

C. R. Soc. Biol., 1984, 178, 205-207.

Radiobiologie.

Le site AP est-il un intermédiaire  
dans la formation des ponts intercaténaux  
dans le DNA irradié ?

par COLETTE GOFFIN et WALTER G. VERLY

Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences,  
Université de Liège, Sart Tilman B6, 4000 Liège I, Belgique.

(reçue le 15 décembre 1983).

*Summary.* — Irradiation of DNA produces primary AP (apurinic or apyrimidinic) sites due to the loss of modified bases and secondary AP sites resulting from the destruction of deoxyribose. The aldehyde groups of the primary AP sites and of some secondary AP sites might be responsible for the formation of the crosslinks in irradiated DNA.

*Résumé.* — Les radiations ionisantes font apparaître, dans le DNA, des sites AP (apuriniques ou apyrimidiques) primaires dus à la perte de bases altérées, et secondaires résultant de la destruction de désoxyribose. Les fonctions aldéhydes des sites AP primaires et de certains sites AP secondaires pourraient être responsables de la formation de ponts intercaténaux dans le DNA irradié.

La perte de bases par le DNA fait apparaître des sites AP (apuriniques ou apyrimidiques). Le DNA du bactériophage T7 est un DNA bicaténaire linéaire qui contient 39 936 paires de nucléotides. Une dépurination acide, qui respecte la structure bicaténaire, fait apparaître 6 sites AP par molécule; le DNA dépuriné est gardé dans une solution de NaCl, citrate, EDTA, pH 7,0.

Pour rechercher les ponts intercaténaux, le DNA est dénaturé par le formamide à 95 % dont on se débarrasse ensuite par dialyse. Les molécules non pontées restent dénaturées, tandis que les molécules contenant des ponts intercaténaux se renaturent. Une sédimentation sur gradient neutre de saccharose permet de distinguer les deux formes : dans les conditions utilisées, les chaînes intactes migrent sur une distance égale à 74 % de la hauteur du gradient, tandis que les molécules bicaténaires intactes ne migrent que sur une distance de 30 %.

Quand il est analysé quelques jours après avoir été préparé, le DNA dépuriné du phage T7 contenant une moyenne de 6 sites AP par molécule montre un petit pic de renaturation témoignant de la présence de ponts intercaténaux. Après 85 jours de stockage à 4° C, la quasi-totalité des molécules sont pontées. Les ponts intercaténaux résultent vraisemblablement de la formation d'une base de Schiff entre la fonction aldéhyde du site AP et un groupe aminé de l'autre chaîne de DNA. Nos résultats montrent qu'à 4° C, il y a suffisamment de mobilité dans la double hélice pour permettre la formation de ces ponts.

Nous avons également étudié le comportement d'un DNA radioactif qui n'avait pas été dépuriné. Ce DNA est tritié dans le groupe méthyle des restes de thymine; il a une radioactivité spécifique de 329 000 dpm par  $\mu$ g. Il est gardé à 4° C dans une solution NaCl, EDTA, pH 7,0, contenant 0,1 p. 100 d'alcool benzylique, à la concentration de 340  $\mu$ g/ml.

Immédiatement après avoir été préparé, il ne contient pas de ponts intercaténaux comme le montre le profil de sédimentation après dénaturation par le formamide. On voit uniquement un pic de chaînes intactes à 74 % suivi d'une traînée de fragments de chaînes; l'étude, à l'aide d'un ordinateur, du profil de sédimentation (1) nous apprend qu'il y a, en moyenne, 0,24 cassure par chaîne. Ce DNA ne contient aucun site AP; en effet, si on le dénature en milieu alcalin pour introduire une cassure près de chaque site AP, puisqu'on neutralise avant de procéder à la sédimentation sur gradient neutre de saccharose, on obtient exactement le même profil de sédimentation qu'après dénaturation par le formamide.

Après 120 jours de stockage à 4° C, la situation a beaucoup changé. Une dénaturation alcaline suivie de sédimentation sur gradient neutre de saccharose permet de calculer que le DNA contient, en moyenne, 2,48 cassures monocaténaux et sites alcali-labiles par molécule. Par ailleurs, la sédimentation après dénaturation par le formamide montre un pic de renaturation indiquant la présence de ponts intercaténaux dans certaines molécules de DNA.

On calcule que, pendant les 120 jours de stockage, il y a eu, en moyenne, 2,38 désintégrations de tritium par molécule de T7 DNA. Ce chiffre est à rapprocher des 2,48 cassures et sites alcali-labiles qu'on a trouvés, en moyenne, par molécule. Selon von Sonntag et coll. (2), le DNA irradié, en présence ou en l'absence d'oxygène, contient 1 site alcali-labile pour 3 cassures monocaténaux. Dans notre cas, nous aurions donc :  $2,48/3 = 0,83$  site alcali-labile, en moyenne, par molécule de T7 DNA après 120 jours. Parmi les sites alcali-labiles présents dans le DNA irradié, il y en a qui résultent de l'altération d'une base suivie de la perte de celle-ci par hydrolyse spontanée du lien glycosylique; un pH élevé entraîne une coupure de la chaîne du côté 3' du site AP principalement par  $\beta$ -élimination. D'autres sites alcali-labiles dépendent de l'altération première du désoxyribose, sans interruption de la chaîne sucre-phosphate, accompagnée de la perte de la base; une fonction aldéhyde apparaît ou non. La présence d'une fonction alcool en 4' résultant de l'ouverture du noyau furanne explique qu'un traitement alcalin entraîne la rupture



de la chaîne sucre-phosphate, du côté 3' du site AP, par formation d'un diester phosphorique cyclique 3',4'.

Les fonctions aldéhydes qui apparaissent au niveau de certains sites AP dans le DNA irradié pourraient être la cause principale des ponts inter-caténares qu'on trouve dans le DNA tritié stocké à 4° C.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. Crine P. & Verly W. G., *Anal. Biochem.*, 1976, 75, 583-595.
  2. von Sonntag C., Hagen U., Schön-Bopp A. M. & Schulte-Frohlinde D., *Adv. Radiation Biol.*, 1981, 9, 109-142.
-