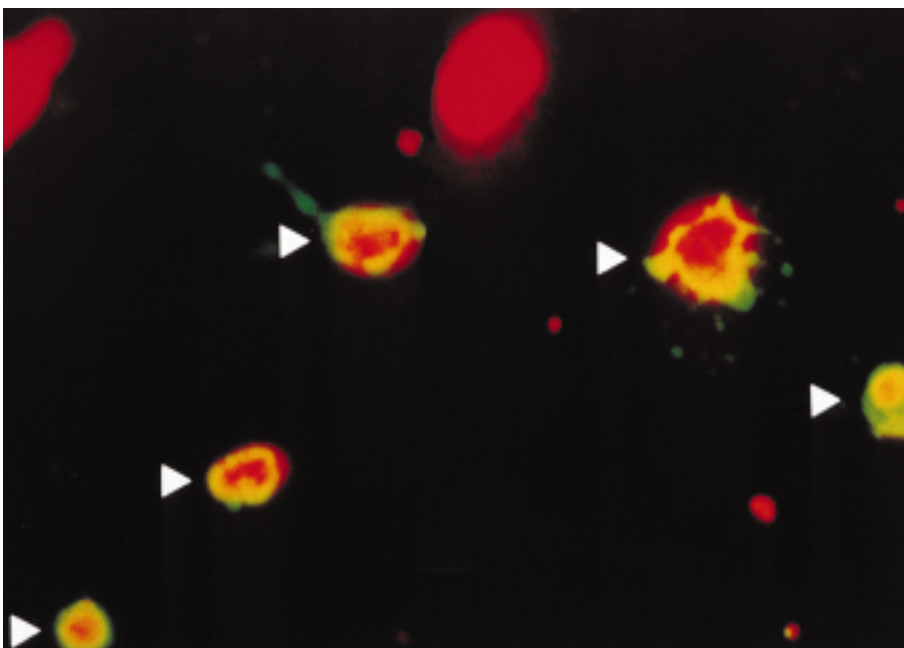
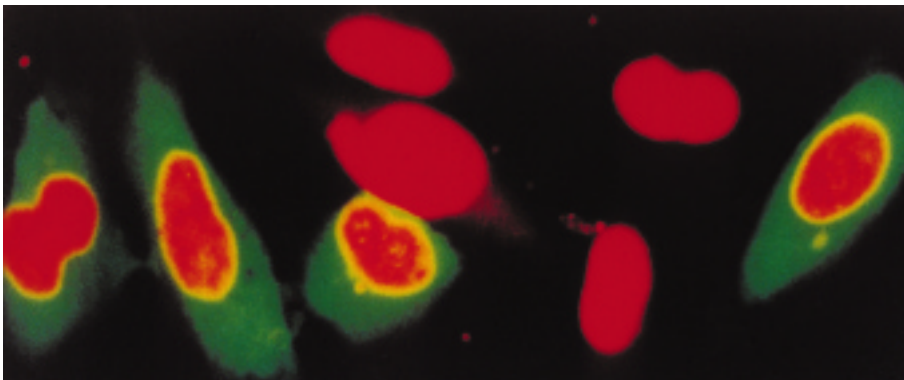


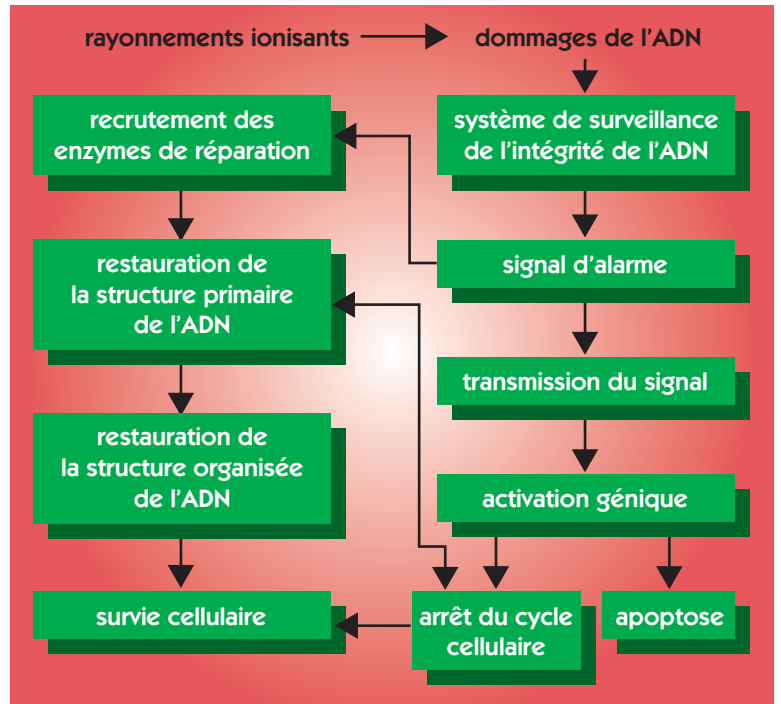
LES GÈNES RADIO-INDUITS

Le système de surveillance de l'intégrité de l'ADN d'une cellule irradiée ne se contente pas de recruter les enzymes permettant la réparation des lésions qu'il a détectées. Il lance simultanément un "signal d'alarme" dont la transmission aboutit à l'activation de gènes spécifiques chargés d'arrêter le cycle cellulaire, le temps d'exécuter les travaux de réparation, ou de conduire à l'élimination d'une cellule trop endommagée. Parmi les très nombreux gènes participant au contrôle de la réponse cellulaire à l'irradiation, les gènes-cibles de la protéine p53 de mammifères sont particulièrement étudiés. "Gardiennne" du génome, cette protéine joue en effet un rôle central dans la réponse cellulaire aux rayonnements ionisants. Cette réponse est moins bien étudiée chez les végétaux. Une façon de l'appréhender est de s'intéresser à l'identification des gènes radio-induits dans la cellule végétale, tout en profitant des acquis scientifiques obtenus dans le domaine animal. La connaissance du génome complet de l'arabette (*Arabidopsis thaliana*), la "plante modèle", ainsi que l'avènement de nouvelles techniques permettent de mener cette recherche à un rythme inconnu auparavant en biologie végétale.



Cellules issues de cancers humains dans lesquelles la protéine p53 produite par un gène muté est incapable d'induire l'apoptose de la cellule en haut et dans lesquelles cette protéine, révélée par fluorescence, a été introduite et a déclenché le processus de mort programmée (celles fléchées en bas).

Figure 1. Les étapes de la réponse cellulaire et moléculaire aux rayonnements ionisants dans les cellules de mammifères.



Des gènes spécifiques activés

La réponse des **cellules** à la présence de dommages radio-induits de l'**ADN** passe par l'activation de **gènes** spécifiques résultant d'une série d'événements moléculaires (figure 1) dont les premiers ont été décrits dans les articles précédents. Les lésions radio-induites de l'ADN sont réparées dans les toutes premières minutes ou, tout au plus, dans les heures qui suivent si la lésion est complexe. L'activation de ces gènes, très spécifiques, aboutit à la synthèse de **protéines** (encadré F, *Les acides aminés, alphabet chimique des protéines*) dont le rôle est soit d'induire l'arrêt de la prolifération cellulaire (voir *Effets des rayonnements sur le cycle cellulaire*) soit d'enclencher le mécanisme d'**apoptose** (voir *Le suicide cellulaire*) selon le nombre et la complexité des lésions ainsi que la fidélité de leur réparation (figure 1). Lorsque les lésions ne sont pas trop sévères, elles sont réparées correctement, c'est-à-dire que l'information génétique est restituée. L'arrêt transitoire en des points précis du cycle cellulaire permet apparemment d'accorder le temps nécessaire à la réparation de l'ADN. La cellule réintègre ensuite son cycle. Si les dommages sont trop importants et ne peuvent être réparés, les cellules endommagées sont

éliminées grâce à l'activation des gènes impliqués dans le phénomène d'apoptose. Globalement, cette stratégie de la cellule, du tissu, de l'organisme irradié évite la transmission de **mutations** aux cellules engendrées, transmission qui est une source potentielle de transformation **maligne**.

De très nombreux gènes participent au contrôle de la réponse cellulaire à l'irradiation. Les niveaux de régulation de l'expression de ces gènes et de leurs produits sont très divers et complexes. Un seul aspect de cette régulation sera évoqué : l'**activation de la transcription** des gènes (production des **ARN** messagers) en citant l'exemple des gènes-cibles de la protéine p53. L'importance des activations de gènes dans la réponse à l'irradiation sera également illustrée par des avancées récentes dans la connaissance des gènes radio-induits chez les végétaux.

Les gènes activés par p53 dans les cellules de mammifères

Le gène p53 code un **facteur de transcription**, la protéine p53, "gardienne" du **génome** qui joue un rôle central dans la réponse cellulaire aux rayonnements ionisants. En réaction à des dommages subis par l'ADN, cette protéine fait l'objet d'altérations structu-

rales qui provoquent sa stabilisation et son accumulation dans le noyau. Elle se fixe alors sur des séquences régulatrices spécifiques de certains gènes, déclenchant l'activation de leur transcription. Les principaux gènes effecteurs de la réponse aux radiations dépendant de p53 sont illustrés dans la figure 2. Ces activations de gènes ont pour conséquence soit de bloquer la prolifération cellulaire de façon transitoire, soit d'entraîner la disparition de la cellule par apoptose.

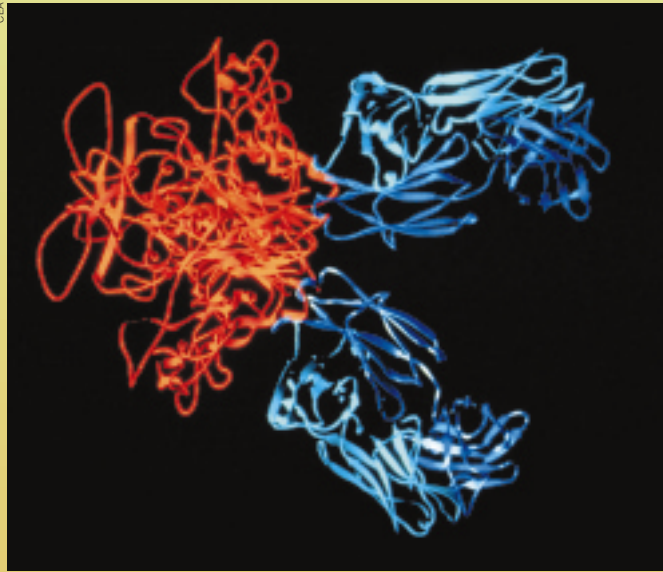
p53 et le contrôle du cycle cellulaire

Plusieurs gènes radio-induits placés sous le contrôle de la protéine p53 provoquent un arrêt de la prolifération des cellules en des points précis du cycle lorsque cette dernière est activée. Avant de détailler leur mécanisme d'action, il faut rappeler que le déroulement correct des phases successives du cycle est orchestré par un système de contrôle complexe incluant diverses familles de protéines, les **cyclines**, ainsi que leurs **kinases** associées (cdk) et des inhibiteurs de ces dernières. Chacune des transitions successives d'une phase à l'autre (encadré E, *Le cycle cellulaire : duplication sous contrôle*) s'effectue sous le contrôle d'un complexe cdk-cycline spécifique. L'importance de ce contrôle est illustrée par la mise en évidence de

Les acides aminés, alphabet chimique des protéines

F

L'information contenue dans un **gène** détermine une séquence bien précise d'**acides aminés** qui va donner naissance à une **protéine** déterminée. Constituant essentiel de la matière vivante, une protéine peut, selon sa nature, être un élément de structure cellulaire, un élément qui reconnaît des entités biologiques étrangères, qui transporte de l'énergie ou, ce qui est un cas fréquent, participe en tant qu'**enzyme** à une réaction chimique particulière au sein même de la cellule. Les acides aminés, au nombre de vingt, ont une structure générale simple. Ils présentent à une extrémité un atome d'azote lié à deux atomes d'hydrogène formant un **groupement amine** NH₂, ensuite un ensemble d'atomes propre à chaque acide aminé, puis à l'autre extrémité un **groupement carboxylique** COOH. Lorsque deux acides aminés se rencontrent, l'hydrogène du groupement amine de l'un s'associe au radical OH du groupement carboxylique de l'autre pour



Représentation de la structure d'une immunoglobuline (anticorps), exemple de protéine de poids moléculaire très élevé.

créer une **liaison peptidique** d'assemblage qui s'accompagne de l'expulsion d'une molécule d'eau H₂O (schéma). Le nombre d'acides aminés composant une protéine peut être inférieur à 100 ou atteindre voire dépasser 1000 pour les plus grosses d'entre elles. La position d'un acide aminé donné dans la protéine finale est déterminée par une succession de trois **bases**, appelée **codon**, présente dans la

chaîne latérale

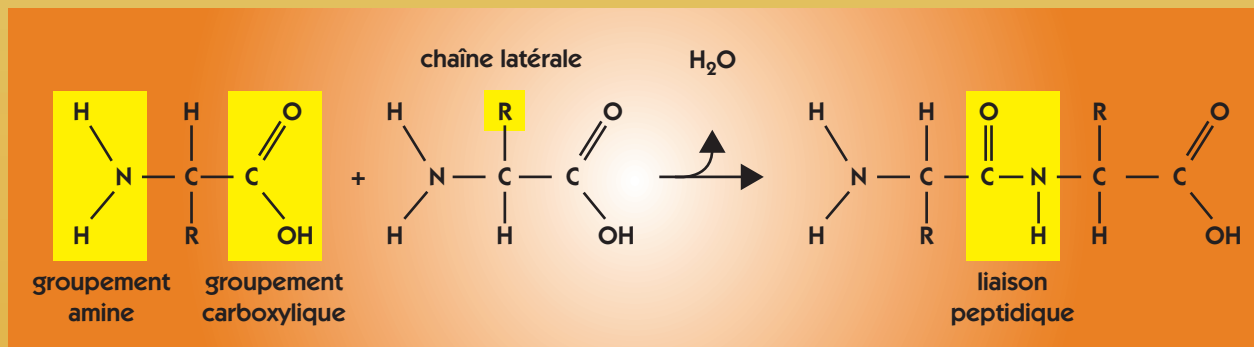
créer une **liaison peptidique** d'assemblage qui s'accompagne de l'expulsion d'une molécule d'eau H₂O (schéma). Le nombre d'acides aminés composant une protéine peut être inférieur à 100 ou atteindre voire dépasser 1000 pour les plus grosses d'entre elles. La position d'un acide aminé donné dans la protéine finale est déterminée par une succession de trois **bases**, appelée **codon**, présente dans la

séquence nucléotidique d'ARN messager.

La synthèse d'une protéine à partir d'une **séquence nucléotidique de l'ADN** appelée région codante ou gène se fait en deux étapes impliquant différentes molécules d'ARN. Tout d'abord, l'information portée par un gène est copiée en une séquence nucléotidique complémentaire appelée **ARN messager** (étape de **transcription**). Celui-ci est ensuite transporté dans le **cytoplasme**, lieu de fabrication de la protéine. Le messager est alors lu par séries de trois bases nucléotidiques, les

codons qui sont reconnus spécifiquement par les molécules d'**ARN de transfert**.

Un codon détermine un acide aminé unique qui est ajouté à la chaîne protéique en fabrication par l'ARN de transfert. Les différents acteurs de cette étape de traduction sont maintenus étroitement associés par les **ribosomes**, un complexe de protéines et d'**ARN ribosomal**.



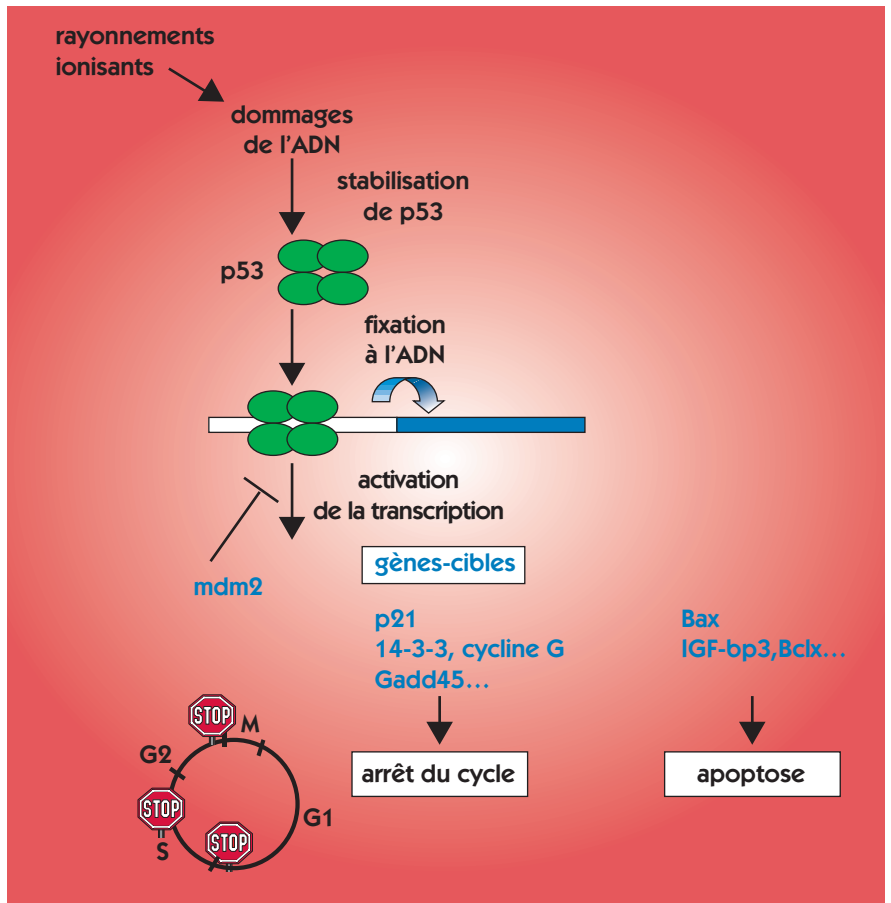
mutations de gènes codant certaines protéines de ces complexes, par exemple la protéine p16 qui participe à la transition de la phase G1 à la phase S. Les arrêts ou délais de cycle induits par les rayonnements aux points de contrôle : transition G1/S, phase S et transition G2/M sont schématisés sur la figure 2.

La réponse "p53 dépendante" implique l'activation du gène p21. La protéine p21 se fixe aux complexes cdk-

cycline de la transition G1/S et bloque les cellules irradiées en phase G1 du cycle. Cet arrêt permet alors la réparation des lésions, évitant la fixation de mutations qui surviendraient s'il y avait réplication d'un ADN endommagé. La protéine p21 contrôle en outre l'arrêt en phase G2 en réprimant l'activité kinase du complexe qui régule la transition G2/M. D'autres gènes radio-induits par la p53 sont également capables d'exer-

cer un contrôle sur l'arrêt du cycle. C'est le cas de ceux qui codent la cycline G ou des protéines de type 14-3-3. En outre, ces dernières sont capables de se fixer à la p53 lorsqu'elle est activée et de renforcer ainsi son activité de facteur de transcription. Le gène *GADD45* (pour *Growth-Arrest and DNA Damage*) joue un rôle dans l'arrêt de la réplication de l'ADN (phase S). Il participerait aussi à la réparation des lésions.

Figure 2. Gènes effecteurs de la protéine p53 dans la réponse aux rayonnements ionisants dans les cellules de mammifères.



p53 et le contrôle de la réponse apoptotique

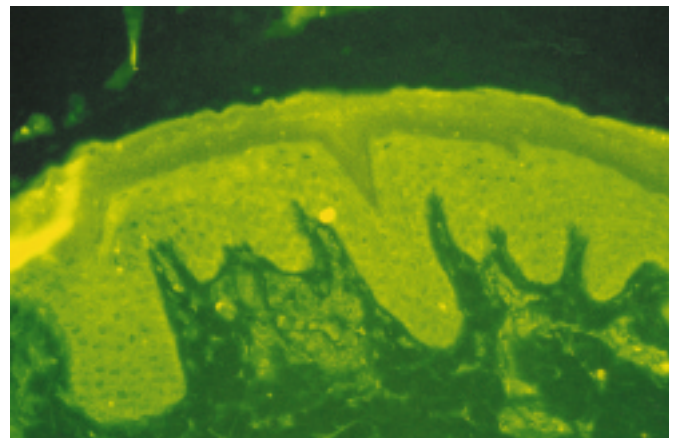
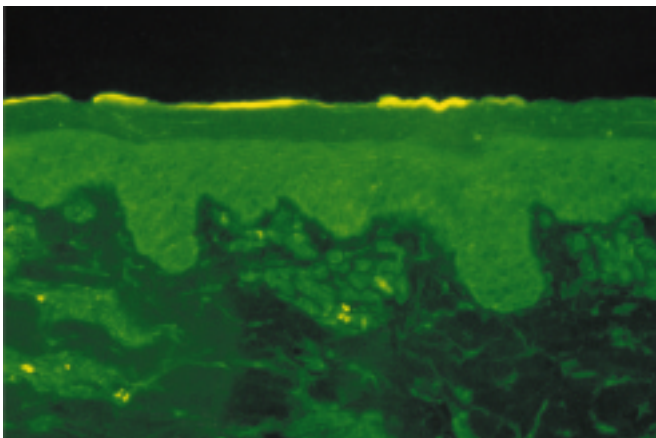
Le mécanisme d'apoptose sous le contrôle du gène p53 peut se déclencher non seulement lorsque des dommages trop importants persistent, mais encore dans d'autres situations comme l'activation d'**oncogènes**. C'est probablement une des raisons pour lesquelles les cellules tumorales se caractérisent souvent par la perte de la fonction de p53. Ce défaut leur confère un avantage sélectif lié à la perte de la fonction apoptotique. (voir *Le suicide cellulaire*). Les muta-

tions de ce gène dit **suppresseur de tumeur** sont retrouvées dans plus de 50 % des cancers.

Lorsque les lésions sont réparées, il est nécessaire que la "signalisation p53" s'éteigne, c'est-à-dire qu'il y ait un rétro-contrôle des régulations des gènes mises en place afin que les cellules réintègrent le cycle. De fait, il existe un mécanisme auto-régulateur de la réponse p53. La p53 active le gène *MDM2* dont le produit inhibe son activité de facteur de transcription. Le mécanisme nécessite un troisième partenaire, la kinase DNA-dépendante (DNA-PK) qui joue un rôle majeur



Mise en évidence par immunofluorescence de l'induction du facteur de croissance TGF- β 1 dans la peau irradiée d'un porc. À gauche, coupe de peau non irradiée (intensité faible du marquage révélé en vert), à droite coupe de peau irradiée (32 grays), 6 heures après l'irradiation (intensité forte du marquage).



M. Martin-LREG/CEA

dans la signalisation et la réparation des cassures double brin de l'ADN. Dans une telle situation, DNA-PK phosphoryle la protéine MDM2 alors inactive. Lorsque l'ADN est réparé, l'activité de DNA-PK s'éteint et MDM2 peut alors se complexer à p53, provoquant l'inactivation de celle-ci, en déclenchant notamment sa dégradation.

De nombreux modèles expérimentaux ont permis d'établir un lien entre la perte ou la dérégulation de la fonction p53 et la radiosensibilité, l'instabilité chromosomique et l'apparition de cancers (voir *L'instabilité chromosomique*). Il faut cependant ajouter que les mécanismes d'arrêt de la prolifération et de l'apoptose ne dépendent pas seulement de l'activation de p53. D'autres processus y contribuent, impliquant une large diversité de gènes, ce qui illustre la complexité des mécanismes de contrôle, multiples et parfois redondants, qui interviennent dans la réponse cellulaire à l'irradiation. Il faut aussi souligner que la régulation fine et la coopération de ces différentes voies moléculaires génétiquement contrôlées sont d'une importance cruciale pour la survie de la cellule et le maintien de la stabilité du génome.

Deux gènes représentatifs chez les végétaux

La réponse aux rayonnements ionisants est moins bien décrite chez les végétaux que chez les animaux. Des **facteurs de transcription** activés par l'ADN endommagé de type p53 et les gènes exprimés sous le contrôle d'une telle protéine sont inconnus. Aussi le Laboratoire de radiobiologie végétale du CEA/Cadarache étudie-t-il cette réponse, chez *Arabidopsis thaliana* entre autres, dans le but d'identifier des fonctions radio-induites potentiellement associées, à la détection et à la réparation de lésions



CEA

de l'ADN et à la régulation du cycle cellulaire. *Arabidopsis* a été choisie comme modèle d'étude parce que cette plante présente un certain nombre de caractéristiques facilitant les approches moléculaires en laboratoire (génome simple, génération rapide en culture, grand nombre de graines) et parce que les outils pour l'analyse fonctionnelle du génome existent. Deux gènes radio-induits chez *Arabidopsis* constituent des exemples représentatifs. Le premier, PARP-1, code une protéine déjà identifiée chez les animaux. Le second, AtGR1, code une protéine nouvelle à la fonction inconnue et qui n'a, à ce jour, été mise en évidence que chez les plantes.

Le gène PARP-1, facteur de survie

Chez les animaux, la protéine poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP-1) est une protéine du noyau qui détecte

et se lie à des cassures de l'ADN. Après fixation à ces lésions, la PARP passe d'un état inactif à un état actif de synthèse de polymères de poly(ADP-ribose). Le transfert de ces derniers sur les protéines acceptrices convertit les lésions en un signal d'alarme qui active la réparation de l'ADN ou, autre branche de l'alternative, la mort cellulaire programmée des cellules trop sévèrement touchées. C'est pourquoi les chercheurs attribuent aux protéines PARP-1 un rôle de facteur de survie dont dépend le devenir de la cellule après un stress génotoxique. La protéine PARP-1 chez *Arabidopsis* est très proche des formes animales en termes de structure et d'activité : les différents domaines structuraux composant cette protéine (domaine de liaison à l'ADN, signal de localisation nucléaire, domaine d'interaction avec les protéines partenaires, domaine catalytique) sont conservés de la plante à l'homme, tout comme la reconnaissance

Arabidopsis thaliana, plante utilisée comme modèle par les chercheurs pour les études génétiques dans le règne végétal.

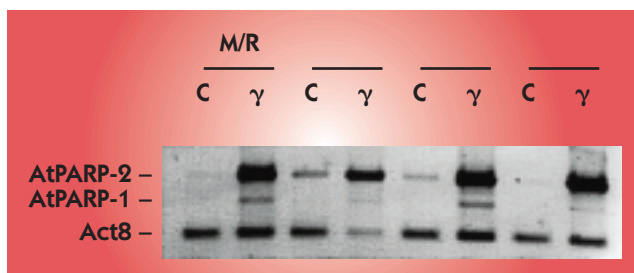


Figure 3. Mise en évidence de l'accumulation de l'ARN messager PARP-1 et PARP-2 dans différents tissus d'*Arabidopsis thaliana* après irradiation par une source de cobalt 60. C correspond à une plante non stressée, γ à une plante traitée par un rayonnement gamma et Act 8 au gène actine, utilisé comme contrôle car son expression à peu près homogène dans tous les types de tissus n'est pas modifiée par les rayonnements ionisants. (M/R est la fraction cellulaire correspondant au méristème apical et aux racines).



Kazmaier/CEA

La fusion du promoteur radio-induit AtGR1 avec le gène rapporteur GUS montre une association étroite entre le niveau d'expression du gène AtGR1 et l'activité mitotique des cellules composant la fleur en développement d'une variété transgénique d'Arabidopsis. Les bourgeons immatures sont très bleus ; ils montrent ensuite une coloration préférentielle des cellules germinales puis, à maturité, une très faible coloration des ovules.



spécifique de cassures de l'ADN et la synthèse de polymères dépendante de lésions de l'ADN. Toutefois, les résultats de la recherche au CEA/Cadarache sont en faveur de mécanismes différents pour le contrôle de l'activité de PARP chez les animaux et chez les végétaux : alors que chez les premiers l'activité de PARP est régulée par l'activation de la protéine après fixation à l'ADN endommagé, chez Arabidopsis les rayonnements ionisants induisent très fortement le taux

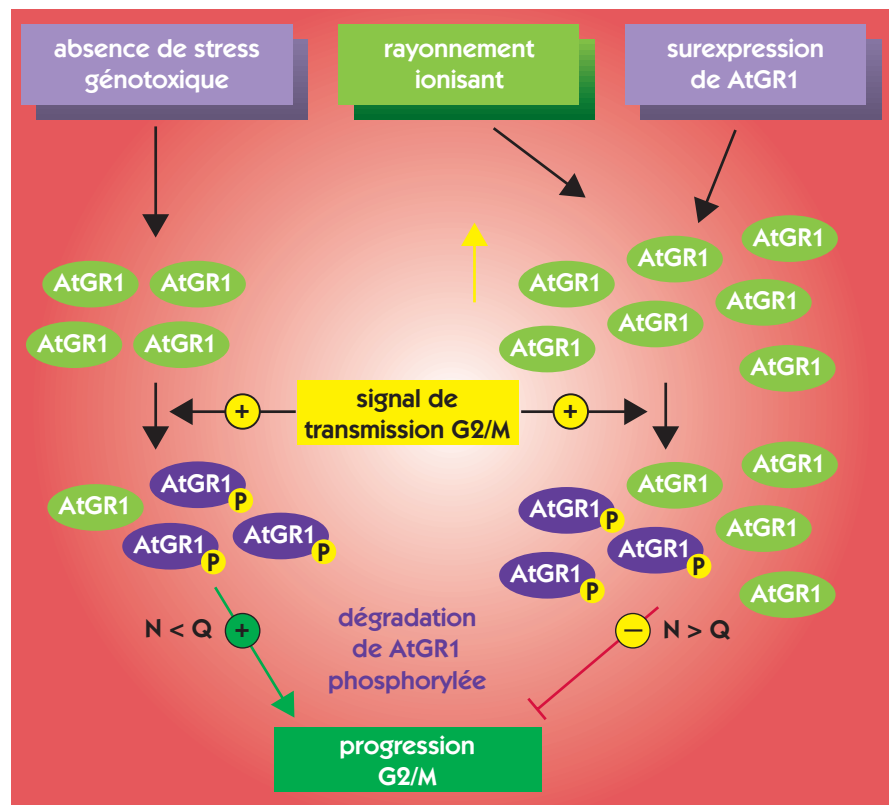
d'expression du gène PARP-1, ce qui a permis de le classer parmi les gènes radio-inductibles. Ceci suppose un autre mode de reconnaissance des lésions de l'ADN chez les plantes. D'autre part, la biosynthèse radio-induite de la protéine PARP-1 chez Arabidopsis est préférentiellement détectée dans des tissus composés de cellules non différenciées et/ou en division, alors que les ARNm PARP-1, qui sont la matrice de la synthèse protéique, s'accumulent dans tous les tissus analysés (figure 3). Compte tenu du fait que la synthèse de protéines est coûteuse en énergie pour une cellule, l'accumulation sélective de la protéine PARP-1 dans certains types de cellules suggère, comme chez les animaux, une association de l'activité PARP-1 végétale au maintien de l'intégrité du génome durant la **réplication** de l'ADN. Ceci ne concerne pas les tissus composés de cellules qui ont terminé leur processus de différenciation et ne se divisent plus.

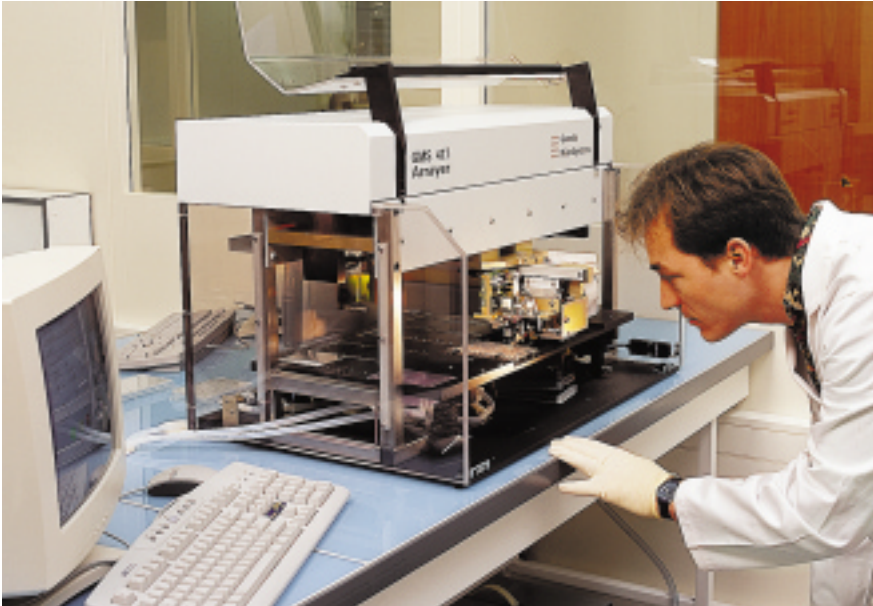
Le gène AtGR1, verrou du cycle cellulaire ?

Le gène AtGR1 (*Arabidopsis thaliana* Gamma Responsive I) a été identifié par une équipe du laboratoire. Ce gène est exprimé à un taux basal dans les cellules



Figure 4. Modèle d'action de la protéine AtGR1. En l'absence de stress génotoxique, la quantité N de la protéine non dégradée (AtGR1) chute en dessous d'un seuil critique Q égal à la quantité de protéine dégradée par phosphorylation (AtGR1_p) et la cellule peut progresser de la phase G2 du cycle cellulaire vers la mitose. Dans le cas inverse, l'accumulation transitoire de la protéine AtGR1 retarde d'autant l'entrée en mitose.





Ph. Pons/CEA

Robot de préparation de puces à ADN testé par le Service de génomique fonctionnelle du CEA à Évry. Les puces ainsi réalisées pourront analyser simultanément jusqu'à 15 552 gènes, permettant une accélération décisive des recherches en radiobiologie tant animale que végétale.



en division mitotique⁽¹⁾, et à un taux très élevé dans des cellules en phase d'**endoreduplication**. L'endoreduplication est caractérisée par la duplication successive de l'ADN **génomique** en absence de séparation des chromosomes et de la **cytokinèse**. Une telle situation est proche d'un blocage du cycle cellulaire juste avant la **mitose**. Les rayonnements ionisants induisent une accumulation massive du **transcrit**, suivie de celle de la protéine, particulièrement bien observable dans les cellules **germinales** (ovules, pollen) qui ne parcourent jamais un cycle d'endoreduplication. Ceci suggère un lien fonctionnel entre la présence de lésions de l'ADN et la nécessité d'arrêter temporairement le cycle cellulaire avant la mitose, qui s'opère au moins en partie par une élévation du contenu intracellulaire en protéine AtGR1. Cette hypothèse est soutenue par des mesures de la quantité de protéine AtGR1 au cours du cycle cellulaire : sa concentration chute au moment de l'entrée en mitose, suggérant que sa disparition momentanée est un signal positif pour la progression du cycle cellulaire vers cette phase. La biosynthèse radio-induite d'AtGR1 constitue un blocage transitoire de l'entrée en mitose. Les résultats obtenus avec des plantes **transgéniques** surexprimant cette protéine confirment cette hypothèse : ces plantes sont stériles en raison d'une distribution aléatoire du matériel génétique lors de la **méiose**. Cette observation indique un blocage définitif

de la division cellulaire, due à la dérégulation de la quantité d'AtGR1 dans la cellule. L'activité biochimique de la protéine AtGR1 reste inconnue, mais le Laboratoire de radiobiologie végétale a proposé un modèle de son action (figure 4). Son rôle serait celui d'un verrou du cycle cellulaire au point de contrôle G2/M après un **stress** radiatif : l'ADN, endommagé par les rayonnements ionisants, induit l'accumulation de la protéine AtGR1, qui retarde de manière transitoire l'entrée en mitose, le temps nécessaire à l'élimination des dommages de l'ADN.

Le végétal rattrape l'animal

L'extraordinaire complexité des fonctions radio-induites ne peut pas être résumée ici. Il faudrait également évoquer les fonctions radio-induites indépen-

dantes de p53 et le rôle d'autres **activateurs de la transcription** tels que BRCA1 et NFκB – moins bien étudiés – dans la "concertation" de la réponse aux rayonnements ionisants. L'avènement de techniques puissantes permettant l'évaluation globale de changements au niveau du transcriptome et du protéome dans un type de cellule considéré et leur application au domaine de la radiobiologie va très rapidement aider au décryptage complet des fonctions induites par les lésions de l'ADN⁽²⁾. Qu'il s'agisse de la technique des puces à ADN (voir encadré dans *Effets héréditaires des rayonnements ionisants*) ou de la technique SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), qui sont toutes deux développées au CEA. *A fortiori*, les approches globales profiteront à la radiobiologie végétale qui pourra, à l'aide de telles techniques, combler son retard par rapport à la radiobiologie animale.

Odile Rigaud

Département de radiobiologie
et radiopathologie
Direction des sciences du vivant
CEA/Saclay

Michael Kazmaier

Département d'écophysiologie végétale
et de microbiologie
Direction des sciences du vivant
CEA/Cadarache

(1) Pointes de racines, méristème apical (petite partie centrale de la rosette qui contient des cellules embryonnaires dont dérivent les feuilles, la hampe et les boutons floraux), primordia foliaires et inflorescences.

(2) Divers outils permettent de caractériser le niveau d'expression des gènes, en fonction du type cellulaire, de l'environnement, du stress, etc. Le **transcriptome** est la partie exprimée du **génome** d'une cellule d'un certain type à un moment et dans des conditions données, les **transcrits** étant les **ARN** messagers. Le **protéome** définit tout ce qui, dans ces conditions, est traduit en **protéines** à partir de la transcription des ARN.