

# ANALYSE STRUCTURALE DES LÉSIONS RADIO-INDUITES DE L'ADN

*Les lésions spontanées ou radio-induites de l'ADN ont des conséquences sur la structure de cette molécule que des techniques d'analyse mettent en évidence de plus en plus finement. La résonance magnétique nucléaire et la dynamique moléculaire permettent notamment d'étudier les changements de conformation de la molécule à partir de l'apparition de la lésion jusqu'à sa réparation éventuelle. Les travaux menés au Commissariat à l'énergie atomique (CEA) démontrent en particulier que plusieurs structures sont généralement associées à un type de lésion donné, du fait de l'augmentation passagère de la flexibilité locale de la molécule d'ADN. L'équilibre entre les différentes conformations dépend aussi des séquences d'ADN mises en jeu et des conditions physico-chimiques du milieu, comme par exemple la température, l'acidité ou la basicité.*

● ● ● ● ●

**Appareil de résonance magnétique nucléaire, installé au CEA/Saclay, utilisé pour déterminer la structure de macromolécules biologiques telles que les protéines ou les fragments d'ADN. Le champ magnétique, produit par une bobine supraconductrice maintenue à la température de l'hélium liquide dans un cryostat, autorise l'étude des atomes possédant un spin (moments magnétiques associés aux noyaux résultant de la rotation des différentes charges) non nul. L'analyse des interactions entre les atomes d'hydrogène, principalement, fournit des informations structurales permettant de résoudre la structure en solution. En arrière-plan sont visibles l'électronique et le système informatique destiné au stockage, au traitement et à l'analyse des données.**



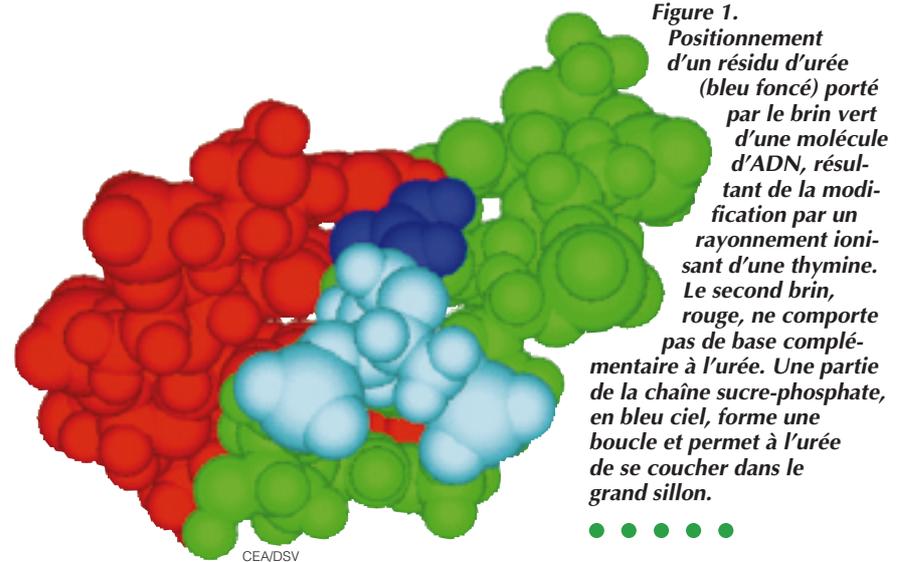
Emmanuel Joly/CEA

## Deux moyens d'analyse structurale de l'ADN

Les **rayonnements ionisants** (rayons X ou gamma) sont à l'origine de nombreuses modifications de la molécule d'**ADN** car ils provoquent la création de radicaux libres eux-mêmes très réactifs vis-à-vis de cette molécule. L'étude des conséquences sur la structure de l'ADN induites par les rayonnements ionisants, par rapport à la structure normale, vise à comprendre les mécanismes de reconnaissance de la molécule par l'ensemble des **protéines** chargées d'en assurer l'intégrité (encadré A, **La molécule d'ADN, vecteur de l'hérédité**). Les techniques employées sont principalement la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la dynamique moléculaire. La RMN est une méthode spectroscopique non destructive qui fournit des informations sur l'environnement local des noyaux atomiques en solution. Il peut s'agir d'informations structurales telles que la distance entre deux atomes<sup>(1)</sup> ou un angle de torsion. Cette technique permet également de déterminer les atomes impliqués dans une **liaison hydrogène** ou d'accéder à la dynamique de la molécule. Ces différentes informations sont utilisées pour construire un ou plusieurs modèles représentatifs de la structure moyenne de la molécule d'ADN en solution dans l'eau, solvant des molécules des **cellules**. Les modèles obtenus servent de base à des calculs de dynamique moléculaire qui simulent le mouvement des atomes à une température donnée<sup>(2)</sup>. Ils permettent de valider la stabilité des modèles et d'étudier les déformations de la molécule d'ADN.

## Des paires de bases plus ou moins stables

Parmi les agents **génotoxiques** extérieurs à la cellule, les rayonnements ionisants sont responsables de lésions chimiques des **bases** ou de l'élimination totale de bases par rupture de la liaison **sucre-base**. S'il s'agit d'une **purine** (adénine ou guanine), ce processus de rupture est appelé **dépuration** ; dans le cas d'une **pyrimidine** (cytosine ou thymine), il est nommé **dépyrimidination**. La molécule d'ADN possède natu-



rellement plusieurs liaisons covalentes<sup>(3)</sup> peu stables, ce qui conduit à des modifications spontanées des bases. Cependant, le taux de ces modifications peut être augmenté par les produits de la **radiolyse** de l'eau (voir *La radiolyse de l'eau*). Quand un radical hydroxyle ou un électron libre entre en contact avec l'ADN, cela provoque un transfert de charge. Par exemple, sous l'effet de ce transfert de charge, la thymine est progressivement fragmentée pour aboutir à un résidu d'urée. Le changement de composition chimique d'une thymine en urée induit une modification pour l'information codante<sup>(4)</sup> initialement portée par la thymine. La présence de l'urée dans une molécule d'ADN entraîne des propriétés **mutagènes** et **létales** car l'**ADN polymérase** tant lors de la répllication de l'ADN (encadré B, **La répllication de l'ADN : une fidélité quasi parfaite**) que lors de sa réparation place préférentiellement une thymine en face de la lésion et non pas une adénine comme attendu normalement, car une thymine donne une structure particulièrement stable avec l'urée. Le couple thymine-urée, à l'intérieur de la **double hélice** d'ADN, est fermé par deux liaisons hydrogène. Par contre, quand une adénine est en face de l'urée le système devient instable et aucune étude structurale de ce cas n'est possible. L'ADN polymérase peut également sauter la lésion, ce qui crée un décalage dans la lecture du **gène** et donc modifie la nature de la protéine qu'il code. Dans ce cas, l'urée est rejetée à l'extérieur de l'hé-

lice. Plutôt que d'être en contact avec le solvant, la base modifiée se couche dans le grand sillon de l'ADN, ce qui engendre une distorsion importante du **squelette phosphodiester** (figure 1).

## L'absence de base potentiellement mutagène

Les sites abasiques se forment spontanément dans les conditions normales. Le nombre de dépurinations est estimé à  $3 \cdot 10^{-11}$  par **nucléotide** et par seconde dans un ADN cellulaire. Ce phénomène est donc un événement fréquent. L'extrapolation des évaluations *in vitro* de cette fréquence indique environ 10 000 dépurinations par cellule de mammifère et par jour. En outre, des agents extérieurs sont capables d'accélérer l'apparition de ces sites en agissant sur les bases de la molécule d'ADN. Pour leur part, les rayonnements ionisants sont également en mesure de toucher directement la liaison désoxyribose-base. L'absence de base, donc d'information

(1) Cette distance peut varier de 2 à 5 Å, un angström =  $10^{-10}$  m.  
 (2) L'analyse de cette simulation permet d'obtenir différentes informations, par exemple la courbure de l'ADN, la diffusion de molécules d'eau ou la variation de l'énergie du système.  
 (3) Liaison chimique entre deux atomes produite par la mise en commun d'une ou de plusieurs paires d'électrons.  
 (4) Information portée par une base de l'ADN qui permet le choix de l'**acide aminé** pour la synthèse des protéines.

## La réplication de l'ADN : une fidélité quasi parfaite

B

Pour assurer la transmission du message génétique, la molécule d'**ADN** est tenue de se répliquer un grand nombre de fois au cours du développement de l'organisme. En effet, chaque cellule, avant de se diviser, dédouble son ADN afin d'en produire deux copies identiques, chacune étant ensuite transférée dans une des cellules filles qui hérite ainsi normalement de l'intégralité de l'information génétique de la cellule mère.

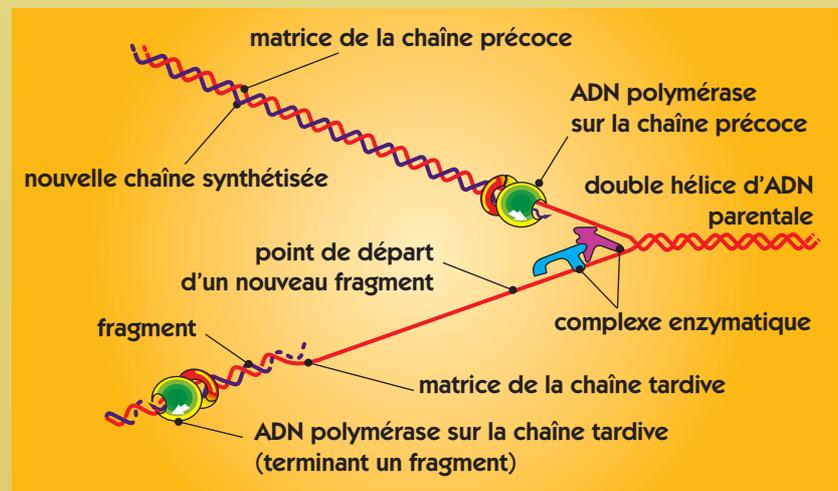
La réplication de l'ADN doit donc être très fiable et reproduire scrupuleusement la séquence des **nucléotides**. L'intégrité de la molécule est garantie par un ensemble de **protéines** qui vont reconnaître et réparer les altérations diverses auxquelles elle est soumise. Entre autres facteurs<sup>(1)</sup>, les rayonnements ionisants (rayons X ou gamma notamment) peuvent être à l'origine de nombreuses modifications de la molécule d'ADN.

La réplication de la double hélice d'ADN commence avec la séparation en un point donné de ses deux chaînes complémentaires. Une **enzyme** se déplace le long de l'échelle et rompt en leur milieu les liaisons qui en constituent les barreaux. Deux brins distincts sont alors obtenus, formant les deux branches d'une **fourche de réplication** (illustration). À chaque fourche de réplication, l'ADN des deux nouvelles chaînes filles est synthétisé par un complexe composé de plusieurs enzymes, dont l'**ADN polymérase** (schéma). Une des deux chaînes dite précoce est synthétisée de façon conti-

nue, l'autre dite tardive l'est par fragments. Chaque brin parental sert de matrice pour l'élaboration d'une nouvelle molécule fille par l'addition séquentielle de nucléotides qui s'accrochent aux demi-barreaux et reconstituent la moitié manquante de l'échelle originelle. Le nucléotide à ajouter à chaque étape est sélectionné pour créer, avec le nucléotide opposé de la chaîne de départ, une paire de **bases** complémentaires (par exemple, une

nouvellement synthétisée ayant une séquence nucléotidique identique à celle de l'hélice parentale, qui a servi de matrice. C'est pourquoi le mécanisme de réplication de l'ADN est qualifié de *semi-conservatif*.

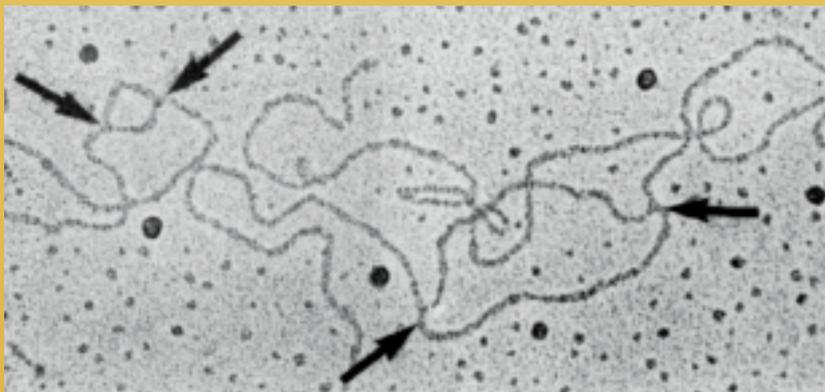
Une des caractéristiques les plus impressionnantes de la réplication de l'ADN est sa fidélité. Des processus enzymatiques complexes assurent une vérification et une correction des inévitables erreurs qui apparaissent de



adénine se lie à une thymine) et engendrer ainsi une nouvelle chaîne dont la séquence est complémentaire de celle de la chaîne parentale. Les réactions chimiques mises en jeu fournissent l'énergie nécessaire à la réplication et la rendent irréversible.

L'information génétique est dupliquée dans son intégralité. Deux doubles hélices complètes d'ADN sont formées, chacune étant composée d'une chaîne d'origine et d'une chaîne

façon aléatoire. Plusieurs mécanismes de correction interviennent pour éliminer des nucléotides mal positionnés, permettant la copie de chaque séquence nucléotidique d'une molécule d'ADN avec moins d'une erreur pour un milliard de nucléotides additionnés. Très rarement, cependant, le mécanisme de réplication saute ou ajoute quelques nucléotides, voire en met un à la place d'un autre. Tout changement de ce type dans une séquence d'ADN constitue une erreur génétique, appelée **mutation**, qui sera copiée dans toutes les générations cellulaires futures, les séquences d'ADN erronées étant dupliquées aussi fidèlement que les séquences correctes.



Atlas biol. cell. - Roland/MASSON

(1) La liste des agressions que l'environnement peut infliger à une cellule est longue : *stress oxydant*, choc thermique, *stress chimique*, *stress génotoxique*, *stress mécanique*, choc osmotique...

codante, va donner lieu à une situation potentiellement mutagène. Des études génétiques montrent que l'ADN polymérase incorpore préférentiellement l'adénine puis la guanine en face d'un site abasique. Les études structurales sur des **oligonucléotides** comportant un site abasique mettent en évidence que l'ADN garde globalement sa forme normale mais qu'en fonction de la base en face du site abasique, différentes conformations sont observées. Si une purine se trouve en face du site abasique, elle reste empilée à l'intérieur de l'hélice. L'oligonucléotide contenant l'adénine en face du site abasique est toutefois plus stable que celui incluant la guanine. La situation est plus complexe lorsque c'est une pyrimidine qui fait face au site abasique. La cytosine est rejetée à l'extérieur de l'hélice alors que la thymine peut se situer aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur de l'hélice. Ces résultats font apparaître l'importance de l'énergie d'empilement entre les bases<sup>(5)</sup> pour la structuration des molécules.

### Les cassures simple brin et les lacunes réparables pour la plupart

La cassure simple **brin** (*nick*) d'une molécule d'ADN est un événement fréquent puisqu'il peut s'en former jusqu'à 150 000 par cellule et par jour (figure 2). Si deux cassures proches affectent le même brin, il se produira une perte (**délétion**) d'un morceau de la chaîne. Cette modification est appelée lacune ou *gap*. L'organisme peut aussi créer lui-même des lacunes lors d'un processus de réparation de l'ADN. La lacune d'un nucléotide est ainsi un intermédiaire du mécanisme de réparation le plus répandu chez la **bactérie** *Escherichia coli*. Ce type de réparation est appelé réparation par excision d'un nucléotide. Une lacune est donc une structure à la fois fréquente, bien reconnue et réparée dans les organismes. L'étude de la structure et de la dynamique d'oligonucléotides comportant soit une cassure simple brin, soit une lacune d'un nucléotide a montré qu'une purine face à la lacune est toujours empilée à l'intérieur de l'hélice et qu'il se forme une cavité. Pour une pyrimidine, il existe un équilibre entre deux

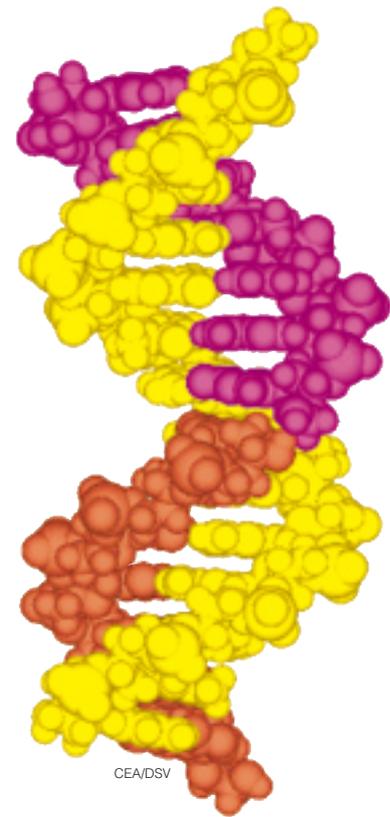


Complexe résolu par cristallographie entre l'ADN polymérase humaine (en jaune), enzyme dont la fonction est de synthétiser de l'ADN, et une molécule d'ADN (en rouge) ayant une cassure simple brin, repérée par deux flèches. Il est intéressant de noter l'angle droit formé par l'ADN.

Structure résolue par Sawaya et al., déposée à la Protein Data Bank (PDB) sous la référence 1BPZ.pdb

structures. Dans une première conformation, la base est à l'intérieur de la double hélice alors que dans la seconde, la pyrimidine est rejetée à l'extérieur de l'hélice et les deux paires de bases adjacentes se retrouvent empilées normalement.

Dans tous les cas, la présence d'une lacune augmente à cet endroit la flexibilité de l'oligonucléotide dont la courbure s'amplifie. L'hydratation de la lacune est différente selon la structure. Si la structure est droite, les molécules d'eau se placent sur deux couches ; si elle est courbée, sur une seule. Un réseau de liaisons hydrogène se constitue entre les molécules d'eau d'une part, entre les molécules d'eau et les bases autour de la lacune d'autre part. La structuration des molécules d'eau dans la cavité participe à la stabilité de l'ensemble. Ces mécanismes s'expliquent en terme d'énergie. En effet, les équilibres atteints

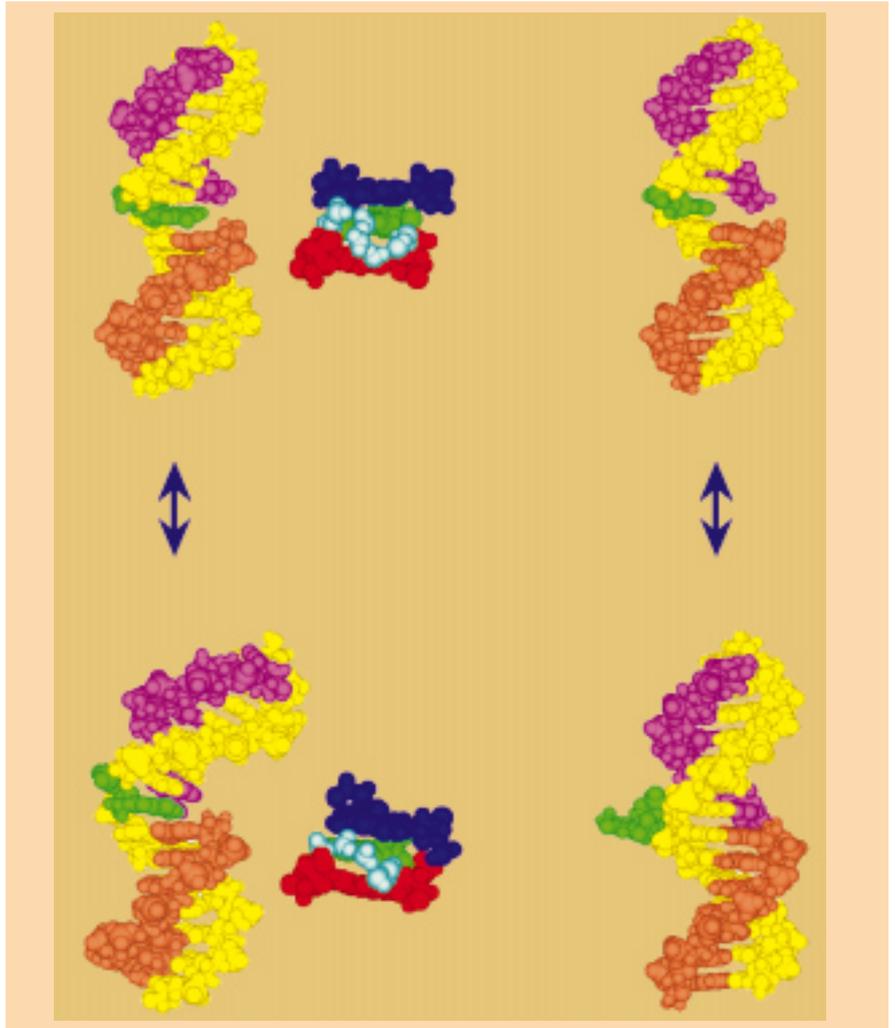


CEA/DSV

(5) L'architecture de la double hélice d'ADN est maintenue, premièrement, par les liaisons hydrogène entre les bases des deux brins et, deuxièmement, par l'énergie d'empilement, c'est-à-dire la surface de contact entre les bases sur le même brin.

Figure 2. Structure d'une molécule d'ADN comportant une cassure simple brin. Le brin continu est en jaune, le brin interrompu en violet puis en beige.

Figure 3. Structures de molécules d'ADN comportant une lacune de un nucléotide face à une base (en vert) : une purine (guanine) à gauche, une pyrimidine (thymine) à droite. Les brins continus sont en jaune, les brins complémentaires en violet et en beige. Dans le cas de la purine, à la forme droite (en haut) et à la forme courbée (en bas) de l'oligonucléotide correspondent respectivement des structures d'hydratation de la lacune à deux et une couches de molécules d'eau (en bleu). Les deux paires de bases adjacentes à la cavité sont en bleu foncé et en rouge. Dans le cas de la pyrimidine sont représentées en haut la conformation où la base est à l'intérieur de l'hélice et en bas celle où la base



CEA/DSV

sont régis par le gain d'énergie d'empilement obtenu pour une structure en fonction de la surface de contact entre les bases. Une pyrimidine, dont l'énergie d'empilement est inférieure à celle d'une purine, est plus facilement rejetée à l'extérieur de l'hélice (figure 3).

Le mécanisme de réparation d'une lacune nécessite que la base non appariée soit impérativement à l'intérieur de l'hélice. Pour les conformations où la base est rejetée à l'extérieur de l'hélice, dans environ 30 % des cas, le processus de réparation est inopérant.

telles que celles où la base se trouve à l'extérieur de l'hélice. Elles constitueraient donc des éléments clés dans le maintien de l'intégrité du **génom**e. Les résultats obtenus et les travaux en cours rendent déjà compte de la performance des systèmes de réparation qui, pour être efficaces, sont tenus de reconnaître et de réparer l'ensemble des erreurs introduites dans les gènes. En effet, un défaut de réparation qui laisse la cellule compatible avec la vie, c'est-à-dire l'apparition d'une **mutation**, doit rester un événement très rare. ●

### Des protéines pour les structures particulières ?

Il existe un grand nombre de protéines associées au complexe de réparation de l'ADN, dont le rôle est toujours inconnu. Pourtant, elles s'avèrent absolument nécessaires. Certaines pourraient être impliquées dans la reconnaissance de conformations particulières d'ADN,

**Yves Boulard**  
 et **Georges Victor Fazakerley**  
 Département de biologie cellulaire  
 et moléculaire  
 Direction des sciences du vivant  
 CEA/Saclay