

Thierry DOUKI¹, Jean-Luc RAVANAT, Christine SAINT-PIERRE, Didier GASPARUTTO, Alain FAVIER, Jean CADET

La spectrométrie de masse : un outil remarquable pour l'étude des dommages de l'ADN

RÉSUMÉ

L'endommagement de la structure chimique de l'ADN par des agents chimiques ou des rayonnements peut avoir des conséquences graves, allant de la mort des cellules à l'induction de mutations. Dans les recherches autour de ce thème, la spectrométrie de masse intervient à plusieurs niveaux. Tout d'abord, elle est l'une des techniques de choix pour la caractérisation de nouveaux dommages. Par ailleurs, utilisée comme détecteur sensible et très spécifique en association avec la chromatographie liquide, elle permet d'obtenir des données quantitatives dans des cellules ou des tissus. Enfin, par sa grande efficacité à caractériser des molécules de taille importante, la spectrométrie de masse MALDI-TOF s'impose comme un outil précieux pour les études biochimiques impliquant des fragments d'ADN de synthèse portant des lésions spécifiques.

MOTS-CLÉS

Spectrométrie de masse, ADN, Caractérisation, Dosage de traces, Analyse de macromolécules

Mass spectrometry, an outstanding tool for the study of damage to DNA

SUMMARY

Damaging of the chemical structure of DNA by chemicals and radiations is a deleterious process that may induce cell death or mutagenesis. In this field of research, mass spectrometry is involved in several ways. First, it is an essential technique for the search and characterization of novel types of DNA damage. In addition, when used as a sensitive and specific detector in combination with liquid chromatography, mass spectrometry enables the collection of quantitative and accurate data on the formation of DNA damage at the cellular and organ levels. Last, MALDI-TOF mass spectrometry is able to efficiently characterize large molecules and is thus a reference technique for biochemical studies involving synthetic DNA fragments carrying a specific damage at a precise position.

KEYWORDS

Mass spectrometry, DNA, Characterization, Trace analysis, Analysis of macromolecules

I - Introduction : la problématique des lésions de l'ADN

La magnifique double-hélice de l'acide désoxyribonucléique, l'ADN, est une véritable icône de la biologie moderne. Et avec raison ! En effet, l'ADN joue un rôle fondamental dans la cellule. C'est dans l'enchaînement précis de ses quatre bases (*figure 1*), la séquence, que se trouve stockée l'information permettant la synthèse des différentes protéines dont a besoin la cellule pour survivre, se diviser et répondre aux variations de son environnement. L'ADN assure également le transfert très fidèle de cette information d'une génération de cellules à une autre en étant dupliqué avant chaque division cellulaire. L'ADN est ainsi à la fois le support de l'information génétique et le vecteur de l'hérédité. Comme toute molécule organique, l'ADN peut

subir des réactions chimiques diverses, sous l'influence d'agents physiques, comme les rayonnements ionisant ou ultraviolet, ou chimiques, comme les polluants ou certaines molécules produites de façon endogène. La modification de la structure chimique de l'ADN qui en découle peut avoir des conséquences très néfastes pour son utilisation par la machinerie cellulaire. En effet, la complémentarité entre les bases adénine et thymine d'une part, et guanine et cytosine d'autre part est fondamentale pour les phénomènes se déroulant à ce niveau. Si les enzymes impliquées dans les grandes fonctions de l'ADN rencontrent de nouvelles structures chimiques, réplication et transcription ne s'effectuent plus de façon correcte. Les conséquences peuvent être tout d'abord la mort de la cellule. Plus grave, une erreur dans l'information génétique peut être introduite (et se propager

Outil

¹DSM/INAC/SCIB UMR-E 3 CEA/UJF FRE CNRS 3200 – Laboratoire «Lésions des Acides Nucléiques» – CEA-Grenoble – 38054 Grenoble Cedex 9 – Tél.: 04 38 78 31 91 Fax 04 38 78 50 90 – E-Mail : Thierry.douki@cea.fr

La spectrométrie de masse : un outil remarquable pour l'étude des dommages de l'ADN

ensuite au fil des générations de cellules). C'est une mutation dont l'une des conséquences les plus graves est le déclenchement d'un phénomène de cancérisation. Pour éviter ces processus délétères, les cellules possèdent des protéines spécialisées dans la réparation de l'ADN dont le rôle est d'éliminer les parties dont la structure chimique est altérée. Quel rôle peut jouer un outil comme la spectrométrie de masse dans l'étude de ces phénomènes et problématiques biologiques ? Une première réponse à cette question nous conduit à évoquer les capacités immenses de la protéomique moderne, une discipline qui trouve naturellement des applications dans l'étude de la réparation de l'ADN. Nous n'aborderons toutefois pas ici les travaux relevant de ce domaine mais focaliserons plutôt notre propos sur des études chimiques et biochimiques. En effet, la chimie, que ce soit de synthèse, de caractérisation ou d'analyse, apporte de nombreuses informations dans le domaine de l'étude des dommages de l'ADN. Souvent mise en oeuvre dans ce type d'étude, la spectrométrie de masse s'est imposée comme un outil indispensable.

II - La caractérisation de la structure chimique des dommages

Les dommages de l'ADN sont associés à une énorme diversité de structures car chaque agent génotoxique induit la formation d'un ou plusieurs types de dommages spécifiques.

Il est donc important de connaître, pour un génotoxique donné, la nature et la structure exacte des dommages formés. Ceci ne peut pas être réalisé sur de l'ADN qui aurait été extrait de cellules traitées car les taux de lésions sont (heureusement !) très faibles. Toutefois, cette difficulté a pu être contournée depuis des décennies grâce à l'utilisation de composés modèles. Selon cette approche, des petites molécules correspondant à des fragments d'ADN (bases, nucléosides, oligonucléotides) sont exposées aux agents génotoxiques étudiés afin d'induire des dommages. L'absence de limite liée à la survie cellulaire permet de travailler sur de grandes quantités de molécules soumises à des doses élevées. Les différents composés du mélange sont ensuite séparés et caractérisés. Cette approche se résume ainsi à une problématique classique, mais pas pour autant toujours simple, de caractérisation de petites molécules organiques. La spectrométrie de masse, en particulier les pièges ioniques permettant la fragmentation multiple, y apporte des informations indispensables, mais devant être complétées par d'autres techniques comme la résonance magnétique nucléaire.

La spectrométrie de masse se révèle encore plus incontournable vis-à-vis d'autres problématiques comme l'identification des mécanismes réactionnels. En effet, l'utilisation de composés marqués par des isotopes stables est un outil des plus

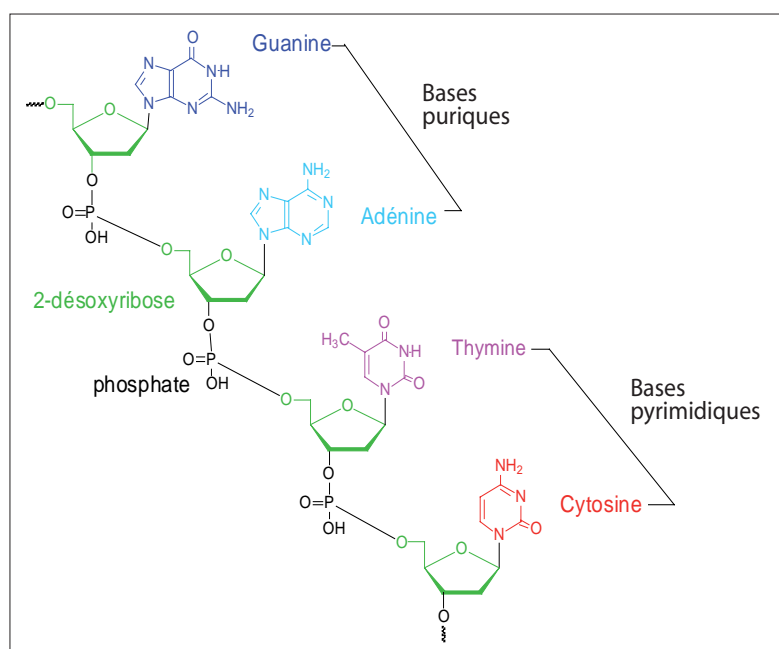


Figure 1

La structure chimique primaire d'un simple brin d'ADN. Sa structure bicaténaire implique notamment des liaisons hydrogènes entre les nucléotides « complémentaires », cytosine et guanine d'une part, thymine et adénine d'autre part. A noter qu'une molécule composée d'une base et d'un 2-désoxyribose est appelée nucléoside. Elle devient nucléotide avec un groupement phosphate.

précieux. Notre équipe a été par exemple confrontée à des lésions radio-induites de l'ADN où une seule attaque radicalaire initiale conduisait à la formation de deux bases oxydées adjacentes issues d'une guanine et d'une thymine (1). La première hypothèse était qu'un radical peroxy se formait d'abord sur la thymine et allait oxyder la guanine par arrachement d'un électron suivi par l'attaque d'une molécule d'eau. Nous avons travaillé sur un composé modèle ne portant qu'une thymine et une guanine et soumis à une irradiation sous atmosphère d'oxygène moléculaire $^{18}\text{O}_2$. L'analyse par spectrométrie de masse électrospray nous a permis de montrer que cette lésion double incorporait de l'oxygène moléculaire (figure 2, voir page suivante), que l'on retrouvait sur la guanine oxydée. Le mécanisme semblait donc plutôt impliquer une addition du peroxy de thymine sur la guanine suivi d'un réarrangement du radical.

Les performances toujours améliorées des spectromètres de masse, notamment en termes de sensibilité, ont permis d'adopter de nouvelles stratégies pour mettre en évidence des lésions jusqu'alors inconnues. En particulier, le couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse facilite la recherche dans des mélanges complexes, à condition de disposer de quelques indices sur la structure des composés ciblés. Il est possible d'utiliser les spectromètres de masse triple quadripolaire en mode dit « perte de neutre » qui permet de visualiser, sur un profil d'élution, toutes les molécules qui perdent le même fragment. Or, les nucléosides se fragmentent quasiment toujours en perdant la partie 2-désoxyribose, soit 116 u.m.a. Nous avons ainsi analysé de l'ADN isolé exposé au

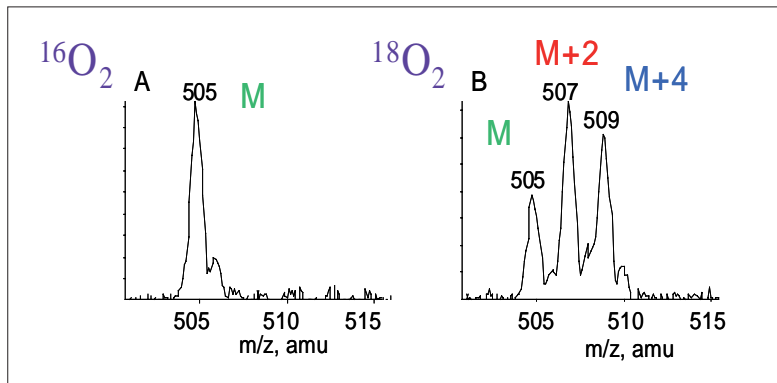
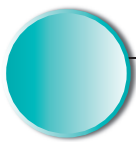


Figure 2

Massif isotopique de l'ion pseudo-moléculaire enregistré par spectrométrie de masse electrospray en mode négatif (ion $[M-H]^-$) d'une lésion complexe. Cette dernière contient un résidu formylamine issu d'une thymine et le dérivé oxydé en position 8 de la guanine. L'expérience est réalisée sur un composé modèle constitué de deux nucléosides reliés par un pont phosphate d(TpG). On voit clairement que lorsque l'oxydation par le rayonnement γ se fait sous atmosphère de $^{18}\text{O}_2$, un ou deux atomes d'oxygène moléculaire sont incorporés. La fragmentation montrera qu'il y en a toujours au moins un sur la guanine oxydée.

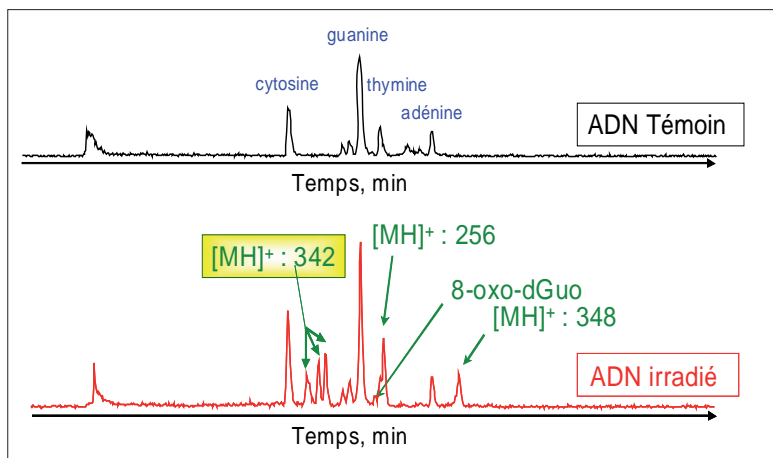


Figure 3

Chromatogramme HPLC-MS/MS enregistrés en mode perte de neutre de 116, correspondant à la perte du 2-désoxyribose caractéristique des nucléosides (electrospray ESI⁺). Le tracé A) correspond à de l'ADN témoin, le tracé B) correspond à de l'ADN exposé au rayonnement γ d'une source de ^{60}Co . On voit nettement apparaître de nouveaux pics. Dans les deux cas, l'ADN est hydrolysé en nucléosides par incubation avec des enzymes avant analyse.

rayonnement γ puis hydrolysé en nucléosides (2). Comme on peut le voir sur la Figure 3, des pics associés à l'apparition de nouveaux nucléosides, dont on connaît ainsi la masse moléculaire, sont venus s'ajouter à ceux correspondant aux quatre bases normales. Nous avons en particulier étudiés ceux de masse 341. Un grand nombre d'études sur des oligonucléotides divers puis des synthèses chimiques nous ont permis de montrer que ces nucléosides proviennent d'une lésion complexe impliquant l'oxydation initiale d'un résidu 2-désoxyribose de l'ADN et la formation d'une cassure, suivies de l'attaque nucléophile d'une cytosine. Sans les performances de l'analyse HPLC-MS/MS, cette lésion qui ne se forme que dans l'ADN entier puisqu'elle nécessite la proximité spatiale des différents réactifs, n'aurait pas pu être identifiée.

III - Quantification des dommages de l'ADN par chromatographie – ESI/MS

L'étude de la réactivité de l'ADN vis-à-vis de divers agents génotoxiques a permis sur des composés modèles et de l'ADN isolé, l'identification de dizaines, voire de centaines de lésions différentes (3, 4). Il importe de savoir si toutes se forment dans les cellules et dans l'organisme ainsi que de déterminer en quelle proportion et en quelle quantité. Le chercheur se trouve là face à un défi analytique sérieux puisque la fréquence des dommages est très basse dans des conditions « raisonnables » d'exposition (faible dose, faible mortalité...), de l'ordre de une lésion pour 1 ou 10 million(s) de bases normales. Autre difficulté, en plus du faible taux de dommages, la taille des échantillons biologiques est souvent limitée, de 5 à 100 μg d'ADN selon les cas. Il faut donc clairement atteindre des sensibilités de l'ordre de la picomole voire de la femtomole. Diverses techniques biochimiques, basées sur l'utilisation d'anticorps ou de procédés électrophorétiques, sont appliquées. Elles sont souvent sensibles mais ne sont que peu quantitatives et peu spécifiques en termes d'identification des lésions reconnues. La spectrométrie de masse, et là encore plus particulièrement l'ESI/MS/MS (Spectrométrie de masse en tandem avec ionisation electrospray), s'impose de plus en plus comme une alternative intéressante (5, 6). Sa sensibilité actuelle se révèle très bien adaptée aux études sur cellules en culture ou chez l'animal.

Comme mentionné précédemment, l'ADN peut facilement être hydrolysé en petites molécules. Dans le domaine de l'analyse des petites molécules, des applications réalisées dans d'autres secteurs, comme par exemple l'analyse environnementale, ont permis de démontrer que le couplage HPLC-MS/MS pouvait se révéler très sensible et spécifique. Pour ce type d'applications, les spectromètres les plus performants sont les appareils triple quadripolaires utilisés en suivi de fragmentation (mode « reaction monitoring »). Cette technique permet de quantifier des molécules connues, dont a été déterminée au préalable la masse moléculaire, la nature des fragments et les propriétés chromatographiques (figure 4). Cette caractérisation initiale constitue l'étape la plus longue car elle requiert la synthèse, l'isolement et la préparation de solutions calibrées de la molécule à quantifier. L'analyse par spectrométrie de masse est réalisée en bloquant le premier quadripôle sur le rapport masse/charge de l'ion pseudo-moléculaire du composé ciblé, alors que le quadripôle situé après la cellule de collision est réglé pour ne suivre que quelques fragments spécifiques de l'analyte. Ces deux niveaux de spécificité assurent un bruit de fond très faible à la détection. La sensibilité atteinte est en routine de 1 à 10 fmol injectées. On notera que de nombreuses méthodes sont développées en dilution isotopique, une approche qui utilise les dérivés marqués par des isotopes stables des molécules cibles comme étalons internes.

De nombreuses équipes ont appliqué cette stratégie à différents types de dommages de l'ADN comme, par exemple, la formation d'adduits impliquant des

La spectrométrie de masse : un outil remarquable pour l'étude des dommages de l'ADN

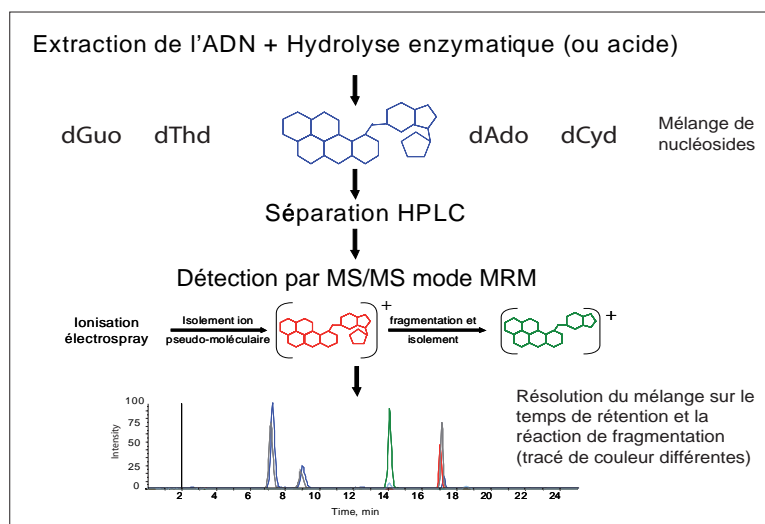


Figure 4

Principe de la quantification des dommages de l'ADN par HPLC-MS/MS en mode «reaction monitoring». Sur le chromatogramme final, chaque analyte cible est repéré par son temps de rétention et sa fragmentation spécifique. L'intégration de la surface des pics et la calibration du signal permet l'obtention de données quantitatives.

composés aromatiques présents dans l'alimentation ou la pollution atmosphérique ou encore des bases modifiées produites par le stress oxydant. Dans ce dernier cas, l'analyse est compliquée par le risque d'oxyder l'ADN pendant son extraction des cellules, un écueil heureusement largement résolu ces dernières années par l'optimisation des protocoles mis en œuvre (7).

Notre équipe a également utilisé l'HPLC-MS/MS pour quantifier les dommages de l'ADN in-

duits par le rayonnement ultraviolet solaire (8, 9). L'absorption de photons UV par l'ADN y déclenche des réactions de dimérisation entre base thymine et/ou cytosine adjacentes. Deux types de photoproduits peuvent se former, les dimères cyclobutane et les photoproduits (6-4). Ces derniers peuvent être à leur tour convertis en isomères de valence Dewar par absorption d'un second photon. Ces réactions peuvent se produire pour chacun des dinucléotides bipyrimidiques (TT, TC, CT ou CC) et c'est donc au total 12 produits qui peuvent se former. Ces composés peuvent être libérés de l'ADN par des enzymes sous forme de deux nucléosides reliés par un groupement phosphate. Leur quantification individuelle est

alors réalisée en électrospray négatif en mode «reaction monitoring». Cet exemple illustre la puissance analytique de la HPLC-MS/MS. En effet, les photoproduits issus de deux thymines ont tous la même masse molaire (tableau 1). De plus, l'isomère de valence Dewar et le dimère cyclobutane présentent des propriétés chromatographiques assez similaires. Par ailleurs, photoproduit (6-4) et isomère Dewar

	Dimère cyclobutane	Photoproduit (6-4)	Isomère de valence Dewar
Structure de la partie base du photoproduit			
Masse moléculaire	546	546	546
Fragmentations principales	<ol style="list-style-type: none"> Coupeure d'une liaison N-glycosidique suivie de la perte d'un 2-désoxyribose (perte de 98 uma) formation de 2-désoxyribose phosphorylé (fragment 195) 	<ol style="list-style-type: none"> réarrangement de la partie base puis perte d'une chaîne carbonée (perte de 113 uma) formation de 2-désoxyribose phosphorylé (fragment 195) 	<ol style="list-style-type: none"> réarrangement de la partie base puis perte d'une chaîne carbonée (perte de 113 uma) formation de 2-désoxyribose phosphorylé (fragment 195)
Temps de rétention	14.0	19.0	13.5

Tableau 1

Structures et caractéristiques utilisées pour la détection des photoproduits dimériques thymine-thymine. Ces derniers sont hydrolysés de l'ADN sous forme de dinucléosides monophosphates (enchaînement base-désoxyribose-phosphate-désoxyribose-base). La séparation chromatographique est réalisée en mode suppression d'ions par de l'acétate de triéthylammonium, et un gradient d'acétonitrile. Ionisation électrospray en mode négatif, détection par spectrométrie de masse en mode «reaction monitoring».

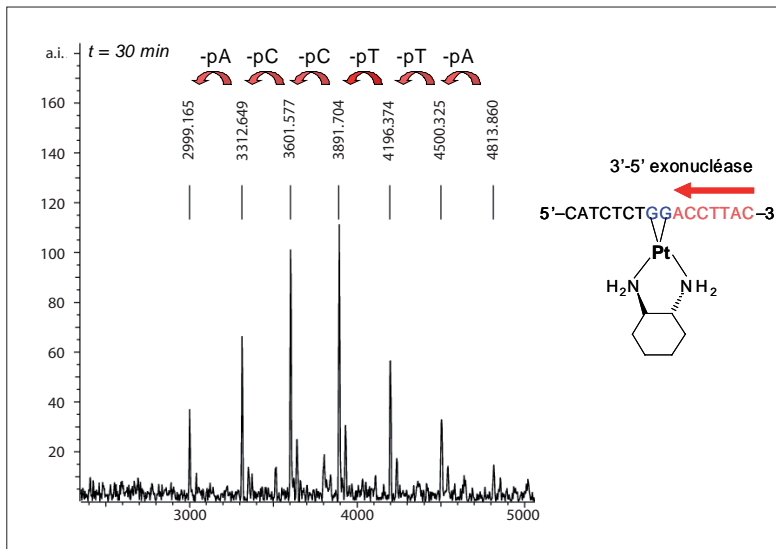
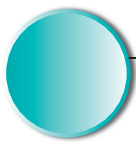


Figure 5

Spectre MALDI-TOF d'un oligonucléotide de synthèse comportant un adduit entre deux guanines et un agent antitumoral platiné. La suite de pics de masse décroissante correspond à des fragments d'ADN pour lesquels le processus de digestion par une exonucléase est de plus en plus avancé. La différence en masse correspond à chaque fois à un nucléotide et permet de reconstituer la séquence

ont les mêmes fragmentations. Cependant, grâce à des différences de caractéristiques de spectrométrie de masse dans le premier cas, ou de comportement chromatographique dans le second, il est possible de doser les trois produits très spécifiquement en une seule injection. Le même raisonnement s'étend aux autres photoproduits. Nous avons pu ainsi déterminer la réactivité de l'ADN en solution aqueuse, dans des cellules humaines en culture et dans la peau humaine complète. On observe toujours une plus forte réactivité des sites TT et TC par rapport à CT et CC. De plus, le rapport entre dimères cyclobutane et photoproduits (6-4) dépend fortement du dinucléotide considéré, il est en moyenne de quatre.

IV - MALDI-TOF pour l'étude des propriétés biologiques des lésions

Grâce aux types d'études rapportées plus haut, il est possible de déterminer la nature et la quantité des dommages qu'un agent génotoxique est susceptible de produire. Ces informations restent toutefois insuffisantes pour déduire la dangerosité de cet agent. En effet, chaque lésion est plus ou moins mutagène et plus ou moins efficacement éliminée par les systèmes de réparation de l'ADN. Si l'on veut avoir accès à ce type de données, l'étude de cellules entières est peu informative car différents types de dommages sont produits et l'ADN est rarement la seule cible des composés toxiques étudiés. Pour obtenir des informations spécifiques sur

une lésion donnée, l'approche la plus pertinente consiste à préparer, par synthèse automatisée sur support solide, des fragments d'ADN (ou oligonucléotides) qui portent un dommage précis au niveau d'une position choisie de leur séquence. Les brins d'ADN ainsi obtenus, longs de quelques dizaines de paires de bases, peuvent être ensuite utilisés comme substrat pour des études enzymatiques *in vitro* (10). A titre d'illustration, il est possible d'observer comment les polymérases se comportent face à la lésion mais également d'étudier l'impact de celle-ci sur leur activité. On peut ainsi déterminer si ces enzymes introduisent bien la base attendue ou non, par exemple une cytosine face à une guanine modifiée.

Dans ce type de travaux, la spectrométrie de masse est mise en œuvre tout d'abord pour le contrôle qualité des oligonucléotides synthétisés. C'est un point primordial car les conditions de synthèse chimique des oligonucléotides sont plutôt dures (pH, oxydation) alors que les bases modifiées sont plus fragiles que leurs précurseurs. Si l'électrospray est bien sûr utilisable, c'est la spectrométrie MALDI-TOF qui est la mieux adaptée à cette tâche puisque l'on recherche des informations sur des molécules de masse moléculaire de plusieurs dizaines de kDa. L'analyse MALDI-TOF des oligonucléotides permet bien évidemment de déterminer leur masse moléculaire mais apporte également des informations sur la séquence de l'oligonucléotide. On emploie pour ce faire des enzymes hydrolysant l'ADN à partir d'une extrémité. L'arrêt de la réaction avant la digestion complète de la séquence permet l'obtention d'un mélange de fragments correspondant à des intermédiaires ayant perdu une, deux, trois ou plus nucléotides (figure 5) (11). La lecture de cette «échelle» de masse permet de reconstituer la séquence. De façon intéressante, la présence d'une lésion bloque souvent les enzymes et un produit de digestion incomplète s'accumule. Ceci permet de vérifier la position et l'intégrité de la lésion dans la séquence synthétisée.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est également utilisée pour élucider des mécanismes enzymatiques, comme par exemple l'action d'enzymes de réparation de l'ADN. Il existe plusieurs systèmes de réparation de l'ADN. L'un d'entre eux, appelé réparation par excision de base (ou système BER (Base Excision Repair)) consiste en l'élimination de la base modifiée par coupure de la liaison entre la base et le 2-désoxyribose par des enzymes de la famille des ADN N-glycosylases. Cette première étape est suivie de l'élimination du site abasique ainsi libéré et de la resynthèse de la séquence correcte par complémentarité avec le nucléotide situé en face du «trou», sur le brin intact. La protéine Fpg (Formamidopyrimidine ADN-glycosylase) est une enzyme du système BER des eubactéries. Le rôle majeur des résidus lysine dans la

La spectrométrie de masse : un outil remarquable pour l'étude des dommages de l'ADN

première étape du processus qui permet à cette protéine d'éliminer certaines bases oxydées a été déterminé en analysant par MALDI-TOF le complexe ADN/enzyme issu de la réaction. En effet, cette première étape conduit temporairement à une base de Schiff qui peut être stabilisée par réduction et a été identifiée par spectrométrie de masse (12). La seconde étape, l'élimination du site abasique, se fait elle par plusieurs mécanismes selon l'enzyme. Le premier est une β -élimination qui laisse d'une part une extrémité portant un groupement phosphate et, de l'autre, un 2-désoxyribose oxydé. Le second mécanisme dit de β,δ -élimination conduit à deux extrémités phosphorylées. L'analyse MALDI-TOF permet facilement de différencier ces deux possibilités, comme nous l'avons fait récemment dans le cas de l'endonucléase VIII (figure 6) (13).

V - Conclusions

Les quelques exemples rapportés dans cet article illustrent bien comment la spectrométrie de masse prend une place grandissante dans tous les aspects de la recherche sur les dommages de l'ADN. Par ailleurs, cette observation réalisée dans un domaine particulier reflète la montée en puissance plus globale de ces techniques en chimie comme en biologie. Les développements futurs seront évidemment conditionnés par les progrès technologiques des nouveaux spectromètres. Dans le domaine de la quantification des dommages dans l'ADN, un gain de sensibilité d'au moins un ordre de grandeur reste souhaitable pour réaliser des études chez

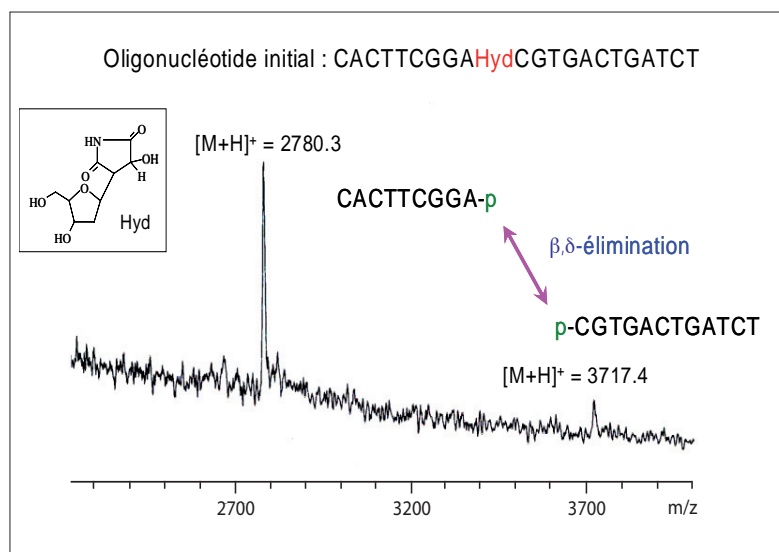


Figure 6

Spectre MALDI-TOF d'un oligonucléotide comportant une lésion 5-hydroxy-hydantoïne (issue de la cytosine) après incubation avec l'endonucléase VIII d'*Escherichia coli*. La perte du nucléotide endommagé avec production de deux extrémités phosphorylées indique la survenue d'un mécanisme de β,δ -élimination dans l'action de l'enzyme de réparation.

l'Homme en population générale. Il sera alors possible de faire converger observations de laboratoire chez l'animal et études environnementales. Pour la caractérisation des dommages ou les recherches biochimiques sur des oligonucléotides, l'utilisation des spectromètres à haute résolution tels qu'apparus récemment promet des résultats de grande qualité.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) DOUKI T., RIVIÈRE J. & CADET J., DNA tandem lesions containing 8-oxo-7,8-dihydroguanine and formamido residues arise from intramolecular addition of thymine peroxyl radical to guanine, *Chem. Res. Toxicol.*, 2002, 15, 445-454.
- (2) REGULUS P., DUROUX B., BAYLE PA., FAVIER A., CADET J. & RAVANAT JL, Oxidation of the sugar moiety of DNA by ionizing radiation or bleomycin could induce the formation of a cluster DNA lesion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104, 14032-14037.
- (3) BURCHAM PC, Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism, *Mutat. Res.*, 1999, 443, 11-36.
- (4) CADET J., BERGER M., DOUKI T. & RAVANAT JL, Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance, *Reviews Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 1997, 131, 1-87.
- (5) ANDREWS CL, VOUIROS P. & HARSCG A., Analysis of DNA adducts using high-performance separation techniques coupled to electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1999, 856, 515-526.
- (6) SINGH R. & FARMER PB, Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection, *Carcinogenesis*, 2006, 27, 178-196.
- (7) GEDIK CM & COLLINS A., Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study, *FASEB J.*, 2005, 19, 82-84.
- (8) DOUKI T., & CADET J., Individual determination of the yield of the main-UV induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions, *Biochemistry*, 2001, 40, 2495-2501.
- (9) MOURETS S., BAUDOUIN C., CHARVERON M., FAVIER A., CADET J. & DOUKI T., Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103, 13765-13770.
- (10) GASPARUTTO D., BOURDAT AG, D'HAM C., DUARTE V., ROMIEU A. & CADET J., Repair and replication of oxidized DNA bases using modified oligodeoxyribonucleotides, *Biochimie*, 2000, 82, 19-24.
- (11) PUAPAIBOON U., JAI-NHUKNAN J. & COWAN JA, Rapid and direct sequencing of double-stranded DNA using exonuclease III and MALDI-TOF MS, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 3338-3341.
- (12) ZHARKOV DO, RIEGER RA, IDEN CR & GROLLMAN AP, NH₂-terminal proline acts as a nucleophile in the glycosylase/AP-lyase reaction catalyzed by *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) protein, *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 5335-5341.
- (13) GASPARUTTO D., AIT-ABBAS M., JAQUINOD M., BOITEUX S. & CADET J., Repair and coding properties of 5-hydroxy-5-methylhydantoin nucleosides inserted into DNA oligomers, *Chem. Res. Toxicol.*, 2000, 13, 575-584.