

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

Université de Sherbrooke

Produits d'oxydation de l'ADN : influence de la
Vitamine C et suroxydation de la cytosine

par

Johann Rivière

Département de médecine nucléaire et de radiobiologie

Thèse présentée à la faculté de médecine

En vue de l'obtention du grade de
philosophiae doctor (Ph.D.) en Radiobiologie

2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

ISBN: 0-494-05860-9

Our file *Notre référence*

ISBN: 0-494-05860-9

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

*« Mozart...avec un bon antibiotique...Il aurait pu facilement écrire quatre ou cinq
feuilles de plus... »*

Bertrand Blier

Table des matières

Chapitre I – Les dommages à l’ADN	2
1-1 – Généralités : Structure et fonction de l’ADN.....	2
1-2 – Dommages à l’ADN	5
1-2-1 – Phénomènes pouvant induire des dommages.....	5
1-2-2 – La réaction de Fenton.....	6
1-2-3 – Types de dommages à l’ADN	7
1-2-4 – Les produits d’oxydation de la cytosine	12
1-2-5 – Les produits de suroxydation de l’ADN	14
1-3 - Conséquences biologiques.....	14
1-3-1 – Formation de mutations dans le génome.....	15
1-3-2 – Apoptose et nécrose	16
1-3-3 – Réparation de l’ADN	17
1-3-3-1 - La réparation par excision de base (BER : Base Excision Repair) ..	18
1-3-3-2 - La réparation par excision de nucléotides (NER : Nucleotide Excision Repair).....	19
1-3-3-3 - Autres types de réparations	21
1-4 – Méthodes d’analyse des dommages à l’ADN	21
1-4-1 - Détection par GC-MS	22
1-4-2 - Détection par LC-MS-MS	23
1-4-3 – Méthodes enzymatiques.....	24
1-4-4 –Détection par HPLC-EC-UV	25
1-4-5 – Problèmes liés à l’extraction d’ADN.....	27
Chapitre II – Antioxydants et ADN : influence de la vitamine C	28

2-1 – Les antioxydants : Généralités	28
2-2 – La vitamine C	29
2-2-1 – Généralités.....	29
2-2-2 – Propriétés chimiques de la vitamine C.....	30
2-2-3 – Recyclage de l'ascorbate dans la cellule.....	33
2-2-4 – Transport de la vitamine C à travers les membranes.....	34
2-3 – La vitamine C possède-t-elle un effet antioxydant ou pro-oxydant <i>in vivo</i> ?	36
Hypothèses et objectifs	40
Chapitre III - Article n° 1 : Ascorbate and H₂O₂ induced oxidative DNA damage in Jurkat cells.....	41
Chapitre IV - Article n° 2 : Oxidation of 5-hydroxy-2'-deoxyuridine into isodialuric acid, dialuric acid and hydantoin products	70
Chapitre V - Article n°3 : Oxidation of 5-hydroxypyrimidine nucleosides to a mixture of four N¹-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-hydroxyhydantoin isomers.....	87
Chapitre VI - Conclusion générale.....	115
6-1 - Variation de la distribution des produits d'oxydation dans l'ADN et les conséquences sur la cellule.....	115
6-1-1 - L'effet de la vitamine C sur la formation des dommages dans l'ADN cellulaire	115
6-1-2 - Produits de suroxydation dans l'ADN.....	116
6-1-3 - Pouvoir mutagène des produits de suroxydation de l'ADN	117
6-2 - Problèmes liés à la mesure des produits d'oxydation de l'ADN	120
Références.....	124

Liste des illustrations

Figure 1-1 : Les quatre bases de l'ADN sur le squelette ribose-phosphate.....	3
Figure 1-2 : Photo-produits obtenus par irradiation à 254nm de deux pyrimidines adjacentes (cytosine-thymine) sur un brin d'ADN.....	8
Figure 1-3 : Sites d'attaque par les espèces réactives de l'oxygène sur les bases de l'ADN.....	9
Figure 1-4 : Produits d'oxydation formés majoritairement dans l'ADN par attaque de radicaux hydroxyles.....	10
Figure 1-5 : Lésion double 8oxodG-Formamide	11
Figure 1-6 : Mécanisme de formation des produits d'oxydation de la cytosine.....	13
Figure 1-7 : Transition et transversion dans le génome	16
Figure 1-8 : Réparation par excision de base.....	19
Figure 1-9 : Réparation par excision de nucléotide	20
Figure 1-10 : Principe du détecteur électrochimique	25
Figure 2-1 : Structure de l'acide ascorbique.....	31
Figure 2-2 : Equilibre acido-basique de l'acide ascorbique, influence sur son oxydation.....	32
Figure 2-3 : Recyclage enzymatique de la vitamine C dans la cellule.....	34
Figure 2-4 : Piégeage intracellulaire de l'ascorbate	35
Tableau 2-1 : Relation entre la dose de vitamine C absorbée et les concentrations du plasma et intracellulaire chez des patients humains en bonne santé.....	36
Figure 3-1 : HPLC-UV/EC analysis of 5OHdCyd.....	51
Tableau 3-1 : Levels of oxidative DNA damage in Jurkat cells.....	52
Figure 3-2 : Incorporation of DHA into cells in culture.....	54
Figure 3-3 : Induction of DNA damage by H ₂ O ₂	56
Figure 3-4 : Effect of iron and desferroxamine	58

Figure 3-5 : DNA repair of 5OHdCyd	60
Figure 4-1 : Proposed Mechanism of Oxidation of 5OHdUrd	73
Figure 4-2 : HPLC analysis of 5OHdUrd oxidation products	74
Figure 4-3 : ¹ H-NMR of product 2b in DMSO-d ₆	82
Figure 4-4 : ¹ H-NMR of product 3a in DMSO-d ₆	83
Figure 4-5 : ¹³ C-NMR of product 2b.....	84
Figure 4-6 : HMBC of product 2b	85
Schema 5-1 : Mechanism of oxidation of 5-hydroxy-2'-deoxyuridine and 5-hydroxy-2'- deoxycytidine	98
Figure 5-1 : HPLC profile of 5-hydroxy-2'-uridine and 5-hydroxy-2'-deoxycytidine oxidation products.....	99
Figure 5-2 : Interconversion of hydantoin products.....	102
Figure 5-3 : ¹ H-NMR 600 MHz spectrum of N1-(2-deoxy-β-D- <i>erythro</i> -pentofuranosyl)-5- hydroxy-imidazolidine-2,5-dione (4OHisodHyd) in D ₂ O	103
Tableau 5-1a : Chemical shifts of ¹ H NMR of 5-hydroxyhydantoin products	104
Tableau 5-1b : Proton coupling constants of 5-hydroxyhydantoin products	104
Schema 5-2 : Reduction of 5-OHdHyd and 4OHisodHyd to imidazolidine products	104
Schema 5-3 : Isomerization of 5-hydroxyhydantoin products (5a,5b,6a,6b)	107
Figure 5-4 : Kinetics of decomposition of hydantoin products	109
Tableau 5-2 : Kinetics of decomposition and isomerization of 5-hydroxyhydantoin products as a function of pH.....	110

Liste des abréviations

- **2-ODD** : 2-oxoacid-dependent dioxygenase
- **4-OHisodHyd** : 1-(2'-désoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-4-hydroxy-isohydantoïne
- **5OHdC** : 5-hydroxycytosine
- **5OHdCyd** : 5-hydroxy-2'-désoxycytidine
- **5OHdHyd** : 1-(2'-désoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-hydroxyhydantoïne
- **5OHdU** : 5-hydroxyuracile
- **5OHdUrd** : 5-hydroxy-2'-désoxyuridine
- **8oxodA** : 7,8-dihydro-8-oxo-adénine
- **8oxodG** : 7,8-dihydro-8-oxoguanine
- **8oxodGuo** : 2' désoxy- 7,8-dihydro-8-oxoguanosine
- **ADN** : Acide 2'-désoxyribonucléique
- **AP** : apurinique ou apyrimidique
- **ARN** : Acide ribonucléique
- **ATP** : Adénosine tri-phosphate
- **BER** : base excision repair (réparation par excision de base)
- **Br₂** : Brome
- **Cu⁺** : Ion cuivreux
- **Cu²⁺** : Ion cuivrique
- **dCyd glycol** : glycols de cytidine
- **dCyd** : 2'-désoxycytidine
- **DEPT** : Distortionless enhancement by polarization transfer
- **DHA** : Déhydroascorbate
- **dU** : 2'-désoxyuracile
- **dUrd glycol** : glycols de 2'-désoxyuridine
- **EC** : Electrochimie
- **Endo III** : endonucléase III
- **Endo VIII** : endonucléase VIII
- **ERO** : Espèces réactives de l'oxygène
- **FapyA** : 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine d'adénine
- **Fapy-dGuo** : N⁶-(2-désoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine
- **FapyG** : 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine de guanine
- **FdU** : formyl-uracile
- **Fe²⁺** : Ion ferreux
- **Fe³⁺** : Ion ferrique
- **FeSO₄** : Sulfate de fer
- **Fpg** : Fapy Glycosylase
- **GC-MS** : Gaz chromatography - Mass spectrometry (chromatographie gazeuse couplé à un spectromètre de masse)
- **H₂O₂** : Peroxyde d'hydrogène
- **HETCOR** : Heteronuclear correlation (correlation hétéronucléaire)
- **HMBC** : Heteronuclear multiple bound correlation (correlation hétéronucléaire entre plusieurs liaisons)
- **HmdU** : hydroxyméthyl-uracile
- **HPLC** : High performance liquid chromatography (chromatographie liquide à haute performance)

- **KMnO₄** : Permanganate de potassium
- **LC-MS-MS** : Liquid chromatography – Mass spectrometry in tandem (chromatographie liquide couplé à un spectromètre de masse en tandem)
- **Na₂IrBr₆** : Hexabromure d'iridium disodique
- **NaBH₄** : Borohydrure de sodium
- **NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide
- **NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- **NaI** : Iodure de sodium
- **NBA** : nuclei buffer solution (tampon d'extraction de noyaux des cellules)
- **NER** : Nucléotide excision repair (réparation par excision de nucléotides)
- **NMR** : Nuclear magnetic resonance (RMN : resonance magnétique nucléaire)
- **O₂** : Dioxygène
- **O₂⁻** : anion superoxyde
- **ODS-A** : Octadécyl-syllil column (colonne HPLC à phase inverse)
- **PBS** : Phosphate buffer saline (tampon phosphate physiologique)
- **SHA** : Semi-déhydroascorbate
- **SOD** : Superoxyde dismutase
- **UV (A, B, C)** : ultra-violets (de type A, B ou C)

Résumé

Les travaux effectués lors de ce doctorat ont porté principalement sur la formation des dommages d'oxydation de la cytosine. Celle-ci a été étudiée par deux approches distinctes :

Tout d'abord, la formation de dommages d'oxydation à l'ADN en milieu cellulaire en présence d'une concentration élevée en vitamine C en condition de stress (H_2O_2) a été abordée. Nous avons ainsi observé un effet pro-oxydant de la vitamine C résultant en une amplification de la formation des dommages dans l'ADN tel que la 5-hydroxy-2'-désoxycytidine (5OHdCyd) et la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8oxodGuo). Un changement du ratio de la formation de ces produits en faveur de la 5OHdCyd par rapport à celui obtenu par une réaction de Fenton in vitro a par ailleurs été mis en évidence.

L'autre partie de ces travaux a porté sur la suroxydation de produits déjà oxydés de la 2'-désoxycytidine. En effet, ces derniers tel que la 5-hydroxy-2'-désoxyuridine (5OHdUrd) et la 5OHdCyd, ayant des potentiels d'oxydation très faibles, peuvent être sujets à une deuxième oxydation aboutissant à la formation d'autres produits. Nous avons ainsi mis en évidence sur des nucléosides une nouvelle voie de formation de dommages en solution aqueuse aérée impliquant les dérivés nucléosidiques de l'acide isodialurique, l'acide dialurique et la 5-hydroxyhydantoïne (5OHdHyd). Nous avons également caractérisé une nouvelle lésion, le dérivé nucléosidique de la 4-hydroxy-isohydantoïne (4-OHisodHyd), issue d'un réarrangement cétolique de la 5-OHdHyd.

L'effet de hautes concentrations en vitamine C en condition de stress et cette suroxydation des bases de l'ADN sont importants car ils peuvent modifier la distribution des produits d'oxydation dans l'ADN cellulaire et jouer un rôle au niveau de la mutagénèse ou de la toxicité, ce qui peut entraîner de lourdes conséquences pour la cellule.

Introduction

Chapitre I – Les dommages à l'ADN

1-1 – Généralités : Structure et fonction de l'ADN

L'ADN est un long polymère constitué de motifs appelés désoxyribonucléotides. Il existe quatre différents désoxyribonucléotides chacun se distinguant par la nature de sa base en position 1' (**fig 1-1**). Chaque 2'-désoxyribose est lié à un autre par un pont phosphodiester de 5' à 3' pour former le poly-nucléotide.

Les quatre bases de l'ADN sont regroupées en deux familles : les bases puriques qui sont formées de deux hétérocycles adjacents et qui ont pour nom l'adénine et la guanine, et les bases pyrimidiques qui sont formées d'un seul hétérocycle. Elles ont pour nom la cytosine et thymine.

La molécule d'ADN s'associe base par base par des liaisons hydrogènes à un autre brin d'ADN complémentaire de façon antiparallèle pour former une structure en double hélice comme l'ont décrits Watson et Crick (1954). Ainsi, la thymine se lie à l'adénine et la guanine à la cytosine pour former un double brin.

La composition en base de l'ADN dans le génome varie selon les espèces. Chez les procaryotes, le pourcentage de la paire adenine-thymine est compris entre 25 et 75 % de la totalité des bases. Chez les mammifères, la variation est seulement de 45 à 53 % (Devlin, 1997). Chez l'humain, la longueur de l'ADN nucléaire est d'environ $3 \cdot 10^9$ paires de base.

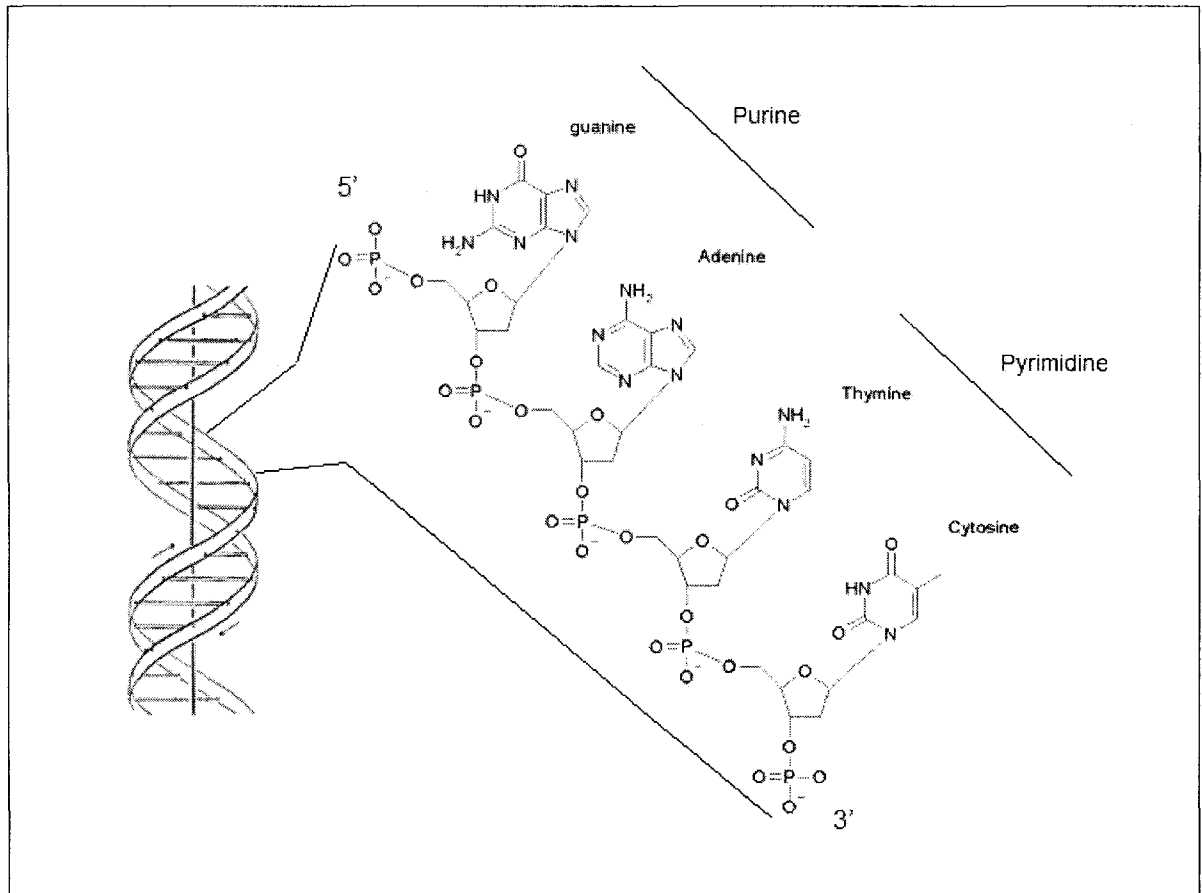


Fig 1-1 : Les quatre bases de l'ADN sur le squelette ribose-phosphate

L'ensemble de l'information génétique d'une cellule est contenue dans son ADN. Chez l'humain, on dénombre environ 30000 gènes dans la totalité de son génome (Devlin, 1997). C'est la séquence des bases contenues sur le double brin, qui lors de la transcription, sert de matrice à la formation d'un autre poly-nucléotide : l'ARN messager. Ce dernier va alors servir à la formation de protéines lors d'un autre processus appelé la traduction. L'ARN messager possède une structure primaire proche de celle de l'ADN, à la différence qu'il possède un groupement hydroxyle en position 2' de ses riboses, qu'il est sous forme simple brin et que la thymine est remplacée par une autre base pyrimidique : l'uracile.

La structure double-brin permet à chaque brin d'ADN de servir de matrice pour la synthèse d'un nouveau brin lors de la réplication, de la même manière que cela se produit pour la transcription. Ce système permet de conserver l'intégrité du génome lors de la division cellulaire.

L'ADN nucléaire des cellules eucaryotes est associé avec de nombreuses protéines appelés histones pour former la chromatine, une structure amorphe et désorganisée à l'intérieur du noyau. Mais juste avant la division cellulaire (mitose), la chromatine s'arrange en structures compactes appelées chromosomes (au nombre de 23 paires chez l'humain). Ceux-ci étant nécessaires à cause de la longueur très importante de l'ADN. L'association de l'ADN avec les histones s'effectue pour former un nucléosome autour duquel l'ADN va s'enrouler. Des sur-enroulements vont par la suite se produire par l'association des nucléosomes entre eux pour former une structure très compacte : les nucléofilaments.

Il existe également une autre forme d'ADN dans les cellules eucaryotes : l'ADN mitochondrial. Il est également double brin, mais de forme circulaire et de longueur bien plus petite (environ 16500 paires de base). Sa structure est plus proche de celle de l'ADN des procaryotes. La séquence de l'ADN mitochondrial humain contient seulement 37 gènes qui codent pour des protéines nécessaires à la formation d'ATP dans les mitochondries ou pour des ARN de transfert et des ARN ribosomiaux (Devlin, 1997).

1-2 – Dommages à l'ADN

1-2-1 – Phénomènes pouvant induire des dommages

L'ADN est une molécule très sensible à divers agents qui peuvent lui infliger des dommages. Ainsi, l'intégrité du code génétique est continuellement remise en cause par la génération d'erreurs liées à la réplication de l'ADN, mais aussi par de nombreux processus d'origine exogène ou endogène.

Parmi les phénomènes endogènes, on notera l'instabilité de la liaison N-glycosidique des nucléosides comme les dépurinations par exemple ou les désaminations spontanées de l'adénine ou la cytosine. L'action d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites dans les mitochondries au cours du métabolisme énergétique cellulaire comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) crée également des dommages. D'autres phénomènes produisent également ces ERO, c'est le cas du système immunitaire ou de la voie de synthèse des prostaglandines par exemple (Devlin, 1997).

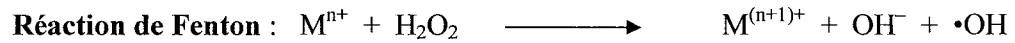
Les modifications d'origine exogène sont en revanche principalement causées par les rayonnements ultraviolets par effet direct (UV-B, UV-C) ou en présence de photosensibilisateurs (UV-A), également par de nombreux agents chimiques comme l'ozone, l'acide nitrique (HNO_2) et divers agents alkylants (ex : diméthyl sulfate), ainsi que par les rayonnements ionisants comme des photons de haute énergie (rayons X, γ) ou par d'autres particules énergétiques telles que les ions lourds, les électrons (faible ou haute énergie), les protons, les neutrons ou encore les particules α . Ces rayonnements ionisants interviennent soit par effet direct sur la molécule d'ADN ou par effet indirect comme c'est le cas par

l'intermédiaire de la radiolyse de l'eau. Dans ce cas là, le solvant est ionisé et forme des espèces potentiellement dangereuses pour les molécules de la cellule comme les radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$) ou du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Certaines espèces comme $\text{O}_2^{\bullet-}$ ou H_2O_2 sont quasiment inerte face à l'ADN. Mais leur transformation dans la cellule peut être responsable de forts dommages. En effet, l'anion superoxyde peut causer des dommages par le biais d'une réaction mettant en jeu de l'oxyde nitrique (NO^\bullet) pour former des peroxy-nitrites (Marnett et al, 2000 ; Cadet et al, 1999), ou en réduisant des radicaux hydroperoxydes de thymine ou des métaux de transition. Il peut également libérer du Fe^{3+} de la ferritine ou du Fe^{2+} des clusters Fer-soufre (Linn, 1998) ou se dismuter, spontanément ou par réaction enzymatique mettant en jeu la superoxyde-dismutase (SOD) et former H_2O_2 . Ce dernier est également peut réactif face à l'ADN et ne provoque directement qu'une N-oxydation de l'adénine. Mais il peut être converti en radicaux hydroxyles hautement réactifs par l'intermédiaire d'une réaction de Fenton. (Cadet et al, 1999)

1-2-2 – La réaction de Fenton

Il s'agit d'une réaction mettant en jeu H_2O_2 avec un métal de transition réduit (Linn, 1998). La réaction fonctionne avec Fe^{2+} ou Cu^+ et dans une moindre mesure (et seulement in vitro) avec des métaux comme du titane (Ti III) ou du cobalt (Co II) (Frelon et al, 2003 ; Halliwell et al, 1985). Les produits de la réaction sont le métal oxydé (ex : Fe^{3+} ou Cu^{2+}), l'ion OH^- et le radical hydroxyle $\bullet\text{OH}$.



Il faut cependant noter que dans la cellule, le cuivre n'est pas détectable (Rae et al, 1999), tandis que le fer l'est à un faible niveau (Epsztejn et al, 1997). De plus une étude a montré que le fer intracellulaire, mais pas le cuivre jouait un rôle important dans les dommages à l'ADN induit par du peroxyde d'hydrogène (Barbouti et al, 2001).

Les radicaux hydroxyles produits lors de ces réactions sont des espèces extrêmement réactives : $k = 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour l'arrachement d'un hydrogène sur de l'isopropanol et $k > 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour son addition sur une double liaison (Breen et Murphy, 1995).

1-2-3 – Types de dommages à l'ADN

Il existe de nombreux types de dommages que peut subir l'ADN selon la nature des divers agents vu précédemment.

Les rayonnements UV-B et C (250 à 320 nm) vont par exemple surtout former des photo-produits tels que les dimères de pyrimidine (cyclo-butane ou 6-4 pyrimidine-pyrimidone) par photo-addition ou des produits comme la 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8oxodG) et des hydrates de cytosine par photo-excitation de la guanine et de la cytosine, respectivement (Cadet et al, 1997a).

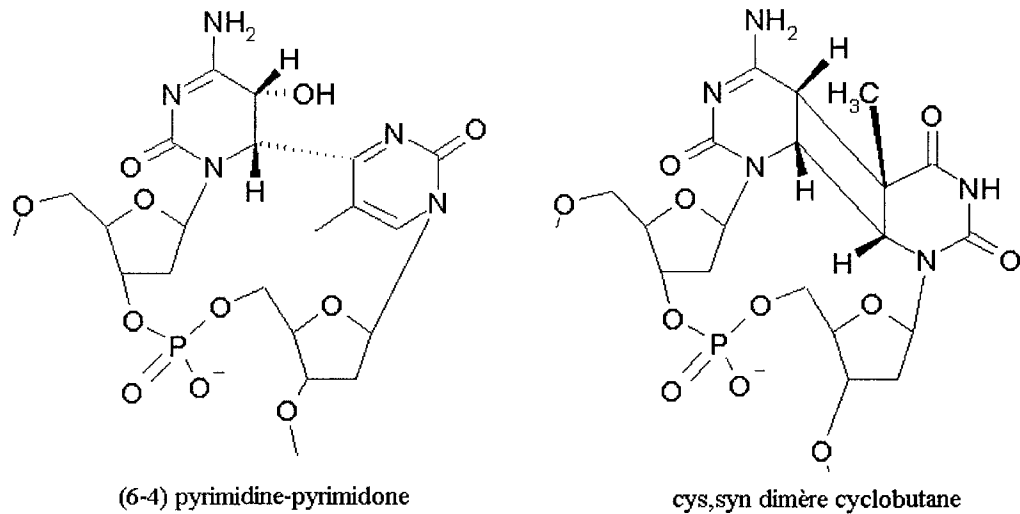


Fig 1-2 : photo-produits obtenus par irradiation à 254nm de deux pyrimidines adjacentes (cytosine-thymine) sur un brin d'ADN

Les rayonnements UV-A (320 à 400nm) par l'intermédiaire de photosensibilisateurs vont oxyder les bases par un processus dit de type I en leur arrachant un électron. Ou bien par un processus de type II, générer de l'oxygène singulet, une espèce non radicalaire capable de réagir avec l'ADN et former ainsi de la 8oxodG en attaquant uniquement la guanine (Ravanat et al, 1995). Il peut également y avoir transfert de charge entre le photo-sensibilisateur et l'oxygène moléculaire qui aboutit à la formation d'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et donc indirectement de radicaux hydroxyles qui vont oxyder des bases ou provoquer des cassures de brin.

Les rayonnements ionisants vont principalement générer par effet indirect des cassures simples ou doubles, mais peuvent également ioniser les bases. Le type de dommages obtenu dans ce cas là dépend alors de l'environnement du brin d'ADN, c'est à dire s'il est en milieu aqueux ou non et s'il se trouve dans un environnement aérobie ou non (Von Sonntag, 1987 ;

Von Sonntag, 1991). Considérant l'aspect biologique de l'étude, seuls les produits obtenus en milieu aqueux aéré seront considérés par la suite.

Dans la cellule où l'eau solvate l'ADN, il se produit donc un effet indirect dû aux molécules d'eau étant à proximité du brin : il y a production de radicaux hydroxyles par radiolyse de l'eau. Ceux-ci vont alors réagir avec l'ADN seulement s'ils sont très proches de ce dernier à cause de sa forte réactivité et attaquer soit au niveau du sucre ou bien sur les bases à certains sites spécifiques (**Fig 1-3**). Les produits formés sont à peu près similaires à ceux obtenus par réaction de Fenton qui génèrent également des radicaux hydroxyles (Frelon et al, 2002).

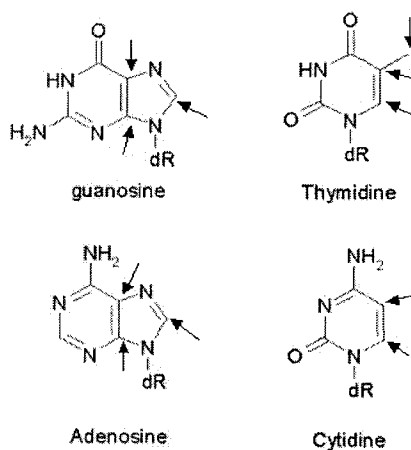


Fig 1-3 : Sites d'attaque par les espèces réactives de l'oxygène sur les bases de l'ADN

Mais plus généralement, les produits formés majoritairement sont la 8oxodG ou le 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine de guanine (FapyG) lorsque le substrat est la

guanine ; les glycols de thymine, l'hydroxyméthyl-uracile (HmdU) ou le formyl-uracile (FdU) pour la thymine ; la 5-hydroxy-cytosine (5OHdC), les glycols d'uracile et le 5-hydroxy-uracile (5OHdU) pour la cytosine ou la 7,8-dihydro-8-oxo-adénine (8oxodA) ou le 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine d'adénine (FapyA) en ce qui concerne l'adénine. Au total, on dénombre plus de soixante-dix dommages aux bases de l'ADN (Cadet et al, 2002). Certains sont très utilisés comme marqueur de l'oxydation de l'ADN : c'est le cas de la 8oxodG.

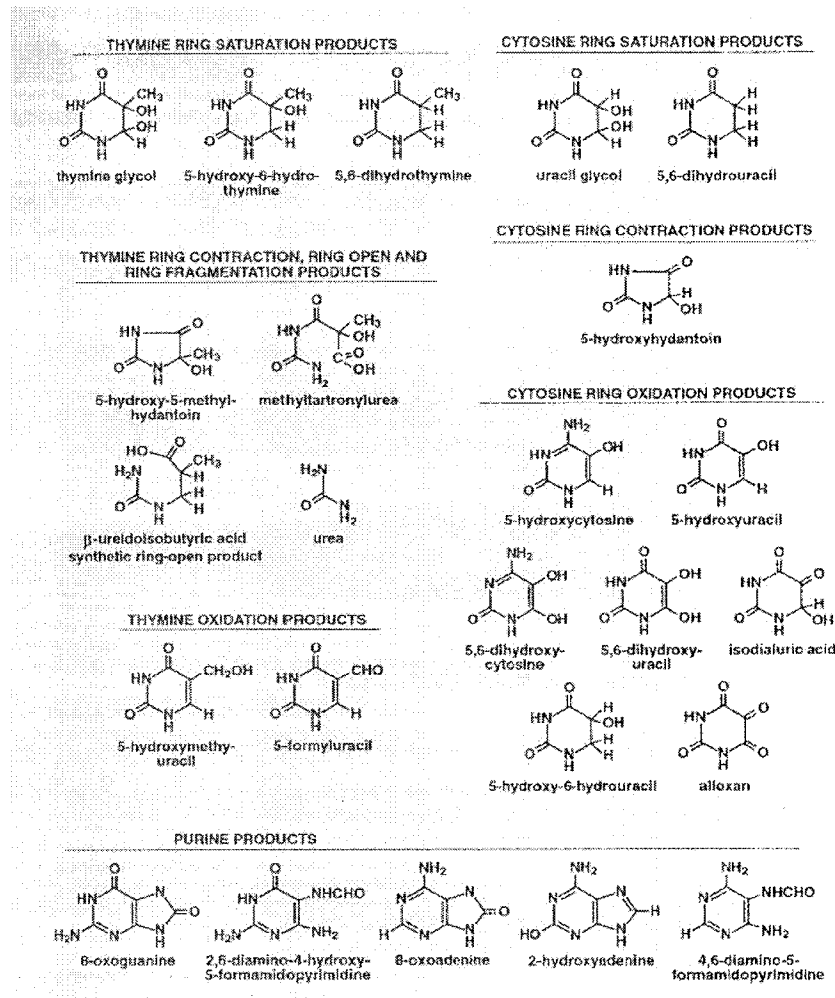


Fig 1-4 : Produits d'oxydation formés majoritairement dans l'ADN par attaque de radicaux hydroxyles (source : Wallace, 1998)

D'autres types de dommages doivent être pris en considération, comme les lésions doubles. Ce sont deux bases adjacentes qui vont subir des dommages par le biais d'un seul événement. C'est le cas pour ce qui concerne la formation de 8oxodG-formamide qui est provoqué uniquement par l'attaque d'un seul radical hydroxyle sur une guanine adjacente à une thymine (Douki et al, 2002 ; Box et al, 2001).

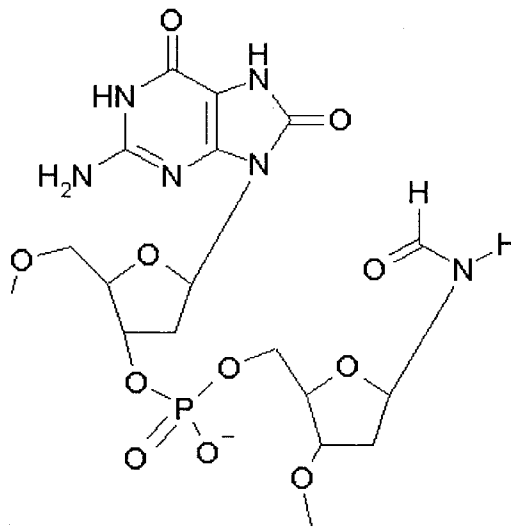


Fig 1-5 : Lésion double 8oxodG-Formamide

Il existe aussi des pontages entre deux bases. Ceux-ci ont lieu sur un même brin, mais possiblement entre deux brins différents (Box et al, 2001).

Enfin, plusieurs autres types de dommages ont été caractérisés, comme des adduits protéines-ADN (Cadet et al, 2002) ou d'autres type d'adduits comme les éthenobases issus d'une réaction avec des métabolites oxydés du chlorure de vinyle, par exemple, ou par un processus endogène lié à la peroxydation des lipides (Marnett et al, 2000 ; Gros et al, 2003). C'est aussi le cas pour la formation d'adduits sur la cytosine, l'adenosine et la guanine à partir

de malondialdéhyde (MDA), un produit carbonyle issue de la peroxydation des lipides (Marnett, 2002).

1-2-4 – Les produits d'oxydation de la cytosine

Comme toutes les pyrimidines, la cytosine est facilement oxydable (Wagner et al, 1999). Lors de ces travaux, nous nous sommes intéressés spécialement à ses produits d'oxydation dont un bon nombre ont déjà été caractérisés. 17 produits stables ont d'ailleurs été identifiés après la modification de la 2'-désoxycytidine (dCyd) par irradiation γ et par photosensibilisation avec de la ménadione en solution aqueuse aérée (Wagner et al, 1999). Les produits majoritaires dans l'ADN semblent cependant être les glycols de cytidine (dCyd glycol), mais ceux-ci par leur instabilité se décomposent en 5-hydroxy-2'-désoxycytidine (5OHdCyd) et en glycol de 2'-désoxyuridine (dUrd glycol) par déshydratation et désamination respectivement (Tremblay et al, 1999). La 5-hydroxy-2'-désoxyuridine (5OHdUrd), bien qu'étant formée en moindre quantité est également un produit important et semble reliée au mécanisme de formation de ces produits (**fig 1-6**). Toutefois, des expériences récentes n'ont montré aucune formation de celle-ci par déshydratation des glycols d'uridine lorsque ceux-ci sont incubés à 37°C (Tremblay, 2004).

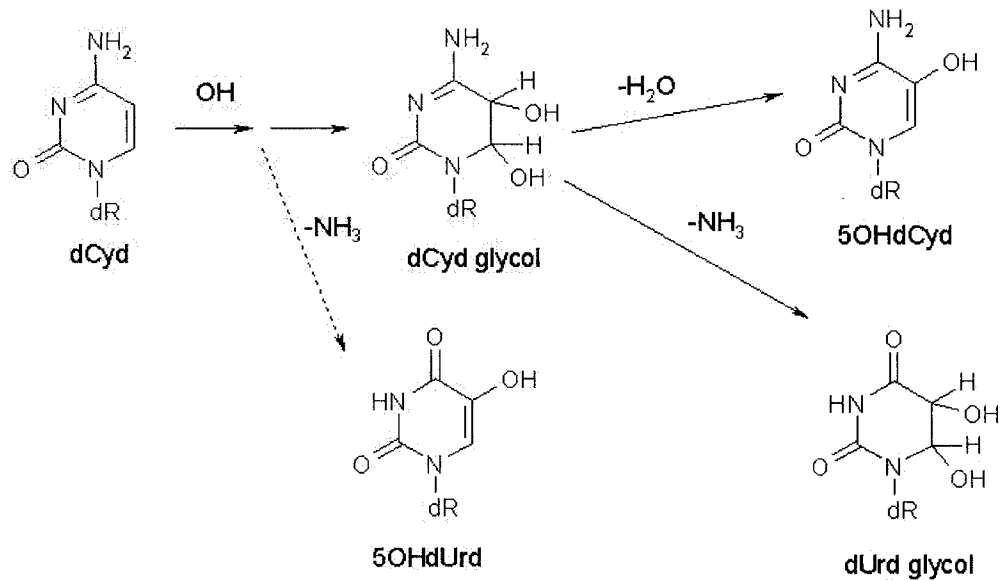


Fig 1-6 : Mécanisme de formation des produits d'oxydation de la cytosine

Ces produits d'oxydation sont importants car ils sont formés dans l'ADN (Wagner et al, 1992) : la 5OHdCyd y a d'ailleurs été mesurée à des niveaux comparables à ceux de la 8oxodGuo qui est un des produits majoritaires (Lenton et al, 1999 ; Wagner et al, 1992); la 5OHdUrd, ainsi que les glycols d'uridine sont par contre moins présents. De plus, même si la 5OHdCyd est relativement peu mutagène (0,05%), les deux autres lésions le sont fortement en s'appariant préférentiellement à une adenine provoquant des transition C vers T (Kreutzer et Essigman, 1998). La faible présence de la 5OHdUrd et des glycols d'uridine dans l'ADN de cellules semble en fait être causée par une réparation importante de ces lésions là. La 5OHdCyd par contre, peut-être grâce à son caractère moins mutagène, semble être moins réparée ce qui lui permet d'être détectée à des niveaux relativement élevés dans les cellules (voir article 1).

1-2-5 – Les produits de suroxydation de l'ADN

La guanine est la base de l'ADN étant la plus sensible à l'oxydation car elle possède le plus faible potentiel d'oxydation (Steenken et al, 1997). Mais un de ses produits d'oxydation, la 8oxodG, est également capable de subir à son tour une oxydation à cause de son potentiel encore plus faible (Ravanat et al, 2003 ; Duarte et al, 2000, Cadet et al, 2003). Ainsi, plusieurs nucléosides modifiés comme la 2,2-diamino-5-[(2-deoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)amino]-5(2*H*)-oxazolone ou le nucléoside du spiroiminohydantoïne ont été identifiés comme étant des produits de suroxydation de la 8oxodGuo par un mécanisme d'oxydation à un électron à l'aide d'un photosensibilisateur (riboflavine) en solution aqueuse aérée. L'acide oxalorique a également été observé comme étant le produit majoritaire de l'oxydation par l'oxygène singulet de la 8oxodG dans l'ADN (Duarte et al, 2000).

Tout comme la guanine, l'oxydation de la cytosine génère des produits ayant un faible potentiel comme par exemple la 5OHdC ou la 5OHdU. Le potentiel de la 5OHdC est d'ailleurs plus faible que celui de la 8oxodG. En outre, l'oxydation par du KMnO₄ de la 5OHdUrd a déjà été mise en évidence (Fujimoto et al, 1997). Il est donc légitime de penser que ces produits là peuvent également subir une oxydation secondaire pour donner de nouvelles modifications.

1-3 - Conséquences biologiques

Les dommages sur l'ADN peuvent avoir de lourdes conséquences pour la cellule (Bjelland et Seeberg, 2003). En effet, ils peuvent être la cause de mutations qui pourraient aboutir à la formation de cancer, ou encore bloquer la réplication et aboutir à la mort cellulaire

par apoptose ou par nécrose. Cela dit, des systèmes de réparation existent dans la cellule pour veiller à garder l'intégrité du génome (Wallace, 2002).

1-3-1 – Formation de mutations dans le génome

Le changement de la structure d'une base peut avoir pour conséquence un mauvais appariement avec la base complémentaire et provoquer une mutation lors de la réplication qui va suivre. Par exemple, une cytosine qui va être oxydée peut se décomposer en 5OHdU ou en glycol de dU et alors s'apparier à une adénine dans 80% des cas (Kreutzer et Essigman, 1998 ; Wang et al, 1998), lors de la synthèse du nouveau brin. Pendant la réplication suivante, l'adénine va alors être appariée avec une thymine. Au final, on a donc une thymine qui remplace une cytosine : cela s'appelle une transition (**fig 1-7**).

De la même manière, une guanine oxydée peut aboutir à la présence de 8oxodG qui va avoir tendance à s'apparier à une adénine (Purmal et al, 1994 ; Wang et al, 1998 ; Kamiya et al, 2004). Lors de la réplication qui va suivre, le brin d'ADN va alors posséder la paire T-A en lieu et place de G-C : c'est une transversion (**fig 1-7**).

Des délétions peuvent être également provoquées par la désamination de bases ou d'autres modifications qui vont empêcher celles-ci de s'apparier correctement avec une autre. Également, certains agents comme des intercalants à l'ADN peuvent être la cause d'insertion de base dans le brin d'ADN. Ces deux derniers phénomènes vont provoquer un « frameshift », il s'agit du type de mutation ayant l'effet le plus radical car il décale la lecture d'une base lors de la traduction et peut modifier l'ensemble de la protéine ainsi produite. Alors que lors d'une

substitution de base comme les transitions et les transversions, seul un acide aminé va être touché dans la majorité des cas.

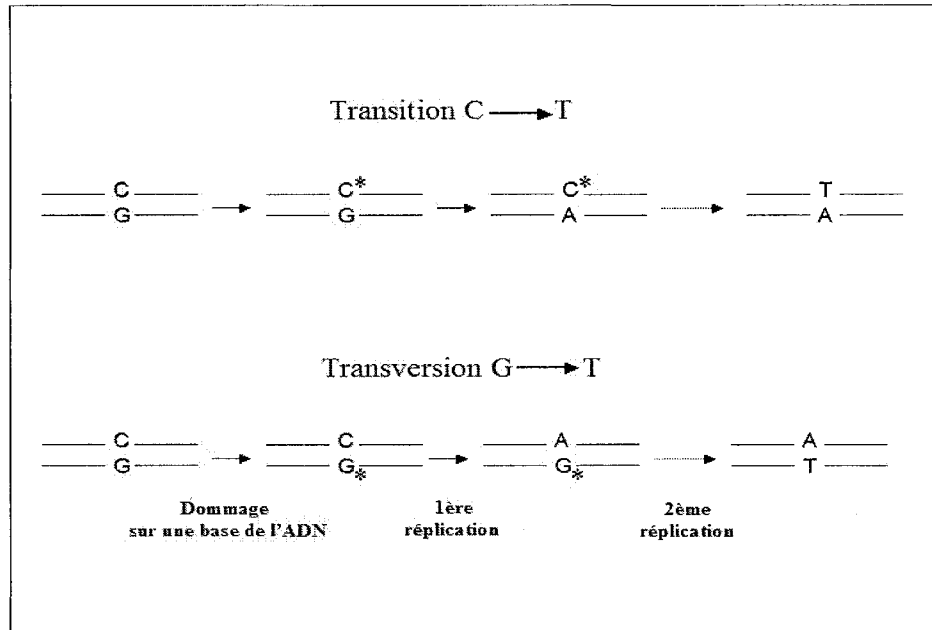


Fig 1-7 : Transition et transversion dans le génome

1-3-2 – Apoptose et nécrose

Lorsqu'une cellule subit des dommages, en particulier sur son ADN, cela peut provoquer sa mort. Si les dommages subit sont très élevés la cellule risque de mourir par nécrose. Elle va alors lyser et perdre ses composants, ce qui aboutit à une inflammation dans le tissus. Le phénomène de nécrose est dangereux pour un organisme parcequ'il provoque une inflammation pouvant endommager les cellules voisines.

Dans le cas où les dommages subis sont trop élevés pour être réparés mais pas suffisamment pour que la cellule subisse une nécrose, elle peut alors rentrer en apoptose.

L'apoptose est une mort programmée de la cellule : il va y avoir un arrêt du cycle cellulaire, déclenchement d'une cascade de protéase (caspases), fragmentation de protéines et de l'ADN à des endroits spécifiques et formation de corps apoptotiques qui vont être phagocytés par les cellules avoisinantes ou des macrophages. Ce processus semble déclencher à partir du gène supresseur de tumeur P53 qui est exprimé en cas de dommages à l'ADN. Si l'expression de P53 dure trop longtemps, la cellule entre alors en apoptose.

L'apoptose présente un avantage par rapport à la nécrose car elle évite la présence d'une inflammation et donc des dommages aux cellules voisines.

1-3-3 – Réparation de l'ADN

L'ADN est la seule macromolécule qui soit réparée plutôt que dégradée. Le système est relativement efficace puisque l'estimation du taux de mutations est d'une paire de base par 10^9 de paires de base pour chaque cellule saine dans une génération, alors que l'ADN subit continuellement des attaques de divers agents mentionnés précédemment. On arrive donc à un équilibre entre la formation de dommages et la réparation de ceux-ci. Cet équilibre est directement lié au taux de mutations dans la cellule (Collins, 1999).

Il existe différentes voies de réparation de l'ADN et ces systèmes sont conservés des bactéries aux humains avec plusieurs enzymes homologues (Wallace, 1998 ; Ide et Kotera, 2004).

1-3-3-1 - La réparation par excision de base (BER : Base Excision Repair)

Ce système élimine les bases modifiées de l'ADN (**fig 1-8**). Dans un premier temps, une glycosylase va venir hydrolyser le lien N-glycosidique entre la base et le ribose pour former un site abasique. Celui-ci est ensuite repéré par une AP endonucléase (AP pour apurinique ou apyrimidique) qui va couper le squelette ribose-phosphate au niveau du phosphodiester. L'action de la polymérase I et d'une ligase vont enfin venir restaurer le brin endommagé.

Les glycosylases peuvent être classées en deux familles distinctes : La « super famille » Nth incluant l'endonucléase III (Endo III) qui a pour substrat les pyrimidines oxydées ; Ogg qui incise les 8oxodG appariées avec une cytosine ; Mut Y qui enlève les adénines appariées au 8oxoG et AlkA qui a pour substrat les bases alkylées (Wallace et al, 2003).

La seconde famille est la Fpg/Nei qui inclue Fpg (MutM) qui comme Ogg reconnaît les 8oxodG, mais aussi les formamidopyrimidines, ainsi que l'endonucléase VIII (Nei) qui a des substrats assez équivalents à Endo III (Wallace et al, 2003).

Il est important de noter que les glycosylases possèdent souvent une autre activité comme celle AP endonucléase (ex : Fpg et Endo III) ou lyase (Endo III, Endo VIII).

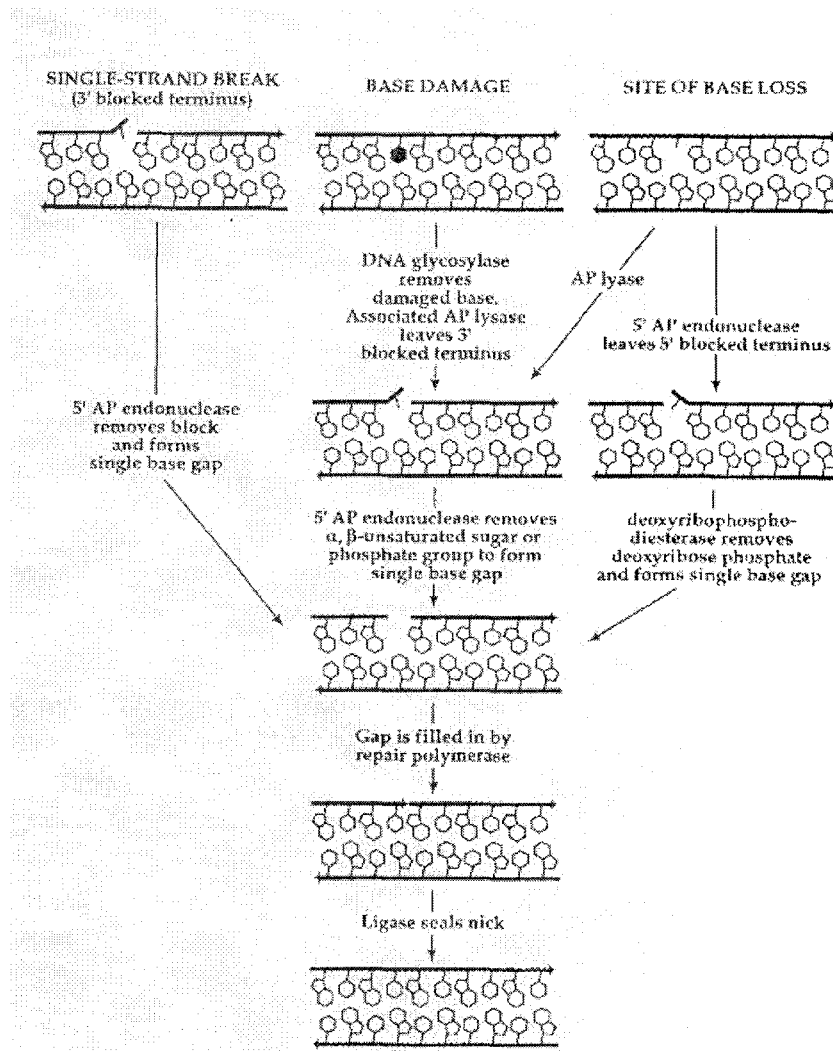


Fig 1-8 : Réparation par excision de base (source : Wallace, 1998)

1-3-3-2 - La réparation par excision de nucléotides (NER : Nucleotide Excision Repair) :

Ce type de réparation est impliqué quand le dommage produit une liaison modifiant la topographie du brin d'ADN. C'est le cas par exemple pour les dimères de pyrimidines produits par les rayonnements UV, ou encore les adduits cis-platine-guanine formés par chimiothérapie.

La réparation est amorcée par la reconnaissance de la distorsion de l'ADN par un système d'endonucléase (Sancar, 1996). Un complexe se forme sur le double brin d'ADN et va l'inciser des deux côtés de la lésions, puis enlever le fragment simple brin possédant le dommage par le biais d'une hélicase. La réparation est ensuite complétée par une polymérase I qui va re-synthétiser un nouveau brin et une ligase va compléter le processus refaisant un lien phosphodiester (fig 1-9).

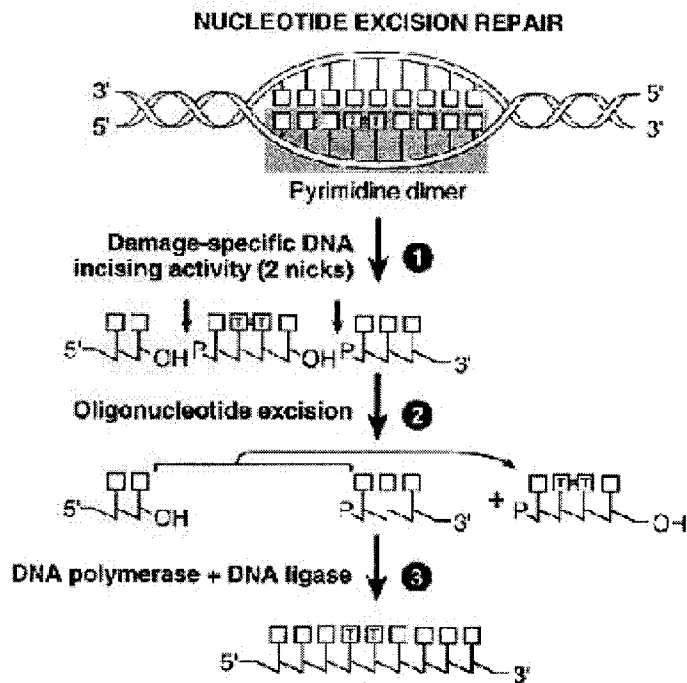


Fig 1-9 : Réparation par excision de nucléotide (source :

<http://cmgm.stanford.edu/wusage8.0/usage/weeklv/2003/01/19/referrersbydocument.html>)

1-3-3-3 - Autres types de réparations

Il existe d'autres modes de réparation de l'ADN. Par exemple, la réparation par inversion de dommages. Elle consiste à rendre chimiquement sa forme initiale à une base qui aurait subis des dommages. C'est le cas des photolyases : des enzymes présentes chez les végétaux qui vont éliminer des photo-produits comme les dimères de pyrimidine en catalysant le mécanisme inverse qui les ont produits (Todo et al, 1999).

La réparation des mésappariements (lorsqu'une boucle de bases non appariées se forme entre les deux brins) va utiliser la méthylation pour savoir quel est le brin parental, et une exonucléase va alors enlever toutes les bases jusqu'à celui-ci (Cooper et al, 1993).

La recombinaison sert aussi de mode de réparation pour l'ADN, notamment pour les cassures doubles brins et les adduits protéines-ADN en transférant le brin qui a sa matrice correspondante touchée par l'autre brin (Shinohara et Ogawa, 1995 ; Jackson et Jeggo, 1995).

Enfin, certains dommages sont réparés par un système dit post-répliatif. Le dommage va être repéré lors de la réplication qui va être bloquée au site endommagé et reprise un peu plus loin. L'espace ainsi laissé est ensuite réparé par recombinaison.

1-4 – Méthodes d'analyse des dommages à l'ADN

Au cours des dernières années, plusieurs méthodes de détection des dommages ont été développées. Mais on note des variations importantes dans les résultats obtenus selon la technique utilisée. C'est également le cas, dans une moindre mesure, au sein d'une même

méthode : en effet, plusieurs laboratoires utilisant les mêmes techniques de détection ont obtenu des résultats différents lors d'analyses d'échantillons identiques (Collins et al, 2004). Les différentes façons de quantifier les dommages à l'ADN reste donc encore aujourd'hui plutôt approximative et doivent encore être améliorées.

Voici les techniques les plus fréquemment utilisées :

1-4-1 - Détection par GC-MS

La technique du GC-MS est une chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Elle permet de séparer des produits en phase gazeuse, puis de connaître leur masse, ce qui peut être très utile pour les identifier. Elle a été très utile pour l'identification des produits d'oxydation de l'ADN formés par les radiations ionisantes ou par d'autres sources d'espèces réactives de l'oxygène (Dizdaroglu, 1991). Elle fût également très utile pour connaître la spécificité des glycosylases impliquées dans la réparation par excision de base (BER ; voir 1-3-3) en utilisant comme substrat de l'ADN hautement endommagé (Dizdaroglu, 2003). Cependant, cette technique semble peu fiable lorsqu'il s'agit de détecter de faibles niveaux de dommages dans l'ADN, notamment en ce qui concerne la 8-oxodGuo. Il semble, en effet, que la quantité de dommage mesurée ainsi soit surestimée : cela est dû à l'hydrolyse acide des bases ainsi qu'à l'étape de dérivation de celles-ci avec des groupements silyles effectuée à haute température avant l'analyse. Cette étape, nécessaire à rendre volatile les produits à mesurer provoquerait une auto-oxydation des bases non modifiées (Cadet et al, 1998 ; Cadet et al, 1997b). Afin d'éviter cet artéfact et baisser les niveaux de dommages, il est nécessaire de faire une pré-purification par HPLC afin d'enlever du milieu ces bases non endommagées (Ravanat et al, 1995).

1-4-2 - Détection par LC-MS-MS

Cette technique met en jeu un système chromatographique (Chromatographie liquide à haute performance : HPLC) servant à séparer les produits à analyser, couplé à un spectromètre de masse pouvant donner la masse du produit à analyser, ainsi que la masse des « ions fils » obtenus par fragmentation de ce dernier. A la sortie de la colonne HPLC, les produits sont ionisés par « electrospray » en appliquant un fort champs électrique à pression ambiante sur une solution traversant un capillaire tout en imposant un flux d'azote visant à créer un « spray ». Ils seront alors fragmentés dans le spectromètre de masse. La fragmentation des produits est ainsi bien spécifique et permet de les caractériser aisément.

L'avantage de cette technique réside dans le fait que contrairement au GC-MS, il n'y a pas de dérivation des bases de l'ADN à faire avant l'analyse et il est possible d'analyser les nucléosides obtenus après digestion enzymatique, ce qui évite certains problèmes d'auto-oxydation rencontrés avec celui-ci. Il est donc également inutile de procéder à une pré-purification par HPLC (Frelon et al, 2000). Il est aussi possible de détecter des quantités de près de 10 fmoles, ce qui permet de l'utiliser lors de détection de faibles niveaux de dommages (Collins et al, 2004). De plus, l'ionisation par « electrospray » étant une méthode douce, celle-ci va alors permettre de détecter des produits pas nécessairement fragmentés.

1-4-3 – Méthodes enzymatiques

Plus récemment une méthode différente et non chromatographique a été mise au point pour analyser les dommages à l'ADN. Il s'agit d'une méthode utilisant une endonucléase impliquée dans la réparation et qui va détecter le dommage. Selon l'enzyme utilisé, on va pouvoir détecter un certain type de dommage. Par exemple, la formamido-pyrimidine DNA glycosylase (Fpg) va reconnaître la 8oxodG ainsi que les formamido-pyrimidines. Lorsque l'endonucléase repère le dommage, la base va être excisée et va laisser un site abasique qui sera converti en une cassure par une AP lyase. Les cassures peuvent alors être détectées de différentes manières :

Par la technique du « comet assay » avec laquelle des cellules vont être enlisées dans un gel d'agarose, puis lysées laissant l'ADN super-enroulé libre dans le gel. On effectue alors la digestion avec l'endonucléase et le gel est placé dans une solution alcaline et soumis à un champ électrique. L'amas d'ADN va alors prendre la forme d'une comète dont la longueur de la queue sera proportionnelle au nombre de cassures (Collins et al, 1997).

L'élution alcaline est une variante du « comet assay », les cellules sont lysées en amont d'un filtre micro-poreux, l'ADN digéré par l'endonucléase et élué par un tampon alcalin. Plus il y a de cassures dans l'ADN, plus les fragments seront petits et élués rapidement. La vitesse d'élution est alors proportionnelle au nombre de cassures (Epe et al, 1994).

Cette technique permet de mesurer de très bas niveaux de dommages dans l'ADN cellulaire. Cela dit, chaque endonucléase ayant plusieurs substrats, il existe alors un certain manque de spécificité. De plus, les niveaux observés sont bien inférieurs à ceux des autres

techniques, ce qui alimente une controverse à savoir si c'est parce qu'il n'y a pas d'auto-oxydation avec ce procédé, ou alors s'il y a une sous-estimation des dommages, les endonucléases pouvant très bien ne pas avoir accès à tous leurs substrats (Collins, 1999). Une étude a cependant montré des niveaux similaires entre la mesure effectuée par « comet assay » et celle par HPLC-EC (Pouget et al, 1999).

1-4-4 –Détection par HPLC-EC-UV

De la même manière que pour le LC-MS-MS, la chromatographie liquide à haute performance à détection par électrochimie et ultraviolet (HPLC-EC-UV) vise à séparer chaque nucléoside ou base de l'ADN, modifié ou non. La détection des produits se fait par un détecteur ultra-violet pour les bases ou les nucléosides non modifiés, et un autre détecteur électrochimique pour les produits d'oxydation. Ces produits d'oxydations pourraient très bien être détectés par le détecteur UV, mais il est alors nécessaire qu'ils soient présents en grande quantité dans l'ADN pour pouvoir sortir du bruit de fond. Par électrochimie, il est par contre possible d'avoir une sensibilité de quelques dizaines de femtomoles (Helbock et al, 1998).

L'avantage du détecteur électrochimique est, en plus de sa sensibilité, sa spécificité. En effet, le détecteur possède deux électrodes sur lesquelles on va établir un potentiel pour oxyder les produits à la sortie de la colonne d'HPLC (**fig 1-10**). La première électrode va oxyder toutes les molécules ayant un potentiel d'oxydation inférieur à celui de l'électrode. La seconde va avoir un potentiel d'oxydation plus élevé que la première et va en plus servir de détecteur. Ainsi, seules les molécules ayant un potentiel d'oxydation situé entre ceux des deux électrodes vont être détectées. Les molécules ayant un potentiel supérieur à celui de la seconde électrode

vont traverser le détecteur sans être analysées. On sélectionne ainsi, par son potentiel, la molécule voulue.

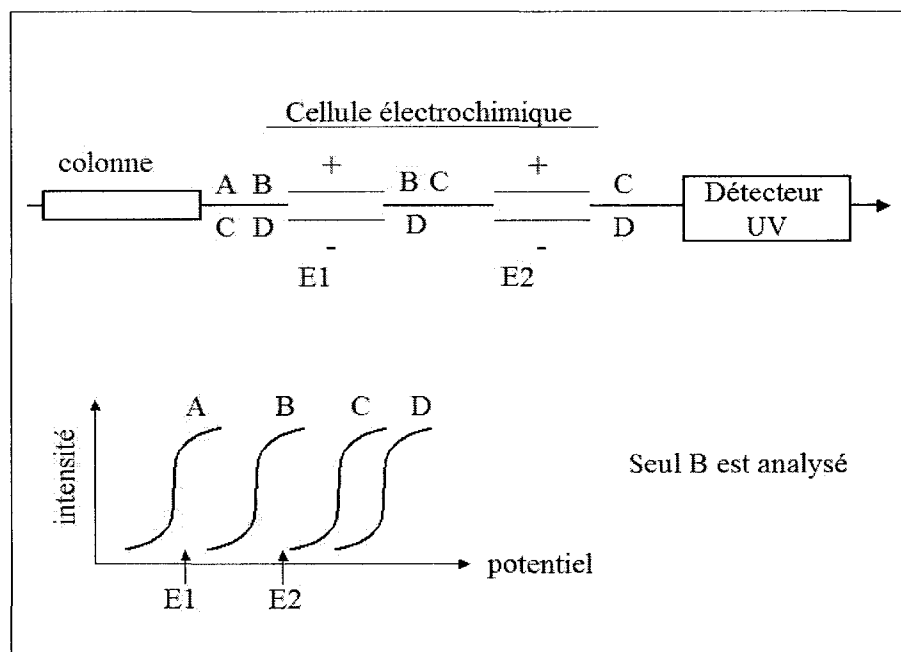


Fig 1-10 : Principe du détecteur électrochimique

Un des points faibles de cette technique est cependant lié à la sélectivité : on ne peut pas détecter un grand nombre de molécules en même temps puisqu'on établit une « fenêtre » comprise entre les deux potentiels des électrodes. Toutes les molécules ayant un potentiel d'oxydation sortant de cette « fenêtre » ne seront pas détectées. De plus, toutes les molécules n'ont pas la même intensité dans leur réponse. C'est pour cela que seuls quelques-uns des dommages d'oxydation à l'ADN peuvent être analysés de cette façon (5OHdCyd, 5OHdUrd, 8oxodGuo pour les principaux).

1-4-5 – Problèmes liés à l'extraction d'ADN

Durant la préparation des échantillons à partir de cellules pour l'analyse par HPLC-EC-UV ou par LC-MS-MS, plusieurs étapes sont susceptibles de produire une oxydation artificielle des bases et donc de fausser les résultats en les surestimant (Hofer et Möller, 2002). C'est le cas lors des digestions enzymatiques pour l'hydrolyse de l'ARN, des protéines et de l'ADN où il est nécessaire de chauffer : la durée des incubations doit donc être minimale et la dilution de l'ADN pas trop faible pour éviter ce genre de problèmes. Mais c'est aussi le cas lors de l'extraction de l'ADN : une méthode utilisant un mélange de chloroforme, d'eau et de phénol très utilisée pour ce type de travaux est d'ailleurs au centre d'un débat sur l'éventuel effet pro-oxydant du phénol (Helbock et al, 1998 ; Finnegan et al, 1996). Cela dit, il semblerait que des impuretés comme des métaux ainsi qu'une excessive exposition à l'oxygène de l'air puissent être la source réelle de l'auto-oxydation de l'ADN (Claycamp, 1992). Le phénol ne jouerait alors qu'un rôle de catalyseur. Il est donc nécessaire d'éviter toutes traces de métaux, et il est recommandé d'utiliser des chélateurs et des antioxydants lors de ces étapes (Hofer et Möller, 2002). Il existe de plus une alternative à cette méthode d'extraction : une autre technique dite « chaotropique » à base de solution concentrée de NaI (Helbock et al, 1998, Loparev et 1991). Cette dernière a souvent été utilisée pour l'extraction de l'ADN car elle semble moins engendrer d'auto-oxydation. En effet, la très forte concentration en sel utilisée pour précipiter l'ADN semble faire en sorte d'éviter à des métaux du milieu de venir se complexer sur le double brin en faisant une compétition avec eux et évite donc la formation artificielle de dommages lors de l'extraction.

Chapitre II – Antioxydants et ADN : influence de la vitamine C

2-1 – Les antioxydants : Généralités

Un antioxydant est une substance qui lorsqu'elle est présente en faible concentration par rapport aux substrats oxydables dans un milieu, ralentit ou prévient l'oxydation de ceux-ci (Halliwell et al, 1990).

Les cellules en possèdent de nombreux utiles pour contrer les effets des radicaux libres et plus généralement pour prévenir des cancers ou des maladies cardiovasculaires. Ils agissent en « éliminant » ces radicaux libres avant même qu'ils aient causé des dommages aux différentes bio-molécules (Valko et al, 2004). Les antioxydants les mieux connus sont la vitamine E (α -tocophérol), qui est une molécule liposoluble localisée dans les membranes et utile contre l'oxydation des lipides. D'autres antioxydants importants sont les caroténoïdes (vitamine A, β -carotènes, xanthophylles, lycopènes), qui possèdent de longues chaînes à doubles liaisons conjuguées qui leurs permettent de « quencher » l'oxygène singulet sans se dégrader, ceci étant très utile contre la peroxydation des lipides. Le glutathion, ainsi que d'autres formes de thiols possèdent également un grand pouvoir réducteur et sont de bons antioxydants. Enfin, la vitamine C qui est impliquée dans diverses fonctions.

Bien souvent, les activités de ces antioxydants sont reliées entre elles. Par exemple, la vitamine C réagit avec la vitamine E pour la régénérer et ainsi lutter contre la peroxydation des lipides (Møller et al, 2004). De la même manière, le glutathion est impliqué dans le recyclage de l'ascorbate.

2-2 – La vitamine C

2-2-1 – Généralités

« Vitamine C » est un terme générique qui est employé pour tous les composés possédant l'activité biologique de l'acide ascorbique (Acide L-Ascorbique : 2,3-Didehydro-L-threo-hexano-1,4-lactone) ou ascorbate.

La vitamine C est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques des organismes vivants. Son principal rôle est celui de cofacteur des enzymes de type « 2-oxoacid-dependent dioxygenase » (2-ODD) présent chez tous les organismes dans lesquels elle catalyse l'incorporation de O₂ dans les molécules organiques (De Tullio et Arrigoni, 2004). Ce rôle dépend souvent du fait qu'elle sert de réducteur de métaux aux sites actifs. Ainsi, elle est impliquée dans la synthèse du collagène dans les tissus conjonctifs, en servant de co-facteurs comme pour la prolyl-hydroxylase ou la lysine hydroxylase (Levine et al, 1993). C'est de cette manière là qu'elle est primordiale pour lutter contre le scorbut. Elle est aussi présente dans le processus de synthèse de la carnitine. Dans les tissus nerveux, il a été montré qu'elle participait à de nombreuses réactions neurochimiques. Les neurones l'utilisent lors de réactions chimiques et enzymatiques pour la synthèse de neurotransmetteurs et d'hormones, ainsi que comme régulateur de l'efficacité post-synaptique des neurotransmetteurs (Tsao, 1997). On lui connaît également un rôle lié au système immunitaire (Jariwalla et al, 1996) ou dans l'absorption du fer dans l'organisme (Block et al, 1991 ; Hallberg et al, 1989).

Mais plus généralement, son rôle est celui d'un antioxydant basé sur ses propriétés réductrices. Il protège les autres composants cellulaires des dommages d'oxydation en agissant

comme un capteur d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou de l'azote comme les radicaux hydroxyles ou peroxydes, ou bien les peroxy-nitrites (Halliwell, 2001). Ainsi, dans les systèmes biologiques, l'ascorbate peut être facilement oxydé en semi-déhydroascorbate (SHA) puis en déhydroascorbate (DHA) qui sera lui-même recyclé pour redonner la forme réductrice (May et al, 1998 ; Rumsey et Levine, 1998).

Beaucoup d'animaux synthétisent eux-même la vitamine C à partir du glucose ou du galactose par la voie de l'acide glucuronique. Mais l'humain a besoin de l'alimentation pour la lui fournir car il a perdu quelque part dans l'évolution l'activité de l'enzyme L-gulonolactone oxydase. C'est également le cas pour le cochon d'inde, certains singes et certaines chauve-souris (Burri et Jacob, 1997).

L'apport journalier recommandé en vitamine C est de 40 mg en Europe et 60 mg en Amérique du nord (Valko et al, 2004), mais une concentration maximum de 50 μ M dans le plasma est atteinte par la consommation de 100 mg par jour (Levine et al, 1996 ; Levine et al, 1999).

2-2-2 – Propriétés chimiques de la vitamine C

L'acide L-ascorbique est un acide dibasique possédant un groupe enediol construit sur un hétérocycle à cinq atomes de type lactone. Cette molécule est stabilisée par la délocalisation des électrons π entre le carbonyle et le enediol. Elle est également constituée de deux carbones asymétriques en position C4 et C5. Cela signifie qu'en plus de l'acide L-ascorbique, il existe trois autres diastéréoisomères : l'acide D-ascorbique, l'acide L-isoascorbique et l'acide D-

isoascorbique. Ces trois autres formes n'ont qu'une très faible activité anti-scorbutique (Tolbert et al, 1975).

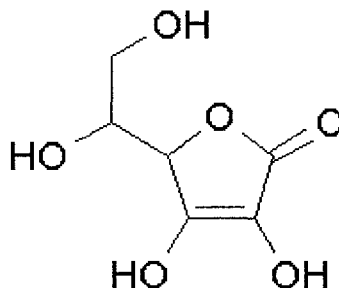


Fig 2-1 : Structure de l'acide ascorbique

L'acide ascorbique possède deux pKa, le premier à 4,1 et le second à 11,79. On le trouve donc dans la cellule à pH physiologique (pH = 7,4) sous la forme d'ascorbate. Le pH joue un rôle important en ce qui concerne l'activité redox de la vitamine C. En milieu alcalin son oxydation et sa dégradation sont plus rapides.

La vitamine C peut donner potentiellement deux électrons pour former son produit d'oxydation, le déhydroascorbate (DHA). Lors de l'oxydation, dans un premier temps un intermédiaire se forme : il s'agit du radical ascorbate (appelé aussi semi-déhydroascorbate) qui possède un électron non apparié. Celui-ci est un acide fort (pKa = -0,45). En milieu cellulaire, il perd donc son deuxième proton, ce qui permet à son électron non apparié de se délocaliser sur les trois carbonyles, cela lui conférant une certaine stabilité. En effet, cette espèce radicalaire est relativement non réactive (Bielski, 1982), et sa deuxième oxydation implique la présence d'un autre radical ascorbate. Ainsi, deux molécules de ce radical vont, par

dismutation, donner d'un côté du DHA et de l'autre une molécule d'ascorbate de façon très rapide ($10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Bielski, 1982) (fig 2-2).

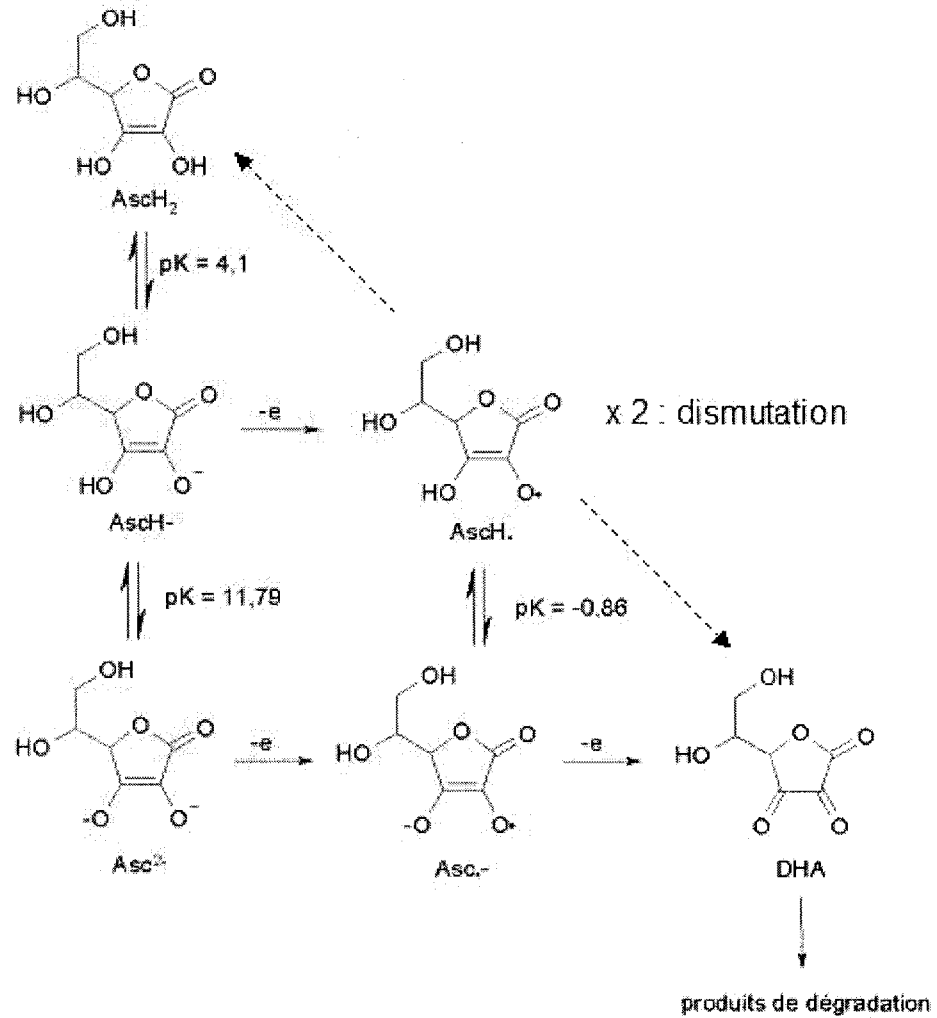


Fig 2-2 : Equilibre acido-basique de l'acide ascorbique, influence sur son oxydation

Les ions métaux ont une importance particulière en ce qui concerne l'oxydation de la vitamine C. Un complexe ternaire mettant en jeu une molécule d'ascorbate, un ion métal (Cu II) et une molécule d'oxygène a par exemple été évoqué après des études spectrophotométriques, pour expliquer le mécanisme d'oxydation de la vitamine C par l'oxygène en solution aqueuse aérée (Tsao, 1997). Il semblerait que l'ascorbate puisse chélater le métal au niveau de ces groupements hydroxyles en position 2 et 3. De cette manière, il est possible de s'en servir comme d'un catalyseur lors d'une réaction de Fenton, afin de régénérer le métal oxydé pendant ce processus.

2-2-3 – Recyclage de l'ascorbate dans la cellule

Dans le but de maintenir un rapport « acide ascorbique/DHA » élevé dans la cellule, il existe plusieurs systèmes de régénération de l'ascorbate : Une voie alternative permet de réduire directement le radical ascorbate en ascorbate par du NADH réduit, catalysée par des réductases de membranes localisées dans les organelles comme les mitochondries (NADH-SHA-réductase, Rumsey et Levine, 98). Mais le DHA doit être recyclé par un système à deux électrons impliquant soit des thiols comme le glutathion (avec la glutaredoxine comme enzyme), le NADPH (thioredoxine reductase), la cystéine, la cystéamine ou des produits de réduction de l'acide α -lipoïque. Si le DHA n'est pas recyclé, il sera alors dégradé pour former plusieurs produits dont les majoritaires sont l'acide thréonique et l'acide oxalique (Tsao, 1997). Ces derniers peuvent être toxiques pour la cellule, d'où l'importance de recycler le DHA.

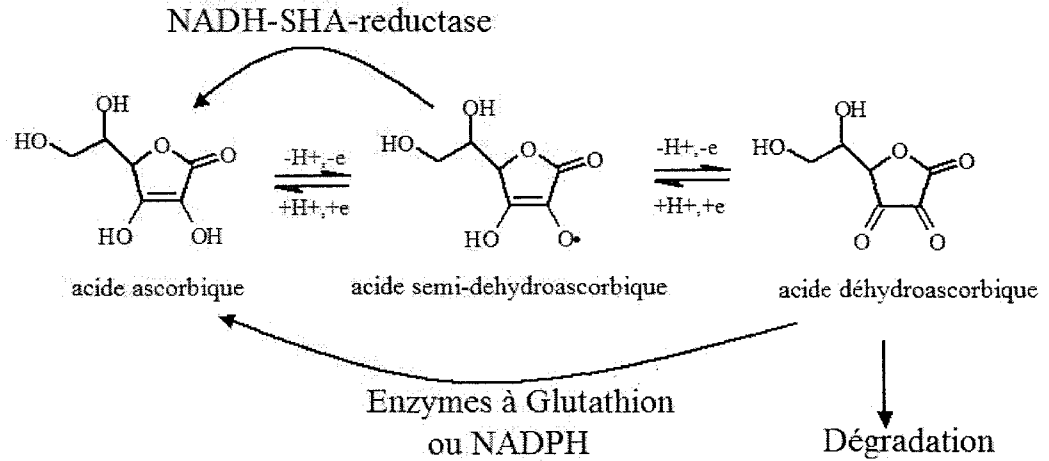


Fig 2-3 : Recyclage enzymatique de la vitamine C dans la cellule

2-2-4 – Transport de la vitamine C à travers les membranes

Du fait de sa structure et des conditions de pH dans la cellule (pH 7,4) qui lui permettent de s'ioniser, l'ascorbate est une molécule qui passe difficilement les membranes lipidiques par diffusion. Cela lui permet de pouvoir être « piégé » dans le milieu intracellulaire. Le DHA par contre possède une structure un peu plus hydrophobe. Il peut ainsi potentiellement mieux diffuser à travers les membranes cellulaires (Rose and Wilson, 1997).

Cela dit chez un organisme comme l'humain qui ne synthétise pas de vitamine C, mais dont la présence est indispensable, la cellule a besoin d'un moyen très efficace pour l'absorber. En réalité, bien qu'il existe un mode de transport Na^+ -dépendant permettant son entrée (Lutsenko et al, 2004), ce n'est pas sous forme d'ascorbate que la vitamine C est

principalement importée dans la cellule, mais plutôt sous forme de DHA. Ce n'est cependant pas à cause de sa structure plus hydrophobe, celle-ci n'étant pas suffisante pour expliquer une concentration intracellulaire en vitamine C aussi élevée, mais plutôt par l'utilisation de transporteurs membranaires de glucose qui permettent son transport. Ces transporteurs sont Glut 1 et Glut 3 principalement, ainsi que Glut 4, mais ce dernier a une affinité pour le DHA beaucoup plus faible (Rumsey et Levine, 1998).

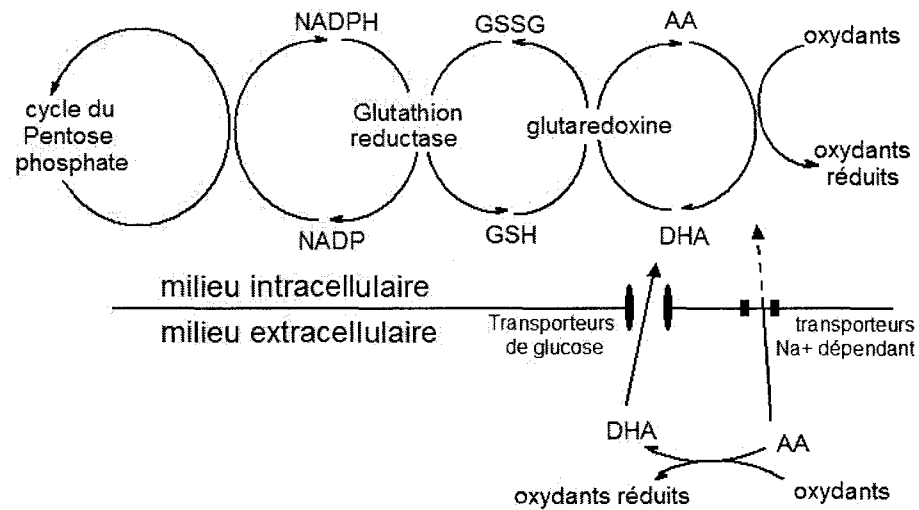


Fig 2-4 : Piégeage intracellulaire de l'ascorbate

Une fois le DHA entré dans le milieu intra-cellulaire, il est alors rapidement réduit par les systèmes de recyclage de la vitamine C (fig 2-4). Les membranes étant imperméables à l'ascorbate, cela provoque une concentration élevée dans la cellule, au dessus du mM (tableau 2-1). Certaines cellules cancéreuses atteignent même des niveaux de plusieurs dizaines de mM ou même supérieurs à 100 mM (voir article 1).

Dose d'absorption de Vitamine C (mg/jour)		100	500	2500
Concentration en ascorbate du plasma (μM)		55 ± 5	70 ± 8	85 ± 5
Concentration intracellulaire en ascorbate (μM)	Neutrophiles	800 ± 200	1300 ± 200	1300 ± 100
	Monocytes	2300 ± 600	3100 ± 100	3100 ± 300
	Lymphocytes	2800 ± 700	3500 ± 100	3500 ± 100

Tableau 2-1 : Relation entre la dose de vitamine C absorbée et les concentrations du plasma et intracellulaire chez des patients humains en bonne santé (ref : Rumsey et Levine, 1998)

2-3 – La vitamine C possède-t-elle un effet antioxydant ou pro-oxydant *in vivo* ?

La vitamine C est un puissant antioxydant grâce à ses propriétés réductrices. En effet, beaucoup d'études ont montré une inhibition de la formation de dommages d'oxydation, aussi bien *in vitro* que *in vivo*, après supplémentation de plusieurs sujets (humain, cochon d'inde, etc...). Ces études se penchaient sur la formation de dommages sur les lipides, les protéines et surtout l'ADN. Ainsi, par exemple, une étude réalisée en 1991 (Fraga et al, 1991) utilisant l'HPLC-EC a montré une augmentation de niveau de 8oxodGuo dans l'ADN de sperme humain de la part de sujets ne consommant pas ou très peu de vitamine C (5mg/jours) ou étant légèrement déficient (10-20 mg/jours). Après consommation de 60 à 250 mg par jour de vitamine C, les niveaux de 8oxodGuo diminuaient.

Plus récemment, une autre étude impliquant 105 sujets en bonne santé a rapporté qu'il existait une corrélation inverse entre la concentration en ascorbate et en glutathion

intracellulaire et la quantité de dommages à l'ADN comme la 8oxodGuo et la 5OHdCyd dans les lymphocytes (Lenton et al, 1999). Une baisse du nombre de transversions G vers T reliées à une baisse de niveau de 8oxodG a aussi été observée lorsque des cellules ont été chargées en vitamine C avant d'être traitées par du H₂O₂ et du cuivre par rapport à des cellules non chargées (Lutsenko et al, 2002). Enfin, aucun effet pro-oxydant de l'ascorbate n'a été observé dans une étude *in vitro* mettant en jeu de l'ascorbate, du fer ou du cuivre et H₂O₂ dans du plasma humain (Suh et al, 2003). Il faut toutefois noter que parmi ce type d'études, bien souvent le marqueur d'oxydation semble peu fiable. C'est notamment le cas pour les études réalisées par Lutsenko et al (2002), et Fraga et al (1991), qui dans les deux cas, mesurent par HPLC-EC des niveaux basaux de 8oxodGuo bien trop élevés (Collins et al, 2004) et probablement issus de l'auto-oxydation lors de l'isolement de l'ADN.

Cependant, il y a une controverse à propos de l'effet réel de la vitamine C dans la cellule. En effet, il a été démontré qu' *in vitro*, celle-ci peut avoir un effet pro-oxydant en générant des radicaux hydroxyles lorsqu'elle est en présence de métaux tel que le cuivre ou le fer, tout ceci par le biais d'une réaction de Fenton (cf chapitre I). Mais cet effet là n'a jamais été clairement démontré *in vivo* (Carr et Frei, 1999). Évidemment, les cellules possèdent toutes sortes de métaux qui pourraient être impliqués dans des réactions de Fenton (fer, cuivre), mais ils sont séquestrés dans des protéines de transport ou de stockage telles que la ferritine, la transferrine ou la ceruloplasmine. Il est cependant possible que ces métaux soit libérés lors d'un stress ou bien par une forte concentration en ascorbate (Baader et al, 1994). Ainsi, le fer stocké dans ces protéines sous forme Fe³⁺ non soluble, sera réduit en Fe²⁺ de la même manière que pour son absorption dans les cellules, ce qui aura le pouvoir de le solubiliser en milieu aqueux sans chélateur. Ce processus le rend alors disponible à une éventuelle formation de radicaux hydroxyle. Il est donc légitime de penser que la vitamine C pourrait posséder ce pouvoir pro-

oxydant. Par ailleurs, plusieurs études ont montré des augmentations de niveaux de dommages dans l'ADN. Ainsi, une étude a mis en évidence l'augmentation du niveau de glycols de thymine et de 5OHdCyd, lorsque des individus en bonne santé ont été co-supplémentés par du fer et de la vitamine C (Rehman et al, 1998). Cela dit, une baisse de la quantité d'autres dommages (8oxodG, 8oxodA, 5OHdU) a également été observée. Une autre étude a également montré une hausse des niveaux de 8oxodA parallèlement à une baisse de ceux de 8oxodG (Podmore et al, 1998). Mais cette dernière semble peu fiable car les niveaux de dommages mesurés par GC-MS sont bien supérieurs aux niveaux standards obtenus par d'autres techniques réputées pour produire moins d'auto-oxydation (cf 1-4).

L'effet pro-oxydant reste donc assez confus, mais il faut noter que lors d'études établis à partir de supplémentation d'individus, les niveaux d'ascorbate intracellulaire atteignent très vite un plateau (**Tableau 2-1**). Il est donc difficile d'évaluer un effet quel qu'il soit lorsqu'il est réalisé sur une population saine ayant une alimentation équilibrée. Il est préférable d'effectuer ce genre d'étude sur une population possédant de faibles niveaux d'ascorbate à la base.

Quoi qu'il en soit, Anitra Carr et Balz Frei (1999) établissaient dans leur revue sur ce sujet « Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions ? » que sur 44 études *in vivo* discutées, 38 montraient un effet de réduction des dommages d'oxydation de l'ADN, de lipides et des protéines, 14 ne montraient aucun changement et seulement 6 un effet pro-oxydant de la vitamine C. Plusieurs de ces études montraient à la fois les deux effets selon les marqueurs d'oxydation observés.

L'activité antioxydante de la vitamine C semble donc être prédominante. Cependant, il semblerait que des concentrations très élevées en ascorbate, au dessus des niveaux

physiologiques normaux puissent favoriser son côté pro-oxydant (voir article 1), peut-être en libérant les métaux de leurs protéines de stockage. De plus, ces niveaux pourraient être atteints dans certains cas de cellules cancéreuses ayant une surexpression de leurs transporteurs de glucose (Younes et al, 2001, Agus et al, 1999).

Hypothèses et objectifs

Beaucoup d'études sur l'observation des dommages d'oxydation à l'ADN utilise la 8oxodGuo comme marqueur. Toutefois, ce produit est sensible à des problèmes d'auto-oxydation, ce qui fausse en partie les mesures.

Lors de ces travaux, nous avons donc voulu observer les effets anti-oxydant ou pro-oxydants de fortes concentrations en vitamine C lors d'une situation de stress sur l'ADN, en utilisant la 5OHdCyd comme marqueur, moins sujette à cette auto-oxydation. Ce produit pourrait en effet être une alternative intéressante à l'utilisation d'autres marqueurs plus traditionnel comme la 8oxodGuo.

Nos études sur les produits d'oxydation de la cytosine (5OHdCyd, 5OHdUrd) nous ont ensuite incité à nous intéresser à leur éventuelle suroxydation. En effet, ce phénomène déjà connu pour la 8oxodGuo à cause de son faible potentiel d'oxydation, pourrait possiblement se produire pour les produits formés lors de l'oxydation de la dCyd possédant également des potentiels faibles. Cette suroxydation pourrait avoir d'importantes conséquences pour la cellule en provoquant un changement de la distribution des produits formés par l'oxydation des bases de l'ADN et influençant ainsi leur caractère mutagène ou leur toxicité.

Chapitre III

Article n° 1 :

Ascorbate and H₂O₂ induced oxidative DNA damage in Jurkat cells

Johann Rivière and J. Richard Wagner

Soumis à "Free radical Biology and Medicine", Avril 2005

Abstract

Vitamin C (ascorbate) can act as an antioxidant or pro-oxidant depending on the experimental conditions. In this work, Jurkat cells were loaded with ascorbate by incubation with dehydroascorbate. The effect of intracellular ascorbate on H₂O₂ induced damage was examined by the analysis of two biomarkers of oxidative DNA damage: 5-hydroxy-2'-deoxycytidine (5OHdCyd) and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8oxodGuo). The formation of oxidative DNA damage induced by 200 μM H₂O₂ greatly increased in cells with a high intracellular ascorbate (30mM) compared to cells with no ascorbate. The level of 5OHdCyd increased 15-fold (2.7 ±0.6 to 40.8 ±6.1 /10⁶ dCyd) whereas that of 8oxodGuo increased 50% (8.4 ±0.4 to 12.1 ±0.5 /10⁶ dCyd). This effect was also observed at lower concentrations of ascorbate (<30 mM) and H₂O₂ (<200 μM H₂O₂). Additional studies showed that replacement of H₂O₂ with *t*-butyl-hydroperoxide completely blocked damage, and that preincubation with iron and desferroxamine increased and decreased the damage, respectively. Together, these studies support a Fenton reaction ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{hydroxyl radicals}$) in the mechanism of formation of damage. When cells containing elevated 5OHdCyd were allowed to undergo DNA repair in culture medium, the levels 5OHdCyd returned to baseline in 2-3 h. In summary, we report that intracellular ascorbate sensitizes H₂O₂-induced oxidative DNA damage in Jurkat cells, and changes the ratio of two oxidation products (5OHdCyd and 8oxodGuo) in favor of 5OHdCyd.

Introduction

Reactive oxygen species and oxidative DNA damage are implicated in numerous pathological disorders including aging and cancer [1-3]. The main reactive species responsible for oxidative DNA damage in cells appears to be hydroxyl radicals generated by the reaction of H₂O₂ and reactive transition metal ions, such as Fe²⁺ and Cu⁺ [4]. Other species may also contribute to DNA damage, including singlet oxygen, metal-peroxide complexes and peroxynitrite [5]. Although the majority of oxidative DNA damage is repaired by base excision repair [6], there is probably a low steady state level of damage that persist even in the absence of oxidative stress. This damage may be an underlying cause of mutations in dividing cells ultimately contributing to cancer [7].

The role of vitamin C in protecting against oxidative DNA damage is a matter of much controversy. On one hand, numerous studies point to a protective effect of vitamin C supplements toward oxidative DNA damage in white blood cells [8-10]. On the other hand, several studies have suggested short-term effects, no effect or even a pro-oxidant effect [11;12]. Thus, there is no consensus as to the effects of vitamin C. Part of the problem, however, has been the validity of biomarkers in clinical studies. The use of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8oxodGuo) as a biomarker has largely contributed to erroneous results in clinical studies. The major problem of 8oxodGuo as a biomarker of oxidative DNA damage is that dGuo undergoes artifactual oxidation to 8oxodGuo, leading to an overestimation of damage. For example, the level of 8oxodGuo in cellular DNA has dramatically fallen over the past 10 years principally as a result of optimization of the methods for DNA extraction, together with the addition of antioxidants and metal chelators, during sample preparation [13-

15]. Today, we know that the actual levels of 8oxodGuo in normal human cells lie between 0.3 and 4.2 /10⁶ dGuo, and they may even be lower [16]. Although we have learned enormously from the study of 8oxodGuo, we must develop alternative biomarkers that are less prone to artifactual oxidation in order to evaluate the effects of micronutrients and diet on oxidative DNA damage.

To investigate the effects of ascorbate on oxidative DNA damage, we incubated cells in culture with the oxidized form of ascorbate, dehydroascorbate (DHA), which is rapidly taken up and converted to ascorbate inside cells. DHA enters cells by way of glucose transporters (Glut 1, Glut 3, Glut 4) then it is rapidly reduced inside cells to ascorbate by glutathion dependent (glutaredoxin) or NADPH dependent (thioredoxine reductase) enzymes [17-19]. Although the concentration of intracellular ascorbate normally ranges from 1-10 mM for cells in vivo, the concentration can increase to levels in excess of 100 mM for cells incubated in cell medium with DHA. The accumulation of ascorbate is particularly efficient in transformed lymphocytes [20-22]. This method of incorporation, in contrast to the direct addition of ascorbate to cell medium, leads to higher levels of incorporation and circumvents the problem of free radical generation.

In the present work, we describe the effects of intracellular ascorbate on H₂O₂-induced oxidative DNA damage. This damage is estimated by the level of 5-hydroxy-2'-deoxycytidine (5OHdCyd), a major product of hydroxyl radical induced oxidation of 2'-deoxycytidine (dCyd) [23;24]. The level of 5OHdCyd is comparable to that of 8oxodGuo in cellular DNA from a variety of animal cells and tissues [23]. Although 5OHdCyd appears to be weakly mutagenic [25;26]. The formation of this damage may be considered to be proportional to strongly mutagenic damage, such as cytosine and uracil glycols, which are formed by the same pathway

via free radical mediated oxidation of dCyd [24;27]. Here, we demonstrate that intracellular ascorbate sensitizes cells to oxidative DNA damage induced by H₂O₂.

Materials and Methods

Materials. Chemicals were of the highest available purity. They were purchased from Sigma (St. Louis, MI) unless stated otherwise. Ascorbate was purchased from BDH (Toronto, Canada); DHA from Fluka (Milwaukee, IL); FeSO₄ from Mallinckrodt (Hazelwood, MO); *t*-butyl-hydroperoxide and 2'-deoxynucleosides were purchased from Aldrich (Milwaukee, IL); H₂O₂ from Fisher (Fair Lawn, NJ); Nuclease P1 and alkaline phosphatase from Roche (Mannheim, Germany).

Treatment of cells with DHA and H₂O₂. Jurkat cells (ATCC, Manassas, VA) were cultured in RPMI medium (Gibco, Grand Island, NY) with 10% foetal bovine serum (Gibco). Treatment of cells with DHA and H₂O₂ was carried out in two steps. First, the cells were incubated in PBS (3.4 M NaCl, 67 mM KCl, 254 mM Na₂HPO₄, 44 mM KH₂PO₄, pH 6.4) with freshly added DHA (0- 2000 μM) for 30 min at 37°C, and then the cells were washed with phosphate buffer saline (PBS). In the second step, cells were re-suspended in ice-cold PBS containing freshly added H₂O₂ (0 to 200 μM), held on ice for 30 min, and washed twice with ice-cold PBS. For repair studies, cells were treated as above, and then, they were incubated in RPMI medium with 10% foetal bovine serum.

Extraction of DNA. Ten million cells were washed with 1 ml of nuclei buffer solution (NBA; 0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, pH 7.5) and then treated with triton X-100 (0.25% v/v) in the same buffer for 10 min at 4°C. The nuclei were collected by centrifugation at 4000 g for 10 min and stored at -80°C until further manipulation. Two methods of DNA extraction were used. The method with phenol consisted of three steps: 1) nuclei were dissolved in 500 μL of 2X lysis buffer, obtained from Applied

Biosystems (Foster City, CA), and 100 μL of 6 mg/ml in 50 mM Tris-HCl of Proteinase K (Roche), and the mixture was incubated at 37°C for 60 min; 2) DNA was extracted with a mixture of phenol/water/chloroform (Applied Biosystems), followed by successive extractions with 400 μL of phenol/water/chloroform plus 400 μL of Sevag (24/1, v/v; chloroform/isoamyl alcohol), and then 800 μL of Sevag (the samples were vortexed for 5 min and the organic and aqueous phases were separated by centrifugation at 13200 g for 3 min); and 3) DNA was precipitated by the addition of 50 μL of sodium acetate buffer (3 M, pH 4.8) and 500 μL of cold isopropanol (-20°C) followed by equilibration at -20°C for 1 h, centrifugation at 13200 g for 10 min, successive washes with 50% isopropanol and 70% ethanol, and drying under vacuum for 3 min. The second method of DNA extraction was carried out with NaI using the DNA extractor WB Kit (Wako, Japan).

Sample Preparation. Purified DNA (40-50 μg) was dissolved in 50 μL of freshly drawn nanopure water (Millipore, Bedford, MA). The sample was incubated for 20 min at 40°C with nuclease P1 (5 μL ; 1 unit/ μL in acetate buffer 50 mM pH 4.8), and then for another 40 min at 40°C with alkaline phosphatase (5 μL of alkaline phosphatase (1 unit/ μL in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) plus 7 μL of 1.2 M ammonium acetate (pH 7.0)). The mixture of nucleosides was acidified (pH 4) by addition of 5 μL of 0.22 M phosphoric acid and then extracted with 50 μL of chloroform by brief vortexing and centrifugation at 13200 g for 5 min to eliminate excess proteins. The aqueous phase was recovered and transferred to 150 μL plastic vials for HPLC-EC/UV analysis.

HPLC-EC/UV Analysis. The analysis of 5OHdCyd and 8oxodGuo was carried out using a Model 2690 Alliance system (Waters, Milford, MA) connected in series to a Model 2487 UV detector (Waters) and a Coulochem II electrochemical detector (ESA Associates, Chelmsford, MA) equipped with a Model 5011 analytical cell (ESA Associates). The separation of

nucleosides was achieved using a ODS-A, 250 mm x 6 mm, 5 µm particle size analytical octadecylsilyl column (YMC, Kyoto, Japan) maintained at 30°C by a Model CH-30 column heater (Eppendorf, Hamburg, Germany). HPLC-EC/UV analysis of 5OHdCyd was carried out at a flow rate of 1 ml/min with 50 mM phosphate buffer and 3% methanol as the mobile phase, followed by a step gradient from 20 to 33 min with the initial buffer containing 20% methanol. Non-modified dCyd was detected by UV detection at 260 nm and 5OHdCyd was detected by electrochemical detection with the first and second electrodes operating at 200 mV and 400 mV, respectively (voltage versus Pd reference electrode). The analysis of 8oxodGuo was carried out under identical conditions as above except the mobile phase consisted of 8% methanol in 50 mM phosphate buffer at pH 5.5 and the first and second electrodes were set at 250 mV and 450 mV, respectively.

Intracellular concentration of DHA. Ascorbate was measured by HPLC-EC according to the method of Rose and Bode [28]. Five million cells were washed three times with ice-cold PBS, suspended in 200 mM phosphate buffer pH 2 containing 0.1 mM EDTA, and subjected to three freeze-thaw cycles. Ascorbate was analyzed using an ODS-A, 250 mm x 6 mm, 5 µm particle size, octadecylsilyl column (YMC) with 200 mM phosphate (pH 3.0) as the mobile phase and the same electrochemical detector and cell system as described above except with the electrodes set at -150 mV and 425 mV. Total protein was measured by the Bradford assay (Bio-Rad) and the concentration of intracellular ascorbate was calculated by assuming an average protein concentration of 0.025 mg/10⁶ cells and cell volume of 200 nL/10⁶ cells [29].

Direct oxidation of nuclei. Purified nuclei from Jurkat cells were suspended in 900 µL of 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). To this suspension, 100 µL of 500 µM of ferrous ammonium sulfate, 100 mM ascorbate and 2 mM H₂O₂ were added, and the mixture was incubated for 30 min at 37°C. The nuclei were collected by centrifugation for 10 min at 4000

rpm and washed once with Tris-HCl buffer. DNA was subsequently extracted by the method using phenol/water/chloroform as described above.

Results

Analysis of damage by HPLC-EC/UV

The analysis of 5OHdCyd and 8oxodGuo was carried out separately in order to optimize their separation and detection. Buffer without methanol was used for the separation of 5OHdCyd in order to avoid interference with contaminating compounds by electrochemical detection. In contrast, 8oxodGuo is more polar than 5OHdCyd, and thus, it was eluted in buffer containing 8% methanol. The electrochemical detector was set to optimize the detection of 5OHdCyd and 8oxodGuo with mid-point oxidation potentials of 200 and 300 mV, respectively. The identity of 5OHdCyd and 8oxodGuo in samples of hydrolyzed DNA was based on comparison of their retention time and their oxidation potential with authentic standards. The analysis of 5OHdCyd is depicted in **Figure 3-1**. The baseline level of 5OHdCyd and 8oxodGuo were 1.3 ± 0.5 and $4.1 \pm 2.1 / 10^6$ dGuo, respectively, in the DNA of non-treated Jurkat cells (**Table 3-1**). These values are very similar to those reported for freshly extracted DNA from human lymphocytes using a similar method of analysis [8]. In additional experiments, we examined the levels of 5OHdCyd and 8oxodGuo using either NaI or phenol to extract DNA (**Table 3-1**). In the case of 8oxodGuo, the level of damage decreased using NaI compared to phenol, consistent with previous studies. On the other hand, the level of 5OHdCyd was higher using NaI compared to phenol, suggesting that the former method introduces artifactual oxidation. The difference between the two methods, however, disappeared in DNA containing elevated levels of damage from cells treated with H₂O₂ (data not shown). Finally, the presence of trace amounts of NaI interfered somewhat with electrochemical detection of 5OHdCyd by HPLC-UV/EC. For these reasons, the analysis of damage was carried out using the original method based on phenol to extract DNA.

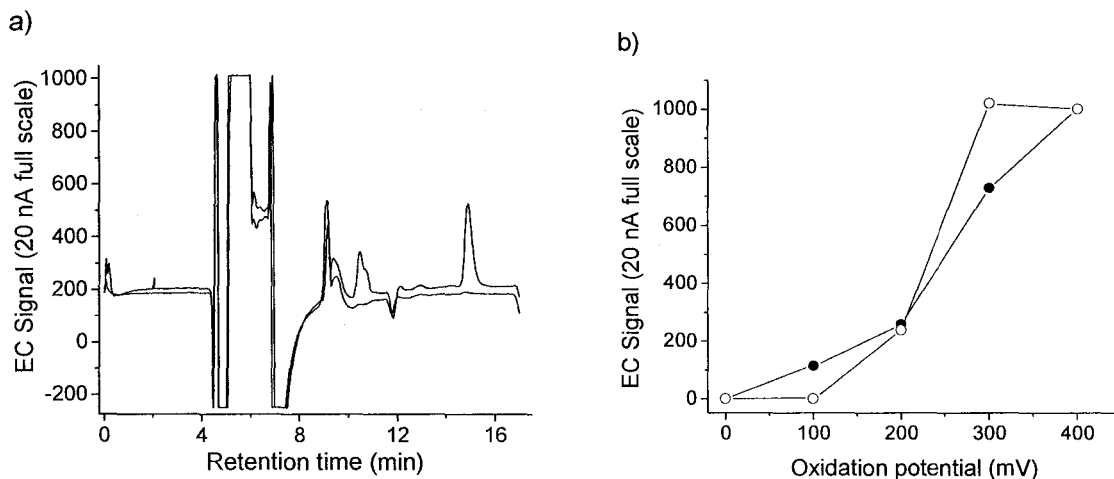


Figure 3-1 : HPLC-UV/EC analysis of 5OHdCyd

a) The upper chromatogram shows the level of 5OHdCyd (865 fmol) induced within cells containing 30 mM ascorbate after exposure to 200 μ M H_2O_2 . The lower chromatogram depicts the baseline level of 5OHdCyd in non-treated Jurkat cells (30 fmol). For each analysis, approximately 30 μ g of digested DNA was injected and the level of dCyd was determined by monitoring UV absorption at 260 nm during the same chromatographic run (not shown).

b) This graph shows the electrochemical (EC) signal as a function of oxidation potential of the electrochemical cell (0-450 mV). Authentic standard of 5OHdCyd (open circles) gives the same mid-point potential as 5OHdCyd obtained from digested DNA of H_2O_2 -treated cells (solid circles).

	5OHdCyd / 10 ⁶ dCyd	8oxodGuo / 10 ⁶ dGuo
Baseline (NaI)	2.4 ± 0.7 (n=3) ^a	2.9 ± 1.5 (n=12) ^b
Baseline (phenol)	1.3 ± 0.5 (n=5) ^a	4.1 ± 2.1 (n=5) ^b
Control A (+H ₂ O ₂) ^c	1.3 ± 0.4 (n=3)	Not measured
Control B (+H ₂ O ₂ +ascorbate) ^d	1.4 ± 0.4 (n=2)	Not measured
H ₂ O ₂ 200 μM	2.7 ± 0.6 (n=3)	8.4±0.4 (n=3)
H ₂ O ₂ 200 μM + 200 μM DHA	40.8 ± 6.1 (n=3)	12.1 ± 0.5 (n=3)
Nuclei+ Fe ²⁺ + H ₂ O ₂	55.3 ± 13.5 (n=3)	241.5 ± 72.7 (n=3)

^aSignificantly different ($P=0.04$). ^bNot significantly different ($P=0.13$). ^cCell lysis was carried out in NBA buffer containing 200 μM H₂O₂. ^dCell lysis was carried out in NBA buffer containing 200 μM H₂O₂ and 200 μM ascorbate. Samples were then processed as described in Materials and Methods. Corresponding errors : standard deviation.

Table 3-1 : Levels of oxidative DNA damage in Jurkat cells

Artifactual oxidation

DNA may undergo artifactual oxidation during cell lysis, DNA extraction, and enzymatic digestion. To examine this possibility in the analysis of 5OHdCyd, the lysis of Jurkat cells was carried out in buffer containing 200 μM H_2O_2 and/or 200 μM ascorbate. This concentration of ascorbate was approximately equal to that, which arises from the lysis of 10 million cells containing 100 mM ascorbate. The results showed no change in the level of 5OHdCyd, indicating that ascorbate and H_2O_2 do not induce artifactual oxidation of DNA during cell lysis (**Table 3-1**). As a positive control, the addition of 50 μM Fe^{2+} and 200 μM H_2O_2 to purified nuclei gave expected increases in the levels of both 5OHdCyd and 8oxodGuo. Interestingly though, in vitro oxidation of nuclei by Fe^{2+} and H_2O_2 produced 5-fold more 8oxodGuo than 5OHdCyd (**Table 3-1**). The same ratio of 8oxodGuo to 5OHdCyd was also obtained for the oxidation of a mixture of DNA nucleosides or the oxidation of purified DNA in solution (data not shown). Therefore, we conclude that the induced level of 5OHdCyd in cells treated with H_2O_2 can not be attributed to artifactual oxidation during DNA extraction and enzymatic digestion because this would have resulted in a higher level of 8oxodGuo compared to 5OHdCyd, whereas the reverse was observed in treated cells, i.e., 5OHdCyd was in fact 3.4-fold greater than 8oxodGuo (**Table 3-1**).

Accumulation of ascorbate in Jurkat cells

Upon incubation with DHA in cell culture (0-2000 μM), the concentration of intracellular ascorbate increased to levels in excess of 100 mM in Jurkat cells (**Figure 3-2**). The uptake of DHA and accumulation of intracellular ascorbate was similar to that reported for HL-60 cells, which accumulated approximately 50 mM and 150 mM ascorbate upon incubation with 1 and

10 mM DHA, respectively [21;30]. Similarly, human lymphocytes, neutrophils, and fibroblasts, have been shown to accumulate high concentrations of intracellular ascorbate with similar kinetics [22;31;32].

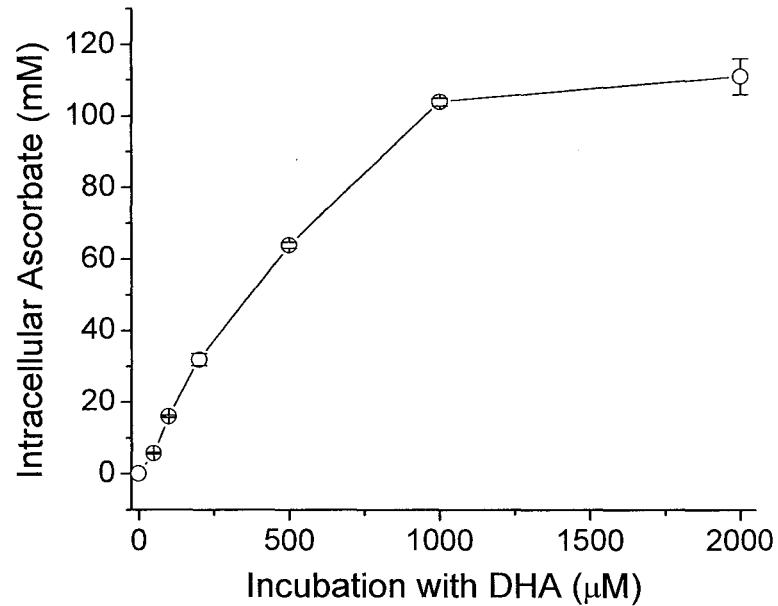


Figure 3-2 : Incorporation of DHA into cells in culture

Jurkat cells were incubated with DHA for 30 min at 37°C. Intracellular ascorbate was measured by HPLC-EC/UV (see Materials and Method). The concentration of intracellular ascorbate was calculated assuming an average protein concentration of 0.025 mg/10⁶ cells and volume of 200 nL/10⁶ cells (for example, 242 nmol of ascorbate/mg protein corresponds to an intracellular concentration of 30 mM). The values for PBS (initial conditions) are the average of two measurements (±SD).

Induction of DNA damage with DHA and H₂O₂

The effect of intracellular ascorbate on oxidative DNA damage was examined by first incubating cells with DHA at 37°C and then exposing them to H₂O₂ (0-200 μM). Exposure of cells to H₂O₂ alone did not markedly increase the level of 5OHdCyd in cellular DNA (**Figure 3-3a**). In sharp contrast, the level of 5OHdCyd increased from 2.7 ± 0.6 to $40.8 \pm 6.1 / 10^6$ dCyd (15-fold) when cells were loaded with 30 mM ascorbate prior to exposure to 200 μM H₂O₂ (**Figure 3-3a**). The induced level of 5OHdCyd depended on the concentration of H₂O₂, and reached a plateau at concentrations above approximately 200 μM H₂O₂. Similarly, the level of damage depended on the concentration of intracellular ascorbate (**Figure 3-3b**). At the maximum concentration of ascorbate (105 mM), the level of 5OHdCyd reached 66 ± 3 lesions/ 10^6 dCyd. On the other hand, the combination of ascorbate and H₂O₂ did not nearly sensitize the formation of 8oxodGuo to same extent as 5OHdCyd (**Figure 3-3a and 3-3b**). The level of 8oxodGuo increased from 8.4 ± 0.4 to $12.1 \pm 0.5 / 10^6$ dGuo (50%) when comparing H₂O₂-induced DNA damage in cells without ascorbate to that in cells containing 30 mM ascorbate, respectively.

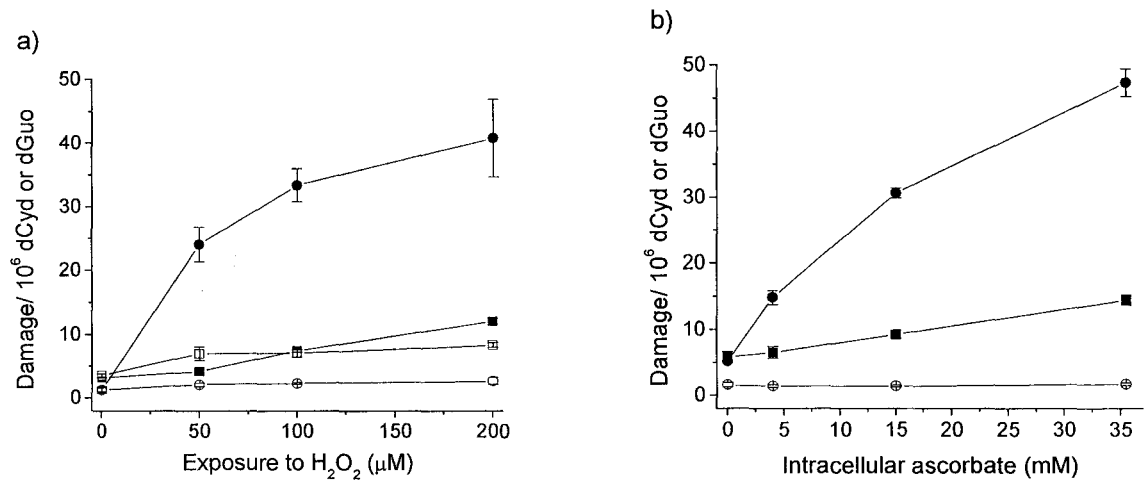


Figure 3-3 : Induction of DNA damage by H₂O₂

a) DNA damage was measured in Jurkat cells as a function of exposure to H₂O₂ (0-200 μM). Symbols: 5OHdCyd in cells with ascorbate (solid circles) and without ascorbate (open circles) and 8oxodGuo in cells with ascorbate (solid squares) and without ascorbate (open squares). The intracellular concentration of ascorbate was 30 mM.

b) DNA damage was measured in Jurkat cells as a function of intracellular ascorbate. Symbols: 5OHdCyd (solid circles) and 8oxodGuo (solid squares) in cells exposed to 200 μM H₂O₂. The effect of intracellular ascorbate on 5OHdCyd is also shown for cells not exposed H₂O₂ (open circles). Each point represents the average of three analyses (±SD.)

Effect of iron and *t*-butyl-hydroperoxide

To examine the role of iron in the formation of DNA damage, Jurkat cells were incubated with either iron or desferroxamine to modulate the levels of intracellular iron prior to accumulation of ascorbate and exposure to H₂O₂. The results showed that iron increased the level of 5OHdCyd by 2.5-fold whereas desferroxamine decreased the damage by 2-fold (**Figure 3-4**). To examine the mechanism of DNA damage further, H₂O₂ was replaced with *t*-butyl-hydroperoxide. The difference between these reagents is that, upon reduction by metal ions, *t*-butyl-hydroperoxide will generate peroxy radicals, whereas H₂O₂ will generate hydroxyl radicals. The results indicated no increase in the level of 5OHdCyd in cells containing a high concentration of ascorbate and exposed to *t*-butyl-hydroperoxide (data not shown). Together, the results of iron modulation and *t*-butyl-hydroperoxide are consistent with the reaction Fe²⁺ and H₂O₂, leading to the generation of hydroxyl radicals, according to a Fenton reaction.

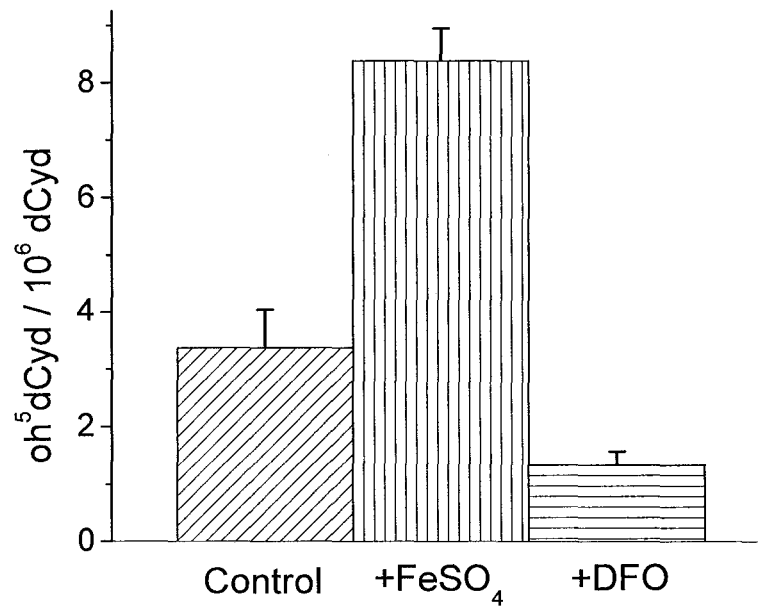


Figure 3-4 : Effect of iron and desferrioxamine

Jurkat cells were first incubated with either 1 mM FeSO₄ or 1 mM desferrioxamine (DFO). They were incubated with DHA, which corresponded to an intracellular concentration of ascorbate of 10 mM, and then exposed to 25 μM H₂O₂ as described in the Materials and Methods. Each point represents the average of three measurements (±SD).

DNA repair studies

The steady state level of oxidative DNA damage represents the difference between the rate of formation of damage and the rate of repair of damage by DNA repair enzymes. The repair of 5OHdCyd and 8oxodGuo was examined in Jurkat cells, which were treated with DHA, exposed to H₂O₂, and then allowed to recover in culture medium at 37°C for various times (0-4 h). The concentration of H₂O₂ was chosen to minimize secondary effects due to cell death. At concentrations of H₂O₂ greater than 100 µM H₂O₂, there was extensive cell death at 4 h incubation as observed by incorporation of trypan blue. At 50 µM H₂O₂, the majority of cells appeared to survive in culture but the disappearance of 5OHdCyd decreased at initial time-points and then increased at 4 h, suggesting that there was something wrong with the cells at this point. For this reason, the concentration of H₂O₂ was lowered to 25 µM H₂O₂. At this concentration, the initial level of 5OHdCyd was only 3.2 /10⁶ dCyd but the level consistently dropped to baseline after incubation in cell culture (**Figure 3-5**). The results indicated that approximately half of 5OHdCyd was removed from cellular DNA within the first 2.5 h of incubation at 37°C. In contrast, it was not possible to estimate the kinetics of repair for 8oxodGuo because the induced level of this damage at 25 µM H₂O₂ was not significantly different from the baseline level.

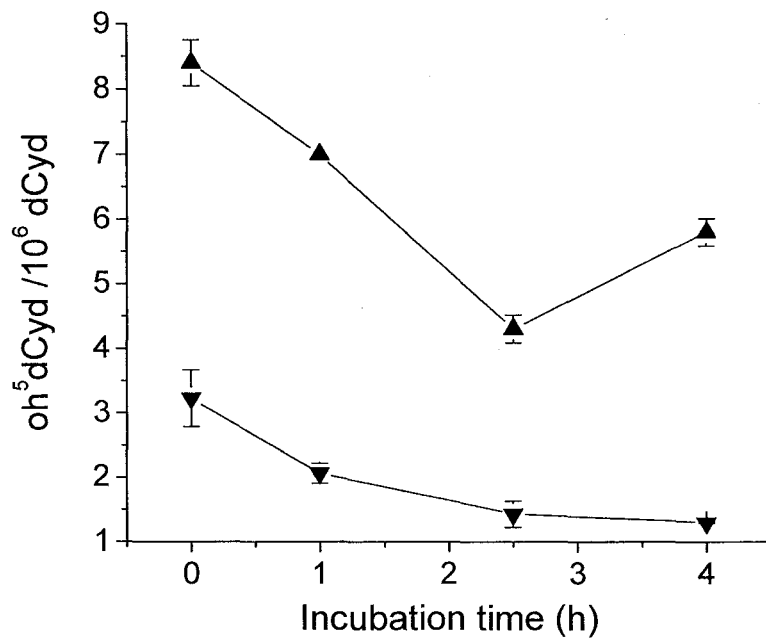


Figure 3-5 : DNA repair of 5OHdCyd

Jurkat cells containing 10 mM ascorbate were exposed to either 50 μM H_2O_2 (solid triangles) or 25 μM H_2O_2 (inverse solid triangles). Following exposure to H_2O_2 , the cells were washed with PBS, and incubated in cell medium at 37°C for various periods of time (0-4 h). Each point represents the average of three measurements ($\pm SD$).

Discussion

There are several advantages for using 5OHdCyd as a biomarker of oxidative DNA damage in place of or in combination with 8oxodGuo. Both of these modifications can be detected with adequate sensitivity by HPLC-UV/EC. The main advantage of 5OHdCyd compared to 8oxodGuo is the apparent lack of susceptibility of the assay to artifactual oxidation. Intuitively, 5OHdCyd should be less prone to artifactual oxidation than 8oxodGuo because the oxidation potential of dCyd is much higher than that of dGuo. Furthermore, the analysis of both 5OHdCyd and 8oxodGuo allows one to evaluate the occurrence of artifactual oxidation during sample preparation. In cellular DNA, the amount of 5OHdCyd is comparable or higher to the amount of 8oxodGuo. For example, the level of 5OHdCyd was $2.9 \pm 1.4 / 10^6$ dCyd, whereas that of 8oxodGuo was $4.5 \pm 1.8 / 10^6$ dGuo in 100 human lymphocyte samples. The level of 5OHdCyd was nearly the same as 8oxodGuo in rat liver and kidney ($\sim 15 / 10^6$ dGuo) and 4-fold higher than 8oxodGuo in rat brain (38.4 ± 5.8 compared to $8.5 \pm 2.0 / 10^6$ dGuo) [23]. In contrast, the oxidation of DNA in solution by a variety of oxidants (γ -radiation, UVA plus menadione, $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$, $\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$) leads to the formation of 8oxodGuo with a yield in excess of 5OHdCyd [23]. Thus, the finding that there is an equal amount or more 5OHdCyd than 8oxodGuo in DNA samples suggests that the contribution of artifactual oxidation to the level of damage was minor. Conversely, a greater amount of 8oxodGuo than 5OHdCyd may be a good indication of artifactual oxidation.

The mechanism of DNA damage induced by ascorbate and H_2O_2 in Jurkat cells likely involves the reaction of Fe^{2+} and H_2O_2 . The involvement of Fe^{2+} is supported by the ability of iron and desferroxamine to modulate oxidative DNA damage (**Figure 3-4**). In addition, hydroxyl radicals are directly implicated in the mechanism of damage because replacement of

H₂O₂ with *t*-butyl-hydroperoxide did not induce DNA damage. It is well known that ascorbate increases DNA damage induced by the reaction of iron and H₂O₂ with DNA [33;34]. Similar effects have also been reported using isolated nuclei from rat liver [35]. The ability of ascorbate to enhance the oxidation of DNA in homogeneous solutions can largely be attributed to the reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺, which undergoes oxidation in air to generate reactive oxygen species, and/or provides the necessary reducing equivalents to sustain the Fenton reaction. In contrast, the ability of ascorbate to oxidize DNA in cells has not been clearly demonstrated. The situation however is different in cells because there is very little free iron, and the majority of this iron exists in its reduced state (Fe²⁺) because of the overwhelming presence of reducing agents. Furthermore, hydroxyl radicals have limited diffusion in cells due to their extreme reactivity with biological compounds, and thus, DNA damage by a Fenton reaction in cells is limited to the reaction of H₂O₂ with DNA bound iron. An alternative pathway for the pro-oxidant effects of ascorbate in cells involves the mobilization of iron from ferritin [36;37]. For example, when neuroblastoma cells were incubated with ascorbate, the iron pool shifted from Fe³⁺ to Fe²⁺ states and then partially returned to the Fe³⁺ state upon exposure to H₂O₂ [38]. Assuming a similar reaction in Jurkat cells, we propose that the pro-oxidant effect of ascorbate in the induction of DNA damage may be related to an increase in the intracellular concentration of free iron, which increases the amount of iron bound DNA.

The formation of oxidative DNA damage by ascorbate and H₂O₂ is unique because it generates more 5OHdCyd compared to 8oxodGuo, whereas the opposite trend occurs for the oxidation of DNA in solution. It should also be noted that differences in the level of 5OHdCyd and 8oxodGuo can not be attributed to DNA repair because DNA damage was assessed immediately following treatment with H₂O₂ at 4°C. Thus, the ability of ascorbate to change the ratio of 5OHdCyd and 8oxodGuo must be due to the involvement of ascorbate in the chemistry

of formation of DNA damage. Our hypothesis is that ascorbate affects the yield of 8oxodGuo more than that of 5OHdCyd. This is consistent with the ambivalent nature of intermediate dGuo radicals depending on the redox status (in contrast, intermediate dCyd radicals are much less sensitive to redox status). The reaction of hydroxyl radicals at C8 of dGuo leads to the formation of intermediate 8-hydroxy-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosyl radicals, which undergo either reduction to give N⁶-(2-deoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (Fapy-dGuo) or oxidation to give 8oxodGuo [39]. Thus, the presence of oxidizing agents, such as Fe³⁺ and oxygen, usually increase the yield of 8oxodGuo in DNA [34;40;41]. Interestingly, the yield of 8oxodGuo is slightly greater than Fapy-dGuo when DNA is exposed to oxidants in solution, whereas Fapy-dGuo predominates over 8oxodGuo (2.5-fold) in experiments with cellular DNA [5;42;43]. This change underlines the reductive environment of cells. Because of the proximity of Fe³⁺, it is reasonable to propose that 8-hydroxy-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosyl radicals transfer an electron to Fe³⁺ (undergo oxidation) to give 8oxodGuo with the concomitant reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺. Thus, the effect of ascorbate on the ratio of 5OHdCyd and 8oxodGuo may be explained by reduction of Fe³⁺ bound to DNA, which impedes subsequent oxidation of 8-hydroxy-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosyl radicals. Alternatively, ascorbate may directly reduce these radicals and divert the pathway to Fapy-dGuo.

A number of studies indicate that ascorbate enhances cell killing in a synergistic manner with free radical generating agents, including H₂O₂, menadione and arsenic trioxide [22;44;45]. In particular, neuroblastoma cells appear to be very sensitive to elevated concentrations of ascorbate in cell culture [37;46]. Previously, we showed that incubation of Jurkat cells with DHA sensitized these cells to H₂O₂ induced necrosis and apoptosis [22]. In sharp contrast, DHA incubation and elevated intracellular ascorbate with HL-60 cells protects them from

H₂O₂ induced toxicity [20]. In addition, the presence of ascorbate in HL-60 cells decreased H₂O₂ and Cu²⁺ induced mutagenesis involving G to T transversions [30]. Although the authors attributed this effect to a reduction in the level 8oxodGuo, it should be noted that artifacutal oxidation likely contributed to the reported levels of 8oxodGuo which ranged from 50 to 500 /10⁶ dGuo. In preliminary studies, we find that DHA and H₂O₂ induces 5OHdCyd to a higher level in Jurkat cells compared to HL-60 cells, indicating that the ability of ascorbate to induce oxidative DNA damage is lower but nevertheless present in HL-60 cells (unpublished results). This suggests that ascorbate and H₂O₂ likely causes damage to other targets that are more important than DNA toward immediate survival.

In conclusion, we report the ability of a high intracellular concentration of ascorbate to exacerbate H₂O₂ induced oxidative DNA damage in Jurkat cells. The importance of this reaction at low physiological concentrations of ascorbate remains to be established. Nevertheless, the magnitude of the effect at high intracellular concentrations suggests that the combination of ascorbate with agents that generate reactive oxygen species may be a useful strategy to kill certain types of cancer cells, particularly if they overexpress glucose transporters, leading to efficient uptake DHA [47-49], and they generate copious amounts of H₂O₂ [50]. Equally important, we show that the presence of ascorbate affects the ratio of 5OHdCyd and 8oxodGuo. Whereas the oxidation of DNA in solution appears to produce more 8oxodGuo than 5OHdCyd, the presence of ascorbate shifted the ratio of these products in cellular DNA to give about 3-fold more 5OHdCyd than 8oxodGuo. Thus, our results indicate that the overall effects of ascorbate will not only depend on the ability to induce DNA damage but also on the final distribution of damage that ultimately determines the biological consequences.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support of the Cancer Research Society, Inc.,
Canada.

References

1. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, UK.
2. Ames, B.N., Shigenaga, M.K., and Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 7915-7922.
3. Feig, D.I., Reid, T.M., and Loeb, L.A. (1994) Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res.*, **54**, 1890s-1894s.
4. Henle, E.S. and Linn, S. (1997) Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, **272**, 19095-19098.
5. Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., and Ravanat, J.L. (2003) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.*, **531**, 5-23.
6. Cadet, J., Bourdat, A.G., D'Ham, C., Duarte, V., Gasparutto, D., Romieu, A., and Ravanat, J.L. (2000) Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat. Res.*, **462**, 121-128.
7. Collins, A.R. (1999) Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *BioEssays*, **21**, 238-246.
8. Lenton, K.J., Therriault, H., Fulop, T., Payette, H., and Wagner, J.R. (1999) Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis*, **20**, 607-613.
9. Moller, P. and Loft, S. (2004) Interventions with antioxidants and nutrients in relation to oxidative DNA damage and repair. *Mutat. Res.*, **551**, 79-89.
10. Carr, A. and Frei, B. (1999) Does Vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.*, **13**, 1007-1024.
11. Podmore, D.I. and Lunec, J. (1998) Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*, **392**, 559.
12. Moller, P., Viscovich, M., Lykkesfeldt, J., Loft, S., Jensen, A., and Poulsen, H.E. (2004) Vitamin C supplementation decreases oxidative DNA damage in mononuclear blood cells of smokers. *Eur. J. Nutr.*, **43**, 267-274.
13. 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. U. S. A.*, **95**, 288-93.
14. Hofer, T. and Moller, 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.

15. 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.
16. Collins, A.R., Cadet, J., Moller, L., Poulsen, H.E., and Vina, J. (2004) Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch. Biochem. Biophys.*, **423**, 57-65.
17. Rumsey, S.C. and Levine, M. (1998) Absorption, transport and disposition of ascorbic acid in humans. *J. Nutr. Biochem.*, **9**, 116-130.
18. May, J.M., Mendiratta, S., Hill, K.E., and Burk, R.F. (1997) Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22607-22610.
19. Park, J.B. and Levine, M. (1996) Purification, cloning and expression of dehydroascorbic acid-reducing activity from human neutrophils: identification as glutaredoxin. *Biochem. J.*, **315**, 931-938.
20. Guaiquil, V.H., Vera, J.C., and Golde, D.W. (2001) Mechanism of vitamin C inhibition of cell death induced by oxidative stress in glutathione-depleted HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, **276**, 40955-40961.
21. Guaiquil, V.H., Farber, C.M., Golde, D.W., and Vera, J.C. (1997) Efficient transport and accumulation of vitamin C in HL-60 cells depleted of glutathione. *J. Biol. Chem.*, **272**, 9915-9921.
22. Sane, A.T., Cantin, A.M., Paquette, B., and Wagner, J.R. (2004) Ascorbate modulation of H₂O₂ and camptothecin-induced cell death in Jurkat cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **54**, 315-321.
23. 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**, 3380-3384.
24. Wagner, J.R., Decarroz, C., Berger, M., and Cadet, J. (1999) Hydroxyl radical-induced decomposition of 2'-deoxycytidine in aerated aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4101-4110.
25. Kreutzer, D.A. and Essigmann, J.M. (1998) Oxidized, deaminated cytosines are a source of C → T transitions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 3578-3582.
26. Wagner, J.R., Tremblay, S., Gowans, B., and Hunting, D.J. (1997) Incorporation of two deoxycytidine oxidation products into cellular DNA. *Biochem. Cell Biol.*, **75**, 377-381.
27. Tremblay, S., Douki, T., Cadet, J., and Wagner, J.R. (1999) 2'-Deoxycytidine glycols, a missing link in the free radical-mediated oxidation of DNA. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20833-20838.
28. Rose, R.C. and Bode, A.M. (1995) Analysis of water-soluble antioxidants by high-pressure liquid chromatography. *Biochem. J.*, **306**, 101-105.

29. Lenton, K.J. , Therriault, H., Cantin, A.M., Fulop, T., Payette, H., and Wagner, J.R. (2000) Direct correlation of glutathione and ascorbate and their dependence on age and season in human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.*, **71**, 1194-1200.
30. Lutsenko, A. , Carcamo, J.M., and Golde, D.W. (2002) Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, **277**, 16895-16899.
31. Puskas, F., Gergely, P., Banki, K., and Perl, A. (2000) Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C. *FASEB J.*, **14**, 1352-1361.
32. Welch, R.W., Wang, Y., Crossman, A.J., Park, J.B., Kirk, K.L., and Levine, M. (1995) Accumulation of vitamin C (Ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **270**, 12584-12592.
33. 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**, 2137-2145.
34. Henle, E.S., Luo, Y., Gassmann, W., and Linn, S. (1996) Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated fenton reactions. The deoxyguanosine family. *J. Biol. Chem.*, **271**, 21177-21186.
35. Hu, M.L. and Shih, M.K. (1997) Ascorbic acid inhibits lipid peroxidation but enhances DNA damage in rat liver nuclei incubated with iron ions. *Free Rad. Res.*, **26**, 585-592.
36. Boyer, R.F., Grabill, T.W., and Petrovich, R.M. (1988) Reductive release of ferritin iron: a kinetic assay. *Anal. Biochem.*, **174**, 17-22.
37. Baader, S.L. , Bruchelt, G., Carmine, T.C., Lode, H.N., Rieth, A.G., and Niethammer, D. (1994) Ascorbic-acid-mediated iron release from cellular ferritin and its relation to the formation of DNA strand breaks in neuroblastoma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **120** , 415-421.
38. Baader, S.L. , Bill, E., Trautwein, A.X., Bruchelt, G., and Matzanke, B.F. (1996) Mobilization of iron from cellular ferritin by ascorbic acid in neuroblastoma SK-N-SH cells: an EPR study. *FEBS Lett.*, **381**, 131-134.
39. Steenken, S. (1989) Purine bases, nucleosides, and nucleotides: Aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and electrons and OH adducts. *Chem. Rev.*, **89**, 503-520.
40. Colwell, B.A. and Morris, D.L. (2003) Formation of the oxidative damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine from the nucleoside 2'-deoxyguanosine: parameter studies and evidence of Fe(II) binding. *J. Inorg. Biochem.*, **94**, 100-105.
41. Toyokuni, S. and Sagripanti, J.L. (1996) Association between 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation and DNA strand breaks mediated by copper and iron. *Free Radic. Biol. Med.*, **20**, 859-864.
42. 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.

43. Frelon, S., Douki, T., Favier, A., and Cadet, J. (2003) Hydroxyl radical is not the main reactive species involved in the degradation of DNA bases by copper in the presence of hydrogen peroxide. *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 191-197.

44. Noto, V., Taper, H.S., Jiang, Y.H., Janssens, J., Bonte, J., and DeLoecker, W. (1989) Effects of sodium ascorbate (vitamin C) and 2-methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K3) treatment on human tumor cell growth in vitro. I. Synergism of combined vitamin C and K3 action. *Cancer.*, **63**, 901-906.

45. Michel, L., Dupuy, A., Jean-Louis, F., Sors, A., Poupon, J., Viguier, M., Musette, P., Dubertret, L., Degos, L., Dombret, H., and Bachelez, H. (2003) Arsenic trioxide induces apoptosis of cutaneous T cell lymphoma cells: evidence for a partially caspase-independent pathway and potentiation by ascorbic acid (vitamin C). *J. Investig. Dermat.*, **121**, 881-893.

46. Song, J.H., Shin, S.H., Wang, W., and Ross, G.M. (2001) Involvement of oxidative stress in ascorbate-induced proapoptotic death of PC12 cells. *Exp. Neurol.*, **169**, 425-437.

47. Agus, D.B., Vera, J.C., and Golde, D.W. (1999) Stromal cell oxidation: a mechanism by which tumors obtain vitamin C. *Cancer Res.*, **59**, 4555-4558.

48. Younes, M., Juarez, D., Lechago, L.V., and Lerner, S.P. (2001) Glut 1 expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder is associated with poor patient survival. *Anticancer Res.*, **21**, 575-578.

49. Younes, M., Lechago, L.V., Somoano, J.R., Mosharaf, M., and Lechago, J. (1996) Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Res.*, **56**, 1164-1167.

50. Szatrowski, T.P. and Nathan, C.F. (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.*, **51**, 794-798.

Chapitre IV

Article n° 2:

Oxidation of 5-Hydroxy-2'-Deoxyuridine into Isodialuric Acid, Dialuric Acid and Hydantoin Products

Johann Rivière¹, François Bergeron¹, Sébastien Tremblay¹, Didier Gasparutto², Jean
Cadet² and J. Richard Wagner^{1*}

Publié dans : "Journal of the American Chemical Society"

N°126 (21), p6548-6549, 2004.

¹Canadian Institutes of Health Research Group in the Radiation Sciences, Faculty of
Medicine, University of Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada and ²Département de Recherche
Fondamentale sur la Matière Condensée, SCIB/LAN, CEA/Grenoble, France.

Abstract:

Oxidation products of cytosine, including 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, are highly susceptible to subsequent oxidation. Here, the oxidation products of 5-hydroxy-2'-deoxyuridine have been studied by NMR and MS analyses. The initial products were diastereomers of isodialuric acid nucleoside. These products subsequently decomposed into corresponding dialuric acid derivatives at neutral pH. The position of the carbonyl and hydroxyl groups, at C5 and C6 for isodialuric acid, and at C6 and C5 for dialuric acid derivatives, respectively, was determined by ^1H - and ^{13}C -NMR analyses. In addition, these analyses revealed that the carbonyl groups of both isodialuric and dialuric acid derivatives exist in their fully hydrated form in aqueous solution. Finally, the dialuric acid derivatives were observed to undergo subsequent decomposition into the corresponding 5-hydroxyhydantoin derivatives. Studies of a trinucleotide containing 5-hydroxyuracil suggest that the reactions described herein for the monomer can be extrapolated to DNA.

The biological consequences of DNA damage induced by ionizing radiation and endogenous free radicals are ultimately determined by their structure and chemistry.¹ The oxidation of guanine derivatives has received much attention particularly since it is the base with the lowest ionizing potential in DNA.² For this reason, guanine is the most sensitive and sometimes the only component to undergo oxidation in DNA; for example, guanine is the most sensitive DNA base to riboflavin photosensitization, singlet oxygen and oxidizing metal complexes.³ Interestingly, 8-oxo-7,8-dihydroguanine, one of the main products of guanine oxidation has a lower oxidation potential than guanine, making it highly susceptible to secondary oxidation. Indeed, the oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine is greatly favored over that of guanine under identical conditions.⁴ Cytosine is also an important target of oxidation in DNA; for example, it is particularly sensitive to oxidation by 2-methyl-1,4-naphthoquinone photosensitization, ozone and potassium permanganate.⁵ Similar to the case of guanine in DNA, the oxidation of cytosine gives products that have a relatively low oxidation potential, e.g., 5-hydroxyuracil and 5-hydroxycytosine.⁶ Although the sensitivity of 5-hydroxypyrimidines to KMnO_4 and one-electron oxidants has been reported, there has been little effort to untangle the complicated chemistry of oxidation.⁷ Here, we report the characterization of six products in the oxidation pathway of 5-hydroxy-2'-deoxyuridine (5OHdUrd).

Oxidation of 5OHdUrd (**1**) by either Br_2 (1 equivalent) or Na_2IrBr_6 (5 equivalents) led to the quantitative formation of two polar products (**2a** and **2b**). These products were also formed in good yields by photosensitization using near-UV light and 2-methyl-1,4-naphthoquinone (50%) but less efficiently by treatment with KMnO_4 (10%). When the purified compounds were dissolved in neutral aqueous solution, they were observed to undergo a series of

decompositions. The decomposition of **2a** and **2b** led to **3b** and **3a**, respectively, and the decomposition of either **3a** or **3b** led to a mixture of **4a** and **4b** (fig 4-1; fig 4-2). The above products were identified by NMR and MS analyses. Each product is represented by a pair of diastereomers (e.g., **2a** and **2b**) as inferred by the close similarities in their chromatography, decomposition, and spectral features. Products **4a** and **4b** were identified as diastereomers of 5-hydroxyhydantoin nucleoside by comparison of their $^1\text{H-NMR}$ and MS features with authentic standards. On the other hand, products **2a**, **2b**, **3a**, and **3b** have not previously been reported and their identity was based on more detailed analyses of the most abundant diastereomer (**2b** and **3a**).

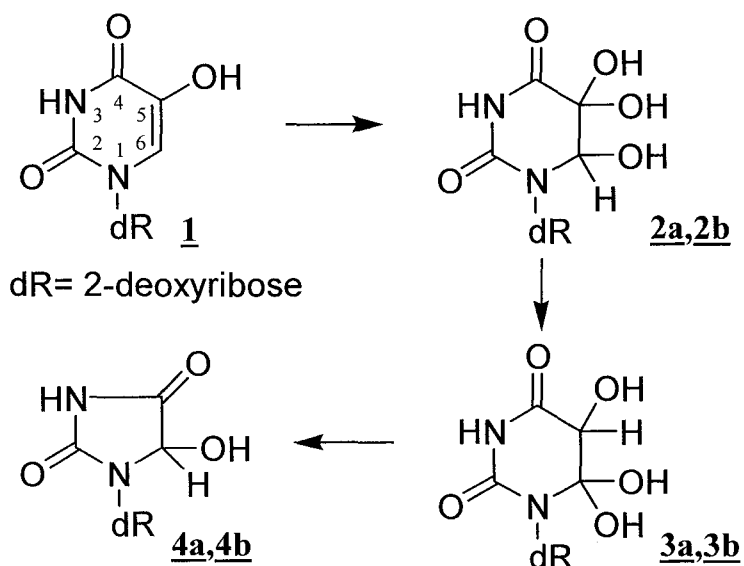


Figure 4-1 : Proposed Mechanism of Oxidation of 5OHdUrd (1)

Product **2b** was identified as the nucleoside derivative of isodialuric acid (fig 4-1). Reduction of **2b** with NaBH_4 gave a single peak that co-eluted and had the same mass as cis 5,6-glycol of dUrd, indicating that **2b** contains a carbonyl group. It should be noted though that the carbonyl of isodialuric acid exists as a hemiacetal as shown by the presence of two

exchangeable OH protons at 6.6 and 6.9 ppm. Similarly, a hydrated structure was proposed in the case of the modified nucleobase.⁸ Additional evidence was provided by the presence of a quaternary carbon at 89 ppm in ¹³C-NMR analysis, which can be assigned to C5 of the hemiacetal. Such a structure is consistent with the initial loss of H₂O from the molecular ion in MS analysis. The position of the CHOH group at C6 was ascertained by additional NMR analyses. The carbon at 78 ppm was assigned to the CHOH group on the basis of DEPT and HETCOR experiments. The chemical shift of this carbon (78 ppm) is very close to the δ value of the C6 carbon of dUrd 5,6-glycols (76 ppm); in contrast, the chemical shift of the C5 carbon of dUrd 5,6-glycols is 10 ppm lower (69 ppm).^{5a} In addition, HMBC experiments suggest that the CHOH group is at C6 because the CH proton shows approximately equal long range coupling with equidistant carbons at C2 and C4.

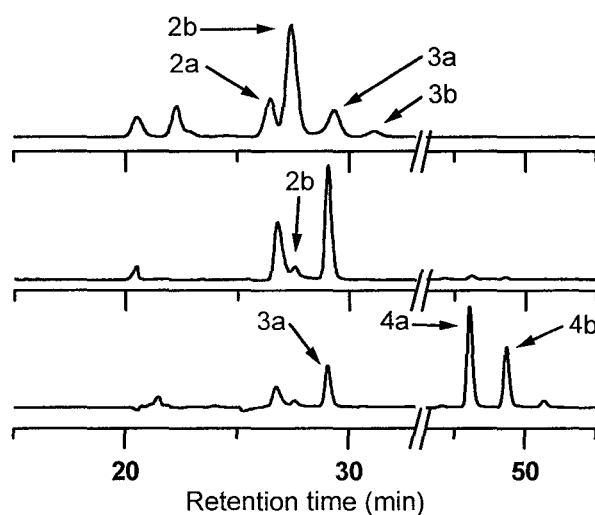


Figure 4-2 : HPLC analysis of 5OHdUrd oxidation products

Top: semi- preparative separation of a partially decomposed mixture in water. Middle: decomposition of purified 2b (2 h; pH 7; 37°C); Bottom: decomposition of purified 3a (24 h; pH 7; 37°C). Amplitude of the peaks corresponds to their relative absorption at 210 nm.

Two other products were characterized in the mixture of decomposition products (peaks 21 and 22 min; **fig 4-2**). The product eluting at 21 min was identified as isodialuric acid nucleobase by comparison with authentic standard.⁸ In contrast, the product at 22 min gave the same mass and nearly identical NMR characteristics as isodialuric acid nucleoside (**2b**) except for changes in the profile of osidic protons.⁹ The formation of these products indicates that **2b** undergoes N1-C6 ring-chain tautomerism leading to an intermediate ureid. An analogous intermediate has been proposed in the interconversion of furanosyl and pyranosyl forms of biruret containing nucleosides.^{5a}

Product **3a** was identified as the nucleoside derivative of dialuric acid (**fig 4-1**). The reduction of **3a** with NaBH₄ was less efficient than that of **2b**, and the reaction not only gave cis 5,6-glycol but also traces of 5-hydroxyhydantoin nucleoside. The presence of exchangeable protons at 6.6 and 6.9 ppm, as well as the corresponding carbon signal at 89 ppm, indicated that **3a** comprises a hydrated carbonyl moiety. The greater downfield shift of CH and OH protons of CHOH by 0.7 and 1.0 ppm downfield, respectively, in **3a** compared to **2b**, is consistent with the presence of two strongly electron withdrawing groups, i.e., a carbonyl at C4 and a hydrated carbonyl at C6, next to CHOH. The ¹³C-NMR spectrum of **3a** was extracted as a minor component from the spectrum of **2b**. Again, the main difference between isodialuric acid (**2b**) and dialuric acid (**3a**) derivatives was the position of the CHOH carbon, which was shifted 11 ppm farther downfield for **3a** compared to **2b** (78 ppm compared to 89 ppm). An alternative structure, in which dialuric acid transforms into an ureid with a carboxylic acid substituent, was ruled out because there was no indication for the presence of a carboxylic acid in ¹H-NMR, ¹³C-NMR or MS/MS analyses. Nevertheless, the difficulties encountered with the analysis of **3b** by NMR are likely related to its conversion into a complex mixture of products under certain conditions, depending on the concentration and pH of the solution. Taken

together, our results indicate that compound **3a** is the nucleoside derivative of dialuric acid, with an OH group at C5 and a hydrated carbonyl group at C6.

The oxidation of 5OHdUrd (**1**) into final stable products includes three steps (Scheme 1). The initial reaction involves nucleophilic substitution of BrOH to give a C5-substituted bromohydrin, similar to the reaction of other pyrimidines.¹⁰ In contrast to other pyrimidines, however, the bromohydrins of 5OHdUrd are not at all stable. The decomposition of pyrimidine bromohydrins under slightly alkaline conditions involves transfer of the hydroxyl group from C6 to C5 and elimination of Br anion giving pyrimidine 5,6-glycols.^{10d} A similar pathway for the unstable bromohydrins of 5OHdUrd directly leads to isodialuric acid products (**2a** and **2b**). The conversion of **2a** and **2b** into dialuric acid (**3a** and **3b**) involves a stereospecific reaction that transfers a proton from C6 to C5, such as α -hydroxyketone isomerization. Finally, it is reasonable to propose that the formation of 5-hydroxyhydantoin products (**4a** and **4b**) involves ring opening of **3a** or **3b**, and decarboxylation of an intermediate ureid bearing an α -hydroxycarboxylic acid. For thymine derivatives, an analogous reaction is not possible presumably because the electron-donating methyl group at C5 stabilizes the corresponding ureid, i.e., N-methyltartronylurea.^{10b}

To explore the oxidation of 5OHdUrd (**1**) in DNA, we subjected d(Tp5HUpT) to oxidation by Na₂IrBr₆ and examined the products by HPLC and ion trap MS. These analyses gave a single product with a mass of 885 m/z, consistent with the formation of either hydrated isodialuric or dialuric acid derivatives (addition of 34 m/z to d(Tp5HUpT)). In addition, subsequent fragmentation of the molecular ion peak gave a peak at 867 m/z, indicating the initial loss of H₂O, similar to monomers (**2a**, **2b**, **3a** and **3b**). These analyses indicate that the same products are formed by oxidation of 5OHdUrd (**1**) and d(Tp5HUpT) in aqueous solution.

Similarly, our studies with longer oligonucleotides containing 5OHdUrd (**1**) point to the same pathway of oxidation, with the formation of products with M+34 m/z.

It is well known that 5OHdUrd (**1**) and 5-hydroxy-2'-deoxycytidine are susceptible to chemical oxidation.⁷ Treatment of synthetic oligonucleotides containing 5OHdUrd with KMnO₄ generates single strand breaks at the modified site.^{7a} Indeed, incorporation of 5OHdUrd, and other easily oxidizable nucleoside analogs, followed by treatment with KMnO₄, has been proposed as a new strategy to detect single-nucleotide polymorphism.^{7b} On the other hand, RNA containing 5OHdUrd catalyzes the oxido-reduction of NADH, suggesting a role of these modifications in ribozymes.^{7c} 5OHdUrd and 5-hydroxy-2'-deoxycytidine are potentially mutagenic and substrates for DNA repair enzymes.¹¹ The ease of secondary oxidation of 5-hydroxy-2'-deoxycytidine may explain some of the discrepancies in its reported mutagenesis.^{11b} It is reasonable to propose that 5-hydroxypyrimidines as relevant targets for further oxidation.

Acknowledgment. We are grateful to the Canadian Institutes of Health Research (MOP-1249) and NATO (CLG.976147).

Supporting Information Available. Details of reaction conditions. ¹H NMR, ¹³C NMR and HMBC of products **2b** and **3a** (see pages 81-84).

Experimental section

5-Hydroxy-2'-deoxyuridine (5OHdUrd) was synthesized by bromination of 2'-deoxyuridine in water followed by treatment with collidine, according to a reported procedure (Fujimoto, J.; Tran, L.; Sowers, L.C. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 1254-1258). High performance liquid chromatography (HPLC) was carried using the following equipment: Model LC-10AD pump (Shimadzu, Tokyo, Japan), Model SIL-HT autoinjector (Shimadzu), Model 480 UV detector (Waters, Milford, MA), and Model RI-3 refractive index detector (Varian Inc., Palo Alto, CA). Data was acquired with the aid of Millennium (v. 3.05.01; Waters). Oxidation products of 5OHdUrd were separated using three octadecylsilyl silica gel columns connected in tandem: the first column was platinum EPS 3 μm 100 $^{\circ}\text{A}$ 53 mm length x 7 mm i.d. (Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL), followed by two ODS-A 5 μm 120 $^{\circ}\text{A}$ 250 mm length x 6 mm i.d. (YMC, Inc, Kyoto, Japan). ^1H NMR and ^{13}C NMR were recorded on a Bruker AM300 spectrometer equipped with an Aspect 3000 computer. Mass spectrometry analyses of nucleosides were performed by ESI-TOF-MS (Q-ToF2, Micromass UK Ltd., Manchester, UK). The samples were dissolved in 50% acetonitrile in water containing 1 mM NaCl, infused at 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ and electrosprayed in positive ion mode with 1.5 kV applied to the solvent. Calibration was performed using a solution of sodium/cesium iodide covering the m/z range from 200 to 1500. The cone voltage was set to 35V and scan time was 2 sec/scan. Mass spectrometry analyses of trinucleotides was carried out by ESI-MS in the negative mode using an LCQ ion trap (ThermoFinnigen, San Jose, CA) and samples (10 μM) dissolved in acetonitrile and water (50/50, v/v) containing 1% triethylamine.

Oxidation of 5-hydroxy-2'-deoxyuridine (5OHdUrd)

The oxidation products of 5OHdUrd were prepared by bromination. Two hundred mg of 5OHdUrd (**1**) was dissolved in 5 ml of water and stirred at 4°C. Small proportions (10-100 μ l) of Br₂ were added until a yellow coloration persisted. The solution was flushed with argon to eliminate traces of Br₂ and kept on ice until purification. Two isomeric products were separated by HPLC (see above) using 0.5% CH₃COOH in water as the mobile phase. The oxidation of 5OHdUrd by Br₂, KMnO₄ and Na₂IrBr₆ was studied in solutions containing 10 mM 5OHdUrd, 2.5-20 mM oxidant and 50 mM sodium phosphate buffer (pH 3-9). The oxidation of 5OHdUrd by photosensitization was carried out by near UV photolysis of 10 mM 5-oh-dUrd and 0.5 mM 2-methyl-1,4-naphthoquinone in aerated aqueous solution. Lastly, the oxidation of d(Tp5HUpT) (200 μ M) was done by treatment with Na₂IrBr₆ (200 μ M) in phosphate buffered water (10 mM, pH 7.0) containing 100 mM NaCl. The mixture was left at room temperature for 1 h and the product was purified by reversed phase HPLC (50 mM TEAE) using a gradient elution from 2 to 20% CH₃CN in water over a period of 30 m. The product eluted at 20 min d(Tp5HUpT) was prepared on a DNA synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The trinucleotide was deprotected and purified by HPLC before experiments.

1-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-isodialuric acid (2a, minor isomer). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, TMS): 10.3 (s, 1, N₃H), 6.7 (s, 1, C₅OH), 6.6 (s, 1, C₅OH), 5.9 (dd, 1, H_{1'}), 6.1 (d, 1, C₆OH), 5.1 (d, 1, C_{3'}OH), 4.7 (t, 1, C_{5'}OH), 4.7 (d, 1, H₆), 4.1 (m, 1, H₃), 3.4 (m, 1, H₄), 3.4 (m, 2, H₅, H_{5''}), 2.1 (m, 1, H₂), 1.8 (m, 1, H_{2''}). LC/MS ES+ (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity): 579 (2M-2H+Na, 25), 301 (M-H+Na, 100).

1-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-isodialuric acid (2b, major isomer). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, TMS): 10.3 (s, 1, N₃H), 6.9 (s, 1, C₅OH), 6.6 (s, 1, C₅OH), 6.1 (pst, 1, H_{1'}), 5.9 (d, 1, C₆OH), 5.2 (d, 1, C₃'OH), 5.0 (t, 1, C₅'OH), 4.6 (d, 1, H₆), 4.1 (m, 1, H₃), 3.4 (m, 1, H₄), 3.4 (m, 2, H₅, H₅^{''}), 2.1 (m, 1, H₂), 1.9 (m, 1, H₂^{''}). ¹³C-NMR (100.62 MHz, D₂O, TMS): 169 (C=O), 152 (C=O), 88.5 (C₅), 85.2 (C₄), 84.9 (C₁'), 77.9 (C₆), 70.1 (C₃'), 60.9 (C₅'), 36 (C₂'). LC/MS ES+ (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity): 579 (2M-2H+Na, 25), 301 (M-H+Na, 100). LC/MS/MS 301 m/z (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity) 301 (M-H+Na, 100); 283 (M-H+Na-H₂O, 80); 255 (5); 185 (M-H+Na-sugar, 20); 167(45); 139 (30).

1-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-dialuric acid (3a, major isomer). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, TMS): 11 (br, 1, N₃H), 7.0 (br, 1, C₅OH), 6.9 (s, 1, C₆OH), 6.6 (s, 1, C₆OH), 5.8 (pst, 1, H_{1'}), 5.3 (d, 1, C₅H), 5.1 (d, 1, C₃'OH), 4.8 (t, 1, C₅'OH), 4.1 (m, 1, H₃), 3.6 (m, 1, H₄), 3.4 (m, 2, H₅, H₅^{''}), 2.4 (m, 1, H₂), 1.9 (m, 1, H₂^{''}). ¹³C-NMR (100.62 MHz, D₂O, TMS): 173 (C=O), 156 (C=O), 89.3 (C₅), 87.6 (C₆), 85.7 (C₄'), 82.3 (C₁'), 71.1 (C₃'), 61.7 (C₅'), 35 (C₂'). LC/MS ES+ (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity): 579 (2M-2H+Na, 30), 301 (M-H+Na, 100). LC/MS/MS 301 m/z (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity) 301 (M-H+Na, 65); 283 (M-H+Na-H₂O, 100); 255 (5); 283 (45); 255 (45); 185 (M-H+Na-sugar, 95); 167(10); 139 (40).

1-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-dialuric acid (3b, minor isomer). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, TMS): 10.9 (br, 1, N₃H), 7.0 (br, 1, C₅OH), 6.9 (s, 1, C₆OH), 6.5 (s, 1, C₆OH), 5.6 (dd, 1, H_{1'}), 5.2 (d, 1, C₅H), 5.1 (d, 1, C₃'OH), 4.7 (t, 1, C₅'OH), 4.1 (m, 1, H₃), 3.6 (m, 1, H₄), 3.4 (m, 2, H₅, H₅^{''}), 2.4 (m, 1, H₂), 1.9 (m, 1, H₂^{''}). LC/MS ES+ (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity): 579 (2M-2H+Na, 30), 301 (M-H+Na, 100).

1-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-hydroxyhydantoin (4a). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, TMS): 11 (br, 1, N₃H), 6.9 (d, 1, C₅OH), 5.8 (pst, 1, H_{1'}), 5.3 (d, 1, C₅H), 4.1 (m, 1, H_{3'}), 3.6 (m, 1, H_{4'}), 3.4 (m, 2, H_{5'}, H_{5''}), 2.4 (m, 1, H_{2'}), 1.8 (m, 1, H_{2''}). LC/MS ES+ (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity): 531 (2M-H+2Na, 20), 277 (M-H+2Na, 30), 255 (M+Na, 100). LC/MS/MS 301 m/z (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity) 255 (M+ Na, 100); 182 (40); 139 (45); 113 (35); 80 (5).

1-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-hydroxyhydantoin (4b). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, TMS): 10.9 (br, 1, N₃H), 6.9 (br, 1, C₅OH), 5.6 (pst, 1, H_{1'}), 5.2 (d, 1, C₅H), 5.3 (d, 1, H_{5'}), 4.1 (m, 1, H_{3'}), 3.6 (m, 1, H_{4'}), 3.4 (m, 2, H_{5'}, H_{5''}), 2.4 (m, 1, H_{2'}), 1.8 (m, 1, H_{2''}). LC/MS ES+ (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity): 531 (2M-H+2Na, 20), 277 (M-H+2Na, 35), 255 (M+Na, 100).

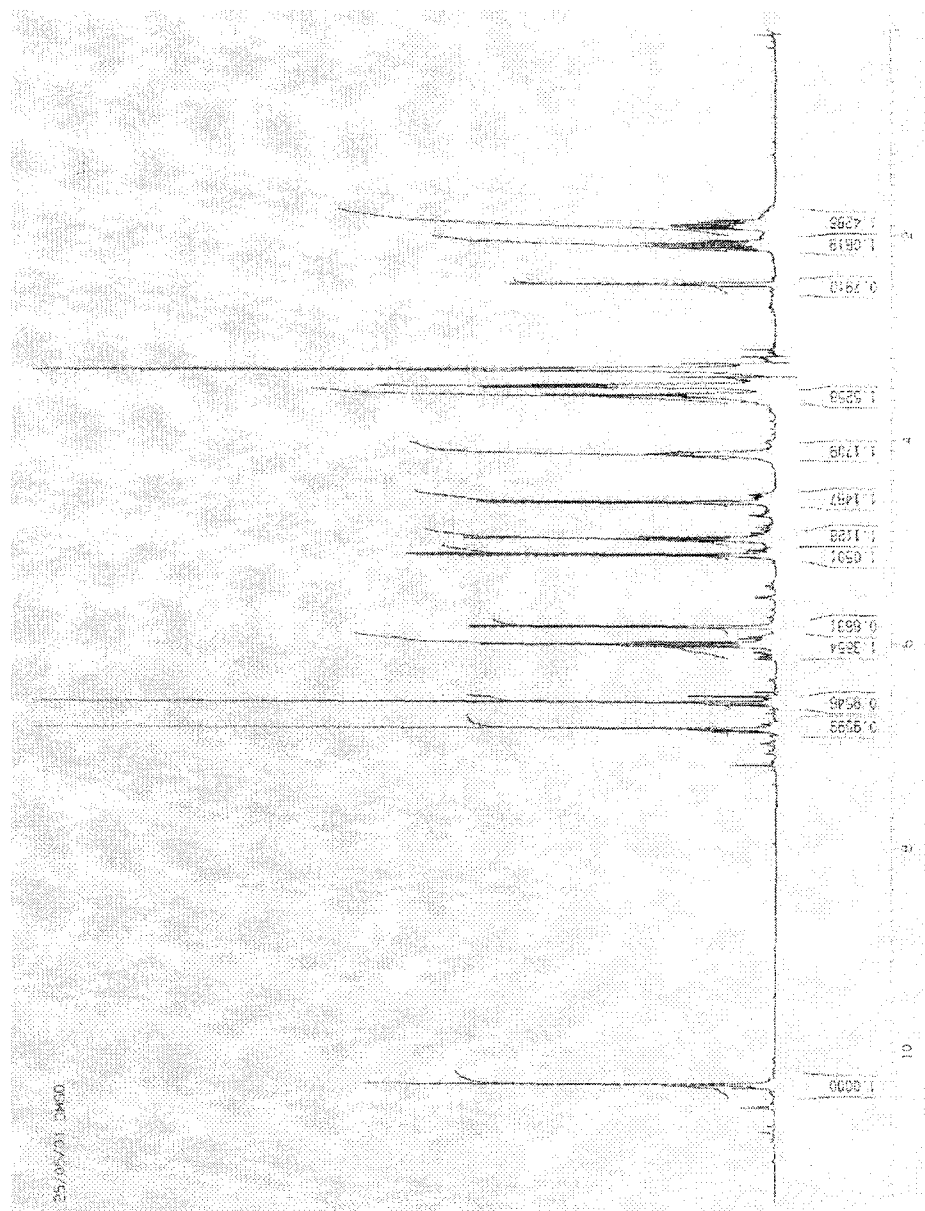


Figure 4-3 : $^1\text{H-NMR}$ of product 2b in DMSO-d_6
(chemical shifts in Experimental Section).

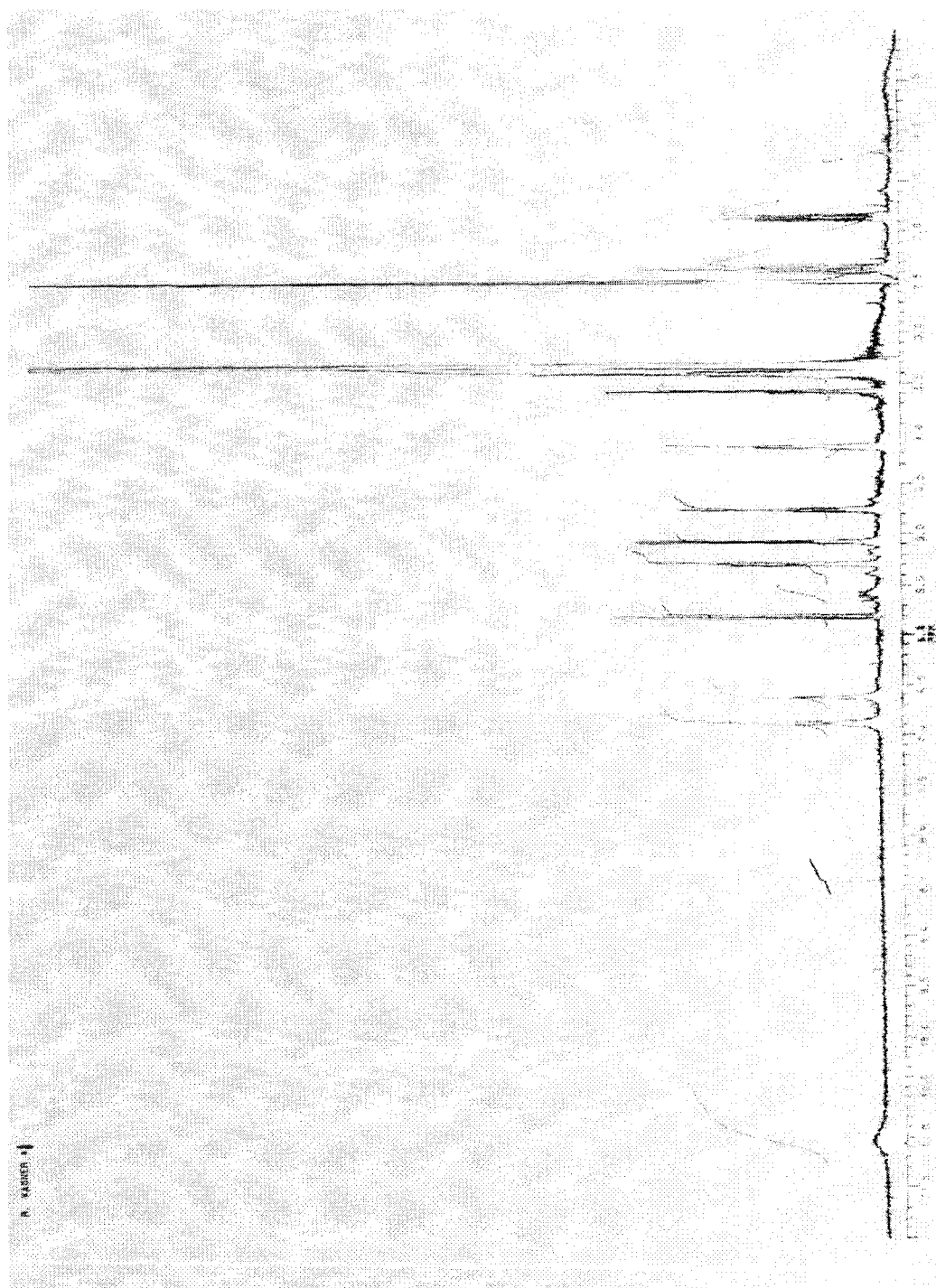


Figure 4-4 : $^1\text{H-NMR}$ of product 3a in DMSO-d_6
(chemical shifts in Experimental Section).

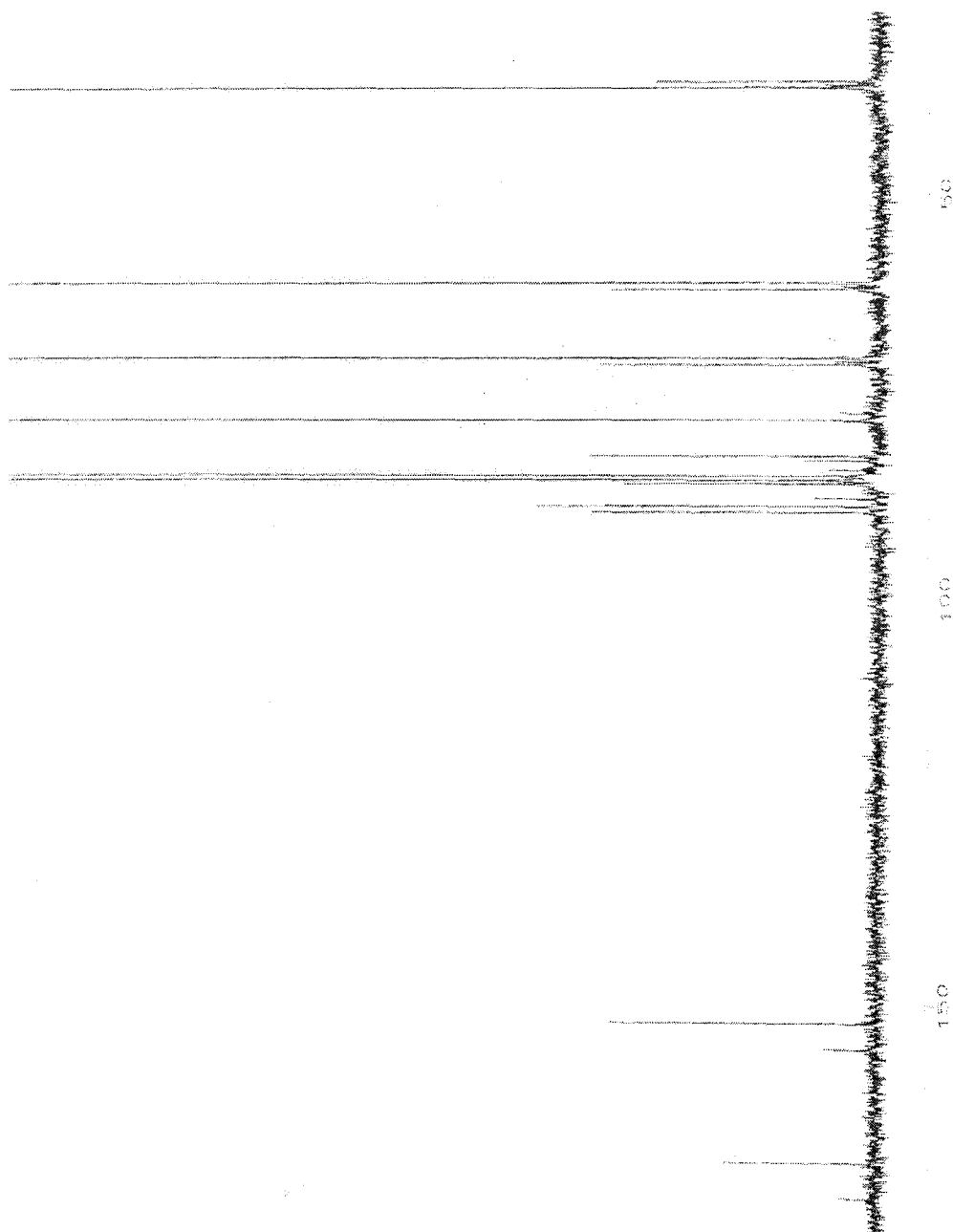


Figure 4-5 : ^{13}C -NMR of product 2b

The spectrum shows two compounds. The major compound is product 2b and the minor compound is 3a. (chemical shifts in Experimental Section).

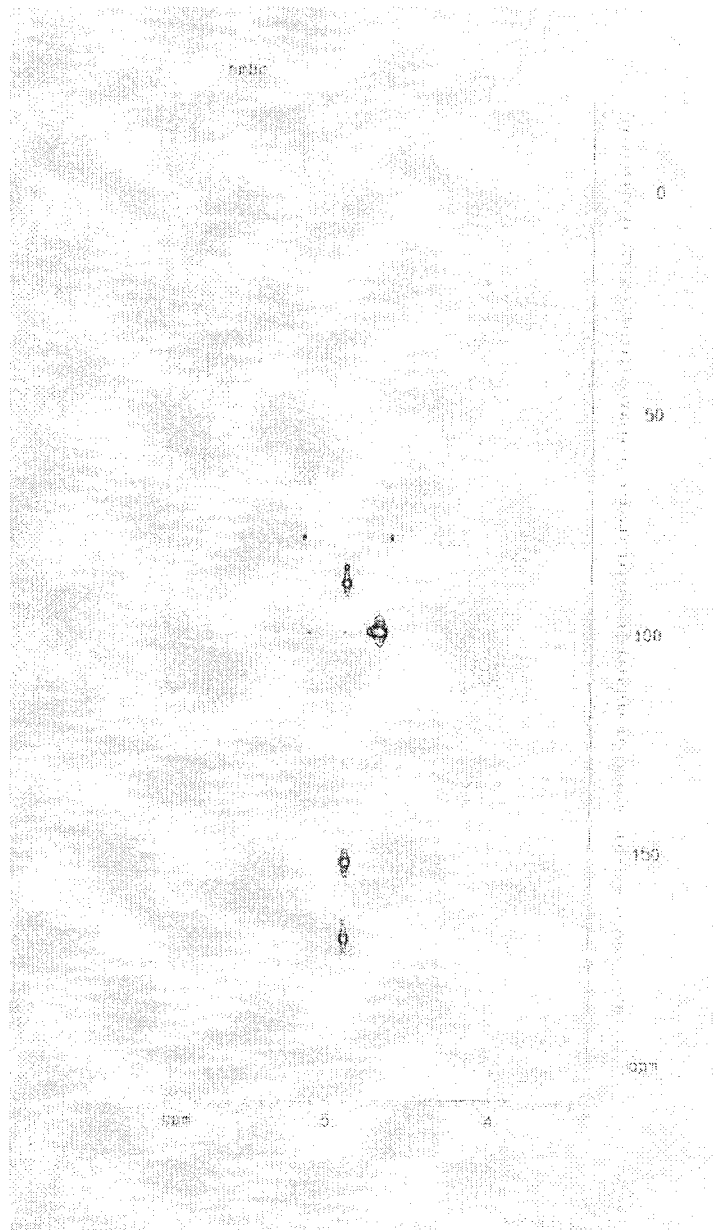


Figure 4-6 : HMBC of product 2b

References

- (1) (a) Cadet J; Delatour T; Douki T; Gasparutto D; Pouget JP; Ravanat JL; Sauvaigo S *Mutat. Res.* **1999**, 424, 9-21. (b) Wallace, S. S. *Free Rad. Biol. Med.* **2002**, 33, 1-14.
- (2) (a) Steenken, S.; Jovanovic, S. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 617-618. (b) Sugiyama H; Saito I *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7063-7068.
- (3) (a) Douki T; Cadet J *Int. J. Radiat. Biol.* **1999**, 75, 571-581. (b) Burrows, C. J.; Muller, J. G. *Chemical Reviews* **1998**, 98, 1109-1151.
- (4) (a) Ravanat, J. L.; Saint-Pierre, C; Cadet, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 2030-2031. (b) J. Duarte, V.; Gasparutto, D.; Yamaguchi, L. F.; Ravanat, J. L.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P.; Cadet, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12622-12628. (c) Luo, W. C.; Muller, J. G.; Rachlin, E. M.; Burrows, C. J. *Org. Lett.* **2000**, 2, 613-616. (d) Tretyakova, N. Y.; Niles, J. C.; Burney, S.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, 12, 459-466.
- (5) (a) Wagner JR; Decarroz C; Berger M; Cadet J *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 4101-4110. (b) Bienvenu C; Wagner JR; Cadet J *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11406-11411. (c) Girault, I.; Fort, S.; Molko, D.; Cadet, J. *Free Rad. Res.* **1997**, 26, 257-266. (d) Hayatsu, H. *J. Biochem.* **1996**, 119, 391-395.
- (6) Wagner, J. R.; Hu, C. C.; Ames, B. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 3380-3384.
- (7) (a) Fujimoto, J.; Tran, L.; Sowers, L. C. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10, 1254-8. (b) Wolfe, J. L.; Kawate, T.; Sarracino, D. A.; Zillmann, M.; Olson, J.; Stanton, V. P.; Verdine, G. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 11073-11078. (c) Yanagawa, H.; Ogawa, Y.; Ueno, M. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 13320-6.
- (8) (a) Schuchmann, M. N.; von Sonntag, C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1983**, 1525-1531.
- (9) ¹H-NMR analysis suggest that isodialuric acid attached to an α -pranosyl moiety because of the chemical shift of H1' (5.5 ppm) and H4' (<4 ppm) and large coupling between H1'-H2' (9.7 Hz).
- (10) (a) Bienvenu, C.; Cadet, J. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2632-2637. (b) Wagner, J. R.; van Lier, J. E.; Berger, M.; Cadet, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2235-2242. (c) Harayama, T.; Yanada, R.; Iio, K.; Yoneda, F. *Nucl. Acids Symp.* **1986**, 17, 25-82. (d) Ryang, H. S.; Wang, S. Y. *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 1191-1192.
- (11) (a) Feig, D. I.; Sowers, L. C.; Loeb, L. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 6609-13. (b) Kreutzer, D. A.; Essigmann, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 3578-3582.

Chapitre V

Article n°3 :

**Oxidation of 5-hydroxypyrimidine nucleosides to a mixture of four N¹-
(2-deoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-hydroxyhydantoin isomers**

Johann Rivière and J. Richard Wagner

Accepté pour publication à “*chemical Research in Toxicology*”, Juin 2005

Abstract

The reaction of hydroxyl radicals with 2'-deoxycytidine (dCyd), as well as the decomposition of dCyd radical cations, leads to a complex mixture of oxidation products in aqueous aerated solutions. The oxidation of dCyd gives products with a relatively low oxidation potential that are highly susceptible to further oxidation, including 5-hydroxy-2'-deoxycytidine (5OHdCyd) and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine (5OHdUrd). Previously, we showed that the oxidation of 2'-deoxyuridine (dUrd) involves the formation of dialuric acid and isodialuric acid intermediates, followed by fragmentation of isodialuric acid to N¹-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-hydroxyhydantoin (5OHdHyd). In this work, we have examined the oxidation of 5OHdCyd and 5OHdUrd in greater detail. The oxidation of these substrates by Br₂ led to a similar profile of intermediate and stable products indicating that the dialuric and isodialuric acid derivatives of dCyd undergo deamination in part before they transform into 5OHdHyd. Analysis of the final mixture of oxidation products by HPLC revealed the formation two novel products. On the basis of NMR and MS, these products were identified as the diastereomers of N¹-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-4-hydroxyimidazolidine-2,5-dione (4OHisodHyd). These products arise from the transformation of purified 5OHdHyd under neutral conditions. The isomerization of 5OHdHyd to 4OHisodHyd was reversible and each diastereomer produced a specific diastereomer of the other structural isomer. The rate of isomerization was accelerated in going from pH 5 to pH 9, whereas all isomers decomposed at higher pH. In contrast, interconversion between each pair of diastereomers was minor. Thus, we conclude that the oxidation of 5OHdCyd or 5OHdUrd predominantly gives a mixture of 5OHdHyd and iso-5OHdHyd under neutral conditions. The biological consequences of dCyd

oxidation will ultimately depend on the effects of both products on DNA repair and mutagenesis.

KEYWORDS: Oxidative DNA damage, DNA repair, 5-hydroxy-2'-deoxycytidine, 5-hydroxy-2'-deoxyuridine, HPLC analysis, nuclear magnetic resonances, mass spectrometry.

Introduction

The structure of DNA damage determines to a large extent the biochemical steps that take place in signalling processes, DNA repair, and mutagenesis [2;3;24]. 2'-deoxycytidine (dCyd) is sensitive to oxidation by γ irradiation in aqueous solutions, photosensitization with UV light and 2-methyl-1,4-naphthoquinone, exposure to various chemical oxidants, including ozone potassium permanganate, and peroxyxynitrite [9;11;21]. 5OHdCyd is a major oxidation product of dCyd in DNA, and it has been detected at relatively high levels in various rats tissues and primary human lymphocytes [14;22]. 5OHdUrd is also produced in DNA depending on the oxidant and experimental conditions. In general, the oxidation products of dCyd are expected to have a relatively high mutagenic potential because saturation of the pyrimidine 5,6-double bond greatly accelerates subsequent loss of the amino group at C4 involved in base pairing in duplex DNA. For example, two major products of oxidation of dCyd, 5OHdUrd and 2'-deoxyuridine 5,6-glycols, give rise to C to T transitions with a frequency of about 80% when the oligonucleotides containing these modifications are inserted in bacteria [13;20].

Of the four bases of DNA, 2'-deoxyguanosine (dGuo) has received the most attention mainly because it has the lowest oxidation potential and thus it is the most susceptible to oxidizing agents [19]. A major product of oxidation of dGuo, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dGuo), has been used as a biomarker of oxidative DNA damage that causes G to T transversions [3]. In contrast, the endogenous levels of 5OHdCyd are comparable to those of oxidation of 8-oxo-dGuo, suggesting that 5OHdCyd may also be a useful biomarker of oxidative DNA damage. The levels of 5OHdCyd even surpassed those of

8-oxo-dGuo by several fold when Jurkat cells containing a high intracellular concentration of ascorbate were exposed to H₂O₂ [18].

It has been shown that the 8-oxo-dGuo is susceptible to secondary oxidation because of its low oxidation potential, which is lower than that of the dGuo, leading to the formation of several final oxidation products [5;16]. In the same way, 5OHdUrd and 5OHdCyd have a low oxidation potential and they have a tendency to undergo subsequent oxidation; in fact, the oxidation potential of 5OHdCyd is slightly lower than that of 8oxodGuo [17]. Several studies have reported the efficient formation of strand breaks by chemical oxidation of oligonucleotides containing 5OHdUrd and 5OHdCyd using KMnO₄ as an oxidizing agent [7]. However, the chemistry of this oxidation reaction remains poorly understood. Recently, we showed that the oxidation of 5OHdUrd by Br₂, Na₂IrBr₆ or photosensitization induces a cascade of transformations, giving isodialuric acid, dialuric acid and 5-hydroxyhydantoin products [17]. In the present work, we have extended the latter studies to 5OHdCyd, and report close similarities between the oxidation of 5OHdUrd and 5OHdCyd. Interestingly, although 5OHdHyd appeared to be the final product in both reactions, we have found that these products transform further into novel isomers under neutral conditions. The fascinating chemistry of these products will be reported here in greater detail.

Experimental procedure

Chemicals and instrumentation. 2,4,6-Collidine, deuterium oxide, d_6 -dimethylsulfoxide, 2'-deoxyuridine (dUrd) and 2'-deoxycytidine (dCyd) were purchased from Aldrich (St Louis, MO). Phosphoric acid was obtained from Sigma (St Louis, MO); NaOH from Fluka (Steineim, Germany); and bromine from Baker (Phillipsburgh, NJ). Two HPLC systems were used throughout this study. HPLC system #1 consisted of a Model 510 pump (Waters Ass.), a manual injector (Rheodyne), and a RI-3 refractive index detector (Varian) connected to a linear chart recorder. HPLC system #2 consisted of a column heater (Eppendorf), a 616 pump, 717 autosampler connected to a 996 PDA detector, and controlled by Millennium 32 data acquisition software (Waters Associates). $^1\text{H-NMR}$ analyses were routinely performed on a AM300 (Bruker). $^{13}\text{C-NMR}$ and HMBC were carried out on a 600 MHz machine (Unity Inova 600/51 AS, Varian). Mass spectrometry analyses of nucleosides were performed by ESI-TOF-MS (Q-Tof2, Micromass UK Ltd., Manchester, UK). Samples were dissolved in 50% acetonitrile in water containing 1 mM NaCl, infused at 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ and electrosprayed in positive ion mode with 1.5 kV applied to the solvent. Calibration was performed using a solution of sodium/cesium iodide covering the m/z range from 200 to 1500. The cone voltage was set to 35 V and scan time was 2 sec/scan.

Synthesis of 5-hydroxy-2'-deoxycytidine (5OHdCyd) and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine (5OHdUrd). Initial bromination of dCyd was carried out by the drop-by-drop addition of Br_2 to dCyd (2 g) in water (50 ml) at 4°C until the solution changed to a persistently light yellow color. The solution was subsequently stirred to remove excess Br_2 . To convert the corresponding bromohydrin to 5OHdCyd, 10% (v/v) 2,4,6-collidine was added and the

solution heated at 50°C for 1 h. The solution was extracted with an equal amount of diethyl ether and concentrated to dryness on a rotary evaporator. The product was then purified by HPLC system #1 (see above) using an ODS reversed phase column (250 mm x 10 mm, 5 µm particle size, YMC, Kyoto, Japan) and a flow rate of 2 ml/ min with 15% methanol in water as the mobile phase. Peaks between 9 and 18 min were collected and re-purified using the same column and flow rate, but with 5% methanol in 10 mM formate buffer. The peak at 19 min was collected, concentrated to 10 ml and lyophilized to dryness under a vacuum pump. Similarly, 5OHdUrd was synthesized by bromination of dUrd in water as described above for 5OHdCyd. After extraction with diethyl ether, the aqueous phase was concentrated by rotary evaporation and dried on a vacuum pump. The residue was dissolved in 10 ml of water and an equal volume of chloroform was added. The product was collected as a flaky white powder and subsequently purified by recrystallization in methanol.

Oxidation of 5-hydroxy-2'-deoxyuridine (5OHdUrd) and 5-hydroxy-2'-deoxycytidine (5OHdCyd). The oxidation of 5OHdUrd and 5OHdCyd was carried out by bromination in phosphate buffer 50 mM pH 7 at 4°C. One hundred mg of 5OHdUrd or 5OHdCyd were dissolved in 10 ml of water and stirred at 4°C and Br₂ was added drop-wise to the solution until a light yellow color persisted. The solution was bubbled with air to eliminate traces of Br₂ and incubated at 37°C for 48 h. The oxidation products were purified by HPLC system #2 using an ODS reversed phase column (250 x 6.0 mm, 5 µm, YMC) and water as the mobile phase. The diastereomers of 5OHdHyd eluted at 9.8 min and 10.7 min whereas the diastereomers of iso-5OHdHyd eluted at 13,0 and 14,5 min. The products were collected and lyophilized to dryness under a vacuum pump.

Reduction of N¹-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-hydroxyhydantoin (5OHdHyd) and N¹-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-hydroxyimidazolidine-2,5-dione (4OHisoHyd) by NaBH₄. The product (5b, 6b; 0.072 mmol) was dissolved in 7 ml of ethanol and two equivalents of NaBH₄ (0,142 mmol) was added in small portions. The reaction was stopped after 20 min by the addition of glacial acetic acid. The mixture was evaporated to dryness and re-suspended in water.

Rates of decomposition as a function of pH. Purified diastereomers of 5OHdHyd and iso-5OHdHyd were dissolved in phosphate buffer 50 mM at pH 5, 7 or 9 and incubated at 37°C within the auto-injector of HPLC system #2. The products were separated on an ODS reversed phase column (250 x 6.0 mm, 5μm YMC) with 50 mM phosphate buffer (pH 5.5). The decomposition of each product was monitored by UV detection at 211 nm.

N¹-(2'-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-hydroxyhydantoin (5a). ¹H-NMR (300 MHz, D₂O, TMS): 5.81 (pst, 1, H_{1'}), 5.36 (s, 1, C₅H), 4.21 (m, 1, H_{3'}), 3.74 (m, 1, H_{4'}), 3.55 (m, 1, H_{5'}), 3.48 (m, 1, H_{5''}), 2.39 (m, 1, H_{2'}), 2.03 (m, 1, H_{2''}). ¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, TMS): 6.3 (br, 1, C₅OH), 5.8 (pst, 1, H_{1'}), 5.1 (s, 1, H₅), 5.0 (d, 2, C_{3'}OH), 4.7 (br, 1, C₅OH), 4.1 (m, 1, H_{3'}), 3.6 (m, 1, H_{4'}), 3.5-3.2 (m, 2, H_{5'}, H_{5''}), 2.3 (m, 1, H_{2'}), 1.8 (m, 1, H_{2''}). ¹³C-NMR (600 MHz, D₂O, TMS): 176 (C₄), 158 (C₂), 86 (C_{4'}), 82 (C_{1'}), 77 (C₅), 70 (C_{3'}), 62 (C_{5'}), 36 (C_{2'}). LC/MS ES+ (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity): 255 (M+Na, 100), 199 (20). LC/MS/MS 255 m/z (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity) 255 (M+Na, 100), 182 (25), 156 (5), 139 (2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranose + Na, 20), 113 (5).

N¹-(2'-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-hydroxyhydantoin (5b). ¹H-NMR (300 MHz, D₂O, TMS): 5.71 (pst, 1, H_{1'}), 5.29 (s, 1, C₅H), 4.25 (m, 1, H_{3'}), 3.74 (m, 1, H_{4'}), 3.54 (m, 1, H_{5'}), 3.50 (m, 1, H_{5''}), 2.37 (m, 1, H_{2'}), 2.00 (m, 1, H_{2''}). ¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, TMS): 10.9 (br, 1, N₃H), 6.9 (br, 1, C₅OH), 5.6 (pst, 1, H_{1'}), 5.2 (s, 1, H₅), 5.1 (d, 2, C_{3'}OH), 4.6 (br, 1, C_{5'}OH), 4.2 (m, 1, H_{3'}), 3.7 (m, 1, H_{4'}), 3.5-3.2 (m, 2, H_{5'}, H_{5''}), 2.4 (m, 1, H_{2'}), 1.9 (m, 1, H_{2''}). LC/MS ES+ (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity): 255 (M+Na, 100), 199 (5). LC/MS/MS 255 m/z (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity) 255 (M+Na, 100), 182 (45), 139 (2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranose + Na, 35), 113 (25).

N¹-(2'-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-4-hydroxyimidazolidine-2,5-dione (6a). ¹H-NMR (300 MHz, D₂O, TMS): 5.69 (pst, 1, H_{1'}), 5.35 (s, 1, C₅H), 4.18 (m, 1, H_{3'}), 3.86 (m, 1, H_{4'}), 3.55 (m, 1, H_{5'}), 3.45 (m, 1, H_{5''}), 2.47 (m, 1, H_{2'}), 2.08 (m, 1, H_{2''}). ¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, TMS): 10.8 (br, 1, N₃H), 7.0 (br, 1, C₅OH), 5.7 (pst, 1, H_{1'}), 5.4 (d, 2, C_{3'}OH), 5.2 (s, 1, H₅), 4.7 (br, 1, C_{5'}OH), 4.1 (m, 1, H_{3'}), 3.7 (m, 1, H_{4'}), 3.5-3.2 (m, 2, H_{5'}, H_{5''}), 2.3 (m, 1, H_{2'}), 2.1 (m, 1, H_{2''}). ¹³C-NMR (600 MHz, D₂O, TMS): 174 (C₄), 157 (C₂), 84 (C_{1'}), 81 (C_{4'}), 78 (C₅), 70 (C_{3'}), 61 (C_{5'}), 35 (C_{2'}). LC/MS ES+ (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity): 255 (M+Na, 100), 244 (5), 158 (5), 70 (5). LC/MS/MS 255 m/z (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity) 255 (M+Na, 70), 182 (20), 156 (5), 139 (2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranose + Na, 100), 113 (10).

N¹-(2'-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-4-hydroxyimidazolidine-2,5-dione (6b). ¹H-NMR (300 MHz, D₂O, TMS): 5.77 (pst, 1, H_{1'}), 5.53 (s, 1, C₅H), 4.22 (m, 1, H_{3'}), 4.00 (m, 1, H_{4'}), 3.60 (m, 1, H_{5'}), 3.48 (m, 1, H_{5''}), 2.49 (m, 1, H_{2'}), 2.36 (m, 1, H_{2''}). ¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, TMS): 10.9 (br, 1, C₄OH), 7.0 (br, 1, C₅OH), 5.7 (pst, 1, H_{1'}), 5.4 (d, 2,

C₃'OH), 5.3 (s, 1, H₅), 4.7 (br, 1, C₅'OH), 4.1 (m, 1, H₃'), 3.8 (m, 1, H₄'), 3.5-3.2 (m, 2, H₅',H₅''), 2.5 (m, 1, H₂'), 2.3 (m, 1, H₂''). LC/MS ES+ (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity): 255 (M+Na, 45), 229 (25), 199 (30), 158 (100), 70 (70). LC/MS/MS 255 m/z (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity) 255 (M+Na, 100), 182 (10), 160 (5), 139 (2-deoxy-β-D-*erythro*-pentofuranose + Na,25), 113 (5).

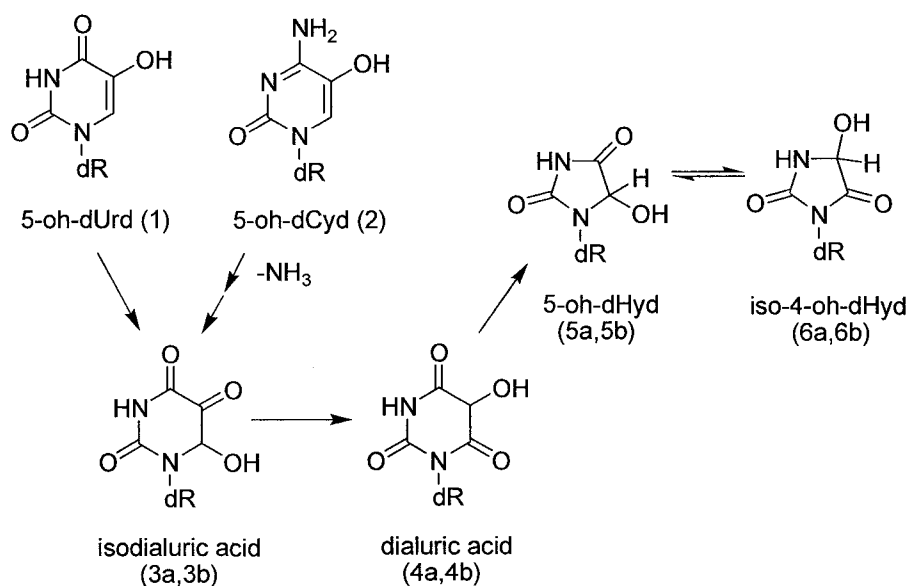
1-(2'-deoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-4,5-dihydroxy-imidazolidin-2-one (7). ¹H-NMR (300 MHz, D₂O, TMS): 5.62 (pst, 1, H₁'), 5.24 (d, 1, C₅H) 5.09 (d, 1, C₄H), 4.27 (m, 1, H₃'), 3.78 (m, 1, H₄'), 3.56 (m, 1, H₅'), 3.53 (m, 1, H₅''), 2.42 (m, 1, H₂'), 1.93 (m, 1, H₂'').

Results and discussion

Oxidation of 5OHdUrd and 5OHdCyd

The oxidation of 5OHdUrd and 5OHdCyd to stable products involves a sequence of steps (**Scheme 5-1**). The bromination of 5OHdUrd at 4°C initially leads to two diastereomers of the nucleoside derivative of isodialuric acid (3a and 3b). These products were not separated under the present chromatography conditions (**fig 5-1**). Similarly, the oxidation of 5OHdCyd gave a single polar peak at 5 min by HPLC analysis with the same retention time as that observed in the oxidation of 5OHdUrd (**fig 5-1**). This suggests that the bromination of 5OHdUrd and 5OHdCyd lead to the same or similar intermediates. The second step in the oxidation of 5OHdUrd involves the conversion of isodialuric acid to dialuric acid derivatives (4a and 4b). Previously, we showed that each diastereomer of isodialuric acid transforms into a single diastereoisomer of dialuric acid (3a gives 4b whereas 3b gave 4a). At early times of decomposition (<12 h), the oxidation of either 5OHdUrd or 5OHdCyd led to a peak at 5.8 min, suggesting that products 4a and 4b or analogous products were formed in both oxidation reactions. This peak disappeared at later times of decomposition with the growth of several other peaks (**fig 5-1**). The profile of stable products shows several other peaks that were common to the mixture of stable oxidation products of both 5OHdUrd and 5OHdCyd. In particular, the peaks at 9.9 and 10.3 as well as those at 12.6 and 14.5 min appeared in the analysis of both mixtures. The similarity between the two mixtures suggests that intermediate dialuric acid or isodialuric acid derivatives of 5OHdCyd undergo deamination leading to the same intermediates as in the oxidation of 5OHdUrd. This is consistent with an increase in the hydrolysis of the exocyclic amino group upon saturation of the 5,6-double bond of dCyd. For example, 5,6-glycols of dCyd undergo deamination to the 5,6-glycols of dUrd in aqueous

solution. Nevertheless, there are several additional peaks in the profile of 5OHdCyd oxidation products. These peaks might be derivatives of 5OHdHyd and 4OHisoHyd that retain the amino group at C4. Although the amino derivative of 5OHdHyd has not been detected in the spectrum of products in the oxidation of 5OHdCyd, the oxidation of 5-methyl-2'-deoxycytidine gives analogous hydantoin derivatives, which retains the exocyclic amino group ([1]. Thus, we conclude that the oxidation of 5OHdUrd and 5OHdCyd are very similar in terms of the final profile of stable oxidation products.



Scheme 5-1 : Mechanism of oxidation of 5-hydroxy-2'-deoxyuridine and 5-hydroxy-2'-deoxycytidine

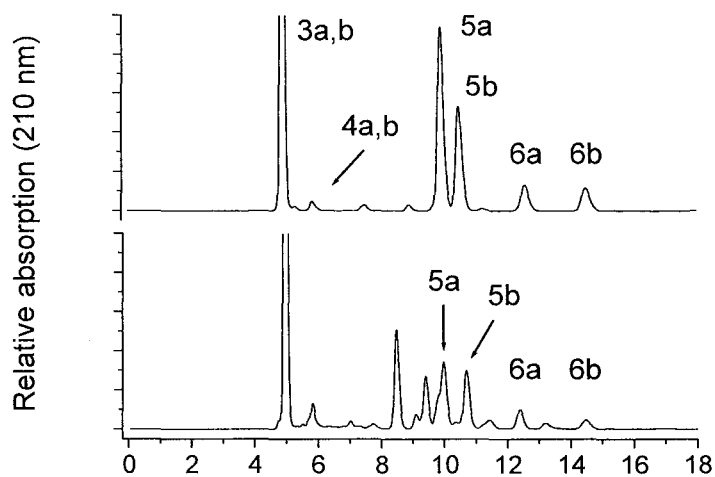


Figure 5-1 : HPLC profile of 5-hydroxy-2'-uridine and 5-hydroxy-2'-deoxycytidine oxidation products

Upper chromatogram shows oxidation products of 5OHdUrd and lower chromatogram, oxidation products of 5OHdCyd after incubation at 37°C at pH 7.4.

Products 5a and 5b are diastereomers of N^1 -(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5-hydroxyhydantoin (5OHdHyd) and products 6a and 6b to the corresponding alpha-hydroxyl ketone isomers (structures shown in Scheme 5-1).

Analysis of novel decomposition products of 5OHdHyd

The decomposition of 5OHdUrd and 5OHdCyd oxidation products revealed two previously non-identified peaks (**fig 5-1**). These peaks specifically arose from the decomposition of purified 5OHdHyd such that product 5a gave product 6a whereas product 5b gave product 6b (**fig 5-2**). $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and mass spectrometry analysis indicated that 6a and 6b were nucleosides with a modified base and intact sugar moiety. Moreover, these analyses indicate that the modified base moiety is analogous to 5-hydroxyhydantoin except that the position of the C4 carbonyl and C5 hydroxyl groups are interchanged (**Scheme 5-1**). The $^1\text{H-NMR}$ spectra of 6a and 6b depicted eight non-exchangeable protons (**fig 5-3**), of which seven protons were assigned to the sugar moiety on the basis of proton coupling constants and comparison with 5OHdHyd. The singlet between 5-5.5 ppm was assigned to the non-exchangeable proton of the base moiety. The chemical shifts for protons of 6a and 6b were remarkably similar to those of 5a and 5b (**Table 5-1a**). On the basis of proton coupling constants, the sugar moiety of 6a and 6b contains a β -furanose ring structure. For nucleosides in the β -furanose form, the size of $J(1'2')$ and $J(1'2'')$ are roughly equal, giving rise to a pseudo triplet for this proton in the $^1\text{H-NMR}$ spectrum. In contrast, the size of $J(1'2')$ and $J(1'2'')$ vary over a wide range, and they are strikingly different in nucleosides with α -furanose, α -pyranose or β -pyranose [4]. The $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of 6a and 6b depicted 8 signals. The carbons of the sugar moiety were essentially the same as other nucleosides with an intact sugar moiety. Signals at 158-9 and 174-6 ppm were assigned to the amide carbonyl carbons of the imidazolidine-2,4-dione ring. The carbonyl resonances of 5OHdHyd and 4OHisdHyd were difficult to observe because of their long relaxation time. The remaining carbon signal at 78 ppm was assigned to the hydroxyl-substituted secondary carbon of the base moiety. Again, the chemical shifts of carbons for 4OHisdHyd diastereomers (6a and 6b) were nearly identical

to those for 5OHdHyd diastereomers (5a and 5b). HMBC analysis of products 5a showed the presence of a cross-peak between the base proton at C5 of the imidazolidine-2,4-dione ring and the anomeric carbon whereas no cross-peak was observed in product 6a (data not shown). This is consistent with the proposed structure in which the base proton is closer to the anomeric carbon in 4OHisodHyd compared to 5OHdHyd. Finally, it should be noted that all of the products (5a, 5b, 6a, 6b) gave the same molecular ion and fragmentation pattern in mass spectrometry analysis.

In contrast to the $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts, there were distinctive differences in proton coupling constants between 5OHdHyd and 4OHisodHyd (**Table 5-1b**). These differences may be related to changes in the conformation of the furanose ring and the hydroxymethyl group at C4' due to the presence of a carbonyl group at C5 of 4OHisodHyd derivatives. The decrease of $J(1'2')$ by 1 Hz accompanied with a dramatic increase of $J(3'4')$ from 3.2 to 7 Hz for 4OHisodHyd (6a and 6b) compared to 5OHdHyd (5a and 5b) indicate that the equilibrium between the population of 3'-endo,2'-exo and 3'-exo,3'-endo shifts in favour of the former (28% for 5OHdHyd to 49% for 4OHisodHyd). These results are consistent with strong steric interactions of the carbonyl group at C5 with protons of the sugar moiety. A decrease in both $J(4'5')$ and $J(4'5'')$ of 4OHisodHyd compared to 5OHdHyd suggests that the population of different rotamers of the hydroxymethyl group shifts toward a gauche gauche ($g^+(\psi)$) conformation in which the hydroxymethyl group is directly above the furanose ring (36% for 5OHdHyd to 55% for 4OHisodHyd). In the case of 4OHisodHyd, the hydroxymethyl group may be more stable in $g^+(\psi)$ because of the formation of a H-bond between this group and the carbonyl group at C5. Similar yet not as strong effects have been observed with hydroxyl and hydroperoxy groups at the C6 position of 5,6-unsaturated pyrimidine nucleosides [12;23].

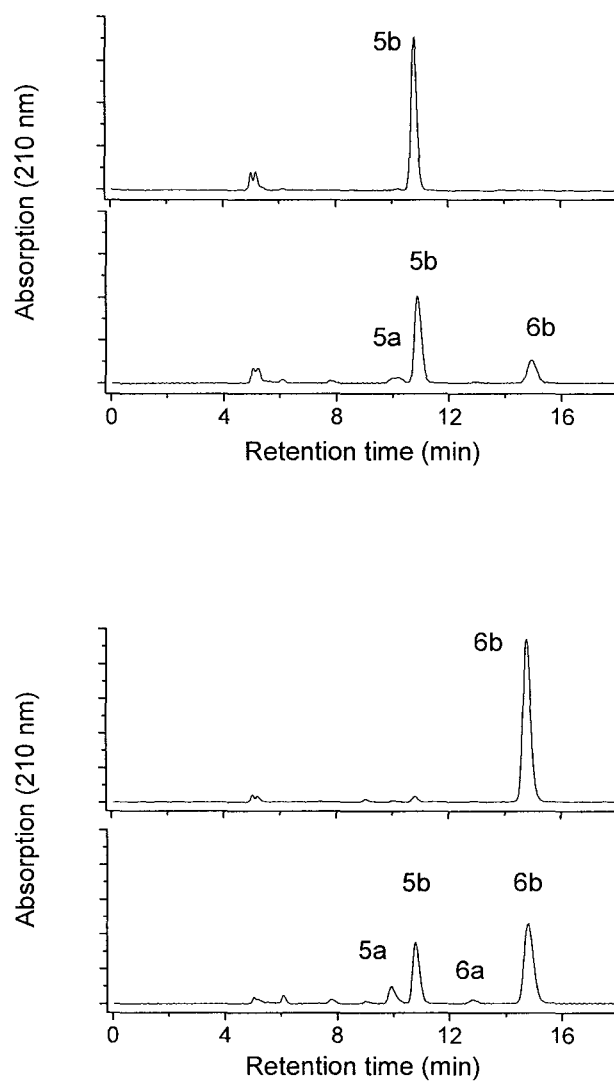


Figure 5-2 : Interconversion of hydantoin products

A) conversion of 5OHdHyd (5b) to 4OHisdHyd (6b); and B) conversion of 4OHisdHyd (6b) to 5OHdHyd (5b). The conversion of isomers was monitored by HPLC with detection at 210 nm. For panel A and B, the upper traces show the analysis of purified isomers whereas the lower traces show the mixture of isomers after incubation of the purified isomers at 37°C for 48 h.

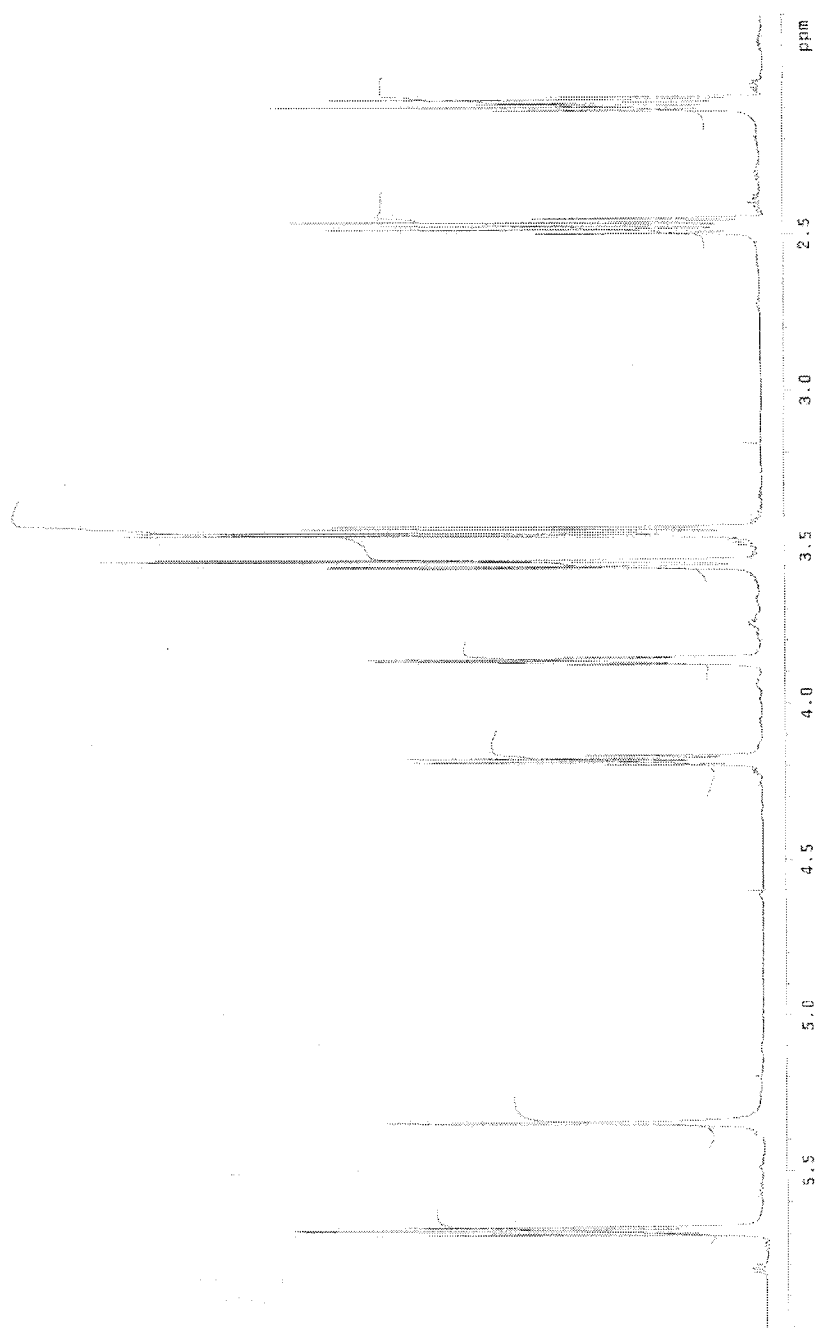


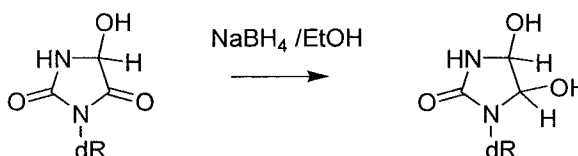
Figure 5-3 : ¹H-NMR 600 MHz spectrum of N1-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-hydroxy-imidazolidine-2,5-dione (4OHisoHyd) in D₂O

Nucleoside	H _{1'}	H base	H _{3'}	H _{4'}	H _{5'}	H _{5''}	H _{2'}	H _{2''}
5a	5.81	5.36	4.21	3.74	3.55	3.48	2.39	2.03
5b	5.71	5.29	4.25	3.74	3.54	3.50	2.37	2.00
6a	5.69	5.35	4.18	3.86	3.55	3.45	2.47	2.08
6b	5.77	5.53	4.22	4.00	3.60	3.48	2.49	2.36
7	5.62	5.24 ; 5.09	4.27	3.78	3.56	3.53	2.42	1.93

Table 5-1a : Chemical shifts of ¹H NMR of 5-hydroxyhydantoin products

Nucleoside	J _{1'2'}	J _{1'2''}	J _{2'2''}	J _{2'3'}	J _{2''3'}	J _{3'4'}	J _{4'5'}	J _{4'5''}	J _{5'5''}
5a	8.06	6.41	14.01	6.12	3.29	3.40	4.03	5.67	12.22
5b	8.33	6.35	14.01	6.13	3.11	3.11	4.49	6.13	12.08
6a	7.50	6.23	13.92	7.50	6.04	7.14	3.30	4.94	12.45
6b	6.90	6.86	13.86	6.86	5.25	6.86	3.32	5.46	12.54

Table 5-1b : Proton coupling constants of 5-hydroxyhydantoin products



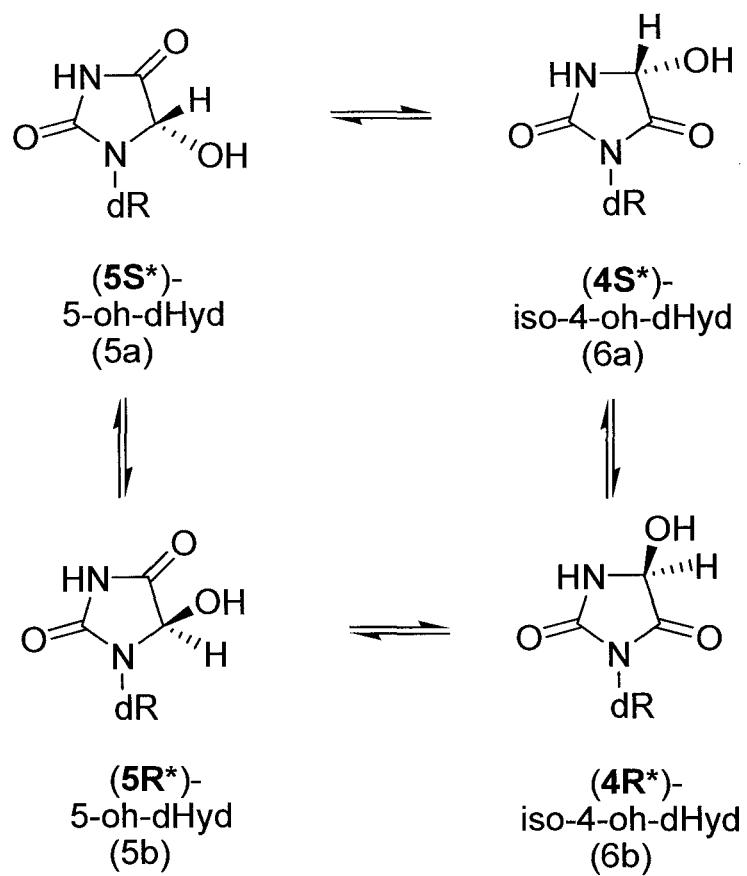
Scheme 5-2 : Reduction of 5-OHdHyd and 4OHisdHyd to imidazolidine products

Reduction of 5OHdHyd and 4OHisodHyd to 4,5-dihydroxyimidazolidine

Products 5a and 6a were purified by HPLC and treated with NaBH₄ to reduce the carbonyl group at C5 to a hydroxyl group. The reduction of 5a resulted in two peaks that eluted before 5a by HPLC analysis, and similarly, the analysis of the reduction mixture of 6a showed two peaks. When the reaction products were mixed, one of the products from the reduction of 5a co-eluted with one of the products from the reduction of 6a. These results were consistent with the reduction of either 5OHdHyd or 4OHisodHyd to two diastereomers of N1-(2-deoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-4,5-dihydroxyimidazolidin-2-one for a total of four possible diastereomers (Scheme 5-2). The proposed structure was supported by ¹H-NMR analysis. The NMR spectrum in D₂O depicted seven proton signals of 6a that were assigned to the protons of an intact sugar moiety. The most characteristic feature of these compounds was the presence of two doublets belonging to the base moiety at 5.24 and 5.09 ppm. These signals were assigned to the non-exchangeable protons of the vicinal diol group. Finally, the molecular ion and fragmentation (-H₂O) were consistent with the proposed structure. Interestingly, these products are closely related to trans N1-(2-deoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-1-carbamoyl-4,5-dihydroxyimidazolidin-2-one, a major hydroxyl radical induced oxidation product of dCyd. It should be noted, however, that the coupling of non-exchangeable protons of the imidazolidin-2-one ring was relatively strong for N1-(2-deoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-4,5-dihydroxyimidazolidin-2-one (6 ppm), whereas this coupling was very weak (<1 ppm) for trans N1-(2-deoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-1-carbamoyl-4,5-dihydroxyimidazolidin-2-one [21]. This suggests that the hydroxyl groups of the imidazolidin-2-one ring of N1-(2-deoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-4,5-dihydroxyimidazolidin-2-one are in a *cis* rather than a *trans* configuration.

Kinetics of isomerization of 5OHdHyd and 4OHisodHyd

Three possible reactions may be involved in the isomerization of 5OHdHyd: 1) ring chain tautomerism between N1-C5 (e.g., 5a→5b); 2) ring chain tautomerism between N3-C4 (e.g. 6a→6b); or 3) alpha-hydroxy ketone rearrangement (5a→6a) (**Scheme 5-3**). The rates of these reactions were determined by HPLC analysis of the four isomers as a function of time at 37°C starting with a purified isomer (**fig 5-4; Table 5-2**). The main reaction of 5OHdHyd (5a and 5b) and 4OHisodHyd (6a and 6b) at pH 5 and pH 7 involved alpha-hydroxy ketone rearrangement. The rates of alpha-hydroxy ketone rearrangement increased in the following order (6b > 6a > 5b > 5a), which correlates with their polarity on reversed phase chromatography. The rates of rearrangement were lower for 5OHdHyd with a 5S* compared to a 5R* configuration, suggesting that the 5S* configuration is the more stable configuration. From the rates of forward and backward reactions, the ratio of 5a and 6a and 5b and 6b at equilibrium was estimated to be about 1 to 1 at pH 7. The rate of alpha-hydroxy ketone rearrangement was dependent on pH with a small increase from pH 5 to pH 7 and a larger increase from pH 7 to pH 9. At pH 9, there was considerable decomposition of 5OHdHyd and 4OHisodHyd isomers to unknown product(s) that eluted at the solvent front of HPLC analysis. In addition to rearrangement, we observed ring-chain tautomerism at N1-C5 of 5OHdHyd. This reaction was not at all detected or it was minor (< 6.6-fold of rearrangement), depending on the isomer and the pH. The rate of ring-chain tautomerism was faster for the 5R diastereomer (5b) compared to the 5S diastereomer (5a). In fact, the formation of 5a from 6b can probably be accounted for by a two step pathway involving alpha-hydroxy ketone rearrangement (6b to 5b) followed by ring-chain tautomerism (5b to 5a). Finally, the interconversion of diastereomers of 4OHisodHyd (6a to 6b and 6b to 6a) was observed to a minor extent, suggesting that these products undergo ring chain tautomerism at C4-N3.



Scheme 5-3 : Isomerization of 5-hydroxyhydantoin products (5a, 5b, 6a, 6b)

Alpha-hydroxyl ketone rearrangement has been proposed in the hydroxyl radical induced oxidation of cytosine and 2'-deoxycytidine to N3-carbamoyl-4,5-dihydroxyimidazolidin-2-one products. The formation of these products involves C4-C5 cleavage of intermediate endoperoxides to give an open chain alpha-hydroxy aldehyde that converts to an open chain alpha-hydroxy ketone (N1-glycolybiuret), which subsequently undergoes ring closure to N3-carbamoyl-4,5-dihydroxyimidazolidin-2-one products. Recently, we reported that the oxidation of 5-hydroxy-2'-deoxyuridine gives a pair of alpha-hydroxy ketone intermediates, in which the diastereomers of isodialuric acid convert to the corresponding diastereomers of dialuric acid. The latter reaction is very similar to the conversion of 5OHdHyd to 4OHIsodHyd reported in the present work. The rearrangement of isodialuric acid (3a, 3b, 4a, and 4b; **Scheme 5-1**) and hydantoin alpha-hydroxy ketones (5a, 5b, 6a, and 6b) do not involve opening of the pyrimidine or imidazolidine rings because this would result in epimerization of the carbon next to N1. In contrast, each diastereomer of isodialuric acid (3a or 3b) gives only one diastereomer of dialuric acid (4a or 4b), and each diastereomer of 5OHdHyd (5a or 5b) gives only one diastereomer of 4OHIsodHyd (6a or 6b). Furthermore, these findings indicate that alpha-hydroxy ketone rearrangement of either dialuric or hydantoin derivatives do not involve enolization because this would also result in epimerization of the carbon atom next to N1. Thus, the most likely mechanism of alpha-hydroxy ketone rearrangement involves concerted and stereospecific 1,2 H-atom shift [10].

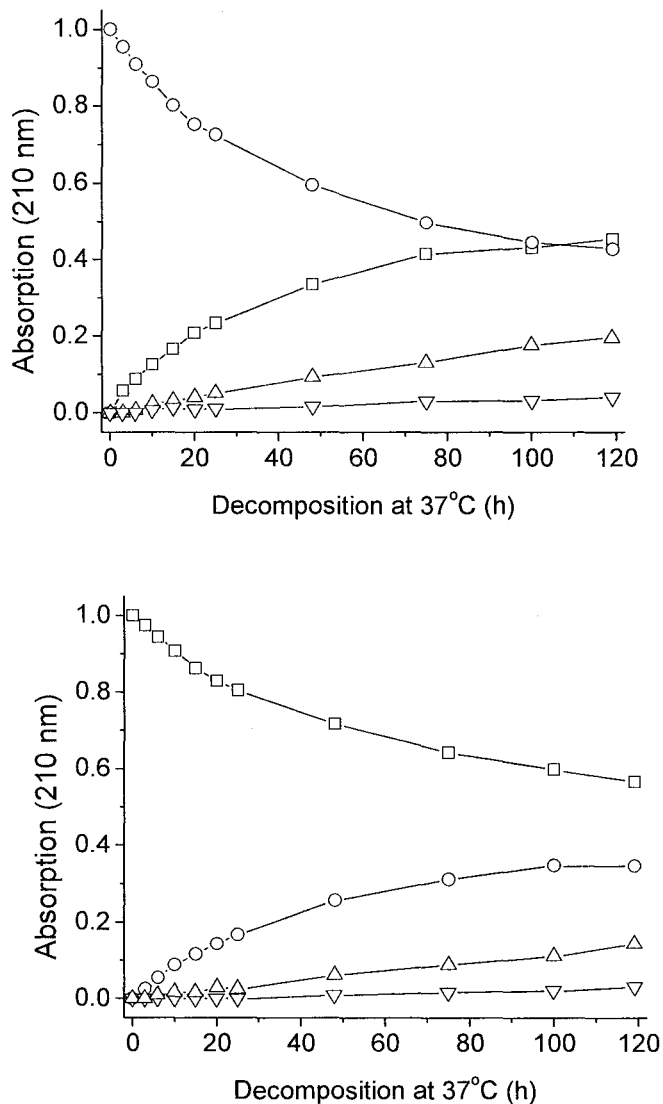


Figure 5-4 : Kinetics of decomposition of hydantoin products

A) decomposition of 5OHdHyd (5b); and B) decomposition of 4OHisodHyd (6b). The decomposition of isomers was monitored by HPLC with detection at 210 nm (as shown in Fig. 3). Symbols: open squares (5b), open circles (6b), open upward triangles (5a), open downward triangles (6a).

	pH 5	pH 7	pH 9
5OHdHyd (5a)	-0.0046 ±0.0005	-0.0056 ±0.0005	-0.0067 ±0.0007
5a to 6a	+0.0055 ±0.0016	+0.0059 ±0.0002	+0.0033 ±0.0002
5a to 6b	+0.0010 ±0.0000	+0.0011 ±0.0001	n.d.
5a to 5b	n.d. ^b	-0.0006 ±0.0001	n.d.
5OHdHyd (5b)	-0.0078 ±0.0002	-0.0087 ±0.0003	-0.0254 ±0.0015
5b to 6b	+0.0081 ±0.0004	+0.0079 ±0.0005	+0.0012 ±0.0002
5b to 5a	+0.0009 ±0.0002	+0.0012 ±0.0002	n.d.
5b to 6a	n.d.	+0.0004 ±0.0000 ^c	n.d.
4OHisodHyd (6a)	-0.0086 ±0.0006	-0.0146 ±0.0015	-0.0460 ±0.0007
6a to 5a	+0.0067 ±0.0002	+0.0059 ±0.0002	n.d.
6a to 5b	+0.0003 ±0.0000 ^c	+0.0004 ±0.0000 ^c	n.d.
6a to 6b	n.d.	+0.0004 ±0.0000	n.d.
4OHisodHyd (6b)	-0.0118 ±0.0007	-0.0131 ±0.0005	-0.0170 ±0.0008
6b to 5b	+0.0105 ±0.0003	+0.0088 ±0.0002	+0.0015 ±0.0001
6b to 5a	+0.0021 ±0.0000 ^d	+0.0017 ±0.0005 ^d	n.d.
6b to 6a	n.d.	+0.0003 ±0.0000	n.d.

Table 5-2 : Kinetics of decomposition and isomerization of 5-hydroxyhydantoin products as a function of pH ^a

^aRates of decomposition or formation (h^{-1}) were estimated by fitting the data either to a single exponential function or to a linear function at early times ($R^2 > 0.98$; $P < 0.05$). The analysis of products was carried out by HPLC with UV detection, assuming that the extinction coefficient of each product was the same at 210 nm.

^bNot detected.

^cFormation of product was delayed with respect to loss of the parent.

^dFormation of products was linear as a function of time (0-72 h).

Biological implications

The lability of 5OHdHyd in synthetic oligonucleotides was reported in ammonia (30% degradation in 24h) and piperidine (50% degradation in 1 h)[15]. Furthermore, various attempts to protect the alcohol at C5 by common strategies led to its degradation to numerous products. The present study suggests that 5OHdHyd likely exists in DNA as a mixture of four isomers. Because of the similarities of these isomers, for example, they elute nearly together on reversed phase chromatography, they give the same molecular ion and fragmentation pattern in mass spectrometry, and their NMR features are very similar, it will be difficult if not impossible to determine the biological effects of individual isomers. In comparison, the biological effects of 5-hydroxy-5-methylhydantoin, a major product of the oxidation of thymidine, have been studied by its specific incorporation into synthetic oligonucleotides [8]. First, this modification is relatively stable in alkaline such as piperidine but prolonged treatment leads to strand breaks. Subsequent studies showed that 5-hydroxy-5-methylhydantoin was a substrate for excision by purified DNA repair proteins, including Endo III and Fpg, but not yOgg1, and that it was strongly blocking toward polymerization with the incorporation of A opposite the lesion.

Finally, the susceptibility of 5OHdCyd and 5OHdUrd to oxidation should be taken into account in the analysis and study of this damage in DNA repair and mutagenesis. For example, the lack of detection of 5OHdCyd in the analysis of DNA damage by enzymatic digestion and LC/MSMS may perhaps be explained by its oxidation during sample preparation of MS analysis. In addition, the oxidation of 5OHdCyd may also be a problem in DNA repair studies that do not distinguish between 5OHdCyd or 5OHdUrd and their various oxidation products. The susceptibility of 5OHdCyd to oxidation may explain the discrepancy concerning the

mutagenic potential of 5OHdCyd, which was reported to be very mutagenic in one study [6], but weakly mutagenic in another study [13].

ACKNOWLEDGMENT We thank the Cancer Research Society, Inc., for their generous financial assistance.

References

1. Bienvenu, C. (1996) *Oxydation radicalaire de la 5-methyl-2'-desoxycytidine (Ph.D. thesis)*. Grenoble.
2. Bjelland, S. and Seeberg, E. (2003) Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res*, **531**, 37-80.
3. Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., and Ravanat, J.L. (2003) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.*, **531**, 5-23.
4. Cadet, J., Taieb, C., Remin, M., Niemczura, W.P., and Hruska, F.E. (1980) Conformational studies of alpha- and beta-pyrimidine 2'-deoxyribonucleosides in the syn and anti conformation. *Biochim. Biophys. Acta*, **608**, 435-45.
5. Duarte, V., Gasparutto, D., Yamagushi, L.F., Ravanat, J.L., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., and Cadet, J. (2000) oxaluric acid as the major product of singlet oxygen-mediated oxydation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12622-12628.
6. Feig, D.I., Sowers, L.C., and Loeb, L.A. (1994) Reverse chemical mutagenesis: identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 6609-13.
7. Fujimoto, J., Tran, L., and Sowers, L.C. (1997) Synthesis and cleavage of oligodeoxynucleotides containing a 5-hydroxyuracil residue at defined site. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 1254-1258.
8. Gasparutto, D., Ait-Abbas, M., Jaquinod, M., Boiteux, S., and Cadet, J. (2000) Repair and coding properties of 5-hydroxy-5-methylhydantoin nucleosides inserted into DNA oligomers. *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 575-584.
9. Girault, I., Fort, S., Molko, D., and Cadet, J. (1997) Ozonolysis of 2'-deoxycytidine: isolation and identification of the main oxidation products. *Free Radic Res*, **26**, 257-66.
10. Harris, D.W. and Feather, M.S. (1973) Evidence for a C2-C1 intramolecular hydrogen transfer during the acid-catalyzed isomerization of D-Glucose to D-Fructose. *Carbohydr. Res.*, **30**, 359-365.
11. Hayatsu, H. (1996) The 5,6-double bond of pyrimidine nucleosides, a fragile site in nucleic acids. *J. Biochem.*, **119**, 391-395.
12. Jolibois, F., Voituriez, L., Grand, A., and Cadet, J. (1996) Conformational and electronic properties of the two cis (5S,6R) and (5R,6S) diastereoisomers of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine: X-ray and theoretical studies. *Chem Res Toxicol*, **9**, 298-305.
13. Kreutzer, D.A. and Essigmann, J.M. (1998) Oxidized, deaminated

cytosines are a source of C → T transitions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 3578-3582.

14. Lenton, K.J., Therriault, H., Fulop, T., Payette, H., and Wagner, J.R. (1999) Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis*, **20**, 607-613.

15. Muller, E., Gasparutto, D., Lebrun, C., and Cadet, J. (2001) Site-specific insertion of the (5R*) and (5S*) diastereoisomers of 1-[2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl]-5-hydroxyhydantoin into oligodeoxyribonucleotides. *Eur. J. Org. Chem.*, 2091-2099.

16. Ravanat, J.L., Saint-Pierre, C., and Cadet, J. (2003) One-electron oxidation of the guanine moiety of 2'-deoxyguanosine: influence of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *J Am Chem Soc.*, **125**, 2030-1.

17. Riviere, J., Bergeron, F., Tremblay, S., Gasparutto, D., Cadet, J., and Wagner, J.R. (2004) Oxidation of 5-hydroxy-2'-deoxyuridine into isoldialuric acid, dialuric acid, and hydantoin products. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 6548-6549.

18. Riviere, J. and Wagner, J.R. (submitted) Ascorbate and H₂O₂ mediated oxidative DNA damage in cells. *Carcinogenesis*.

19. 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.

20. Tremblay, S., Douki, T., Cadet, J., and Wagner, J.R. (1999) 2'-Deoxycytidine glycols, a missing link in the free radical-mediated oxidation of DNA. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20833-20838.

21. Wagner, J.R., Decarroz, C., Berger, M., and Cadet, J. (1999) Hydroxyl radical-induced decomposition of 2'-deoxycytidine in aerated aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4101-4110.

22. 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**, 3380-3384.

23. Wagner, J.R., Vanlier, J.E., Berger, M., and Cadet, J. (1994) Thymidine hydroperoxides - structural assignment, conformational features, and thermal decomposition in water. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2235-2242.

24. Wallace, S.S. (2002) Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med*, **33**, 1-14.

Chapitre VI - Conclusion générale

6-1 - Variation de la distribution des produits d'oxydation dans l'ADN et les conséquences sur la cellule

6-1-1 - L'effet de la vitamine C sur la formation des dommages dans l'ADN cellulaire

Lors de notre étude, nous avons observé un effet pro-oxydant de l'ascorbate sur l'ADN. Évidemment, les conditions n'étaient pas physiologiques bien que certaines souches de cellules soient capables d'atteindre des concentrations très élevées en ascorbate (article 1). Mais nous avons montré que la présence en forte concentration d'un antioxydant comme l'ascorbate non seulement induit la formation de produits d'oxydation, mais aussi modifie le rapport de certains produits. En effet, lors d'une réaction de Fenton *in vitro* sur de l'ADN de thymus de veau, le rapport entre la quantité de 5OHdCyd et la 8oxodGuo est d'environ 5 (Lenton et al, 1999 ; article 1). Par contre, les niveaux obtenus dans notre étude par incubation avec H₂O₂ de cellules possédant une très haute concentration en vitamine C ont montré une amplification de la formation des dommages avec une prédominance de 5OHdCyd (le rapport 5OHdCyd/8oxodGuo est de 3,4). Il est donc permis de penser qu'une forte concentration d'ascorbate pourrait favoriser la formation d'autres produits léthaux ou mutagènes au détriment d'autres. Par exemple, la 5OHdUrd qui fait partie de la même voie de formation que la 5OHdCyd (Tremblay et al, 1999) et qui est hautement mutagène (Kreutzer et al, 1998) doit possiblement être formée en plus grande quantité dans ces conditions là, ce qui pourrait avoir de lourdes conséquences pour la cellule. En revanche, il est également possible que ce soit un produit moins mutagène qui soit préférentiellement formé. La préférence pour la formation de

produits d'oxydation concernant d'autres bases comme l'adénine ou la thymine n'a pas été étudiée dans ces conditions là, mais il est aussi probable que certains de leurs produits d'oxydation soient formés plus favorablement que d'autres dans de telles conditions, cela modifiant leur distribution et ainsi les conséquences sur la cellule.

Nos travaux aux niveaux cellulaires ont porté principalement sur des cellules Jurkat, mais nous avons obtenu des résultats quelques peu différents avec des cellules HL60 qui sont une autre souche de lymphocyte. En effet, en traitant ces cellules de la même façon que les cellules Jurkat, nous avons obtenu des niveaux de 5OHdCyd plus faibles, bien que la concentration en ascorbate après incubation avec du DHA soit supérieure pour les HL60 (résultats non publiés). Il a par ailleurs été montré que l'ascorbate possédait un effet protecteur dans ces cellules lorsqu'elles étaient soumises à un stress oxydant similaire à celui que nous avons étudié (Lutsenko et al, 2002). On peut ainsi penser que selon chaque type de cellule, les produits formés le seront dans des quantités ou des proportions différentes et qu'ainsi un type de dommage soit plus présent dans un certain type de cellules ou de tissus.

6-1-2 - Produits de suroxydation dans l'ADN

Nous avons vu au cours de ces travaux que plusieurs produits d'oxydation de l'ADN étaient susceptibles d'être de nouveau oxydés pour aboutir à la formation d'autres produits, notamment en ce qui concerne la guanine et la cytosine. On peut alors se questionner sur ce qu'il en est réellement dans l'ADN cellulaire. En effet, aucune étude n'a encore identifié des produits connus comme étant ceux issus de la suroxydation de la 8oxodG dans de l'ADN extrait de cellules, les différentes études portant uniquement sur des oligonucléotides ou sur le nucléoside (Ravanat et al, 2003 ; Duarte et al, 2000). Cependant, bien qu'on ne sache pas s'ils

ont été formés par une voie impliquant la suroxydation, la 5OHdHyd et le 5,6-dihydroxyuracile qui est une forme tautomère de l'acide isodialurique ont déjà été identifiés dans de l'ADN isolé (Gajewski et al, 1990) et de l'ADN extrait de cellules humaines (Nackerdien et al, 1992). Il est donc permis de penser que la 8oxodGuo et la 5OHdCyd aient pu être suroxydées dans un système comme celui que nous avons étudié où les niveaux d'oxydation sont importants (bien que la haute concentration en ascorbate donne un caractère très réducteur à la cellule), leurs potentiels d'oxydation étant plus faibles que ceux de la dCyd et de la dGuo. Il est ainsi possible que d'autres produits non mesurés mais issus des produits d'oxydation observés soient formés parallèlement à la formation de ces produits, lors de réactions d'oxydation des bases de l'ADN.

Une étude a récemment montré que la 8oxodG induisait d'autres dommages dans le brin d'ADN dans lequel elle se trouve (Kim et al, 2004). En revanche, la 8oxodGuo libre, mais à proximité de l'ADN, aurait un effet protecteur en servant de capteur de radicaux libres. La facile suroxydation de la 8oxodGuo aurait donc un effet ambivalent. Il n'est cependant pas précisé quel effet est prédominant ou bien comment celui-ci fonctionne. Les faibles potentiels d'oxydation de la 5OHdCyd et de la 5OHdUrd qui permettent cette seconde oxydation (article 2) nous emmènent donc à penser qu'il pourrait en être de même avec ces produits.

6-1-3 - Pouvoir mutagène des produits de suroxydation de l'ADN

Le pouvoir mutagène des produits de suroxydation de la guanine a été étudié à plusieurs reprises (Lim et al, 2004 ; Henderson et al, 2002 ; Henderson et al, 2001 ; Kino et al, 2001). Dans ces études là, il était montré que la 8oxodGuo, un produit responsable de transversion G vers T, pouvait être de nouveau oxydé pour aboutir à la formation d'autres produits encore plus mutagènes comme la 2,2-diamino-5-[(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)amino]-5(2H)-

oxazolone ou le nucléoside du spiroiminohydantoïne, responsables du même type de mutation, mais aussi de transversion G vers C.

De la même manière, certaines études ont qualifié la 5OHdCyd de produits hautement mutagènes (Purmal et al, 1994 ; Feig et al, 1994), mais un autre travail réalisé plus récemment a démontré une faible mutagénicité de celle-ci (Kreutzer et al, 1998). On peut alors penser que l'ambiguïté entre ces deux études est due à la possible suroxydation de ce produit qui en forme d'autres, mutagènes ou pas, comme l'acide dialurique, l'acide isodialurique, la 5OHdHyd ou la 4-OHisodHyd. Cependant, dans les deux cas, il a été montré que la 5OHdUrd était aussi hautement mutagène et nous avons vu que ses produits de suroxydation sont identiques en grande partie à ceux obtenus avec la 5OHdCyd. L'ambiguïté aurait donc due concerner les deux produits. Mais il n'est pas à exclure que lors de ces études, seule la 5OHdCyd ait été suroxydée ; car en effet, elle possède un potentiel d'oxydation plus faible que celui de la 5OHdUrd (information non montrée).

Quelques études relatives à la mutagénèse, la toxicité et la réparation ont porté sur les produits que nous avons observés après suroxydation de 5OHdCyd et 5OHdUrd. Il a ainsi été montré que l'acide isodialurique pouvait être un substrat pour l'uracile N-glycosylase, une enzyme de réparation servant à enlever l'uracile obtenu par désamination de la cytosine dans l'ADN (Dizdaroglu, 1996). Il semblerait aussi que ce produit soit incisé par l'endonucléase III (Dizdaroglu, 2000), une glycosylase spécialisée dans l'incision de dommages issus de l'oxydation de pyrimidines. Cependant, lors de ces travaux, les résultats étaient non significatifs et il serait même possible que l'acide isodialurique mesuré soit en fait dû à un artefact provoqué par la désamination de la 5,6-dihydroxy-cytosine, un autre produit d'oxydation de la cytosine reconnu par Endo III. Cette même étude montrait que la 5OHdHyd

n'était pas un substrat pour cette enzyme. Toutefois, il avait été évoqué antérieurement que ce produit là fut observé lorsque de l'ADN irradié par des photons γ était digéré par Endo III (Wagner et al, 1996). Mais là aussi, la 5OHdHyd pourrait être un artefact issue d'un autre produit d'oxydation de l'ADN reconnu par Endo III, à savoir l'alloxane qui par décarboxylation mène à la formation de ce produit (Luo et al, 1996).

On sait cependant que la nuclease P1 est capable de digérer la 5OHdHyd dans un oligonucleotide, mais que les phosphodiesterases de muqueuse intestinale bovine et de rate de veau en sont incapables (Muller et al, 2001). Une autre étude a aussi montré que la 5-hydroxy-5-methylhydantoïne bloquait plusieurs polymerases et était donc létale (Gasparutto et al, 2000). Par ailleurs, ce produits est un excellent substrat pour les enzymes de réparation comme Endo III, Endo VIII et même Fpg, ainsi que pour plusieurs de leurs homologues. La structure relativement proche de ce produit avec la 5OHdHyd pourrait laisser penser que cette dernière puisse aussi avoir des conséquences à peu près similaires. On ne sait toutefois toujours pas si la 5OHdHyd est capable de créer des mutations dans le génome. De la même manière, on connaît peu de chose concernant l'acide isodialurique et surtout l'acide dialurique à propos de leur toxicité et de leur pouvoir mutagène.

On ignore encore si la 4OHisoHyd se forme dans l'ADN, mais l'équilibre observé entre cette dernière et la 5OHdHyd (cf article 3) pourrait également intervenir dans le pouvoir mutagène de ces produits. On ne connaît évidemment rien actuellement concernant la létalité, la réparation et la prédisposition de la 4OHisoHyd à créer des mutations. Mais cet équilibre entre les deux produits pourrait bien évidemment fausser les mesures, ce qui expliquerait par exemple, l'ambiguïté concernant le fait que la 5OHdHyd est oui ou non un substrat pour Endo III.

Bien que beaucoup d'étude ait été menées sur les dommages à la cytosine, il reste donc beaucoup d'éléments à découvrir concernant ces produits d'oxydation et leur produits de suroxydation dans l'ADN. Il serait intéressant, par une technique très sensible, de tous les mesurer dans l'ADN cellulaire et d'établir leur pouvoir mutagène ou léthal, ainsi que leur prédisposition à être réparé (avec différents enzymes de réparation : Endo III et Endo VIII principalement).

6-2 - Problèmes liés à la mesure des produits d'oxydation de l'ADN

Nous avons vu que la mesure des dommages d'oxydation des bases de l'ADN cellulaire était un travail qui comportait de nombreuses difficultés .

Premièrement, dans le choix de la technique d'analyse. Nous avons évoqué en introduction qu'il existait de nombreuses façons de procéder pour analyser les niveaux de dommages des bases de l'ADN. Chaque technique possède ses forces et ses faiblesses, cela dit l'utilisation de l'HPLC-EC-UV, ainsi que celle du LC-MS-MS, semblent les plus appropriées. En effet, le GC-MS surévalue la quantité de dommages de faibles niveaux et la technique du « comet » manque de spécificité. De plus, lors de nos travaux, les niveaux de 5OHdCyd et ceux de 8oxodGuo que nous avons mesurés dans l'ADN cellulaire étaient comparables avec les niveaux obtenus dans la littérature ne semblant pas avoir été sujet à de l'auto-oxydation (Collins et al, 2004 ; Lenton et al, 1999). L'utilisation de l'HPLC-EC-UV pour notre étude a donc, semble-t-il, été judicieuse.

Pour ce qui concerne la technique d'extraction de l'ADN, l'utilisation du mélange phénol/eau/chloroforme lors de nos expériences n'a pas semblé induire de la suroxydation.

Tout d'abord parce que notre rapport 5OHdCyd/8oxodGuo lors de nos analyses était différent de celui obtenu lorsqu'on mime une réaction d'autooxydation sur de l'ADN isolé en ajoutant des métaux dans le milieu réactionnel (Lenton et al, 1999 ; article 1). Ensuite, nous avons essayé une autre technique d'extraction d'ADN à partir d'une solution concentrée de NaI (Loparev et al, 1991 ; Helbock et al, 1998). L'utilisation de cette dernière technique ne s'est toutefois pas révélée plus intéressante du fait d'une moins bonne reproductivité des résultats, ainsi que d'une suspicion concernant la dégradation de certains produits notamment la 5OHdCyd (informations non montrées). La technique d'extraction d'ADN cellulaire à base de phénol nous a donc semblé appropriée à condition d'éviter toute contamination par des métaux ainsi que des temps d'incubation trop long, y compris lors des digestions d'ADN suivant l'extraction (Beckman et al, 2000).

Beaucoup d'études ont utilisé comme marqueur d'oxydation de l'ADN la 8oxodGuo. Ce choix semble logique du fait que ce dommage d'oxydation est produit en quantité importante dans l'ADN cellulaire et est donc facilement détectable (Collins, 2004). Il est en outre mutagène ce qui le rend responsable de lourdes conséquences dans la cellule. Cependant, la 5OHdCyd est une alternative intéressante comme utilisation en tant que marqueur d'oxydation de l'ADN parce que ces niveaux mesurés sont comparables à ceux de la 8oxodGuo et sa formation est reliée à celle d'autres produits mutagènes comme les glycols de 2'-déoxyuridine ou la 5OHdUrd responsables de transitions C vers T. Sa formation semble, de plus, moins provenir de phénomènes d'auto-oxydation comme c'est le cas pour la 8oxodGuo, le potentiel d'oxydation de la dCyd étant beaucoup plus élevé que celui de la dGuo ($G \ll A < T, C$). Enfin, concernant la suroxydation de ces produits là, elle semble être comparable dans les deux cas, les potentiels d'oxydation de la 5OHdCyd et de la 8oxodGuo étant relativement proches.

Perspectives

Il serait bon de poursuivre les travaux entrepris lors de ce doctorat en continuant nos recherches dans les différentes voies que voici :

Il faudrait tout d'abord confirmer notre hypothèse, à savoir si oui ou non le FapydGuo se forme dans les cellules Jurkat lors d'expériences impliquant de fortes concentrations d'ascorbate en situation de stress. De la même façon, le phénomène provoquant une ré-augmentation des dommages à l'ADN après plusieurs heures de réparations devrait être étudié. Il serait aussi intéressant d'étendre l'étude à plusieurs autres souches cellulaires.

Également, lors des études de suroxydation de la cytosine, il serait bon d'identifier tous les produits formés par l'oxydation de la 5OHdCyd. Enfin une étude plus approfondie à propos de la 4OHisoHyd, à savoir si elle est formée ou pas dans l'ADN cellulaire et quels sont ses effets dans la cellule (mutagénèse, toxicité), serait requise.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le docteur Richard Wagner pour m'avoir accueilli dans son laboratoire afin que je puisse effectuer les travaux de mon doctorat. Son professionnalisme et ses conseils tout le long de mon séjour, ont été utiles et très enrichissants. Ce fut ainsi un plaisir de travailler au sein de son équipe.

Je tiens également à remercier les étudiants du laboratoire présent lors de mon séjour : Guillaume Ratelle, Sébastien Tremblay, Sylvain Cecchini (notre éternel doyen, même si techniquement il ne faisait pas parti du labo...) et François Bergeron, pour leurs coups de mains et conseils lorsque c'était nécessaire, ainsi que pour les nombreuses discussions scientifiques ou non.

Plusieurs pensées vont également envers les autres étudiants, professeurs et le personnel permanent du département : ce fût un plaisir de les côtoyer quotidiennement.

Je n'oublierai pas non plus les nombreux moments passés lors de ces dernières années avec Jean-François Allard, Philippe Bérard, François Bergeron, Antoine Mougin, entre autres, lors de nos diverses soirées destinées à dynamiser l'industrie de la bière au Québec !

Je suis infiniment reconnaissant du soutien internautique en provenance du pays des « fromages qui puent » de la part de mes amis : Triphon, le paillou, Tatouille, Nath, le nem et la poule. J'en profite au passage pour remercier les « artisans tripier-charcutier » du pays Albigeois dont certains produits de contrebande ont miraculeusement atterri dans mon assiette ici même au Québec.

Je remercie aussi Jean-Paul Deux pour avoir fait tomber le mur de Berlin.

Enfin, je voudrais remercier mes parents pour m'avoir toujours soutenu lors de mes études, même quand j'ai été mis à la porte du lycée...comme quoi, rien n'est jamais perdu...

Références

1. Agus, D. B.; Vera, J. C., and Golde, D. W. Stromal cell oxidation: a mechanism by which tumors obtain vitamin C. *Cancer Res.* 1999 Sep 15; 59(18):4555-8.
2. Baader, S. L.; Bruchelt, G.; Carmine, T. C.; Lode, H. N.; Rieth, A. G., and Niethammer, D. Ascorbic-acid-mediated iron release from cellular ferritin and its relation to the formation of DNA strand breaks in neuroblastoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1994; 120(7):415-21.
3. Barbouti, A.; Doulias, P. T.; Zhu, B. Z.; Frei, B., and Galaris, D. Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med.* 2001 Aug 15; 31(4):490-8.
4. Beckman, K. B.; Saljoughi, S.; Mashiyama, S. T., and Ames, B. N. A simpler, more robust method for the analysis of 8-oxoguanine in DNA. *Free Radic Biol Med.* 2000 Aug; 29(3-4):357-67.
5. Bielski, B. J. H. Chemistry of ascorbic acid radicals. Seib, P. A. and Tolbert, B. M. Ascorbic acid chemistry, metabolism and uses. American Chemical Society, advances in chemistry series ed. 1982; pp. 81-100.
6. Bjelland, S. and Seeberg, E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res.* 2003 Oct 29; 531(1-2):37-80. ISSN: 0027-5107.
7. Block, G. Vitamin C and cancer prevention: the epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr.* 1991 Jan; 53(1 Suppl):270S-282S.
8. Box, H. C.; Dawidzik, J. B., and Budzinski, E. E. Free radical-induced double lesions in DNA. *Free Radic Biol Med.* 2001 Oct 1; 31(7):856-68.
9. Breen, P. A and Murphy, A. J. Reaction of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18(6):1033-1077.
10. Burri, B. J. and Jacob, R. A. Human metabolism and the requirement for vitamin C. Lester Packer, Jurgen Fuchs. *Vitamin C in health and disease.* Marcel Dekker ed. 1997; pp. 341-366.
11. Cadet, J.; Berger, M.; Douki, T.; Morin, B.; Raoul, S.; Ravanat, J. L., and Spinelli, S. Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage. *Biol Chem.* 1997a Nov; 378(11):1275-86.
12. Cadet, J.; Delatour, T.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Pouget, J. P.; Ravanat, J. L., and Sauvaigo, S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res.* 1999 Mar 8; 424(1-2):9-21.
13. Cadet, J.; Douki, T.; Frelon, S.; Sauvaigo, S.; Pouget, J. P., and Ravanat, J. L. Assessment of oxidative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC-MS/MS measurement. *Free Radic Biol Med.* 2002 Aug 15; 33(4):441-9.
14. Cadet, J.; Douki, T.; Gasparutto, D., and Ravanat, J. L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res.* 2003 Oct 29; 531(1-2):5-23.
15. Cadet, J.; Douki, T., and Ravanat, J. L. Artifacts associated with the measurement of oxidized DNA bases. [Review] [83 refs]. *Environmental Health Perspectives.* 1997b Oct; 105(10):1034-9.
16. Cadet, J.; Douki, T., and Ravanat, J. L. Facts and Artifacts in the Measurement of Oxidative Base Damage to DNA. *Free Radical Research.* 1998; 29:541-550.
17. Carr, A. C. and Frei, B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am J Clin Nutr.* 1999 Jun; 69(6):1086-107.
18. Claycamp, H. G. Phenol sensitization of DNA to subsequent oxidative damage in 8-hydroxyguanine assays. *Carcinogenesis.* 1992 Jul; 13(7):1289-92.

19. Collins, A. R. Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays*. 1999 Mar; 21(3):238-46.
20. Collins, A. R.; Cadet, J.; Moller, L.; Poulsen, H. E., and Vina, J. Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch Biochem Biophys*. 2004 Mar 1; 423(1):57-65.
21. Collins, A. R.; Dobson, V. L.; Dusinska, M.; Kennedy, G., and Stetina, R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res*. 1997 Apr 29; 375(2):183-93.
22. Cooper, D. L.; Lahue, R. S., and Modrich, P. Methyl-directed mismatch repair is bidirectional. *J Biol Chem*. 1993 Jun 5; 268(16):11823-9.
23. De Tullio, M. C. and Arrigoni, O. Hopes, disillusion and more hopes from vitamin C. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Jan; 61(2):209-19.
24. Devlin, M.T., Textbook of biochemistry with clinical correlations. Fourth edition. 1997.
25. Dizdaroglu, M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med*. 1991; 10(3-4):225-42.
26. Dizdaroglu, M. Substrate specificities and excision kinetics of DNA glycosylases involved in base-excision repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*. 2003 Oct 29; 531(1-2):109-26. ISSN: 0027-5107.
27. Dizdaroglu, M.; Bauche, C.; Rodriguez, H., and Laval, J. Novel substrates of Escherichia coli nth protein and its kinetics for excision of modified bases from DNA damaged by free radicals. *Biochemistry*. 2000 May 9; 39(18):5586-92.
28. Dizdaroglu, M.; Karakaya, A.; Jaruga, P.; Slupphaug, G., and Krokan, H. E. Novel activities of human uracil DNA N-glycosylase for cytosine-derived products of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res*. 1996 Feb 1; 24(3):418-22.
29. Douki, T.; Riviere, J., and Cadet, J. 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*. 2002 Mar; 15(3):445-54.
30. Duarte, V.; Gasparutto, D.; Yamaguchi, L. F.; Ravanat, J. L.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P., and Cadet, J. oxaluric acid as the major product of singlet oxygen-mediated oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA. *J. Am. Chem. Soc*. 2000; 122:12622-12628.
31. Epe, B. and Hegler, J. Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting. *Methods Enzymol*. 1994; 234:122-31.
32. Epsztejn, S.; Kakhlon, O.; Glickstein, H.; Breuer, W., and Cabantchik, I. Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal Biochem*. 1997 May 15; 248(1):31-40.
33. Feig, D. I.; Sowers, L. C., and Loeb, L. A. Reverse chemical mutagenesis: identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994 Jul 5; 91(14):6609-13.
34. Finnegan, M. T.; Herbert, K. E.; Evans, M. D.; Griffiths, H. R., and Lunec, J. Evidence for sensitisation of DNA to oxidative damage during isolation. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20(1):93-8.
35. Fraga, C. G.; Motchnik, P. A.; Shigenaga, M. K.; Helbock, H. J.; Jacob, R. A., and Ames, B. N. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Dec 15; 88(24):11003-6.
36. Frelon, S.; Douki, T.; Favier, A., and Cadet, J. Comparative study of base damage induced by gamma radiation and Fenton reaction in isolated DNA. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*. 2002; 2866-2870.
37. Frelon, S.; Douki, T.; Favier, A., and Cadet, J. Hydroxyl radical is not the main reactive species involved in

- the degradation of DNA bases by copper in the presence of hydrogen peroxide. *Chem Res Toxicol.* 2003 Feb; 16(2):191-7.
38. Frelon, S.; Douki, T.; Ravanat, J. L.; Pouget, J. P.; Tornabene, C., and Cadet, J. High-performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. *Chem Res Toxicol.* 2000 Oct; 13(10):1002-10.
39. Fujimoto, J.; Tran, L., and Sowers, L. C. Synthesis and cleavage of oligodeoxynucleotides containing a 5-hydroxyuracil residue at a defined site. *Chem Res Toxicol.* 1997 Nov; 10(11):1254-8.
40. Gajewski, E.; Rao, G.; Nackerdien, Z., and Dizdaroglu, M. Modification of DNA bases in mammalian chromatin by radiation-generated free radicals. *Biochemistry.* 1990 Aug 28; 29(34):7876-82.
41. Gasparutto, D.; Ait-Abbas, M.; Jaquinod, M.; Boiteux, S., and Cadet, J. Repair and coding properties of 5-hydroxy-5-methylhydantoin nucleosides inserted into DNA oligomers. *Chem Res Toxicol.* 2000 Jul; 13(7):575-84.
42. Gros, L.; Ishchenko, A. A., and Saparbaev, M. Enzymology of repair of etheno-adducts. *Mutat Res.* 2003 Oct 29; 531(1-2):219-29.
43. Hallberg, L.; Brune, M., and Rossander, L. The role of vitamin C in iron absorption. *Int J Vitam Nutr Res Suppl.* 1989; 30:103-8.
44. Halliwell, B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun.* 1990; 9(1):1-32.
45. Halliwell, B. Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res.* 2001 Apr 18; 475(1-2):29-35.
46. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M., and Blake, D. Metal ions and oxygen radical reactions in human inflammatory joint disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985 Dec 17; 311(1152):659-71.
47. Hartwell, L. H. and Weinert, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* 1989 Nov 3; 246(4930):629-34.
48. Helbock, H. J.; Beckman, K. B.; Shigenaga, M. K.; Walter, P. B.; Woodall, A. A.; Yeo, H. C., and Ames, B. N. DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jan 6; 95(1):288-93.
49. Henderson, P. T.; Delaney, J. C.; Gu, F.; Tannenbaum, S. R., and Essigmann, J. M. Oxidation of 7,8-dihydro-8-oxoguanine affords lesions that are potent sources of replication errors in vivo. *Biochemistry.* 2002 Jan 22; 41(3):914-21.
50. Henderson, P. T.; Delaney, J. C.; Muller, J. G.; Neeley, W. L.; Tannenbaum, S. R.; Burrows, C. J., and Essigmann, J. M. The hydantoin lesions formed from oxidation of 7,8-dihydro-8-oxoguanine are potent sources of replication errors in vivo. *Biochemistry.* 2003 Aug 12; 42(31):9257-62.
51. Hofer, T. and Moller, L. Optimization of the workup procedure for the analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine with electrochemical detection. *Chem Res Toxicol.* 2002 Mar; 15(3):426-32.
52. Ide, H. and Kotera, M. Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biol Pharm Bull.* 2004 Apr; 27(4):480-5.
53. Jackson, S. P. and Jeggo, P. A. DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK. *Trends Biochem Sci.* 1995 Oct; 20(10):412-5.
54. Jariwalla, R. J. and Harakeh, S. Antiviral and immunomodulatory activities of ascorbic acid. *Subcell Biochem.* 1996; 25:213-31.
55. Kamiya, H. Mutagenicities of 8-hydroxyguanine and 2-hydroxyadenine produced by reactive oxygen species. *Biol Pharm Bull.* 2004 Apr; 27(4):475-9.

56. Kim, J. E.; Choi, S.; Yoo, J. A., and Chung, M. H. 8-Oxoguanine induces intramolecular DNA damage but free 8-oxoguanine protects intermolecular DNA from oxidative stress. *FEBS Lett.* 2004 Jan 2; 556(1-3):104-10.
57. Kino, K. and Sugiyama, H. Possible cause of G-C-->C-G transversion mutation by guanine oxidation product, imidazolone. *Chem Biol.* 2001 Apr; 8(4):369-78.
58. Kreutzer, D. A. and Essigmann, J. M. Oxidized, deaminated cytosines are a source of C --> T transitions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1998 Mar 31; 95(7):3578-82.
59. Lenton, K. J.; Therriault, H.; Fulop, T.; Payette, H., and Wagner, J. R. Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis.* 1999 Apr; 20(4):607-13.
60. Levine, M.; Cantilena, C. C., and Dhariwal, K. R. In situ kinetics and ascorbic acid requirements. *World Rev Nutr Diet.* 1993; 72:114-27.
61. Levine, M.; Conry-Cantilena, C.; Wang, Y.; Welch, R. W.; Washko, P. W.; Dhariwal, K. R.; Park, J. B.; Lazarev, A.; Graumlich, J. F.; King, J., and Cantilena, L. R. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 16; 93(8):3704-9.
62. Levine, M.; Rumsey, S. C.; Daruwala, R.; Park, J. B., and Wang, Y. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *JAMA.* 1999 Apr 21; 281(15):1415-23.
63. Lim, P.; Wuenschell, G. E.; Holland, V.; Lee, D. H.; Pfeifer, G. P.; Rodriguez, H., and Termini, J. Peroxyl radical mediated oxidative DNA base damage: implications for lipid peroxidation induced mutagenesis. *Biochemistry.* 2004 Dec 14; 43(49):15339-48.
64. Linn, S. DNA damage by iron and hydrogen peroxide in vitro and in vivo. *Drug Metab Rev.* 1998 May; 30(2):313-26.
65. Loparev, V. N.; Cartas, M. A.; Monken, C. E.; Velpandi, A., and Srinivasan, A. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents. *J Virol Methods.* 1991 Sep; 34(1):105-12.
66. Luo, Y.; Henle, E. S., and Linn, S. Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated fenton reactions. The deoxycytidine family. *J Biol Chem.* 1996 Aug 30; 271(35):21167-76.
67. Lutsenko, E. A.; Carcamo, J. M., and Golde, D. W. A human sodium-dependent vitamin C transporter 2 isoform acts as a dominant-negative inhibitor of ascorbic acid transport. *Mol Cell Biol.* 2004 Apr; 24(8):3150-6.
68. Lutsenko, E. A.; Carcamo, J. M., and Golde, D. W. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *J Biol Chem.* 2002 May 10; 277(19):16895-9.
69. Marnett, L. J. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology.* 2002 Dec 27; 181-182:219-22.
70. Marnett, L. J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2000 Mar; 21(3):361-70.
71. May, J. M.; Cobb, C. E.; Mendiratta, S.; Hill, K. E., and Burk, R. F. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J Biol Chem.* 1998 Sep 4; 273(36):23039-45.
72. Moller, P.; Viscovich, M.; Lykkesfeldt, J.; Loft, S.; Jensen, A., and Poulsen, H. E. Vitamin C supplementation decreases oxidative DNA damage in mononuclear blood cells of smokers. *Eur J Nutr.* 2004 Oct; 43(5):267-74.
73. Muller, E.; Gasparutto, D.; Lebrun, C., and Cadet, J. Site-specific insertion of the (5R*) and (5S*) diastereoisomers of 1-[2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl]-5-hydroxyhydantoin into oligodeoxyribonucleotides. *Eur. J. Org. Chem.* 2001; 2091-2099.

74. Nackerdien, Z.; Olinski, R., and Dizdaroglu, M. DNA base damage in chromatin of gamma-irradiated cultured human cells. *Free Radic Res Commun.* 1992; 16(4):259-73.
75. Podmore, I. D.; Griffiths, H. R.; Herbert, K. E.; Mistry, N.; Mistry, P., and Lunec, J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature.* 1998 Apr 9; 392(6676):559.
76. Pouget, J. P.; Ravanat, J. L.; Douki, T.; Richard, M. J., and Cadet, J. Use of the comet assay to measure DNA damage in cells exposed to photosensitizers and gamma radiation. *J. Chim. Phys.* 1999; 96:143-146.
77. Purmal, A. A.; Kow, Y. W., and Wallace, S. S. Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing in vitro. *Nucleic Acids Research.* 1994 Jan 11; 22(1):72-78.
78. Rae, T. D.; Schmidt, P. J.; Pufahl, R. A.; Culotta, V. C., and O'Halloran, T. V. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science.* 1999 Apr 30; 284(5415):805-8.
79. Ravanat, J. L. and Cadet, J. Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products. *Chem Res Toxicol.* 1995 Apr-1995 May 31; 8(3):379-88.
80. Ravanat, J. L.; Saint-Pierre, C., and 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 Feb 26; 125(8):2030-1.
81. Ravanat, J. L.; Turesky, R. J.; Gremaud, E.; Trudel, L. J., and Stadler, R. H. 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.* 1995 Dec; 8(8):1039-45.
82. Rehman, A.; Collis, C. S.; Yang, M.; Kelly, M.; Diplock, A. T.; Halliwell, B., and Rice-Evans, C. The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 May 8; 246(1):293-8.
83. Rose, R.C. and Wilson, J. X. Ascorbate membrane transport properties. *Vitamin C in health and disease.* Marcel Dekker ed. 1997; pp 143-161.
84. Rumsey, C. S. and Levine, M. Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid humans. *Nutritional Biochemistry.* 1998; 9:116-130.
85. Sancar, A. DNA excision repair. *Annu Rev Biochem.* 1996; 65:43-81.
86. Shinohara, A. and Ogawa, T. Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. *Trends Biochem Sci.* 1995 Oct; 20(10):387-91.
87. Steenken, S. and Jovanovic, S.V. How easily oxidizable is DNA ? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* 1997; 119:617-618.
88. Suh, J.; Zhu, B. Z., and Frei, B. Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 2003 May 15; 34(10):1306-14.
89. Todo, T. Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. *Mutat Res.* 1999 Jun 23; 434(2):89-97.
90. Tolbert, B. M.; Downing, M.; Carlson, R. W.; Knight, M. K., and Baker, E. M. Chemistry and metabolism of ascorbic acid and ascorbate sulfate. *Ann N Y Acad Sci.* 1975 Sep 30; 258:48-69.
91. Tremblay, S. Ph.D. Thesis : "L'oxydation de la cytosine dans l'ADN et sa réparation". 2004.

92. Tremblay, S.; Douki, T.; Cadet, J., and Wagner, J. R. 2'-Deoxycytidine glycols, a missing link in the free radical-mediated oxidation of DNA. *J Biol Chem.* 1999 Jul 23; 274(30):20833-8.
93. Tsao, C. S. An overview of ascorbic acid chemistry and biochemistry. *Vitamin C in health and disease.* Marcel Dekker ed. 1997; pp. 25-58.
94. Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; Rhodes, C. J., and Telser, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004 Nov; 266(1-2):37-56.
95. Von Sonntag, C. *Chemical basis of radiation biology.* London : Taylor and Francis ed. 1987.
96. von Sonntag, C. The chemistry of free-radical-mediated DNA damage. *Basic Life Sci.* 1991; 58:287-317; discussion 317-21.
97. Wagner J.R.; Decarroz C; Berger M, and Cadet J. Hydroxyl radical-induced decomposition of 2'-deoxycytidine in aerated aqueous solutions. *Journal of the American Chemical Society.* 1999 May 5; 121(17):4101-4110. ISSN: 0002-7863.
98. Wagner, J. R.; Hu, C. C., and Ames, B. N. Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Apr 15; 89(8):3380-4.
99. Wallace, S. S. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radical Biology & Medicine.* 2002; 33(1):1-14.
100. Wallace, S. S. Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiat Res.* 1998 Nov; 150(5 Suppl):S60-79.
101. Wallace, S. S.; Bandaru, V.; Kathe, S. D., and Bond, J. P. The enigma of endonuclease VIII. *DNA Repair (Amst).* 2003 May 13; 2(5):441-53.
102. Wang, D.; Kreutzer, D. A., and Essigmann, J. M. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutation Research.* 1998 May 25; 400(1-2):99-115.
103. Watson, J. D. and Crick, F. H. The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1953; 18:123-31.
104. Younes, M.; Juarez, D.; Lechago, L. V., and Lerner, S. P. Glut 1 expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder is associated with poor patient survival. *Anticancer Res.* 2001 Jan-2001 Feb 28; 21(1B):575-8.