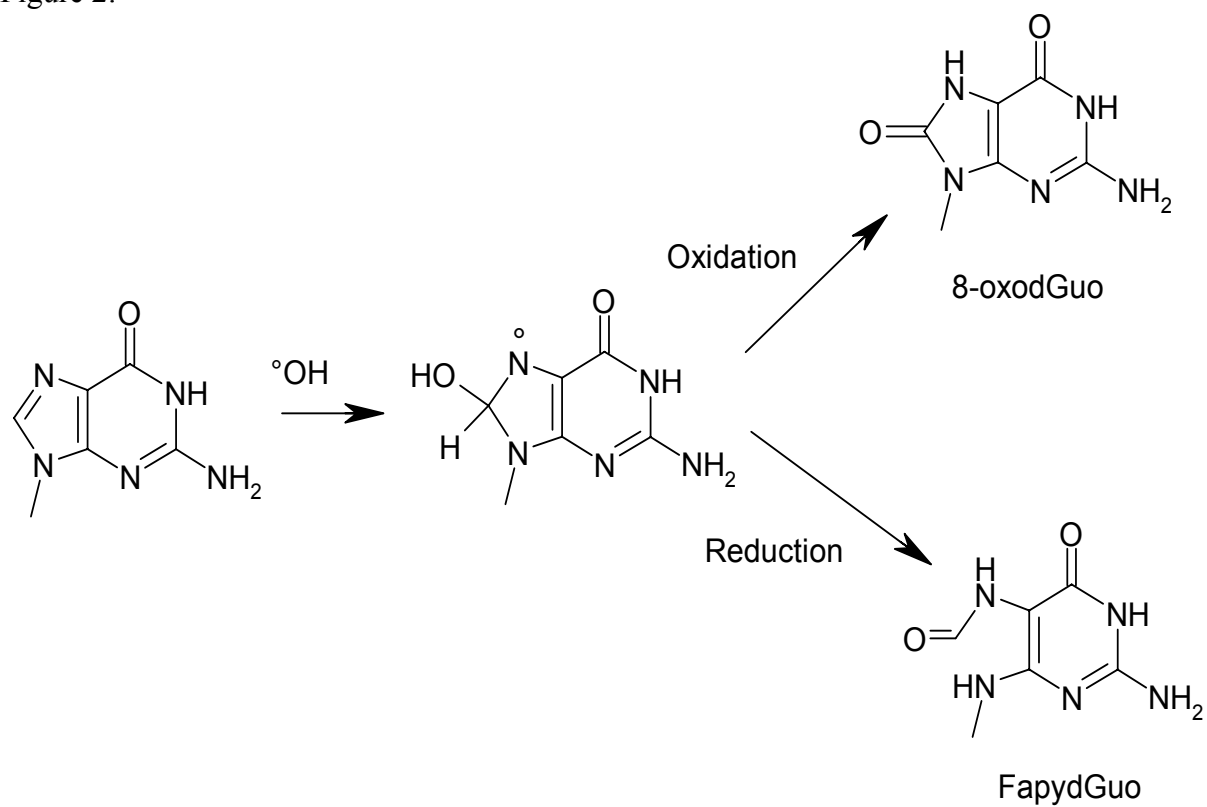


Figure 3:

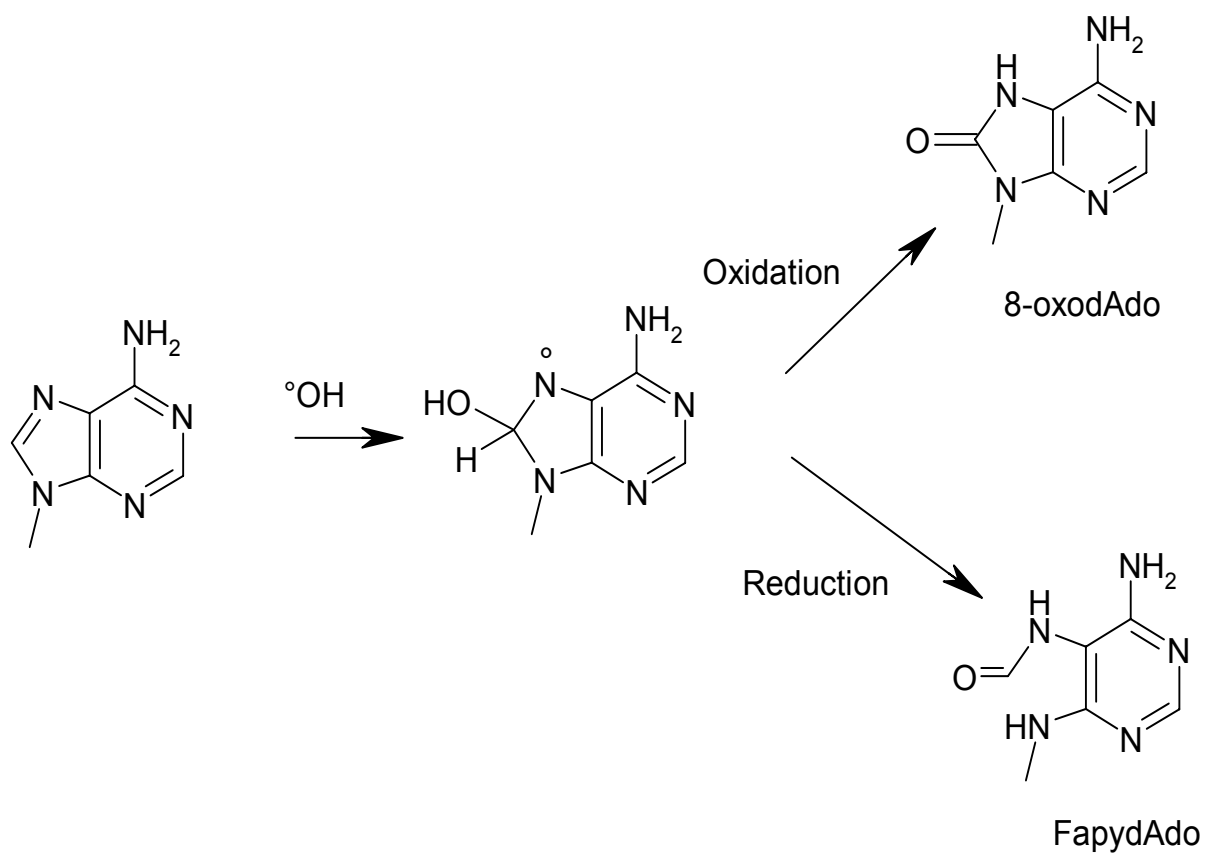


Figure 4

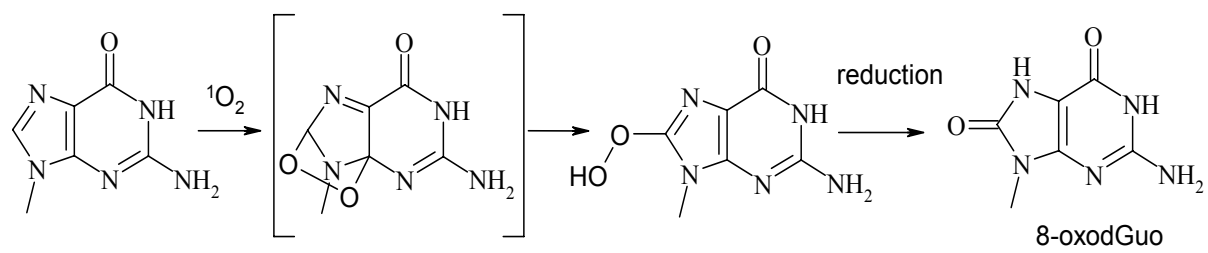


Figure 5

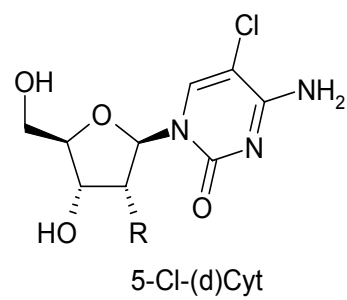
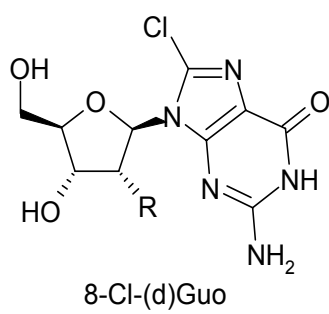
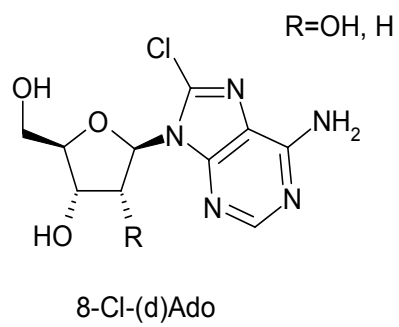


Figure 6:

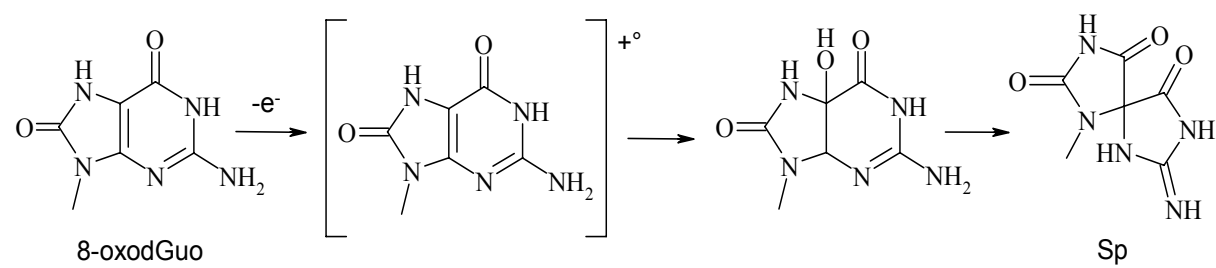


Table 1. Yields^a of degradation products of thymine, guanine and adenine in the DNA of THP-1 malignant human monocytes²⁶ upon exposure to γ -rays and $^{12}\text{C}^{6+}$ particles^b

Lesions	γ -rays	$^{12}\text{C}^{6+}$ heavy ions
<i>Cis and trans</i> ThdGly	97	62
5-HmdUrd	29	12
5-ForUrd	22	11
8-OxodGuo	20	10
FapyGua	39	22
8-oxodAdo	3	3
FapyAde	5	1

^a expressed in lesions per 10^9 nucleobases

^b linear energy transfer: 31.5 keV/ μm

Table 2. Yields^a of chlorinated aminobases in the DNA and RNA of SKM-1 cells upon incubation with 300 μ M HOCl for 10 min⁷⁷.

Chlorinated aminobases	DNA	RNA
5-ClCyt	9.8 \pm 2.3	15.8 \pm 0.5
8-ClGua	2.0 \pm 0.4	16.2 \pm 1.8
8-ClAde	1.5 \pm 0.4	0.5 \pm 0.4

^a expressed in number of lesions per 10⁶ nucleobases

Detection of chlorinated DNA and RNA nucleosides by HPLC coupled to tandem mass spectrometry as potential biomarkers of inflammation

Carine Badouard^a, Mitsuharu Masuda^b, Hoyoku Nishino^b,
Jean Cadet^a, Alain Favier^a, Jean-Luc Ravanat^{a,*}

^a *Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques, DRFMC/SCIB CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France*

^b *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kawaramachi-Hirokoji Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan*

Received 28 January 2005; accepted 30 March 2005

Available online 18 April 2005

Abstract

Upon inflammation, activated neutrophils secrete myeloperoxidase, an enzyme able to generate hypochlorous acid (HOCl) from hydrogen peroxide and chloride ions. An analytical method, involving HPLC coupled to electrospray tandem mass spectrometry, has been set-up to detect low levels of HOCl-induced nucleic acids lesions, including both ribo and 2'-deoxyribonucleoside derivatives of 8-chloroguanine, 8-chloroadenine and 5-chlorocytosine. Validation of the developed method was achieved using isolated cells treated with HOCl. The method was found to be sensitive enough to allow the measurement of background levels of 5-chloro-2'-deoxycytidine in the DNA of human white blood cells isolated from 7 mL of blood.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Oxidative stress; DNA damage; RNA damage; Hypochlorous acid; Tandem mass spectrometry; Human biomarkers

1. Introduction

Following infection and inflammation, various cells of the immune systems are activated with subsequent induction of several enzymes, including inducible nitric oxide synthase, NAD(P)H oxidase and myeloperoxidase (MPO). A consequence of this activation is the production of several reactive oxygen and nitrogen species such as superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), nitric oxide, peroxynitrite and hypohalous acids (HOCl and HOBr) [1]. The resultant oxidant species can oxidize, nitrate, chlorinate or brominate several cellular constituents including lipids, proteins and nucleic acids [2]. Such processes are recognized as risk factors for human cancers since the bactericidal agents could also damage host tissues.

Among the different activated species, it has been shown that HOCl is able to chlorinate several biological molecules [3] and among them, nucleic acids represent one of the most

studied biomolecules due to its key role in cell evolution. Reaction of HOCl with isolated DNA and RNA has been found to generate several chlorinated base modifications [4,5]. The mechanism of formation of such DNA and RNA damage has been proposed to involve the transient formation of base radicals [6].

Oxidized DNA lesions, and among them mostly 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) have been extensively used as in vivo biomarkers of oxidative stress [7]. For this purpose, several physico-chemical and biological approaches have been developed to allow the determination of the cellular level of 8-oxodGuo [8]. During the last two decades, the difficulty of measuring oxidized DNA lesions, mostly 8-oxodGuo, has been highlighted [9,10]. The background level of 8-oxodGuo in different untreated cell lines was found to vary by, at least, three orders of magnitude, depending on the method used. The main goals of the European network European Standards Committee on Oxidative DNA Damage (ESCODD) that was recently set-up, were to determine the origins of the discrepancies and to propose

* Corresponding author. Tel.: +33 4 38 78 47 97; fax: +33 4 38 78 50 90.
E-mail address: jrvanat@cea.fr (J.-L. Ravanat).

optimized protocols of measurement. It seems now well established that the main drawback was the artifactual DNA oxidation that may occur during sample preparation, which mainly implies DNA extraction [11–14]. However, there is still an incomplete agreement between the results obtained using methods requiring DNA extraction and indirect approaches such as the comet assay [15]. Therefore, the use of oxidized DNA lesions as biomarkers of oxidative stress still remains a challenging issue [16]. The use of chlorinated DNA bases as indicators of inflammation could represent a suitable alternative since artifactual formation of chlorinated DNA bases is not expected to occur, at least significantly, during sample preparation. However, the cellular background level of such DNA modifications in human leukocytes has not been yet determined. In addition, it has not been clearly shown that significant amounts of chlorinated DNA lesions could be produced in cells incubated in the presence of HOCl.

In this work, a HPLC coupled to electrospray tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) based method has been developed for the measurement of both chlorinated DNA lesions including 5-chloro-2'-deoxycytidine (5-ClCyd), 8-chloro-2'-deoxyguanosine (8-ClGua), 8-chloro-2'-deoxyadenosine (8-ClAdo) and chlorinated RNA nucleosides including 5-chlorocytidine (5-ClCyd), 8-chloroguanosine (8-ClGua) and 8-chloroadenosine (8-ClAdo). Such a method has been used to measure the level of chlorinated DNA and RNA lesions in cells incubated with HOCl. Thereafter, the assay has been applied for monitoring the extent of the different chlorinated nucleosides in the DNA of freshly isolated human white blood cells.

2. Material and methods

2.1. HPLC–MS/MS measurements

The chlorinated nucleosides were obtained as previously described [4]. On-line HPLC–MS/MS measurements were carried out using a Agilent (Massy, France) 1100 HPLC system, equipped with a thermostated autosampler, a binary HPLC pumping system, an oven and a UV detector. Separations were performed using a reversed phase Uptisphere-ODB (3 μ m, 0.2 cm \times 15 cm) column from Interchim (Montluçon, France). The elution was achieved at a flow rate of 0.2 mL/min in the gradient mode, the column being

maintained at 28 °C. The proportion of acetonitrile in 5 mM ammonium formate (pH 6.5), starting from 0%, reached either 25% (conditions A) or 20% (conditions B) within 30 min for the measurement of chlorinated 2'-deoxyribonucleosides and ribonucleosides, respectively. After the completion of the HPLC analysis (30 min), the column was washed with 50% acetonitrile for 5 min and an additional 15 min period was required to equilibrate the HPLC column between two injections. At the output of the column, the eluent was directed first to a UV detector set at 260 nm for monitoring the overwhelming normal nucleosides. Then, after addition of MeOH (0.1 mL/min), the eluent was directed onto a API3000 tandem mass spectrometer (Applied Biosystems) through a "TurboSpray" electrospray source (Sciex Thornil Canada) as described in details elsewhere [17–19]. The system was entirely controlled by Analyst software 1.2. To improve the sensitivity of detection a low resolution (± 1.2 amu) was used. In addition, for each of the ribo- and 2'-deoxyribonucleosides, the different parameters of ionization and fragmentation were optimized by infusing a 20 μ M solution of the nucleoside directly onto the mass spectrometer, as previously described [17,18]. For all the studied DNA lesions, a higher sensitivity was obtained in the positive ionization mode for an ion spray voltage of 5500 V and a temperature of 450 °C for the turbo gas (nitrogen), the acquisition dwell time of each transition being 750 ms.

A sensitive MRM method was applied to measure the different chlorinated nucleosides. The different transitions used for the detection of the chlorinated nucleosides, together with their retention time and the collision energy for fragmentation are given in Table 1. The most abundant daughter ion was found to correspond, for all the chlorinated nucleosides studied, to the loss of the (2-deoxy)ribose moiety. To improve the specificity of detection, a second transition, corresponding to the loss of the (2-deoxy)ribose moiety for the molecule containing the ³⁷Cl isotope, was also monitored for all chlorinated DNA and RNA lesions. The limit of quantification, determined for a S/N = 10, for the detection of the studied chlorinated nucleosides varies between 2 and 25 fmol injected (Table 1). Quantification of the amount of the different DNA lesions was performed by external calibration. For that purpose prior and after each series of samples, three different standards containing either the three chlorinated nucleosides or 2'-deoxyribonucleosides were injected. Similarly, an external quantification was used to quantify the amount

Table 1

Mass spectrometric and HPLC features of the different chlorinated ribo and 2'-deoxyribonucleosides detected by HPLC–MS/MS under HPLC conditions A or B used for optimal separation of 2'-deoxyribonucleosides and ribonucleosides, respectively (conditions detailed in material and methods)

Product	Molecular weight	Retention time (min)	Main transition	Collision energy (eV)	Limit of quantification (fmol)
5-ClCyd	261	14.5 (A)	262 \rightarrow 146	13	5
8-ClGua	301	19.1 (A)	302 \rightarrow 186	16	25
8-ClAdo	285	22.5 (A)	286 \rightarrow 170	19	2
5-ClCyd	277	11.7 (B)	278 \rightarrow 146	15	5
8-ClGua	317	17.8 (B)	318 \rightarrow 186	21	15
8-ClAdo	301	22.0 (B)	302 \rightarrow 170	31	2

of hydrolyzed DNA [18] or RNA samples, using the area of the peak of a standard of dGuo or Guo, respectively. Results, given as the number of lesions per million normal nucleosides, represent, if not specified, the average and standard deviation of four independent determinations.

2.2. Cell treatment with HOCl

A SKM-1 cell line was used. Cells in growth phase were collected by centrifugation before to be washed. Then, 10 million of cells were suspended in 10 mL of HBSS buffer and an adequate volume of HOCl (prepared as previously described [4]) was added to the buffer solution to give a 300 μ M final concentration. Then, the cells were incubated at 37 °C for 10 min. After incubation, *N*-acetylcysteine was added to stop the reaction [4]. Then, cells were washed and in a subsequent step DNA and RNA were isolated using Qiagen extraction kit following the recommendations of the manufacturer. Nucleic acids were digested to nucleosides as described previously [20]. The results reported in Fig. 3, represent the average and standard deviation of four independent determinations.

2.3. Isolation of human leukocytes

Leukocytes obtained from 10 human volunteers were rapidly isolated from 7 mL of blood using citrate CPT vacutainers obtained from Beckton Dickinson (Pont de Claix, France) and a single centrifugation step according to manufacturer's recommendations. Cells were then washed twice in PBS buffer and stored frozen until DNA extraction. The DNA was extracted and digested using the recently optimized protocol (chaotropic method) that minimizes adventitious DNA oxidation to occur during the work-up [20]. Practically, the so-called "chaotropic method" consists in the transient isolation of nuclei followed by precipitation of DNA using NaI subsequently to protease and RNases treatments, as described in detailed elsewhere [18,20].

3. Results

The newly designed HPLC–MS/MS method was found to be sensitive with a limit of quantification for different chlorinated ribo- and 2'-deoxyribonucleosides within a few fmole range (Table 1). In addition, for all the measured nucleosides, including 5-ClCyd, 8-ClGuo, 8-ClAdo, 5-ClCyd, 8-ClGuo and 8-ClAdo, the intensity of detection was found to increase linearly ($R^2 > 0.98$) with the amount of nucleosides injected over, at least, three orders of magnitude, starting from 5 fmole up to 5 pmol injected (not shown). Using the relatively high abundance of ^{37}Cl isotope, a second transition corresponding to the loss of either the 2-deoxyribose or ribose moieties was used to improve the specificity of detection of the 2'-deoxyribonucleosides and ribonucleosides, respectively. As shown in Figs. 1 and 2, the second transition, as expected, has an intensity only three times lower

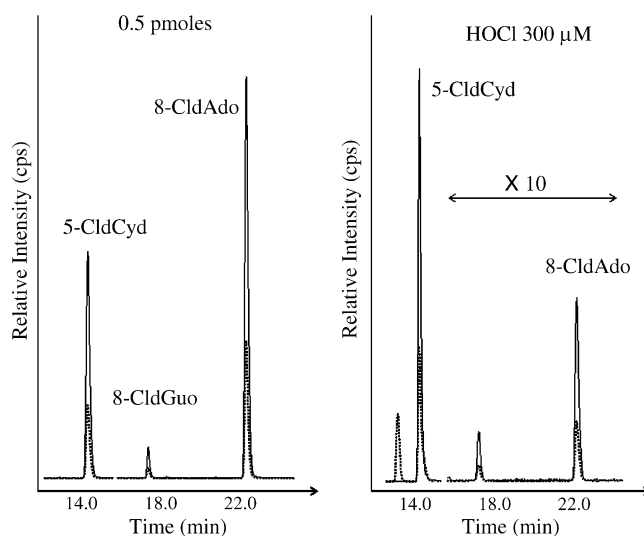


Fig. 1. Typical chromatograms obtained for the determination of chlorinated nucleosides in DNA samples. Left panel represents the chromatogram obtained by injection of 0.5 pmol each of 5-ClCyd, 8-ClGuo and 8-ClAdo. Right panel represents the HPLC–MS/MS chromatogram obtained by analysis of a DNA sample extracted from cells treated with 300 μ M HOCl. For clarity, signals for 8-ClGuo and 8-ClAdo have been enhanced by a factor of 10. For each lesion, the two monitored transitions correspond to the loss of the 2-deoxyribose moiety (loss of 116) from the molecule containing the ^{35}Cl (full line) or ^{37}Cl (dashed line) isotope.

than that of the major transition (natural abundance of ^{35}Cl and ^{37}Cl are 75% and 25%, respectively). However, a high background is observed for the second transition 280 \rightarrow 148 selected for 5-ClCyd (Fig. 2). The background level of the different chlorinated DNA and RNA lesions in untreated SKM-

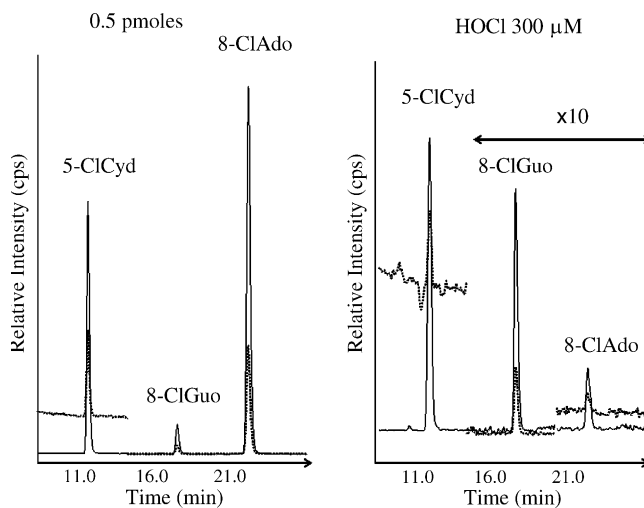


Fig. 2. Typical chromatograms obtained for the determination of chlorinated bases in RNA samples. Left panel represents the chromatogram obtained by injection of 0.5 pmol each of 5-ClCyd, 8-ClGuo and 8-ClAdo. Right panel represents the HPLC–MS/MS chromatogram obtained by the analysis of a RNA samples extracted from cells treated with 300 μ M HOCl. For clarity, signals for 8-ClGuo and 8-ClAdo have been enhanced by a factor 10. For each lesion, the two monitored transitions correspond to the loss of the ribose moiety (loss of 132) from the molecule containing the ^{35}Cl (full line) or ^{37}Cl (dashed line) isotope.

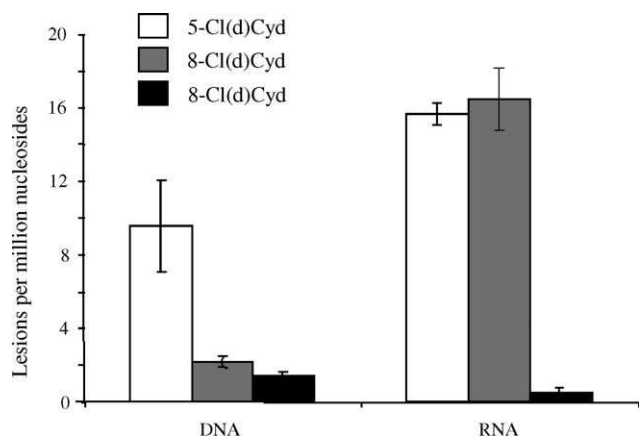


Fig. 3. Formation of chlorinated DNA and RNA bases, as determined by HPLC–MS/MS, in the DNA and RNA of cells treated for 10 min in the presence of 300 μ M HOCl. Results, expressed as the number of modification per million nucleosides represent the average \pm standard deviation of four independent experiments.

1 cells was found to be close to, or even below, the limit of quantification of the HPLC–MS/MS assay. On the other hand, a significant amount of the six studied DNA and RNA lesions was detected in HOCl treated cells (Fig. 3). Interestingly, HOCl induces mainly the formation of 5-CldCyd in DNA and, under our experimental conditions, a concentration of 300 μ M HOCl was found to give rise to 9.8 ± 2.3 5-CldCyd per 10^6 nucleosides (Fig. 3). In the mean time, the induced levels of 8-chloropurines were found to be much lower since 2.0 ± 0.4 8-CldGuo and 1.5 ± 0.4 8-CldAdo per 10^6 nucleosides were generated. A somewhat different quantitative formation of chlorinated lesions was observed in RNA (Fig. 3). Thus, high amounts of both 5-ClCyd and 8-ClGuo were found to be generated in the RNA of treated cells, with values of 15.8 ± 0.5 and 16.2 ± 1.8 lesions per 10^6 nucleosides, respectively. As observed in DNA, chlorination of the adenine moiety in RNA appears to be a minor process, leading to the formation of 0.5 ± 0.4 lesion per 10^6 nucleosides. Interestingly, chlorination of the bases was found to occur three-fold more efficiently in RNA than in DNA.

About 70 μ g of DNA was obtained using our DNA extraction protocol after isolation of human white blood cells utilizing CPT vacutainers starting from 7 mL of human blood. Among the three different chlorinated DNA lesions that may be expected, only 5-CldCyd was found to be present in significant amounts as determined by HPLC–MS/MS analysis of the enzymatic DNA hydrolysate. No detectable amounts of 8-ClGuo were observed indicating that the level of the latter chlorinated nucleoside is below the limit of detection of the assay, namely 0.2 lesion per 10^6 nucleosides. A small peak of 8-CldAdo with a signal to noise ratio around 3 was detected (not shown) in the DNA hydrolysate. However, the levels of the lesion were not high enough to enable a precise quantification ($S/N > 10$). According to the limit of sensitivity of our assay we could estimate the level of 8-CldAdo in the DNA of human white blood cells at around 0.02 le-

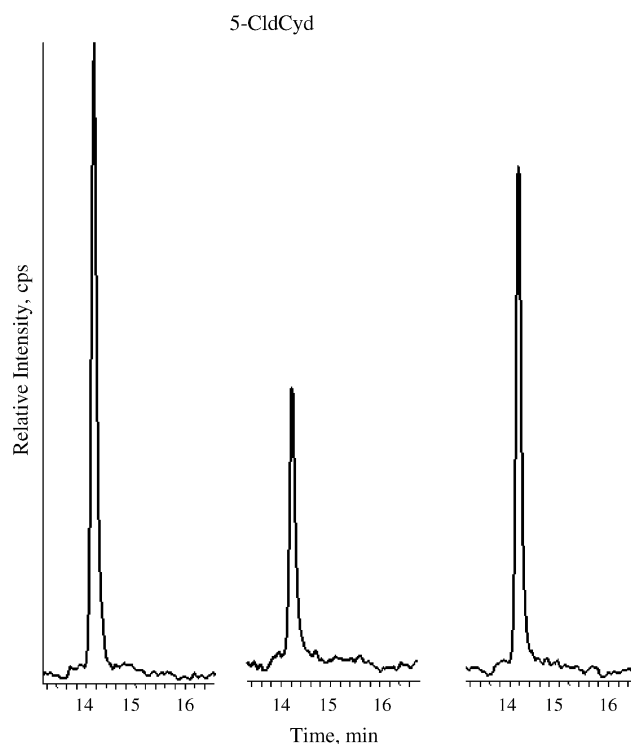


Fig. 4. Typical chromatograms obtained for the determination of 5-CldCyd in three different DNA samples extracted from human white blood cells. The HPLC–MS/MS detected peaks (transition 262 \rightarrow 146) have a signal-to-noise ratio ranging from 42 (left chromatogram) to 20 (middle chromatograms) representing levels of detected 5-CldCyd as low as 12 fmol (middle chromatogram), obtained following the injection of 15 μ g hydrolyzed DNA.

sion per 10^6 nucleosides. The background level of 5-CldCyd was determined to be around 0.15 lesions per 10^6 nucleosides, a level much higher than our limit of quantification as shown in Fig. 4. Unfortunately, the second transition used to improve the specificity of detection of 5-CldCyd was found to be useless, since a large contaminating peak was found to elute just after 5-CldCyd in the samples (not shown). Interestingly, significant variations were observed between the different healthy volunteers with levels ranging between 0.06 and 0.4 5-CldCyd per 10^6 nucleosides ($n = 10$).

4. Discussion

DNA lesions, and among them mainly 8-oxodGuo, have been extensively used as in vivo biomarkers of oxidative stress. However, an overview of the literature indicates that some of the methodologies used to measure 8-oxodGuo were not accurate and in numerous cases have significantly overestimated the cellular level of the latter oxidized purine nucleoside. The difficulties of assessing low amounts of the DNA lesion are not due to the sole necessity to have a sensitive and specific assay that should allow an accurate determination of levels around 1 lesion per 10^6 nucleosides. In fact, one of the main limitations is due to the possible occurrence of adventitious DNA oxidation during samples preparation [21].

During the last few years, mainly in Europe through the ESCODD research network, significant efforts have been made to overcome the above mentioned difficulties [15]. However, nowadays the background levels of 8-oxodGuo measured by either HPLC–EC or HPLC–MS/MS in DNA extracted with an optimized protocol that minimizes the occurrence of spurious DNA oxidation during the work-up [20] are still three to five times higher than those determined by the comet assay or alkaline elution associated with DNA repair enzymes. Additional efforts have to be made in order to determine the origin of the gap between the two different approaches.

Another alternative to be considered is the measurement of DNA lesions that could not be produced artifactually during sample preparation. In this respect, DNA adducts resulting from the reaction of reactive aldehydes derived from lipid peroxidation, such as malondialdehyde or 4-hydroxy-2-nonenal represent interesting biomarkers [22,23]. In the present work, we have evaluated if chlorinated DNA or RNA bases could be of interest as well. For this purpose, we have designed a HPLC–MS/MS based method, as previously described for 8-oxodGuo [17] and other oxidized DNA bases [18]. After optimization of the parameters of electrospray ionization and fragmentation, it appears that the method exhibits a limit of sensitivity of a few fmoles. This should allow an accurate determination with a level of detection of about 0.1 lesion per 10^6 nucleosides in 50 μg DNA. Concerning the fragmentation, it is interesting to note that, in the most sensitive positive ionization mode, the loss of either the 2-deoxyribose or ribose moiety is the predominant daughter ions for the 2'-deoxyribo- and ribonucleosides, respectively. This feature that has been already observed for several normal and modified nucleosides [24] has been used for the search of unknown DNA lesions [25]. In addition, in order to improve the specificity of detection we have taken advantage of the relatively high natural abundance of ^{37}Cl isotope (33% compared to ^{35}Cl) to apply a second transition for the monitoring of the different chlorinated derivatives.

The appropriate HPLC behavior of the different chlorinated DNA or RNA nucleosides allows an efficient separation of the lesions on the C18 reversed phase used (Figs. 1 and 2). Therefore, the three chlorinated nucleosides could be detected simultaneously both in DNA or RNA hydrolysates, and in the mean time the normal overwhelming nucleosides could be quantified using an on-line UV detector set-up at 260 nm. To check the efficacy of the HPLC–MS/MS method and the efficiency of HOCl to halogenate nucleic acids, isolated cells were treated with 300 μM of HOCl. Thereafter, both DNA and RNA were isolated from the cells using a commercially available kit. Hydrolysis of RNA was performed under conditions initially developed for DNA since the enzymes used are also able to digest RNA into ribonucleosides. Then, the levels of chlorinated DNA and RNA nucleosides were assessed by HPLC–MS/MS using an external calibration. The level of chlorinated purine nucleosides in the nucleic acids of untreated cells was found to be below the limit of sensitivity. In contrast, the presence of 5-CldCyd and 5-CiCyd

was detected in the DNA and RNA of untreated cells, with a signal to noise ratio of about 3 (not shown). Thus, the level of the latter chlorinated pyrimidine nucleoside was estimated to be around 0.05 lesion per 10^6 nucleosides. Incubation of the cells with a concentration of 300 μM HOCl for 10 min was found to induce a significant increase in the amounts of the chlorinated DNA and RNA nucleosides (Fig. 3). Interestingly, it was found that 5-CldCyd is the main lesion produced in DNA, whereas 8-CiGuo and 5-CiCyd were shown to be more efficiently generated in the RNA of treated cells. It may be pointed out that chlorination of adenine was found to be a minor process, both in RNA and DNA. Another point of major interest deals with the fact that RNA is a much better substrate for chlorination than DNA. Altogether, under the present experimental conditions, about 14 chlorinated DNA bases per 10^6 nucleosides are generated in the cells treated with 300 μM HOCl, while about 34 lesions per 10^6 nucleosides are detected in RNA. This could be explained by the important cytoplasmic localization of RNA that is more accessible than DNA. Another possibility deals with the fact that RNA is mostly single-stranded and unpacked compared to the double-stranded DNA which is highly condensed in the nucleus. Since it is well known that RNA is not, or at the best, partly repaired, it could be hypothesized that RNA lesions could represent better biomarkers in comparison with DNA lesions, even if the rapid turnover of RNA is expected to limit accumulation of lesions.

As demonstrated with the experiments involving HOCl treated cells, the HPLC–MS/MS method possesses the required sensitivity to measure low levels of chlorinated lesions. In addition, the already excellent specificity of tandem mass spectrometry could be increased for the detection of chlorinated DNA nucleosides since a second transition corresponding to the detection of the molecules containing the ^{37}Cl isotope could be monitored. As shown in Figs. 1 and 2, the presence of the chlorinated DNA lesions is further confirmed by the detection of the two transitions in the same HPLC peak at the expected retention time of the different nucleosides. This is observed for both DNA and RNA lesions.

Attempts were then made to determine the background levels of chlorinated nucleosides in the DNA isolated from human white blood cells. For this purpose, white blood cells were first separated using CPT vacutainers and the DNA was subsequently extracted using an optimized protocol developed for the measurement of 8-oxodGuo [20], in order to be able, in the near future, to simultaneously quantify both chlorinated and oxidized DNA lesions. One limitation of such an approach is that the latter protocol does not enable isolation of RNA; however work is in progress to resolve this limitation and to allow the detection of both oxidized and chlorinated RNA lesions in human lymphocytes. It should be noted that the Qiagen DNA extraction method used in the experiment performed with isolated cells (*vide supra*) has been shown to induce significant DNA oxidation during its isolation [20]. Unfortunately, the sensitivity of the present

assay was not good enough to allow the determination of the 8-chloropurine nucleosides, even if small peaks, corresponding to the limit of sensitivity of the assay ($S/N = 3$), were detected for 8-CldAdo. Therefore, the levels of 8-CldGuo and 8-CldAdo could be estimated below 0.2 and close to 0.02 lesions per 10^6 nucleosides, respectively, whereas, the level of 5-CldCyd is about 0.15 lesions per 10^6 nucleosides. The detected level of 5-CldCyd is significantly higher than that of chlorinated purine nucleosides, and above the limit of quantification of the assay (Fig. 4). The higher level of 5-CldCyd could be correlated to the fact that the chlorinated pyrimidine is more efficiently generated in cells treated with HOCl (*vide supra*). It may be noted that notable variations in the level of 5-CldCyd are observed between the different volunteers, with levels ranging from 0.06 up to 0.4 lesions per 10^6 nucleosides (not shown). However, the second transition used for the detection of 5-CldCyd (264 \rightarrow 148) shows the presence of an intense peak detected eluting just after 5-CldCyd. This prevents the use of the latter transition to unambiguously confirm the presence of 5-CldCyd (not shown). Efforts will be made to overcome this limitation by improving the DNA extraction protocol. Such an improvement is also required in order to enable the simultaneous isolation of both RNA and DNA for the quantification of chlorinated and oxidized bases in human lymphocytes.

In conclusion, a very sensitive and specific HPLC–MS/MS assay has been set-up for the measurement of chlorinated DNA and RNA nucleosides. The developed method allowed us to show that incubation of cells in presence of HOCl induced chlorination of both DNA and RNA. 5-CldCyd was the main generated DNA lesion, whereas, chlorination of both Guo and Cyt occurs notably in RNA. Finally, the level of 5-CldCyd could be accurately determined in the DNA extracted from human white blood cells that were obtained from only 7 mL of blood. In the near future, attempts will be made to check whether the different chlorinated DNA and RNA lesions could be used as biomarkers of inflammation. The main objective of the work will be to simultaneously determine several nucleic acids lesions, including oxidized, chlorinated and lipid peroxidation adducts both in RNA and DNA and to use them, in human biomonitoring studies as po-

tential biomarkers of oxidative stress and inflammation. For that purpose, efforts are currently made to improve protocols for RNA isolation.

References

- [1] G.M. Rosen, S. Pou, C.L. Ramos, M.S. Cohen, B.E. Britigan, *FASEB J.* 9 (1995) 200.
- [2] C.G. Cochrane, *Am. J. Med.* 91 (1991) 23S.
- [3] P.A. Kulcharyk, J.W. Heinecke, *Biochemistry* 40 (2001) 3648.
- [4] M. Masuda, T. Suzuki, M.D. Friesen, J.-L. Ravanat, J. Cadet, B. Pignatelli, H. Nishino, H. Ohshima, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 40486.
- [5] H.J. Chen, S.W. Row, C.L. Hong, *Chem. Res. Toxicol.* 15 (2002) 262.
- [6] C.L. Hawkins, M.J. Davies, *Chem. Res. Toxicol.* 15 (2002) 83.
- [7] M.K. Shigenaga, B.N. Ames, *Free Radic. Biol. Med.* 10 (1991) 211.
- [8] J. Cadet, M. Weinfeld, *Anal. Chem.* 65 (1993) 675.
- [9] J. Cadet, T. Douki, J.-L. Ravanat, *Environ. Health Perspect.* 105 (1997) 1033.
- [10] J. Cadet, C. D'Ham, T. Douki, J.-P. Pouget, J.-L. Ravanat, S. Sauvaigo, *Free Radic. Res.* 29 (1998) 541.
- [11] ESCODD, *Free Radic. Res.* 32 (2000) 333.
- [12] ESCODD, *Free Radic. Res.* 36 (2002) 239.
- [13] ESCODD, *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2003) 1089.
- [14] ESCODD, *Carcinogenesis* 23 (2002) 2129.
- [15] C.M. Gedik, A. Collins, *FASEB J.* 19 (2005) 82.
- [16] A.R. Collins, J. Cadet, L. Moller, H.E. Poulsen, J. Viña, *Arch. Biochem. Biophys.* 423 (2004) 57.
- [17] J.-L. Ravanat, B. Duret, A. Guiller, T. Douki, J. Cadet, *J. Chromatogr. B* 715 (1998) 349.
- [18] S. Frelon, T. Douki, J.-L. Ravanat, J.-P. Pouget, C. Tornabene, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (2000) 1002.
- [19] J.-L. Ravanat, G. Remaud, J. Cadet, *Arch. Biochem. Biophys.* 374 (2000) 118.
- [20] J.-L. Ravanat, T. Douki, P. Duetz, E. Gremaud, K. Herbert, T. Hofer, L. Lasserre, C. Saint-Pierre, A. Favier, J. Cadet, *Carcinogenesis* 23 (2002) 1911.
- [21] J.-L. Ravanat, R.J. Turesky, E. Gremaud, L.J. Trudel, R.H. Stadler, *Chem. Res. Toxicol.* 8 (1995) 1039.
- [22] T. Douki, F. Odin, S. Caillat, A. Favier, J. Cadet, *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 62.
- [23] L.J. Marnett, *Toxicology* 181–182 (2002) 219.
- [24] Y. Hua, S.B. Wainhaus, Y. Yang, L. Shen, Y. Xiong, X. Xu, F. Zhang, J.L. Bolton, R.B. van Breemen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 80.
- [25] P. Regulus, S. Spessotto, M. Gateau, J. Cadet, A. Favier, J.-L. Ravanat, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 2223.

Short Communication

Hydrogen peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA

Tim Hofer^{1,a,*}, Carine Badouard^{2,b}, Edyta Bajak^{1,b}, Jean-Luc Ravanat², Åse Mattsson¹ and Ian A. Cotgrave¹

¹Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institute, Box 210, S-171 77 Stockholm, Sweden

²Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques, DRFMC/SCIB, CEA Grenoble, F-38054 Grenoble cedex 9, France

*Corresponding author
e-mail: thofer@ufl.edu

Abstract

Human A549 lung epithelial cells were challenged with ¹⁸O-labeled hydrogen peroxide (¹⁸O-H₂O₂), the total RNA and DNA extracted in parallel, and analyzed for ¹⁸O-labeled 8-oxo-7,8-dihydroguanosine (¹⁸O]-8-oxoGuo) and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (¹⁸O]-8-oxodGuo) respectively, using high-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). ¹⁸O]-H₂O₂ exposure resulted in dose-response formation of both ¹⁸O]-8-oxoGuo and ¹⁸O]-8-oxodGuo and ¹⁸O]-labeling of guanine in RNA was 14–25 times more common than in DNA. Kinetics of formation and subsequent removal of oxidized nucleic acids adducts were also monitored up to 24 h. The A549 showed slow turnover rates of adducts in RNA and DNA giving half-lives of approximately 12.5 h for ¹⁸O]-8-oxoGuo in RNA and 20.7 h for ¹⁸O]-8-oxodGuo in DNA, respectively.

Keywords: A549 cells; electrospray ionization; mass spectrometry; oxidative stress; 8-oxodGuo; 8-oxoGuo.

Oxidative damage to nucleic acids (DNA and RNA) can lead to malfunctioning and erroneous coding, causing aging and cancer (Finkel and Holbrook, 2000). Guanine is especially vulnerable to oxidation, having the lowest oxidation potential of the normal nucleosides (Steenken and Jovanovic, 1997), and giving 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) in DNA from 2'-deoxyguanosine (dGuo) (Kasai, 1997; De Zwart et al., 1999). 8-OxodGuo has the potential to pair with both cytosine and adenine and can cause transcriptional reading errors (Culp et al., 1989; Klein et al., 1992). In RNA, oxidation of guanosine (Guo) can give 8-oxo-7,8-dihydroguanosine (8-oxoGuo). Whereas DNA is double-stranded, RNA is on

average 30–40% single-stranded (Metzler, 1977), mainly cytoplasmic, less compartmentalized and less compact than nuclear DNA. Little is known about RNA repair or the consequences of RNA damage. However, the human YB-1 protein was found to specifically bind to RNA containing 8-oxoguanine (Hayakawa et al., 2002), and it has been found that alkylative RNA damage is repaired *in vivo* (Aas et al., 2003). Rat liver treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane showed considerably more RNA oxidation over DNA (Fiala et al., 1989), and cultured human skin fibroblasts exposed to UVA radiation showed an approximately seven-fold higher degree of RNA oxidation over DNA (Wamer and Wei, 1997). Substantial oxidation of RNA over DNA has been indicated in human urinary analyses (Park et al., 1992; Weimann et al., 2002), detected *in situ* in brains from Parkinson's disease patients (Zhang et al., 1999) and in the early stages of Alzheimer disease (Nunomura et al., 2001). Given this, we were interested in exposing cultured cells to subtoxic levels of stable isotopically labeled ¹⁸O]-H₂O₂ to test for ¹⁸O]-8-oxoGuo (RNA) and ¹⁸O]-8-oxodGuo (DNA) formation, and to study their turnover using parallel extraction of total RNA and total DNA from the same cells. Human lung epithelial A549 cells were chosen, which are capable of tolerating high oxidative insults without undergoing apoptotic cell death (Dandrea et al., 2004). Measurement of 8-oxodGuo is complicated, as oxidation of dGuo can occur during the work-up procedure, generating artifactually high levels of 8-oxodGuo (Helbock et al., 1998; Hofer and Möller, 2002; Ravanat et al., 2002). However, since artifactual incorporation of ¹⁸O into DNA or RNA cannot occur during work-up of nucleic acid samples, exposure to isotopically labeled oxidants should give a more accurate modification measurement than using unlabeled H₂O₂. Recently, ¹⁸O was found to be incorporated into DNA when cells were exposed to the [¹⁸O₂]-1,4-labeled endoperoxide DHPN¹⁸O₂ (Martinez et al., 2000; Ravanat et al., 2000) which, under heating, produces ¹⁸O]-labeled singlet oxygen ¹⁸[¹O₂] that specifically reacts with the guanine bases in DNA, forming ¹⁸O]-8-oxodGuo. ¹⁸[¹O₂]-labeling of DNA was also used for the methodological evaluation of work-up procedures (Ravanat et al., 2002) using HPLC-MS/MS (Ravanat et al., 1998, 2000; Frelon et al., 2000), a technique also used for this study.

Endogenous H₂O₂ is membrane-permeable and can be derived from many cellular sources, including specific cells of the immune system, intracellular sites such as from mitochondrial respiration, enzymatic reactions, redox cycling of toxic substances such as quinones, and from energetic radiation (Halliwell and Gutteridge, 1999). Hydrogen peroxide (Thénard, 1818) is a strong oxidant

^aPresent address: Department of Aging and Geriatric Research, University of Florida, Gainesville, FL 32610, USA.

^bThese authors contributed equally to this work.

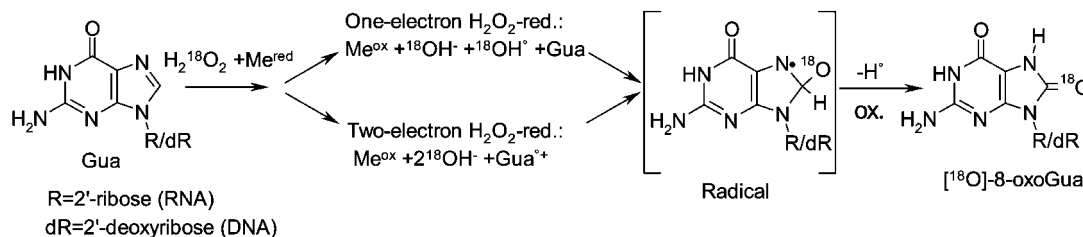


Figure 1 Probable reaction mechanism for ^{18}O -labeled hydrogen peroxide (^{18}O - H_2O_2) oxidation of guanine in RNA and DNA mediated by transition metals.

and reacts with biomolecules under catalysis by redox-cycling transition metals (Fe^{2+} and Cu^+) using 'Fenton chemistry' (Fenton, 1894; Wardman and Candeias, 1996). Studies of H_2O_2 -dependent oxidation reactions involving transition metals date back to the mid-19th century (Schönbein, 1860; Fenton, 1876, 1894) and are mainly believed to involve production of the reactive hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$) (Downes and Blunt, 1879; Haber

and Weiss, 1932). Other mechanisms have also been suggested, including formation of the oxidizing ferryl ion (FeO^{2+}) (Manchot and Wilhelms, 1902; Bray and Gorin, 1932) and, more recently, a two-electron reduction mechanism (Hofer, 2001; Figure 1).

As shown in Figure 2A, ^{18}O - H_2O_2 exposures resulted in concentration-dependent formation of both ^{18}O -8-oxoGuo and ^{18}O -8-oxodGuo up to 5 mM peroxide,

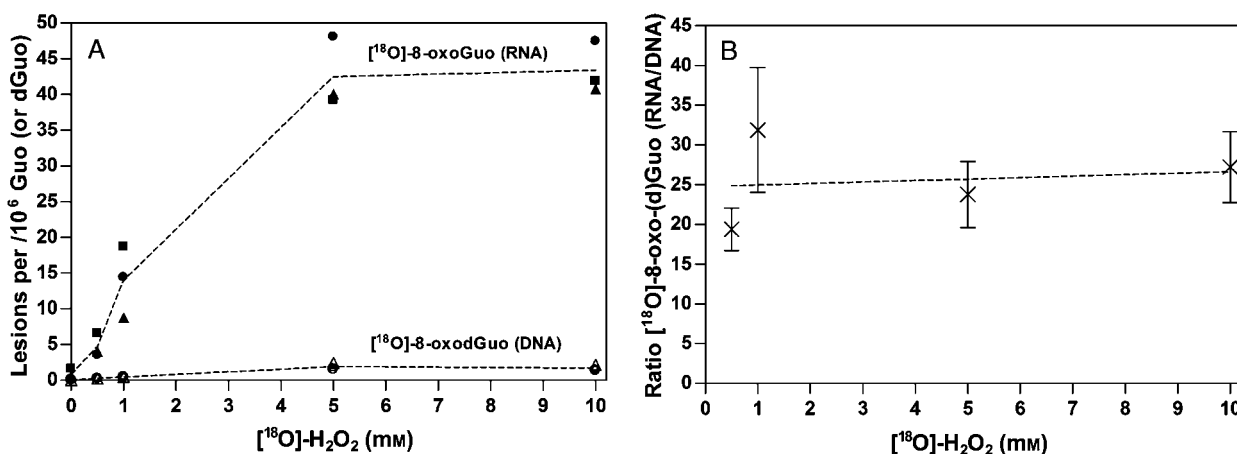


Figure 2 Dose-response exposure of A549 cells to ^{18}O - H_2O_2 (0.5–10 mM) for 1 h with analysis of ^{18}O -8-oxoguanine formation in total RNA and DNA isolated from the same pool of exposed cells.

(A) A dose-response relationship was observed up to 5 mM for both RNA and DNA. For RNA, the symbols ●, ■ and ▲ are used to identify a sample at a given dose (DNA from the same sample has an open symbol). Three replicates for each dose were exposed simultaneously and analyzed in parallel (dashed line shows the average). The average DNA levels (mean \pm SEM) were 0.035 ± 0.015 (0 mM), 0.24 ± 0.017 (0.5 mM), 0.45 ± 0.024 (1 mM), 1.88 ± 0.28 (5 mM) and 1.67 ± 0.25 (10 mM) ^{18}O -8-dGuo/ 10^6 dGuo. Mean levels of ^{18}O -8-oxoguanine for both RNA and DNA increased significantly ($p < 0.05$) reciprocally up to 5 mM. (B) The ratio of ^{18}O -8-oxo(d)Guo formation in RNA versus DNA was constantly ca. 25-fold higher in RNA than DNA, irrespective of the dose of ^{18}O - H_2O_2 (mean \pm SEM and trend line; data from Figure 2A).

Human A549 type II lung carcinoma epithelial cells were obtained from the American Tissue Type Collection and were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and 1 mM sodium pyruvate at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2 . Cells were passaged by conventional trypsinization every 2–3 days. For experiments, 1.5×10^6 cells were seeded into 100-mm culture dishes in 10 ml of 5% FBS-DMEM with penicillin/streptomycin and grown for 72 h, after which they had reached confluency (approx. $8\text{--}9\times 10^6$ cells per dish, Figure 4A). After washing the cells twice in 5 ml of phosphate-buffered saline (PBS), 3 ml (low volume) of ice-cold DMEM medium (without FBS or penicillin/streptomycin) containing ^{18}O - H_2O_2 (90–95 at. % ^{18}O ; Icon Services, Summit, NJ, USA) was added evenly to each dish, which were then transferred (within minutes) to the incubator (37°C) for 60 min of incubation. After washing three times in 5 ml of PBS, cells were lysed for nucleic acid extraction in QRL1 buffer (RNA/DNA extraction kit No. 14142, Qiagen, Hilden, Germany) containing 1% v/v β -mercaptoethanol using a cell scraper. Cell lysates from two dishes were pooled and homogenized using a Potter-Elvehjem homogenizer. Thereafter, total DNA and RNA were separately isolated in parallel from the same cells by column binding in turns. The nucleic acids were eluted in 100 μl of water containing 50 μM of the Fe^{3+} -chelator deferoxamine mesylate. To each 40–60- μg nucleic acid sample were added 5 U of nuclease P_1 and hydrolysis buffer (final concentrations: 30 mM ammonium acetate, 20 μM zinc chloride, pH 5.3), followed by 1 U of alkaline phosphatase and the samples were hydrolyzed for 60 min at 50°C. An equal amount of chloroform/isoamyl alcohol (24:1) was added and the tubes were briefly shaken and spun to remove proteins and the samples were concentrated using a speed-vac to approximately 25–30 μl . HPLC-MS/MS analyses were performed as previously described (Ravanat et al., 1998; Frelon et al., 2000) using an autosampler, pump and UV detector (280 nm) for analysis of Guo and dGuo connected in-line to an API 3000 triple-quadrupole mass spectrometer from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) in the ESI^+ mode detecting transitions from parent $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion compounds for highest sensitivity. After HPLC separation, tandem quadrupole m/z -separation followed the transitions for splitting of the N -glycosidic bonds with loss of the 2'-ribose (or 2'-deoxyribose) unit: $M_r=302.1\text{--}170.0$ (^{18}O -8-oxoGuo) and $M_r=286.1\text{--}170.0$ (^{18}O -8-oxodGuo). Amounts of ^{18}O -8-oxoGuo and ^{18}O -8-oxodGuo were determined against isotopically labeled standards that were calibrated spectrophotometrically.

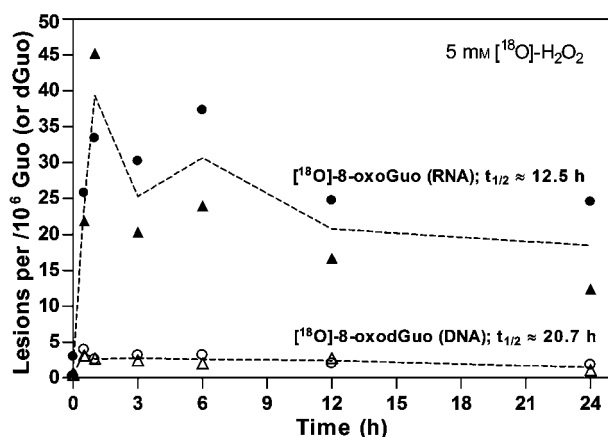


Figure 3 Kinetics of turnover of [¹⁸O]-8-oxoGuo (RNA) and [¹⁸O]-8-oxodGuo (DNA) in A549 cells over a 24-h recovery period after 1 h of exposure to 5 mM [¹⁸O]-H₂O₂.

Cells were exposed to peroxide, nucleic acid isolations performed and oxidized base detection performed as described for Figure 2. Cells were washed three times in 5 ml of PBS and incubated at 37°C in 5% FBS-DMEM (without penicillin/streptomycin), after which the cells were washed twice with PBS and lysed. After 1 h, ¹⁸O-labeling of guanine in RNA was on average 14-fold more common than in DNA. Half-lives of [¹⁸O]-8-oxoGuo (total RNA) and [¹⁸O]-8-oxodGuo (total DNA) were 12.5 and 20.7 h, respectively (compared to the 1-h sample). After 24 h the levels had decreased by 56% (RNA) and 59% (DNA). Measurements were performed in duplicate (dashed lines show the average). A 0.5-h incubation point is also included.

reaching a plateau at 10 mM, for both RNA and DNA. The reason for this plateau is unclear, but could be due to some of the most damaged cells becoming detached from the culture dishes during the wash steps. To facilitate detection of a strong HPLC-MS/MS signal from [¹⁸O]-8-oxodGuo, relatively high concentrations (0.5–10 mM) of [¹⁸O]-H₂O₂ (3 ml, low volume) were used. The sensitivity of the assay depends on the HPLC-MS/MS model used, settings and chromatographic conditions, but also on the number of cultured cells used, the amount of added [¹⁸O]-H₂O₂ and the efficiency of the nucleic acid extraction and enzymatic hydrolysis. From HPLC-MS/MS analyses of the nucleic acid [¹⁸O]-8-oxo(d)Guo/(d)Guo levels with respect to the amount of [¹⁸O]-H₂O₂ added, and the amount of nucleic acids extracted (measured by UV spectrophotometry), it was estimated that only 0.5–1 per 10⁶ [¹⁸O]-H₂O₂ molecules added gave rise to an [¹⁸O]-8-oxo(d)Guo molecule. Thus, the majority of added [¹⁸O]-H₂O₂ reacted with other cell constituents or could have partly been removed by cellular defense systems, including peroxidase activities. To some extent, the migration of electron holes (radical cations, see Figure 1) through nucleic acids could also have occurred. To study the formation and subsequent removal of ¹⁸O-labeled guanines in RNA or DNA more closely (Figure 3), [¹⁸O]-H₂O₂ at 5 mM was chosen. Isolation of DNA and RNA from the same population of cells, with subsequent parallel biochemical nucleic acid analyses, revealed that ¹⁸O-labeling of guanine in RNA was 14–25-fold more common than in DNA when normalized to their respective total Guo or dGuo contents (Figures 2B and 3). Also, the A549 cells contained approximately twice the amount of RNA compared to DNA. Based on a known dependence of this oxidation event on Fenton

chemistry, these observations might suggest that transition metals reside closely in the local environment of RNA in the cell, and that the amount of H₂O₂ reaching the nucleus may be significantly reduced due to cellular defense systems. Furthermore, the processes involved in nucleic acid turnover, which include repair and/or degradation, were found to be rather slow (Figure 3). Thus, cursory inspection of the kinetics of turnover of [¹⁸O]-8-oxoGuo (total RNA) and [¹⁸O]-8-oxodGuo (total DNA) after pulsed exposure of cells and recovery for 24 h in the absence of peroxide reveal an approximate half-life turnover of adduct in RNA of 12.5 h, and for label in DNA of 20.7 h (compared to average levels from the 1-h samples). The kinetics of RNA turnover was notably reduced after 12 h, and after 24 h the levels had decreased by 56% (RNA) and 59% (DNA). The potential contribution of a dilution effect to the observed patterns of adduct formation due to cell cycle progression was demonstrated to be minimal, as the cells were confluent during the exposure period (Figure 4A). Rather, the higher concentrations of H₂O₂ (1, 5 and 10 mM) caused a stall in cell division, observed after 24 h (Figure 4A). In addition, the viability of various cell types is affected differently by hydrogen peroxide exposure, and the A549 lung cells are particularly resistant to peroxide-induced oxidative stress and the resultant cytolytic toxicity (Dandrea et al., 2004). Control experiments revealed that, under the conditions of exposure, cell viability, assessed as adherent cell number, was not substantially affected by the treatment with peroxide (Figure 4B). In our experiments the human A549 cells showed considerably slower half-life turnover rates for 8-oxodGuo in DNA (Figure 3) compared to results obtained in other cell types, such as mice embryonic fibroblasts exposed to photosensitizer and light (5.5 h; Osterod et al., 2001) and human lymphoblast cells exposed to H₂O₂ (1 h; Jaruga and Dizdaroglu, 1996). The reasons underlying this anomaly are uncertain, but may lie in differing efficiencies of repair in the respective cell lines, or the slow turnover may be a consequence of high levels of RNA and DNA damage. Some degree of isotope effect on the enzymatic processes involved is less likely, but cannot be ruled out. In addition, to date few data have been published on the kinetics of turnover of oxidized RNA. The majority of cellular RNA (up to 95%) is represented by transfer and ribosomal RNA, whereas the remaining RNA is in the form of messenger RNA and other low-molecular-weight RNAs. Turnover half-lives for rRNA and tRNA in the rat brain have been reported to be 12 and 12.5 days, respectively, whereas nDNA has a non-significant turnover (Dani, 1997). Consequences of RNA damage will vary, depending on the target RNA species. However, collectively it can be stated that protein synthesis is a primary target for dysfunction, particularly in the face of modified mRNA species. It is interesting to note that the fidelity of nascent mRNA molecules is partially checked before translation, and thus the synthesis of incorrect (truncated) protein(s) may be prevented when the 'defective' mRNAs undergo targeted degradation (Maquat and Carmichael, 2001). The existence of an RNA-signaling network with regulatory functions has also been recently suggested (Mattick, 2004), where RNA damage could thus be provocative.

In conclusion, the present data unequivocally show that cellular RNA is a more sensitive target for hydrogen

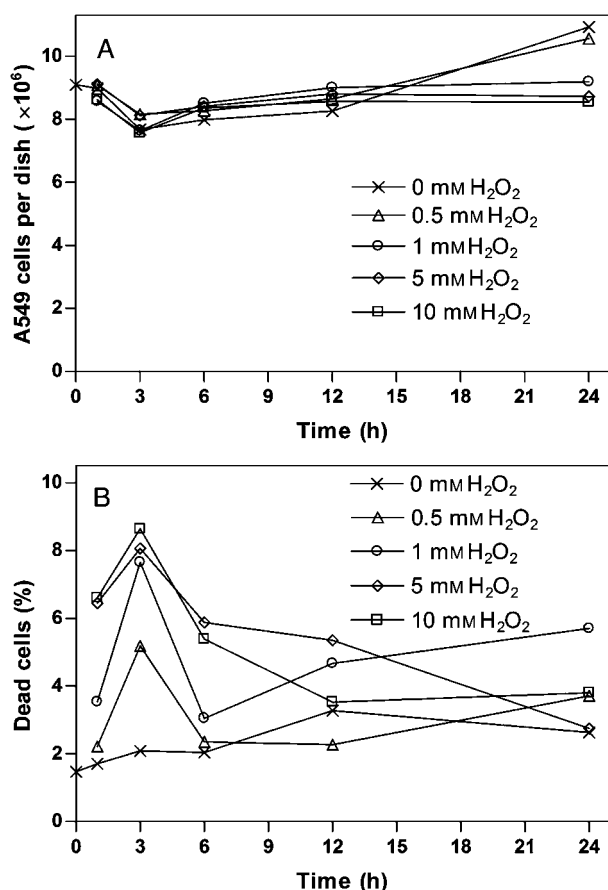


Figure 4 Exposure of A549 cells to H₂O₂ (0.5–10 mM, 1 h) and assessment of cell number and viability over 24 h.

After identical experimental procedures as described for Figure 3, cells were trypsinized (37°C, 5 min), dispersed in 5% FBS-DMEM, diluted (1:1) in 0.5% trypan blue and counted with a microscope using a Bürker cell-counting chamber. (A) Total number of cells (dead and alive) attached per cell-culture dish. The cell number per dish remained at approximately 8–9 × 10⁶ cells for the highest (1, 5 and 10 mM) H₂O₂ exposures, but with a small increase (non-significant) after 24 h for the lowest exposures (0 and 0.5 mM H₂O₂). (B) Percentage of dead (blue) cells counted after trypan blue inclusion. From a background of 2–3% dead cells, H₂O₂ exposure generated up to 9% dead cells (for 10 mM H₂O₂), with the phenomenon strongest occurring after 3 h. The mean of three separate exposures is shown.

peroxide-induced oxidation of guanine residues than DNA. This may present serious ramifications for cellular biochemical processes, particularly involving *de novo* protein synthesis, thus contributing to cytotoxic events during oxidative stress. The observation may also further support efforts to establish the assay of 8-oxoGuo in urine and other body fluids, as opposed to 8-oxodGuo (Kasai, 1997), as a potential biomarker of oxidative stress *in vivo* (Park et al., 1992; Weimann et al., 2002). There is a clear need for further quantitative and qualitative validations in this area.

Acknowledgments

We thank Prof. Bengt Jernström and Kristian Dreij for their critical reading of the manuscript.

References

- Aas, P.A., Otterlei, M., Falnes, P.Ø., Vågbø, C.B., Skorpen, F., Akbari, M., Sundheim, O., Bjørås, M., Slupphaug, G., Seeberg, E., and Krokan, H.E. (2003). Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* 421, 859–863.
- Bray, W.C. and Gorin, M.H. (1932). Ferryl ion, a compound of tetravalent iron. *J. Am. Chem. Soc.* 54, 2124–2125.
- Culp, S.J., Cho, B.P., Kadlubar, F.F., and Evans, F.E. (1989). Structural and conformational analyses of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Chem. Res. Toxicol.* 2, 416–422.
- Dandrea, T., Hellmold, H., Jonsson, C., Zhivotovsky, B., Hofer, T., Wärgård, L., and Cotgreave, I. (2004). The transcriptosomal response of human A549 lung cells to a hydrogen peroxide-generating system: relationship to DNA damage, cell cycle arrest, and caspase activation. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 881–896.
- Dani, S.U. (1997). Molecular turnover and aging. In: *Principles of Neural Aging*, S.U. Dani, A. Hori, and G.F. Walter, eds. (Amsterdam, The Netherlands: Elsevier).
- De Zwart, L.L., Meerman, J.H.N., Commandeur, J.N.M., and Vermeulen, N.P.E. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 202–226.
- Downes, A. and Blunt, T.P. (1879). The effect of sunlight upon hydrogen peroxide. *Nature* 20, 521.
- Fenton, H.J.H. (1876). On a new reaction of tartaric acid. *Chem. News* 33, 190.
- Fenton, H.J.H. (1894). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* 65, 899–910.
- Fiala, E.S., Conaway, C.C., and Mathis, J.E. (1989). Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Cancer Res.* 49, 5518–5522.
- Finkel, T. and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.
- Frelon, S., Douki, T., Ravanat, J.-L., Pouget, J.-P., Tornabene, C., and Cadet, J. (2000). High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 1002–1010.
- Haber, F. and Weiss, J. (1932). Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwissenschaften* 20, 948–950.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Edition (Oxford, UK: Oxford University Press).
- Hayakawa, H., Uchiumi, T., Fukada, T., Ashizuka, M., Kohno, K., Kuwano, M., and Sekiguchi, M. (2002). Binding capacity of human YB-1 protein for RNA containing 8-oxoguanine. *Biochemistry* 41, 12739–12744.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B., Shigenaga, M.K., Walter, P.B., Woodall, A.A., Yeo, H.C., and Ames, B.N. (1998). DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 288–293.
- Hofer, T. (2001). Oxidation of 2'-deoxyguanosine by H₂O₂-ascorbate: evidence against free OH[•] and thermodynamic support for two-electron reduction of H₂O₂. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 210–213.
- Hofer, T. and Möller, L. (2002). Optimization of the workup procedure for the analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine with electrochemical detection. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 426–432.
- Jaruga, P. and Dizdaroglu, M. (1996). Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res.* 24, 1389–1394.
- Kasai, H. (1997). Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat. Res.* 387, 147–163.

- Klein, J.C., Bleeker, M.J., Saris, C.P., Roelen, H.C.P.F., Brugghe, H.F., van den Elst, H., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., Westra, J.G., Kriek, E., and Berns, A.J.M. (1992). Repair and replication of plasmids with site-specific 8-oxodG and 8-AAFdG residues in normal and repair-deficient human cells. *Nucleic Acids Res.* *20*, 4437–4443.
- Manchot, W. and Wilhelms, O. (1902). Ueber Peroxydbildung beim Eisen. *Justus Liebig's Ann. Chem.* *325*, 105–124.
- Maquat, L.E. and Carmichael, G.G. (2001). Quality control of mRNA function. *Cell* *104*, 173–176.
- Martinez, G.R., Ravanat, J.-L., Medeiros, M.H.G., Cadet, J., and Di Mascio, P. (2000). Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of ¹⁸O-labeled singlet oxygen for mechanistic studies. *J. Am. Chem. Soc.* *122*, 10212–10213.
- Mattick, J.S. (2004). The hidden genetic program of complex organisms. *Sci. Am.* *291*, 60–67.
- Metzler, D.E. (1977). *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells*, 1st Edition. (New York, USA: Academic Press).
- Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E.K., Jones, P.K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S., et al. (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *60*, 759–767.
- Osterod, M., Hollenbach, S., Hengstler, J.G., Barnes, D.E., Lindahl, T., and Epe, B. (2001). Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1)-deficient mice. *Carcinogenesis* *22*, 1459–1463.
- Park, E.-M., Shigenaga, M.K., Degan, P., Korn, T.S., Kitzler, J.W., Wehr, C.M., Kolachana, P., and Ames, B.N. (1992). Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 3375–3379.
- 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.
- Ravanat, J.-L., Di Mascio, P., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., and Cadet, J. (2000). Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *J. Biol. Chem.* *275*, 40601–40604.
- Ravanat, J.-L., Douki, T., Duetz, 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.
- Schönbein, C.F. (1860). Fortsetzung der Beiträge zur nähern Kenntniss des Sauerstoffs. *J. Prakt. Chem.* *79*, 65–72.
- Steenken, S. and Jovanovic, S.V. (1997). How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* *119*, 617–618.
- Thénard, M.L.J. (1818). Observations sur des nouvelles combinaisons entre l'oxygène et divers acides. *Ann. Chim. Phys.* *8*, 306–313.
- Wamer, W.G. and Wei, R.R. (1997). *In vitro* photooxidation of nucleic acids by ultraviolet A radiation. *Photochem. Photobiol.* *65*, 560–563.
- Wardman, P. and Candeias, L.P. (1996). Fenton chemistry: an introduction. *Radiat. Res.* *145*, 523–531.
- Weimann, A., Belling, D., and Poulsen, H.E. (2002). Quantification of 8-oxo-guanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in human urine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* *30*, E7.
- Zhang, J., Perry, G., Smith, M.A., Robertson, D., Olson, S.J., Graham, D.G., and Montine, T.J. (1999). Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am. J. Pathol.* *154*, 1423–1429.

Received October 10, 2004; accepted February 4, 2005

DNA lesions as biomarkers of inflammation and oxidative stress: a preliminary evaluation.

Carine BADOUARD, Thierry DOUKI, Jean CADET, Alain FAVIER & Jean-Luc RAVANAT*.

*Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée, SCIB/Laboratoire « Lésions des Acides Nucléiques », CEA/Grenoble F-38054 Grenoble Cedex 9, France.*Corresponding author, Tel: +33(0)438784797 Fax : +33(0)438785090 e-mail : jravanat@cea.fr*

Reactive oxygen species involved in oxidative stress may damage DNA, the biopolymer that contains the genetic information. The cell has developed several enzymatic systems to repair the damage but some of them may persist and lead to mutagenesis. We focused our attention on the simultaneous quantification of several DNA lesions using the highly sensitive, specific and reliable high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry detection technique (HPLC-MS/MS). The aim of this work is to determine if the different measured DNA lesions could be used as biomarkers of *in vivo* oxidative stress and/or inflammation. For such a purpose, three different types of DNA lesions were monitored: oxidized DNA lesions, chlorinated nucleosides arising from inflammation processes and DNA adducts generated from reaction with reactive aldehydes arising from lipid peroxides breakdown. Preliminary results, that have to be further confirmed, show a significant increase in the level of several different DNA lesions in diabetic patients versus a control group of healthy volunteers.

1. INTRODUCTION

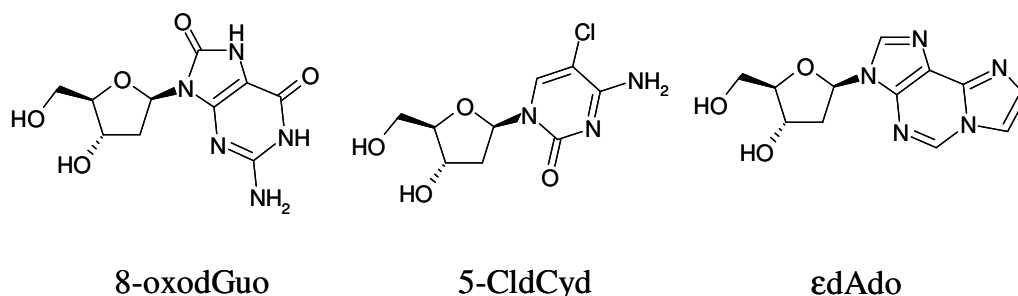
Reactive oxygen species (ROS) that are involved in oxidative stress are able to oxidize biomolecules including DNA and RNA to generate a wide set of modifications [1,2]. ROS, including O_2^{\bullet} , H_2O_2 , $\bullet OH$ and 1O_2 are generated during mitochondrial respiration, intra-cellular signal transduction, phagocytosis and metabolism of xenobiotics. In addition, stimulated monocytes and neutrophils generate hypochlorite (HOCl) via the activation of myeloperoxidase [3]. HOCl is a key bactericidal agent that can also damage host tissues. During the last three decades, many attempts were made to measure oxidized bases and nucleosides in biological fluids and to use them as biomarkers of oxidative stress [4]. In this respect, most of the works have focused on the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo), partly due to the availability of a suitable assay involving HPLC coupled to electrochemical detection.

With the recent emergence of sensitive and versatile analytical tools, such as the HPLC-MS/MS technique, many efforts have been made to measure other DNA lesions [5]. In this way, we were interested in the measurement of three different kinds of DNA damage. Oxidized DNA lesions include 8-oxodGuo, thymidine glycols (ThdGly), 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine (5-HMdUrd) and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyadenosine (8-oxodAdo). Chlorinated DNA lesions comprise 8-chloro-2'-deoxyguanosine (8-ClIdGuo) 8-chloro-2'-deoxyadenosine (8-ClIdAdo) and 5-chloro-2'-deoxycytidine (5-ClIdCyd), arising

from the action of HOCl released by activated macrophages during inflammation processes [6]. Finally, DNA adducts including 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine (εdGuo), 1,*N*⁶-etheno-2'-deoxyadenosine (εdAdo), the malondialdehyde and 4-hydroxynonenal 2'-deoxyguanosine adducts (M₁dGuo and HNEdGuo, respectively) that could be generated by the cycloaddition of reactive aldehydes arising from the breakdown of lipid peroxides, were quantified [7]. The structure of some of the detected DNA lesions is given in Figure 1.

Our strategy for human biomonitoring consists in the measurement of the lesions both in human urine and in the DNA (and RNA) extracted from white blood cells (Scheme 1), using the sensitive and specific HPLC-MS/MS approach. Thus, the above selected DNA lesions were measured in the leukocytes obtained from both human healthy volunteers and diabetic patients suffering from a disease well known to be associated to an oxidative stress.

Figure 1: Chemical structures of some of the studied DNA lesions including 8-oxodGuo, 5-Cl_dCyd and εdAdo.



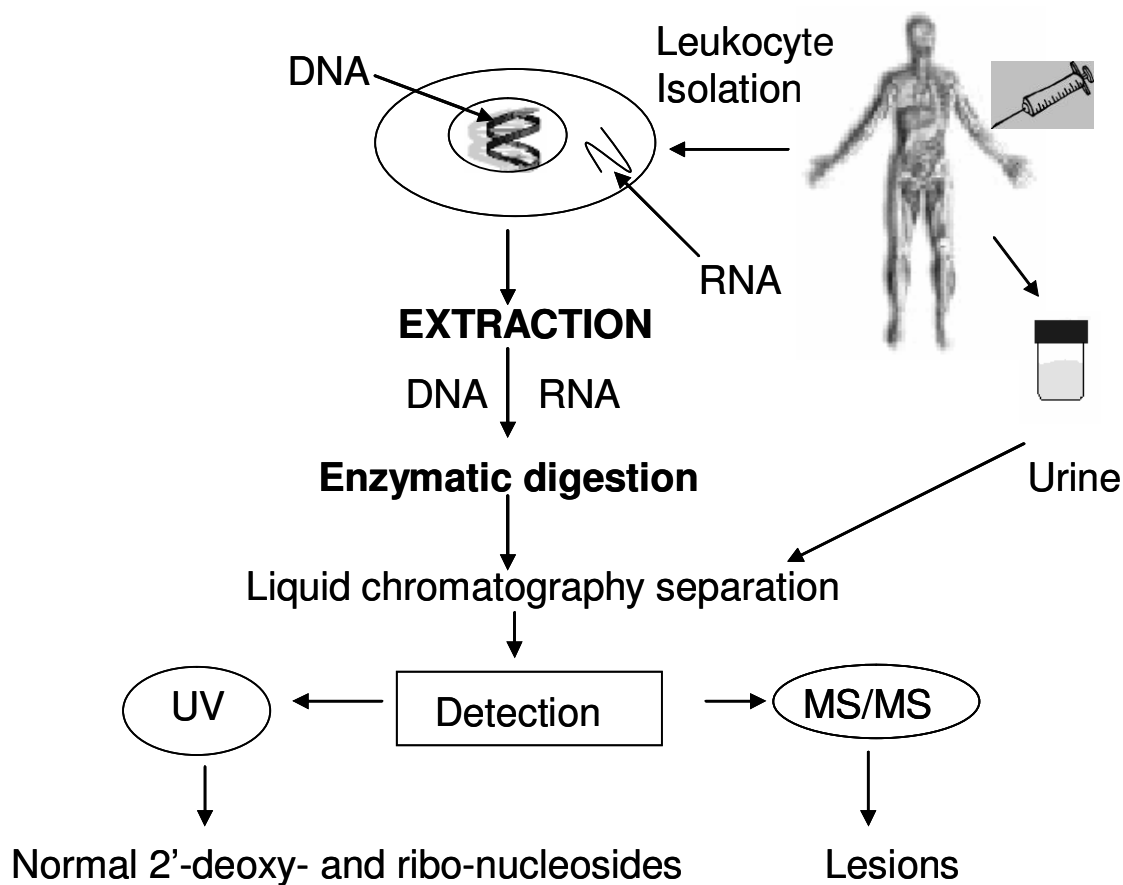
2. STRATEGY

Attempts were made to simultaneously measure different DNA lesions in human urine. The presence of DNA lesions in urine could be attributed, at least, partly to the elimination of repair products of DNA and oxidation of nucleotide pools [8,9]. Therefore, the measurement of DNA lesions in human urine may represent interesting non invasive biomarker of oxidative stress, even if the presence of the lesions in urine could have other origins. In this respect, it is worth noting that in a recent work [10], in contrast to previous studies [11], it has been shown that the diet has no effect on the level of 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) and related nucleosides.

The HPLC-MS/MS method was found to be sensitive enough to enable quantification of 8-oxoGua and related ribo and 2'-deoxyribonucleosides, in agreement with a recent work [12]. Unfortunately, we were not able to quantify other oxidized DNA lesions, including ThdGly. Efforts are currently made to measure additional DNA lesions in human urine.

Concerning the quantification of DNA damage in human leukocytes, an optimized protocol to isolate leukocytes from whole blood and to extract DNA and RNA has been developed in order to minimize spurious DNA oxidation occurring during the work-up [13]. In the present work, emphasis was placed on DNA lesions (*vide infra*) but in the future, RNA lesions that could represent good biomarkers of oxidative stress (Scheme 1) will be also considered.

Scheme 1: Human monitoring



3. MEASUREMENT OF THE LESIONS BY HPLC-MS/MS

The HPLC-MS/MS measurements were performed using a API 3000 tandem mass spectrometric apparatus (Applied Biosystems). For each of the different studied DNA or RNA lesions, a method was set up and the sensitivity of detection was optimized by infusing a diluted solution of the nucleosides as previously described in details for 8-oxodGuo and other DNA lesions [14-16]. The multiple reaction monitoring mode (mrm) was used in order to provide the highest sensitivity. For all the products, both positive and negative polarities were tested and at exception of 5-HMdUrd and ThdGly, the positive ionization mode was found to be the most sensitive. The transitions used for the detection of the different DNA lesions, together with their limit of quantification, are listed in Table 1. In addition, a UV detector system was used to quantify normal nucleosides and results are given as the number of modifications per million nucleosides.

Table 1: Mass spectrometry features and detection threshold of studied DNA lesions

Bases, ribonucleosides and 2'-deoxyribonucleosides	Molecular weight (amu)	Ionization	Transitions studied	Quantification limit (fmol)
ThyGly	276	negative	275→116	80
5-HMdUrd	258	negative	257→124	80
8-oxodGuo	283	positive	284→168	20
8-oxoGuo	299	positive	300→168	17
8-oxoGua	150	positive	151→112	400
8-oxodAdo	267	positive	268→152	100
5-ClcCyd	261	positive	262→146	5
8-ClcGuo	301	positive	302→186	25
8-ClcAdo	285	positive	286→170	2
5-ClcCyd	277	positive	278→146	5
8-ClcGuo	317	positive	318→186	15
8-ClcAdo	301	positive	302→170	2
εdGuo	291	positive	292→176	3
εdAdo	275	positive	276→160	2,5
M ₁ dGuo	303	positive	304→188	30
HNE-dGuo	423	positive	424→308	12

4. DETERMINATION OF THE LEVEL OF DNA LESIONS IN LEUKOCYTES OF DIABETIC PATIENTS AND IN HEALTHY VOLUNTEERS

4.1 PATHOLOGY OF DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus is a group of metabolic disorders with one common manifestation: hyperglycemia. Chronic hyperglycemia causes damage to the eyes, kidneys, nerves, heart and blood vessels. The etiology and physiopathology leading to hyperglycemia, however, are markedly different among patients suffering from diabetes mellitus, dictating different prevention strategies, diagnostic screening methods and treatments. Diabetes mellitus that is characterized by absolute insulin deficiency and acute onset, usually before 25 years of age, should be referred to as type 1 diabetes mellitus. This type is characterized by beta cell destruction in pancreas caused by an autoimmune process, usually leading to absolute insulin deficiency. Types 2 diabetes mellitus is characterized by insulin resistance in peripheral tissue and an insulin secretory defect of the beta cell. This is the most common form of diabetes mellitus and is highly associated with a family history of diabetes, older age, obesity and lack of exercise. In this case, insulin resistance and hyperinsulinemia eventually lead to impaired glucose tolerance.

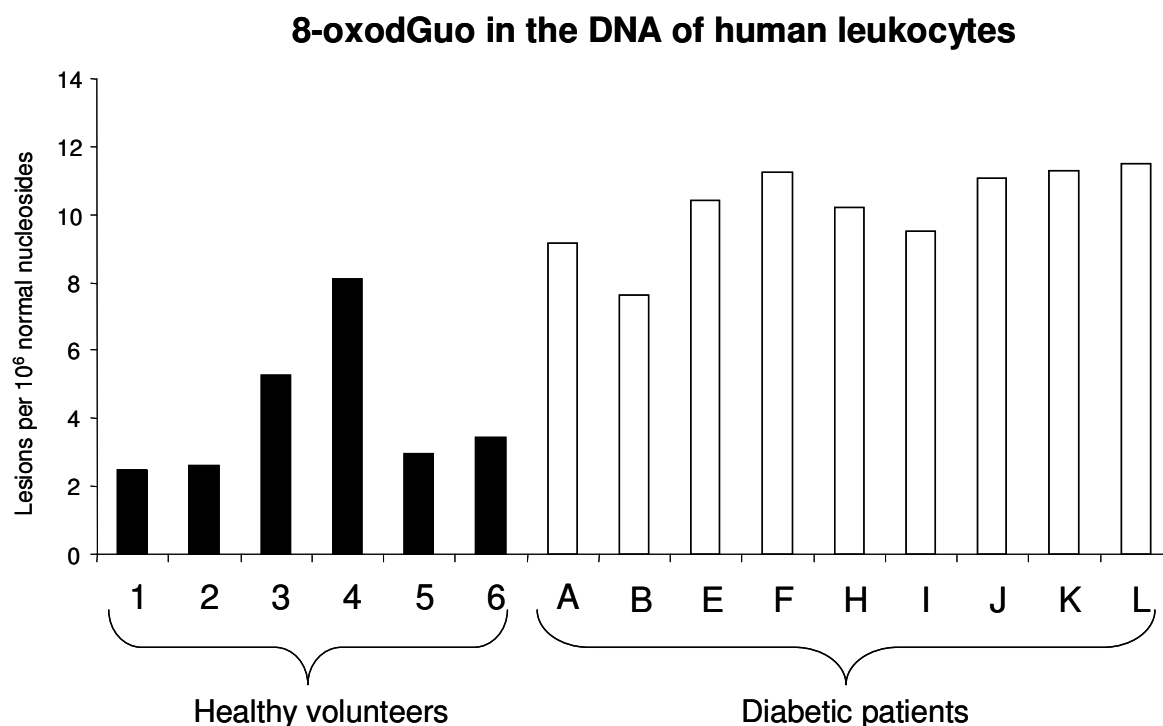
Evidence has been found that diabetes is associated with oxidative stress and inflammation [17-20]. By using an animal model, it has been demonstrated that induction of experimental

diabetes by streptozotocin results in an increase in oxidation of liver and kidney DNA, that was reduced by treatment of rats with insulin [21]. Therefore, in order to evaluate the reliability of the different DNA lesions as biomarkers of oxidative stress and/or inflammation, attempts were made to measure the level of the selected DNA damage in diabetic patients, and to compare these levels with those determined in healthy volunteers.

4.2 OXIDIZED DNA LESIONS

Using the HPLC-MS/MS approach, we were able to determine the level of 8-oxodGuo in the DNA of healthy volunteers (n= 6) and diabetic patients (n=12; type 1 and 2); the results are presented in Figure 2. Unfortunately, the sensitivity of the assay, and/or the amount of extracted DNA from 7 ml of blood, was not sufficient enough to enable the determination of ThdGly, 5-HMdUrd and 8-oxodAdo. In addition, the cellular background level of the later mentioned DNA lesions seems to be significantly lower than that of 8-oxodGuo. The measured levels of 8-oxodGuo in human healthy volunteers range from 2 to 8 8-oxodGuo per million nucleosides. Interestingly, the level measured in diabetic patients appears to be significantly higher with values ranging from 9 to 12 8-oxodGuo per million nucleosides.

Figure 2: 8-OxodGuo measured in DNA of human leukocytes extracted from healthy volunteers (dark columns) and diabetic patients (open columns)

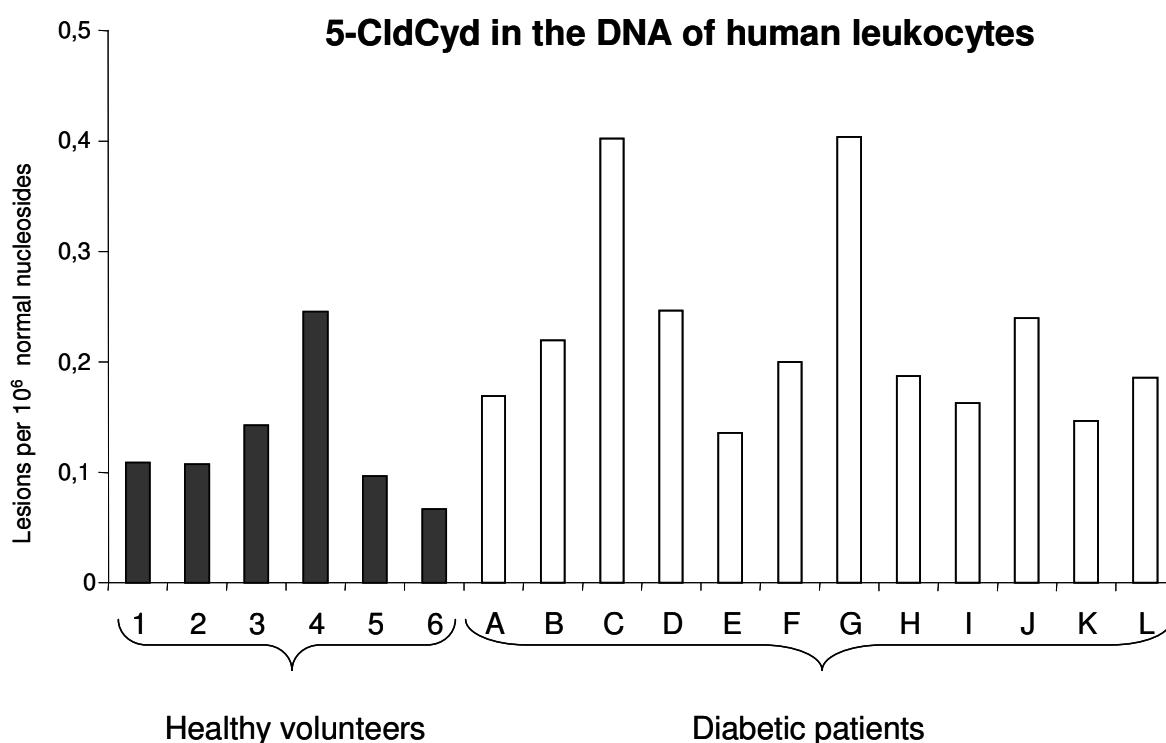


4.3 CHLORINATED DNA LESIONS

Interestingly, the sensitivity of the HPLC-MS/MS method allowed us to measure the background level of 5-CldCyd in the DNA of human healthy volunteers. The level of 8-CldGuo and 8-CldAdo was not high enough to permit an accurate quantification of these lesions. According to the assessed limit of sensitivity of our assay (Table 1), it could be

estimated that the level of 8-Cl dGuo is at the best lower than 0.2 lesions per million nucleosides, whereas the level of 8-Cl dAdo is around 0.05 lesions per million nucleosides in the DNA of human leukocytes. In human healthy volunteers, the level of 5-Cl dCyd (Figure 3) was determined to be around 0.15 lesions per million nucleosides and interestingly, the amounts determined in diabetic patients seem to be higher, however further analyses have to be performed in order to confirm this trend.

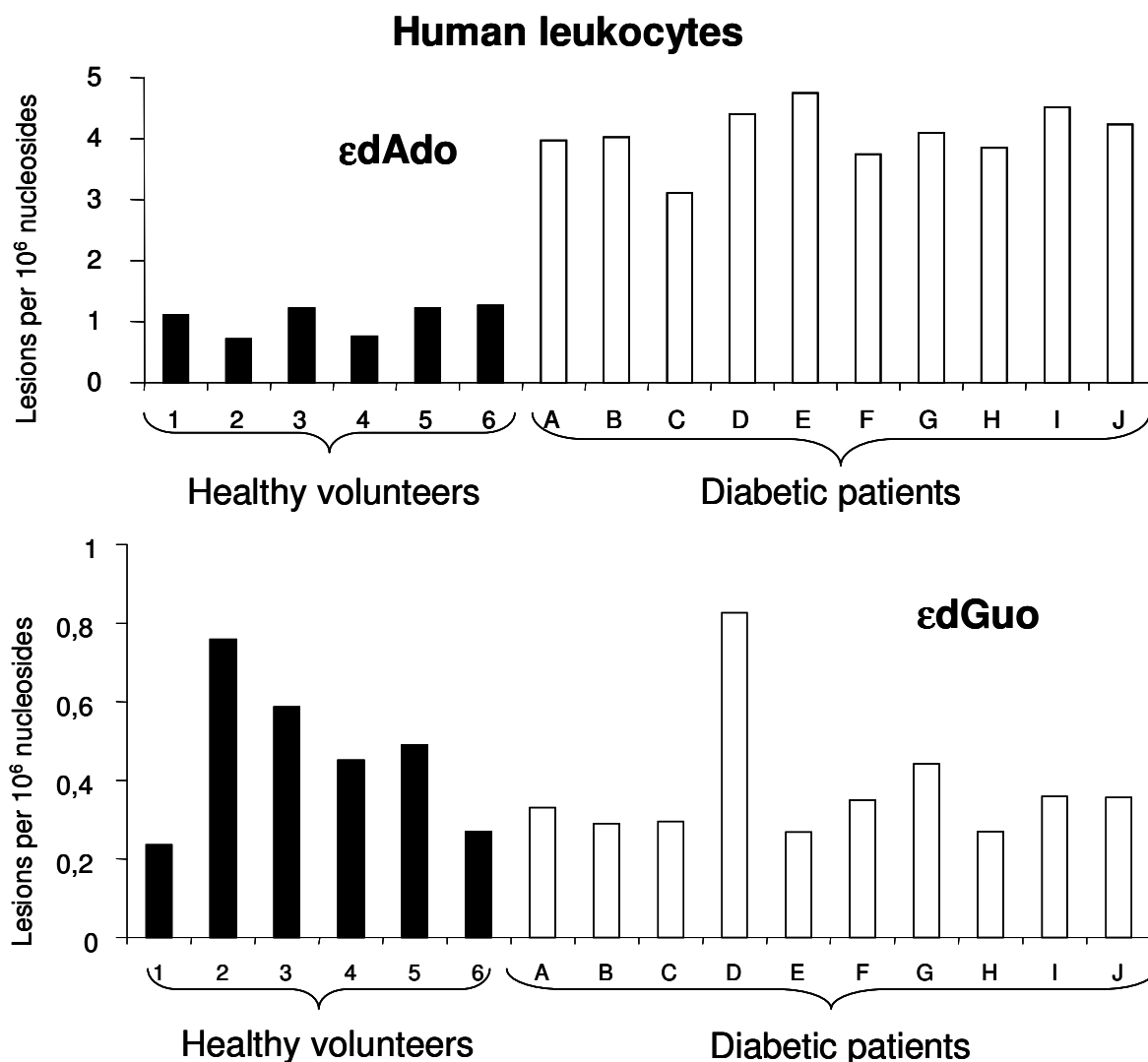
Figure 3: 5-Cl dCyd measured in DNA of human leukocytes extracted from healthy volunteers (dark columns) and diabetic patients (open columns)



4.4 DNA LESIONS ARISING FROM INITIAL LIPID PEROXIDATION

Finally, attempts were made to determine the level of DNA adducts arising from the addition to amino bases of reactive aldehydes generated from the decomposition of lipid peroxides. Therefore, ϵ dAdo and ϵ dGuo were measured in DNA extracted both from human healthy volunteers and diabetic patients (Figure 4). Work is in progress to assess the levels of M₁dGuo and HNE-dGuo adducts, two other relevant reactive aldehyde adducts to DNA. The background level of ϵ dGuo was shown to be around 0.5 lesions per million nucleosides in both diabetic patients and the control group (Figure 4). In contrast, the level of ϵ dAdo, estimated to be 0.8 lesions per million nucleosides in healthy volunteers, was found to be about 5 folds higher in the DNA of diabetic patients (Figure 4).

Figure 4: Ethenonucleosides (ϵ dAdo and ϵ dGuo) measured in DNA of human leukocytes extracted from healthy volunteers (dark columns) and diabetic patients (open columns)



5. DISCUSSION

During the last two decades, major efforts have been devoted to the search of reliable biomarkers of oxidative stress [5]. In this respect, most of the works have focused on the measurement of 8-oxodGuo, using different analytical approaches. Several recent studies have highlighted the difficulties of measuring oxidative DNA nucleosides, mainly 8-oxodGuo, due to possible spurious oxidation of DNA during the work-up preceding the measurement [22]. This may significantly lead to an overestimation of the cellular level of 8-oxodGuo. However, most of the difficulties have been now identified and the European network ESCODD has recommended an appropriate strategy to overcome most of the drawbacks [23]. For example, an optimized protocol for DNA extraction is now available, allowing the measurement of a background level as low as 0.5 8-oxodGuo per million nucleosides in a human leukocyte cell line. In the present work, the measured level of 8-oxodGuo in isolated human leukocytes was found to be 2 lesions per million nucleosides. Therefore, it could not be totally excluded that this relatively high level may be due to adventitious DNA oxidation during the work-up. Whereas, a small increase in the level of

8-oxodGuo was observed in diabetic patients compared to control, and it could not be excluded that the high amounts may occult observation of larger differences.

Another approach that may be applied to overcome the problem of artefactual oxidation of DNA is to measure lesions that could not be, at least, significantly generated during the work-up, such as chlorinated DNA lesions or DNA adducts formed by reactive aldehydes arising from lipid peroxydation. In addition, the simultaneous detection of several DNA biomarkers is particular relevant since it could provide insight into the origin of oxidative stress. Such a work was facilitated by the high sensitivity and versatility of the HPLC-MS/MS assay that allowed us to detect several DNA modifications. Thus, the method was sensitive enough to enable the quantification of 5-CldCyd in the DNA of human leukocytes. The background level was shown to be around 0.15 lesions per million nucleosides and a small increase was observed in diabetic patients compared to control. A more significant increase was observed for ϵ dAdo, whereas, in the mean time, no detectable variation was noted for ϵ dGuo. This preliminary work highlights the importance of the simultaneous determination of several DNA lesions that seems to indicate that some of the DNA lesions could be efficiently used as *in vivo* biomarkers of oxidative stress and/or inflammation. In addition, the use of DNA lesions other than 8-oxodGuo may, at least, indirectly circumvent the problem of artefactual DNA oxidation during the work-up.

In addition, a HPLC-MS/MS assay has been developed to measure RNA lesions. Preliminary results (not shown) have revealed that RNA is about 20 times more susceptible to oxidation than DNA in cells treated with hydrogen peroxide. This could be explained, at least, partly by the predominant cytoplasmic localization of RNA and by the fact that RNA is mostly single-stranded compared to the highly condensed double-stranded nuclear DNA. Taken into consideration that RNA is not or, at the best, partly repaired, the measurement of RNA lesions could represent relevant biomarkers of oxidative stress, even if the turnover of the RNA molecule is rapid.

The measurement of DNA lesions in human urine offers interesting analytical possibilities. Since this biological fluid does not contain high amounts of normal bases, the risk of artefactual generation of lesions during the work-up is, at the best, very low. Isotope dilution mass spectrometry represents probably the best method to obtain an accurate quantification of the different DNA lesions. However, the biological validation of such a measurement still remains a highly debated matter. Could an increase in oxidative DNA bases in human urine be directly correlated to an increased oxidative stress in the body? More works have to be done to answer this question and our objective to compare the determined levels of DNA lesions in human urine and in leukocytes would certainly give interesting information. However, an increase in the sensitivity of the assays is necessary to measure other lesions than overwhelming 8-oxoGua and related nucleosides.

It may be concluded that in the case of diabetes mellitus, we have observed a significant increase of ϵ dAdo together with a similar trend, although of lower amplitude, for 8-oxodGuo and 5-CldCyd in the DNA of leukocytes. Therefore, it is reasonable to propose these lesions as good biomarkers of oxidative stress and inflammation processes. However, these preliminary results must be confirmed by additional analyses in both volunteers and diabetic patients. In addition, attempts will be made to search for a possible relationship between the type of diabetes mellitus (type 1 and 2) and the level of the different DNA and RNA lesions measured in the leukocytes and also in urine.

ABBREVIATIONS

DNA: Deoxyribonucleic Acid
RNA: Ribonucleic Acid
ROS: Reactive Oxygen Species
HOCl: hypochlorite
ThdGly: Thymidine glycols or 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine
5-HmdUrd: 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine
8-oxodGuo: 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
8-oxoGua: 8-oxo-7,8-dihydroguanine
8-oxoGuo: 8-oxo-7,8-dihydroguanosine
8-oxodAdo: 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyadenosine
5-ClIdCyd: 5-chloro-2'-deoxycytidine
8-ClIdGuo: 8-chloro-2'-deoxyguanosine
8-ClIdAdo: 8-chloro-2'-deoxyadenosine
5-ClCyd: 5-chlorocytidine
8-ClGuo: 8-chloroguanosine
8-ClAdo: 8-chloroadenosine
edGuo: 1,N²-etheno-2'-deoxyguanosine
edAdo: 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine
HNE-dGuo: 1,N²-propano-2'-deoxyguanosine
M₁dGuo: 3-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)pyrimido[1,2α]purin-10(3H)one
amu: atomic mass unit
HPLC-MS/MS: High Performance Liquid Chromatography-electrospray ionization tandem Mass Spectrometry
ESCODD: European Standards Committee on Oxidative DNA Damage

REFERENCES

1. Ames, B.N. and Gold, L.S. (1991) Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat. Res.*, **250**, 3-16.
2. Cadet, J., Berger, M., Douki, T. and Ravanat, J.-L. (1997) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **31**, 1-87.
3. Henderson, J.P.B., J.;Heinecke, J.W. (1999) Molecular chlorine generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system of phagocytes produces 5-chlorocytosine in bacterial RNA. *The Journal of Biological chemistry*, **27**, 33440-33448.
4. Griffiths, H.R., Moller, L., Bartosz, G., Bast, A., Bertoni-Freddari, C., Collins, A., Cooke, M., Coolen, S., Haenen, G., Hoberg, A.M., Loft, S., Lunec, J., Olinski, R., Parry, J., Pompella, A., Poulsen, H., Verhagen, H. and Astley, S.B. (2002) Biomarkers. *Mol Aspects Med*, **23**, 101-208.
5. Guetens, G., De Boeck, G., Highley, M., van Oosterom, A.T. and de Bruijn, E.A. (2002) Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **39**, 331-457.
6. Masuda, M., Suzuki, T., Friesen, M.D., Ravanat, J.-L., Cadet, J., Pignatelli, B., Nishino, H. and Ohshima, H. (2001) Chlorination of guanosine and other nucleosides by hypochlorous acid and myeloperoxidase of activated human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, **276**, 40486-40496.
7. Douki, T., Odin, F., Caillat, S., Favier, A. and Cadet, J. (2004) Predominance of the 1,N²-propano 2'-deoxyguanosine adduct among 4-hydroxy-2-nonenal-induced DNA lesions. *Free Radic Biol Med*, **37**, 62-70.
8. Shigenaga, M.K. and Ames, B.N. (1991) Assays for 8-hydroxy-2-deoxyguanosine: A biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Rad. Biol. Med.*, **10**, 211-216.
9. Loft, S., Fischer-Nielsen, A., Jeding, I.B., Vistisen, K. and Poulsen, H.E. (1995) 8-Hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage. *J. Toxicol. Environ. Health*, **40**, 391-404.
10. Gackowski, D., Rozalski, R., Roszkowski, K., Jawien, A., Foksinski, M. and Olinski, R. (2001) 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine levels in human urine do not depend on diet. *Free Radic Res*, **35**, 825-832.
11. Park, E.M., Shigenaga, M.K., Degan, P.D., Korn, T.S., Kitzler, J.W., Wehr, C.M., Kolachana, P. and Ames, B.N. (1992) Assay of excised oxidative DNA lesions : isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3375-3379.

12. Weimann, A., Belling, D. and Poulsen, H.E. (2001) Measurement of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxo-2'-deoxyadenosine in DNA and human urine by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Free Radic Biol Med*, **30**, 757-764.
13. 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.
14. 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 Biomed Sci Appl*, **715**, 349-356.
15. Frelon, S., Douki, T., Ravanat, J.-L., Pouget, J.P., Tornabene, C. and Cadet, J. (2000) High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. *Chem Res Toxicol*, **13**, 1002-1010.
16. Hua, Y., Wainhaus, S.B., Yang, Y., Shen, L., Xiong, Y., Xu, X., Zhang, F., Bolton, J.L. and van Breemen, R.B. (2001) Comparison of negative and positive ion electrospray tandem mass spectrometry for the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of oxidized deoxynucleosides. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **12**, 80-87.
17. Collins, A.R., Raslova, K., Somorovska, M., Petrovska, H., Ondrusova, A., Vohnout, B., Fabry, R. and Dusinska, M. (1998) DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic Biol Med*, **25**, 373-377.
18. Rehman, A., Nourooz-Zadeh, J., Moller, W., Tritschler, H., Pereira, P. and Halliwell, B. (1999) Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett*, **448**, 120-122.
19. Pitozzi, V., Giovannelli, L., Bardini, G., Rotella, C.M. and Dolara, P. (2003) Oxidative DNA damage in peripheral blood cells in type 2 diabetes mellitus: higher vulnerability of polymorphonuclear leukocytes. *Mutat Res*, **529**, 129-133.
20. Faure, P. (2003) Protective effects of antioxidant micronutrients (vitamin E, zinc and selenium) in type 2 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med*, **41**, 995-8.
21. Ramon, O., Wong, H.K., Joyeux, M., Riondel, J., Halimi, S., Ravanat, J.-L., Favier, A., Cadet, J. and Faure, P. (2001) 2'-deoxyguanosine oxidation is associated with decrease in the DNA- binding activity of the transcription factor Sp1 in liver and kidney from diabetic and insulin-resistant rats. *Free Rad. Biol. Med.*, **30**, 107-118.
22. Cadet, J., Douki, T. and Ravanat, J.-L. (1997) Artifacts associated with the measurement of oxidized DNA bases. *Environ. Health Perspect.*, **105**, 1033-1039.
23. Gedik, C.M. and Collins, A. (2005) Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *Faseb J.* **19** 81-84.

Les lésions des acides nucléiques: détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation.

L'ADN ou l'ARN, détenteurs de l'information génétique, peuvent subir des dommages dus aux acteurs du stress oxydant ou de l'inflammation. La cellule a développé des mécanismes de réparation de ces dommages, mais certaines lésions peuvent persister et devenir mutagènes. Dans ce but, nous nous sommes intéressés au dosage simultané de plusieurs de ces lésions à l'aide d'une technique de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en mode tandem, outil analytique rapide et fiable ayant une très grande sensibilité. Le but de ce travail était de trouver des biomarqueurs du stress oxydant ou de l'inflammation parmi les lésions connues de l'ADN et de les quantifier dans les milieux biologiques humains afin de compléter le panel existant de biomarqueurs protéiques ou lipidiques. Ainsi, trois groupes de lésions ont pu être quantifiés : les lésions oxydatives issues de l'action des espèces oxygénées activées, les lésions chlorées issues des phénomènes inflammatoires et les adduits de la peroxydation lipidique. Les étapes de mise au point analytique ayant été optimisées, elles ont été suivies d'une validation biologique parmi différentes pathologies étudiées et représentées par le diabète, certains cancers traités par radiothérapie et les hommes atteints d'infertilité masculine. Les différents résultats montrent une variation des taux des certaines lésions dans les leucocytes circulants ou des l'urine des patients par rapport aux sujets sains. Néanmoins, ces essais nécessitent d'être confirmés quant à l'utilisation des ces lésions en tant que biomarqueurs. D'autres types de pathologies devront également être testés.

Nucleic Acids lesions: Detection by HPLC-MS/MS in human biological fluids and interest as biomarkers of oxidative stress and inflammation.

Molecules involved in oxidative stress or inflammation can damage DNA or RNA, the biopolymers that contain the genetic information. The cell has developed several enzymatic systems to repair the damage but some of them can remain and lead to mutagenicity. Hence, we focused our attention on the simultaneous quantification of a few lesions using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, a very sensitive, fast and reliable analytical system. The aim of this work was to look for biomarkers of oxidative stress among the known DNA lesions by quantifying them in human biological fluids. For such a purpose, three types of DNA lesions were monitored: lesions due to oxidative stress, chlorinated lesions arising from inflammation processes and lesions generated subsequently to lipid peroxidation. As the analytical methods had been optimised, it was followed by the biological validation among different pathologies such as diabetes, patients suffered from cancer and treated by radiotherapy and men with infertility. Preliminary results obtained show different rates between patients and healthy controls. These results have to be confirmed in order to conclude as the use of these lesions as biomarkers. Other kinds of pathologies must be investigated using the same approach.