

LES DOMMAGES RADIO-INDUITS DES ACIDES NUCLÉIQUES

L'ADN, la molécule qui contient toutes les informations nécessaires au fonctionnement de l'organisme et à la reproduction, est, au sein de chaque cellule, la principale cible susceptible d'être altérée par des rayonnements. Elle peut l'être directement par un dépôt d'énergie en excès ou par l'arrachement d'un électron, qui casse ou déforme les morceaux de l'ADN. Elle peut l'être aussi indirectement, par l'effet de ces mêmes phénomènes sur les molécules d'eau qui l'entourent et constituent plus des deux-tiers du poids de l'organisme. Après avoir identifié les différents types de lésions que les rayonnements sont capables d'infliger aux acides nucléiques (ADN et ARN), les chercheurs élargissent chaque jour leurs connaissances sur les mécanismes mis en jeu, sur la mesure des dommages effectivement imputables aux rayonnements et sur le rôle que ces dommages jouent au niveau du tissu, de l'organe, voire de l'organisme entier.

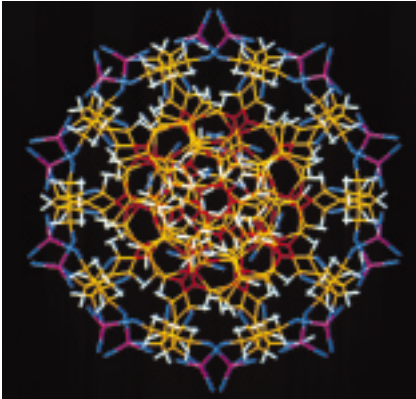


● ● ● ● ●
Lecture d'un autoradiogramme. Chaque groupe de quatre bandes sombres correspond à la séquence nucléotidique des quatre bases (adénine, guanine, cytosine et thymine) d'un fragment d'ADN. La dégradation de ces bases est une des principales modifications que les rayonnements ionisants peuvent provoquer dans l'ADN

Deux mécanismes principaux

Les **acides désoxyribonucléiques (ADN)** sont les principales cibles, au niveau de la **cellule**, de l'action biologique d'un **rayonnement ionisant (rayons X, gamma, ions lourds)**. Les effets de ces rayonnements sur l'ADN peuvent entraîner une cascade de conséquences pouvant aboutir à la mort de la cellule (**léthalité**) ou à des modifications de son "programme", par **mutagenèse** ou/et **cancérogenèse**. Deux processus principaux sont impliqués dans les modifications radio-induites de l'ADN cellulaire.

Le premier processus fait intervenir un effet *direct* ou quasi-direct. Il se traduit par l'excitation (apport d'énergie) et l'ionisation (arrachement d'un électron) de l'ADN et des molécules d'eau liées à ce polymère biologique. Les électrons éjectés réagissent préférentiellement avec les **bases pyrimidiques (thymine et cytosine)** et **puriques (adénine et guanine)**, bases qui constituent les "barreaux de l'échelle" de l'ADN (encadré A, *La molécule d'ADN, vecteur de l'hérédité*) pour former des anions radicaux. Des réactions de transfert de charges électriques se produisent en par-



J-L. Martin/J-C Lambry/INSERM

Coupe transversale d'une molécule d'ADN.

ticulier le long de la chaîne d'ADN, avec une localisation préférentielle sur les bases de type guanine où elles ouvrent des "trous positifs" sous forme de cations radicalaires.

Le deuxième processus d'endommagement radio-induit de l'ADN est essentiellement *indirect*. Il implique des espèces réactives provenant de la décomposition sous l'effet des rayonnements des molécules d'eau un peu distantes de l'ADN (**radiolyse**). Ces espèces réactives sont essentiellement le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), dont la réactivité est prédominante, l'atome d'hydrogène (H^\bullet)

et l'électron hydraté ($\text{e}_{\text{aq}}^{-\bullet}$) (voir *La radiolyse de l'eau*). Les intermédiaires radicalaires des bases et des fragments de sucres (désoxyribose) générés par ionisation ou après réaction des électrons et des produits de la radiolyse de l'eau sont transformés très rapidement (moins d'une milliseconde) en produits finaux de décomposition. L'oxygène, par son effet sensibilisateur, participe à la plupart de ces réactions radicalaires de dégradation.

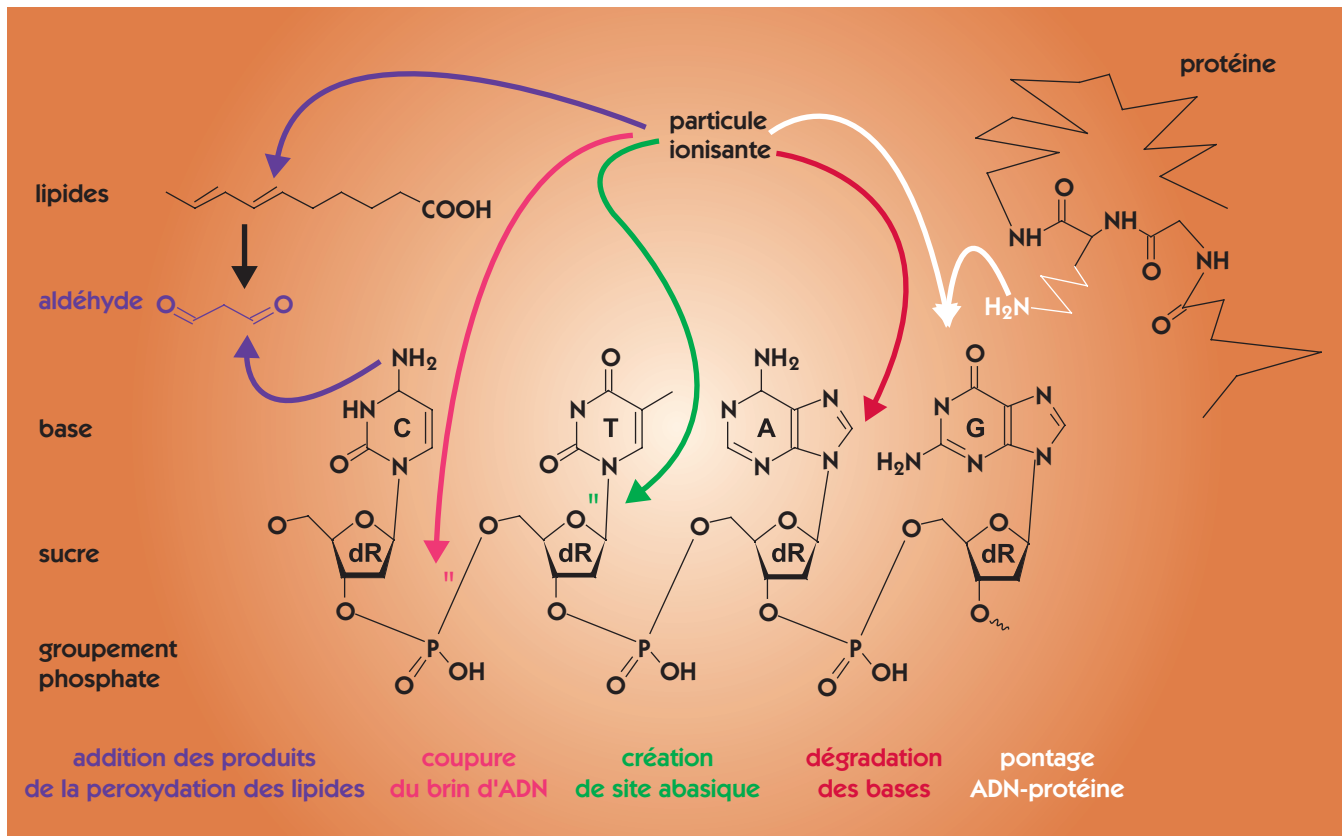
Cinq grands types de modifications

Les modifications qui résultent de ces deux principaux mécanismes de dégradation sont regroupées en cinq grandes catégories (figure 1) :

- les **cassures de chaînes d'ADN**, qu'il s'agisse de coupures simples (d'un **brin**) ou doubles (des deux brins) résultent de réactions radicalaires affectant les sucres (désoxyribose) qui constituent les "montants de l'échelle" de la double chaîne d'ADN ;
- les **dégradations** des bases puriques et pyrimidiques ;
- la **création de sites abasiques** (disparitions de bases), qui résulte de l'éli-



Figure 1. Les cinq grands types de dégradation de l'ADN, présentés sur les quatre bases pouvant être touchées, les pyrimidines (cytosine C et thymine T) et les purines (adénine A et guanine G). Le pontage ADN-protéine, en particulier, est illustré par un exemple bien étudié au Laboratoire lésions des acides nucléiques du CEA. Dans un premier temps, un électron est arraché à la base guanine, dans un second temps le groupement amine NH_2 de l'acide aminé (ici une lysine) se lie à la guanine ionisée.



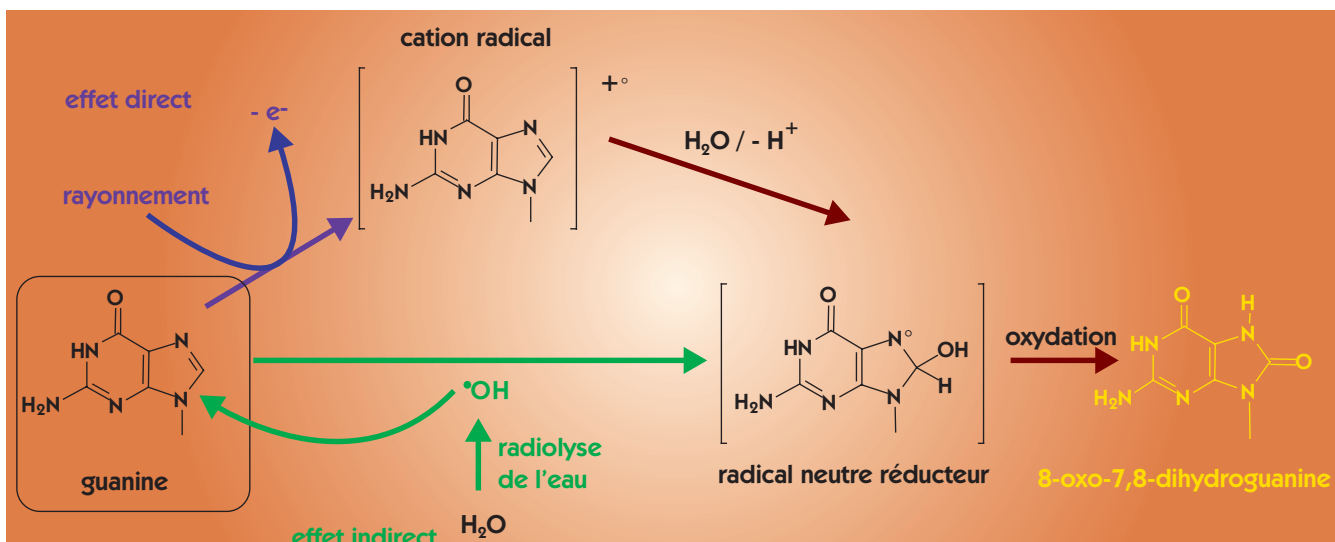


Figure 2. Mécanisme simplifié de l'oxydation radicalaire de la base guanine conduisant à la formation de 8-oxoGua : en haut, l'effet direct par arrachement d'un électron, en bas l'effet indirect via la radiolyse de l'eau.



mination radio-induite d'une base normale ou du départ spontané d'une base modifiée ;

- les **pontages ADN-protéines**, qui impliquent la formation d'une liaison chimique entre une base et un acide aminé, une des "briques" d'une protéine (encadré F, **Les acides aminés, alphabet chimique des protéines**) entourant la molécule d'ADN ;

- l'**addition à des bases de l'ADN** de produits de la peroxydation des lipides. Les produits d'addition, en l'occurrence des aldéhydes, proviennent de la décomposition de produits d'oxydation radio-induits de lipides membranaires.

La possibilité de formation de dommages multiples (plusieurs bases modifiées sur un ou sur les deux brins d'ADN, avec d'éventuelles coupures de chaînes) vient compliquer le tableau.

Plusieurs événements modificatifs sont en effet susceptibles de se produire dans l'environnement très proche de la molécule d'ADN lors du dépôt d'énergie du rayonnement ionisant. Les cassures double brin constituent, à ce jour, le seul exemple connu de modifications multiples radio-induites dans l'ADN cellulaire. Ce type de lésion signe l'action d'un rayonnement ionisant.

Trois axes de travail

La stratégie de recherche du Commissariat à l'énergie atomique (CEA) pour aborder l'étude des effets des rayonnements ionisants sur l'ADN s'articule autour de trois axes de travail, aux finalités très complémentaires. Le premier porte sur la détermination, toujours plus précise, des mécanismes de formation des lésions radio-induites, le deuxième sur la mesure des dommages dans l'ADN cellulaire après exposition au rayonnement gamma et le troisième sur l'évaluation du rôle *biologique* des dommages radio-induits, la réparation des lésions et l'étude des effets mutagènes.

Les recherches sur les mécanismes physico-chimiques des lésions sont en particulier conduites au sein du laboratoire Lésions des acides nucléiques de la Direction des sciences de la matière au CEA/Grenoble, en liaison avec les chercheurs de la Direction des sciences du vivant et avec des équipes du Centre national de la recherche scientifique (CNRS).

Les mécanismes de formation des lésions radio-induites

La première série de travaux porte sur les aspects mécanistiques des réactions radio-induites des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN isolé et de *systèmes modèles*. Ces systèmes sont des nucléosides (base + sucre) et des **oligonucléotides** (courts fragments d'ADN composés chacun d'une base purique ou pyrimidique, d'un sucre et d'un groupement

phosphate). Les travaux reposent sur l'isolement et la caractérisation des produits finaux de la dégradation des entités constitutives (bases, nucléosides) et des oligonucléotides. Des schémas cohérents ont pu être proposés à partir des informations structurales et certaines informations cinétiques, dont celles, déjà disponibles dans la littérature, portant sur les radicaux radio-induits apparaissant de manière transitoire dans ces réactions. Ces schémas décrivent les réactions de modification des bases puriques et pyrimidiques après oxydation par arrachement d'un électron (ionisation) et par addition d'un radical hydroxyle. À titre d'exemple, la figure 2 présente le mécanisme (simplifié) d'oxydation radicalaire de la base guanine conduisant à la formation de 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua). Il a ainsi été montré que cette modification de l'ADN peut résulter indifféremment d'un effet indirect, par l'addition du radical hydroxyle en position 8 de la guanine, ou d'un effet direct, après arrachement d'un électron du noyau purique. Cette modification de l'ADN provoque des mutations qui correspondent au remplacement d'une paire de bases guanine-cytosine par une paire de bases thymine-adénine.

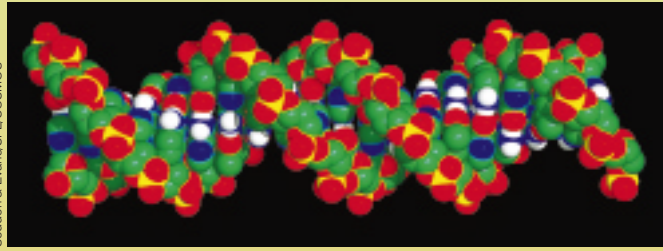
Les études théoriques faisant appel aux méthodes de la chimie quantique⁽¹⁾ sont ici d'un apport croissant. Elles permettent notamment de déterminer les propriétés tant de forme (conformationnelles) qu'électroniques des produits de

(1) Voir à ce sujet *Clefs CEA* n°42, p. 14.

La molécule d'ADN, vecteur de l'hérédité

A

Nous portons tous, dans le **noyau** de chacune de nos **cellules**, une série de très longues molécules d'**ADN** (acide désoxyribonucléique) pelotonnées sur elles-mêmes. Des dizaines de milliers de messages y sont inscrits, selon un code que les biologistes savent



Représentation d'une molécule d'ADN montrant la double hélice (en vert, rouge et jaune) et les paires de bases (en bleu et blanc).

maintenant déchiffrer. Tous les êtres vivants de la Terre utilisent le même code génétique. Les cellules humaines contiennent environ 700 fois plus d'ADN que la bactérie *Escherichia coli*, mais 30 fois moins que certaines cellules d'amphibiens et de végétaux.

Chaque message, chaque **gène**, permet la fabrication de l'un des innombrables composants nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme, en particulier les **protéines**. L'ensemble de ces messages, le **génome**, constitue notre patrimoine héréditaire. Il définit pour l'essentiel nos caractéristiques physiques. Le code utilisé, écrit sous forme de "mots" appelés **codons** qui déterminent chacun un **acide aminé**, résout adroitement le problème du stockage d'une grande quantité d'information génétique dans un espace restreint.

L'ADN, de même que l'**ARN** (acide ribonucléique), l'autre acide nucléique essentiel qui intervient dans la **réplication** de l'information de l'ADN et dans la transmission de l'information à la protéine à construire, est constitué de millions de briques élémentaires, les **nucléotides**. Un nucléotide se compose d'un **sucre** (glucide à 5 carbone) lié d'un côté à un ou plusieurs groupes

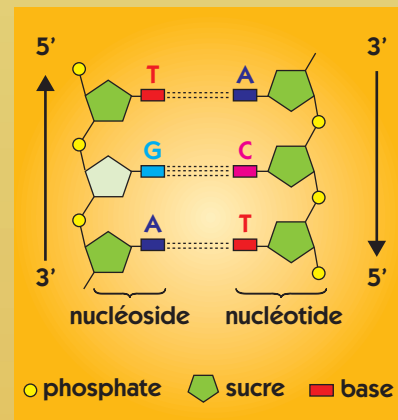
comprenant un atome de phosphore entouré de quatre atomes d'oxygène (**groupements phosphate**), et de l'autre côté à une molécule appelée **base** (azotée en l'occurrence). Dans l'ADN, le sucre élémentaire est le désoxyribose. La base d'un nucléotide d'ADN est l'une des quatre suivantes : l'adénine (A), la thymine (T), la guanine (G) et la cytosine (C). La molécule d'ADN est constituée de deux chaînes de nucléotides ou **brins** organisées en **double hélice** ressemblant à une échelle en colimaçon. La molécule d'ARN se compose quant à elle d'une chaîne unique. Son sucre est le ribose. Ses bases sont identiques, à l'exception de la thymine (T) remplacée par une autre base, l'uracile (U).

Les sucres et les phosphates sont les montants de l'échelle formée par la molécule d'ADN, tandis que les liaisons entre les bases en sont les barreaux. Cette structure comprend deux types de liaisons, d'une part celles unissant les sucres et les phosphates entre eux le long de chaque chaîne, d'autre part celles qui associent les bases en regard l'une de l'autre sur chacune des chaînes, constituant des paires à raison d'environ 10 paires de nucléotides

par tour d'hélice. Un codon est composé de trois nucléotides.

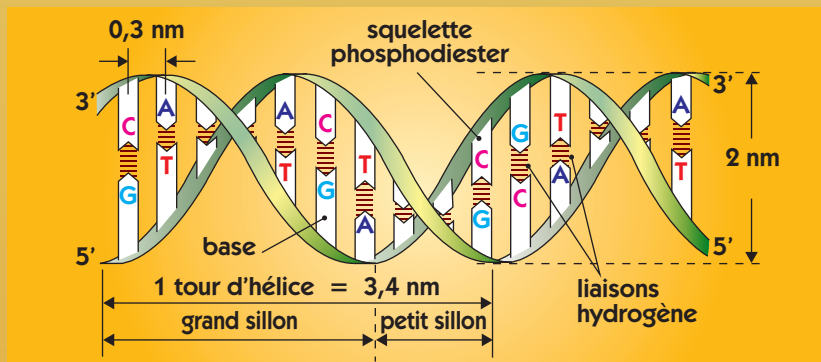
Les nucléotides sont reliés par des **ponts phosphodiester** qui unissent le carbone 5' d'un groupe désoxyribose au carbone 3' du suivant (figures). Les bases sont attachées à

cette chaîne répétitive **désoxyribose-phosphate** également baptisée **squelette phosphodiester**. Toutes les bases de la molécule d'ADN se trouvent à l'intérieur de la double hélice, les désoxyriboses-phosphates à l'extérieur. Ceci exige que les bases sur une chaîne soient extrêmement proches de celles situées sur l'autre chaîne et nécessite l'appariement spé-



cifique d'une grosse base dite **purine** (A ou G, chacune possédant un double cycle) sur une chaîne avec une petite base appelée **pyrimidine** (T ou C, chacune présentant un cycle unique) sur l'autre chaîne. Les paires de bases complémentaires qui se constituent entre A et T et entre G et C sont appelées paires de **bases de Watson-Crick**. Le nombre de **liaisons hydrogène** utiles pouvant se former entre G et C ou entre A et T est plus grand que pour toutes les autres combinaisons.

Puisque chaque chaîne contient une **séquence nucléotidique** exactement complémentaire de celle qui lui est associée sur la chaîne opposée, les deux brins portent en fait la même information génétique.



dégradation radio-induite de nucléosides. Autre domaine d'application très prometteur de ces approches théoriques : l'étude de la réactivité du radical $\bullet\text{OH}$ et de l'atome $\text{H}\bullet$ avec les bases de l'ADN.

La mesure des dommages radio-induits de l'ADN

Les travaux sur la mesure des dommages radio-induits de l'ADN portent essentiellement sur les lésions des bases puriques et pyrimidiques. Leurs objectifs premiers ? La recherche et la mesure quantitative des principales lésions susceptibles de se former dans l'ADN cellulaire. Il s'agit, en particulier, de valider dans l'environnement de la cellule les résultats obtenus sur l'ADN isolé et les systèmes modèles. La détermination des *cinétiques* de réparation des lésions créées dans l'ADN de cellules après exposition à une dose élevée de rayonnement – plus de 10 **grays** (Gy) – est une autre finalité de ces mesures.

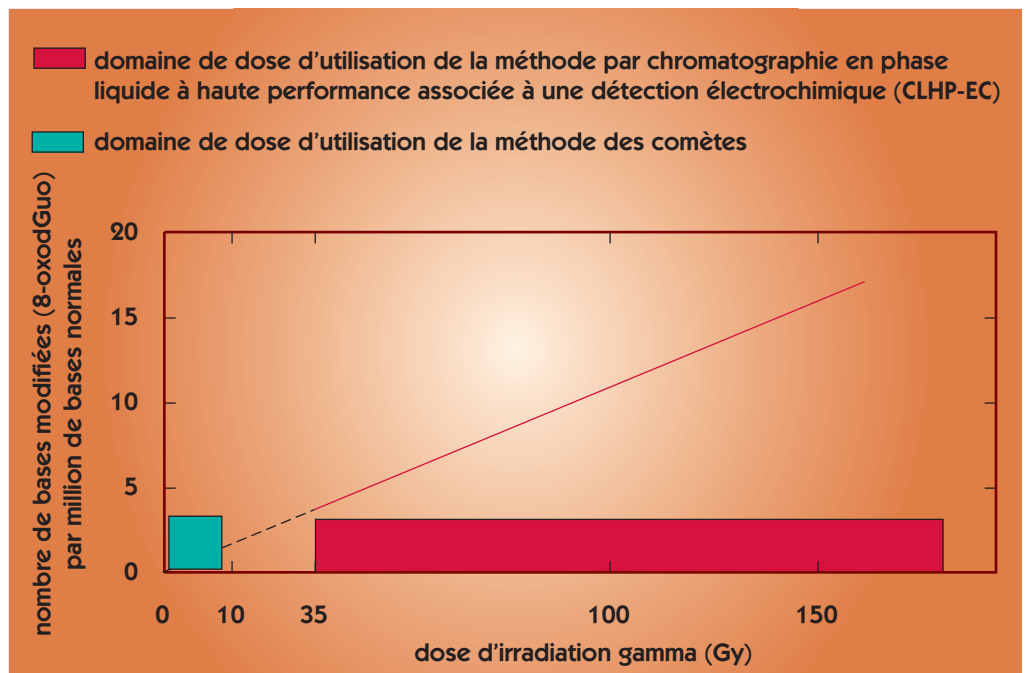
Deux grandes approches expérimentales sont actuellement utilisées pour effectuer ces mesures. Elles exigent, entre autres conditions contraignantes, une très grande sensibilité de détection. La limite requise est en effet voisine d'une base modifiée pour un million, voire 10 millions, de bases normales et cela à partir de quelques microgrammes d'ADN seulement ! Il faut, de surcroît,

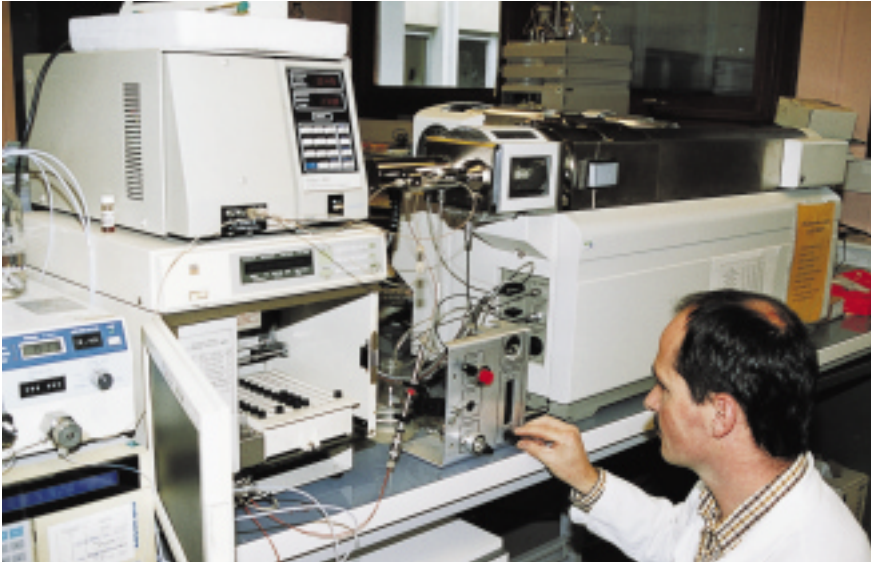
minimiser les risques d'oxydation parasite des bases normales pendant toutes les opérations d'extraction de l'ADN et l'analyse des dommages induits (figure 3).

Une première approche de l'étude des dommages consiste à optimiser les méthodes de **chromatographie en phase liquide** ou **gazeuse** qui permettent de séparer les molécules en fonction d'une de leurs caractéristiques (taille, charge) (encadré 1). La seconde méthode, qui permet des analyses dans des cellules isolées, consiste à appliquer une version modifiée de la **méthode dite des comètes** (encadré 2), méthode classique et très sensible mais qui ne permet pas la détermination d'un dommage défini. Elle donne désormais la possibilité d'effectuer la mesure globale d'un ensemble hétérogène de dommages radio-induits dans des cellules isolées (cassures simple et double brin d'ADN et diverses lésions sensibles au traitement en milieu basique qui caractérise la méthode) après exposition à des doses aussi faibles que 20 cGy.

Il est maintenant possible de mesurer deux grandes classes de lésions que sont d'une part les bases pyrimidiques modifiées et d'autre part l'apparition surtout de 8-oxoguanine (8-oxoGua), en créant des coupures d'ADN supplémentaires à l'endroit de ces lésions après incubation avec des **enzymes** de réparation (voir *Les gardiens du génome*). Il est alors

Figure 3. Domaines d'utilisation des méthodes de mesure des dommages radio-induits de l'ADN en fonction de la dose d'irradiation et du nombre de bases modifiées par rapport au nombre de bases normales.





LAN/CEA

Mesure de dommages radio-induits de l'ADN cellulaire sous forme de nucléosides par chromatographie liquide à haute performance associée à une détection par spectrométrie de masse en mode tandem (ionisation par *electrospray*).



Les méthodes chromatographiques optimisées

1

Les méthodes chromatographiques en phase liquide ou gazeuse employées pour mesurer les dommages infligés à l'ADN permettent la séparation des bases modifiées à l'état de traces à partir d'un mélange complexe. La mesure du dommage s'effectue directement en sortie de la colonne de l'appareil de chromatographie par diverses techniques de détection (électrochimie, spectrométrie de masse). Ces mesures, particulièrement celles qui ont impliqué

la chromatographie en phase gazeuse avec une détection par spectrométrie de masse, se sont heurtées à de nombreuses difficultés. Les résultats d'abord obtenus, par une méthode non optimisée de cette technique, ont conduit à surestimer les valeurs de plus d'un facteur 20 avant que ne soient identifiées les réactions parasites responsables. À ce jour, seule la mesure de la 8-oxoGua a en fait été effectuée par cette méthode dans l'ADN cellulaire, et cela à des

doses supérieures à 30 Gy, en utilisant la chromatographie en phase liquide à haute performance associée à une détection électrochimique. Le couplage de la spectrométrie de masse en mode tandem (ionisation par *electrospray*) à l'analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance a récemment donné d'excellents résultats. Cette méthode s'avère à la fois d'une grande sensibilité et dotée d'un champ d'applications très large.

possible d'observer la présence de dommages radio-induits des bases dans l'ADN de cellules isolées à partir de doses d'exposition de 2 Gy de rayonnement gamma.

L'évaluation du rôle biologique des dommages radio-induits de l'ADN

Le but ultime de ces études est la détermination du rôle biologique des dommages radio-induits de l'ADN. Il faut pour cela pouvoir mesurer la présence de ces derniers dans la cellule (*voir plus haut*). Trois objectifs principaux sont poursuivis, en coopération étroite avec des biochimistes et des biologistes du CEA et d'autres organismes de recherche.

Le premier est de déterminer les changements de conformation de la molé-

cule d'oligonucléotide induits par le dommage. Les chercheurs ont, pour ce faire, recours à l'analyse par résonance magnétique nucléaire (*voir L'analyse structurale des lésions radio-induites de l'ADN*). Le deuxième objectif est d'étudier la spécificité de reconnaissance des dommages par des enzymes de réparation (*voir Les gardiens du génome*). Le troisième est d'évaluer le pouvoir mutagène de dommages de bases et leur réparation, après introduction dans des cellules humaines de fragments d'ADN contenant sur des sites définis une ou plusieurs modifications. Ces derniers travaux sont conduits en collaboration avec Alain Sarasin, de l'Institut fédératif sur le cancer (IFC1) du CNRS à Villejuif.

Pour ces différents travaux sont préparés des fragments modifiés d'ADN de séquence définie (d'une longueur de 20 à 50 bases). Lorsqu'elles sont chimi-

Le test des comètes modifié

Dans sa version classique, le test des comètes est destiné à mesurer, dans des cellules isolées, des cassures de l'ADN et des dommages hétérogènes de la molécule (modifications de bases ou de résidus de sucres instables) et à apprécier l'efficacité de leur réparation. Certains de ces dommages sont convertis en cassures supplémentaires dans les conditions d'analyse du test, en milieu basique. Les cellules sont incorporées dans un gel étalé sur une lame de microscope et les membranes sont éliminées. L'ADN est alors soumis à un champ électrique qui l'étire et fait ressortir les brins fragmentés à l'extérieur du noyau. Sous microscope, l'ADN, après visualisation

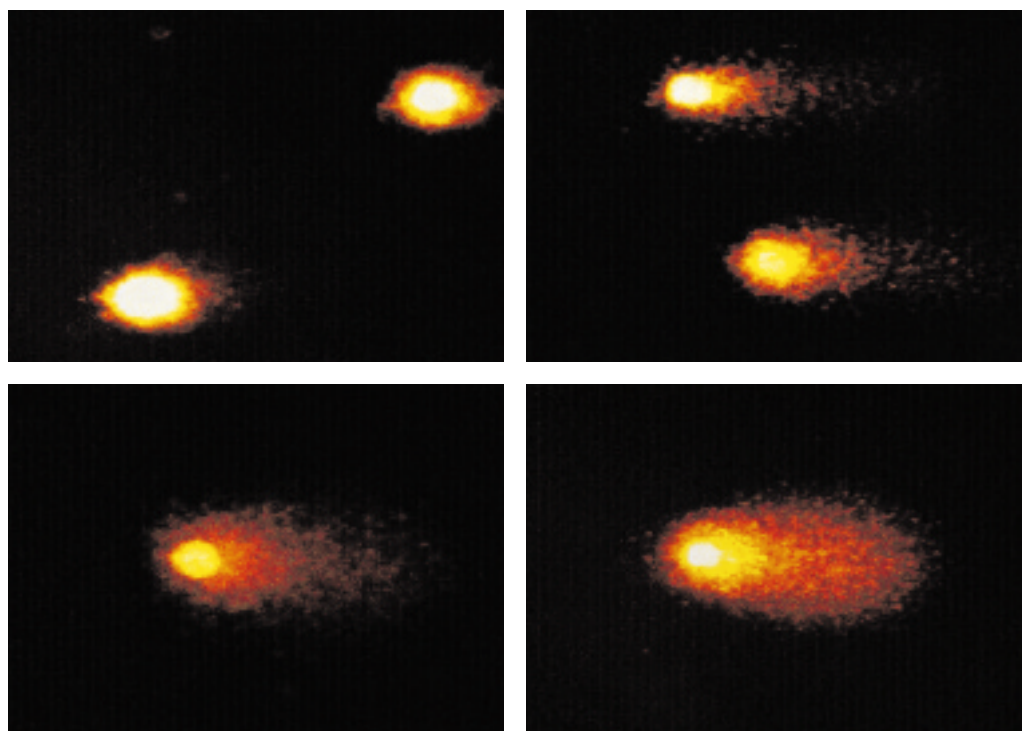
par ajout d'un colorant, présente un aspect de comète dont la queue apparaît d'autant plus allongée qu'il est plus fragmenté.

Afin d'étendre le champ d'application de cette méthode, une étape supplémentaire est introduite au cours de l'expérience. Elle consiste à "digérer" l'ADN avec une enzyme de réparation spécifique d'un type de dommages de bases. Cette étape crée de nouvelles cassures, consécutives aux premières étapes de la réparation, l'excision de base étant suivie de l'élimination totale ou partielle du sucre, et révélées après la migration de l'ADN sous l'effet du champ électrique. La taille de la queue de la comète

est ainsi augmentée en fonction de la quantité de dommages formés dans l'ADN cellulaire reconnu par l'enzyme. Le tableau récapitule le nombre de dommages dans l'ADN cellulaire créé par l'exposition au rayonnement ionisant.

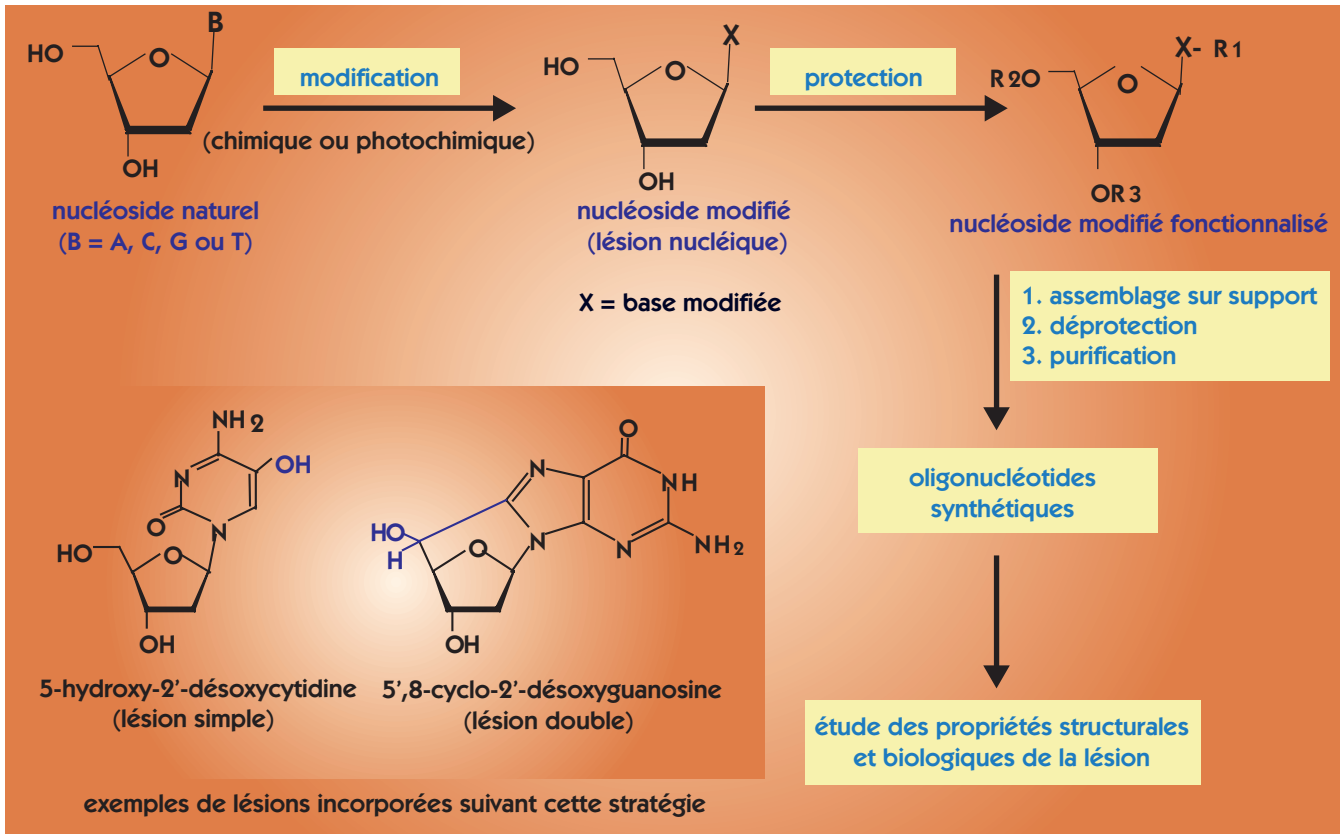
Pour créer ces cassures, deux enzymes sont utilisées : l'endonucléase III (endo III) ou la formamidopyrimidine ADN-glycosylase (FPG) d'origine bactérienne. La formation de produits d'oxydation parasites à partir des bases normales très largement majoritaires est minimisée, voire supprimée, lors de l'analyse par électrophorèse qui échelonne, sur le gel, les fragments d'ADN en fonction de leur longueur.

| | niveau de référence pour 1 million de paires de bases normales | nombre de modifications par cellule (niveau basal) | formation par Gy pour 1 million de paires de bases normales | formation par Gy par cellule |
|--|--|--|---|------------------------------|
| cassures simple et double brin et dommages sensibles au traitement basique | 0,56 | 3 360 | 0,260 | 1 600 |
| sites reconnus par FPG | 0,42 | 2 520 | 0,095 | 570 |
| sites reconnus par endo III | 0,38 | 2 280 | 0,105 | 635 |



● ● ● ● ●
Méthode des comètes.
 Cellules contrôle en haut
 (traitées avec FPG à droite)
 et cellules irradiées
 par un rayonnement gamma
 de 8 Gy émis par une source
 au cobalt 60 en bas (cellule
 traitée avec FPG à droite).

LAN/CEA



quement stables, les modifications sont insérées de manière spécifique dans un ou plusieurs sites choisis de la séquence retenue (figure 4). Dans le cas contraire, la base ciblée est modifiée de manière relativement spécifique dans l'oligonucléotide lui-même.

Tous ces travaux contribuent, d'une part à une meilleure connaissance des propriétés biochimiques des bases modifiées de l'ADN, d'autre part à une

amélioration constante de la sensibilité des méthodes de détection des lésions.

Jean Cadet

et l'équipe du Laboratoire lésions des acides nucléiques
Département de recherche fondamentale sur la matière condensée
Direction des sciences de la matière
CEA/Grenoble

Figure 4. Stratégie de synthèse des oligonucléotides modifiés pour l'étude des bases d'ADN modifiées.
L'assemblage se fait sur un support solide (billes de verre). La protection vise à empêcher d'autres réactions chimiques que celle étudiée de se produire. R1, R2 et R3 sont des groupements protecteurs servant à masquer la réactivité des groupes stables en milieu acide ou basique.



LAN/CEA

Insertion d'une lésion sous forme de nucléotide dans un site défini d'un fragment d'ADN à l'aide d'un synthétiseur d'oligonucléotides.