

Dégradation de l'ADN par les rayonnements ionisants

Influence de la structure et de l'environnement

Mélanie Spothem-Maurizot, Marie Begusova et Michel Charlier

Abstract

DNA damaging by ionising radiations. Influence of the structure and of the environment

DNA which bears the genetic information of the cell is the critical target for radiolytic attack. In the nucleus, DNA is not a straight and naked double helix in B-form. The sequence of the bases, the topological stress, the interactions with other partners (proteins) induce structures different from the canonical B-form. The effects of radiations occur through the attack by radicals issued from water radiolysis. The most reactive one is the oxidative hydroxyl radical. The radiolytic process is a chemical process in which both reactivity and accessibility of reactive sites, and consequently the structure of DNA, are involved. We have developed a simulation code to calculate the hydroxyl radical attack of different DNA structures. This procedure uses structural data obtained by either NMR, crystallography or molecular modelling, and accurately fits the experimental results.

Mots-clés

ADN, rayonnements ionisants, structure, radical hydroxyle, stress oxydant.

Key-words

DNA, ionising radiations, structure, hydroxyl radical, oxidative stress.

Les rayonnements ionisants (rayons α , β , γ , X, neutrons, particules lourdes) sont largement utilisés comme auxiliaires de la médecine : sondes en radiodiagnostic, agents destructeurs en radiothérapie anticancéreuse. Leur nocivité potentielle fait aussi l'objet d'une grande attention en direction des personnels normalement ou accidentellement exposés dans l'industrie du nucléaire civil ou militaire, des spationautes, du personnel des services de radiologie, radiothérapie ou de médecine nucléaire. Il s'agit là de radioprotection. Les deux problématiques sont cependant différentes. La radiothérapie suppose la stérilisation d'une tumeur, aussi complètement et rapidement que possible. En dehors des situations accidentelles heureusement fort rares, la radioprotection s'intéresse aux phénomènes très étalés dans le temps, aux conséquences tardives, mais cependant graves. Ce sont les effets stochastiques liés aux faibles ou très faibles expositions. Ces effets intéressent l'ADN : ce sont les inductions de mutations, de remaniements chromosomiques, de modification du génome qui sont à l'origine de désordres cellulaires dramatiques, comme la cancérisation.

La radiobiologie fait souvent appel à deux concepts lorsqu'il s'agit de l'attaque du matériel biologique. Le concept d'effet direct, où la molécule étudiée (ADN, protéine) est elle-même touchée par le rayonnement ionisant, donc ionisée et sujette à une évolution chimique conduisant à une molécule endommagée. Le concept d'effet indirect, où la molécule est attaquée par les radicaux issus de la radiolyse de l'eau (*encadré 1*). Il est bien clair qu'en solution aqueuse, seuls les effets indirects seront visibles car ils seront très majoritaires. Dans une solution d'ADN à 1 mg/mL, qui en physico-chimie est considérée comme concentrée, l'eau représente encore 99,9 % de la masse, et l'ADN ne subira en première approximation qu'une ionisation pour 1 000 produites sur l'eau. On comprend donc que les effets directs, s'ils existent,

ne peuvent se produire que dans des phases où l'ADN est très condensé et l'eau très minoritaire, ce qui n'est jamais le cas, les tissus mous étant composés de 70 à 80 % d'eau.

Nous nous sommes donc intéressés aux effets indirects sur l'ADN, c'est-à-dire à l'attaque par les radicaux issus de la radiolyse de l'eau. En milieu aérobie, seuls les radicaux hydroxyle OH \cdot jouent un rôle important. L'attaque des sites sensibles (sucres, bases) de l'ADN sera une réaction d'oxydation qui nécessite la rencontre entre les deux

Glossaire

ADN en forme B, Z et quadruplex

L'ADN en forme B (Watson-Crick) est une double hélice droite. L'ADN en forme Z est une double hélice gauche qui se forme généralement avec des séquences GC alternées. Le quadruplex est une hélice droite quadruple, ou les plans des bases comportent quatre guanines reliées par des liaisons hydrogène.

FSB, ARB

Coupures franches (*frank strand break*) et coupures révélées par traitement alcalin (*alkali revealed breaks*). Les FSB, observables sur la molécule d'ADN sans aucun traitement postérieur à l'irradiation, résultent généralement de l'oxydation des sucres (désoxyribose). Les ARB apparaissent après traitement en milieu alcalin (pipéridine) aux sites des bases endommagées.

Histones – Core de nucléosome

Les histones sont des protéines associées à l'ADN dans la chromatine. Le core de nucléosome est un assemblage globulaire d'histones, entouré par un fragment d'ADN. C'est le niveau d'organisation primaire de la chromatine.

Sillons de l'ADN

Les squelettes des deux hélices ne sont pas symétriques par rapport à l'axe de la double hélice. De ce fait, deux sillons de largeur et de profondeur différentes sont créés (voir *figure 3* et *encadré 3*).

Télomères

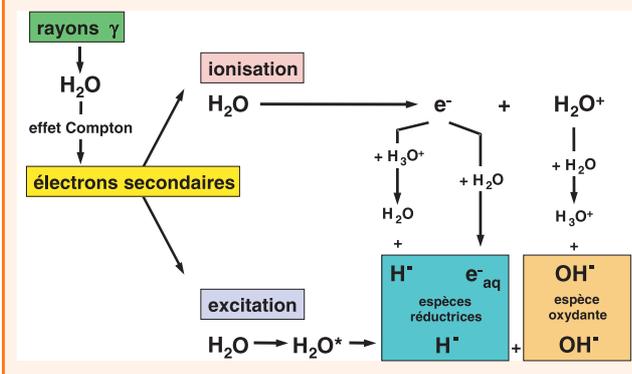
Parties terminales des chromosomes.

Encadré 1

Radiolyse de l'eau

Les rayons γ , neutres, ne sont pas des particules ionisantes. Leur interaction avec la matière se fait principalement par effet Compton. Des électrons secondaires sont générés. Chargés, ils ionisent ou excitent les molécules d'eau, qui se décomposent alors en radicaux : atome d'hydrogène, électron solvaté, radical hydroxyle.

En milieu aérobie, les radicaux réducteurs sont rapidement éliminés par réaction avec l'oxygène moléculaire. Seul subsiste le radical hydroxyle, très oxydant, qui attaque l'ADN.



partenaires de la réaction. Le radical OH^\cdot doit pouvoir arriver au contact du site réactionnel, ce qui suppose une conformation locale adéquate. Le problème que nous nous sommes posé, et que nous avons étudié, est alors celui-ci : comment la structure locale de l'ADN module-t-elle l'attaque des sucres et des bases le long d'une séquence d'ADN ? Et son corollaire : comment des ligands de l'ADN modifient-ils l'attaque des sites où ils sont fixés ?

Le problème n'est pas académique car l'ADN n'est jamais, dans la cellule eucaryote, une double hélice B canonique. Il peut adopter des structures variées [1]. Il est structuré par les histones et soumis à un stress topologique important. Des régions en forme Z peuvent apparaître en amont des zones de transcription, les télomères des chromosomes peuvent adopter des structures en quadruple hélice (quadruplex). L'ADN est déformé localement par les protéines qui interviennent dans la régulation, la traduction, la transcription, la réparation. Cela conduit évidemment à l'étude de la radiolyse des complexes ADN-protéines, que nous ne ferons qu'évoquer ici.

Mécanismes et sites d'attaque

Sur l'ADN, les sites d'attaque du radical hydroxyle OH^\cdot sont soit portés par le sucre (désoxyribose), soit par les bases A, T, G et C [2].

Sur le sucre, le radical OH^\cdot va ôter un atome d'hydrogène et laisser un radical centré sur un carbone. Le devenir le plus probable de ce radical sera une rupture du cycle furanne avec libération de la base. La situation ultime la plus courante est une extrémité 5'-phosphate en aval et une extrémité 3'-phosphate ou 3'-phosphoglycolate en amont. Ces coupures sont appelées coupures franches (*frank strand breaks*, FSB) car elles sont directement observables après l'irradiation.

Les bases sont des résidus à forte composante aromatique. Les radicaux OH^\cdot pourront abstraire un atome d'hydrogène, par exemple sur le méthyle de la thymine, mais beaucoup plus fréquemment s'additionner sur les carbones des

liaisons π : C5 et C6 des pyrimidines, C4, C5 et C8 des purines. *In fine*, les pyrimidines donneront majoritairement des dérivés 5-hydroxy, et les purines, soit des formamidopyrimidines, soit des dérivés 8-oxo. La majorité de ces bases modifiées ont leur liaison N-glycosidique fragilisée, ce qui permet de libérer la base lors d'un traitement alcalin. La liaison phosphodiester est alors aussi fragilisée, et le traitement alcalin conduira à une rupture de la chaîne ; ce sont les coupures révélées en milieu alcalin (*alkali revealed breaks*, ARB), essentiellement dues aux altérations des bases [3].

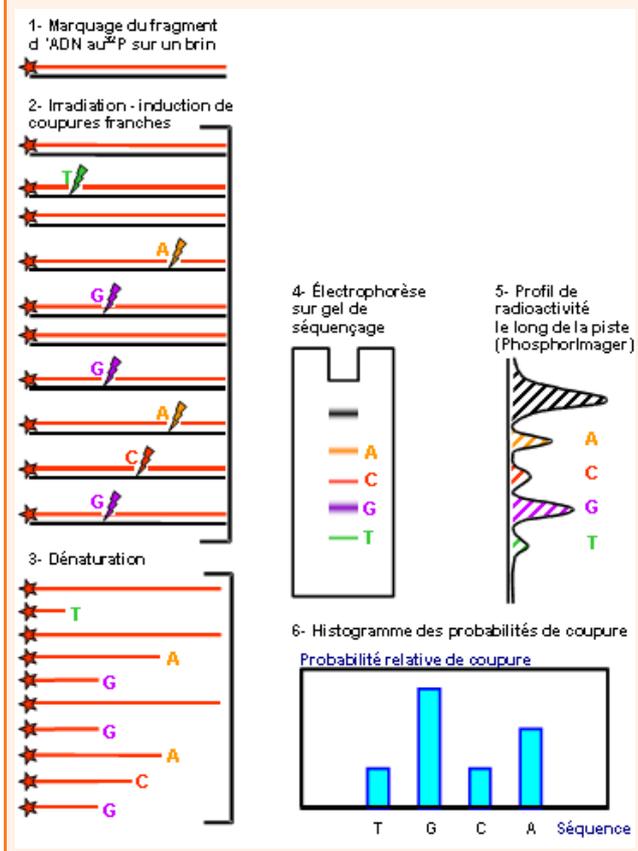
Modulation de l'attaque par la structure

L'étude de la probabilité d'attaque radiolytique - FSB ou ARB - en chaque site nucléotidique de l'ADN utilise la technique d'électrophorèse sur gel de séquençage [4]. Le brin d'ADN que l'on veut étudier est marqué, puis irradié. Si l'ADN n'est soumis à aucun traitement avant électrophorèse, on révèle uniquement les FSB, c'est-à-dire essentiellement les attaques des sucres (*encadré 2*). Si l'ADN est soumis à un

Encadré 2

Probabilité de coupure franche (FSB)

Après marquage d'un des deux brins (1), l'ADN est irradié (2), ce qui induit des coupures franches au niveau des sucres et des attaques des bases. Les coupures franches sont révélées directement par séparation des fragments générés sur gel de séquençage (4). A une bande correspond un oligonucléotide de longueur donnée qui porte l'extrémité marquée. L'intensité de cette bande (5) est proportionnelle à la quantité d'oligonucléotide correspondant, donc à la probabilité de coupure (6) en son extrémité non marquée.



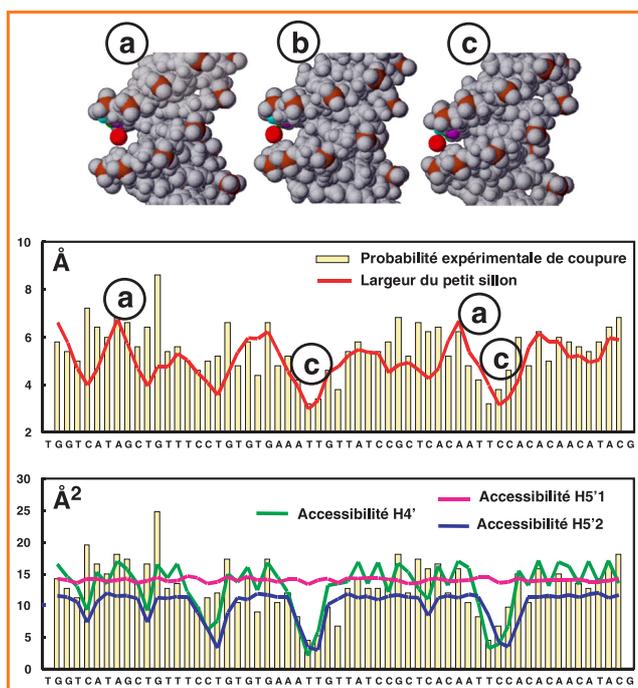


Figure 1 - Largeur du petit sillon et accessibilité des atomes H4' et H5' du désoxyribose.

Le modèle montre la pénétration d'un radical OH' à l'intérieur d'un petit sillon large (a), moyen (b) et étroit (c). Les courbes représentent les probabilités d'attaque mesurées expérimentalement (histogrammes) auxquelles sont superposées la largeur du petit sillon (partie médiane) et les accessibilités des atomes H4', H5'1 et H5'2 (partie basse).

traitement alcalin avant l'électrophorèse, on révèle alors la somme FSB + ARB, c'est-à-dire l'ensemble des attaques aux sucres et aux bases.

L'ADN que nous avons utilisé pour cette étude est un fragment de 80 paires de bases encadrant le promoteur et l'opérateur du gène *lac* chez *E. coli* [5-6]. La figure 1 montre les probabilités de coupure franche au long de la partie centrale du fragment.

On constate que tous les sucres sont des sites d'attaque potentiels, mais que tous ne sont pas attaqués avec la même

probabilité. Deux régions de l'ADN au voisinage de séquences 5'-AATT sont significativement moins attaquées que la moyenne. Ces régions sont connues pour présenter une courbure vers le petit sillon, qui se trouve alors légèrement refermé.

A l'aide d'un logiciel de modélisation moléculaire (SYBYL), nous avons construit un fragment d'ADN comportant les 67 paires de bases centrales du fragment étudié, et la structure a été établie par minimisation d'énergie. Il est alors possible de déterminer, en chaque point de la séquence, la largeur du petit sillon, et l'accessibilité au radical OH' des atomes d'hydrogène (encadré 3).

Sur la figure 1, nous avons superposé au profil des probabilités de FSB, la largeur du petit sillon et les accessibilités aux radicaux OH' des atomes H4', H5'1 et H5'2 des sucres, calculés tout au long de la séquence du fragment.

Nous observons une excellente corrélation entre la probabilité de coupure franche et la largeur du petit sillon d'une part, et les accessibilités aux radicaux OH' des atomes H4' et H5'2 d'autre part, alors que l'accessibilité de l'atome H5'1 ne varie pas au long de la séquence.

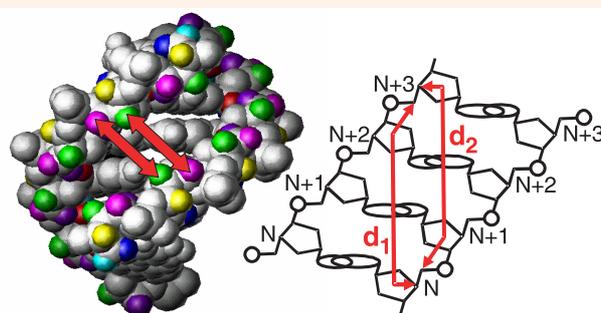
Il apparaît donc clairement que dans les régions de l'ADN où le petit sillon a une largeur inférieure à 4,5 Å, et où les accessibilités des atomes H4' et H5'2 sont inférieures à 15 et 11 Å² respectivement, la probabilité d'induction d'une coupure franche résultant de l'attaque du sucre est réduite. Il apparaît aussi clairement que dès que la largeur du petit sillon dépasse 4,5 Å, les accessibilités des atomes H4' et H5' du sucre ont atteint leurs valeurs maximales. La probabilité d'induire des FSB sera plus faible dans les régions où le petit sillon est resserré. Il est cependant vain d'imaginer qu'elle puisse être significativement plus grande dans des régions où le petit sillon s'élargit au-delà de 4,5 Å.

Simulation de l'attaque

Pour que l'attaque oxydante ait lieu, il est indispensable que les sites réactifs soient accessibles aux radicaux OH'. Cependant, deux sites également accessibles mais n'ayant pas la même réactivité vis-à-vis du radical OH' ne conduiront pas à des probabilités de coupure identiques.

Encadré 3

Largeur du petit sillon - Accessibilités



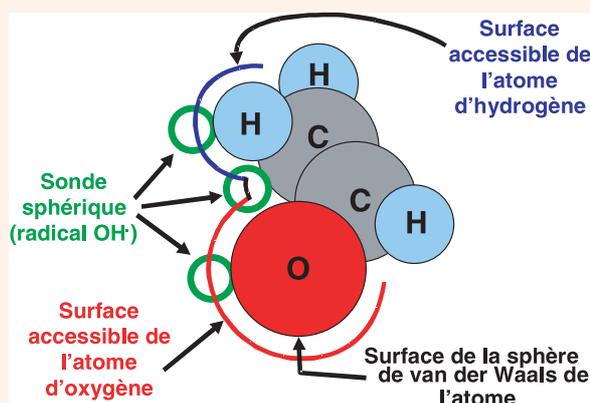
La largeur du petit sillon est la moyenne des distances d_1 et d_2 définies par :

d_1 : distance entre le centre de l'atome H4' du résidu N sur le brin 3' et l'atome H5'1 du résidu N+3 sur le brin 5'.

d_2 : distance entre le centre de l'atome H5'1 du résidu N sur le brin 3' et l'atome H4' du résidu N+3 sur le brin 5'.

On fait rouler sur la molécule, représentée par les sphères de van der Waals des atomes, une sonde sphérique (ici, le radical OH')

pour laquelle on veut évaluer les accessibilités des atomes de la molécule. La surface accessible, ou accessibilité d'un atome à la sonde, est la surface de la portion de sphère engendrée par le centre de la sonde tant qu'elle reste en contact avec l'atome considéré.



Nous avons mis au point un code de calcul permettant la simulation de l'attaque oxydante par OH^\cdot [6-8]. Par l'intermédiaire de la structure, il tient compte des accessibilités des sites sensibles, et il permet aussi de tenir compte de leur réactivité (figure 2).

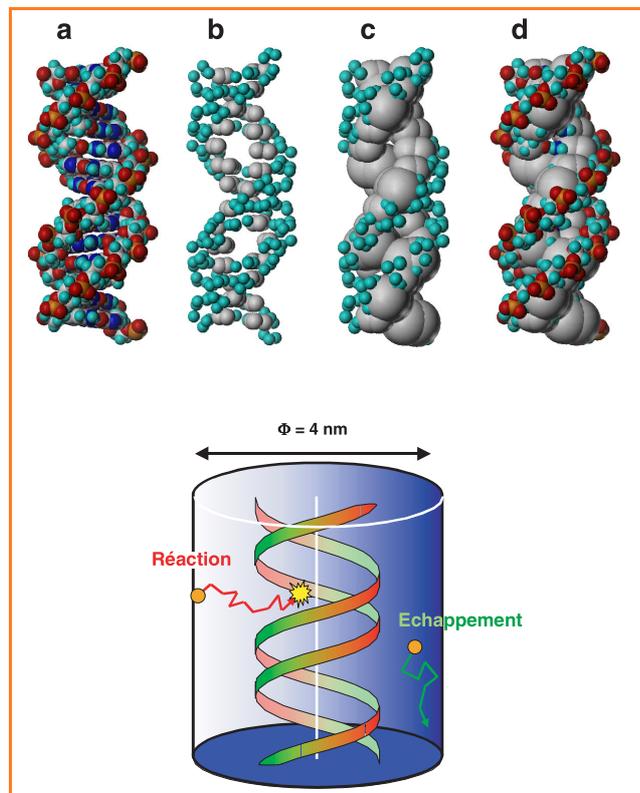


Figure 2 - En haut : différentes représentations de l'ADN en forme B.

En bas : schéma du principe de la simulation RADACK.

a : tous les atomes sont représentés avec leur rayon de van der Waals.

b : seuls les atomes réactifs sont représentés avec leur rayon de van der Waals.

c : mêmes atomes qu'en b, mais avec leur rayon de réactivité $r_{\text{OH}, A}$.

d : les atomes non réactifs ont été rajoutés avec leur rayon de van der Waals. Le radical OH^\cdot « voit » l'ADN tel qu'en d.

Les coordonnées atomiques de la molécule d'ADN étant connues (cristallographie, RMN, modélisation moléculaire), chaque atome A est représenté par une sphère dont le rayon est le rayon de van der Waals si A n'est pas réactif, ou, s'il est réactif, par le rayon $r_{\text{OH}, A}$, que nous appellerons rayon de réactivité. Le rayon $r_{\text{OH}, A}$ est proportionnel à la constante de vitesse de réaction $k_{\text{OH}, A}$ du radical OH^\cdot avec l'atome A [9]. C'est par cet intermédiaire que la réactivité est prise en compte.

On génère alors, à l'intérieur d'un volume de travail entourant l'ADN, des radicaux OH^\cdot que l'on fait se déplacer au hasard dans toutes les directions de l'espace par pas de 1 Å. Quand le radical rencontre la sphère représentant un atome non réactif, il reprend son parcours au hasard dans la solution. Quand il rencontre une sphère représentant un atome réactif, on comptabilise une réaction en ce site. On génère un nombre suffisant de radicaux pour que la précision soit acceptable. Pour chaque site sensible du sucre (par exemple H4', H5'1 et H5'2) ou des bases, on dénombre les réactions sur les atomes réactifs. On obtient alors les probabilités relatives d'attaque en chaque site tout au long de la séquence.

Cette simulation, que nous avons appelée RADACK (**RADI**ation **attACK**), a été utilisée pour décrire l'attaque oxydante des radiations sur l'ADN en forme B, Z, en quadruplex, et sur des complexes ADN-protéines (figure 2).

L'ADN en forme B

La simulation par RADACK de l'attaque de l'ADN en forme B a été réalisée sur le même fragment que celui sur lequel nous avons effectué les mesures d'accessibilité et de largeur du petit sillon [6].

FSB : pour les atomes très exposés en surface de la molécule d'ADN (H5'1), les accessibilités comme les probabilités d'attaque sont importantes. Pour les atomes très enterrés (H1'), l'accessibilité comme la probabilité d'attaque sont très faibles. Pour les situations intermédiaires (H4', H5'2, H2'1 et H2'2), les probabilités d'attaque chutent plus vite que les accessibilités. Même si l'atome reste accessible, il est plus difficile au radical de l'atteindre lors de son parcours stochastique, car les probabilités de rencontrer d'autres atomes réactifs sur son parcours sont importantes. Nous avons donc considéré en première analyse que l'abstraction des seuls hydrogènes H4', H5'1 et H5'2, qui donnent des radicaux centrés sur les carbones C4' et C5', conduisait à un FSB. Une régression multilinéaire sur les données expérimentales permet de déduire que les radicaux centrés en C4' ont une probabilité trois fois plus grande d'évoluer vers un FSB que les radicaux centrés en C5'. La figure 3 montre la probabilité relative d'induire un FSB calculée par RADACK (courbe rouge) superposée au profil expérimental.

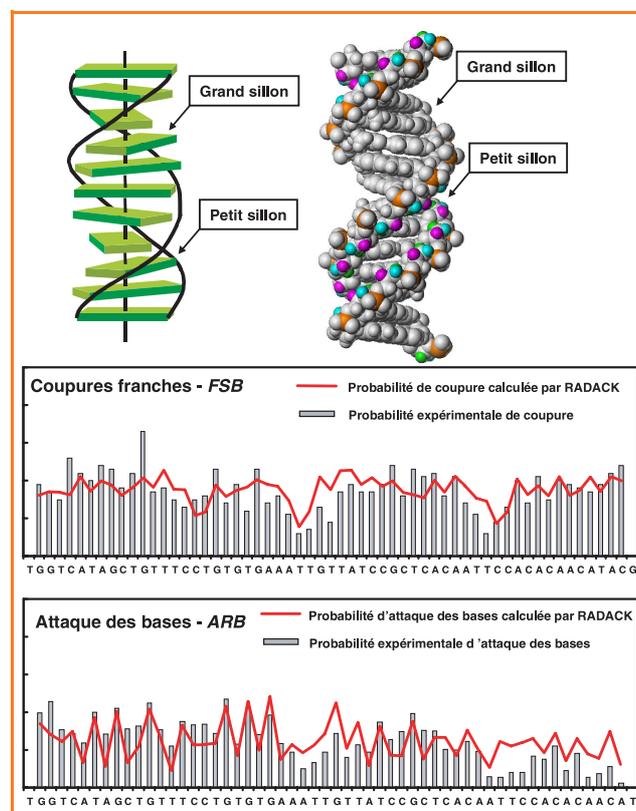


Figure 3 - Radiolyse de l'ADN en forme B.

Les histogrammes sont les probabilités de coupure franche ou de coupure révélée par traitement alcalin. Les courbes en rouge sont les simulations RADACK correspondantes.

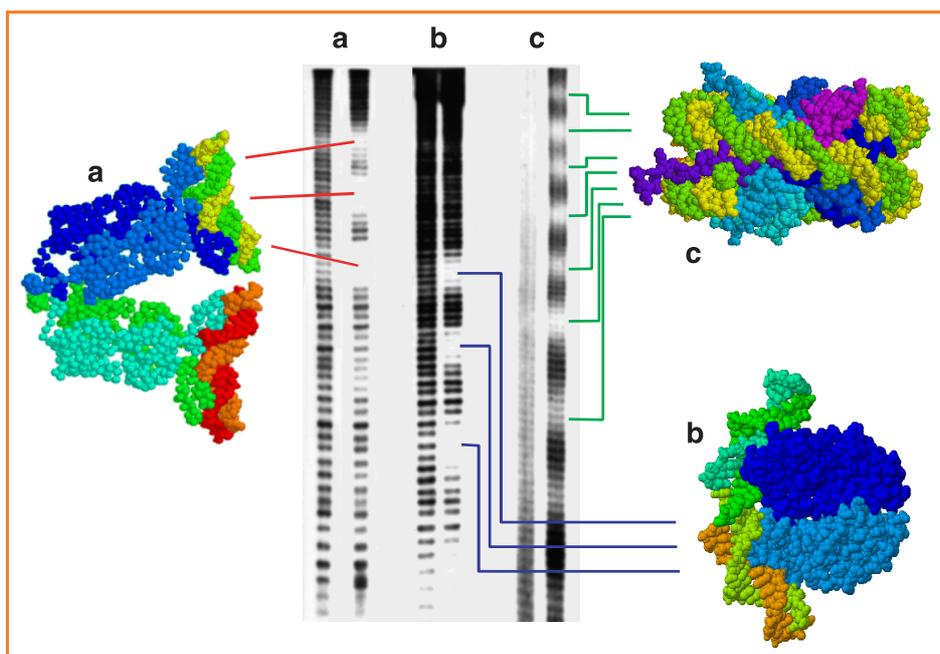


Figure 6 - Empreintes par radiolyse laissées sur l'ADN par le répresseur de l'opéron lactose d'*E. coli* (a), la protéine CRP d'*E. coli* (b) et l'octamère d'histones dans le core de nucléosome (c).

Dans les trois cas, les pistes de droite représentent la radiolyse de l'ADN seul. Les traits de couleur montrent sur les pistes de gauche les zones de l'ADN qui ont été protégées de la radiolyse par la présence des protéines fixées. Les représentations des protéines ont été réalisées à partir des fichiers 1LBG, 1CGP et 1AOI de la Protein Data Bank.

par RMN [15], soit par cristallographie aux rayons X [16], nous avons pu calculer en utilisant RADACK, les probabilités d'attaque de l'ADN dans les complexes en présence de la protéine. L'accord est excellent entre les profils d'attaque mesurés expérimentalement et les résultats de la simulation RADACK [17].

Conclusion

La radiolyse de l'ADN en milieu aérobie est majoritairement due à l'attaque oxydante par le radical OH[•]. L'attaque des sites sensibles aux radicaux est très dépendante de leur accessibilité, c'est-à-dire de la structure de l'ADN et de la présence de ligands. La simulation de l'attaque radicalaire par la méthode RADACK est en remarquable accord avec l'expérience dans les cas étudiés. Ceci permet d'espérer que cette simulation, explicative, peut devenir prédictive : à partir d'une structure connue (ADN, protéine, complexe), il deviendrait possible, *in silico*, de prévoir la position et la sensibilité des sites potentiels d'attaque radiolytique. L'intérêt fondamental est évident : c'est la compréhension des mécanismes moléculaires de la radiolyse de l'ADN. L'intérêt médical est en aval, et peut-être à plus long terme. Tout progrès dans la perception des mécanismes de la radiolyse de l'ADN peut déboucher sur une meilleure utilisation de la radiothérapie, ou une mise en œuvre plus pertinente et plus efficace des techniques de radioprotection.

Références

- [1] Saenger W., *Principles of nucleic acid structure*, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, 1984.
- [2] Von Sonntag C., *The chemical bases of radiation biology*, Taylor and Francis, London, New York, Philadelphia, 1987.
- [3] Cadet J., Berger M., Douki T., Ravanat J.-L., *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 1997, 31, p. 1.
- [4] Charlier M., Spothem-Maurizot M., *DNA-protein interactions, A practical approach.*, A Travers, M. Buckle (eds), Oxford University Press, New York, 2000, p. 175.
- [5] Franchet-Beuzit J., Spothem-Maurizot M., Sabattier R., Blazy-Baudras B., Charlier M., *Biochemistry*, 1993, 32, p. 2104.
- [6] Sy D., Savoye C., Begusova M., Michalik V., Charlier M., Spothem-Maurizot M., *Int. J. Radiat. Biol.*, 1997, 72, p. 147.

- [7] Michalik V., Spothem-Maurizot M., Charlier M., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1995, 13, p. 565.
- [8] Begusova M., Spothem-Maurizot M., Sy D., Michalik V., Charlier M., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2001, 19, p. 141.
- [9] Smoluchowski M.V., *Physikalische Z.*, 1916, 17, p. 557.
- [10] Tartier L., Michalik V., Spothem-Maurizot M., Rahmouni A.R., Sabattier R., Charlier M., *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22, p. 5565.
- [11] Wang Y., Patel D.J., *J. Mo. Biol.*, 1995, 251, p. 76.
- [12] Begusova M., Tartier L., Sy D., Spothem-Maurizot M., Michalik V., Charlier M., *Int. J. Radiat. Biol.*, 1999, 75, p. 913.
- [13] Lüger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J., *Nature*, 1997, 389, p. 251.
- [14] Begusova M., Sy D., Charlier M., Spothem-Maurizot M., *Int. J. Radiat. Biol.*, 2000, 76, p. 1063.
- [15] Spronk C., Bonvin A., Radha P., Melacini G., Boelens R., Kaptein R., *Structure*, 1999, 7, p. 1483.
- [16] Lewis M., Chang G., Horton N., Kercher M., Pace H., Schumacher M., Brennan R., Lu P., *Science*, 1996, 271, p. 1247.
- [17] Begusova M., Eon S., Sy D., Culard F., Charlier M., Spothem-Maurizot M., *Int. J. Radiat. Biol.*, 2001, 77, p. 645.



M. Spothem-Maurizot

Mélanie Spothem-Maurizot¹ est chargée de recherche à l'Inserm et **Michel Charlier**² est directeur de recherche CNRS au Centre de biophysique moléculaire*.



M. Charlier



M. Begusova

Marie Begusova

est ingénieur en sciences nucléaires à l'Institut de physique nucléaire de Prague**.

* Centre de biophysique moléculaire, CNRS, rue Charles-Sadron, 45071 Orléans Cedex 2.

¹ Tél. : 02 38 25 55 75. Fax : 02 38 63 15 17.

Courriel : spothem@cns-orleans.fr

² Tél. : 02 38 25 55 49. Fax : 02 38 63 15 17.

Courriel : micharli@cns-orleans.fr

** Institut de physique nucléaire, Département de dosimétrie des radiations, Na Truhlarce 39, CZ-18086 Prague (République Tchèque).

Tél. : +420 283 842 791. Fax : +420 283 842 788.

Courriel : begusova@ujf.cas.cz