Avant-propos

Ch. Gruner/INSTITUT CURIE

Parmi les faits que l'historien du futur retiendra du XXe siècle, il est probable que figureront les développements pacifiques de l'énergie nucléaire. Les perspectives ouvertes par les multiples utilisations des rayonnements ionisants et de la radioactivité en matière de compréhension du vivant et d'applications médicales dépassent en effet largement les craintes qu'elles suscitent. Leur banalisation est telle qu'est souvent perdue de vue la nature des outils à la base de gestes quotidiens de prévention, d'observation ou de traitement. L'utilité d'une radiographie, d'une scanographie ou d'une radiothérapie antitumorale est rarement contestée par leurs bénéficiaires. Par ailleurs, la prise de conscience du rôle de l'activité humaine dans "l'effet de serre" et de ses conséquences sur l'évolution du biotope donne au nucléaire, moins producteur de dioxyde de carbone que d'autres formes d'énergie, un supplément d'intérêt. Ceci reste vrai en dépit des questionnements légitimes au sujet des déchets et de leur devenir, des conséquences d'expositions accidentelles aux radiations, qui ne pourront jamais être totalement exclues, ou encore des effets d'expositions chroniques à de faibles, voire très faibles, doses. Une compréhension plus approfondie des interactions des rayonnements ionisants avec la matière vivante, objectif essentiel de la radiobiologie, reste nécessaire pour lever ces incertitudes.

Les travaux effectués dans ce domaine tant en France qu'à l'étranger ont permis de dégager, ces toutes dernières années, quelques notions d'intérêt fondamental dont ce numéro de *Clefs CEA* donne un aperçu.

Tout d'abord, une intégration de plus en plus riche et complexifiée des concepts, de la production des dommages par les rayonnements à l'expression des réponses cellulaires, a été enregistrée. Ces concepts incluent la cytotoxicité et le suicide cellulaire, la production de mutations génétiques et d'aberrations chromosomiques, l'induction de la transformation cancéreuse et de l'instabilité génomique associée, enfin la modulation de l'expression de gènes avec la transduction en cascade de signaux effecteurs.

Ensuite une meilleure connaissance des processus enzymatiques de réparation fidèle de l'ADN et de ceux source d'erreurs et la compréhension de leur contrôle génétique ont permis de mettre en évidence leurs interactions avec d'autres fonctions essentielles dans l'économie cellulaire : la réplication, la transcription, l'organisation dynamique de la chromatine, la recombinaison génétique et sans doute la différenciation au cours du développement embryonnaire.

Il en découle que l'intérêt actuel se porte de plus en plus vers l'analyse des interactions moléculaires entre plusieurs objets. Les méthodes et les techniques modernes de la biologie structurale sont appelées à féconder ce domaine des associations multi-partenaires de protéines avec d'autres protéines ou avec des acides nucléiques. Des approches récentes appliquées à l'analyse biochimique de complexes d'organismes extrémophiles (adaptés à des températures élevées ou à de très hauts niveaux de radiations, etc.) amènent à suggérer que, si ces objets moléculaires sont combinés de manière différente mais organisée, de nouvelles règles de fonctionnement cellulaire pourraient apparaître. Celles-ci permettraient alors la survie dans des conditions d'environnement imprévisibles.

Il apparaît enfin qu'au cours de l'évolution s'est produit un extraordinaire maintien de fonctions essentielles, dont celles impliquées dans la réparation des lésions radio-induites. Il est par exemple constaté que, des bactéries à l'homme, le processus de reconnaissance et de réparation des mauvais appariements de bases de l'ADN est remarquablement conservé. Ceci démontre le rôle central de ces mécanismes impliqués à la fois dans la préservation de la continuité des espèces (réparation fidèle) et dans l'introduction de biodiversité (réparation source d'erreurs). La survenue de pathologies graves peut être associée à des défauts de ces processus. C'est le cas de prédisposition à certains cancers ou du vieillissement précoce observé dans divers syndromes.

Différents laboratoires du Commissariat à l'énergie atomique (CEA) et du Centre national de la recherche scientifique (CNRS) ainsi que de l'Institut national de la recherche agronomique (Inra) ont, à un moment ou à un autre du développement de leurs travaux au cours des cinq dernières années, apporté leur contribution à ces différents aspects. L'effort de l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) dans le domaine des effets biologiques des rayonnements a plus spécifiquement porté sur l'épidémiologie. La concertation régulière entre les directions des sciences de la vie de ces organismes a permis d'éviter les redondances, de créer des synergies et d'établir des liens autour de méthodologies communes initiées par l'un des partenaires. Le développement des biopuces à ADN par le CEA et l'intérêt que diverses équipes du CNRS y portent devraient être exemplaires à cet égard. En collaboration avec divers laboratoires français, l'apport de chercheurs européens, anglais, hollandais et allemands a été notable. Ces associations, facilitées entre autres par des contrats de la Communauté européenne, leur ont valu dans des cas précis (couplage de la réparation avec d'autres fonctions vitales, par exemple) de prendre le pas sur des laboratoires américains ou japonais.

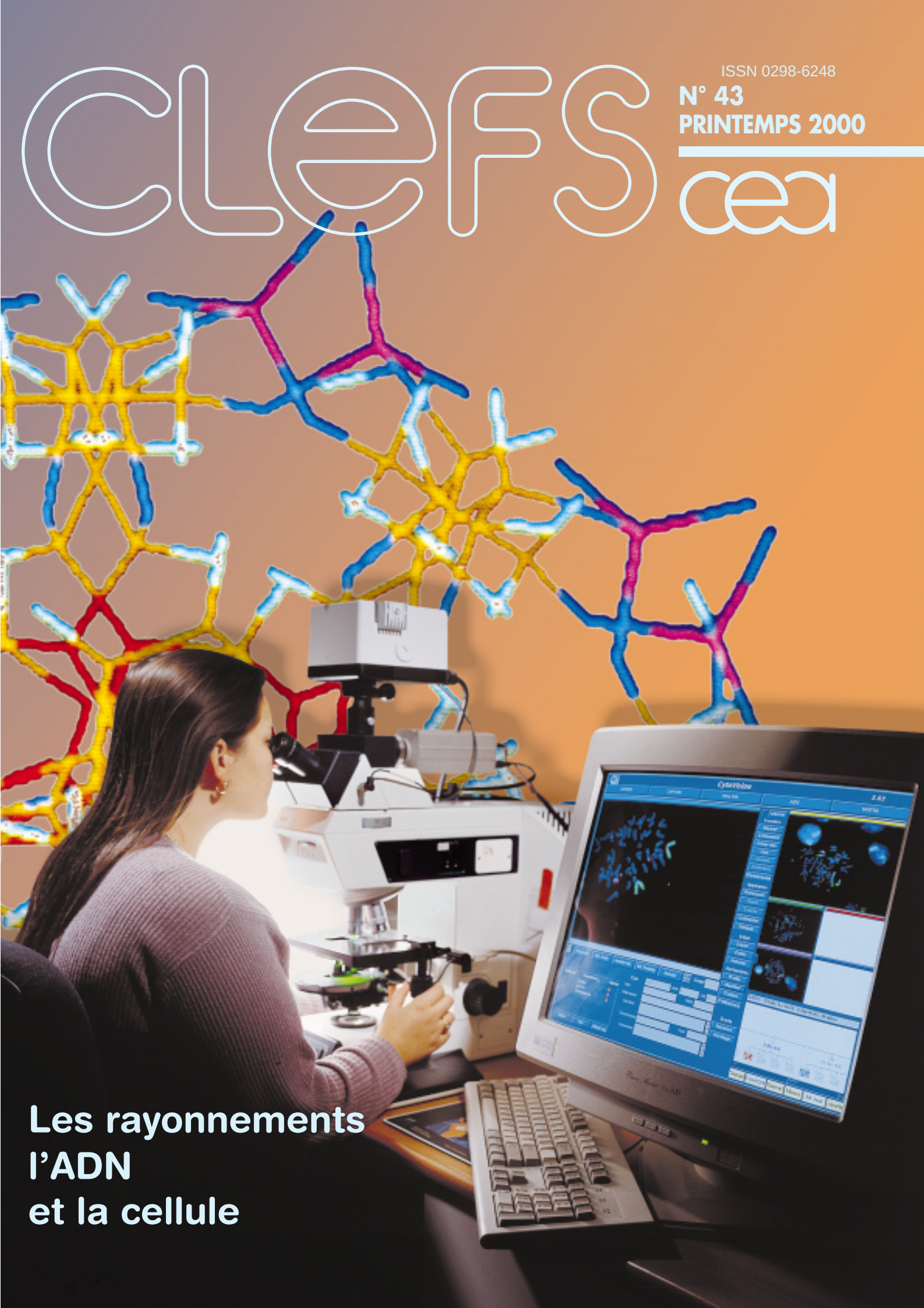
Il reste difficile de publier des résultats de radiobiologie dans les grandes revues généralistes. Des articles importants ont cependant paru au cours des cinq dernières années dans *Science*, *Nature*, *Cell*, les *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* ou *EMBO Journal* (de l'*European Molecular Biology Organization*). C'est le cas d'observations particulièrement pertinentes sur la détection de certaines lésions radio-induites par des méthodes ultrasensibles, sur la formation de complexes de réparation par excision de bases avec leur mécanisme d'action ou encore sur la nature de la réparation de la cassure double brin et des acteurs moléculaires mis en jeu.
La poursuite d'une bonne coordination institutionnelle et de la mise en œuvre de moyens, surtout en personnels jeunes et bien formés (rôle important du Diplôme d'études approfondies de radiobiologie) avec une persistance des efforts consentis par le ministère chargé de la Recherche devraient permettre d'améliorer la participation nationale à ce type de travaux de haut niveau.
Le contexte politique en France et dans le monde reste souvent imprégné d'incompréhension et d'inquiétude dans le domaine du nucléaire alors que la nécessité économique de son maintien est peu discutée. Une bonne maîtrise du mode d'action des rayonnements sur le vivant et la comparaison raisonnée avec d'autres risques (tabagisme, accidents de la route, pollutions industrielles diverses, etc.) restent le meilleur moyen de lutter contre la désinformation.

Ethel Moustacchi
Directeur de recherche émérite au CNRS
Institut Curie - CEA/Direction des sciences du vivant

CLEFS

ISSN 0298-6248
N° 43
PRINTEMPS 2000

cea



Les rayonnements l'ADN et la cellule

Éditorial

Le renouveau, depuis quelques années, de la recherche dans le domaine de la radiobiologie, en particulier en France, justifie de faire le point des connaissances sur l'action des rayonnements ionisants sur la matière vivante. C'est l'objet de ce numéro de *Clefs CEA*, qui a l'ambition de fournir une information scientifique solide sur le sujet. Il montre comment les chercheurs du CEA (qui s'est vu confier une mission de pilote par les pouvoirs publics), en étroite collaboration avec ceux des autres organismes de recherche et de l'Université, contribuent activement aux progrès de la compréhension des mécanismes intimes de l'action des rayonnements sur l'ADN, la cellule et les tissus.

La structure du numéro s'appuie sur l'échelle des temps qui caractérise l'action biologique des rayonnements et les réactions de l'organisme. Le premier chapitre traite des événements initiaux au niveau de l'ADN et de la cellule, qui surviennent en une infime fraction de seconde. Le deuxième porte sur les réponses de l'organisme dans les secondes, les minutes et les heures qui suivent. Le troisième aborde les événements pouvant traduire, à l'échelle des années, voire des générations, une insuffisance des mécanismes qui, dans la très grande majorité des cas, permettent une réparation des dommages causés ou, à tout le moins, l'élimination des cellules trop sévèrement touchées.

Un dernier article, plus général, montre comment un organisme international comme le Comité scientifique des Nations unies sur les effets des radiations atomiques (Unscear), chargé de l'évaluation de l'impact sanitaire des rayonnements ionisants, s'est organisé pour synthétiser les progrès de la recherche. Sans attendre pour autant de tout savoir dans le détail, au niveau fondamental, les experts sont ainsi en mesure de fournir aux autorités l'état de l'art scientifique sur lequel fonder des normes assurant, avec d'importantes marges de sécurité, la protection des travailleurs et du public.

Les concepts de la biologie étant bien spécifiques et souvent d'un accès difficile, des éléments d'aide à la lecture ont été intégrés à ce numéro, sous la forme notamment d'encadrés sur les notions de base et d'un glossaire. Ce ne seront que des rappels pour les uns, des "marchepieds" utiles, nous l'espérons, pour les autres.

Dans sa forme et son contenu, ce numéro de *Clefs CEA* est le premier d'une série dont chacun présentera les travaux et résultats du CEA sur un thème scientifique ou technologique stratégique ainsi que le contexte dans lequel ils sont menés et obtenus. C'est ainsi que le prochain numéro présentera, à la rentrée, un panorama de la contribution apportée par notre organisme aux nouvelles technologies de l'énergie.

Anne-Marie Birac
Rédacteur en chef

Revue éditée par le
Commissariat à l'énergie atomique
Direction de la communication
et des affaires publiques
31 - 33, rue de la Fédération
75752 Paris Cedex 15
Tél. : 01.40.56.10.00

Le CEA sur Internet :
http://www.cea.fr

Comité scientifique
Pascal Anzieu, France Brès-Tutino,
Guy Fournier, Claire Giry, Jean Hanus,
Étienne Klein, Alain Leudet,
Jean-Claude Levain, Henri Métivier,
Serge Poulard, Paul Reuss, Michel Saint-Mleux,
Alain Simon, Yves Vandenboomgaerde

Ont participé à la préparation de ce numéro :
Dr. Anne Flüry-Hérard, Dr. Jean-Michel Giraud,
Christine Jimonet, Philippe Voisin,
Christian de Rouffignac

Directeur de la publication
Jean-Louis Chambon

Rédacteur en chef
Anne-Marie Birac

Rédacteurs en chef adjoints
Martine Trocellier
Bernard Bouquin

Iconographie
Florence Klotz

Secrétariat
Marceline Pac

Abonnement
L'abonnement à *Clefs CEA* est gratuit.
Les demandes doivent être adressées,
de préférence par télécopie, à :
CEA/Direction de la communication
et des affaires publiques
Abonnements *Clefs CEA*
31 - 33, rue de la Fédération
75752 Paris Cedex 15
Fax : 01.40.56.20.01 - Tél. : 01.40.56.11.07

ISSN 0298-6248
Commission paritaire N° 2 037 ADEP

Réalisation : STIPA imprimerie
Montreuil - 01.48.18.20.20

À l'exclusion des illustrations, la reproduction totale ou partielle des informations contenues dans ce numéro est libre de tous droits, sous réserve de l'accord de la rédaction et de la mention d'origine.

With the exception of illustrations, all information in this issue of Clefs CEA *may be freely reproduced, subject to written permission from the CEA and mention of the source.*

© 2000 Commissariat à l'énergie atomique

Les rayonnements, l'ADN et la cellule

AVANT-PROPOS *par Ethel Moustacchi* 4

RAYONNEMENTS IONISANTS ET MATIÈRE VIVANTE 6
(les différents types de rayonnements, les définitions, les unités, les moyens expérimentaux)

I. LES LÉSIONS DE L'ADN

INTRODUCTION *par Christine Jimonet* 9

LES DOMMAGES RADIO-INDUITS DES ACIDES NUCLÉIQUES *par Jean Cadet* 10

ENCADRÉ A : La molécule d'ADN, vecteur de l'hérédité 18

ANALYSE STRUCTURALE DES LÉSIONS RADIO-INDUITES DE L'ADN 23
par Yves Boulard et Georges Victor Fazakerley

ENCADRÉ B : La réplication de l'ADN : une fidélité quasi parfaite 26

LA RADIOLYSE DE L'EAU *par Bernard Hickel* 33

DES OUTILS PHYSIQUES POUR ÉTUDIER LES LÉSIONS RADIO-INDUITES *par Pascal Pihet* 34

II. RÉPONSES PRÉCOCES ET PROCESSUS DE RÉPARATION

INTRODUCTION *par Marie-Claude Gaillard* 42

LES GARDIENS DU GÉNOME. Réparation des lésions de l'ADN produites par les rayonnements ultraviolets et ionisants *par Serge Boiteux, Juan Pablo Radicella et Sylvie Chevillard* 43

ENCADRÉ C : Les chromosomes, supports matériels des gènes 51

DES BACTÉRIES RÉSISTANTES aux rayonnements ionisants *par Marie Libert* 58

EFFETS DES RAYONNEMENTS SUR LE CYCLE CELLULAIRE. Les levures comme modèles *par Carl Mann et Marie-Claude Marsolier* 63

ENCADRÉ D : La cellule, le maillon essentiel 71

ENCADRÉ E : Le cycle cellulaire : duplication sous contrôle 72

LES GÈNES RADIO-INDUITS *par Odile Rigaud et Michael Kazmaier* 78

ENCADRÉ F : Les acides aminés, alphabet chimique des protéines 83

LE SUICIDE CELLULAIRE *par Évelyne May et Hervé Coffigny*

Effets des rayonnements ionisants. LES CONSÉQUENCES MESURABLES AU NIVEAU CELLULAIRE *par Philippe Voisin*

III. RÉPONSES TARDIVES

INTRODUCTION *par Christine Jimonet* 88

L'INSTABILITÉ CHROMOSOMIQUE *par Françoise Hoffschir et Laure Sabatier* 93

CANCERS RADIO-INDUITS. Étude sur des cellules en culture *par Catherine Luccioni* 94

EFFETS HÉRÉDITAIRES DES RAYONNEMENTS IONISANTS *par Bernard Dutrillaux*

DE LA CELLULE À L'HOMME

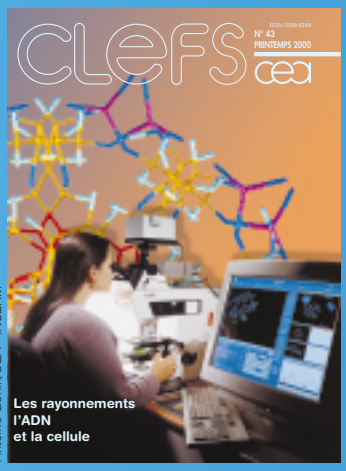
DE LA RECHERCHE À LA RÉGLEMENTATION *par Anne Flüry-Hérard*

ÉCHELLE DE CORRESPONDANCE DES NIVEAUX D'EXPOSITION ET DES EFFETS SANITAIRES

GLOSSAIRE

(les mots figurant dans les encadrés et dans le glossaire apparaissent respectivement en rouge ou en bleu dans les textes correspondants à leur première occurrence)

N° 43
Printemps 2000

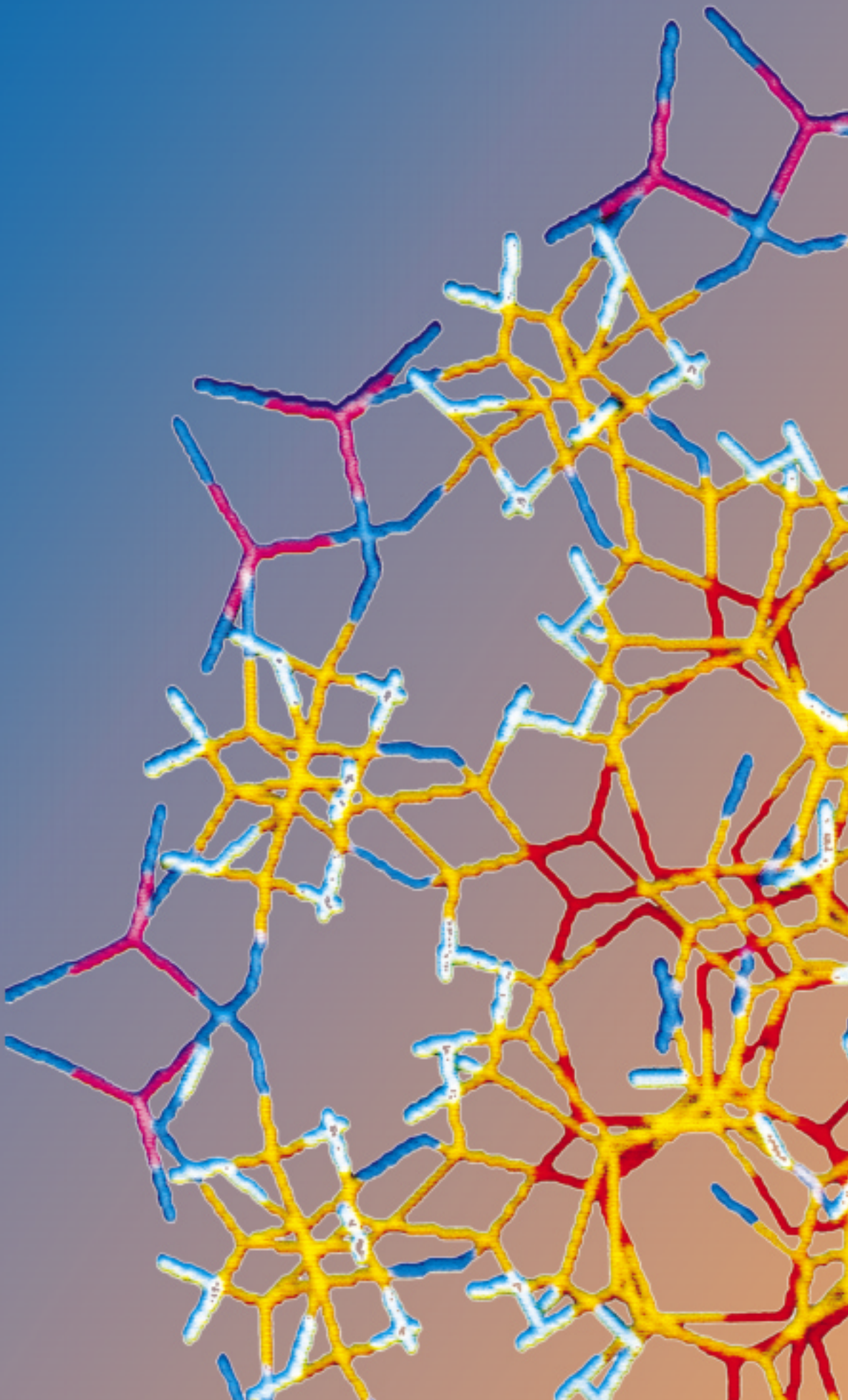


Antoine Gonin/CEA - INSERM

Les progrès de la génétique humaine, ceux de la biologie moléculaire tant sur le plan fondamental que des techniques ont permis, ces dernières années, d'importantes avancées des recherches en radiobiologie. Ici, sur fond de coupe transversale d'un modèle de molécule d'ADN, un appareil de cytovision traitant des images de matériel génétique obtenues par fluorescence.

Dans le prochain numéro :

- **LES NOUVELLES TECHNOLOGIES DE L'ÉNERGIE**



EFFETS DES RAYONNEMENTS SUR LE CYCLE CELLULAIRE

Les levures comme modèles

Les organismes vivants, depuis l'apparition sur Terre du plus simple d'entre eux, sont soumis à un nombre considérable d'agressions de diverses origines. Ils mettent depuis longtemps en œuvre des systèmes de réponse aux lésions de leur ADN résultant de ces agressions, et notamment des rayonnements. La cellule sait "faire le point" à plusieurs moments de sa vie, ralentir voire bloquer son cycle avant de le poursuivre, après réparation de son ADN, et se diviser. Ces mécanismes ont conservé une remarquable similitude tout au long de l'évolution. L'étude relativement facile de ces systèmes chez les levures est donc d'une aide précieuse pour appréhender les systèmes correspondants chez l'homme et en évaluer les limites mais aussi les possibilités, en particulier en cancérologie.

E. Joly/CEA

Localisation par observation au microscope à fluorescence d'une protéine hybride RAD53-GFP exprimée dans des cellules de levure. Les contours des cellules apparaissent sur l'écran du poste informatique de traitement d'image en rouge, l'ADN du noyau en vert.

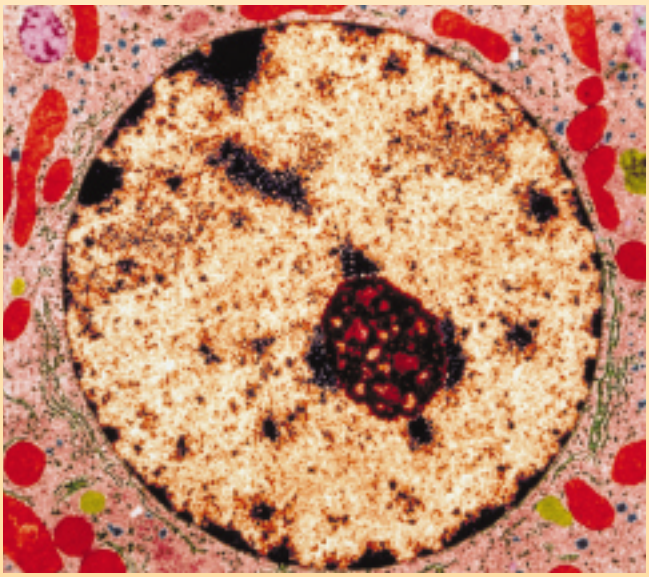
La cellule, le maillon essentiel

D

Brique constitutive fondamentale de tout être vivant, la cellule contient l'intégralité de l'information qui serait nécessaire à la construction de l'organisme tout entier. Chaque type de cellule n'en utilise toutefois que la part correspondant à sa "spécialité" (dans le cas d'une cellule du pancréas, par exemple, pour se mettre en situation de produire de l'insuline).

Chez les **eucaryotes**(1) supérieurs, dont font partie les mammifères et donc l'homme, la cellule comporte les éléments principaux suivants :

- le **noyau** contient l'information génétique de la cellule (les **gènes**), sous forme d'**ADN** (organisé en temps utile en **chromosomes**). Il est le siège de la transcription des **ARN**, qui assurent la réplication de l'information inscrite dans l'ADN et sa transmission aux protéines à construire (voir les encadrés A, B et C ***La molécule d'ADN, vecteur de l'hérédité, La réplication de l'ADN : une fidélité quasi parfaite*** et ***Les chromosomes, supports matériels des gènes***) ;
- le **cytoplasme** est composé de divers éléments baignant dans une substance transparente qui renferme des filaments et des **microtubules** constituant le squelette de la cellule. Ce **cytosquelette**, fait de fibres protéiques, donne sa forme à la cellule et permet sa locomotion ;
- des microstructures exerçant des fonctions particulières et appelées **organites cellulaires** sont incluses dans le cytoplasme. L'**appareil de Golgi** concentre, trie, conditionne et excrète des productions protéiques de la cellule (**lipoprotéines**, **enzymes**, **hormones**). Les **mitochondries**, qui possèdent leur propre ADN, sont les centrales énergétiques de la cellule. Elles combinent l'oxygène avec les molécules alimentaires pour fabriquer de l'**ATP** (adénosine triphosphate), molécule transporteuse d'énergie intervenant dans de très nombreuses étapes du métabolisme cellulaire. Le **réticulum endoplasmique** est un réseau tubulaire membranaire de transport des protéines synthétisées au niveau des **ribosomes**, grosses particules formées d'ARN et de protéines issues de la transcription de cet ARN. Les **lysosomes** sont "l'estomac" de la cellule, chargés de détruire au moyen d'enzymes des substances provenant de l'extérieur ou appartenant à la cellule elle-même. Les **peroxyzomes** sont spécialisés dans la décomposition du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) ;
- la **membrane cytoplasmique** englobe l'ensemble du cytoplasme et du noyau. Elle délimite la cellule et l'isole tout en permettant les échanges avec le milieu extérieur grâce à ses propriétés de perméabilité (à l'eau et à certaines substances qui y sont dissoutes) et à la présence de protéines servant de "pompes" ou de "canaux" pour le transfert de molécules.



D. Kunkel/Phototake/CNRI

Vue d'un hépatocyte (cellule du foie) montrant en particulier le noyau, un nucléole et des mitochondries (en rouge) et le réticulum endoplasmique rugueux (en vert).

(1) Organismes vivants composés d'une ou de nombreuses cellules possédant un noyau et un cytoplasme distincts. La lignée des eucaryotes inclut toutes les formes de vie à l'exception des bactéries et de certaines algues inférieures, qui appartiennent à la lignée des **procaryotes**, et des virus.

Des micro-organismes à l'homme

Les **rayonnements**, qu'ils soient non ionisants comme les ultraviolets (UV) ou **ionisants**, sont depuis le début de l'évolution biologique une cause naturelle de lésions pour l'**ADN** des êtres vivants. Les dommages causés à l'ADN par ces agents physiques sont de nature très diverse (voir *Les dommages radio-induits des acides nucléiques*) incluant des modifications des **bases**, des cassures simple brin ou des cassures double brin…

Les **cellules** doivent impérativement traiter ces lésions pour éviter la perte d'information génétique et préserver ainsi leur survie. De fait, tant les **procaryotes** (cellules sans noyau) que les **eucaryotes** (cellules avec un noyau) présentent des systèmes élaborés de réponse aux lésions de l'ADN. Le premier système de ce type, le système SOS, a été décrit chez la **bactérie** *Escherichia coli* (procaryote). Il est celui qui est encore le mieux compris à nos jours. Ses deux principaux éléments sont LexA, un **répresseur de transcription** des **gènes**

induits en cas d'ADN endommagé, et RecA, une **enzyme** (co-protéase) qui devient active en cas de lésions d'ADN et qui inactive LexA, permettant la **transcription** des gènes qu'il contrôle.

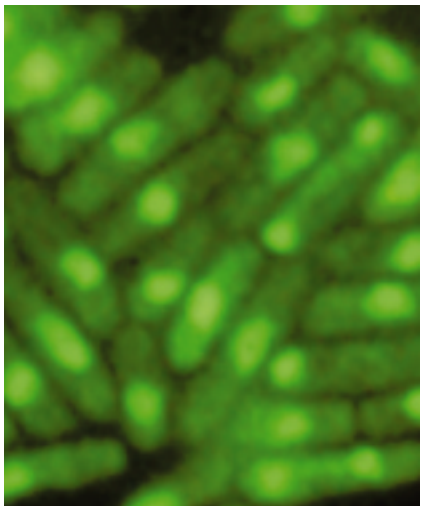
Des systèmes analogues ont été découverts chez les cellules eucaryotes. Certains de leurs éléments, conservés de façon extrêmement fidèle au cours de l'évolution, se retrouvent aujourd'hui aussi bien chez les micro-organismes que chez l'homme. Il est aisément concevable que les eucaryotes simples comme les **levures** *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ou *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) se prêtent beaucoup plus facilement aux analyses génétiques et biochimiques que les cellule d'organismes plus organisés comme les mammifères. Les levures sont ainsi considérées comme des modèles pour l'étude de la réponse des cellules eucaryotes aux lésions d'ADN. Cet article porte essentiellement sur le système de réponse de *S. cerevisiae* et mentionne *S. pombe* et les cellules de mammifères en cas de différences importantes avec lui.

Les réponses cellulaires aux lésions de l'ADN

Deux réponses principales ont été caractérisées chez *S. cerevisiae* en cas de lésions d'ADN : l'**activation de la transcription** de gènes dont les produits sont impliqués dans la réparation de l'ADN et des blocages temporaires du cycle cellulaire (encadré E, ***Le cycle cellulaire : duplication sous contrôle***). Chez les cellules animales, il existe une autre réponse, l'**apoptose**, ou mort cellulaire programmée (voir *Le suicide cellulaire*).

Le traitement des lésions de l'ADN fait intervenir plusieurs mécanismes de réparation qui procèdent par excision de **nucléotides**, par recombinaison, par photoréactivation ou par excision de bases (voir *Les gardiens du génome*). Quand les lésions apparaissent, la transcription des gènes codant certaines enzymes de ces voies est activée. Par ailleurs, l'ADN endommagé active des voies d'inhibition de la division cellulaire à des étapes bien précises du cycle que sont les phases G1, S ou G2/M (figure 1), en fonction de la position des cellules dans leur cycle au moment où se produisent les lésions. Les mécanismes permettant ces différents arrêts de la division ont des éléments communs, notamment les senseurs protéiques qui repèrent la présence de l'ADN endommagé, mais ils diffèrent quant aux cibles inhibées au sein de la machinerie de la division cellulaire. La réponse la mieux caractérisée chez les levures au niveau du cycle cellulaire est l'arrêt en G2/M.

Les blocages du cycle cellulaire jouent un rôle très important dans la résistance des cellules aux *stress* **génotoxiques**. Ils interdisent la **réplication** de l'ADN et la **ségrégation** des **chromosomes** (encadré B, ***La réplication de l'ADN, une fidélité quasi parfaite***) tant que les lésions ne sont pas complètement réparées. Les processus de réparation peuvent ainsi se dérouler pendant plusieurs heures jusqu'à leur terme sans être interrompus par la **mitose**. Lorsque la réparation des lésions est achevée, les cellules peuvent reprendre leur cycle sans que leur viabilité soit affectée (figure 2B). En revanche, des cellules **mutantes** incapables de bloquer leur cycle en cas d'ADN endommagé sont extrêmement sensibles aux irradiations parce qu'elles entrent en mitose avec des fragments chromosomiques qui sont mal ségrégés lors de la division (figure 2D).

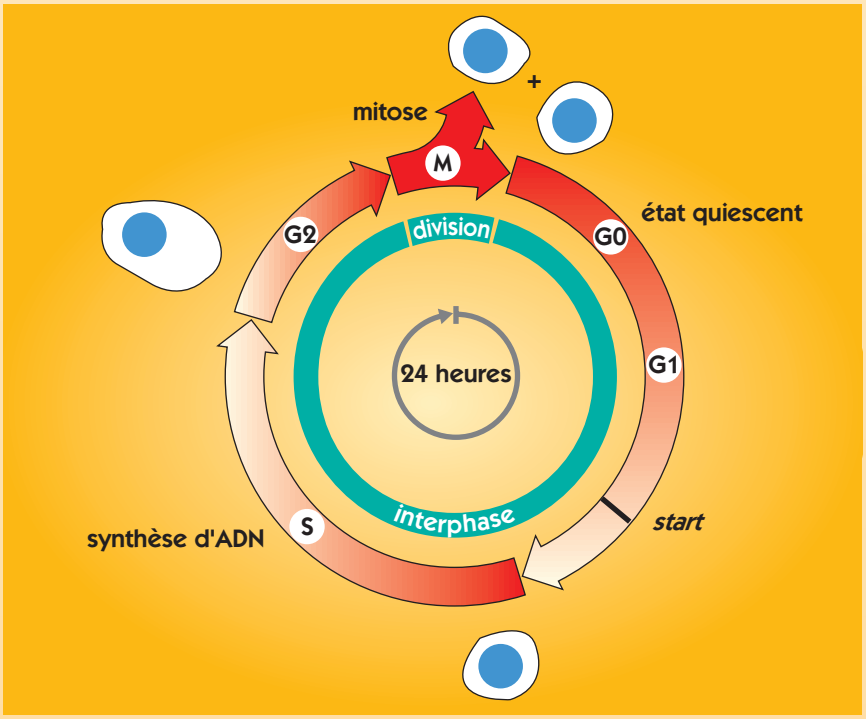


Salk Institute

Cellules de Schizosaccharomyces pombe en cours de division. Cette levure est, avec Saccharomyces cerevisiae, un des organismes qui se prêtent le plus facilement aux analyses génétiques et biochimiques et les font considérer comme des modèles pour l'étude de la réponse des cellules eucaryotes aux lésions de l'ADN.

Le cycle cellulaire : duplication sous contrôle

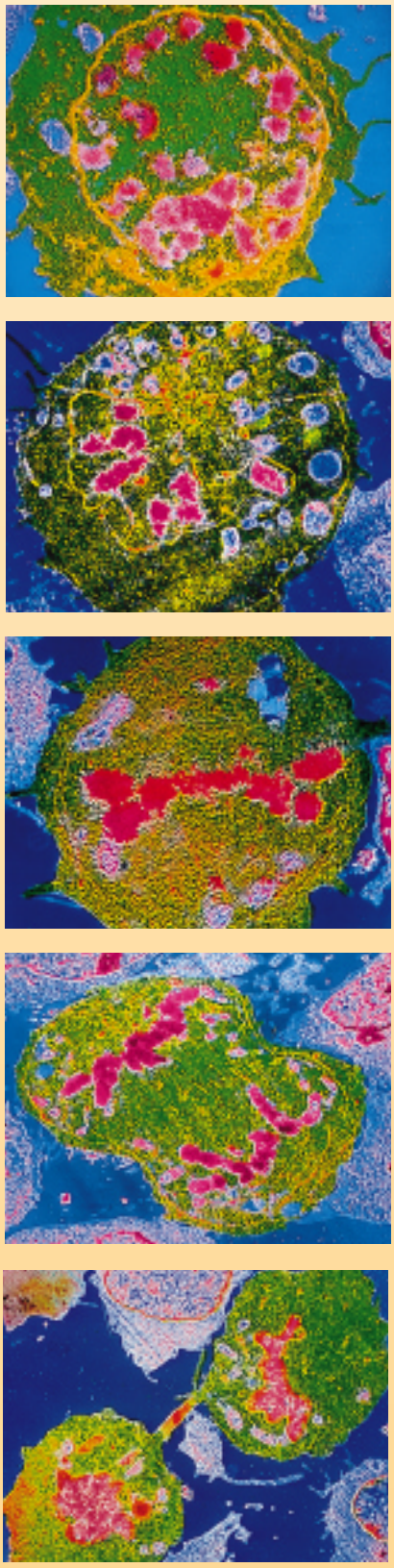
La vie d'une cellule comporte plusieurs phases distinctes dont la plus importante est la **mitose**, processus de division cellulaire. Ces phases sont représentées conventionnellement sur un cercle, chaque "tour" correspondant à l'apparition de deux cellules filles identiques issues de la division de la cellule mère (schéma).



Cycle cellulaire d'une cellule eucaryote standard (d'après Biologie moléculaire de la cellule*, Flammarion).*

Le cycle cellulaire typique dure environ vingt-quatre heures chez les **eucaryotes** supérieurs. La vie de la cellule est "rythmée" par les phases de mitose, séparées par une phase plus longue nommée **interphase**. Cette interphase commence par une période au cours de laquelle la cellule exerce ses fonctions "ordinaires", sans production de nouvel **ADN**. Elle fabrique alors des **protéines** et les substances nécessaires à sa croissance ou aux travaux qui lui sont assignés, en utilisant de l'énergie chimique, qu'elle peut aussi temporairement stocker. L'interphase débute par une phase de présynthèse appelée G1 dont la fin marque le démarrage (*Start*) du cycle cellulaire proprement dit. À ce stade, la cellule peut entrer dans une phase de **quiescence** (G0) où il lui est possible de rester des jours, voire des années avant de reprendre son cycle de division. Au point *Start* débute la phase, cruciale, de synthèse et de réplication de l'ADN, appelée S pour synthèse, qui aboutit au bout d'un temps variable (quelques minutes à quelques heures) à une **duplication** du stock d'ADN de la cellule, qui passe de *n* à 2 *n*. À l'issue de l'étape suivante, dite de post-synthèse (G2), au cours de laquelle la cellule s'assure que la réplication de son ADN est achevée, elle peut commencer la mitose (M), processus qui se décompose en cinq étapes :

- la **prophase** est marquée par la condensation de la chromatine dispersée dans le noyau en 2 *n* **chromosomes** individualisés. Chaque chromosome est constitué de deux **chromatides** sœurs reliées en un point, le **centromère**. Le **fuseau mitotique**, structure bipolaire composée de microtubules et de protéines associées, commence à se former ;
- la **prométaphase** est notamment ponctuée par la rupture de l'enveloppe du noyau ;
- la **métaphase** est caractérisée par le rassemblement des chromosomes dans



P. Sentein/CNRI

Phases successives de la mitose d'une cellule humaine (lymphocyte) observées au microscope électronique à transmission : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase.

une zone, la “plaque équatoriale”, à égale distance des deux pôles du fuseau mitotique ;

- l’**anaphase** voit les deux stocks de chromosomes se séparer (**ségrégation**) en quelques minutes après clivage des centromères, ce qui permet à chaque chromatide de se déplacer vers un des pôles ;
- la **télophase** est marquée par l’individualisation des noyaux des deux cellules filles, une enveloppe nucléaire se reconstituant autour des chromosomes individuels qui se décondensent. La télophase est suivie par la **cytodiérèse** (ou **cytocinèse**) qui mène à la séparation complète des deux nouvelles cellules.

Un mode particulier de la division cellulaire intervient dans la genèse des cellules sexuelles ou **gamètes** (ovules et spermatozoïdes) qui, lors de la fécondation, apporteront chacune une moitié *n* des chromosomes de l’œuf. Appelé **méiose**, ce processus aboutit, par deux

Ph. Plailly/CNRS-LBMC

Ovocytes d’un mollusque marin se préparant à la méiose.

divisions au lieu d’une après la **réplication** de l’ADN, à une réduction de moitié (de 2 *n* à *n*) du nombre des chromosomes de chaque cellule fille. Les gamètes, qui ne possèdent que la moitié du nombre de chromosomes propres à l’espèce, portent pour cette raison le qualificatif d’**haploïde**, terme opposé à **diploïde**, qui désigne une cellule comptant deux jeux de chromosomes homologues. Les cellules **somatiques**, qui constituent l’organisme, sont diploïdes et se divisent par mitose, produisant deux cellules elles-mêmes diploïdes. Seules les cellules **germinales** subissent la méiose et génèrent quatre cellules haploïdes, les gamètes.

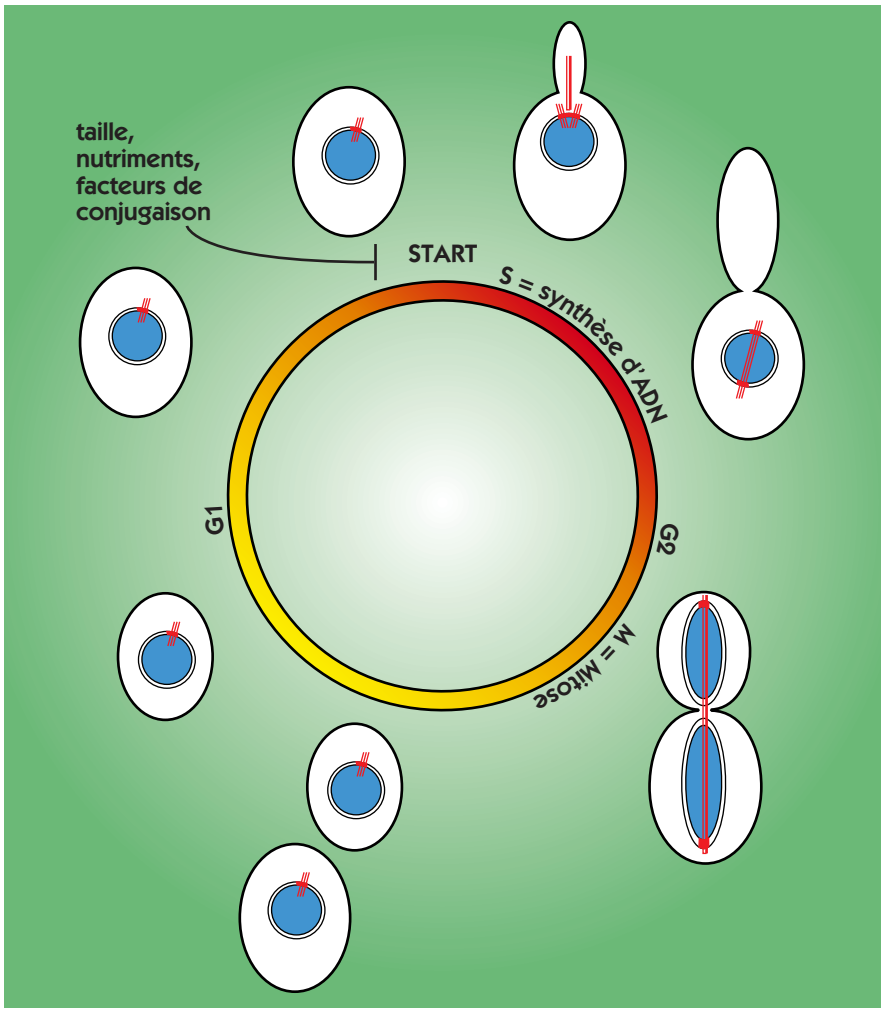


Figure 1. Le cycle cellulaire de S. cerevisiae. Les cellules passent le point* Start *lorsque certaines conditions sont remplies. Ce passage irréversible dans la phase S de synthèse d’ADN déclenche trois types d’événements : la réplication des chromosomes, la duplication du centre organisateur des microtubules (carrés rouges dans la membrane nucléaire) pour la mise en place du fuseau mitotique (traits rouges), et la formation du bourgeon. Lorsque la synthèse d’ADN est terminée, les cellules passent en phase G2, puis entament la mitose, les deux cellules filles se retrouvant au début de G1. Les lésions d’ADN provoquent le blocage des cellules en G1, S et G2/M.

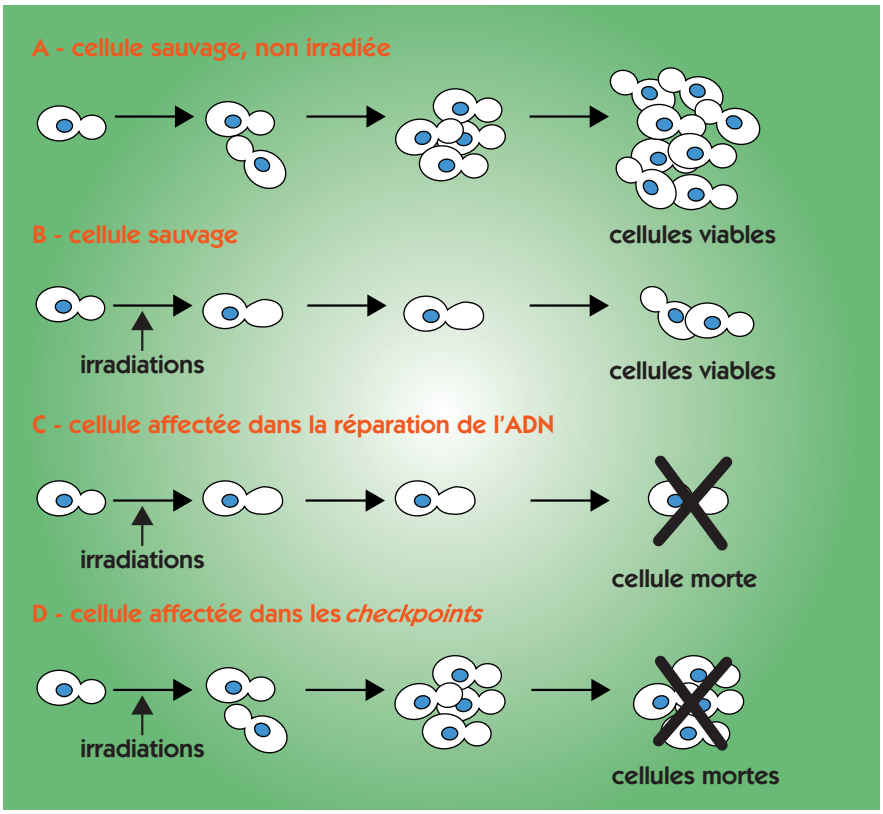


Figure 2. Réponses aux irradiations de cellules sauvages (B) ou mutées dans des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (C) ou dans les checkpoints (D). Après irradiation, les cellules sauvages bloquent leur cycle de division tant que les lésions ne sont pas réparées. Les cellules mutées dans des gènes de réparation détectent les lésions et arrêtent leur division. Incapables de réparer ces lésions, elles meurent néanmoins. Les cellules mutées dans les gènes de checkpoint n'arrêtent pas leur division et ségrègent leurs chromosomes sans avoir eu le temps de réparer, d'où des dommages létaux et la mort, après quelques divisions.

Les voies de contrôle du cycle cellulaire

La mise en place des réponses aux lésions de l'ADN passe par des **voies de contrôle** du cycle cellulaire, ou "*checkpoints*" (figure 2D). Elles permettent des arrêts du cycle pendant le temps requis pour que les cellules puissent réparer leur ADN avant la ségrégation des chromosomes. D'une manière générale, les voies de contrôle du cycle cellulaire sont des mécanismes qui subordonnent l'exécution d'un événement cellulaire donné à l'accomplissement préalable d'un autre événement. Il existe des *checkpoints* qui imposent la réplication préalable de l'ADN et une absence totale de lésions avant toute ségrégation des chromosomes, et d'autres qui bloquent la séparation des **chromatides** sœurs tant que le **fuseau mitotique** n'est pas correctement organisé. Comme nous allons le voir, les mécanismes moléculaires des *checkpoints* qui interviennent lorsque l'ADN est endommagé sont complexes.

Les mécanismes moléculaires des voies de contrôle

Les gènes impliqués dans les *checkpoints* ont été identifiés en cherchant des mutants hypersensibles aux *stress* génotoxiques. Des analyses génétiques et biochimiques ont ensuite permis d'ordonner l'intervention de leurs produits, de telle sorte que les mécanismes moléculaires commencent à être connus de façon précise. La voie de contrôle qui provoque chez *S. cerevisiae* l'arrêt en G2/M en réponse à l'ADN endommagé est à ce jour la mieux caractérisée. Comme toute voie de transmission d'un signal, ce *checkpoint* comporte des éléments senseurs, des éléments transmetteurs et des éléments effecteurs(1) (figure 3).

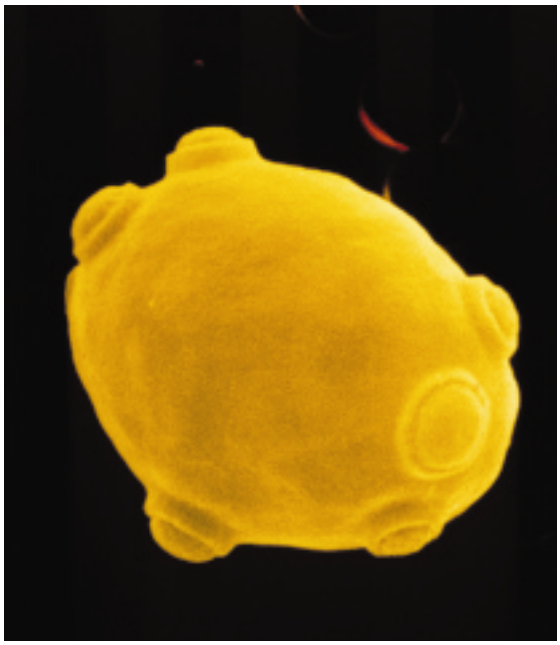
Les senseurs donnent le signal

Les lésions de l'ADN sont soumises rapidement à différentes modifications enzymatiques, de sorte qu'il est difficile de savoir si les lésions constituent en elles-mêmes le signal perçu par le *checkpoint* ou si ce signal n'est pas constitué par les lésions modifiées par des complexes de réparation. En fait, certaines données suggèrent que, comme pour les systèmes bactériens, la présence d'ADN simple brin constituerait l'élément déclencheur. Quoi qu'il en soit, les produits de quatre gènes, *RAD9*, *RAD17*, *RAD24* et *MEC3* ont des propriétés compatibles avec les fonctions de senseurs ou de modificateurs de lésions. En particulier Rad17 a une structure proche de celle des exonucléases(2) et Rad24 est homologue d'un facteur de réplication qui se fixe à l'ADN de la **fourche de réplication**. Ces quatre gènes sont répartis en deux groupes : *RAD9* d'un côté, *RAD17*, *RAD24* et *MEC3* de l'autre, agissant de manière parallèle et additive pour le déclenchement du *checkpoint*.

(1) Dans la suite de l'exposé, les gènes de *S. cerevisiae* sont typographiés en majuscules et italiques (*RAD53*), les mutants en minuscules et italiques (*rad53*), et les protéines correspondantes sans italiques avec une majuscule pour la première lettre (Rad53). Ces conventions sont différentes de celles employées pour d'autres organismes, dont *S. pombe*.
(2) Enzyme qui dégrade l'ADN à partir des extrémités.

Les éléments transmetteurs passent le message

Deux gènes s'avèrent essentiels pour la transmission du signal : *RAD53* et *MEC1*. Toutes les réponses à l'ADN endommagé, transcriptionnelles et cellulaires, dépendent des propriétés fonctionnelles de leurs produits. Mec1, bien qu'appartenant structurellement à la "super famille" des lipides **kinases**, est probablement une protéine kinase. Le gène *TEL1*, requis pour le maintien de la longueur des **télomères**, est un homologue de *MEC1* dans le génome de *S. cerevisiae*. Sa délétion n'entraîne pas d'hypersensibilité aux stress génotoxiques dans une souche **sauvage**, mais augmente la sensibilité d'une souche déjà mutée pour le gène *MEC1*. Tel1 semble donc avoir une fonction plus spécifique aux télomères, mais accessoire pour les *checkpoints*. Plusieurs homologues fonctionnels de *MEC1* et *TEL1* sont connus chez les autres eucaryotes : le gène Rad3 de *S. pombe* et les gènes humains ATM et ATR par exemple. ATM est le gène dont la mutation est responsable du syndrome *ataxia telangiectasia*. Les cellules mutées pour ce gène sont hypersensibles aux rayonnements ionisants, car elles sont incapables de bloquer leur cycle de division après irradiation, comme les mutants *mec1* de *S. cerevisiae*. Les malades atteints de ce syndrome présentent par ailleurs une fréquence élevée de cancers. ATR (*ATM-related*) est un gène présentant des homologies avec ATM. Il joue un rôle dans la recombinaison **méiotique**, mais sa fonction éventuelle en réponse à l'ADN endommagé n'a pas encore été clairement identifiée. *RAD53* code une protéine kinase et son homologue humain, hCHK2, a récemment été impliqué dans le syndrome multi-cancers de Li-Fraumeni. Rad53 est une protéine kinase activée par **phosphorylation** lorsque l'ADN est endommagé. Cette phosphorylation dépend de Rad9 et de Mec1, ce qui indique que Rad53 agit en aval de ces **protéines**.



D. Kunkel/Phototake/CNRI

***Saccharomyces cerevisiae** observée au microscope électronique à balayage. Le système qui, en réponse aux lésions de l'ADN, provoque chez cette levure l'arrêt du cycle cellulaire avant la mitose est un des mieux caractérisés.*

CEA/SBGM

Mise en évidence de la protéine** Rad53 **après électrophorèse sur gel d'acrylamide. En absence de lésions de l'ADN, la protéine migre sous forme d'une seule bande. En cas de lésions déclenchées par des irradiations UV,** Rad53 **est phosphorylée, ce qui modifie sa mobilité électrophorétique et fait apparaître plusieurs bandes supplémentaires. (En A, Rad53 phosphorylée, en B Rad53 non phosphorylée).

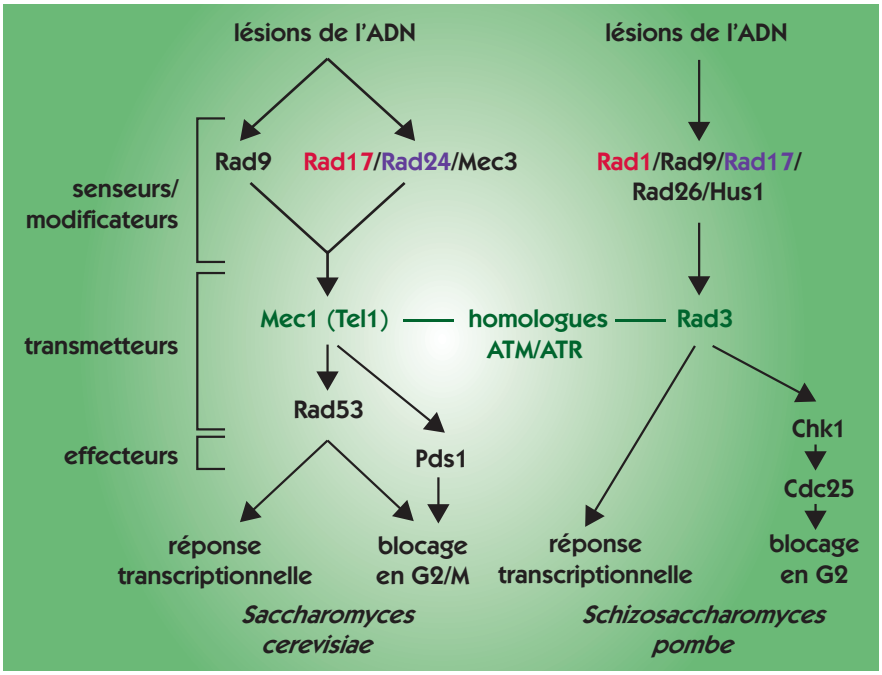


***Figure 3.** La voie de réponse G2/M aux lésions de l'ADN chez S. cerevisiae et G2 chez S. pombe. Les éléments des couples de gènes homologues RAD17/**Rad1**, RAD24/**Rad17**, MEC1(TEL1)/**Rad3** sont indiqués par une couleur identique.*

fonctions	*S. cerevisiae*	*S. pombe*	*Homo sapiens*	caractéristiques biochimiques
senseurs/ modificateurs	*RAD9* *RAD17* *RAD24*	Rhp9 Rad1 Rad17 Hus1 Rad9	 EST[a] EST EST hRAD9	domaines BRCT[b] nucléase[c] probable homologie avec le facteur de réplication[d] C ? ?
transmetteurs	*MEC1* *TEL1* *RAD53*	Rad3 Rad3 Cds1	ATR ATM hCHK2	protéine kinase[e] protéine kinase protéine kinase
effecteurs	*CHK1* *BMH1/2*	Chk1 Rad24/25	hCHK1 gène de type 14-3-3	kinase de Cdc25 protéine de type 14-3-3[f]

(a) EST pour Expressed Sequence Tag *(fragment d'un gène exprimé chez l'homme).*
(b) Les domaines BRCT sont similaires au domaine C-terminal (extrémité carboxylique - COO^-) de la protéine humaine BRCA1 dont la mutation est impliquée dans certains cancers du sein.
(c) Les nucléases clivent les chaînes d'ADN.
(d) Les facteurs de réplication interviennent avec les polymérases synthétisant l'ADN.
(e) Les protéines kinases transfèrent des groupements phosphates sur les acides aminés de certaines protéines-cibles, ce qui régule leur activité.
(f) Les protéines de type 14-3-3 reconnaissent et fixent certains motifs de protéines phosphorylées.

Tableau. Quelques gènes homologues impliqués dans les* checkpoints *chez* S. cerevisiae*,* S. pombe *et* Homo sapiens *(les gènes de* S. pombe *et de* H. sapiens *sont typographiés selon les conventions en usage).

Cependant les mutants *rad53* sont beaucoup moins sensibles aux irradiations que les mutants *mec1*, ce qui suggère que Mec1 agit sur d'autres protéines indépendamment de Rad53.

Les effecteurs bloquent le cycle

Enfin, les effecteurs responsables de l'arrêt du cycle cellulaire en cas d'ADN endommagé ne sont pas connus avec certitude chez *S. cerevisiae*. Une cible probable est Pds1, une protéine intervenant dans l'association des chromatides sœurs pendant la mitose, et dont la mutation du gène supprime l'arrêt en G2/M après une irradiation gamma. Par contre, chez *S. pombe* et chez les mammifères, l'arrêt du cycle cellulaire en G2 en réponse à l'ADN endommagé passe par l'inhibition de la kinase dépendante des cyclines (Cdk) régissant l'entrée en mitose [3]. La phosphatase Cdc25, protéine qui hydrolyse les groupements phosphates, est nécessaire à l'activation de la Cdk Cdc2. Après irradiation, la kinase Rad3 de *S. pombe* active par phosphorylation la kinase Chk1, qui phosphoryle à son tour la phosphatase Cdc25. Cette phosphorylation entraîne la séquestration de Cdc25 par les protéines de type 14-3-3, ce qui empêche l'activation de Cdc2. Le même mécanisme a été retrouvé chez la souris et chez l'homme.

La réaction des cellules eucaryotes aux lésions de l'ADN est globalement restée très semblable chez les eucaryotes simples comme les levures et chez les eucaryotes supérieurs. Le tableau donne une liste de gènes homologues de *S. cerevisiae*, *S. pombe* et *Homo sapiens*, dont les produits interviennent dans les *checkpoints*. Il existe peu de gènes de *S. cerevisiae* ou de *S. pombe* qui ne possèdent pas un homologue humain, ce qui justifie bien l'utilisation de ces levures comme systèmes modèles, même s'il est clair que certaines voies, comme celle de l'apoptose, sont spécifiques des cellules animales, et peuvent donc difficilement être étudiées dans ces organismes.

Des voies de contrôle aux anti-cancéreux

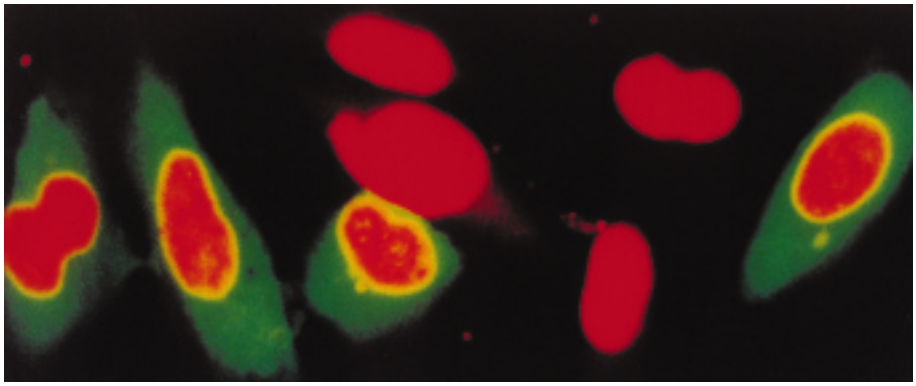
Outre l'intérêt de connaître les réactions des cellules eucaryotes aux irradiations, l'étude des *checkpoints* de la levure peut aboutir à des applications thérapeutiques importantes, en particulier dans la lutte contre les cancers. En effet, les cellules cancéreuses présentent par essence des défauts au sein même des voies de contrôle de la division. L'inactivation de ces voies est probablement un des premiers processus à amorcer le développement d'un cancer, en permettant l'accumulation rapide de modifications génétiques nécessaires à la formation d'une tumeur. Cette caractéristique constitue aussi leur point faible, puisque l'absence de *checkpoints* rend les cellules cancéreuses plus sensibles que des cellules saines à des traitements génotoxiques. Or ces défauts de *checkpoint* sont dus à des mutations dans des gènes qui ont souvent des homologues chez *S. cerevisiae*. Des chercheurs américains mettent donc actuellement au point des programmes de criblage de médicaments anti-cancéreux fondés sur des mutants (de réparation ou de *checkpoint*) de *S. cerevisiae*, dont la sensibilité à certains composants chimiques est comparable à celle de certaines **lignées** cancéreuses. Les levures étant plus aisées à manipuler que des lignées cellulaires d'eucaryotes supérieurs, elles peuvent ainsi servir de "cobayes" unicellulaires pour la recherche de tels médicaments.

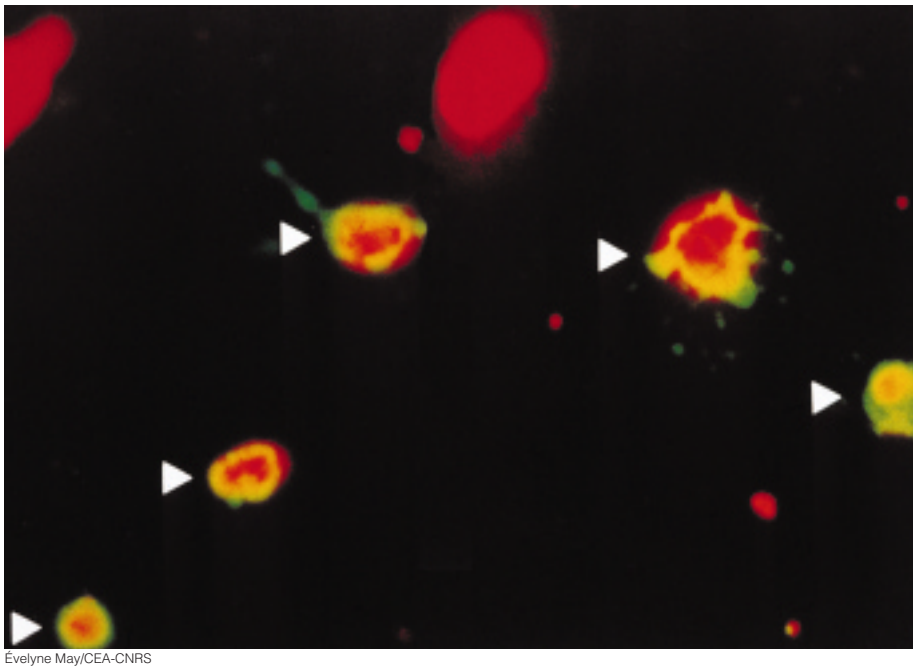
(3) Les deux composants-clés du système de contrôle du cycle cellulaire sont la kinase cycline-dépendante et la cycline sans laquelle la première est inactive. Le complexe formé agit comme une protéine kinase pour déclencher les processus en aval.

Carl Mann
et **Marie-Claude Marsolier**
Département de biologie cellulaire et moléculaire
Direction des sciences du vivant
CEA/Saclay

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. "Gardienne" 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.

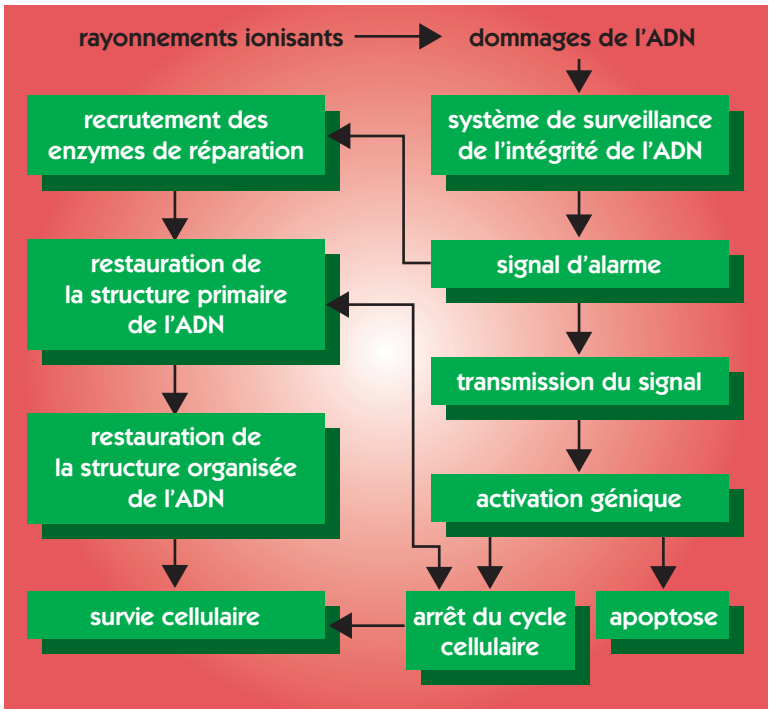




Évelyne May/CEA-CNRS

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 structurales 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

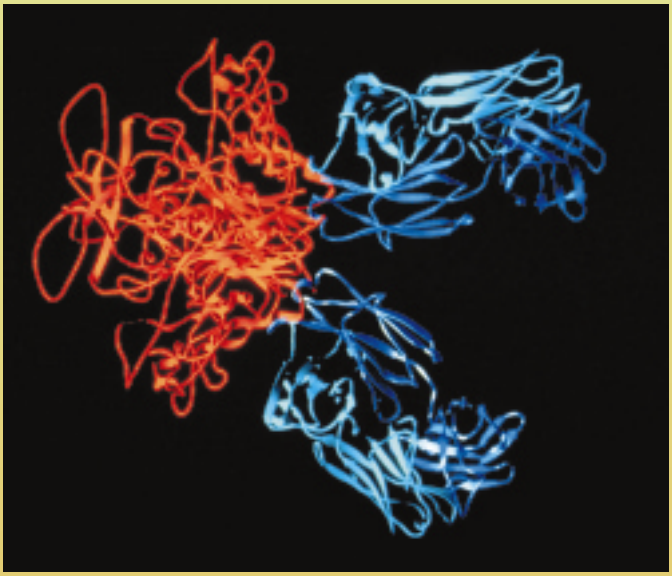
Plusieurs gènes radio-induits placés sous le contrôle de la protéine p53 provoquent un arrêt de la prolifération des cellules en des points précis du cycle lorsque cette dernière est activée. Avant de détailler leur mécanisme d'action, il faut rappeler que le déroulement correct des phases successives 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** NH_2, 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 créer une **liaison peptidique** d'assemblage qui s'accompagne de l'expulsion d'une molécule d'eau H_2O (schéma).

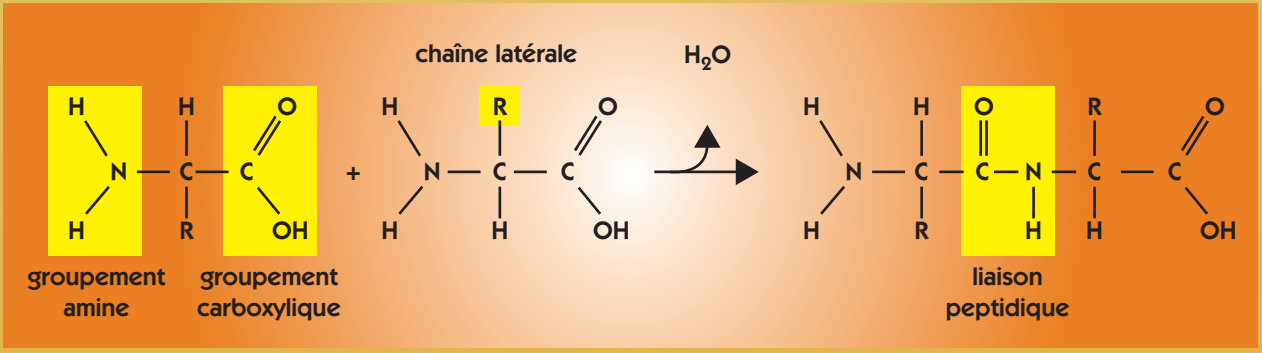
CEA



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

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**.

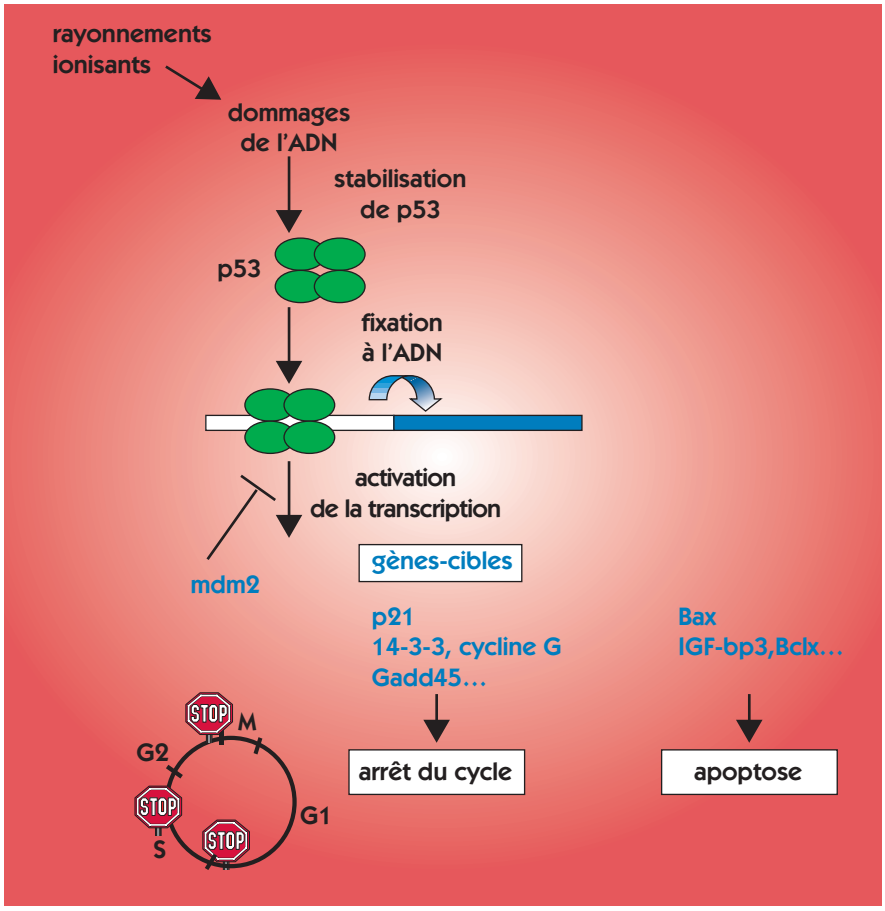
La synthèse d'une protéine à partir d'une **séquence nucléotidique de l'ADN** appelée région codante ou gène se fait en deux étapes impliquant différentes molécules d'ARN. Tout d'abord, l'information portée par un gène est copiée en une séquence nucléotidique complémentaire appelée **ARN messager** (étape 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 chaine 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'exercer 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.

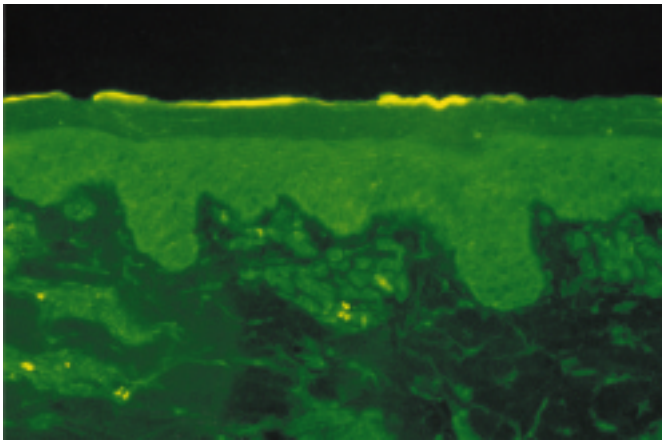


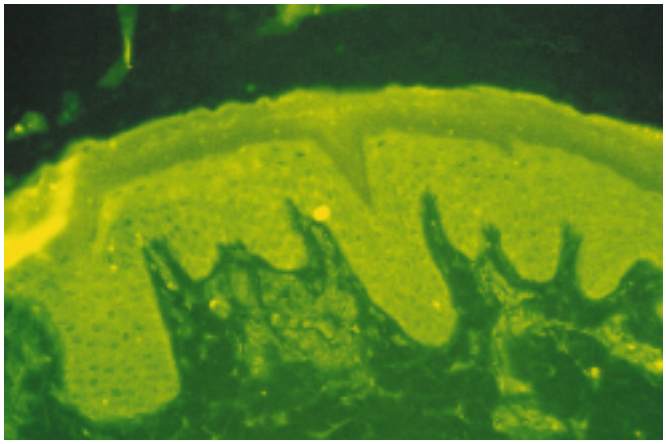
p53 et le contrôle de la réponse apoptotique

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 mutations 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 rétrocontrôle 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-β1 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 de l'ADN et à la régulation du cycle cellulaire. *Arabidopsis* a été choisie comme modèle d'étude parce 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.

CEA

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

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

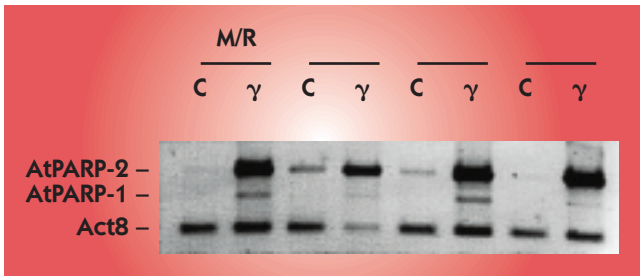


Figure 3. Mise en évidence de l'accumulation de l'ARN messager PARP-1 et PARP-2 dans différents tissus d'Arabidopsis thaliana après irradiation par une source de cobalt 60. C correspond à une plante non stressée, γ à une plante traitée par un rayonnement gamma et Act 8 au gène actine, utilisé comme contrôle 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 1*) a été identifié par une équipe du laboratoire. Ce gène est exprimé à un taux basal dans les cellules

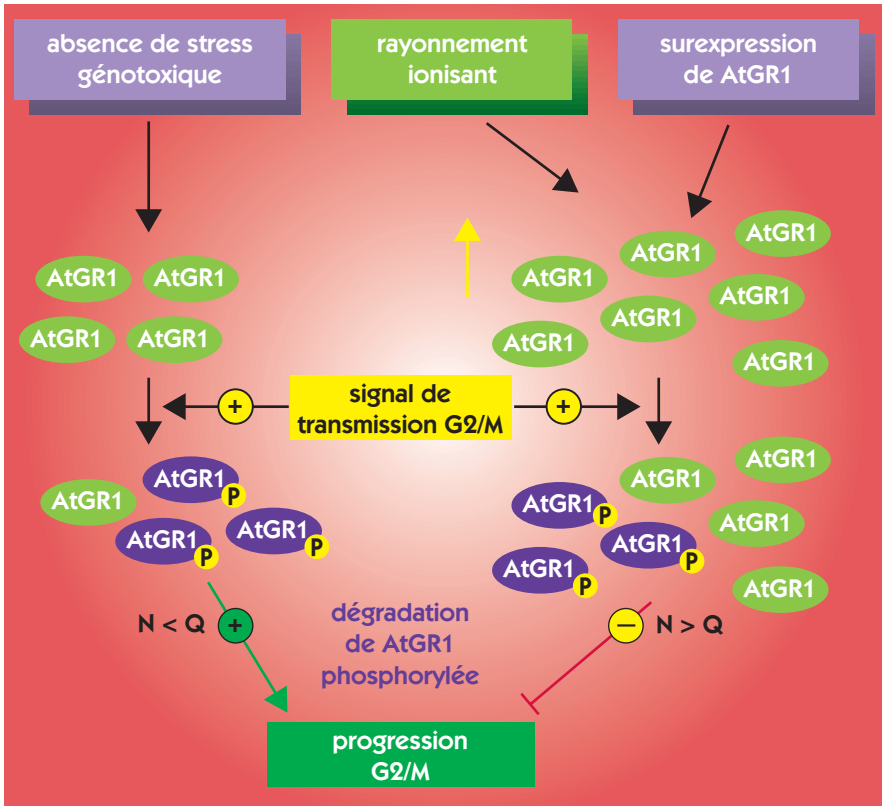
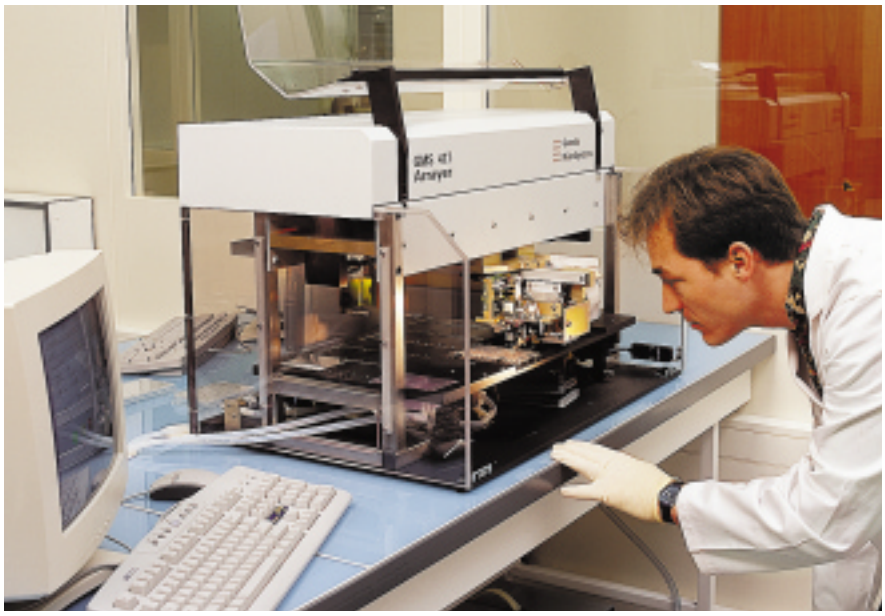


Figure 4. Modèle d'action de la protéine AtGR1. En l'absence de stress génotoxique, la quantité N de la protéine non dégradée (AtGR1) chute en dessous d'un seuil critique Q égal à la quantité de protéine dégradée par phosphorylation ($AtGR1_P$) et la cellule peut progresser de la phase G2 du cycle cellulaire 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 indépendantes 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.

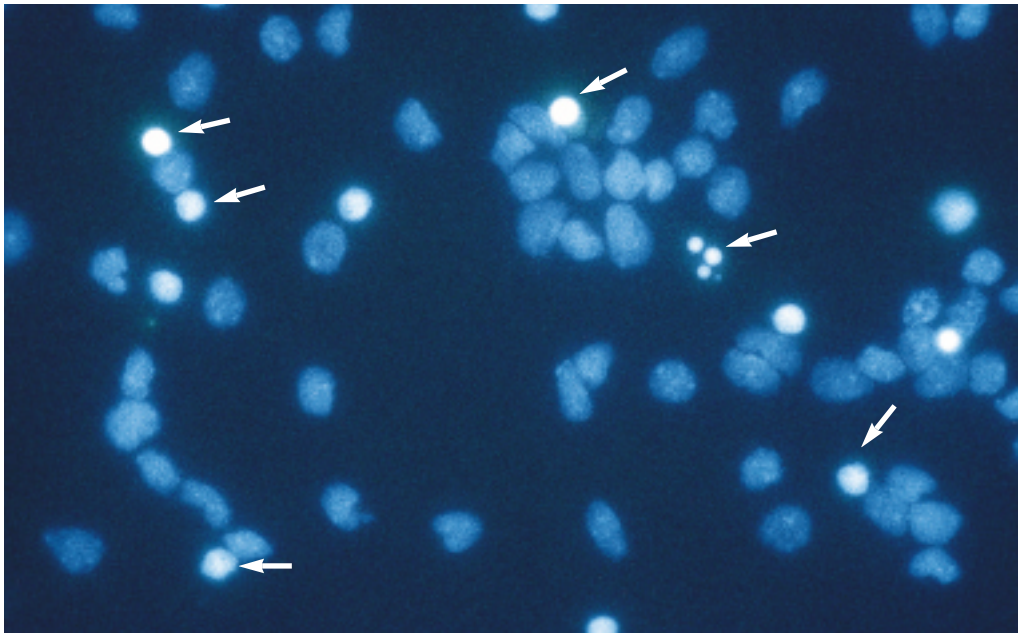
(1) Pointes de racines, méristème apical (petite partie centrale de la rosette qui contient des cellules embryonnaires dont dérivent les feuilles, la hampe et les boutons floraux), primordia foliaires et inflorescences.
(2) Divers outils permettent de caractériser le niveau d'expression des gènes, en 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.

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

LE SUICIDE CELLULAIRE

Dans le combat de la cellule contre les lésions infligées à son ADN par des agents génotoxiques, et par des rayonnements ionisants notamment, la protéine p53 joue un rôle pivot. Elle intervient dans le contrôle de la prolifération et de la spécialisation cellulaire (différenciation) mais aussi dans le maintien de l'intégrité du génome. Elle peut orienter les cellules endommagées vers le suicide, ou apoptose, pour éviter le risque d'apparition de tumeurs qui seraient fatales à tout l'organisme. C'est par le dérèglement des programmes de suicide cellulaire que les cellules tumorales vont se développer. La connaissance approfondie des mécanismes de l'apoptose, pour les déclencher éventuellement à la demande, suscite de grands espoirs dans la thérapie du cancer.

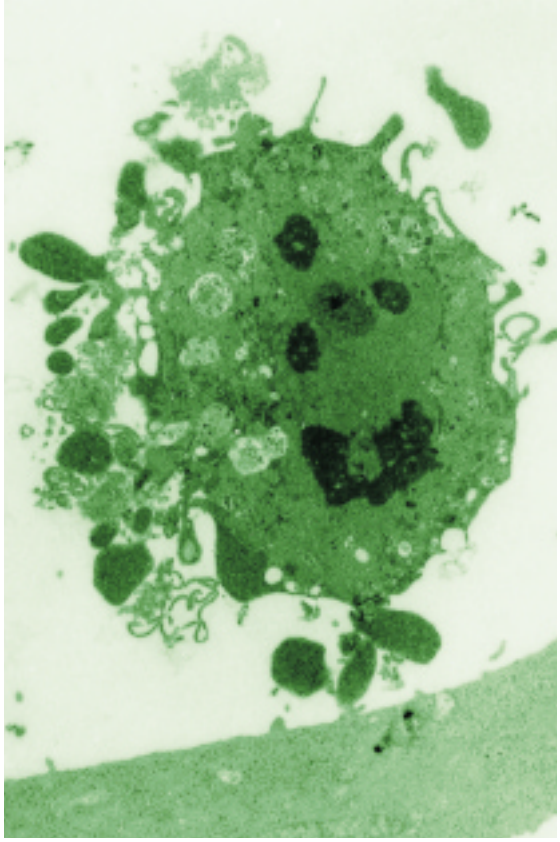


CEA

L'apoptose, mécanisme de mort cellulaire programmée, intervient fréquemment de façon naturelle ou peut être induite par l'action d'agents génotoxiques. Par exemple, lorsqu'un reptile mue, une nouvelle peau remplace l'ancienne dont les cellules sont mortes par apoptose. Ici, des noyaux de cellules du cortex cérébral de rat en culture après une irradiation de 1 Gy. Plusieurs cellules, repérées par des flèches, subissent l'apoptose.

Deux types de mort cellulaire

Chez l'adulte, la grande majorité des **cellules** sont à l'état **quiescent** mais quelques unes meurent alors qu'un nombre équivalent se divisent (encadré E, ***Le cycle cellulaire : duplication sous contrôle***). C'est ce qui est observé par exemple dans des organes comme le foie ou le rein. Cependant, d'autres organes tels que la moelle osseuse, l'intestin grêle, le testicule ou la peau ont un renouvellement très élevé. Enfin, dans le cerveau, les neurones ne se divisent pas, ou très peu, et certains d'entre eux meurent progressivement tout au long de la vie de l'individu. Dans tous les cas, ces morts cellulaires sont isolées dans l'organe et donnent lieu à une phagocytose discrète. Les cellules mortes sont capturées, ingérées, digérées par des cellules voisines ou des cellules spécialisées, les **macrophages**, sans provoquer de réaction inflammatoire. Ce type de mort est activement mis en action par la cellule elle-même. C'est pourquoi le terme de *mort cellulaire programmée* ou **apoptose** est utilisé. La mue des insectes, des batraciens et des reptiles relève de ce mécanisme. Avant ce concept de mort cellulaire, le terme de **nécrose** était employé dans tous les cas. Aujourd'hui, ce terme est réservé à la mort cellulaire par foyer à la suite d'une modification de l'homéostasie(1) de la cellule, modification qui peut résulter d'une ischémie(2), d'une hyperthermie, d'une agression par une substance chimique ou un choc physique. Les deux types de mort cellulaire, apoptose et nécrose, diffèrent par leur répartition dans le tissu et par les changements de la structure et de la morphologie cellulaire (encadré D, ***La cellule, le maillon essentiel***). Au cours de l'apoptose, la cellule se contracte mais les **organites** (**mitochondries**, **appareil de Golgi** et **réticulum endoplasmique**) gardent leur aspect normal. Dans le **noyau**, la **chromatine** se condense puis se fragmente en **nucléosomes**. Enfin, la **membrane cytoplasmique** se rompt pour former des corps apoptotiques renfermant du **cytoplasme** avec des organites. Lors de la nécrose, la cellule et les organites gonflent puis éclatent en provoquant une réaction inflammatoire qui génère un foyer nécrotique.



CNRS

Vue au microscope électronique d'une cellule cancéreuse humaine de l'épithélium, dans laquelle a été introduite une molécule d'ADN conduisant à l'expression de la protéine p53, en phase terminale d'apoptose. La rupture de la membrane cytoplasmique a entraîné la formation de corps contenant du cytoplasme et des organites.

L'apoptose est un processus qui joue un rôle primordial au cours de l'embryogenèse. Elle permet le modelage du nouvel être en éliminant des tissus ancestraux (la palmure des doigts, par exemple) ou l'établissement de la fonction du système nerveux et du système immunitaire. L'apoptose intervient aussi après l'action d'un **génotoxique** ou au cours d'une maladie. Dans le cas du cancer, il semble que l'apoptose soit réduite ou neutralisée pour autoriser la survie et laisser libre cours au développement des cellules cancéreuses.

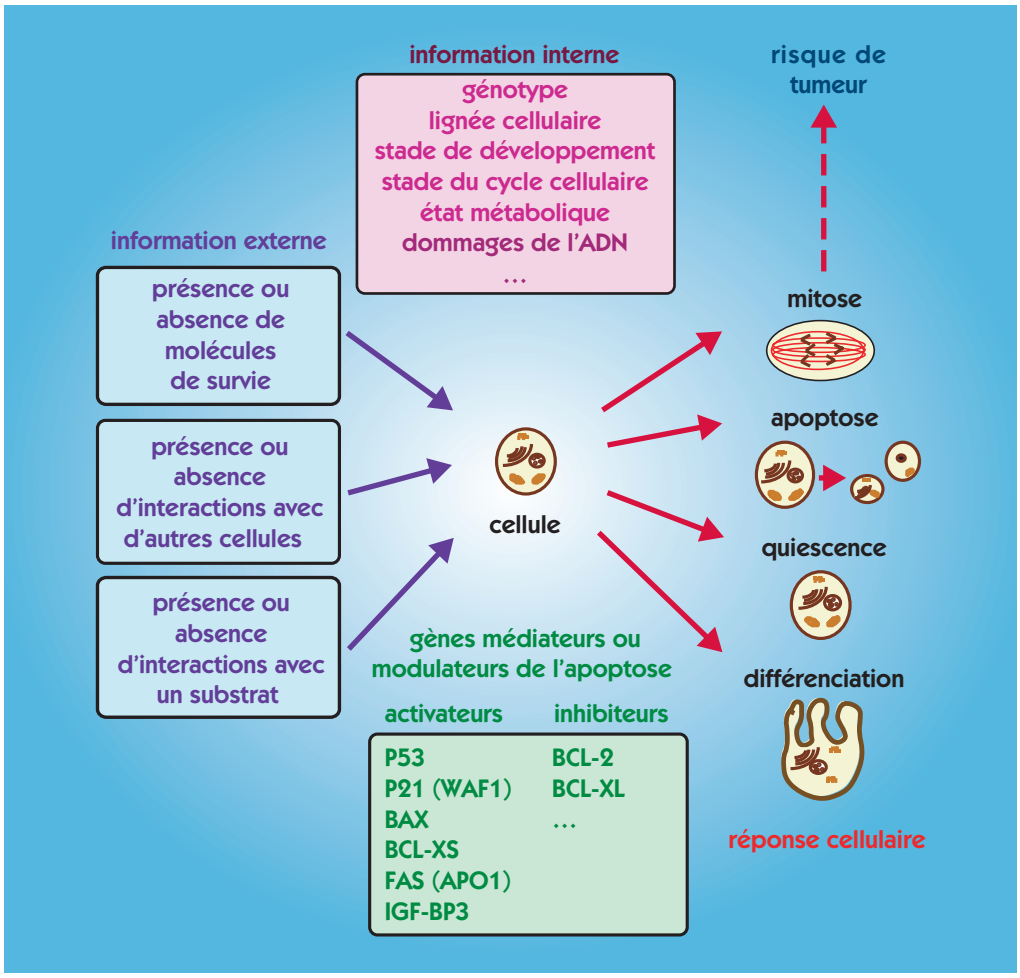
Le rôle central de la protéine p53

L'**ADN** est la cible privilégiée de l'action des **rayonnements ionisants** qui induisent des cassures simple ou double **brin**. Cependant, les rayons ultraviolets et diverses substances chimiques, parmi lesquelles des molécules s'intercalant dans la molécule d'ADN, créent également des lésions de l'ADN. L'ensemble de ces dommages seraient reconnus directement par la partie C-terminale(3) de la **protéine** p53 ou indirectement par la protéine ATM (voir articles précédents). Cela provoque une activation de la protéine p53, produit du **gène suppresseur de tumeur** P53, qui active à son tour l'**expression** de plusieurs **gènes** dont P21 (WAF1-Cip-1), GADD45, BAX, MDM2…

La protéine p21 se complexe à des **cyclines** et à leurs **kinases** associées pour bloquer le cycle cellulaire à la transition G1/S (voir *Les gènes radio-induits*). Cet arrêt du cycle cellulaire permettrait à la cellule de réparer ses lésions avant d'entrer dans la phase de duplication de l'ADN (phase S). Si la réparation est impossible, incomplète ou infidèle, la protéine p53 orienterait alors la cellule vers l'apoptose en activant GADD45,

(1) Mécanisme visant chez les organismes vivants à maintenir ou à rétablir différentes constantes physiologiques quelles que soient les variations de l'environnement.
(2) Insuffisance de la circulation sanguine dans un organe ou un tissu.
(3) Les protéines, longs polymères d'**acides aminés** associés par des **liaisons peptidiques**, possèdent une extrémité **aminée** ou N-terminale ($-NH_3^+$) et une extrémité **carboxylique** ou C-terminale ($-COO^-$).

Figure 1. Les différentes réponses de la cellule en fonction de ses informations d'origines externe et interne.



FAS, IGF-BP3 (*Insulin Growth Factor Binding Protein*) et le **proto-oncogène** BAX.

La quantité de p53 présente dans la cellule est contrôlée par la protéine elle-même qui active l'expression du gène MDM2. En effet, la formation dans le noyau d'un complexe entre les protéines p53 et mdm2 entraîne le transport et la dégradation spécifique de p53 dans le cytoplasme. Ce mécanisme permet le redémarrage du cycle cellulaire après réparation.

Le choix d'une cellule de ne plus se diviser (arrêt en G1) ou de se diriger vers l'apoptose est guidé par de nombreux facteurs, les contacts intercellulaires notamment, et la présence ou l'absence de molécules de survie[4] regroupant certains **métabolites**, des facteurs de croissance, des substances du système immunitaire (interleukines) et des **hormones**. La nature de la réponse dépend étroitement du type cellulaire. Sur des cellules en culture, une même **dose** d'irradiation va seulement bloquer le cycle cellulaire des **fibroblastes**, cellules du tissu conjonctif, mais induire l'apoptose des thymocytes, cellules constitutives du thymus[5]. Chacun des facteurs qui régulent l'arrêt du cycle ou l'apoptose sont susceptibles de se combiner entre eux, donnant ainsi lieu à tout un éventail de possibilités qui détermineront le devenir de la cellule (figure 1).

Un suicide "organisé"

Après une irradiation, les cellules de la couche granulaire externe du cervelet du jeune rat meurent en grande quantité dans les 6 à 9 heures. L'injection d'actinomycine D (inhibiteur de synthèse d'**ARN**) ou de cycloheximide (inhibiteur de synthèse des protéines) empêche temporairement cette vague d'apoptose. L'activation de certains gènes de la cellule est donc nécessaire pour le développement apoptotique. C'est en étudiant les **mutations** chez un petit ver parasite, le *Cænorhabditis elegans*, que des gènes pro-apoptotiques CED-3 et CED-4 et un gène anti-apoptotique CED-9 ont été mis en évidence. Chez les mammifères, les gènes équivalents sont respectivement ICE, APAF-1 et BCL-2. La protéine ICE (*Interleukine 1 Converting Enzyme*) fait partie de la famille des caspases[6] qui s'activent les unes les autres en cascade puis activent finalement une endonucléase[7] et de nombreuses autres **enzymes** chargées de modifier le **cytosquelette** et les protéines de la surface membranaire, permettant ainsi la phagocytose. L'apaf-1 est une molécule régulatrice de l'activité des caspases. La famille de bcl-2 est composée de deux sous-familles. L'une comprenant bcl-2 et bcl-xl favo-

(4) Molécules déclenchant des réactions intracellulaires favorisant la survie.
(5) Organe lymphoïde situé devant la trachée, particulièrement développé chez l'enfant et le jeune animal, et qui joue un rôle dans l'immunité.
(6) Enzymes contenant une molécule de Cystéine et une activité ASPartate protéASE.
(7) Enzyme dégradant l'ADN, sauf au niveau de ses extrémités.

rise la survie, l'autre incluant bax, bak, bad, bcl-xs favorise la mort cellulaire.

La présence ou l'absence de **facteurs de survie** provenant de l'environnement cellulaire mais également l'état du **génome**, qui conditionne le rôle de la protéine p53, vont encourager ou freiner le processus apoptotique. Le mécanisme d'action de la protéine bax est de se lier à la protéine de survie bcl-2. Elles forment alors des dimères et se neutralisent. Une augmentation de l'une ou de l'autre de ces protéines conduit à la constitution de dimères bcl-2-bcl-2 ou bax-bax, avantageant la survie ou la mort cellulaire. La surexpression de bcl-2 neutralise le complexe apaf-1-caspase et bloque l'apoptose. Par contre, un excès de bax favorise une perméabilisation de la **membrane mitochondriale** ainsi que la création d'un complexe cytochrome C-apaf-1-caspase, déclenchant le programme d'exécution de l'apoptose (figure 2).

Apoptoses naturelle et radio-induite

L'apoptose naturelle est très importante chez l'embryon et le fœtus à des périodes bien précises. Elle intervient par exemple pour éliminer les neurones n'ayant pas atteint leur cible, qui sécrètent des facteurs de survie, et ainsi affiner les connexions inter-neuronales. Ces phases d'apoptose naturelle concordent-elles avec des phases de radiosensibilité ? Chez le rat, l'apoptose naturelle des neurones est abondante dans les jours qui suivent la naissance tandis que la phase de grande sensibilité de ces cellules à l'apoptose radio-induite se situe aux deux tiers de la gestation. La période d'apoptose naturelle correspond à la phase de synaptogenèse (pendant laquelle se forment les synapses, qui sont les connexions entre les neurones) alors que celle d'apoptose radio-induite se rapporte à la phase multiplicative des neuroblastes (neurones immatures). Chez l'adulte, les neurones ne se divisent pas (sauf un petit nombre d'entre eux) et sont peu sensibles à l'irradiation. Il existe donc des fenêtres de radiosensibilité au cours du développement embryonnaire et fœtal qui sont caractéristiques de chaque tissu. L'apoptose naturelle est indépendante de P53 car elle intervient normalement chez les souris dont le gène est invalidé, c'est-à-dire des souris qui n'expriment pas la protéine p53. Par contre, les cellules irradiées en phase multiplicative subissent l'arrêt du cycle en G1 et l'apoptose sous la dépendance de p53.

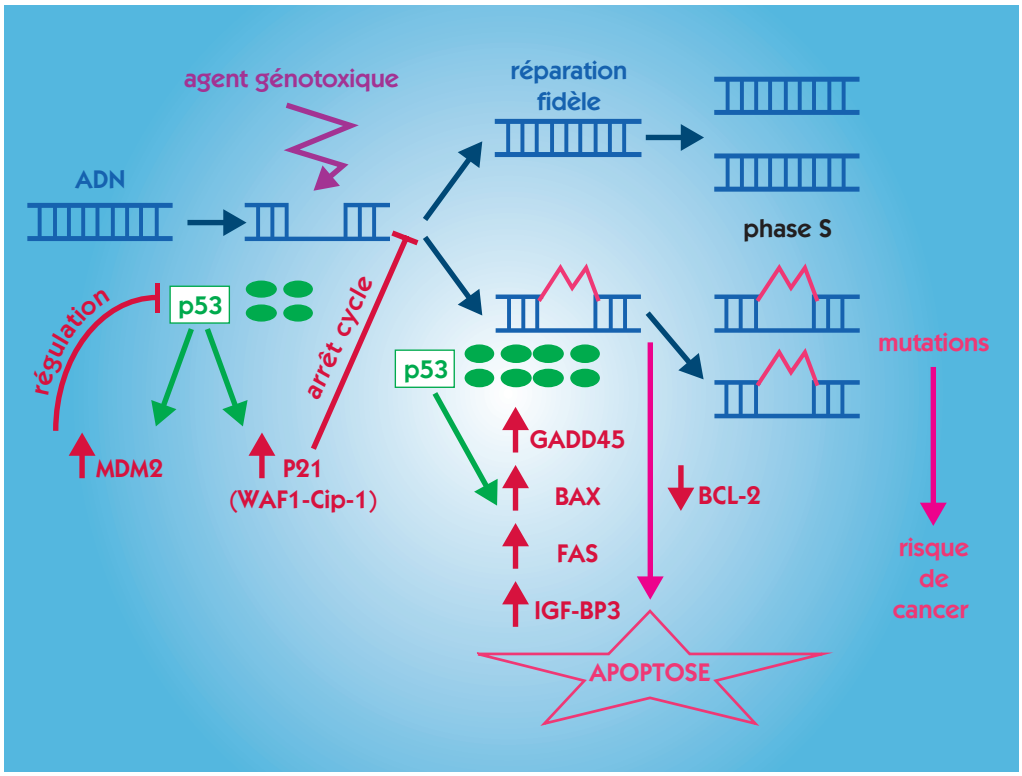
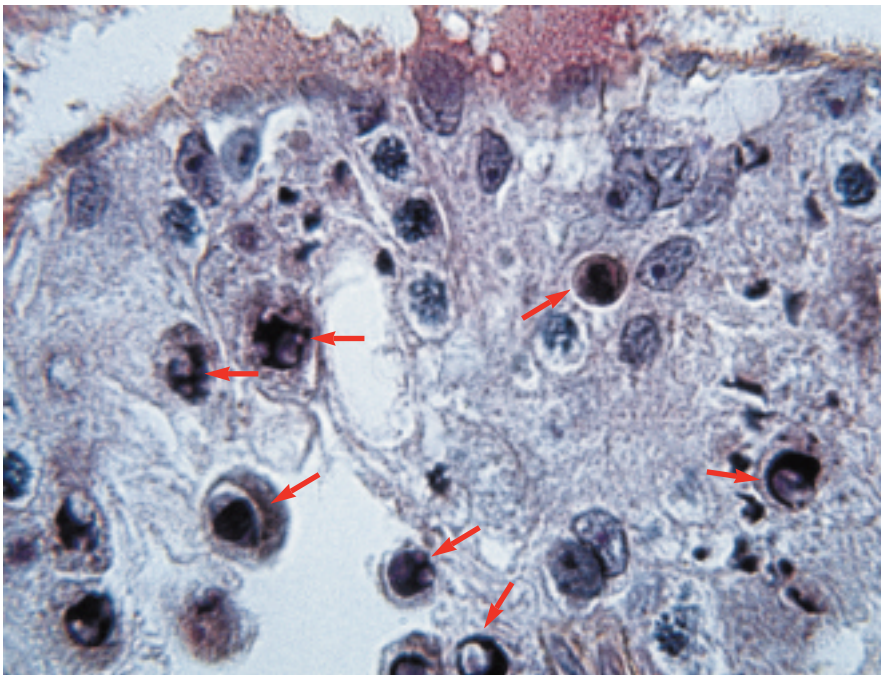


Figure 2. Les mécanismes de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose induits par la protéine p53.



CEA

Cellules testiculaires de rat adulte après une irradiation à l'âge fœtal. De nombreuses cellules en apoptose parmi les spermatocytes sont repérées par des flèches.

Au niveau de l'intestin de l'adulte, l'irradiation tue beaucoup de cellules de l'intestin grêle mais peu du côlon. Ceci s'explique par le fait que l'absence de la protéine bcl-2 dans l'intestin grêle favorise l'apoptose alors que son expression normale dans le côlon la freine. Les autres principaux tissus à renouvellement rapide de l'adulte subissent une apoptose radio-induite qui impliquerait la protéine p53. De même, la chimiothérapie provoque une apoptose généralisée dans ces tissus mais, heureusement, surtout dans les **tumeurs**.

La protéine p53 n'intervient pas seulement dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Elle est fortement exprimée durant la **prophase méiotique** des spermatocytes, cellules **germinales** mâles, au cours de laquelle se forment les spermatides, cellules **haploïdes** ne possédant que la moitié du nombre des **chromosomes** propre à l'espèce, suggérant ainsi un rôle dans la recombinaison et les changements de structure de la chromatine.

Des espoirs dans la thérapie du cancer

Dans une tumeur, l'augmentation du nombre de cellules cancéreuses est le résultat d'une prolifération incontrôlée avec surexpression de proto-oncogènes particuliers mais aussi d'un taux d'apoptose limité ou nul. Ainsi, la surexpression de l'anti-apoptotique bcl-2, dans certaines tumeurs, permet la survie des cellules cancéreuses. Après exposition à un génotoxique, la majorité des cellules contenant des lésions non ou mal réparées sont éliminées par apoptose sous le contrôle de la protéine p53. La mutation du gène P53, qui favorise la survie de cellules porteuses d'anomalies, est une étape importante de la progression tumorale.

Le rôle primordial de la protéine p53 dans le développement tumoral est mis en évidence par le fait que des souris ayant les deux **allèles** du gène P53 inactivés meurent rapidement de diverses tumeurs dans les six premiers mois de leur existence. Ainsi, la réduction ou l'inhibition du suicide cellulaire apparaît-elle comme une étape clé de la cancérisation. C'est pourquoi la recherche de traitements favorisant l'apoptose radio- ou chimio-induite des cellules tumorales est un domaine en pleine effervescence.

Évelyne May et **Hervé Coffigny**
Département de radiobiologie
et de radiopathologie
Unité mixte de recherche CEA-CNRS
(UMR 217)
Direction des sciences du vivant
CEA/Fontenay-aux-Roses

Effets des rayonnements ionisants

LES CONSÉQUENCES MESURABLES AU NIVEAU CELLULAIRE

L'exposition d'un organisme aux rayonnements ionisants a des conséquences mesurables au niveau de l'ADN, mais aussi d'autres structures de la cellule. Après la mise en évidence d'indicateurs de la dose reçue basés sur l'observation des chromosomes atteints, l'évolution des techniques de biologie moléculaire et de leur sensibilité ont permis de développer des indicateurs biologiques d'effet cellulaire. Sans avoir la spécificité des précédents, ceux-ci conduiront à mieux comprendre les effets radio-induits pour aboutir à des facteurs diagnostiques et pronostiques de l'irradiation.

Vue de l'appareillage d'une chromatographie liquide haute pression (HPLC). Ce système d'analyse est utilisé pour séparer des macromolécules organiques complexes (lipides, protéines) qui constituent, par exemple, les membranes cellulaires. Une HPLC peut fournir une indication aidant à mieux comprendre les modifications des propriétés physiques de la membrane cytoplasmique dues aux rayonnements ionisants.

C. Cieutat/IPSN

La nécessité d'indicateurs biologiques d'effet cellulaire

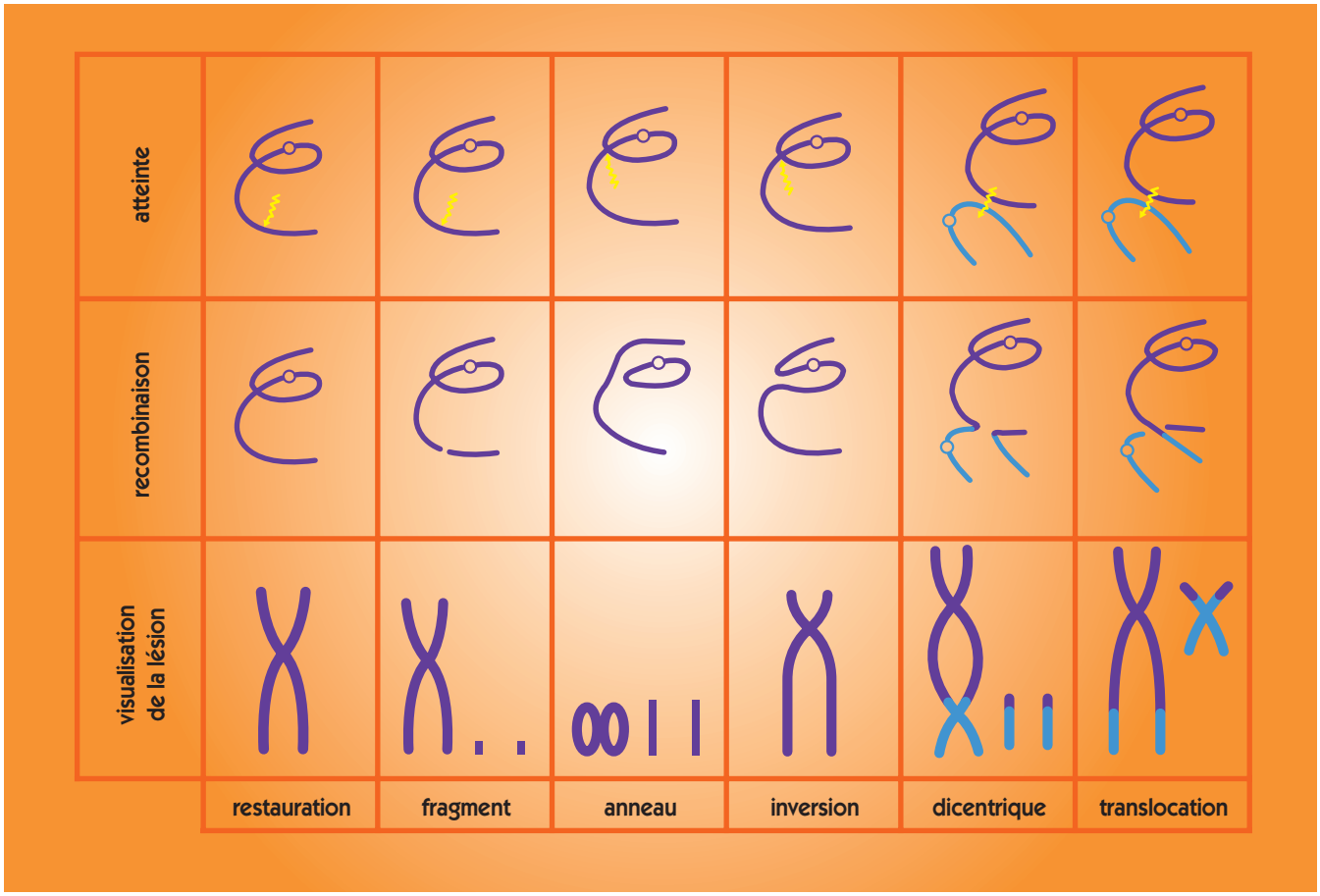
L'exposition des **cellules** aux **rayonnements ionisants** peut avoir des conséquences dommageables au niveau de l'**ADN** et des autres structures cellulaires (encadré D, ***La cellule, le maillon essentiel***), des conséquences susceptibles de se répercuter non seulement sur le comportement des cellules voisines mais sur le tissu tout entier, affectant le fonctionnement de l'organisme à plus ou moins long terme. La probabilité des dommages et la rapidité de leurs **effets** dépendent de nombreux facteurs, parmi lesquels la **dose** reçue, le type de rayonnement, le **débit de dose**, la nature et le volume des tissus exposés.

Il est apparu très tôt nécessaire de trouver des paramètres biologiques capables d'évaluer, sinon de quantifier, les atteintes des différentes composantes de l'organisme. L'intérêt de ces paramètres diffère substantiellement en fonction des besoins : risques de dommages génétiques causés par les rayonnements naturels, estimation de la dose reçue en cas de surexposition accidentelle, effets sur les tissus sains et les **tumeurs** lors de thérapies…

Ces indicateurs sont tenus de posséder certaines qualités intrinsèques : **spécificité**, **facilité** d'obtention et de dosage, **reproductibilité**, **sensibilité** et **stabilité** dans le temps, **effet mémoire** pour la reconstruction *a posteriori* de l'exposition. En outre, la mise en évidence d'une relation entre la dose et l'effet permet de différencier *indicateurs* et *dosimètres* biologiques.

Aucun bio-indicateur actuel ne répond à tous ces critères. Les plus largement développés sont des bio-marqueurs **cytogénétiques** de dose. Les effets des rayonnements ionisants sur l'ADN et leurs conséquences sur la survie cellulaire sont effectivement connus depuis longtemps. L'éventail des dommages **chromosomiques** observés a donné les moyens d'établir différents tests allant jusqu'à la reconstitution *a posteriori* de l'exposition et l'estimation de l'hétérogénéité de la dose. Les dommages physiques provoqués par l'ionisation étant censés se distribuer équitablement dans toutes les structures cellulaires, les effets biologiques correspondants devaient être

Figure 1. Nature et formation des aberrations chromosomiques radio-induites. Selon la position et le nombre de lésions de l'ADN et en fonction de la qualité de la réparation ou de la recombinaison du chromosome sur lui-même ou avec un autre, soit des chromosomes normaux, soit différents types d'aberrations chromosomiques seront observés.



mesurables ailleurs que sur l'ADN. L'amélioration récente des connaissances, notamment dans le domaine moléculaire, a permis d'identifier des bio-marqueurs de ces effets au niveau de la **membrane cytoplasmique**, des **mitochondries** ou même dans leurs conséquences sur la mort cellulaire (**apoptose**) radio-induite.

Les conséquences mesurables sur l'ADN

Le large spectre des dommages de l'ADN dus aux rayonnements ionisants est la conséquence finale de phénomènes décrits précédemment. Malgré des processus de correction extrêmement efficaces, un nombre réduit d'erreurs peut subsister : les plus importantes s'observent lors de la **métaphase** (encadré E, ***Le cycle cellulaire : duplication sous contrôle***). Ces aberrations chromosomiques (figure 1) résultent d'une cassure non réparée (fragment, **délétion**), d'une réparation incomplète du chromosome sur lui-même (**inversion**, anneau centrique) ou d'un échange de matériel entre au moins deux chromosomes (**translocation**, **dicentrique**).

Avec leurs formes atypiques, les dicentriques et les anneaux centriques sont facilement observables au microscope après coloration simple de l'ADN. Ces aberrations chromosomiques favorisent l'élimination de la cellule concernée. Elles sont dites *instables*. Par opposition, les inversions et les translocations, dont la forme ne diffère pas *a priori* de celle d'un chromosome normal, sont capables de "passer" la division cellulaire et sont dites *stables*. Leur visualisation nécessite une coloration spécifique. Les fragments, résultant aussi de **mutagènes** chimiques, ne sont pas caractéristiques des rayonnements ionisants. Ils sont susceptibles d'être éliminés directement sous forme de micronoyaux intra-cytoplasmiques, dont la fréquence constitue un précieux indicateur d'effet mutagène. Enfin, un artifice expérimental permet d'observer l'apparition des aberrations chromosomiques radio-induites dans les heures voire les jours qui suivent l'irradiation, sans culture cellulaire préalable. Plus qu'un moyen de mesure des effets, l'observation de ces chromosomes prématurément condensés (PCC) reste une méthode sophistiquée de compréhension des mécanismes de réparation.

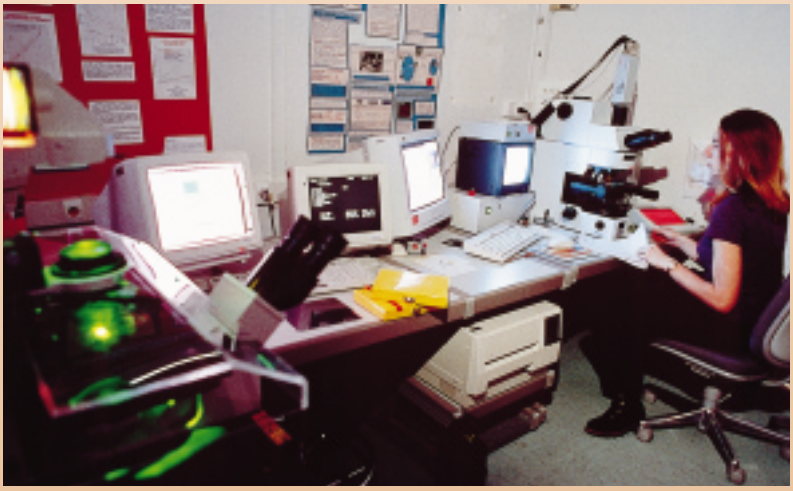
Seuls certains aspects de ces techniques développées au Laboratoire de dosimétrie biologique multiparamétrique de l'Institut de protection et de sûreté nucléaire (LDBM/IPSN) seront ici abordés (encadré).

Le dicentrique, indicateur spécifique de l'irradiation cellulaire

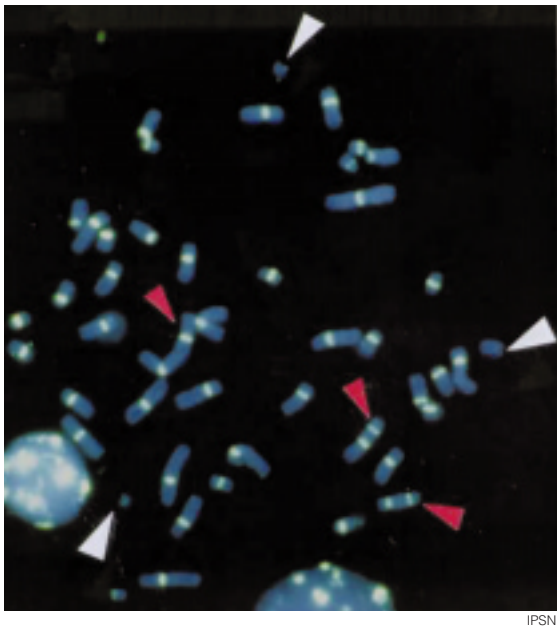
Lors d'une irradiation accidentelle, la dose reçue est évaluée par le dénombrement des anomalies chromosomiques instables dans les **lymphocytes**, à partir d'un simple prélèvement de sang. Une

Un système d'analyse d'images performant

Que ce soit pour l'établissement de courbes de référence par des expérimentations *in vitro* ou l'estimation de doses en cas d'irradiation accidentelle ou pour la recherche, l'observation des dicentriques ou des translocations s'effectue sur des centaines de cellules. Pour s'aider dans cette tâche fastidieuse, le LDBM se sert d'un système d'analyse d'images, adapté à la dosimétrie biologique en collaboration avec la société française qui l'a développé. Dans une station de travail type, les lames à observer sont placées sur une platine motorisée qui permet de trouver (ou retrouver) les lymphocytes en état de métaphase, à l'aide d'une caméra à mise au point automatique. Le positionnement des chromosomes en métaphase est assuré par un contrôleur raccordé à un ordinateur. Des tests de validation ont montré que l'automate trouvait au moins 80 % des stades de métaphase utilisables pour la cytogénétique conventionnelle ou la fluorescence. Une assistance logicielle aide au dénombrement, semi-automatique, des aberrations chromosomiques. Le gain en vitesse apporté par le système est de 2 à 4 par rapport au dénombrement manuel, compte tenu de la qualité des préparations et de la dose d'irradiation.



C. Cieutat/IPSN



IPSN

Microphotographie du noyau d'un lymphocyte fortement irradié, mis en culture dans un milieu approprié et bloqué au stade de la métaphase (grossissement x 1 000). Des aberrations chromosomiques, dicentriques (flèches roses) et fragments (flèches blanches), sont observées.

courbe dose-effet (figure 2) fait correspondre à la fréquence d'aberration enregistrée une dose d'irradiation à la moelle osseuse. Ces courbes sont établies par l'irradiation ***in vitro*** de prélèvements sanguins et diffèrent selon le type de rayonnement. Le débit de dose importe aussi, notamment pour les rayonnements de faible énergie (gamma, X). La précision de l'estimation est fonction du nombre de métaphases observées. Trente ans de recherches ont montré qu'en dehors de quelques produits chimiques tels que la bléomycine (un antibiotique), les rayonnements ionisants étaient seuls responsables de l'apparition des dicentriques. Leur fréquence de formation spontanée dans la population française est de l'ordre de 1 pour 1 500 cellules et ne varie pas significativement avec l'âge, le sexe et le tabagisme.

Après une irradiation globale *homogène*, la fréquence des anomalies chromosomiques dans les lymphocytes sanguins se maintient sans grand changement pendant plusieurs mois. En revanche, suite à une irradiation *hétérogène*, lymphocytes irradiés et non irradiés se mélangent rapidement. D'où une sous-estimation des dommages locaux radio-induits par l'effet de la dilution, partiellement corrigible par des modèles mathématiques basés sur la cinétique de disparition des aberrations avec le temps.

Les cas de suspicion d'exposition aux rayonnements auxquels cette méthode est appliquée restent rares, en France comme ailleurs : moins de 200 cas ont été analysés par l'IPSN ces huit dernières années, que ce soit chez les travailleurs, directement ou indirectement exposés dans l'industrie, la recherche et la santé, ou dans le public. Pour la majorité des cas, cette expertise a permis de rassurer les sujets sur l'absence d'irradiation significative.

La translocation, indicateur spécifique des irradiations anciennes ?

L'irradiation accidentelle doit parfois être évaluée après des années, en particulier chez les survivants d'Hiroshima et Nagasaki (Japon, 1945) et les "liquidateurs" de Tchernobyl (Ukraine, 1986). Une analyse des aberrations chromosomiques stables telles que les translocations n'était, jusqu'à présent, pratiquée qu'avec une technique de marquage lourde et difficile. Une méthode récente née de la biologie moléculaire et adaptée à la dosimétrie biologique, l'hybridation *in situ* fluorescente (*Fluorescent* In Situ *Hybridation*, FISH), a grandement simplifié leur détection et s'applique systématiquement aux irradiations anciennes. Elle permet de révéler des zones particulières sur les chromosomes ou de les marquer sélectivement dans leur totalité (*painting*). Les techniques FISH sont d'ailleurs utilisées en clinique pour déceler des anomalies héréditaires ou acquises. Elles visent à réaliser une association moléculaire

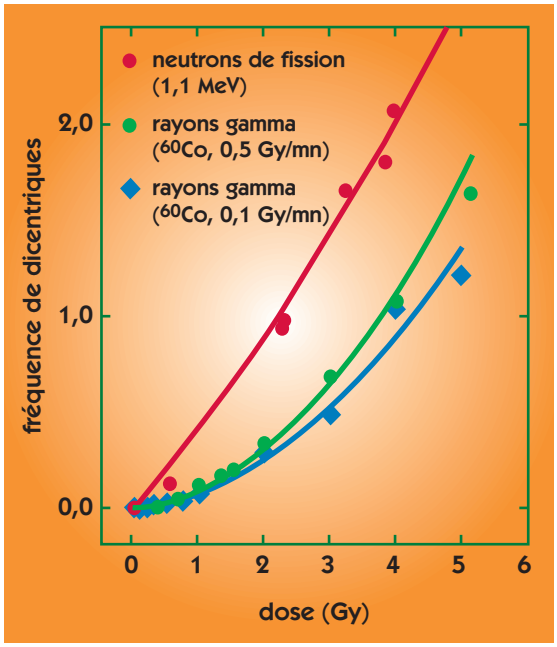


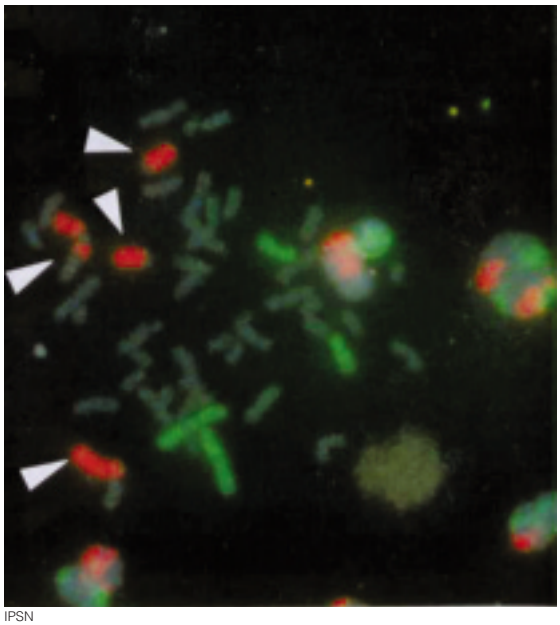
Figure 2. Relations dose-effet établies au LDBM en dénombrant les dicentriques induits dans les lymphocytes du sang périphérique, après irradiation in vitro *de sang normal par des rayonnements ionisants de divers types, à différents débits de dose. Pour une même dose d'irradiation, le nombre d'aberrations produit par les rayonnements de forte énergie (neutrons) est plus important que pour ceux de faible énergie (gamma, X). En outre, l'effet du débit de dose s'atténue considérablement lorsque le rayonnement est de forte énergie (neutrons, ions lourds).*

(hybridation) entre des **séquences** artificielles d'ADN simple **brin**, spécifiques des zones chromosomiques que l'expérimentateur désire mettre en évidence, et les chromosomes de métaphase étalés sur une lame de microscope. La visualisation du signal fluorescent se fait au niveau des zones hybridées. Compte tenu des marqueurs disponibles, seules deux ou trois des 23 paires de chromosomes humains sont généralement marquées.

Des courbes reliant la fréquence de translocations avec la dose d'irradiation ont été établies *in vitro* comme pour les dicentriques. Globalement, les résultats obtenus en fonction de la **qualité de rayonnement** et du débit de dose sont très proches. Quoique dans son principe l'évaluation des translocations ne soit pas récente, leur facilité de détection par FISH a soulevé de nouvelles questions. Quelle est leur spécificité par rapport aux rayonnements ionisants ? Le taux basal de translocation augmente-t-il avec l'âge et avec des facteurs tels l'alcoolisme ? Quelle est, surtout, la stabilité effective des translocations dans le temps ? L'IPSN réalise des études systématiques, notamment sur les accidents anciens, afin de connaître la réelle validité de cette approche.

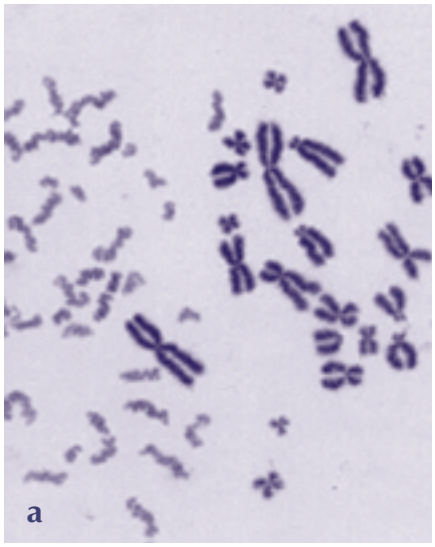
Les chromosomes prématurément condensés

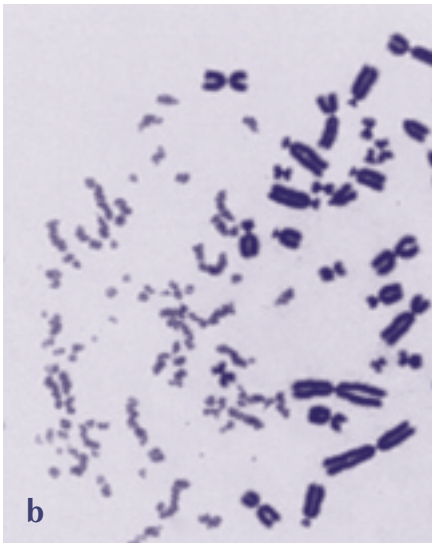
La technique des PCC repose sur la possibilité de visualiser les chromosomes sans culture préalable, par fusion cellulaire. À partir d'un prélèvement sanguin, des lymphocytes sont fusionnés avec des cellules en division d'une **lignée** d'ovaire de hamster chinois : les substances qu'elles libèrent induisent une dissolution de la membrane du **noyau** et une condensation prématurée des chromosomes lymphocytaires sous forme d'un simple brin individuel, la **duplication** de l'ADN n'ayant pas encore eu lieu. Les aberrations chromosomiques prennent la forme de fragments excédentaires, d'où un nombre d'objets supérieur aux 46 chromosomes d'une cellule humaine normale. Une relation linéaire est établie entre ce nombre et la dose d'irradiation. Contrairement à la cytogénétique conventionnelle qui n'autorise l'observation que des lymphocytes ayant atteint la métaphase, cette technique s'adresse à un échantillonnage aléatoire de cellules. Cette méthode, plus rapide que le dénombrement des dicentriques, permet en outre d'étudier la cinétique et le rendement de réparation de l'ADN, en choisissant précisément le laps de temps entre l'irradiation et la fusion cellulaire. Des courbes dose-effet réalisées pour le rayonnement gamma après différents temps de réparation montrent que, pour une même dose, le nombre de fragments excédentaires radio-induits diminue très rapidement durant les premières 24 heures, puis de plus en plus lentement durant les 48 heures suivantes. D'autres expériences ont mis en évidence que la variation de température de l'échantillon de sang entre le prélèvement et l'analyse



IPSN

Microphotographie en fluorescence d'une métaphase de lymphocyte irradié dans laquelle trois paires de chromosomes ont été colorées par des sondes d'ADN spécifiques, à l'aide de la technique FISH triple peinture. Les paires de chromosomes 2 et 12 sont en vert et la paire de chromosomes 4 en orange. Les autres chromosomes ont été rendus visibles par la fixation d'un colorant fluorescent non spécifique. Les flèches indiquent les portions de chromosome 4 qui ont été coupées sur les parties peintes et insérées sur un chromosome non peint (grossissement x 1 500).





IPSN

La fusion entre une cellule d'ovaire de hamster chinois entretenue en lignée et bloquée au stade de la métaphase (à droite de chaque microphotographie) et un lymphocyte au repos, un non irradié en a et un irradié (rayons gamma ^{60}Co, 4 Gy, 0,5 Gy/mn) en b, provoque la condensation prématurée des chromosomes sous forme de brins simples d'ADN (à gauche de chaque microphotographie). L'irradiation se traduit par des cassures de l'ADN conduisant à des fragments surnuméraires aux 46 brins d'ADN que comporte une cellule humaine normale.

n'a pas d'influence sur les résultats. La technique des PCC est appliquée aux irradiations accidentelles expertisées par l'IPSN, parallèlement à la cytogénétique conventionnelle, afin d'en connaître la faisabilité et les limites.

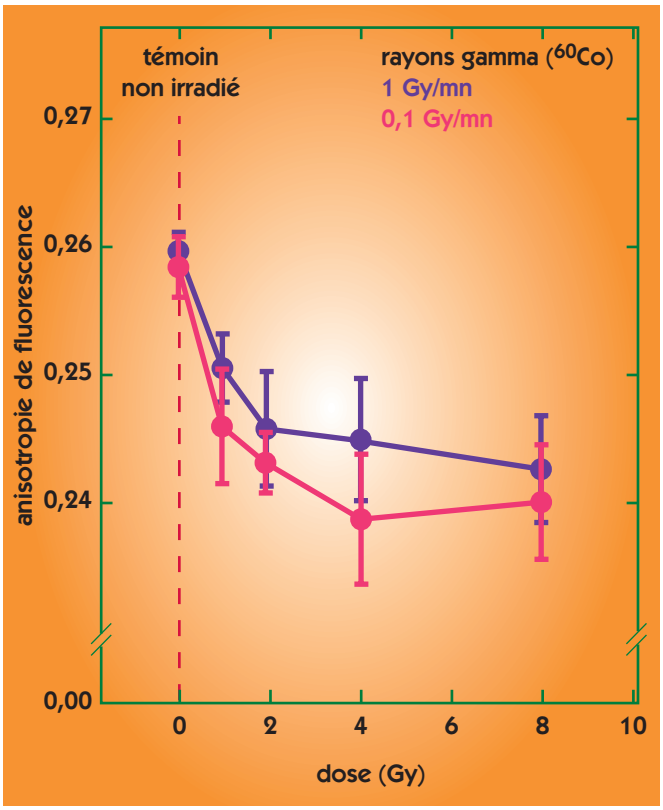
Les conséquences sur d'autres constituants

Des travaux récents ont confirmé le rôle essentiel de la membrane et d'autres constituants cellulaires dans l'apoptose radio-induite. La composition chimique de la membrane en fait une cible privilégiée des radicaux libres produits par l'énergie déposée, conduisant à des perturbations précoces, plus ou moins durables, de sa structure et de ses fonctions. Or, la membrane joue un rôle au niveau de l'interface sur le transfert des signaux vers le noyau et donc sur les fonctions cellulaires. Ses dommages radio-induits peuvent avoir des conséquences susceptibles d'aboutir au stade ultime de l'apoptose.

Dans cette cascade d'événements, trois mécanismes semblent appropriés pour devenir des indicateurs de l'effet cellulaire des rayonnements ionisants : les modifications des propriétés physiques de la membrane ; la libération, précédant l'apoptose, de certains composés dans le milieu extracellulaire, suite à la perte d'intégrité de la membrane, et l'apoptose elle-même.

La fluidité membranaire

Les molécules qui composent la membrane se déplacent, séparément ou en groupe, selon des mouvements latéraux, transversaux et de rotation. Cette fluidité est en fait étroitement contrôlée, les propriétés fonctionnelles de la cellule dépendant pour partie de la faculté de la membrane à rester thermodynamiquement stable. Pour apprécier les modifications biophysiques de la membrane, le LDBM a retenu une technique fondée sur l'incorporation spécifique de molécules fluorescentes, soit dans le compartiment lipidique, soit à l'interface lipide-**protéine**. Éclairées avec une lumière polarisée, ces sondes renvoient une lumière fluorescente, en fonction de leur capacité de mouvement, dans une direction plus ou moins différente de celle de la lumière incidente. La comparaison de l'intensité de la fluorescence de la lumière polarisée incidente avec celle de la lumière dépolarisée réémise traduit le mouvement des sondes et permet d'évaluer un para-



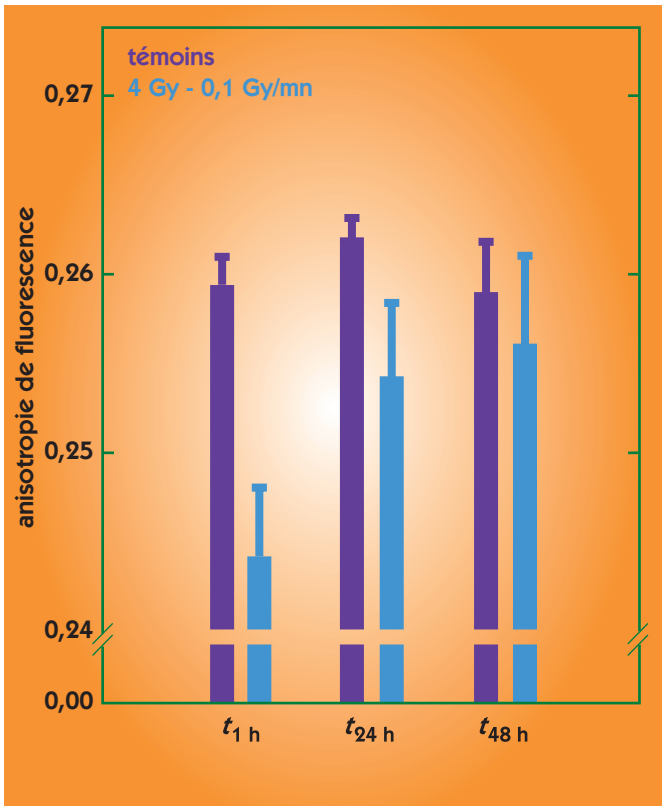
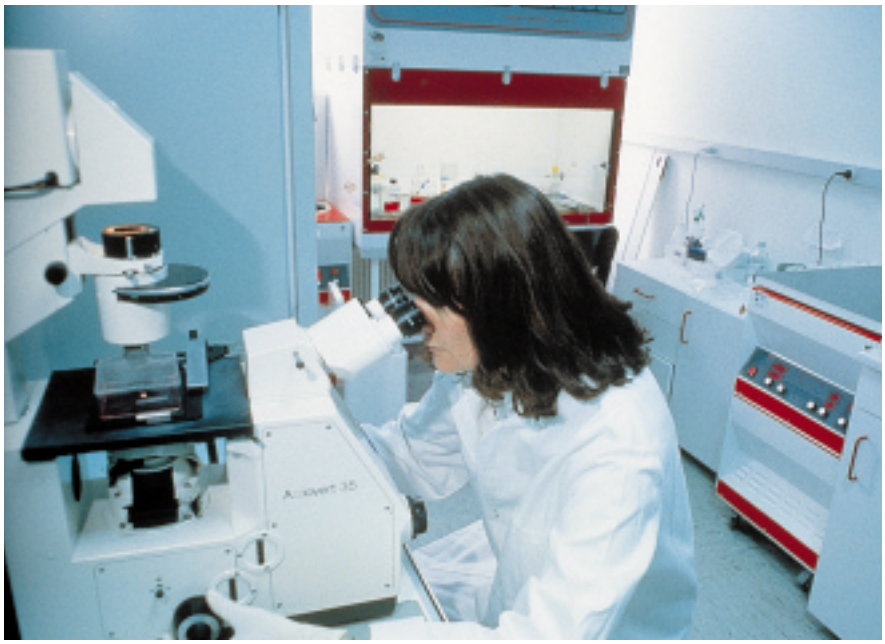


Figure 3. À gauche, évolution du paramètre caractérisant la fluidité de la membrane en fonction de la dose reçue par des lymphocytes sanguins pour divers débits de dose, après incorporation d'une sonde fluorescente dans la partie lipidique de la membrane. Les relations dose-effet montrent que la fluidité membranaire augmente avec la dose, puisque l'anisotropie de fluorescence diminue, traduisant une dégradation de l'environnement lipidique de la sonde. Cette dégradation apparaît d'autant plus importante que le débit de dose est plus faible. À droite, les altérations membranaires persistent jusqu'à 48 heures après l'irradiation.



C. Cieutat/IPSN

Observation d'une préparation à l'aide d'un microscope inversé. Dans ce cas, l'éclairage se fait par dessus la préparation, alors que les objectifs se trouvent au-dessous de la platine. Ce système est particulièrement adapté pour examiner les boîtes où sont réalisées les cultures de cellules.

mètre caractérisant la fluidité de la membrane : l'anisotropie de fluorescence.

Le laboratoire a d'ores et déjà démontré, sur des cellules vivantes, la possibilité d'apprécier des modifications biophysiques de la membrane après irradiation à des doses relativement faibles, de 0 à 8 Gy (figure 3). La fluidité membranaire varie proportionnellement à la dose reçue et inversement au débit de dose, quelle que soit la sonde. La membrane s'organise en micro-domaines réagissant différemment. Le compartiment lipidique de la membrane deviendrait plus fluide, cette fluidité variant en fonction de la profondeur considérée dans la membrane, alors que l'interface lipide-protéine deviendrait plus rigide. L'effet peut persister jusqu'à 48 heures après l'irradiation. Cette technique est applicable à plusieurs types cellulaires : lymphocytes, **hématies**, **fibroblastes** ou même cellules intestinales. Cependant, les expérimentations n'ont pour le moment porté que sur des modèles *in vitro* provenant de sang humain ou de cultures de cellules irradiées. Leurs résultats restent à confirmer sur divers modèles ***in vivo***.

L'apoptose radio-induite

Trois techniques ont été appliquées simultanément sur les mêmes échantillons biologiques pour estimer l'apoptose radio-induite à différents stades de l'évolution de la cellule vers sa mort programmée :

- le **marquage fluorescent à l'annexine V** permet d'apprécier le passage, par diffusion transversale, de la phosphatidylsérine, de la face interne de la membrane qu'elle occupe normalement à la face externe en situation d'apoptose ;
- le **marquage au DiOC$_6$**, molécule fluorescente pénétrant spécifiquement dans la mitochondrie et dont la variation d'intensité conduit à déterminer la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial se manifestant au cours de l'apoptose ;
- le **test du FADU** (***Fluorescence Analysis of DNA Unwinding***), méthode de spectrofluorimétrie, donne la possibilité d'évaluer la dégradation des propriétés de l'ADN directement liée au nombre de cassures de brins radio-induites.

Des études *in vitro* sur du sang humain irradié mis en culture ont montré, sur la population lymphocytaire, des relations dose-effet persistant au moins jusqu'à 7 jours après l'irradiation. Les deux premières techniques fournissent des résultats reproductibles et comparables. Une deuxième étude *in vivo*, portant sur des rats pour lesquels des prélèvements sanguins ont été effectués à différents moments après l'irradiation, a mis en évidence que la détection de l'apoptose radio-induite est possible jusqu'à 48 heures après en utilisant le marquage mitochondrial. Les deux autres méthodes ne sont applicables que dans les heures qui suivent l'irradiation.

La différence entre les résultats *in vitro* et *in vivo* s'explique à la lumière de la cascade d'événements à l'origine de l'apoptose. Les expériences indiquent que l'exposition de la phosphatidylsérine à l'extérieur de la membrane, signal d'élimination des cellules apoptotiques par les **macrophages**, se produit *in vivo* dans les 48 heures suivant l'irradiation. Par contre, l'élimination des cellules apoptotiques *in vitro* n'a pas lieu, en l'absence de macrophages dans la suspension cellulaire. C'est pourquoi le même phénomène est observé beaucoup plus longtemps.

À terme, l'ensemble de ces méthodes d'investigation doit permettre de dresser un tableau complet et multiparamétrique des effets des rayonnements ionisants sur la cellule et l'organisme. Une adaptation de certaines de ces techniques à des cellules autres que les cellules sanguines est envisagée pour répondre plus spécifiquement au problème de l'irradiation localisée.

Philippe Voisin
Département de protection de la santé
de l'homme et de dosimétrie
Institut de protection
et de sûreté nucléaire
Fontenay-aux-Roses

III. RÉPONSES TARDIVES

Le cancer : un reflet de l'échec des défenses

Chez l'homme, les cellules d'un organisme sain ne se divisent que sur ordre des cellules environnantes. Au contraire, les cellules cancéreuses, ignorant les signaux qui limiteraient leur prolifération, n'obéissent qu'à leur propre programme de duplication. Les cellules d'une tumeur proviennent toutes de la division anormale d'une cellule unique, à l'origine d'un clone tumoral. Le processus, qui s'étale sur des années ou des dizaines d'années, résulte d'une accumulation de mutations dans certains gènes de cette cellule.

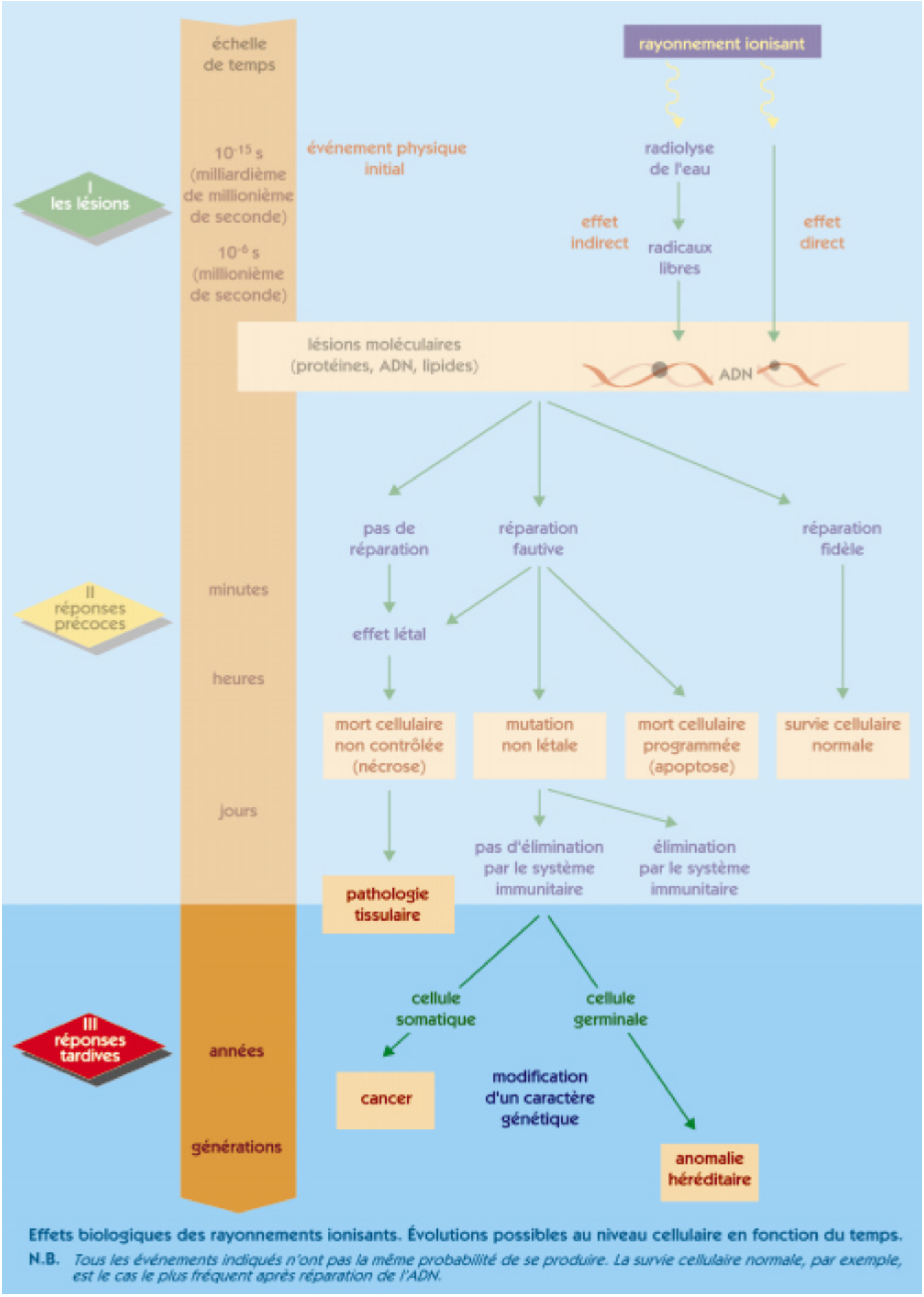
Deux classes de gènes, les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur, codent des protéines participant à la régulation du cycle cellulaire et jouent un rôle fondamental dans l'apparition du cancer. Les premiers stimulent la croissance cellulaire, les seconds la freinent. La perte, ou délétion, d'un fragment chromosomique porteur d'un gène suppresseur de tumeur, par cassure des deux brins de l'ADN sous l'action d'un rayonnement ionisant ou d'un autre agent mutagène, pourra conduire à rendre inopérant un mécanisme d'arrêt de la division cellulaire. Les gènes codant les systèmes de réparation interviennent également dans la cancérisation. L'introduction de mutations dans ces derniers entraîne une instabilité de l'ADN, puisque l'ensemble des cellules tumorales contiendra un ADN réparé de manière variable, donc différent d'une cellule à l'autre.

Les lésions de l'ADN, l'activation d'un oncogène ou l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur provoquent normalement le suicide de la cellule. Le clone tumoral provient donc d'une cellule pouvant échapper à cette mort programmée. Le deuxième mécanisme de défense des cellules contre la prolifération met en jeu le raccourcissement, à chaque duplication, de segments d'ADN localisés aux extrémités des chromosomes et qui enregistrent le nombre de divisions cellulaires. Lorsqu'ils deviennent trop courts, ces télomères ne protègent plus les extrémités chromosomiques, occasionnant de nombreuses fusions entre elles. Des chromosomes instables sont générés, créant un chaos génétique fatal à la cellule. La télomérase, enzyme qui remplace les segments de télomères éliminés à chaque division, est absente de la quasi-totalité des cellules saines mais présente dans presque toutes les cellules tumorales. L'immortalité peut ainsi être conférée à une cellule ayant subi des modifications du gène codant cette enzyme.

Toutes les cellules constitutives des organismes supérieurs contiennent deux jeux de chromosomes homologues et par conséquent deux exemplaires de chaque gène. Un cancer ne surviendra que si les deux copies d'un même gène, par exemple un suppresseur de tumeur, sont mutées. En conséquence, une tumeur se développe par étapes et apparaît après mutation de plusieurs gènes, ce qui explique le long délai existant généralement entre une mutation initiale et l'évolution clonale.

Les cellules sexuelles, quant à elles, ne sont dotées que d'un jeu de chromosomes afin que l'addition d'un ovule et d'un spermatozoïde conduise à un œuf en contenant deux jeux. Une mutation localisée dans le patrimoine génétique d'une cellule sexuelle pourra être transmise à la descendance et aux générations suivantes. Toutes les cellules du nouvel organisme posséderont alors la mutation puisque la croissance de l'individu se fait par divisions cellulaires successives avec copie de l'ADN à partir de l'œuf fécondé. Les personnes ayant hérité d'un gène muté d'un parent présentent alors une prédisposition au cancer, réduisant le temps d'apparition d'un clone tumoral.

Christine Jimonet
Institut national des sciences et techniques nucléaires
CEA/Saclay

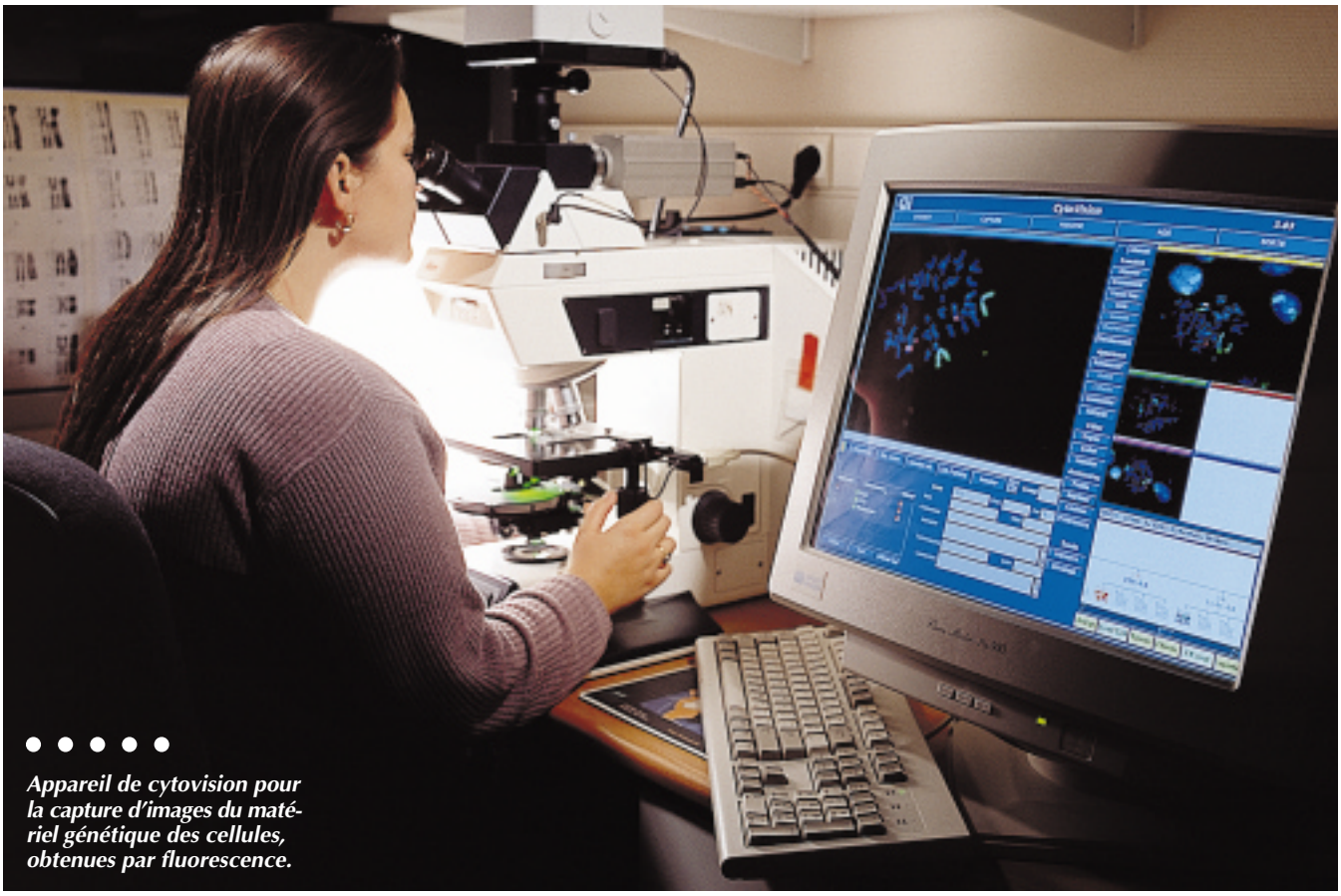


Effets biologiques des rayonnements ionisants. Évolutions possibles au niveau cellulaire en fonction du temps.

N.B. *Tous les événements indiqués n'ont pas la même probabilité de se produire. La survie cellulaire normale, par exemple, est le cas le plus fréquent après réparation de l'ADN.*

L'INSTABILITÉ CHROMOSOMIQUE

Reflétée par la présence d'anomalies dans la forme et le nombre des chromosomes d'une cellule, l'instabilité chromosomique est un phénomène constaté aussi bien lors du vieillissement que dans le processus de cancérogenèse ou encore à la suite d'un stress comme l'irradiation. Ce mécanisme apparaît dans tous les cas nécessaire pour que la cellule retrouve la stabilité qui lui permet de poursuivre une croissance normale, avec une durée de vie limitée, ou devienne immortelle, en cas de cancérisation. Le vieillissement joue un rôle important dans l'accumulation des mutations et donc dans la probabilité d'apparition de cancers. Pour autant, une simple mutation n'est pas suffisante pour transformer une cellule saine en cellule cancéreuse : la genèse d'un cancer nécessite la rencontre de plusieurs événements rares et indépendants.



Appareil de cytovision pour la capture d'images du matériel génétique des cellules, obtenues par fluorescence.

A. Gonin/CEA

Des circonstances diverses

L'instabilité **chromosomique** peut se manifester aussi bien **in vivo**, au cours du processus de **cancérogenèse**, qu'***in vitro***, au cours du vieillissement **cellulaire**, de la *transformation cellulaire*(1) ou à la suite d'une irradiation ou d'une exposition à des substances toxiques diverses. Ce phénomène reflète la présence dans le **caryotype** d'anomalies chromosomiques telles que des chromosomes à deux **centromères** (**dicentriques**), des échanges de matériel entre deux chromosomes (**translocations**), des gains ou des pertes de chromosomes. Ces anomalies se retrouvent au fil des générations et affectent des chromosomes différents.

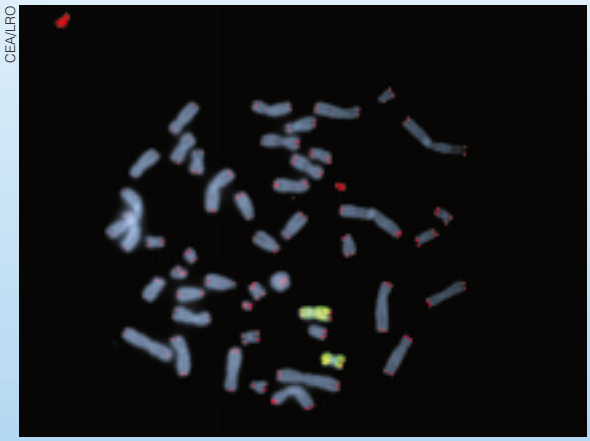
Retrouvées dans la plupart des **lignées** cellulaires tumorales, les associations **télomériques** (entre les extrémités des chromosomes) représentent une carac-

(1) Passage de la cellule normale à la cellule immortelle puis cancéreuse.

Télomères et télomérase : de l'importance des extrémités

1

Les télomères, extrémités des chromosomes, les protègent de la dégradation **nucléotidique** et de la fusion bout à bout. Dès 1938, des travaux avaient montré que les télomères avaient un rôle de protection (*capping*), assurant la stabilité **mitotique** des chromosomes : après irradiation par des rayons X, les chromosomes qui en étaient privés devenaient "collants" et pouvaient initier des cycles de cassures et de fusions. Raccourcissant à chaque division cellulaire, les télomères contrôlent la capacité proliférative de certaines de nos cellules. Il existe des **protéines** spécifiques des **séquences** télomériques formant le télosome. Pour transformer un télomère en cassure double brin, il suffirait qu'il ne soit plus reconnu par les protéines du télosome. Des systèmes sophistiqués contrôlent constamment l'intégrité de l'**ADN**. Les **enzymes de réparation** se mobilisent pour réparer les cassures qui apparaissent. Cette machinerie pourrait facilement confondre les extrémités des chromosomes avec une cassure d'ADN nécessitant une réparation. Les télomères risquent donc de fusionner entre eux par recombinaison ou par des mécanismes de fusion bout à bout, ce qui se caractériserait par la formation de chromosomes dicentriques instables. Les protéines télomériques jouent un rôle de protection et permettent aux télomères d'échapper aux systèmes de réparation de l'ADN.



CEA/LRO

Cellule en métaphase dont l'ensemble des chromosomes est coloré en bleu, les séquences télomériques en rouge et le chromosome 16 en jaune-vert.

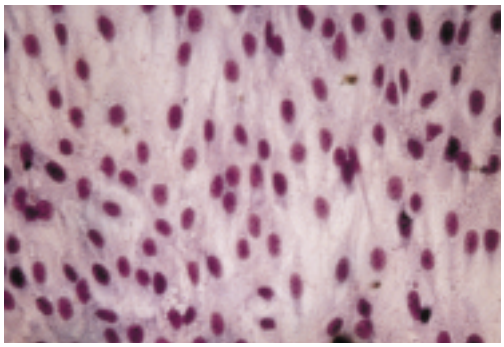
Une enzyme, la **télomérase**, peut rallonger les télomères. Alors qu'elle est absente dans la majorité des cellules **somatiques**, près de 85 % des tumeurs présentent une activité de la télomérase. Ainsi cette enzyme est devenue une cible de choix pour les agents anticancéreux. Toutefois, le délai entre la perte de l'activité de la télomérase et l'induction d'une **sénescence** cellulaire peut être important si les télomères des cellules tumorales sont longs. Ceci a modéré les espoirs d'utilisation de la télomérase comme cible directe et orienté les recherches vers les mécanismes impliqués dans la maintenance et le raccourcissement des télomères afin de prendre pour cible les télomères des cellules cancéreuses. Des études récentes ont montré que l'introduction du gène codant la télomérase (hTERT) dans des cellules primaires permet de rétablir son expression et confère aux cellules un **phénotype** de cellules normales et jeunes de manière indéfinie (élongation des télomères). Au-delà des utopies de jouvence éternelle, l'enjeu est important : il s'agit de déterminer si la greffe de cellules **transgéniques** surexprimant la télomérase peut être envisagée à des fins thérapeutiques ou si une telle greffe serait dangereuse et équivalente à une greffe de cellules tumorales.

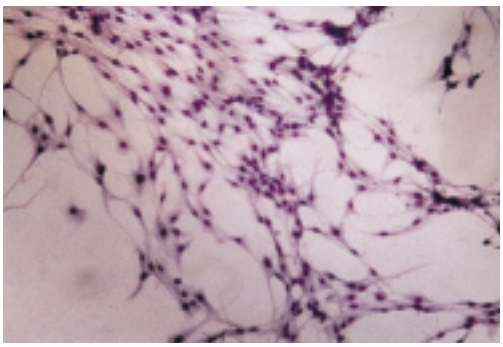
Laure Sabatier

téristique de l'instabilité chromosomique. Elles peuvent être détectées dans les cellules des sujets prédisposés aux cancers et dans les cellules cancéreuses en début d'évolution. Ces associations télomériques sont à l'origine des chromosomes dicentriques qui, à leur tour, génèrent l'instabilité chromosomique (encadré 1).

Instabilité chromosomique au cours du vieillissement

Il a été admis au début des années soixante que le vieillissement de la cellule pouvait être expliqué par une limitation du nombre de divisions cellulaires : au bout de quelques générations, les cellules de l'organisme "sénescent" et meurent. Les cellules vieillissantes, dites **sénescentes**, présentent une forte augmentation d'anomalies chromosomiques. La formation de ces aberrations génère des cassures qui, non réparées, induisent l'arrêt du **cycle cellulaire** : après un nombre limité de divisions, ces cellules sont amenées à ne plus se diviser (voir *Effets des rayonnements sur le cycle cellulaire*).





INSERM

Fibroblastes normaux (à g.) et transformés (à dr.). Les cellules transformées s'entrecroisent au lieu d'être alignées côte à côte.

Des scientifiques ont ainsi montré que les cultures primaires de **fibroblastes** (cellules du tissu conjonctif) n'ont qu'un nombre limité de générations cellulaires, correspondant environ à cinquante doublements de populations (encadré E, ***Le cycle cellulaire : duplication sous contrôle***). Dans des fibroblastes sénescents, plus les divisions se succèdent, plus la longueur des phases G1 et G2 du cycle cellulaire est élevée ; les cellules augmentent en taille et leur **métabolisme** énergétique est perturbé. Les cellules sénescentes sont caractérisées par une perte de capacité proliférative due d'une part à la diminution de leur faculté de réparation (voir *Les gardiens du génome)* et d'autre part au raccourcissement progressif des séquences télomériques. Différentes études suggèrent que la perte de ces séquences à chaque division contribuerait à l'apparition des anomalies observées, l'altération des **télomères** déstabilisant les extrémités des chromosomes et conduisant à des pertes chromosomiques. De fait, l'ensemble des chromosomes formant le caryotype de cellules sénescentes présentent des anomalies telles que des translocations et des disparitions de chromosomes. Cette perte permanente de séquences télomériques réduit en outre la viabilité des cellules et les conduit finalement à la mort.

Une étude portant sur des fibroblastes de poumon embryonnaire humain montre que la phase de sénescence est caractérisée par le passage des cellules à la **polyploïdie** (multiplication du nombre de chromosomes de la cellule par deux, trois ou *n*) associé à un niveau élevé d'anomalies chromosomiques. Une hypothèse serait que la sénescence cellulaire pourrait s'accompagner de réarrangements chromosomiques **clonaux** provoquant la transformation cellulaire lorsque certains **gènes**, des **oncogènes** ou des **gènes suppresseurs de tumeurs**, y sont localisés.

L'instabilité chez les "précancéreux"

Chez les patients atteints de maladies précancéreuses, une instabilité chromosomique aboutissant à des fusions télomériques est souvent observée, dès les stades prémalins ou dans les tumeurs de bas grade de malignité. Les tumeurs malignes plus avancées font quant à elles apparaître des remaniements clonaux, c'est-à-dire présents dans de nombreuses cellules tumorales, ainsi que des déséquilibres chromosomiques spécifiques.

Chez les sujets souffrant de maladies telles que l'*ataxia telangiectasia*, le *xeroderma pigmentosum*, le syndrome de Bloom ou le syndrome de Werner, les cellules montrent une instabilité chromosomique spontanée élevée (translocations, **inversions**...), impliquant pour certaines des chromosomes spécifiques. L'incidence de cancers chez ces patients est d'autre part très importante. Hypersensibles aux radiations, ils présentent des défauts de réparation, de recombinaison, de **voies de contrôle** du cycle cellulaire créant et maintenant ainsi les dommages de l'ADN responsables de l'instabilité chromosomique. Spontanée ou induite par l'irradiation, l'instabilité est élevée dans leurs cellules.

Dans le cas d'*ataxia telangiectasia* et de *xeroderma pigmentosum*, il ne semble pas y avoir de corrélation entre la taille des télomères et la fréquence des chromosomes dicentriques terminaux. Les cellules de patients touchés par la maladie de Werner, caractérisées par un vieillissement prématuré, subissent une forte instabilité chromosomique. Un défaut de **réplication**, de **ségrégation**, de réparation ou de **transcription** pourrait entraîner l'accumulation de **mutations** et d'anomalies chromosomiques. Enfin, les cellules de patients atteints de la *progeria*, maladie génétique caractérisée par un vieillissement très accéléré, présentent également une instabilité chromosomique avec raccourcissement télomérique.

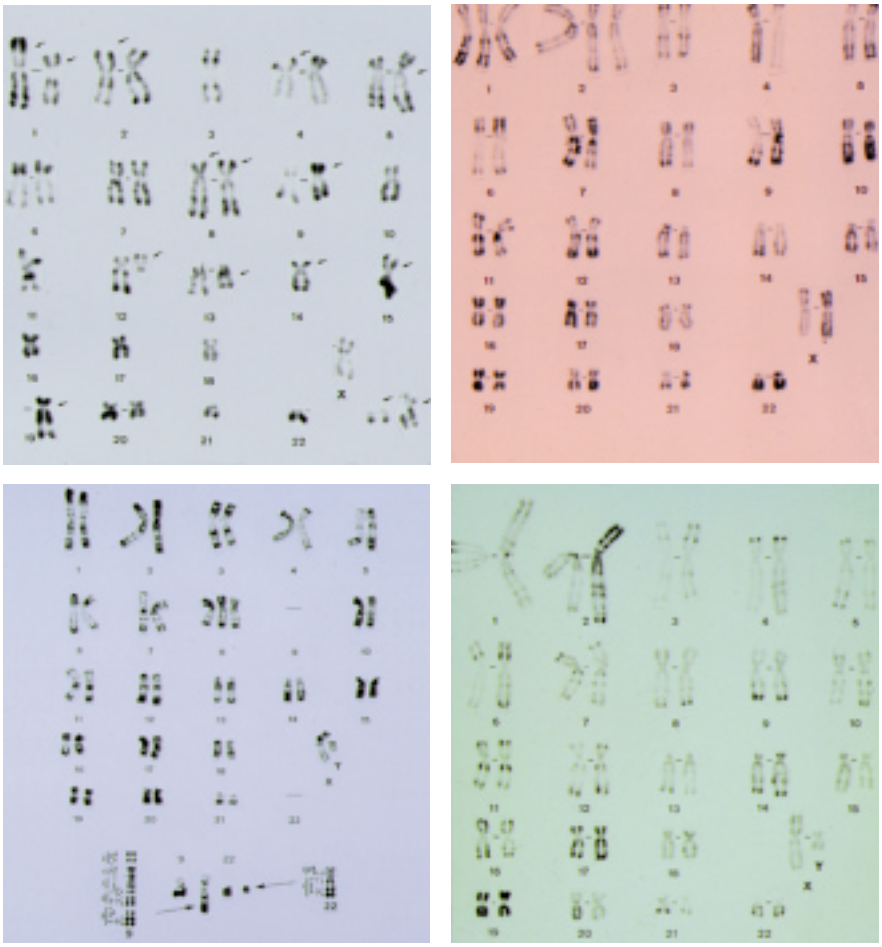
L'instabilité chromosomique dans les cellules cancéreuses

Une tumeur se caractérise par une somme importante d'altérations génétiques acquises au cours d'une longue évolution clonale (encadré 2). Une cellule normale acquiert des caractères de transformation à la suite d'une ou plusieurs mutations qui lui confèrent un "avantage proliératif" important.

Les cancers impliquent une rupture des contraintes normales de la prolifération cellulaire. Celle-ci est gérée directement par les mécanismes du cycle ou

Cancer et vieillissement 2

Il se produit au cours d'une vie environ 10^{16} divisions cellulaires dans le corps humain. Dans un environnement dépourvu de facteurs **mutagènes**, les mutations surviennent spontanément à un taux estimé de 10^{-6} mutations par gène et par division cellulaire. Une seule mutation n'est pas suffisante pour transformer une cellule saine en une cellule cancéreuse. Beaucoup d'arguments montrent que la genèse d'un cancer nécessite en effet la rencontre simultanée dans une cellule de plusieurs événements rares et indépendants. Le vieillissement joue donc un rôle important dans l'accumulation des mutations, d'où une augmentation de l'incidence des cancers avec l'âge. Les données statistiques permettent d'estimer qu'il faut de trois à sept événements indépendants pour transformer une cellule normale en une cellule cancéreuse, les plus petits nombres s'appliquant aux leucémies, les valeurs les plus grandes aux carcinomes.



INSTITUT CURIE

Les quatre principaux types cytogénétiques de cancers. De gauche à droite et de haut en bas, les profils monosomique (fibrosarcome), trisomique (tumeur de l'utérus), de translocation (entre les choromosomes 9 et 22 dans une leucémie) et à caryotype normal.

indirectement par le biais du contrôle de l'engagement dans une **différenciation** terminale ou dans la mort cellulaire programmée, appelée **apoptose** (voir *Le suicide cellulaire*).

Les gènes de régulation normaux sont classés en deux catégories : ceux dont les produits stimulent la prolifération cellulaire et ceux dont les produits servent à l'inhiber. La prolifération incontrôlée qui caractérise le cancer est pilotée de deux manières : soit un gène stimulateur de prolifération hyperactif (mutation **dominante**) est fabriqué et le gène altéré sera un oncogène (l'**allèle** normal étant un **proto-oncogène**), soit un gène inhibiteur de prolifération (mutation **récessive**) est inactivé et il sera appelé gène suppresseur de tumeur.

L'**amplification génique** est une des manifestations de l'instabilité génomique souvent observée au cours du processus tumoral. Elle peut provenir d'un gain de chromosomes suite à des réarrangements. Elle peut également résulter d'un mécanisme intra- ou extra-chromosomique, deux formes d'amplification qui ne coexistent pas dans une cellule tumorale.

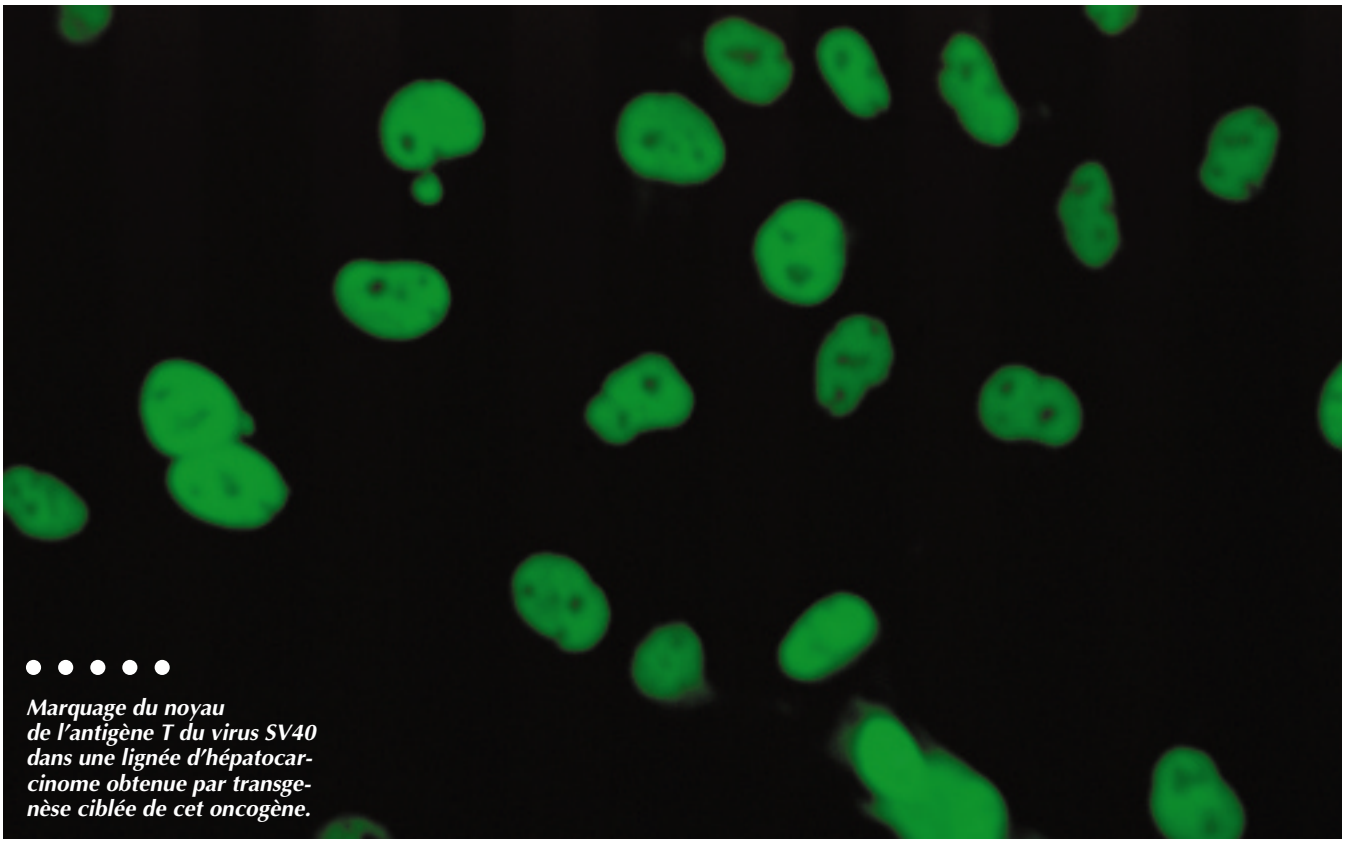
Les études **cytogénétiques** ont permis de mettre en évidence quatre types de cancers. Chacun est caractérisé par des profils de déséquilibres chromosomiques spécifiques, impliquant à la fois des modifications de nombre et de structure :

- le profil **monosomique** résulte de pertes ou de **délétions** de chromosomes entraînant la transformation de la cellule **diploïde** en une cellule **hypodiploïde**. Des **endoreduplications** peuvent survenir, conduisant à la formation de **clones hypotétraploïdes** avec des caryotypes très remaniés. Ainsi, la perte de chromosomes ou de fragments chromosomiques permet de démasquer des mutations récessives par délétion des allèles normaux. Ce type de profil se retrouve en particulier dans les cancers du sein, du côlon, du poumon et de la prostate.
- le profil **trisomique** se distingue par des duplications de chromosomes avec peu de réarrangements. Ces tumeurs évoluent vers une **triploïdie**. Ce profil concerne des **adénomes** et certains **carcinomes** tels que **neuroblastomes** ou tumeur de Wilm's.
- le profil **de translocation** est caractérisé par des translocations réciproques sans perte de matériel génétique. Il se retrouve dans les **hémopathies** et dans quelques **sarcomes**.
- peu de tumeurs ont un **caryotype normal**. Ces tumeurs ont des caractéristiques cliniques ou biologiques qui les rapprochent des tumeurs de type trisomique.

Instabilité et immortalisation cellulaire

Les cellules humaines normales en culture ont une durée de vie limitée. Mais si ces cellules sont **transfectées** par certains agents, l'**antigène** T par exemple, leur cycle est modifié et elles deviennent immortelles. Elles sont alors caractérisées par une forte instabilité chromosomique qui génère l'apparition de déséquilibres chromosomiques, laquelle associée à une fréquence augmentée d'**aneuploïdie** permet l'immortalisation de ces lignées.

Afin d'étudier l'instabilité liée à ce processus, des cellules saines et normales sont transfectées par un agent immortalisant tel que SV40, virus à ADN non pathogène pour l'homme. L'antigène T est un oncogène : ce gène code une phosphoprotéine nécessaire à la réplication de l'ADN viral. Au niveau des cellules saines, il agit par interaction directe avec la protéine p53, codée par le gène suppresseur de tumeur qui se trouve être le plus fréquemment muté dans les tumeurs humaines. L'antigène T empêche la liaison de la protéine p53 avec l'ADN. Les protéines p53 et pRb ne jouent plus alors leur rôle normal de



Marquage du noyau de l'antigène T du virus SV40 dans une lignée d'hépatocarcinome obtenue par transgenèse ciblée de cet oncogène.

INSERM/U445

"freins" (régulation négative) du cycle cellulaire. Le fonctionnement des **enzymes** de réparation est perturbé : les lésions ne sont pas réparées, ce qui engendre une augmentation des anomalies chromosomiques.

Les cellules transfectées par l'antigène T de SV40 ont une durée de vie plus longue que les cellules sénescentes normales. Elles se divisent plus longtemps car elles passent une première phase de mortalité appelée M1 où les cellules normales entrent en sénescence et meurent. Les cellules contenant l'antigène T de SV40 passent cette phase M1 du fait de l'inhibition de la p53 induisant l'entrée des cellules normales en sénescence. Ces cellules transfectées se divisent jusqu'à une phase de mortalité M2 dite "crise" où nombre d'entre elles meurent. Les autres, immortalisées, prolifèrent indéfiniment. Les données cytogénétiques montrent que l'instabilité des fibroblastes transformés par l'antigène T est très forte avant et pendant la crise. Elle est caractérisée par un grand nombre de dicentriques dont le taux est maximal pendant la crise et représente alors la majorité des anomalies. Après la crise, ce taux diminue mais reste majoritaire. Les clones émergents sont porteurs de déséquilibres chromosomiques qui confèrent aux cellules porteuses un avantage prolifératif. Ce modèle permet de suivre la chronologie d'apparition des déséquilibres engendrés par l'instabilité et la sélection des remaniements dans les cellules devenant immortelles.

L'instabilité radio-induite

L'irradiation de cellules induit une déstabilisation du **génome** accompagnée d'une forte mortalité cellulaire dès les premières mitoses après l'exposition aux rayonnements (figure). Quelques cellules parviennent toutefois à survivre pendant quelques générations supplémentaires. Cependant, la fréquence d'observation des chromosomes dicentriques par cellule diminue de moitié à chaque génération.

Il est donc difficile d'imaginer qu'il soit possible de voir des remaniements chromosomiques quelques générations après l'irradiation. Néanmoins, une instabilité chromosomique radio-induite a été observée dans des cellules humaines, **hématopoïétiques** (c'est aussi le cas chez la souris), dans des fibroblastes primaires et dans des **lymphocytes**.

Les cellules survivantes à l'irradiation produisent des descendants qui ont une forte capacité à former de nouvelles aberrations chromosomiques. Ces effets retardés de l'irradiation peuvent être expliqués comme les manifestations d'une instabilité génomique transmissible. Ainsi des dommages stables induits par l'irradiation sont-ils longs à se manifester.

La période d'instabilité est suivie par la sélection de clones caractérisés par des déséquilibres chromosomiques qui leur confèrent un avantage prolifératif, ce qui a pour conséquence l'envahissement de la culture par ces clones. Ces anomalies sont caractéristiques des cellules transformées ou tumorales et leur durée de vie est rallongée.

La mort cellulaire "retardée" a été observée avec un décalage atteignant jusqu'à 30 ou 40 générations dans des cellules ovariennes de hamster chinois après un traitement aux rayons X, à l'éthylméthanesulfonate ou à une **enzyme de restriction** mais elle ne l'a pas été après un traitement aux rayons ultraviolets. Ces derniers, non ionisants, créant des lésions simple brin, ceci suggère que l'instabilité liée à la mort cellulaire retardée pourrait être due à un

défaut de réparation des cassures double brin induites par l'irradiation. La fréquence de mutations à des ***loci*** spécifiques est augmentée dans les descendants de cellules irradiées. Des anomalies détectées dans les foyers transformés de lignées de cellules embryonnaires de souris ne sont pas une conséquence directe de l'irradiation. En effet, quel que soit le nombre de cellules irradiées, le taux de foyers transformés est identique.

Tous ces arguments mettent en évidence cette instabilité chromosomique radio-induite qui se produit comme lors du vieillissement cellulaire. L'irradiation permet donc de prolonger la durée de vie des cellules et de retarder le phénomène de sénescence cellulaire.

Une étape essentielle après un *stress*

L'instabilité chromosomique est un phénomène retrouvé après différents *stress* tels que l'irradiation, l'immortalisation, le vieillissement, la cancérisation. Cette instabilité semble une étape essentielle à ce stade pour que les cellules retrouvent une stabilité qui leur permette de poursuivre leur croissance.

Au moment de la plus forte instabilité, certains chromosomes semblent plus impliqués que d'autres pour former des dicentriques. Une hypothèse restant à vérifier est que les chromosomes portant les télomères les plus courts sont impliqués préférentiellement dans la formation des dicentriques. En effet, si les télomères sont courts, l'extrémité du chromosome n'est pas stable et le chromosome ne retrouve sa stabilité qu'en fusionnant avec un autre. L'instabilité chromosomique serait donc un mécanisme nécessaire pour le passage d'une cellule diploïde à une cellule aneuploïde transformée et immortelle, quel que soit le *stress* impliqué.

Françoise Hoffschir
et **Laure Sabatier**
Département de radiobiologie
et de radiopathologie
Direction des sciences du vivant
CEA/Fontenay-aux-Roses

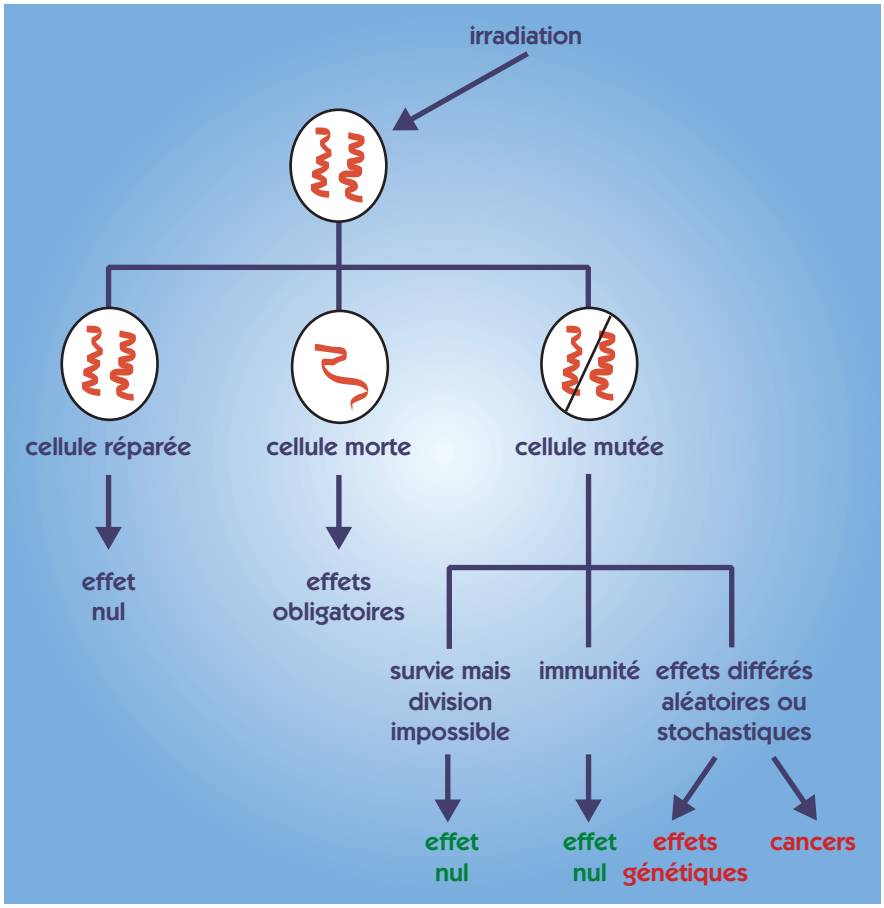


Figure. Conséquences cellulaires de l'irradiation. Dans la plupart des cas, l'irradiation n'a pas de conséquence sur la cellule. Elle n'en a que si la cellule est mutée, qu'elle donne des descendants eux-mêmes mutés qui entrent éventuellement dans un processus tumoral.

CANCERS RADIO-INDUITS

Étude sur des cellules en culture

Au même titre que d'autres agents physiques ou chimiques, les rayonnements ionisants peuvent induire des cancers. Les recherches sur des cellules en culture, en complément des études cliniques, épidémiologiques et des études in vivo, *permettent de préciser comment et à quel niveau un agent est susceptible d'intervenir – directement ou non – dans le processus de cancérogenèse, et donc d'évaluer le risque lié à l'exposition à cet agent.*

A. Gonin/CEA

Microscope à fluorescence utilisé au CEA/Fontenay-aux-Roses pour la technique du* painting *("peinture") des chromosomes.

Les enquêtes **épidémiologiques** montrent que certaines substances (tabac, amiante, divers produits chimiques...) ou agents physiques (rayons ultraviolets, **rayonnements ionisants**,...) sont capables d'induire des cancers. Les données sont toutefois le plus souvent incomplètes, en particulier dans le domaine de l'évaluation du risque en fonction de la **dose** ou de la durée d'exposition.

Il est donc nécessaire de recourir à l'expérimentation pour confirmer et compléter les résultats des enquêtes épidémiologiques, en faisant varier les conditions d'exposition aux rayonnements (dose, **débit de dose**...) et en y associant éventuellement d'autres agents, chimiques ou physiques, susceptibles de modifier la réponse afin d'évaluer l'influence des divers facteurs sur l'incidence des cancers. Des expériences peuvent être effectuées ***in vivo*** sur des animaux exposés à l'agent cancérigène potentiel, en comptabilisant le nombre de cancers survenus. Cependant, ces études sont assez coûteuses et longues, car il est en principe nécessaire de suivre les animaux pendant leur durée de vie, qui est de 2 à 3 ans pour les rongeurs. D'autres expériences sont plus aisément réalisables ***in vitro***, sur des **cellules** en culture. Elles constituent des tests de *transformation cellulaire* (encadré).

L'estimation du risque peut se faire par une approche quantitative directe qui reste toutefois, pour les faibles doses, limitée par des problèmes statistiques, comme l'incidence spontanée, la taille des populations soumises à chaque gamme de dose... Une approche complémentaire, développée en parallèle, consiste à rechercher les mécanismes de la **cancérogenèse**. En effet, la connaissance de ces mécanismes devrait permettre de préciser si un agent, physique ou chimique est en mesure d'intervenir dans le processus de cancérogenèse et à quel niveau, et donc

d'évaluer le risque lié à l'exposition à cet agent. Ces recherches sont réalisées *in vivo* sur des animaux ou *in vitro* sur des cellules en culture. Les modèles *in vitro* ont l'avantage d'offrir la possibilité d'étudier certaines étapes sans avoir recours à un trop grand nombre d'animaux.

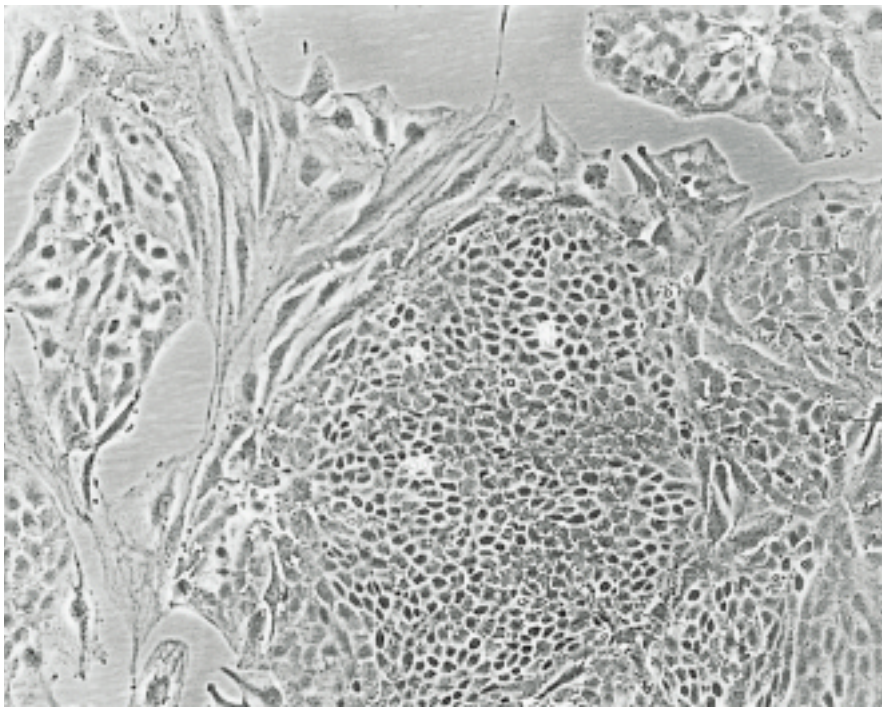
Qu'est-ce qu'une cellule cancéreuse ?

Dans les tumeurs, les cellules ont un aspect différent de celui des cellules normales. Elles présentent une perte plus ou moins complète de leurs caractéristiques fonctionnelles (sécrétion, absorption...). De plus, les cellules cancéreuses sont capables d'accomplir un nombre pratiquement *infini* de divisions, alors que les cellules normales entrent en **sénescence** après un nombre limité de divisions cellulaires, ce nombre étant d'autant plus élevé qu'elles sont prélevées sur un sujet jeune). En outre, le temps de doublement de population cellulaire est plus court que pour les cellules normales (encadré D, ***La cellule, le maillon essentiel*** et encadré E, ***Le cycle cellulaire, duplication sous contrôle***). Enfin, elles peuvent quitter le tissu d'origine et migrer à distance pour donner naissance à une autre tumeur appelée métastase.

Culture cellulaire

Les cellules, placées dans des flacons de culture, adhèrent au fond. Le milieu de culture est changé régulièrement pour éviter toute carence nutritive et/ou effet toxique par accumulation de déchets éliminés par les cellules. Les cellules vont se diviser et, leur nombre augmentant, vont progressivement recouvrir tout le fond du flacon de culture : elles sont dites *confluentes*. À ce moment, elles doivent être subdivisées, c'est-à-dire décollées puis réensemencées à une concentration plus faible : cette opération se nomme un **passage**. Lorsque des cellules sont établies en culture, il s'agit d'une **lignée** cellulaire.

En culture, outre les caractéristiques précédemment décrites, les cellules cancéreuses se différencient des cellules normales par une grande autonomie par rapport aux conditions extérieures. Elles supportent une plus grande densité cellulaire et sont moins sensibles à la composition du milieu de culture. Elles sont également indépendantes du support et n'ont pas besoin de s'ancrer sur le fond du flacon de culture pour proliférer. Les tests qui permettent d'évaluer la transformation cellulaire sont basés sur ces critères. Enfin, lorsque les cellules peuvent induire une tumeur quand elles sont injectées à un animal, cette capacité signe le fait que la transformation est complète : les cellules sont alors dites **tumorigènes**.



CEA/DRR

Cellules en cours de transformation : un foyer se trouve au centre de l'image.

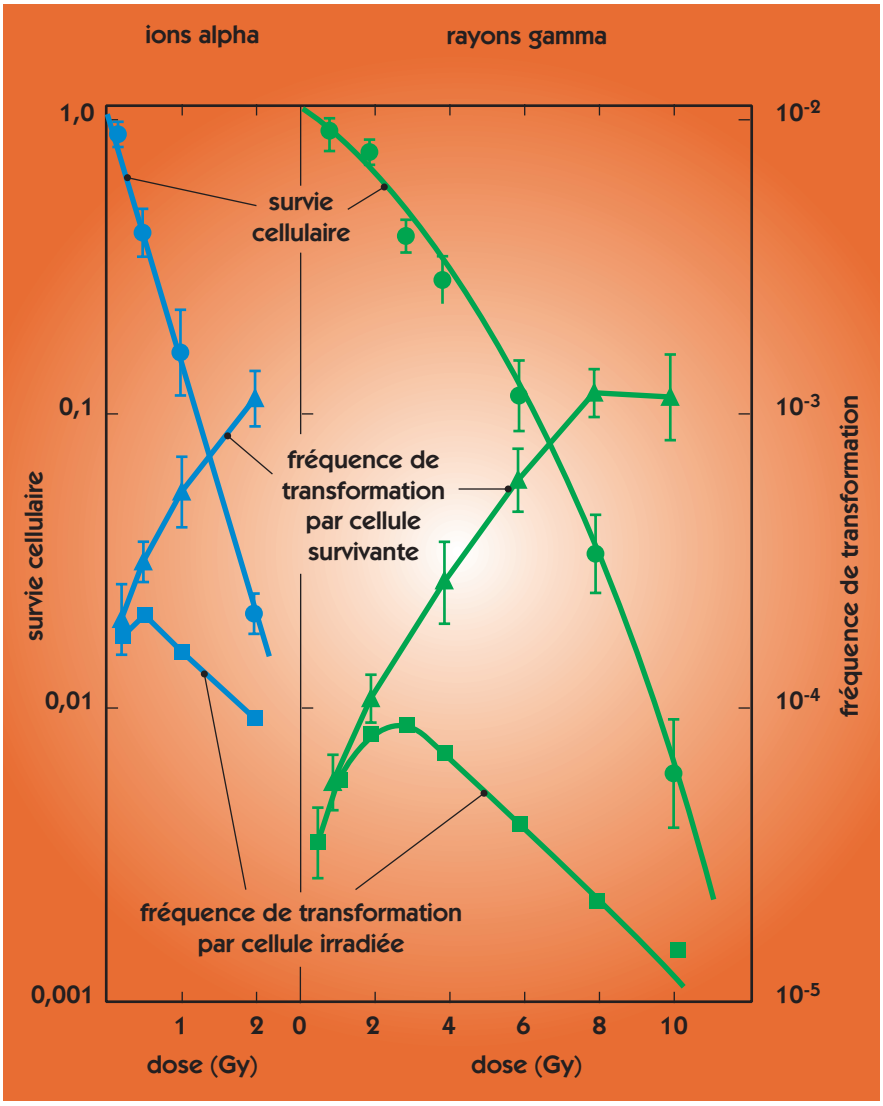
Les cellules cancéreuses ont presque toujours un **caryotype** anormal. Dans quelques rares cas de cancers, des remaniements spécifiques, notamment un réarrangement d'un **chromosome** avec un autre, sont observés. Plus généralement, les anomalies du caryotype se traduisent à la fois par une modification du nombre total de chromosomes et par des déséquilibres, c'est-à-dire une diminution ou une augmentation du nombre relatif de segments ou de chromosomes entiers (voir *L'instabilité chromosomique*). Il est important ici de noter que chaque type de tumeur présente un profil de remaniements chromosomiques caractéristique, même si dans les cellules tumorales d'un patient toutes les modifications ne sont pas observées et bien qu'il existe, au demeurant, des analogies plus ou moins grandes entre des tumeurs provenant de tissus différents.

À l'échelle du **gène**, les cellules cancéreuses présentent des modifications diverses, comme la surexpression d'**oncogènes**, c'est-à-dire de gènes qui favorisent la transformation cellulaire, ainsi que des pertes ou des **mutations** d'**anti-oncogènes**, c'est-à-dire de gènes qui s'y opposent. Ces changements du **génome** s'accompagnent de modifications non génétiques, en particulier des modifications **métaboliques**, qui contribuent sans doute, bien que les mécanismes restent à préciser, à la transformation cancéreuse.

L'effet sur la transformation de cellules déjà immortalisées

De très nombreuses études ont été effectuées sur des cellules de souris ou de hamster déjà immortalisées et établies en lignées. Ces cellules sont irradiées, puis ensemencées en faible densité. Après un délai, qui a été fixé à six

Figure 1. Influence de la dose et du type de rayonnement sur la fréquence de transformation de cellules immortalisées (d'après Hall E.J. et Hei T.K. 1987).



semaines afin de standardiser les protocoles, les foyers de cellules présentant certaines caractéristiques morphologiques sont dénombrés. Une plus grande densité des cellules traduit en effet un avantage proliferatif. La probabilité ou la fréquence de transformation est calculée en divisant le nombre de foyers soit par le nombre de cellules irradiées, soit par le nombre de cellules survivantes. La fréquence de transformation par cellule irradiée augmente en fonction de la dose jusqu'à un maximum, puis diminue car, aux doses les plus fortes (supérieures à 2 Gy pour les rayons gamma), un pourcentage important de cellules ne survit pas. En revanche, la fréquence de transformation par cellule survivante augmente régulièrement avec la dose (figure 1). Ces expériences ont permis d'évaluer l'influence de divers paramètres sur la transformation cellulaire radio-induite. Les rayonnements à fort **transfert linéique d'énergie** (TLE), comme les neutrons ou les particules alpha, sont plus efficaces que les **rayonnements X** ou **gamma** (figure 1). L'influence du débit de dose est différente selon le type de rayonnement. Une diminution entraîne une baisse de la probabilité de transformation pour les rayons X et gamma, alors que c'est l'inverse pour les rayonnements à fort TLE, du moins dans certaines limites.

L'intervalle de temps entre l'irradiation et le test de transformation est très important. Il permet aux cellules de réparer une partie des lésions radio-induites avant de se diviser à nouveau et conduit donc à une diminution de la probabilité de transformation. La transformation cellulaire nécessite que les cellules se divisent, ce qui ne se produit normalement que dans certains tissus ou bien lorsque les doses d'irradiation sont assez élevées pour provoquer une mort cellulaire importante, de l'ordre de quelques grays (Gy) pour le rayonnement X ou gamma. L'exposition à différents agents, chimiques par exemple, peut avoir un effet synergique avec l'irradiation dans certains cas, antagoniste dans d'autres.

Ces expériences ont donc permis d'évaluer le risque de transformation cellulaire après irradiation dans différentes conditions d'exposition. Toutefois, le court délai de quelques semaines entre l'irradiation et la transformation *in vitro* est en contradiction avec le long temps de latence, de quelques années au minimum, observé *in vivo*. Cela suggère un mécanisme en une seule phase comme si ces cellules, qui ont d'ailleurs un caryotype déjà modifié et

Changement de milieu dans des flacons de cellules en culture sous une hotte à flux laminaire au CEA/Fontenay-aux-Roses.

A. Gonin/CEA

instable, avaient déjà franchi plusieurs étapes. La question est donc de savoir sur quel stade agissent les rayonnements ionisants et ce qui a été quantifié.

La transformation de cellules normales

Comme les cellules humaines ne s'immortalisent pas spontanément en culture, il est nécessaire de s'orienter vers des solutions de compromis, soit en les immortalisant par des manipulations génétiques, soit en étudiant la transformation de cellules issues d'animaux qui ne présentent pas ce problème. Pour les modèles développés au Laboratoire de radiobiologie cellulaire du Commissariat à l'énergie atomique (CEA), le choix s'est porté sur des cellules de rat Sprague-Dawley car un très grand nombre d'expériences de cancérogenèse *in vivo* ont déjà été effectuées sur cette souche de rat, et notamment dans les laboratoires du CEA. Les études visent donc à corréler les données obtenues *in vitro* aux observations faites sur les tumeurs humaines et chez les animaux.

Pour étudier la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses, des rats ont été irradiés pendant la dernière semaine de gestation par une source de cobalt 60 (rayonnement gamma) avec un débit de dose de 0,022 Gy par heure, soit une dose de 0,5 Gy par jour et une dose totale de 3,5 Gy. À la fin de l'irradiation, les cellules ont été mises en culture à partir de fragments de cerveau et de poumons prélevés sur les fœtus. Les cellules ont été maintenues en culture pendant plus de cent passages (encadré). Divers paramètres comme le temps de doublement de la population cellulaire, la **clonogénicité** et la **tumorigénicité** ainsi que le caryotype ont été analysés après un nombre de plus en plus grand de passages des cellules en culture (figure 2).

Au cours des premiers passages, les cellules issues de poumons ne sont ni clonogènes, ni tumorigènes et les caryotypes sont normaux. Il n'y a donc pas de remaniements chromosomiques induits par une exposition aux rayonnements gamma dans ces conditions de dose et de débit de dose. Par contre, aux environs d'une trentaine de passages en culture, des cellules présentent diverses anomalies chromosomiques. Une de ces anomalies a un avantage proliferatif puisque après quelques passages la totalité de la population est issue des cellules

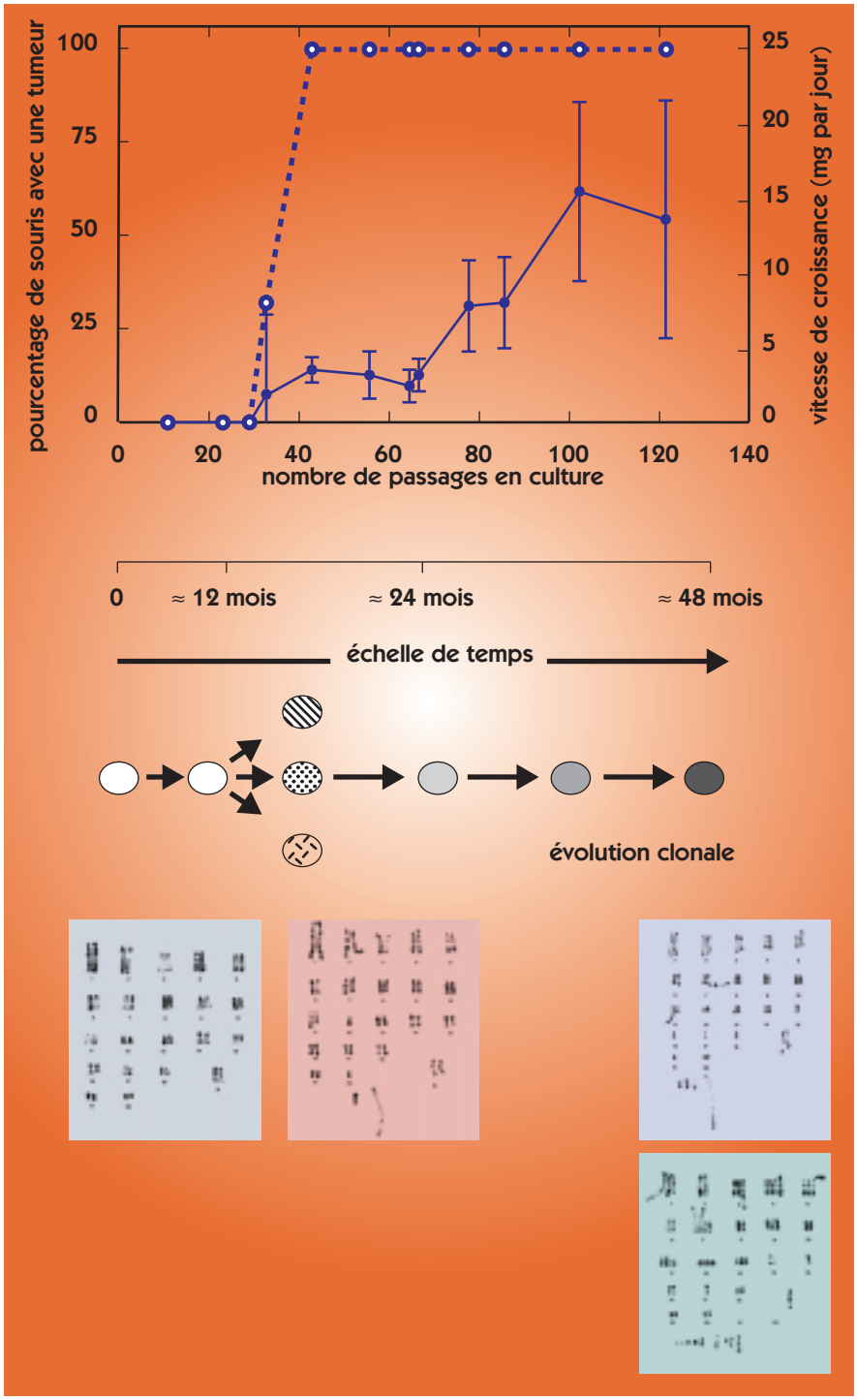
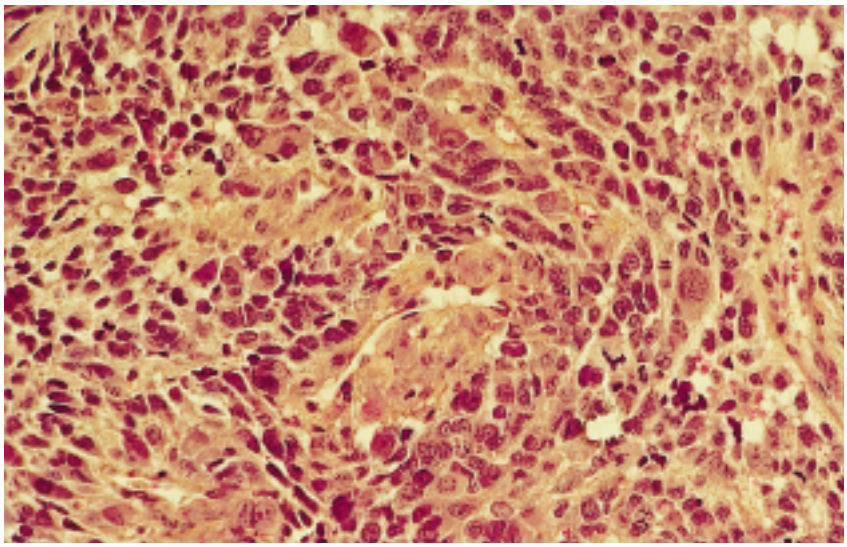


Figure 2. Évolution de la tumorigénicité et des remaniements chromosomiques mise en parallèle avec l'évolution clonale dans les cellules issues de poumons de rats irradiés. Les courbes indiquent le pourcentage de souris nude chez lesquelles les cellules injectées ont donné des tumeurs (trait discontinu) et la vitesse de croissance de ces tumeurs, en milligramme par jour (trait continu). Au-dessous, de gauche à droite, caryotypes de cellules pulmonaires à des passages précoce (16, caryotype normal), intermédiaire (49, remaniements visibles) et tardif (113, nombreux remaniements). En bas, caryotype d'une cellule de cerveau au passage 110.



CEA/DRR

Coupe histologique de tumeur obtenue sur souris nude après injection de cellules transformées. Les souris nude, dépourvues de défenses immunitaires, ne rejettent pas les greffes de cellules provenant d'une autre espèce : elles sont utilisées pour tester la tumorigénicité de cellules, mais aussi pour augmenter la quantité de matériel tumoral humain, les fragments prélevés lors d'une exérèse thérapeutique ou d'une biopsie et qui sont disponibles pour les études fondamentales étant souvent de petite taille.

qui la possèdent. L'apparition des modifications chromosomiques correspond au moment où les cellules deviennent clonogènes et tumorigènes. Les remaniements chromosomiques observés sont ainsi bien en relation avec le processus de transformation radio-induite et non directement avec l'irradiation. Aux remaniements chromosomiques, en particulier l'**amplification génique**, qui caractérisent le clone initial prédominant, s'ajoutent d'autres anomalies qui apparaissent . Au total, après un grand nombre de passages, le caryotype est considérablement remanié. Par ailleurs, le temps de doublement de la population cellulaire diminue au moment de la sélection du clone prédominant, puis reste stable.

Une étude a été menée en parallèle sur des cellules issues de cerveau prélevées sur des rats irradiés dans les mêmes conditions. Le processus est pratiquement identique, les cellules restent apparemment normales au cours des premiers passages en culture, puis les remaniements chromosomiques, la clonogénicité et la tumorigénicité évoluent de façon synchrone comme pour les cellules issues de poumons. Par contre, il n'y a pas d'amplification génique et le nombre de chromosomes évolue selon un mode déjà décrit dans les tumeurs humaines, à savoir qu'il y a duplication du nombre de chromosomes suivie de la perte progressive de certains d'entre eux. Ce processus se produit de façon répétitive.

Les deux modèles ont des caractéristiques communes. En effet, la clonogénicité, la tumorigénicité et le caryotype de ces cellules sont normaux au cours des passages précoces. Ensuite, pendant une période intermédiaire évoquant une instabilité génétique, des cellules avec des caryotypes anormaux, mais différents, sont observées. Une d'entre elles possède un avantage proliératif puisqu'en quelques passages toutes les cellules en sont issues. Par ailleurs, la tumorigénicité évolue par palier et le nombre d'anomalies chromosomiques augmente au cours de la transformation. L'étude de ces cellules à différents stades de cette dernière permettra d'identifier les gènes impliqués dans la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses. Enfin, l'examen de transformations spontanées ou induites par divers agents cancérigènes permettra de rechercher d'éventuelles spécificités ou au contraire des analogies entre les différents processus.

D'autres recherches s'orientent actuellement vers l'étude de la transformation de cellules humaines immortalisées par des manipulations génétiques, mais une question se pose : le processus d'immortalisation en lui-même est-il identique à celui qui s'inscrit dans le cadre de la transformation cellulaire ?

Nécessité des études *in vivo*

La compréhension de processus aussi complexes que ceux impliqués dans la cancérogenèse nécessite des approches complémentaires. En effet, les études effectuées sur des cellules en culture ne prennent pas en compte les influences physiologiques normales comme les taux hormonaux et l'organisation des cellules en tissu avec une architecture propre et la présence de cellules de différentes origines. Elles omettent également de prendre en compte la réaction de l'organisme et, en particulier, le rôle des défenses immunitaires. De plus, régulièrement subdivisées, les cellules sont obligées de se multiplier en permanence, ce qui ne se produit normalement que dans les **cellules souches** de certains tissus. Les expériences de cancérogenèse *in vivo* sur des animaux sont donc indispensables. Elles le sont d'autant plus qu'il est maintenant possible d'identifier les modifications génétiques des cellules tumorales, et donc de préciser les gènes en cause. Par ailleurs, les résultats obtenus à partir des modèles expérimentaux actuels ne peuvent être interprétés qu'à la lumière de ceux provenant de l'analyse des cancers humains eux-mêmes, bien que celle-ci soit rendue difficile par les variations individuelles et que la tumeur, prélevée au moment de l'**exérèse** thérapeutique, ne représente qu'une sorte de photographie à un instant donné après un temps plus ou moins long d'évolution.

Catherine Luccioni(*)
Département de radiobiologie
et radiopathologie
Direction des sciences du vivant
CEA/Fontenay-aux-Roses

(*) Les études de transformation de cellules de rat ont été effectuées avec la collaboration de Monique Reillaudou, Jacqueline Beaumatin, Hervé Coffigny, Hervé Peyre, Isabelle Giuliani et Michèle Morin.

EFFETS HÉRÉDITAIRES DES RAYONNEMENTS IONISANTS

Aucun effet héréditaire des rayonnements ionisants n'a été observé jusqu'à présent chez les personnes irradiées. Tout porte à croire qu'il n'y a effectivement pas d'augmentation des pathologies pour lesquelles la transmission à la descendance est systématique (dominante). Les chercheurs se doivent maintenant de déterminer dans quelle mesure ceci est également le cas pour les pathologies à transmission conditionnelle (récessive), qui n'apparaîtraient éventuellement qu'après un certain nombre de générations. Les recherches sur de tels effets, dont l'incidence ne pourrait être qu'extrêmement faible, se justifient ne serait-ce que pour déterminer si certains individus sont plus prédisposés que d'autres à telle ou telle pathologie.

Plusieurs générations d'une famille japonaise. Supposé quasi nul, l'impact exact des mutations récessives ne pourrait être correctement estimé qu'à partir de la cinquième génération après l'événement causal.

K. Straiton/EXPLORER

Très redoutés après Hiroshima et Nagasaki, les effets héréditaires des **rayonnements ionisants** ne suscitent actuellement qu'un intérêt relativement limité dans la communauté scientifique. La principale raison en est simple : ni les études sur l'animal, ni les enquêtes **épidémiologiques** sur les populations humaines irradiées n'ont montré d'accroissement sensible des pathologies héréditaires pour des **doses** reçues compatibles avec la survie et la procréation. En effet, au-delà d'un certain niveau de dose, les gonades et les cellules **germinales** sont mises hors d'état d'exercer leur fonction.

Dans la mesure où des effets cancérigènes directs étaient détectés dans les mêmes conditions, les scientifiques se sont légitimement tournés vers l'étude de la transformation cellulaire maligne radio-induite (voir *Cancers radio-induits*).

Il est pourtant utile de revenir aujourd'hui sur la question des effets à long terme, car il n'est pas certain que, dans les conditions où les travaux ont été effectués, il ait été possible de détecter un effet retardé. Les grands progrès de la génétique humaine, en particulier, imposent de reconsidérer des conceptions qui étaient naguère en vigueur et pourraient avoir biaisé l'approche du problème.

Les bases des estimations actuelles

Les estimations qu'il est aujourd'hui possible de faire sur les effets héréditaires des rayonnements ionisants reposent d'une part sur les données des études sur l'animal, d'autre part sur celles de l'épidémiologie.

Les données des études sur l'animal

Telles qu'elles ont été reprises par les principales organisations internationales, comme la Commission internationale de protection radiologique (CIPR) et le Comité scientifique des Nations unies sur les effets des radiations atomiques (Unscear), les données de l'expérimentation animale proviennent essentiellement de deux laboratoires, l'un à Oak Ridge aux États-Unis et l'autre à Munich en Allemagne, où des expériences très importantes ont été réalisées dans les années cinquante à soixante-dix.

En l'absence d'approche moléculaire, impossible à l'époque, tout a été orienté sur la détection facile d'un **phénotype** anormal. Bien entendu, cela a exclu d'emblée toute altération psychique ou directement liée au vieillissement, alors qu'il est aujourd'hui établi que ces altérations accompagnent très souvent les maladies héréditaires.

Dans les laboratoires d'Oak Ridge, les équipes placées sous la direction de William L. Russell décidèrent d'étudier les malformations squelettiques radio-induites chez la souris, d'abord en raison de la facilité de leur détection, dès la naissance. À cette époque, les chercheurs pensaient que la quasi totalité des affections héréditaires étaient congénitales(1). La seconde raison ayant guidé ce choix était la notion que ces malformations avaient un déterminisme génétique **dominant**, c'est-à-dire qu'elles résultaient de l'atteinte d'un seul **allèle**, ce qui permettait l'apparition du phénotype dès la première génération. Or, ces deux postulats étaient partiellement faux : il est maintenant prouvé qu'une large fraction des maladies héréditaires n'est pas congénitale. Beaucoup d'altérations squelettiques congénitales observées se sont révélées être plutôt dues à des aberrations chromosomiques, et non à des **mutations** ponctuelles à effet dominant.

La seconde série d'expérimentations importantes fut développée à Munich par le groupe d'Ehling, qui s'est focalisé sur une atteinte oculaire, la cataracte. Le choix de ce phénotype reposait sur les mêmes principes : caractère congénital, trait dominant et détection facile.

Beaucoup d'autres travaux ont bien sûr été réalisés. Ils ne peuvent être mentionnés ici malgré leur intérêt. Dans leur ensemble, les résultats furent donc repris par les diverses commissions internationales qui, après maintes extrapolations, ont déterminé les niveaux de risque. Limitons-nous à reproduire l'estimation du rapport Unscear de 1977 fixant la dose de doublement des mutations à 1 **gray** (Gy). Vingt ans plus tard, le même organisme conclut qu'à la première génération suivant l'irradiation des parents par 0,01 Gy, un excès d'environ 50 maladies à composante héréditaire serait attendu par million d'habitants, soit une incidence de 0,5 %.

Les données épidémiologiques

Les données épidémiologiques sont de deux types. Il s'agit d'une part de celles qui ont porté sur la descendance d'individus irradiés soit médicalement, soit accidentellement pendant une courte durée - ce qui ne représente heureusement qu'un petit nombre de cas - ou à la suite des deux bombardements nucléaires. Ce sont donc essentiellement les populations autour d'Hiroshima et de Nagasaki (Japon) qui ont fait l'objet de ces études dont les conclusions sont simples : aucune augmentation de l'incidence des pathologies héréditaires n'est constatée.

D'autres données proviennent d'études qui ont porté sur des populations qui vivent dans des zones à "forte" **radioactivité** ambiante. Notons en passant que ces études ont été très médiatisées lorsqu'une augmentation des pathologies était rapportée, mais que ces mêmes études passaient totalement inaperçues quand elles ne montraient aucune incidence. En fait, il faut reconnaître que, globalement, ces résultats sont contradictoires, et donc peu fiables, car il n'existe ni registre, ni suivi médical approprié dans les zones à forte radioactivité naturelle étudiées.

Les données d'Hiroshima et de Nagasaki constituent donc la seule base sur laquelle s'appuyer pour établir un seuil au-dessous duquel aucun effet héréditaire n'est observé, une notion qui n'a guère de signification.

Pourquoi revenir sur ces estimations ?

Bien qu'encore théoriques, un faisceau de considérations conduisent à réévaluer les estimations actuelles en raison des progrès de la génétique au plan fondamental et de la génétique humaine. Les progrès de cette dernière sont actuellement quasi-exponentiels, comme le montre la figure 1 qui illustre le nombre de **gènes** identifiés et localisés sur les **chromosomes** humains entre 1966 et 1997. Les progrès ont suivi la même évolution chez la souris, le mammifère "modèle" en matière de génétique. Sachant que les grandes expérimentations sur les effets à long terme ont eu lieu avant les années quatre-vingt, il est clair que le manque d'information de l'époque pouvait induire des biais importants. L'un de ces biais ressort d'ailleurs de la figure 1 puisque le nombre de gènes assignés au chromosome X a été seulement multiplié par 4 entre les années 1960 et 1997 alors que celui des gènes assignés aux

(1) Qui apparaît dès la naissance.

autosomes est passé de 0 à environ 4 000 ! Les grandes expériences sur lesquelles repose l'évaluation du risque génétique ont donc été réalisées alors que la génétique des mammifères était balbutiante, ce qui conduit à penser que beaucoup de leurs conclusions sont à réviser.

Les progrès de la génétique fondamentale sont tout aussi déterminants. Les mécanismes impliqués dans l'hérédité des mammifères n'ont commencé à être entrevus qu'avec le développement de la biologie moléculaire, notamment à partir des années quatre-vingt. Comment telle altération de la molécule d'**ADN** va retentir sur tel phénotype mérite d'être réexaminé à la lumière des acquis les plus récents. La notion simple de **dominance** (un allèle touché, un effet) et de **récessivité** (deux allèles touchés, un effet) a beaucoup évolué avec le temps, puisqu'elle dépend de la puissance des moyens d'analyse mis en œuvre. D'abord très formelle, cette notion a perdu de son importance dans les années soixante à soixante-dix avec les progrès de la biochimie qui ont permis de détecter des effets de *dosage génique*, et donc des niveaux intermédiaires entre récessivité et dominance strictes.

C'est avec les progrès en **oncologie** moléculaire que cette notion a repris de son intérêt. Un trait de caractère, comme la prédisposition héréditaire au cancer, peut apparaître comme dominant parce qu'il se manifeste chez des individus **hétérozygotes**, c'est-à-dire porteurs d'un seul allèle altéré, alors qu'il est récessif à l'échelle cellulaire, car le second allèle est muté ou perdu dans les cellules cancéreuses. Ce processus à deux temps, dont l'un survient au cours du vieillissement de l'individu, montre combien la notion selon laquelle les affectations héréditaires sont congénitales était restrictive.

Les altérations de l'ADN induites et les conséquences qui en découlent mériteraient aussi un long développement. Cinq types d'altérations peuvent être citées. Ce sont d'abord les lésions non **transcrites**, qui se traduisent par un simple polymorphisme de l'ADN, et les lésions transcrites, qui entraînent une variation du phénotype sans caractère pathologique. Il s'agit ensuite des lésions supprimant la fonction de l'allèle touché, sans effet si l'autre allèle compense (effet récessif), ou qui montrent un effet de "dosage génique" (effet dominant). Certaines lésions changent le sens du message, au point que le produit de l'allèle muté entre en compétition avec l'allèle normal restant (effet dominant négatif). Enfin, des lésions peuvent être étendues à plusieurs gènes, "**délétés**" ou dupliqués, rejoignant ainsi les altérations à l'échelle chromosomique (effet dominant).

Pour des raisons évidentes, les mutations dominantes sont aisément reconnues puisqu'elles sont repérées dès la première génération par l'effet qu'elles provoquent, contrairement aux récessives. Ceci entraîne une distorsion considérable de la connaissance des altérations de l'ADN. Ainsi, dans le catalogue du Dr. Victor A. Mc Kusick de la John Hopkins University (1998), aux États-Unis, les traits autosomiques dominants identifiés dans notre espèce sont trois fois plus nombreux que les récessifs, alors que cette proposition est inversée pour les traits liés au chromosome X. La raison en est que les mutations récessives ne sont facilement repérées que si elles sont portées par le chromosome X, puisqu'elles se manifestent chez l'homme, qui ne possède qu'un seul X (pathologie liée au sexe). Des milliers de maladies autosomiques récessives resteraient ainsi encore non identifiées. Cette difficulté peut jouer un rôle très important dans l'évaluation du risque génétique lié aux rayonnements, comme nous le verrons plus loin.

Il existe une autre inconnue, au moins aussi importante. Après exposition aux

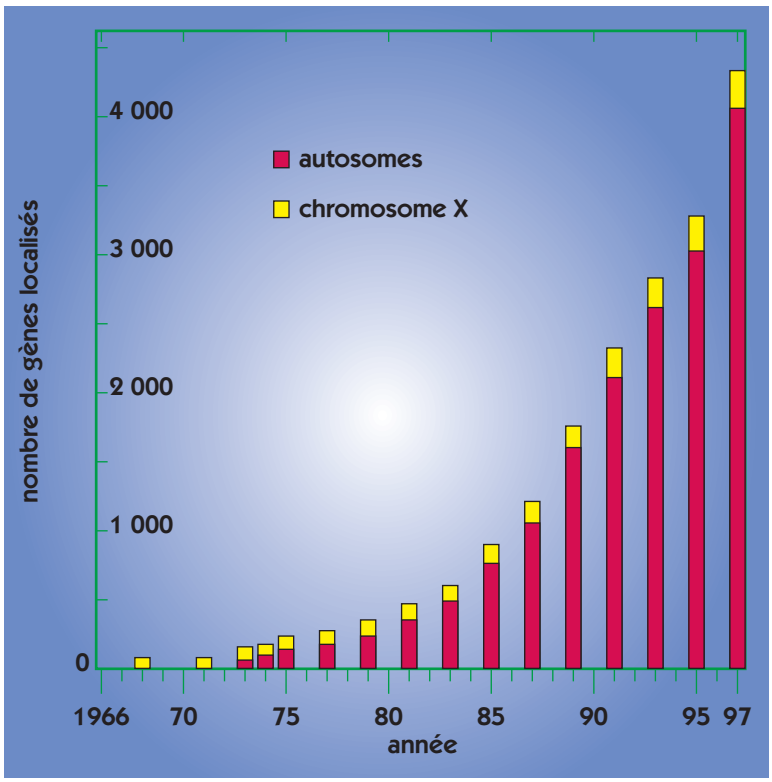
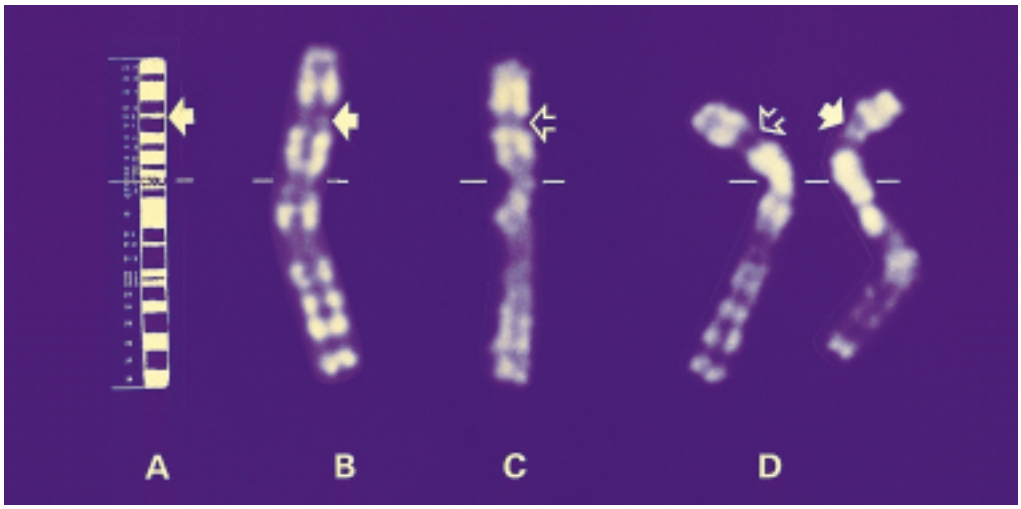


Figure 1. Évolution du nombre de gènes localisés sur les chromosomes humains au cours des trente dernières années (d'après Victor A. Mc Kusick, Mendelian Inheritance in Man, *12e édition).*



UMR 147 CNRS/INSTITUT CURIE

Emplacement sur le chromosome X du gène DMD responsable de la myopathie de Duchenne. En A, schéma d'un chromosome X normal ; en B chromosome X normal ; en C chromosome X avec délétion touchant le gène DMD chez un garçon malade ; en D chromosomes X de la mère transmetteur sain et dont l'un a subi une délétion.

rayonnements, comme à tout **mutagène**, les proportions respectives des lésions à effet récessif et celles à effet dominant ne sont toujours pas connues. Puisque la perte de fonction d'un allèle (mutation récessive) ne nécessite pas de grande spécificité (créer une panne dans un système intégré est aisé alors que modifier la fonction (mutation dominante) nécessite un ciblage plus précis), on peut s'attendre à ce que la grande majorité des mutations soient récessives. Quelques données expérimentales vont en effet dans ce sens, mais leurs résultats sont malheureusement biaisés par les approches utilisées. Il est également établi que dans les cellules cancéreuses, les mutations observées sont très souvent récessives, entraînant des pertes de fonction. Il faut enfin savoir qu'une mutation récessive en une seule copie reste neutre. Elle ne sera donc pas contre-sélectionnée et pourra être facilement transmise.

À partir de la cinquième génération ?

Ainsi, quelle serait la validité des études sur les descendants des irradiés d'Hiroshima et de Nagasaki si, comme il serait légitime de le supposer, les mutations induites étaient, en grande majorité, récessives ? L'arbre généalogique de la figure 2 montre qu'aucune conclusion ne peut encore être tirée aujourd'hui sur les mutations récessives. Aucun effet ne serait attendu en première génération (génération de 1946 à 1966). Des hétérozygotes, porteurs de mutations variées, différentes les unes des autres puisque quelque 100 000 gènes pourraient être indifféremment touchés, n'en existeraient pas moins. Chacun d'entre eux serait en mesure de transmettre, une fois sur deux, sa mutation. La même mutation serait alors susceptible de se rencontrer dans les fratries (deuxième génération, de 1966 à 1986). L'union frère-sœur étant rarissime, la troisième génération (1986-2006) n'a aucune chance de comprendre des individus porteurs **homozygotes** de la mutation. L'union entre cousins germains, déconseillée, étant très peu fréquente, le taux d'homozygotes restera très rare en quatrième génération (2006-2026). Le tabou de l'inceste n'étant plus de mise à ce stade, c'est à la cinquième génération (2026-2046) qu'une conséquence perceptible pourrait être attendue. Il est donc totalement prématuré de conclure à l'absence d'effet sur les pathologies héréditaires dans ces populations. Tout ce qu'il est en revanche possible d'assurer, c'est qu'il n'y a pas eu d'augmentation des pathologies à transmission dominante.

Aujourd'hui, quelques travaux donnent une large place à la recherche des mutations à l'échelle moléculaire. Ils remettent discrètement en cause les évaluations anciennes. Il ne faut certainement pas s'attendre à ce que le risque génétique soit très élevé, mais il serait irresponsable d'ignorer purement et simplement ce risque. Fort heureusement pour la descendance, la stérilisation des gonades, conséquence immédiate des fortes irradiations, limite le risque génétique. Par contre, toute augmentation chronique peut avoir une conséquence, sans que celle-ci ne ressorte des enquêtes épidémiologiques, car ces études n'ont pas la puissance suffisante pour détecter des événements rares au sein de populations, surtout lorsqu'elles sont peu médicalisées. Elles n'ont en particulier aucune valeur prédictive.

Les moyens de la biologie moléculaire sont en progression rapide. Détecter une mutation est devenu banal dans un contexte génétique défini. Cela deviendra également banal à l'échelle de tout le génome lorsque les systèmes d'analyse globale (puces à ADN) seront opérationnels (encadré). Il était donc légitime que se développent au Commissariat à l'énergie atomique (CEA), dans le domaine de la recherche en radiobiologie, un service d'analyse génomique fonctionnelle et un laboratoire d'étude de la radiosensibilité des cellules germinales. À une époque où l'opinion se préoccupe de la gestion des déchets nucléaires et des effets possibles d'une faible augmentation de l'exposition chronique aux rayonnements ionisants, il s'agit d'éviter de constater sans la comprendre une éventuelle augmentation du taux des mutations récessives.

Bernard Dutrillaux
Département de radiobiologie
et de radiopathologie
Direction des sciences du vivant
CEA/Fontenay-aux-Roses

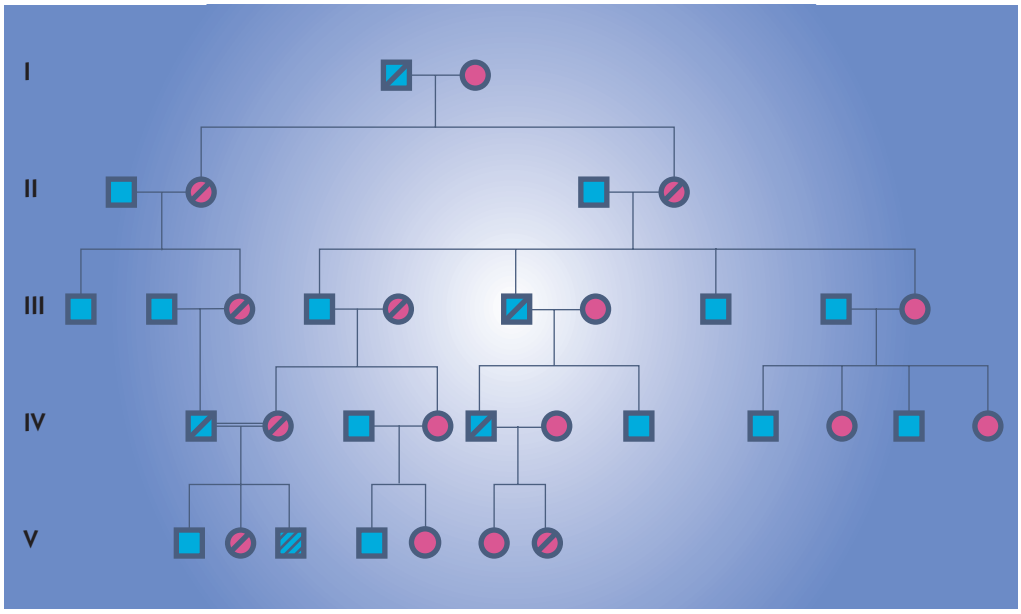


Figure 2. Arbre généalogique théorique figurant la transmission d'une mutation récessive acquise dans les gonades d'un parent de l'homme de la génération I.
Carré *: homme ;* cercle *: femme ;* trait oblique *: porteur sain de la mutation ;* grisé *: homozygote atteint ;* double trait horizontal *: union consanguine entre cousins issus de cousins germains.*

Les prouesses des puces à ADN

L'outil le plus récent pour analyser globalement l'expression génétique est la puce à ADN. Elle est capable d'identifier en une seule opération des centaines et bientôt des milliers ou dizaines de milliers d'échantillons d'ADN.

Sur un support de verre traité ou de silicium, comparable à celui utilisé dans la fabrication des puces électroniques, sont déposés des fragments d'ADN (succession de **bases A**, **T**, **G**, **C**) spécifiques du génome d'une espèce (**oligonucléotides** synthétiques ou séquences d'ADN amplifiées par la technique de réaction de polymérisation en chaîne, PCR). Ces brins "sonde" constituent des sites d'hybridation qui seront reconnus, selon le principe même de la double hélice (encadré A, ***La molécule d'ADN, vecteur de l'hérédité***), par les ADN "cible" cellulaires (succession des bases complémentaires : T, A, C et G), s'ils sont présents dans l'échantillon étudié. Pour analyser un échantillon biologique, il est nécessaire de préparer les cibles, de les marquer à l'aide d'une molécule fluorescente, et finalement de les mettre à "hybrider" sur la puce à ADN. Ainsi, en repérant puis en quantifiant le signal fluorescent sur chaque ADN sonde déposé sur la puce, l'état des cellules est caractérisé en une étape dans l'échantillon étudié, la globalité de l'analyse dépendant du nombre de sondes déposées sur la puce.

En radiobiologie, dans le domaine de l'évaluation des effets de l'irradiation, les *méthodes d'analyse globale* utilisant de telles puces permettront de mettre en évidence les mutations génétiques radio-induites. Elles serviront aussi à étudier les réponses cellulaires au *stress*, à caractériser les effets précoces de l'irradiation, à distinguer des marqueurs de radiosensibilité et à progresser dans la compréhension des relations doses-effets.

Le programme Biopuces du CEA vise maintenant à développer des puces comprenant jusqu'à 100 000 sites d'hybridation, contre 128 dans les premières biopuces, conçues avec Cis bio International. Différentes directions du CEA y participent, essentiellement la Direction des sciences du vivant et la Direction des technologies avancées par le biais du Laboratoire d'électronique, de technologie et d'instrumentation, le Leti. Le CEA a élargi en 1998 le cercle de ses partenaires industriels en s'associant, par exemple, avec bioMérieux, spécialiste des produits de diagnostic médical.

Biopuce, développée dans le cadre du programme Micam, de haute densité à 8 100 sites d'hybridation.

CEA/Studio Pons

DE LA RECHERCHE À LA RÉGLEMENTATION

Dès l'avènement des utilisations de l'énergie nucléaire, le besoin s'est fait sentir de prendre constamment en compte les progrès de la connaissance afin de donner la meilleure base scientifique possible à la réglementation protégeant les travailleurs et le public contre les effets potentiellement nocifs des rayonnements ionisants. Ces prochaines années, les experts devraient bénéficier de l'apport de très nombreux nouveaux résultats grâce à la conjonction de techniques ultra-précises d'irradiation expérimentale et des méthodes d'approche globale du génome. Le Comité scientifique des Nations unies sur les effets des radiations atomiques (Unscear) joue un rôle essentiel dans l'analyse et la synthèse des recherches les plus récentes pour évaluer toujours plus finement ces effets, notamment pour les faibles doses d'irradiation.

Le village de Borovaïa Glinka (Biélorussie) en 1994, contaminé après la catastrophe de Tchernobyl (Ukraine) en 1986.

A. Morkovkin/WOSTOK PRESS

Vers une "explosion" de résultats

C'est une véritable "explosion" de résultats en matière de radiobiologie qu'attendent pour les prochaines années les experts qui travaillent à fournir aux autorités les meilleures bases scientifiques possibles à l'élaboration des réglementations concernant l'exposition aux **rayonnements ionisants**. La moisson de résultats attendue est liée à des développements techniques sur les procédés d'irradiation, qui permettent de créer une lésion unique de l'**ADN** ciblée dans une cellule, et aux méthodes d'approche globale du génome et du fonctionnement cellulaire par l'étude du transcriptome et du protéome(1). Ceci devrait rendre possibles la mesure des modifications induites par une seule lésion radio-induite, et l'analyse de l'influence du contexte génétique et de l'environnement tissulaire sur la réponse.

Aujourd'hui, l'épidémiologie, et particulièrement l'étude des survivants d'Hiroshima et de Nagasaki (Japon) reste, malgré les incertitudes sur la dosimétrie effective, la principale source de renseignements pour la radioprotection. En effet, bien que les modèles expérimentaux soient de plus en plus documentés et les résultats sur les mécanismes et les effets du débit de dose de plus en plus nombreux, les synthèses scientifiques en radiobiologie se trouvent confrontées à plusieurs difficultés. Les résultats accumulés au cours des dernières décennies, tant sur les mécanismes de réparation des lésions et de la réponse **cellulaire** que sur ceux de l'instabilité génétique et de la transformation (voir *L'instabilité chromosomique et Cancers radio-induits*), permettent de comprendre les paramètres qui régissent certaines étapes du processus **mutagène** et/ou **cancérogène**. Toutefois, ces mécanismes sont encore insuffisamment connus pour autoriser une description générale en fonction de la nature des rayonnements, des **doses** et des **débits de dose** et de l'association à d'autres agents. L'abord direct des effets des faibles doses (encadré 1) est jusqu'à présent limité par la sensibilité des méthodes de détection et le nombre de paramètres pouvant être étudiés simultanément.

Le rôle de l'Unscear

Ces résultats de la recherche en radiobiologie doivent être rapidement pris en compte par les organismes internationaux qui fournissent une base scientifique aux autorités édictant les réglementations. Émanation de l'Organisation des Nations unies (ONU), l'Unscear(2) élabore ainsi, tous les cinq à sept ans, des documents scientifiques qui font l'analyse et la synthèse des données disponibles dans les domaines de la radiobiologie, de la radiopathologie, des expositions aux rayonnements et de leurs effets (encadré 2). Ces mises au point concernent le bilan des sources d'exposition, non abordé ici, et les effets biologiques des rayonnements ionisants, un des thèmes des recherches en radiobiologie traitées dans ce numéro. L'intérêt suscité par ces effets est justifié par leurs mécanismes d'action, qui s'appliquent à tous les types de cellules et s'avèrent, pour une grande part, être également en jeu dans d'autres contextes. Il l'est aussi par l'absence de spécificité apparente des cancers ou des effets héréditaires induits par les rayonnements.

La compréhension des mécanismes a pris une importance croissante par rapport à l'étude descriptive des effets observés. C'est ainsi qu'au cours des dix dernières années ont été abordés les mécanismes de la cancérogenèse radio-induite, l'influence du débit de dose sur les effets, la réaction adaptative, les effets sur l'environnement (synthèses publiées entre 1993 et 1996), les mécanismes de réparation de l'ADN et de la mutagenèse, les effets des faibles doses (à paraître). Ces documents traduisent l'approfondissement des connaissances. Ils ont aussi pour objectif de présenter, sur une base scientifique, les données récentes contribuant à l'estimation du risque d'effets **stochastiques**, nocifs ou bénéfiques, et de mettre en lumière les incertitudes ou méconnaissances que l'évolution des recherches devra combler.

(1) Le **protéome** définit la traduction, dans des conditions données, des gènes en protéines à partir de la transcription des ARN messagers, le **transcriptome** étant la partie exprimée du génome d'une cellule dans ces mêmes conditions.
(2) *United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation.*

Les faibles doses 1

Les faibles doses sont définies comme les doses pour lesquelles aucun effet, biologique ou sur la santé, ne peut être observé. Ce niveau dépend :

- des **moyens de diagnostic** permettant d'identifier des lésions spécifiques de l'action des rayonnements ionisants ;
- des **conditions de l'exposition**, la limite la plus basse correspondant aux irradiations aiguës ;
- de la **sensibilité de l'organisme**, les niveaux les plus faibles étant observés chez le fœtus et le jeune enfant ;
- de la **sensibilité de l'organe irradié**, thyroïde chez l'enfant par exemple. Chez l'adulte, les doses inférieures à 200 mSv en irradiation aiguë font partie du domaine des faibles doses. Chez l'enfant, des cancers de la thyroïde sont observés au-dessus de 100 mSv délivrés à cet organe. Chez le fœtus, les résultats sont controversés, mais il pourrait y avoir un risque de cancer au-dessus de 10 à 20 mSv.

Un ancien travailleur de l'usine Bayard de St-Nicolas-d'Aliermont (Seine-maritime) montre un réveil dont la fabrication impliquait une exposition significative au radium.

AFP

Les nouvelles orientations de la recherche

Les modèles cellulaires, les études expérimentales ***in vivo*** et l'**épidémiologie** concourent depuis longtemps à la mesure des effets des différents types de rayonnements, en terme d'efficacité relative, par exemple sur la nature et les taux de cassures de l'ADN, de modifications **chromosomiques**, de mort cellulaire, de **mutations**, de transformation et d'excès de cancers. Avec le développement de techniques plus performantes, les interactions entre l'étude des mécanismes des rayonnements *stricto sensu* et la compréhension du comportement physiologique au niveau cellulaire se sont accrues. Elles portent notamment sur le **cycle cellulaire**, la prolifération et la **différenciation**, l'**apoptose**, la réparation, la **réplication** et la recombinaison de l'ADN, les conditions d'induction de **gènes**, l'instabilité génétique… Au-delà de la physiologie, l'objectif commun à la radiobiologie et à la biologie cellulaire est de comprendre les mécanismes de réponse à des *stress* variés (oxydatif, thermique, radiatif…) et d'analyser les facteurs influençant le retour à l'équilibre. La frontière entre les deux disciplines est devenue ténue, comme le montrent de nombreux articles de ce numéro.

Le pivot de cette orientation commune est, sans conteste, l'ADN. La synthèse de l'Unscear sur sa réparation et la mutagenèse met en exergue les éléments qui ont récemment évolué. Seuls quelques exemples seront cités ici.

Le nombre et la répartition des lésions initialement induites doivent ainsi être revus avec des outils plus sensibles et spécifiques (voir *Les dommages radio-induits des acides nucléiques*). Il apparaît cependant que les dommages complexes sont probablement beaucoup plus

La matière première de l'Unscear : tous les faits, rien que les faits 2

L'Unscear[2] réunit des scientifiques représentant vingt et une nations. Il a été créé en 1955 au sein de l'ONU pour rassembler le maximum de données sur les niveaux d'exposition dus aux diverses sources de rayonnements ionisants et leurs conséquences biologiques, sanitaires et environnementales. Ce bilan, factuel et exhaustif, s'accompagne d'une analyse des mécanismes biologiques sous-jacents, afin d'expliquer les effets constatés et de fournir les bases d'une extrapolation aux doses où les effets sont considérés comme inexistants ou trop faibles pour être observables.

La liste des documents actuellement discutés par l'Unscear et devant être publiés en 2000 illustre l'ampleur de ces travaux, qui couvrent deux thèmes principaux :

- les **sources d'exposition**. L'Unscear en dresse un bilan régulier étayé par des données en provenance de tous les pays. Les rapports publiés périodiquement constituent une somme irremplaçable d'informations sur l'évolution des expositions des populations en fonction de l'origine des sources de rayonnements (naturelles, rayonnements ionisants d'origine humaine, expositions médicale et professionnelles) ;
- **l'évaluation des effets** L'Unscear étudie les résultats expérimentaux, l'estimation des doses, les données humaines, les modèles et les méthodes d'extrapolation. Il prépare dans ce domaine les documents suivants : méthodes d'estimation des doses, évaluation épidémiologique des cancers radio-induits, réparation de l'ADN et mutagenèse, effets héréditaires des rayonnements ionisants, effets combinés de l'irradiation et d'autres agents, effets biologiques aux faibles doses (modèles, mécanismes et incertitudes), expositions et effets de l'accident de Tchernobyl.

représentatifs de l'action des rayonnements que de celle d'autres mutagènes. Il n'est toutefois pas possible de prévoir la fréquence moyenne de mutations pour une dose donnée, en particulier parce que la réparation "non fidèle" de l'ADN peut elle-même être mutagène.

Sur le plan méthodologique, la conservation des mécanismes au cours de l'évolution permet d'utiliser des modèles simplifiés comme la **levure** (voir *Les gardiens du génome, Effets des rayonnements sur le cycle cellulaire*) pour rechercher chez les mammifères les nombreux gènes impliqués dans les effets précoces des rayonnements, des lésions initiales à la mutagenèse. Dans les cellules cancéreuses, les voies contrôlées par ces gènes (division cellulaire, apoptose) sont souvent déficientes.

L'étude de la radiosensibilité bénéficie de la connaissance de maladies génétiques de la réparation (*ataxia telangiectasia*, anémie de Fanconi…) qui s'accompagnent d'une sensibilité accrue aux rayonnements et d'un risque élevé de certains types de cancers. Leur analyse a confirmé l'intrication, la complexité et parfois la redondance des systèmes de réparation qui interviennent dans la réponse cellulaire précoce (réparation et recombinaison, cycle cellulaire, apoptose) comme dans l'instabilité différée (voir *L'instabilité chromosomique*). De plus, l'étude des systèmes complexes mis en œuvre au cours de la réparation a montré la multiplicité des fonctions des gènes impliqués dans la reconnaissance et la signalisation des dommages ainsi que dans le blocage du cycle cellulaire. Elle a également mis en évidence la coopération des différentes voies moléculaires pour le maintien de la stabilité du **génome** et la survie cellulaire, les gènes affectés à la réparation des cassures double brin opérant aussi dans des fonctions immunitaires. De ce fait, la radiosensibilité chez l'homme peut être liée à un bien plus grand nombre de gènes qu'initialement estimé.

Des mécanismes peu spécifiques

La recherche d'une lésion ou d'un mécanisme spécifiques des rayonnements apparaît de plus en plus complexe, du moins aux faibles expositions. En effet, certains des mécanismes décrits dans ce numéro sont mis en jeu aussi bien au cours de processus physiologiques, comme l'apoptose pendant l'embryogenèse ou l'instabilité génétique lors du vieillissement, qu'en réponse à des *stress* d'origine variée ou au cours de processus pathologiques comme la cancérogenèse. Même au niveau des dommages initiaux, le spectre des lésions radio-induites, bien que différent de celui des lésions spontanées, présente une très large plage de recouvrement. De nombreuses données indiquent que les mécanismes de formation de lésion et de réparation de l'ADN pourraient ne pas être identiques à fort et faible débits de dose et qu'une partie au moins des mécanismes mis en jeu seraient induits par une exposition préalable aux rayonnements ou à d'autres toxiques, modifiant la relation dose-effet.

Des domaines de recherche à développer

Sur le plan des effets héréditaires, la recherche s'est jusqu'à présent focalisée sur l'analyse des mutations **dominantes**. L'étude des mécanismes de transmission des mutations **récessives** et de leurs conséquences sur les générations à venir n'en est pas moins amenée à se développer (voir *Effets héréditaires des rayonnements ionisants*).

À côté des études sur les conséquences des lésions de l'ADN, celle de l'influence de facteurs épigénétiques(3) fait apparaître ces derniers comme autant d'éléments susceptibles de moduler, voire de modifier la réponse aux rayonnements, notamment aux faibles expositions. C'est le cas de la communication intercellulaire, de la sécrétion de médiateurs, du "*bystander effect*", c'est-à-dire de l'observation de lésions dans une cellule qui n'a pas été irradiée directement et du rôle des cellules du système immunitaire, en particulier les polynucléaires. Les rôles respectifs des mutations et des événements épigénétiques demeurent cependant largement méconnus et ne peuvent être prédits à partir des effets constatés aux doses élevées.

Faibles doses : des règles de protection spécifiques à terme

Les mesures de radioprotection prises au cours des soixante-dix dernières années ont fait disparaître dans le milieu professionnel les pathologies induites aux doses élevées, et limité les risques susceptibles d'être liés aux faibles expositions. La contribution de la radiobiologie à la radioprotection est triple : identifier et caractériser les effets et risques aux faibles expositions, déterminer les risques prépondérants en fonction à la fois des caractéristiques de la source et du sujet, proposer des relations dose-effet sur la base des résultats expérimentaux et de la connaissance des mécanismes. L'objectif est, à terme, d'établir directement les règles de protection aux faibles expositions, sans extrapolation.

Quels sont les effets et risques prépondérants aux faibles doses ? Jusqu'à présent, la radioprotection a eu pour but de protéger des conséquences des effets mutagènes : cancers et effets héréditaires. Dans la mesure où ces derniers n'ont pas été détectés chez l'homme, les efforts se sont concentrés sur les mécanismes de la cancérogenèse. L'intérêt potentiel des mutations récessives dans la survenue d'effets héréditaires (voir *Effets héréditaires des rayonnements ionisants*) ainsi que des résultats récents montrant l'importance des effets épigénétiques et l'influence de l'irradiation sur les fonctions immunitaires et le vieillissement(4) pourraient relativiser l'importance accordée au risque cancérogène.

Comment aborder l'estimation d'un risque à partir de synthèses scientifiques ? La radiobiologie apporte des résultats qualitatifs et quantitatifs. Au plan qualitatif, l'étude des effets des rayonnements ionisants se focalise sur

(3) Ces facteurs interviennent dans la réponse cellulaire, tissulaire et de l'organisme aux rayonnements ionisants. Ils se traduisent pas une modification, le plus souvent transitoire, de l'expression des gènes et des protéines sans modification du génome lui-même.
(4) Ces résultats sont renforcés par le dernier bilan de la surveillance des survivants d'Hiroshima et de Nagasaki qui montre un excès de mortalité due à des causes non cancéreuses comme les affections cardiaques, vasculaires cérébrales et pulmonaires au-delà d'un seuil de 0,5 à 1 Gy.

A. Morkovkin/WOSTOK PRESS

Contrôle de la thyroïde d'enfants dans un hôpital de la région de Gomel (Biélorussie) particulièrement affectée par la catastrophe de Tchernobyl (Ukraine).

l'identification des mécanismes moléculaires et cellulaires, à la fois pour comprendre les processus d'apparition de ces effets et caractériser les facteurs la modulant, comme la prédisposition génétique, les sensibilités selon l'âge ou le mode de fonctionnement du tissu irradié. Ces connaissances sont de plus en plus utilisées au plan quantitatif. L'étude de l'influence, en fonction de la nature du rayonnement, du débit de dose et des facteurs liés au sujet a montré l'importance de la radiosensibilité individuelle et celle, fondamentale, du débit de dose, tant sur les effets précoces comme la réparation de l'ADN que sur le taux de transformation ou de cancérisation. Aux faibles expositions, le débit de dose apparaît chaque jour davantage comme un paramètre plus pertinent que celui de la dose cumulée. Il soulève par ailleurs la discussion sur l'existence de "seuils", comme cela est observé depuis des années avec le radium 226 ou le *Thorotrast*, produit de contraste à base de thorium employé en radiologie. Cependant, les données quantitatives, directement obtenues aux faibles doses et débits de dose, sont encore insuffisantes, ce qui limite la prise en compte des mécanismes décrits dans l'analyse et la modélisation des risques mutagènes et cancérogènes.

(5) Commission internationale de protection radiologique (en anglais ICRP, *International Commission on Radiological Protection*).

Des approfondissements nécessaires

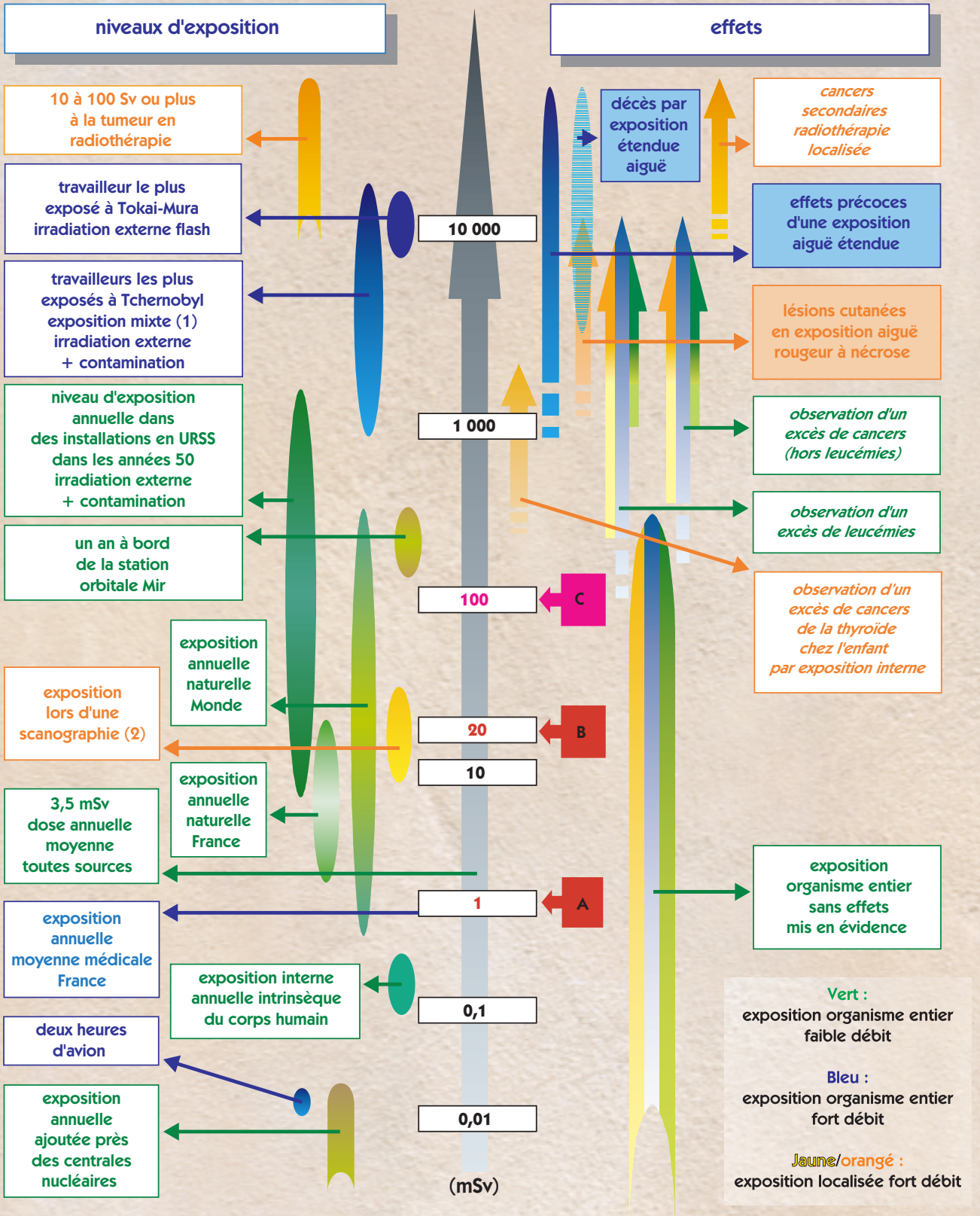
D'autres questions méritent d'être approfondies, notamment sur l'enchaînement des phénomènes biologiques entre l'exposition et l'effet, leur importance relative, l'influence de facteurs génétiques et environnementaux sur la cinétique et le niveau d'action des mécanismes mis en jeu ainsi que la réversibilité de certaines étapes. Des questions plus générales ne peuvent, actuellement, être systématiquement traitées à partir des résultats de la recherche. Elles portent sur la représentativité des résultats obtenus aux niveaux moléculaire et cellulaire et sur les incertitudes biologiques.

La compréhension des mécanismes aux faibles doses et débits de dose et surtout la quantification des effets apparaissent encore parcellaires, nécessitant le recours à des modèles extrapolant aux "faibles doses" les effets observés aux doses plus élevées, essentiellement grâce à l'épidémiologie (encadré 1). Dans ce contexte, le rôle de l'Unscear n'est pas tant de proposer les modèles les plus pertinents, mission de la CIPR[5], mais plutôt de transmettre le point de vue des scientifiques sur la représentativité des phénomènes biologiques et sur les limites de validité des modèles qui en sont issus. C'est d'ailleurs un des sujets analysés dans le document sur les faibles doses.

Deux tendances se manifestent à l'Unscear sur l'analyse du risque cancérogène. Le premier point de vue prône comme règle générale la réalité biologique de la relation linéaire sans seuil (en anglais LNT, pour *Linear Non Threshold*), tout en admettant des nuances. L'initiation des mutations par les rayonnements est alors considérée comme l'étape prépondérante. Le second, tout en reconnaissant que la LNT est un outil pratique pour la radioprotection, ne considère pas l'extrapolation sans seuil comme une réalité biologique. C'est d'abord l'atténuation des effets avec la diminution du débit de dose qui a justifié ce point de vue puis, plus récemment, l'influence de la densité des lésions sur les mécanismes de réparation de l'ADN et sur ceux de la réponse cellulaire.

La conclusion – provisoire – est qu'en l'absence d'une synthèse sur l'ensemble des mécanismes mis en jeu aux faibles doses et de la quantification de l'effet résultant, il est proposé de maintenir l'hypothèse de l'extrapolation linéaire sans seuil avec une réserve sur la forme de la relation dose-effet, incertaine en dessous de 100 mGy (faible **transfert linéique d'énergie**). Sur ce point aussi, le progrès des connaissances devrait s'accélérer de manière significative.

Anne Flüry-Hérard
Direction des sciences du vivant
CEA/Paris



Échelle de correspondance (en millisieverts) des niveaux d'exposition aux rayonnements ionisants et des effets sanitaires

N.B. : La dose efficace (sievert) a été utilisée pour l'ensemble de l'échelle dans un souci de simplification et pour utiliser en parallèle les données d'exposition et les résultats d'épidémiologie. Nous attirons l'attention du lecteur sur le fait que cette unité n'est pas adaptée aux effets déterministes : aux fortes doses à fort débit, le gray est l'unité de référence.

A limite pour le public d'exposition annuelle ajoutée par les activités humaines hors médecine dans l'Union européenne (UE)
B limite d'exposition annuelle pour les travailleurs dans l'UE : 100 mSv/5 ans, sans dépasser 50 mSv/an soit 20 mSv/an en moyenne
C valeur guide de dose à la thyroïde pour la prise d'iode en cas d'accident (France)

Fond coloré : effets déterministes ; gravité proportionnelle à la dose
En italique : effets aléatoires ; probabilité d'apparition proportionnelle à la dose

(1) bulletin AIEA Vol. 41, p. 15
(2) dose efficace (rapport Lacronique - Bonin)

GLOSSAIRE

acide nucléique : polymère constitué par l'enchaînement de **nucléotides**. Il en existe deux types : les ARN et l'ADN

activation de la transcription : activation de l'expression des gènes

adénome : tumeur **épithéliale** bénigne affectant une glande

amplification génique : augmentation forte du nombre de copies d'un ou plusieurs gènes. ***In vivo***, elle se produit au cours de la transformation cancéreuse des cellules ou en réponse à un traitement toxique pour la cellule

aneuploïdie : nombre anormal de chromosomes dans une cellule, en plus ou en moins

antigène : molécule capable de provoquer une réponse immunitaire (induction d'anticorps)

anti-oncogène : gène qui empêche la transformation cellulaire, donc la formation de tumeurs

apoptose : suicide cellulaire (mort programmée de la cellule)

bactérie : micro-organisme, généralement unicellulaire, ne comportant pas de noyau et se multipliant rapidement

biopsie : prélèvement d'un petit fragment de tissu sain ou tumoral effectué dans un but de diagnostic

cancérigène : un agent physique ou chimique est dit cancérigène lorsqu'une exposition à cet agent entraîne une augmentation de l'incidence de cancers

cancérogenèse : ensemble des étapes conduisant à l'apparition d'un cancer

carcinome : cancer des cellules **épithéliales**

cellule souche : cellule pouvant se diviser indéfiniment et donner naissance à des cellules filles capables de subir une **différenciation**

***checkpoint* :** point de contrôle spécifique du cycle cellulaire permettant de le réguler en fonction de l'état de la cellule et de son environnement

clone : population de cellules (ou organisme) formé(e) par divisions répétées à partir d'une cellule commune. Si les cellules appartenant à un même clone prolifèrent plus vite ou meurent moins que les autres cellules de la population, elles vont en représenter un pourcentage de plus en plus important car elles ont un *avantage prolifératif* : il y a *expansion clonale*

cloner (un gène) : en produire de multiples copies grâce à des cycles répétés de réplication (duplication)

clonogénicité : test qui permet d'évaluer la *transformation cellulaire* et ce dans des conditions peu favorables, en très faible concentration ou sur un support empêchant tout accrochage des cellules

co-protéase : facteur nécessaire à l'activité de dégradation enzymatique d'une protéine

cyclines : protéines intervenant dans la régulation du cycle cellulaire

cytogénétique : basé sur l'étude de la structure des chromosomes

délétion : perte de matériel génétique, du **nucléotide** au fragment de chromosome

dicentrique : chromosome à deux centromères (constrictions) résultant d'une coupure de deux chromosomes à une de leur extrémité puis réassociation entre eux

différenciation cellulaire : processus par lequel une cellule se transforme, au cours du développement embryonnaire, en un type cellulaire spécialisé

endoreduplication : duplication de l'ADN sans la séparation des chromosomes ni celle des cellules filles

enzyme : protéine qui catalyse une réaction biochimique

enzyme de restriction : protéine qui peut couper une molécule d'ADN en des sites bien précis correspondant à une **séquence** particulière de **nucléotides**

épidémiologie : science étudiant les rapports entre les pathologies et divers facteurs susceptibles d'exercer une influence sur leur fréquence, leur distribution et leur évolution

épithélial : qui se rapporte aux couches de cellules recouvrant une surface externe ou doublant une cavité

exérèse thérapeutique : ablation d'un tissu pathologique dans le cadre d'un traitement

facteur de survie : molécule déclenchant des réactions intracellulaires favorisant la survie

facteur de transcription : toute protéine intervenant dans l'initiation ou le contrôle de l'expression des gènes

fibroblaste : cellule du tissu conjonctif synthétisant des fibres protéiques (collagène) et de nombreuses substances fondamentales. Elle prolifère bien en culture cellulaire

gamète : cellule reproductive mâle ou femelle

gène suppresseur de tumeur (ou anti-oncogène) : gène qui s'oppose à la transformation d'une cellule en une cellule cancéreuse

génotoxique : toxique vis-à-vis des gènes car entraînant des dommages de l'ADN

génotype : ensemble des gènes d'un individu

hématie : globule rouge du sang

hématopoïèse : génération des cellules sanguines, dans la moelle osseuse

hémopathie : maladie du sang

hormone : substance qu'une glande déverse directement dans le sang qui la transporte vers un organe cible où elle agit

hypodiploïdie : se dit de cellules diploïdes, possédant deux jeux de chromosomes homologues et donc deux copies de chaque gène, ayant perdu un ou plusieurs chromosomes ; **hypotétraploïdie :** se dit de cellules, dotées de quatre jeux de chromosomes homologues et donc de quatre copies de chaque gène, ayant perdu un ou plusieurs chromosomes

immortalisation : acquisition par des cellules eucaryotes (cellules comportant un noyau) de la capacité de se multiplier indéfiniment ***in vitro***. Caractéristique fondamentale des cellules cancéreuses

in vitro* :** (en latin "dans le verre") par référence aux analyses pratiquées à l'origine dans des récipients en verre, tout ce qui concerne les examens en laboratoire sur des produits biologiques hors de l'organisme vivant, par opposition à ***in vivo ("dans le vivant")

inversion : retournement d'une **séquence** plus ou moins longue d'ADN

kinase : enzyme transférant des groupements phosphates (**phosphorylation**) sur des protéines (cette enzyme est alors appelée protéine kinase) ou sur des lipides (lipide kinase)

létalité : mortalité

levure : champignon microscopique unicellulaire se reproduisant normalement de façon asexuée, par bourgeonnement (mitose asymétrique), mais pouvant aussi se reproduire de façon sexuée

lignée cellulaire : population de cellules d'un type donné capables de se diviser indéfiniment en culture

lignée germinale : descendance de cellules à l'origine de la production de **gamètes**

lymphocyte : globule blanc qui produit une réponse immunitaire quand il est activé par une molécule étrangère (un antigène)

macrophage : globule blanc spécialisé dans la capture, l'ingestion et la digestion de particules (phagocytose)

malignité : se dit de tumeurs ou de cellules tumorales qui sont invasives et/ou capables de métastaser

métabolisme : ensemble des processus chimiques qui se produisent dans les cellules vivantes

métabolite : substance organique qui est formée au cours des processus du **métabolisme** (synthèse ou dégradation) ou qui y participe

mutagène : qui augmente la fréquence des **mutations**

mutagenèse : introduction de **mutations** dans un ADN

mutant : cellule ou organisme dont le matériel génétique a subi une ou des **mutation(s)**

mutation : altération transmissible du message génétique par modification d'une **séquence** de **nucléotides** de l'ADN ; **mutation ponctuelle :** altération limitée à un seul **nucléotide**

nécrose : mort cellulaire massive entraînant une inflammation

neuroblastome : tumeur affectant les neuroblastes, cellules nerveuses embryonnaires destinées à former les neurones

nucléotide : composé constitué d'une base (purique ou pyrimidique), d'un sucre et d'un groupement phosphate

oligonucléotide : court fragment d'ADN composé de **nucléotides**

oncogène : gène qui favorise la transformation cellulaire et à ce titre un des nombreux gènes qui contribuent à l'apparition de tumeurs cancéreuses. Forme **mutante** d'un gène normal (**proto-oncogène**) impliqué dans le contrôle de la croissance ou de la division cellulaire

oncologie : étude des tumeurs cancéreuses

phénotype : caractères apparents d'un individu résultant de l'expression de l'ensemble de ses gènes

phosphoryler : transférer un groupement phosphate sur un substrat (lipide ou protéine)

polymérase : enzyme qui catalyse la synthèse de macromolécules **séquencées**, comme l'ADN (ADN polymérase) et l'ARN (ARN polymérase)

polyploïdie : se dit d'une cellule contenant plus de deux jeux de chromosomes homologues ; **triploïdie :** trois jeux de chromosomes homologues et donc trois copies de chaque gène ; **tétraploïdie :** quatre jeux de chromosomes homologues et donc quatre copies de chaque gène

primaire (cellule) : cellule qui n'a pas été modifiée (**immortalisation** par un virus, cancéreuse…)

proto-oncogène : voir **oncogène**

radiolyse : décomposition de matière par des rayonnements ionisants

remaniement clonal : remaniement chromosomique retrouvé dans toutes les cellules d'une population

répresseur de transcription : protéine qui inhibe l'expression des gènes

sarcome : cancer du tissu conjonctif (peau, os…)

sauvage : ne présentant pas de **mutation** dans les gènes étudiés

sénescence : état dans lequel les cellules entrent après un nombre limité de divisions cellulaires (vieillissement)

séquençage : détermination de l'ordre des **nucléotides** (**séquences**) dans les polymères biologiques (ADN, ARN, protéines)

souche : ensemble d'individus présentant le même **génotype**

stochastique : qui comporte la présence d'une ou de plusieurs variables aléatoires

transcription : processus permettant la synthèse d'une molécule d'ARN à partir d'une matrice d'ADN par un mécanisme reposant sur la complémentarité des bases, puis la synthèse des protéines

transcrit : ARN messager issu de la copie d'un des brins de la molécule d'ADN (**transcription**)

transfection : introduction d'un matériel génétique étranger (notamment viral) dans une cellule

transgénique : cellule incorporant un ou plusieurs gènes étrangers ou organisme dont toutes les cellules contiennent ce ou ces gènes et pouvant les transmettre à sa descendance

translocation : transfert éventuellement réciproque d'un fragment de chromosome vers un autre suite à la cassure des deux chromosomes

tumorigénicité : capacité de cellules transformées à induire la formation de tumeurs lorsqu'elles sont injectées à des animaux de même **souche** ou des souris *nude* dépourvues de défenses immunitaires

voie de contrôle : voir ***checkpoint***

QU'EST-CE QUE LA RADIOACTIVITÉ?

Les radionuclides sont des noyaux atomiques instables. Certains sont présents naturellement dans l'homme et l'environnement. Tôt ou tard, ces noyaux instables se transforment pour atteindre un état plus équilibré. Cela s'accompagne de l'émission de particules ou de radiations. C'est ce qu'on appelle la radioactivité. On parle aussi de rayonnements ionisants parce qu'ils ont une énergie suffisante pour arracher des électrons et donc pour ioniser la matière. L'homme peut produire des rayons ionisants, tant à l'aide d'instruments (p.ex. des rayons-X) que par la fabrication de radionuclides artificiels (p.ex. dans des centrales nucléaires ou des accélérateurs de particules). L'unité de radioactivité est le becquerel, symbole Bq. Un becquerel correspond à une désintégration par seconde.

Toute matière est constituée d'atomes. Chaque atome comprend un noyau autour duquel tournent des particules, les électrons. Le noyau est composé de particules appelées protons et neutrons. Certains noyaux atomiques sont stables, ils ne changent pas. Pour d'autres, l'équilibre est rompu à cause d'un excès d'énergie. Ces noyaux sont instables, c'est-à-dire radioactifs.

Qu'est-ce que le rayonnement radioactif ?

Tôt ou tard, chaque noyau instable possédant un excès en énergie va se transformer spontanément pour atteindre l'équilibre. Cela s'accompagne d'une libération d'énergie sous la forme de rayonnement. Ce rayonnement n'est rien d'autre qu'une très petite particule très énergétique ou une onde émises par le noyau. C'est l'émission de ces particules ou ondes qu'ion appelle la radioactivité.

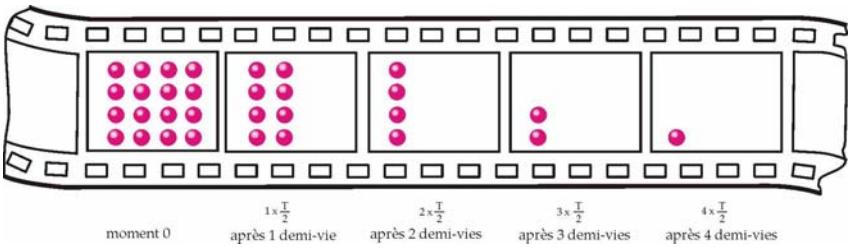
La radioactivité diminue avec le temps : temps de demi-vie.

La rapidité avec laquelle les noyaux atomiques émettent le rayonnement radioactif détermine leur durée de vie. Plus rapide est l'émission, plus courte sera la durée de vie. De même qu'un incendie s'éteint avec le temps, de même s'amenuise l'activité des matières radioactives. Cet amenuisement est appelé la décroissance radioactive.

Le temps nécessaire pour que l'activité retombe à la moitié de la valeur originelle s'appelle la durée de demi-vie (période).

Quelques exemples de durée demi-vies

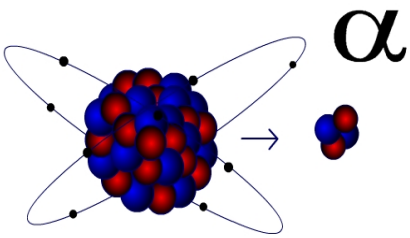
Iridium-191	4,9	secondes
Jodium-123	13	heures
Iridium-192	74	jours
Cobalt-60	5,27	ans
Cesium-137	30	ans
Carbone-14	5 730	ans
Plutonium-239	24 065	ans
Iode-129	15 700 000	ans
Uranium-235	704 000 000	ans



Représentation schématique de la durée de demi-vie. Après chaque période, la moitié de la matière radioactive restante a décru.

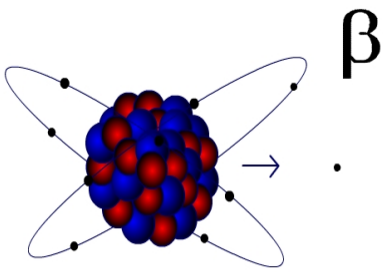
Il y a diverses sortes de rayonnements.

Le rayonnement Alpha



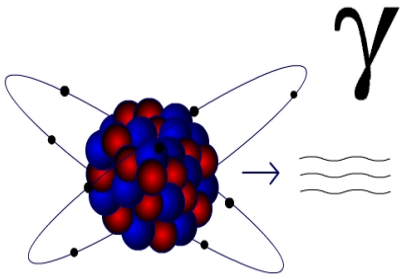
Les particules alpha émises par les noyaux atomiques sont relativement lourdes et grosses. Elles ont une forte charge électrique. Les particules alpha ne sont pas fort pénétrantes et peuvent être facilement arrêtées: quelques centimètres d'air, une feuille de papier ou la corne de l'épiderme humain sont suffisants.

Le rayonnement bêta



Une particule bêta est beaucoup plus légère qu'une particule alpha et a une charge moitié moindre. C'est pourquoi elle est moins facilement freinée et pénètre donc plus profondément dans la matière. Pour retenir les particules bêta, il faut par exemple quelques centimètres de plexiglas ou d'aluminium et jusqu'à quelques mètres d'air.

Rayonnement gamma



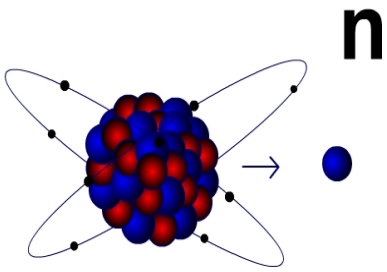
Les rayons gamma sont des ondes d'énergie. Ils n'ont pas de masse. Les ondes sont de la même nature que la lumière, les rayons infrarouges ou ultraviolets. Les rayons gamma ont un pouvoir pénétrant très grand dans la matière. Ils ne peuvent être arrêtés que par quelques centimètres ou mètres de matière à haute densité, comme le fer, le plomb ou le béton, en fonction de l'énergie du rayonnement.

Les rayons gamma traversent des centaines de mètre d'air sans perte apparente d'énergie.

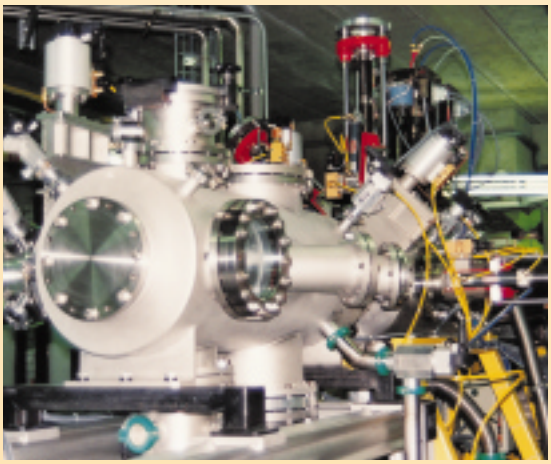
Les rayons-X

Ils sont comparables aux rayons gamma mais sont moins énergétiques et pénètrent donc moins profondément dans la matière.

Le rayonnement neutronique



Le rayonnement neutronique est le terme utilisé en physique nucléaire pour la libération de neutrons. Les neutrons sont présents dans le noyau et, comme leur nom l'indique, sont des particules neutres (donc sans charge électrique). La masse d'un neutron est quatre fois moindre que celle d'une particule alpha. Les neutrons libérés peuvent heurter d'autres noyaux atomiques et réagir avec eux. Si ces noyaux en deviennent radioactifs, ont parle d'activation neutronique. Un neutron peut quelques fois provoquer la fission d'un noyau, comme celui de l'uranium par exemple. Il est très difficile de confiner les neutrons



Ganil/ULP

Ions lourds. ***Chambre d'irradiation sur la ligne située dans la salle d'expérimentation D1 au Grand accélérateur national d'ions lourds (Ganil, CEA-CNRS). Elle se caractérise par une surface utilisable restreinte (2,5 cm²) mais très homogène d'ions dont l'énergie peut varier de de 0,1 à 95 MeV par nucléon et dont le flux largement modulable permet d'obtenir des doses moyennes de quelques cGy à plusieurs milliers de Gy. Une autre aire (G4) est dédiée à l'irradiation d'échantillons biologiques de grande taille.***

Rayonnements ionisa

Afin d'étudier les effets des rayonnements ionisants sur la matière vivante, les chercheurs disposent de sources d'irradiation très diverses. Ces sources sont choisies en fonction soit de la nature du rayonnement, soit des applications recherchées. De la première vont dépendre son mode d'interaction avec la matière et donc les effets biologiques. Ce choix doit également prendre en compte certaines contraintes expérimentales liées par exemple au parcours du rayonnement dans la matière.

Reproduire des conditions d'exposition naturelles, accidentelles ou thérapeutiques

Les objectifs de l'expérimentation en radiobiologie sont de natures très diverses. Des expériences cherchent à reproduire les différents types d'exposition à des rayonnements naturels, comme ceux du radon auxquels sont exposés plus particulièrement la population des régions granitiques et les mineurs qui extraient le minerai d'uranium, ou le rayonnement ultraviolet solaire. Certaines visent à reproduire les effets d'expositions accidentelles : accidents avec des sources de gammagraphie ou accidents de criticité. D'autres, enfin, servent à évaluer les effets d'expositions thérapeutiques telles que la radiothérapie pour le traitement

Rayonnements électromagnétiques ou particulaires

Les **rayonnements électromagnétiques** peuvent être soit des **rayons X**, utilisés par exemple en médecine pour le diagnostic ou des **rayonnements gamma** émis par les atomes **radioactifs**, naturels ou artificiels. Ces rayonnements sont de même nature que la lumière, les ondes radio ou les micro-ondes ou encore les **rayons ultraviolets** (**UV**) émis par le soleil.

Les **rayonnements "particulaires"** sont composés de particules chargées positivement (les **positons**, les **protons**, les **ions alpha** ou les **ions lourds**), négativement (les **électrons**) ou non chargées (les **neutrons**). Ils constituent l'essentiel des **rayonnements cosmiques**.

Dépôt d'énergie à l'échelle microscopique : de moins de 1 à plusieurs centaines de keV/µm

Les rayonnements cèdent, de façon discontinue et aléatoire, tout ou partie de leur énergie à la matière qu'ils traversent.

L'importance des dépôts d'énergie à l'échelle microscopique (voir *Des outils physiques pour étudier les lésions radio-induites*) est souvent exprimée en terme de **transfert linéique d'énergie** (***TLE***). La valeur moyenne du *TLE* varie de moins de 1 kiloélectronvolt par micromètre (keV/µm) (1µm = 0,001 mm) pour les rayonnements électromagnétiques à plusieurs centaines de keV/µm pour des ions lourds. Lorsqu'il s'agit de neutrons, les transferts d'énergie couvrent l'ensemble de ce spectre.

Compte tenu de la variabilité des dépôts d'énergie, pour une même **dose**, l'**effet biologique** dépend du type de rayonnement. Comparer, par exemple, l'effet des rayonnements alpha et des rayonnements gamma revient un peu à comparer l'effet sur une cible d'un boulet de canon par rapport à de la mitraille : même si la quantité de projectile est identique, les dégâts seront différents.

Ainsi, dans le cas des particules alpha, quand la dose décroît, c'est le nombre de cellules atteintes qui devient moindre mais pas le niveau de l'impact sur les cellules touchées, alors que pour les rayonnements gamma, c'est la quantité d'énergie cédée par cellule qui diminue et non pas le nombre de cellules touchées.

Les rayons de la radioactivité

radioactivité : processus par lequel certains **(radio)nucléides**, qui sont instables du fait de leur nombre de nucléons (protons d'une part, neutrons de l'autre) et/ou de leur état énergétique, subissent une désintégration spontanée, avec dégagement d'énergie, aboutissant généralement à la formation de nouveaux nucléides. Ce phénomène s'accompagne de l'émission d'un ou de plusieurs types de rayonnements

transfert linéique d'énergie (***TLE***) : énergie transférée d'une particule au milieu traversé par unité de longueur. Cette grandeur s'exprime en kiloélectronvolt par micromètre (keV/µm)

rayonnement neutronique : non chargé, le neutron n'est arrêté que par des noyaux. La pénétration du rayonnement dépend de l'énergie des neutrons, dont le *TLE* est élevé. Une forte épaisseur de béton, d'eau ou de paraffine les arrête. Ce sont les éléments légers qui arrêtent les neutrons car la masse du noyau est proche de celle du neutron

rayonnement alpha : formé de noyaux d'hélium (deux protons et deux neutrons), il est très peu pénétrant. Une feuille de papier l'arrête et son trajet ne dépasse pas quelques dizaines de micromètres dans les tissus biologiques. Ce rayonnement est donc fortement ionisant (*TLE* élevé) car ces particules cèdent toute leur énergie sur un faible parcours. Pour les **radionucléides** qui émettent des alpha, le risque est donc celui d'une exposition interne

rayonnement bêta : constitué d'électrons (radioactivité bêta moins) ou de positons (radioactivité bêta plus). Ces particules au *TLE* faible sont arrêtées par quelques mètres d'air, une feuille d'aluminium ou sur quelques millimètres d'épaisseur dans les tissus biologiques

rayonnement gamma : composé de photons peu ionisants (*TLE* faible) mais très pénétrants (plus que ceux des rayons X utilisés en radiodiagnostic) pouvant parcourir plusieurs centaines de mètres dans l'air. D'épais écrans de béton ou de plomb sont nécessaires pour s'en protéger

nts et matière vivante

de cancers ou l'utilisation de lasers en médecine, par exemple pour la correction de certains troubles visuels. Sont également menées des recherches plus fondamentales destinées à mieux comprendre les mécanismes d'action des rayonnements sur la matière, utilisant en particulier des **ions lourds** ou des **neutrons** monoénergétiques.

Des conditions expérimentales adaptées

Les possibilités d'irradiation dépendent à la fois des caractéristiques des sources et de la nature de l'échantillon biologique.

Le **parcours des rayonnements dans la matière** est l'un des critères importants. Cette distance est fonction de la nature et de l'énergie du rayonnement. Des rayons X, gamma ou des neutrons sont capables de traverser le corps entier, même s'il existe une différence très importante entre la dose déposée à l'entrée et celle délivrée à la sortie ; des particules **bêta** parcourent plusieurs millimètres, mais des particules alpha seulement quelques dizaines de micromètres. Dans ce cas, pour irradier des cellules en culture, il est nécessaire de les faire proliférer sur un support très mince comme du *Mylar*, car les ions seraient arrêtés par l'épaisseur de plastique des flacons de culture classiques. De même, la surface utilisable pour les irradiations, c'est-à-dire là où le rayonnement est homogène, peut être réduite à quelques centimètres carrés. Aussi limitées que possible, les expériences sur des animaux ne sont donc effectuées qu'avec certaines sources.

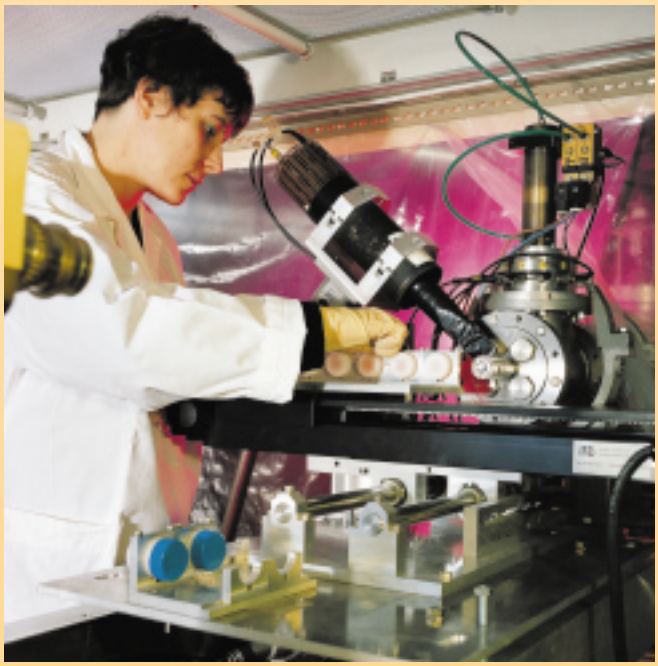
Les sources mises en œuvre sont de différents types : elles vont des plus simples, comme les irradiateurs du type "four de cuisine" à des salles d'irradiation voire à des machines complexes. Les premières sont utilisables directement par les biologistes 24 h sur 24 et n'exigent pas une formation approfondie des opérateurs. Dans les secondes, les caractéristiques physiques du rayonnement sont meilleures, mais elles nécessitent la présence de personnes qualifiées, compte tenu du risque d'exposition. Enfin, les expériences dans les installations les plus importantes sont planifiées plusieurs mois à l'avance après avoir été validées par un comité scientifique (*voir les exemples photographiés*).

A. Gonin/CEA

Rayonnement gamma. ***Irradiateur IBL 637 installé au CEA/Fontenay-aux-Roses. Particulièrement simple, il permet d'irradier du matériel biologique, ici des cellules dans leur milieu de culture, par une source de césium 137.***

Rayonnements ionisants ou non ionisants

La façon dont les rayonnements interagissent avec la matière les définit comme **rayonnements ionisants**, c'est-à-dire suffisamment énergétiques pour ioniser certains atomes du matériau traversé en leur arrachant des électrons, ou comme **rayonnements non ionisants**, tels les rayons ultraviolets. Les rayonnements ionisants peuvent l'être *directement* (c'est le cas des faisceaux de particules chargées : électrons, protons, particules alpha ou d'ions lourds) ou *indirectement* (cas des photons des rayons X ou gamma et des neutrons).



CEA

Rayonnement alpha. ***Sur la ligne de faisceau de l'accélérateur tandem de 7 MV utilisé pour des irradiations de cellules en culture au Laboratoire de radiotoxicologie du CEA à Bruyères-le-Châtel, la gamme d'énergie, de 2 à 15 MeV, autorise des débits de dose de 0,1 à plus de 300 Gy/mn. Par ailleurs, des sources d'actinides, plutonium 239 ou américium 241, couvrent une gamme d'énergie de 4 à 5 MeV avec des débits de dose de 0,05 et 0,2 Gy/mn respectivement.***

Il y a dose et dose…

dose absorbée : quantité d'énergie absorbée en un point par unité de masse de matière (inerte ou vivante), selon la définition de la Commission internationale des unités et des mesures radiologiques (ICRU). Elle s'exprime en **grays** (Gy) : 1 gray correspond à une énergie absorbée de 1 joule par kilogramme de matière. La *dose absorbée à l'organe* est obtenue en faisant la moyenne des doses absorbées en différents points, selon la définition de la Commission internationale de protection radiologique (CIPR)

débit de dose : intensité d'irradiation (énergie absorbée par la matière par unité de masse et de temps). L'unité légale est le gray par seconde (Gy/s), mais le Gy/mn est couramment utilisé

efficacité d'un rayonnement : un rayonnement est dit plus efficace qu'un autre lorsque l'effet obtenu pour une même dose est plus important ou quand la dose nécessaire pour observer un effet est plus faible

dose équivalente : quantité de dose absorbée, pondérée par des **facteurs de qualité**, différents selon les rayonnements car déterminés en fonction de leur efficacité biologique pour des effets **stochastiques**. Par exemple, les rayonnements alpha sont considérés comme 20 fois plus nocifs que les rayonnements gamma. Elle se calcule en **sieverts** (Sv)

dose efficace : c'est une grandeur qui a été introduite pour tenter d'évaluer le détriment en terme d'effets **stochastiques** au niveau du corps entier. Calculée à partir de la dose équivalente pour chaque partie du corps, la dose efficace tient compte des sensibilités différentes des tissus qui se traduisent par des **facteurs de pondération** par organe. Elle s'exprime en sieverts (Sv)

dose engagée : à la suite d'une exposition interne, c'est la dose cumulée reçue dans les cinquante années (pour les travailleurs et les adultes) ou jusqu'à l'âge de soixante-dix ans (pour les moins de 20 ans) suivant celle de l'incorporation du **radionucléide**, si celui-ci n'a pas disparu auparavant par décroissance physique ou élimination biologique

I. LES LÉSIONS DE L'ADN

Le dommage initial : l'espace d'une fraction de seconde

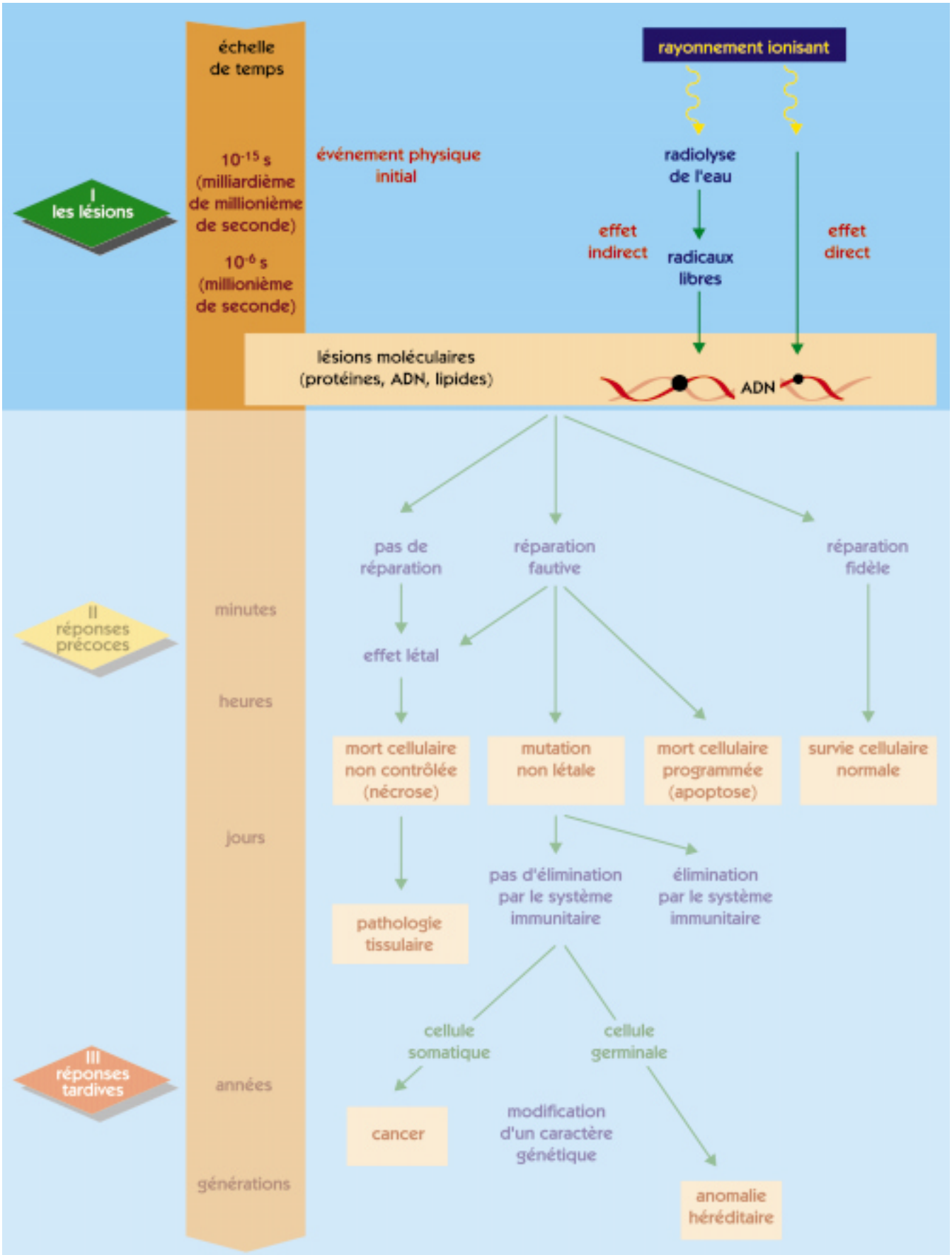
Lorsqu'un rayonnement pénètre dans la matière, que celle-ci soit inerte ou vivante, il peut interagir avec les atomes rencontrés et perdre à chacune de ces interactions une partie de son énergie : c'est l'affaire d'une infime fraction de seconde. Cette énergie cédée sur place est transférée au milieu traversé, ce qui se traduit par des ionisations (arrachement d'électrons) et des excitations transitoires des atomes concernés. Les premières induisent des modifications structurales de la matière.

Dans un organisme vivant, la molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) est un constituant important des cellules, représentant plus d'un dixième de leur poids sec. Environ cinquante milliards de kilomètres d'ADN se trouvent en effet accumulés dans le noyau des quelque cinquante mille milliards de cellules d'un organisme humain. Cette molécule d'ADN, célèbre par sa structure à deux brins complémentaires organisée en double hélice, constitue le support de l'information génétique, d'où l'importance de son intégrité. Elle est comparable à un livre dont les phrases, les gènes, seraient composées de mots comprenant trois lettres choisies dans un alphabet chimique de quatre lettres (les quatre bases).

D'autres molécules, tout aussi indispensables à la vie, sont également susceptibles d'être affectées par les rayonnements ionisants : les molécules d'eau. Solvant de toutes les molécules de la cellule, l'eau occupe une place particulière puisqu'elle représente plus des deux tiers du poids du corps humain. Les rayonnements ionisants sont capables d'agir sur l'ADN de façon directe, par ionisation des atomes de cette molécule, et d'induire des modifications locales de la double hélice. Les mêmes dégâts peuvent être causés de façon indirecte, par ionisation d'une molécule d'eau. La décomposition de l'eau par les rayonnements ionisants génère en effet des espèces chimiques qui sont instables car elles possèdent un électron non apparié. Ce sont de puissants réactifs qui, s'ils sont créés au voisinage de l'ADN, vont l'oxyder. L'action des rayons ultraviolets et de certains toxiques chimiques conduit également à la formation de ces espèces actives de l'oxygène intervenant en outre dans les mécanismes du vieillissement cellulaire. Que les rayonnements ionisants agissent directement ou indirectement sur l'ADN, il en résultera des modifications du même type. Ces lésions, que ce soient des dégradations ou des disparitions de bases, des cassures de l'un ou des deux brins de la chaîne d'ADN ou encore des pontages entre cette molécule et certaines protéines, perturberont la conservation du patrimoine génétique. Diverses techniques d'analyse servent à étudier les changements de structure de la molécule endommagée.

Tous ces phénomènes moléculaires interviennent sur une durée très brève, entre un millionième et un millième de seconde au total. Pour les étudier sur un plan pratique, au-delà du concept global de dose absorbée, qui quantifie l'énergie déposée, la technique de la microdosimétrie permet d'étudier la géométrie microscopique du dépôt d'énergie en découpant en très petits volumes l'espace autour de la trace de la particule ionisante. Cette approche facilite l'évaluation des dégâts infligés à l'ADN et contribue, en complément des recherches sur les mécanismes fondamentaux, à mieux expliquer l'action des rayonnements.

Christine Jimonet
Institut national des sciences et techniques nucléaires
CEA/Saclay



Effets biologiques des rayonnements ionisants. Évolutions possibles au niveau cellulaire en fonction du temps.

N.B. *Tous les événements indiqués n'ont pas la même probabilité de se produire. La survie cellulaire normale, par exemple, est le cas le plus fréquent après réparation de l'ADN.*

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.

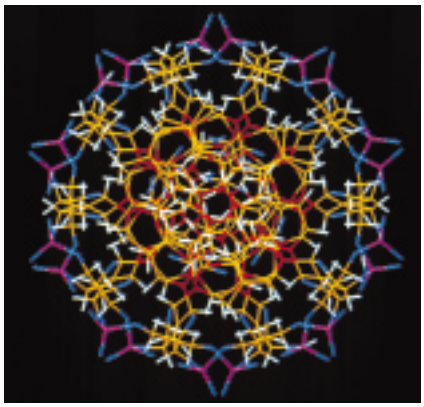
Lecture d'un autoradiogramme. Chaque groupe de quatre bandes sombres correspond à la séquence nucléotidique des quatre bases (adénine, guanine, cytosine et thymine) d'un fragment d'ADN. La dégradation de ces bases est une des principales modifications que les rayonnements ionisants peuvent provoquer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

S. Stammers/SPL/COSMOS

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 (**létalité**) 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.

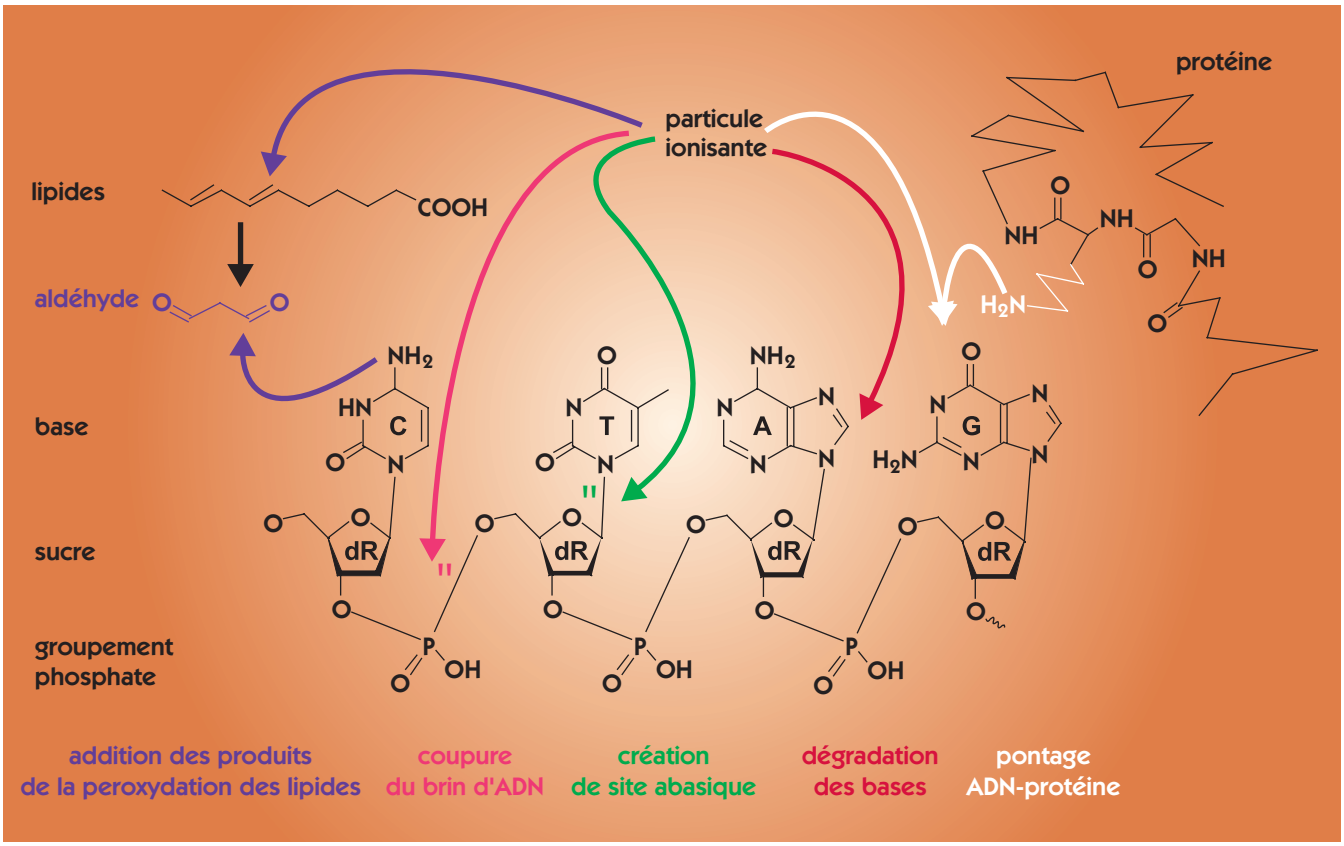
Le deuxième processus d'endommagement radio-induit de l'ADN est essentiellement *indirect*. Il implique des espèces réactives provenant de la décomposition sous l'effet des rayonnements des molécules d'eau un peu distantes de l'ADN (**radiolyse**). Ces espèces réactives sont essentiellement le radical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



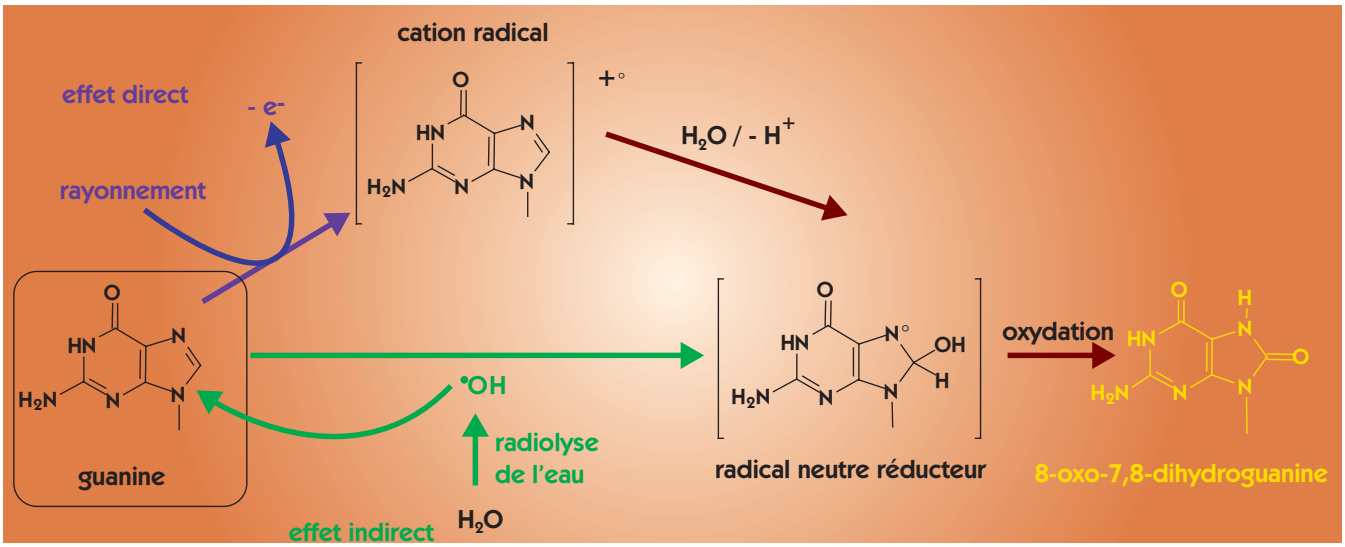


Figure 2. Mécanisme simplifié de l'oxydation radicalaire de la base guanine conduisant à la formation de 8-oxoGua : en haut, l'effet direct par arrachement d'un électron, en bas l'effet indirect via la radiolyse de l'eau.

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.

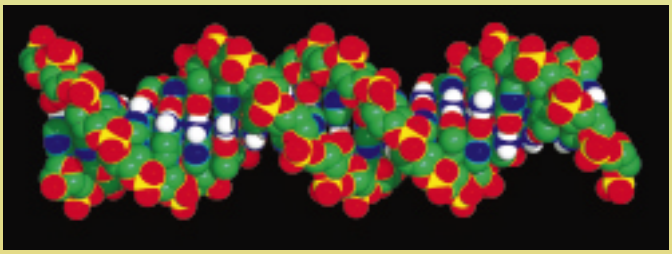
Les études théoriques faisant appel aux méthodes de la chimie quantique(1) sont ici d'un apport croissant. Elles permettent notamment de déterminer les propriétés tant de forme (conformationnelles) qu'électroniques des produits de

(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 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.



Seddon & Evans/SPL/COSMOS

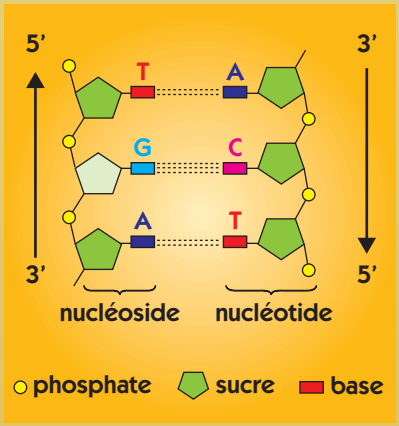
Représentation d'une molécule d'ADN montrant la double hélice (en vert, rouge et jaune) et les paires de bases (en bleu et blanc).

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.

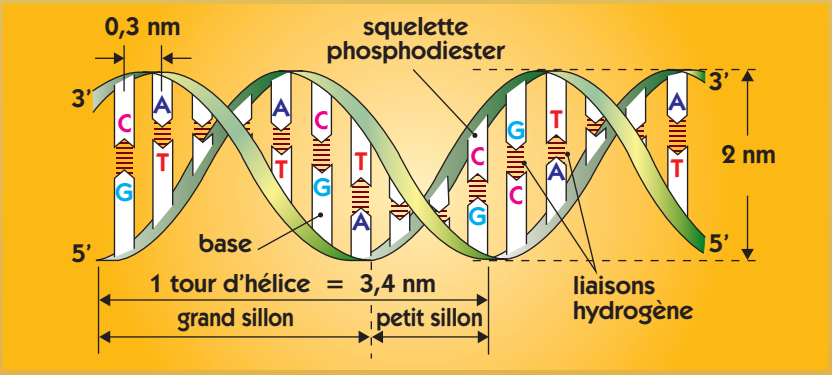
L'ADN, de même que l'**ARN** (acide ribonucléique), l'autre acide nucléique essentiel qui intervient dans la **réplication** de l'information de l'ADN et dans la transmission de l'information à la protéine à construire, est constitué de millions de briques élémentaires, les **nucléotides**. Un nucléotide 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 spécifique 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 •OH et de l'atome H• 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

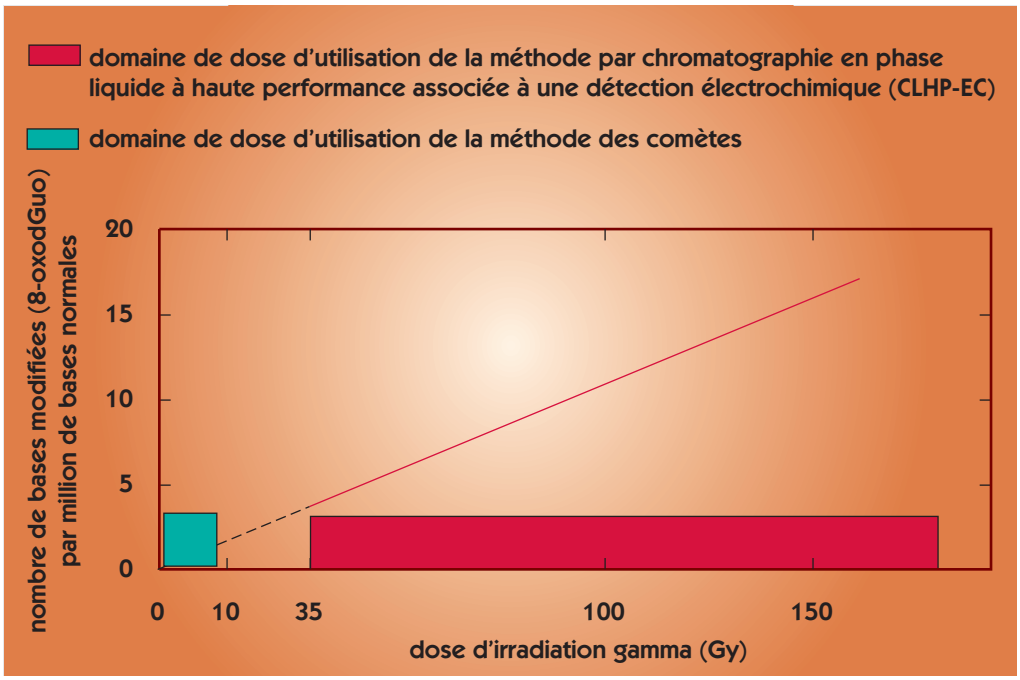
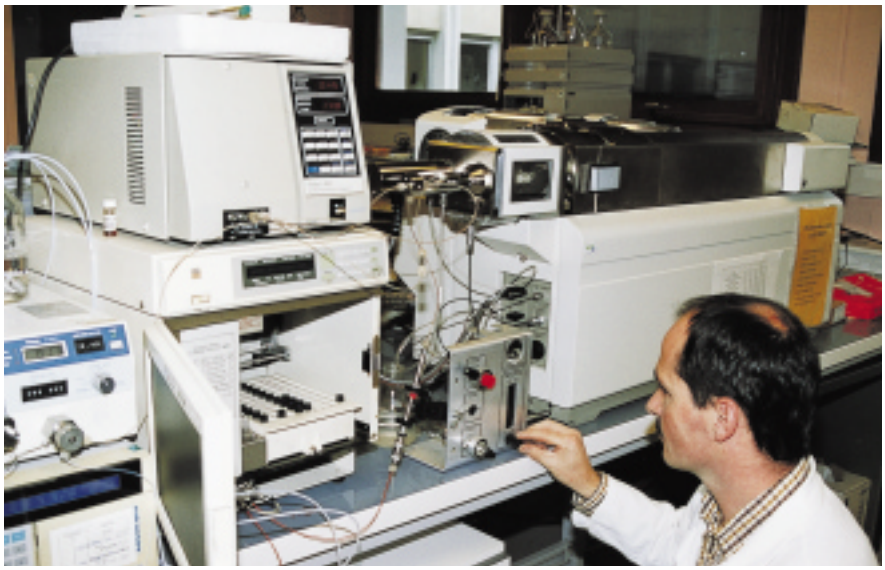


Figure 3. Domaines d'utilisation des méthodes de mesure des dommages radio-induits de l'ADN en fonction de la dose d'irradiation et du nombre de bases modifiées par rapport au nombre de bases normales.



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 molécule 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 fédé-ratif 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

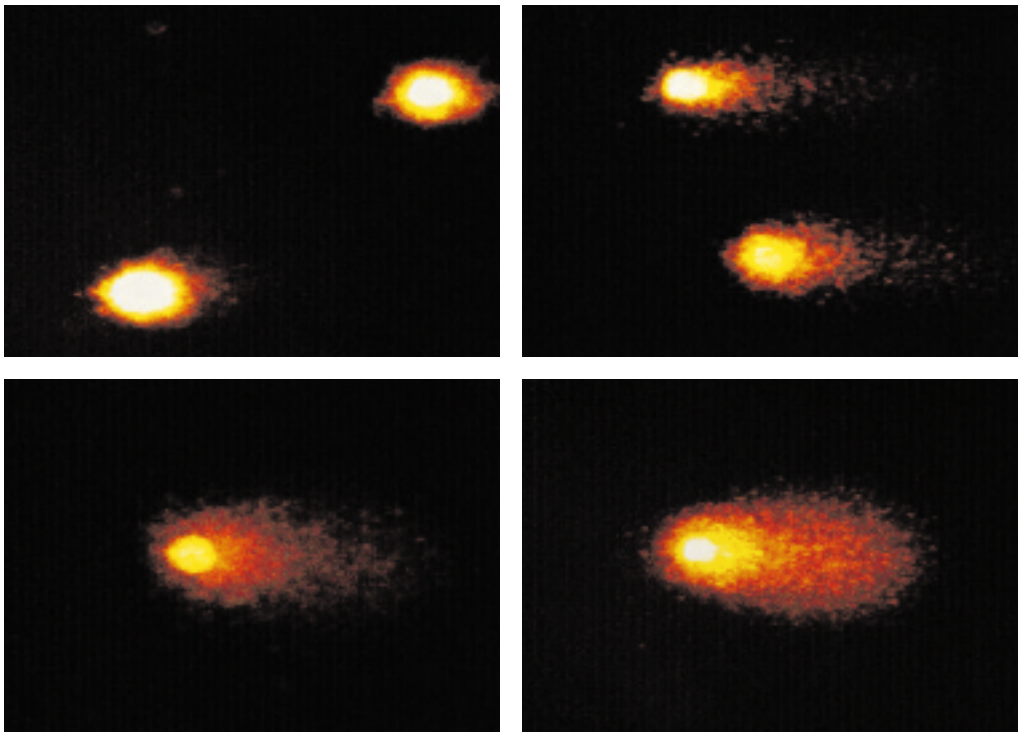
2

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 reconnus 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

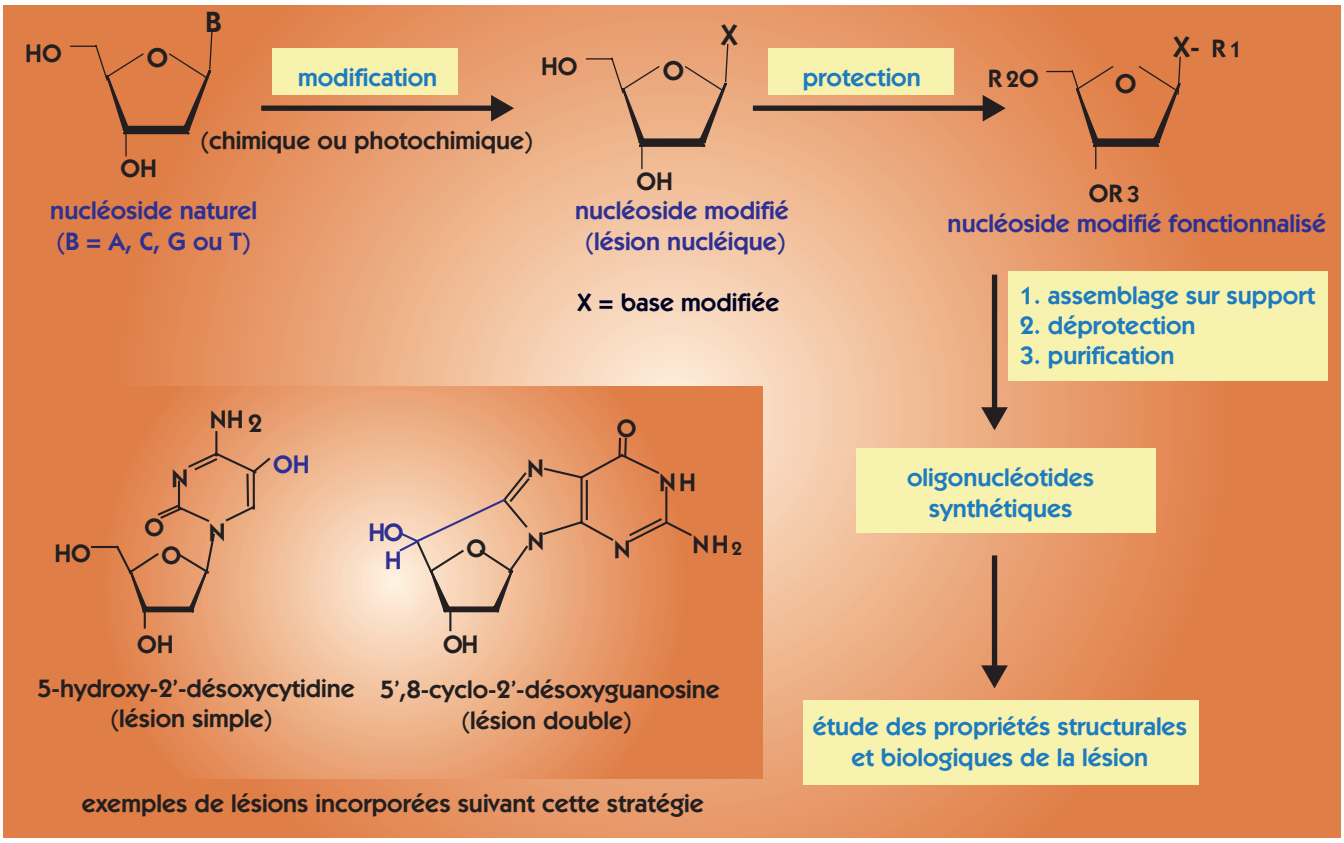


Figure 4. Stratégie de synthèse des oligonucléotides modifiés pour l'étude des bases d'ADN modifiées. L'assemblage se fait sur un support solide (billes de verre). La protection vise à empêcher d'autres réactions chimiques que celle étudiée de se produire. R1, R2 et R3 sont des groupements protecteurs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

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

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.

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.

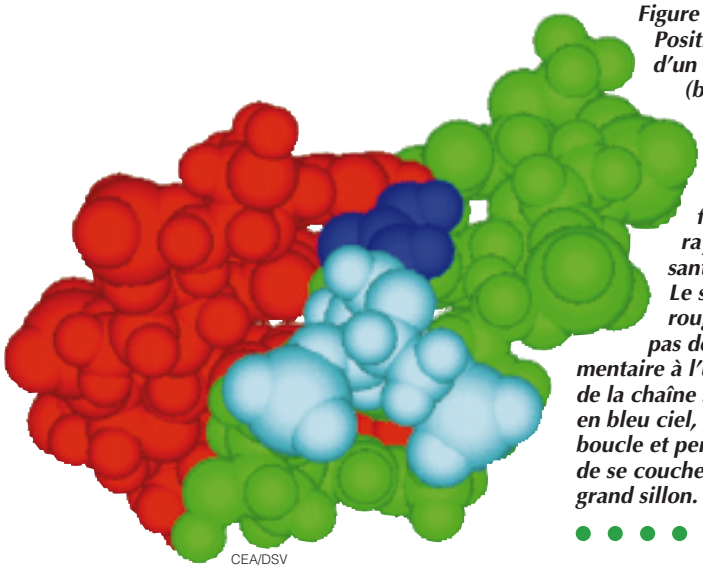
Emmanuel Joly/CEA

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(1) 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(2). 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 *dépurination* ; dans le cas d'une **pyrimidine** (cytosine ou thymine), il est nommé *dépyrimidination*. La molécule d'ADN possède naturellement plusieurs liaisons covalentes(3) 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(4) 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 réplication de l'ADN (encadré B, ***La réplication 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'hélice. 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).



CEA/DSV

Figure 1. ***Positionnement d'un résidu d'urée (bleu foncé) porté par le brin vert d'une molécule d'ADN, résultant de la modification par un rayonnement ionisant d'une thymine. Le second brin, rouge, ne comporte pas de base complémentaire à l'urée. Une partie de la chaîne sucre-phosphate, en bleu ciel, forme une boucle et permet à l'urée de se coucher dans le grand sillon.***

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.

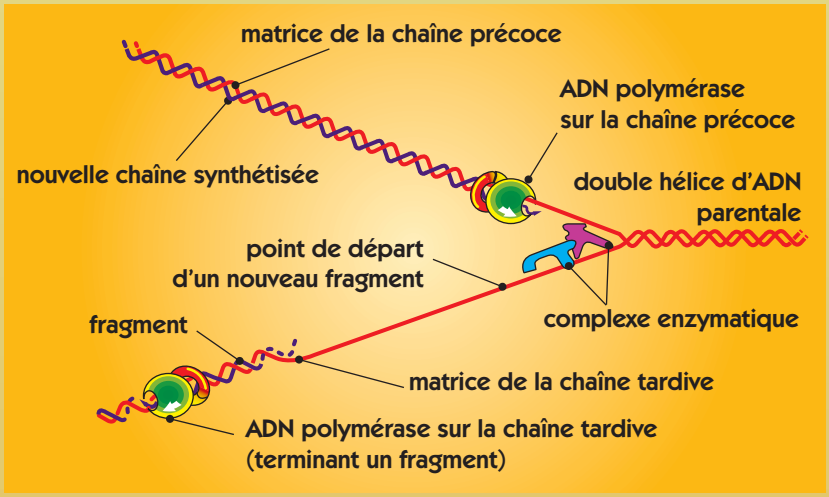
La réplication de l'ADN : une fidélité quasi parfaite

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.

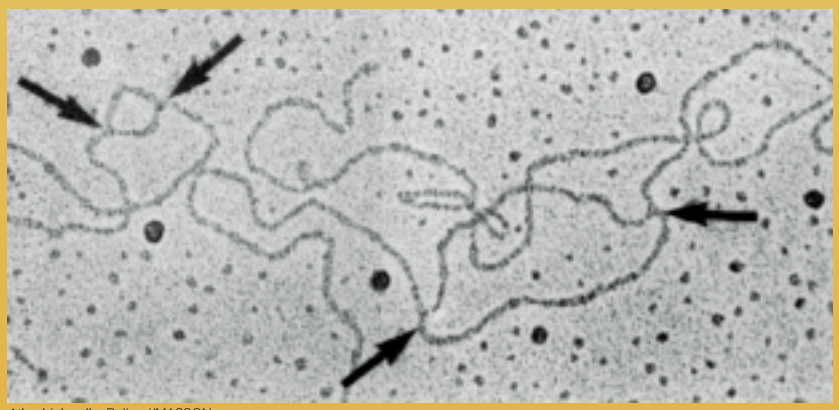
La réplication de l'ADN doit donc être très fiable et reproduire scrupuleusement la séquence des **nucléotides**. L'intégrité de la molécule est garantie par un ensemble de **protéines** qui vont reconnaître et réparer les altérations diverses auxquelles elle est soumise. Entre autres facteurs(1), les 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 continue, 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 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 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 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. - Rolland/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(5) pour la structuration des molécules.

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

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 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

(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.

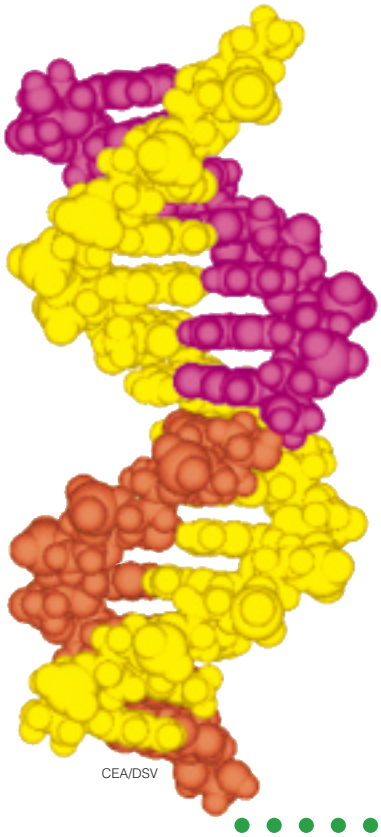
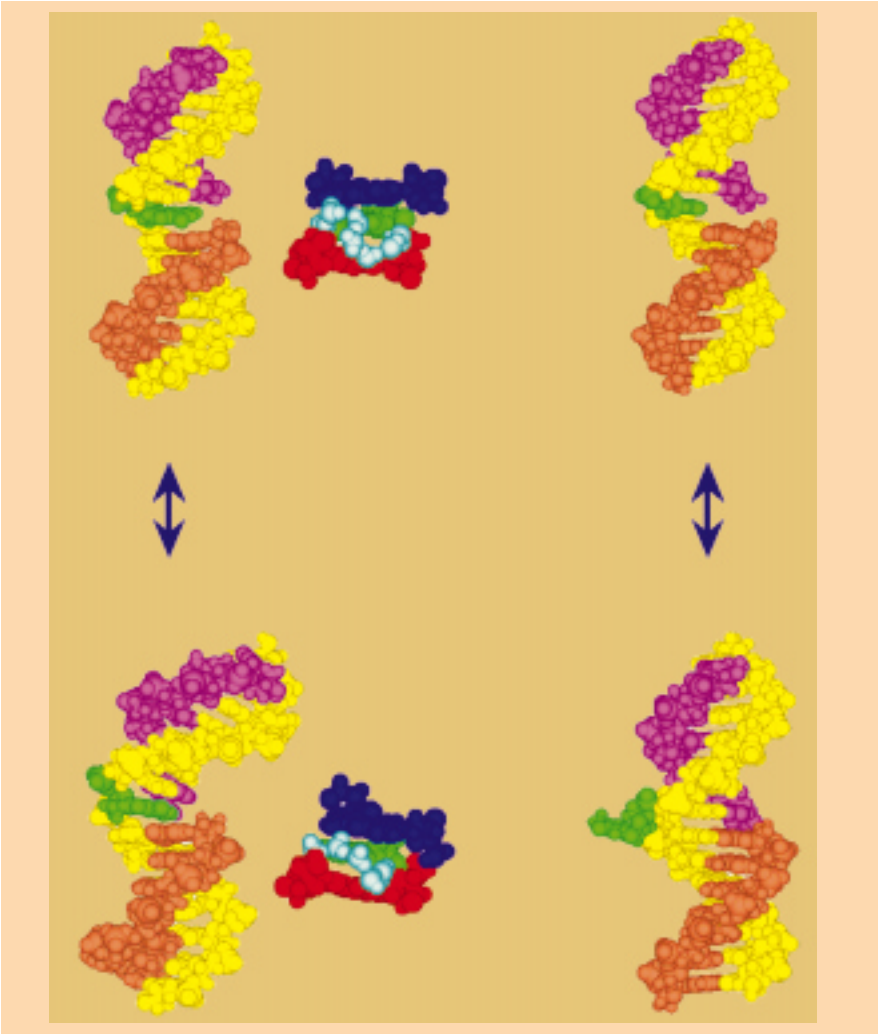


Figure 2. Structure d'une molécule d'ADN comportant une cassure simple brin. Le brin continu est en jaune, le brin interrompu en violet puis en beige.



CEA/DSV

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

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.

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, 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 **génome**. 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.

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

LA RADIOLYSE DE L'EAU

L'organisme humain est constitué de plus de deux tiers d'eau. Sous l'action des rayonnements ionisants, les molécules d'eau peuvent se décomposer pour donner des "morceaux" appelés radicaux libres. Très réactifs, ceux-ci conduisent à diverses modifications chimiques d'éléments essentiels de la cellule, en particulier l'ADN.

Emmanuel Joly/CEA

Dispositif de radiolyse pulsée installé au CEA/Saclay destiné à étudier les propriétés chimiques des radicaux libres provenant de la décomposition de l'eau sous l'action des rayonnements ionisants. Ici, réglage du faisceau lumineux d'analyse qui servira à identifier les radicaux par leur spectre d'absorption.

Des espèces radicalement réactives

Lorsque de l'eau est irradiée par des **rayonnements ionisants**, la première étape, quelle que soit la nature du rayonnement, est l'ionisation. L'excitation directe des molécules d'eau, composées chacune de deux atomes d'hydrogène H et d'un atome d'oxygène O, est un processus mineur comparé à l'ionisation. Au cours de l'ionisation :

$$H_2O \xrightarrow{\text{alpha, bêta, gamma, X}} H_2O^{+\bullet} + e^-,$$

l'électron éjecté peut avoir suffisamment d'énergie pour ioniser à son tour d'autres molécules d'eau. La molécule d'eau ionisée se trouve dotée d'un électron non apparié noté par un point •. Cette première étape, très simple puisqu'il n'y a pas de rupture de liaison chimique, a lieu quelles que soient la nature et l'intensité du rayonnement. Elle est suivie de réactions secondaires extrêmement rapides qui conduisent finalement à la formation de produits moléculaires stables, l'hydrogène H_2 et l'eau oxygénée ou peroxyde d'hydrogène H_2O_2, et à celle de radicaux libres ou d'ions radicaux $H^\bullet$, $^\bullet OH$, $HO_2^\bullet$, $e_{aq}^{-\bullet}$. Ceux-ci sont des atomes, des molécules ou des ions possédant un électron non apparié dans une liaison chimique. Ils sont beaucoup plus réactifs que les produits molécu-

laires et pour cette raison ont une durée de vie très courte, de l'ordre de la microseconde (1 µs = 10^{-6} s). Pour les identifier en temps réel, il est nécessaire de mettre en œuvre une technique spécifique : la radiolyse pulsée (encadré). L'oxygène n'est pas un produit primaire de la radiolyse de l'eau. Il se forme principalement par réaction des radicaux hydroxyles $^{\bullet}OH$ avec l'eau oxygénée. L'électron hydraté $e^{-\bullet}_{aq}$ n'est lié à aucune molécule d'eau. Il est piégé dans une cavité constituée par les molécules d'eau voisines qui forment une sphère d'hydratation, analogue à celle observée pour des ions en solution aqueuse. L'existence de cette espèce très réactive a été postulée dès les années vingt mais n'a été prouvée expérimentalement que quarante ans plus tard. Sur le plan chimique, l'électron hydraté peut être considéré comme la base conjuguée(1) du radical $H^{\bullet}$, qui serait le plus simple des acides :

$H^{\bullet}$ (acide) + OH^{-} (base) $\rightleftharpoons$ $e^{-\bullet}_{aq}$ (base conjuguée de l'acide) + H_2O (acide conjugué de la base).

Le radical $H^{\bullet}$ et l'électron hydraté sont des réducteurs(2) très puissants comparés à la molécule d'hydrogène. Par contre, le radical hydroxyle est extrêmement oxydant(2), beaucoup plus que l'eau oxygénée. Sur le plan biologique, c'est la plus active des espèces provenant de la radiolyse de l'eau.

Le radical hydroxyle attaque les molécules organiques selon trois mécanismes principaux. Il peut arracher un électron à la molécule. Ce phénomène d'oxydation par transfert d'électron, qui conduit à une ionisation de la molécule comme si elle avait absorbé directement le rayonnement, est relativement rare. Le radical hydroxyle est également capable d'arracher un atome d'hydrogène au composé organique. Ce processus mène à la rupture d'une liaison carbone-hydrogène (C—H). De plus, il est susceptible de se fixer sur une double liaison C=C ou sur un cycle aromatique(3), comme le benzène et ses dérivés. Ces trois mécanismes aboutissent à la formation de radicaux libres organiques.

L'effet sensibilisateur de l'oxygène

Il est connu depuis longtemps que l'oxygène rend les **cellules** plus vulnérables au rayonnement. Bien que les mécanismes soient multiples et complexes, une des causes de cette radiosensibilisation est la réaction des radicaux libres organiques avec l'oxygène pour former un radical peroxyle. Si un composé organique est symbolisé par la formule RH, R représentant le radical organique, les réactions s'écrivent :

$$^{\bullet}OH + RH \rightarrow R^{\bullet} + H_2O$$

rupture d'une liaison C—H

$$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$$

formation d'un radical peroxyle

(1) Un acide se transforme en sa base conjuguée en perdant un proton (ion H^+) tandis qu'une base se transforme en son acide conjugué en captant un proton.
(2) Un réducteur est un corps susceptible de céder des électrons et un oxydant est un corps susceptible de capter des électrons.
(3) Une molécule aromatique est une molécule organique dotée d'une grande stabilité due à la circulation d'électrons autour de cycles généralement carbonés.

ARCHIVES CURIE ET JOLIOT-CURIE

Dès la découverte de la radioactivité, les chercheurs se sont intéressés à l'effet des rayonnements, provenant du radium, sur l'eau. Avant la guerre de 1914, le chimiste français André Louis Debierne (1874-1949), qui travaillait dans le même laboratoire que Pierre et Marie Curie, avait déjà postulé que la décomposition de l'eau sous rayonnement impliquait un mécanisme mettant en jeu des radicaux. Ici, André Louis Debierne dans son laboratoire vers 1901.

$$ROO^{\bullet} + RH \rightarrow ROOH + R^{\bullet}$$

formation d'un peroxyde organique

$$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$$

formation d'un autre radical peroxyle.

Cet ensemble de réactions chimiques en chaîne amplifie les dégâts initiaux causés par le radical hydroxyle.

Des composés radioprotecteurs

À l'inverse, un certain nombre de dégâts chimiques sont réparables avant que le processus ne devienne irréversible. Ainsi, une liaison C—H, dont la rupture conduit à un radical libre, peut être restaurée par l'ajout d'un composé qui cède facilement un atome d'hydrogène. Ces espèces sont, par exemple, des substances organiques possédant une liaison S—H, tels les thiols, dérivés des alcools par remplacement de l'oxygène par le soufre S :

$$R^{\bullet} + R_1S-H \rightarrow R-H + R_1S^{\bullet}.$$

Le radical $R_1S^{\bullet}$ est peu réactif et n'est pas capable d'arracher un atome d'hydrogène à un autre composé organique, comme le font les radicaux peroxyles. D'autres composés, de la famille des quinones(4), agissent par transfert d'électron.

Le paradoxe de la décomposition de l'eau

L'eau est elle-même sujette à un processus de réparation particulier qui a longtemps intrigué les chercheurs. Lorsque de l'eau très pure est irradiée par des rayons X ou gamma, elle ne se décompose apparemment pas et l'expérimentateur ne mesure ni formation d'hydrogène ni formation d'eau oxygénée. Par contre, en présence d'air ou de composés chimiques, il observe une décomposition de l'eau. En revanche, l'eau se décompose toujours après une irradiation par des particules alpha. Une équipe américaine conduite par Augustine O. Allen a résolu en 1958 ce paradoxe en montrant que l'hydrogène et l'eau oxygénée produits se recombinent par une réaction chimique en chaîne, grâce aux radicaux $H^{\bullet}$ et hydroxyles. Cette dernière est inhibée en présence d'oxygène ou de solutés dissous dans l'eau. Pour les irradiations par des particules alpha, le rendement de formation des radicaux $H^{\bullet}$ et hydroxyles est beaucoup plus faible que dans le cas des rayons X ou gamma, et la recombinaison entre l'hydrogène et l'eau oxygénée est incomplète.

(4) Nom générique des composés cycliques dans lesquels deux atomes d'hydrogène du cycle sont substitués par deux atomes d'oxygène.

Bernard Hickel
Département de recherche sur l'état condensé, les atomes et les molécules
Direction des sciences de la matière
CEA/Saclay

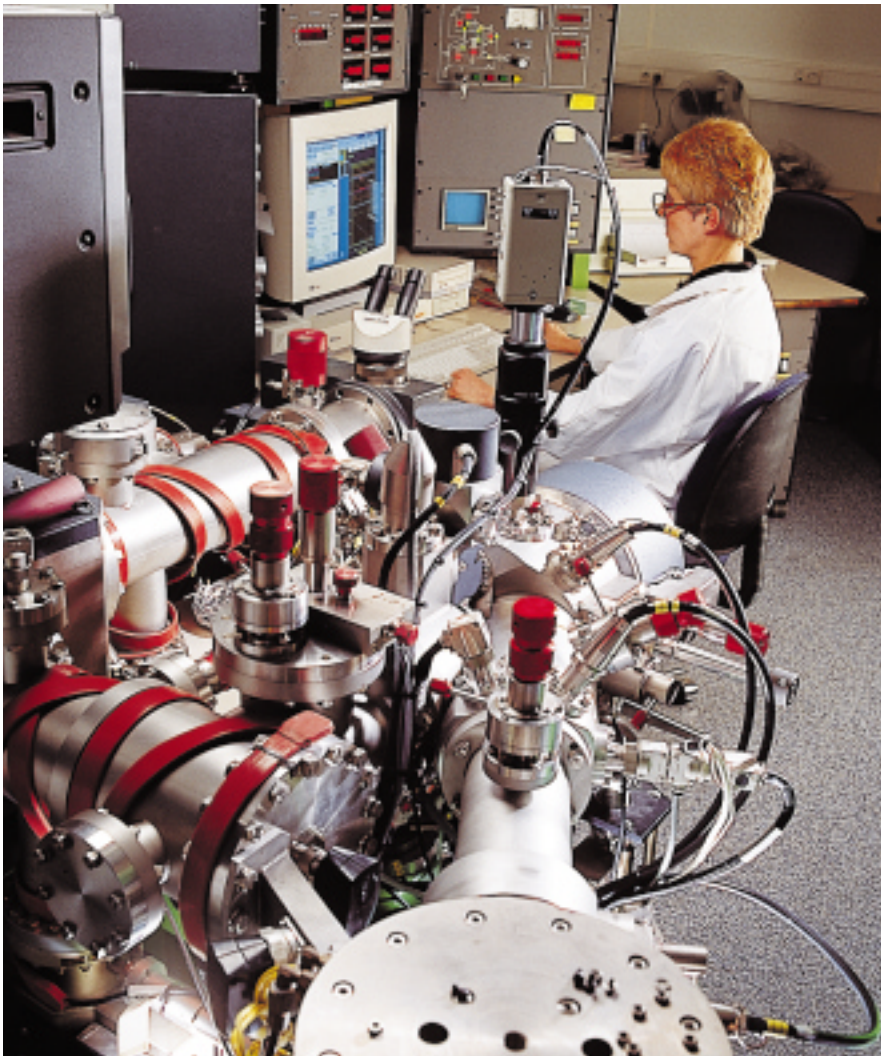
La radiolyse pulsée

Cette technique permet de caractériser les propriétés chimiques des radicaux libres provenant soit directement de la radiolyse de l'eau, soit indirectement par réactions de ces radicaux primaires sur des molécules présentes dans le milieu. Son principe consiste à irradier une solution pendant un temps très bref, de 10^{-9} à 10^{-6} s, avec un accélérateur de particules, des électrons le plus souvent, fonctionnant par impulsions. Les électrons, émis par paquets, portent l'énergie cinétique des radicaux à quelques mégaélectronvolts (MeV). Après la fin de l'irradiation, la formation et la disparition des radicaux sont observées en mesurant la variation de leur concentration en fonction du temps par une méthode optique. La plupart des radicaux absorbant la lumière dans le domaine visible ou plus généralement dans l'ultraviolet (longueurs d'onde comprises entre $2 \cdot 10^{-7}$ et $7{,}5 \cdot 10^{-7}$ m), chaque radical peut être identifié par son spectre d'absorption. Des radicaux libres, dont la durée de vie est parfois aussi courte que 10^{-7} s, sont étudiés dans le dispositif de radiolyse pulsée installé au CEA/Saclay (photo ci-dessous).

Emmanuel Joly/CEA

DES OUTILS PHYSIQUES POUR ÉTUDIER LES LÉSIONS RADIO-INDUITES

Lorsque des rayonnements ionisants pénètrent dans un milieu biologique, ils entrent en collision avec les atomes traversés et, au cours des interactions successives, cèdent de l'énergie, produisant ainsi des effets observables comme des lésions de l'ADN dans la cellule. Établir un rapport entre événements physiques initiaux et effets biologiques est un objectif constant des chercheurs en radiobiologie, en radiothérapie et en radioprotection. Deux approches cohabitent aujourd'hui, l'une fondée sur la corrélation entre la dose absorbée ou la distribution des dépôts d'énergie et l'effet biologique observé, l'autre sur le calcul de trace, censé suivre les interactions des particules en jeu jusqu'au bout de leur trajet pour modéliser les effets initiaux des rayonnements. Elles sont d'autant plus utiles que les concepts classiques de cibles d'un rayonnement pourraient être remis en question.



Antoine Gonin/CEA

La localisation de radionucléides émetteurs de rayonnements à faibles parcours peut conduire à des expositions très hétérogènes des cellules et composants intra-cellulaires réclamant une analyse microdosimétrique des distributions de dépôts d'énergie à l'échelle de ces "cibles". Pour accéder à la microdistribution des radionucléides, l'IPSN met en œuvre des techniques de microanalyse comme le microscope analytique SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry). Fonctionnant selon le principe d'un microscope à balayage électronique, la microscopie ionique remplace le faisceau d'électrons primaire par un faisceau d'ions permettant l'analyse élémentaire de surfaces solides.

Les limites des outils classiques

En traversant un milieu biologique, les **rayonnements ionisants** perdent de l'énergie en heurtant les atomes rencontrés. Ces interactions se traduisent par l'ionisation (arrachement d'un électron) et l'excitation (apport d'énergie)

des atomes de ce milieu le long des trajectoires des particules ionisantes. Au niveau des **cellules**, ces événements initiaux déclenchent une cascade de phénomènes susceptibles de conduire à des **effets biologiques** observables. Pour des systèmes biologiques simples, de telles manifestations apparaissent déjà à de faibles **doses** d'exposition. Ce fait, bien connu, peut sembler surprenant. En effet, l'impact du rayonnement sur la cellule a pour premières conséquences de créer directement ou indirectement un nombre de lésions (voir *Les dommages radio-induits des acides nucléiques*) proche de celui des lésions qui se produisent spontanément. Or, ces dommages spontanés sont presque tous remarquablement réparés (voir *Les gardiens du génome*). Les interactions physiques entre le rayonnement et le milieu cellulaire présenteraient donc des caractéristiques spécifiques liées à la capacité plus ou moins grande du rayonnement à induire tel ou tel effet biologique, en fonction de la dose délivrée, capacité qui définit leur **efficacité biologique** (encadré 1).

Les outils physiques d'investigation classiques, indispensables à la modélisation des lésions biologiques radio-induites, s'appuient sur deux paramètres : la *fluence*, qui représente la quantité de particules ionisantes frappant le milieu, et la *section efficace d'interaction*, qui traduit la probabilité pour ces particules d'entrer en collision avec

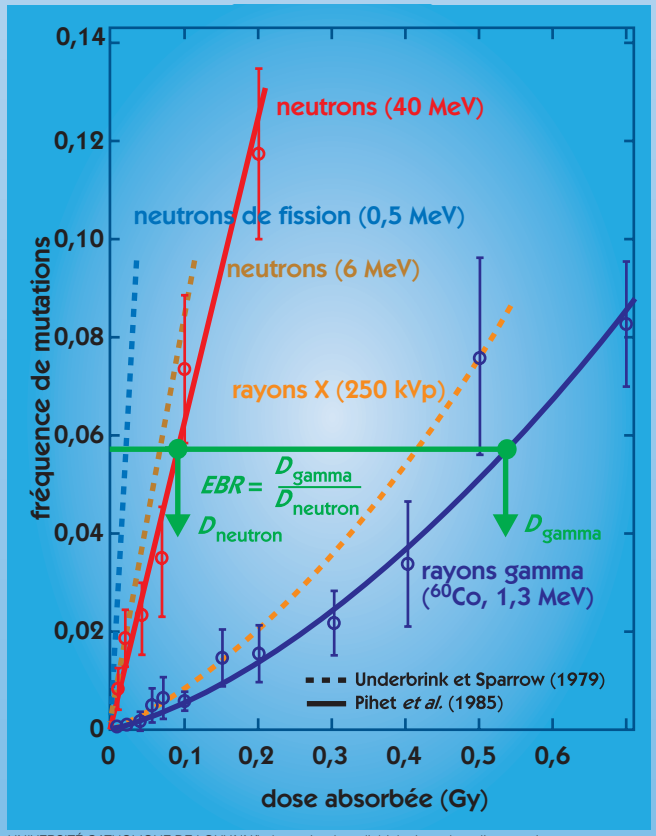
Les facteurs de l'efficacité biologique

1

L'induction de **mutations** par divers types de rayonnement, y compris aux faibles doses, est analysée chez la *Tradescantia*, une fleur assez commune, particulièrement sensible aux agents **mutagènes**, comme les rayonnements ionisants. La *Tradescantia* contient un grand nombre d'étamines, organes mâles renfermant le pollen, de couleur bleue. Sur la variété utilisée, les rayonnements créent des mutations se manifestant par un changement de couleur des cellules qui constituent les poils des étamines (illustration). Le phénomène de mutation est donc directement observable.

UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN/Laboratoire de radiobiologie et de radioprotection

La fréquence, ou probabilité d'apparition, de mutations observée en fonction de la **dose absorbée** chez la *Tradescantia* est représentée sur le schéma ci-contre pour des rayonnements ionisants de nature et d'énergie différentes. La dose absorbée traduit l'énergie absorbée localement dans le milieu. Elle est définie par la valeur moyenne de la densité massique d'énergie absorbée au point considéré.



UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN/Laboratoire de radiobiologie et de radioprotection

Les courbes dose-effet montrent de très nettes différences jusqu'aux faibles doses. Lors de l'interaction entre le rayonnement et le milieu biologique, l'importance de l'effet provoqué est en effet liée au transfert d'énergie. Or, les particules ionisantes se distinguent par leur **transfert linéique d'énergie** (*TLE*), qui correspond à la densité d'énergie absorbée par le milieu rapportée à l'unité de longueur de la trajectoire de la particule. Indirectement ionisants, les neutrons et les photons sont caractérisés par le *TLE* moyen des particules chargées qu'ils engendrent dans le milieu. La densité d'ionisations sur la trajectoire de la particule est en moyenne beaucoup plus forte (jusqu'à 100 fois) pour des neutrons que pour des photons.

Sur le schéma, la "pente" des courbes dose-effet, qui traduit l'importance des dommages induits aux brins d'ADN de la *Tradescantia*, illustre la classification communément admise entre les rayonnements à *TLE* faible, ici des rayons X et gamma, et ceux à *TLE* élevé, ici des neutrons. L'**efficacité biologique relative** (*EBR*) d'un rayonnement vis-à-vis d'un autre est égale au rapport des doses absorbées nécessaires pour produire un même effet biologique sur un système donné.

les atomes de ce milieu. Cependant, ces outils se révèlent insuffisants pour caractériser l'efficacité biologique du rayonnement car c'est moins l'impact de ce dernier sur une "cible" biologique que le transfert d'énergie l'accompagnant qui signe l'importance des lésions primaires produites. Couramment utilisée en radiobiologie, la notion de **dose absorbée** (encadré 1) a toutefois ses limites pour apprécier un effet biologique puisqu'à l'échelle microscopique l'énergie n'est pas délivrée de façon continue mais par paquets variables en nombre et en densité, l'interaction entre le rayonnement et le milieu étant un phénomène essentiellement statistique. Une grandeur moyenne ne traduit donc pas les fluctuations statistiques, parfois très larges, des dépôts d'énergie qui surviennent de manière aléatoire dans de petits volumes comparables à des cellules. La dose absorbée ne prend toute sa signification que dans des conditions d'exposition uniforme par rapport à l'étendue de la cible étudiée (tissu, cellule, **ADN**). Il a par conséquent été

La microdosimétrie des rayonnements ionisants

2

Au sein d'un milieu biologique, le dépôt d'énergie dans un volume défini par sa masse m et sa taille est déterminé par l'énergie cédée ε le long de la trajectoire ℓ, dans la cible présumée, par la particule incidente et les particules associées. Il est exprimé par des **grandeurs microdosimétriques stochastiques**, l'*énergie spécifique* z et l'*énergie linéale* y, qui rapportent respectivement l'énergie cédée à la masse de la cible et à la longueur moyenne des trajectoires aléatoires dans la cible.

Les **fluctuations statistiques** du dépôt d'énergie sont représentées par :

- la distribution des fréquences des dépôts d'énergie ou "événements" pris un à un, $f_1(z)$ ou $f_1(y)$, et la distribution de dose dérivée [$\sim y \cdot f_1(y)$] ou spectre microdosimétrique ;

ou

- la distribution d'énergie spécifique sur l'ensemble des cibles due à 0, 1, 2, …, n événements en fonction de la dose d'exposition D, $f(z;D)$.

La **relation à la dose absorbée** est donnée par :

$$D = \lim_{m \to 0} \bar{z}$$

avec

$$\bar{z} = \int z\, f(z;D)\, dz.$$

Il s'en déduit :

$$\bar{n} = \frac{\bar{z}}{\bar{z}_1},$$

qui correspond au nombre moyen d'événements dans la cible présumée pour une dose d'exposition D.

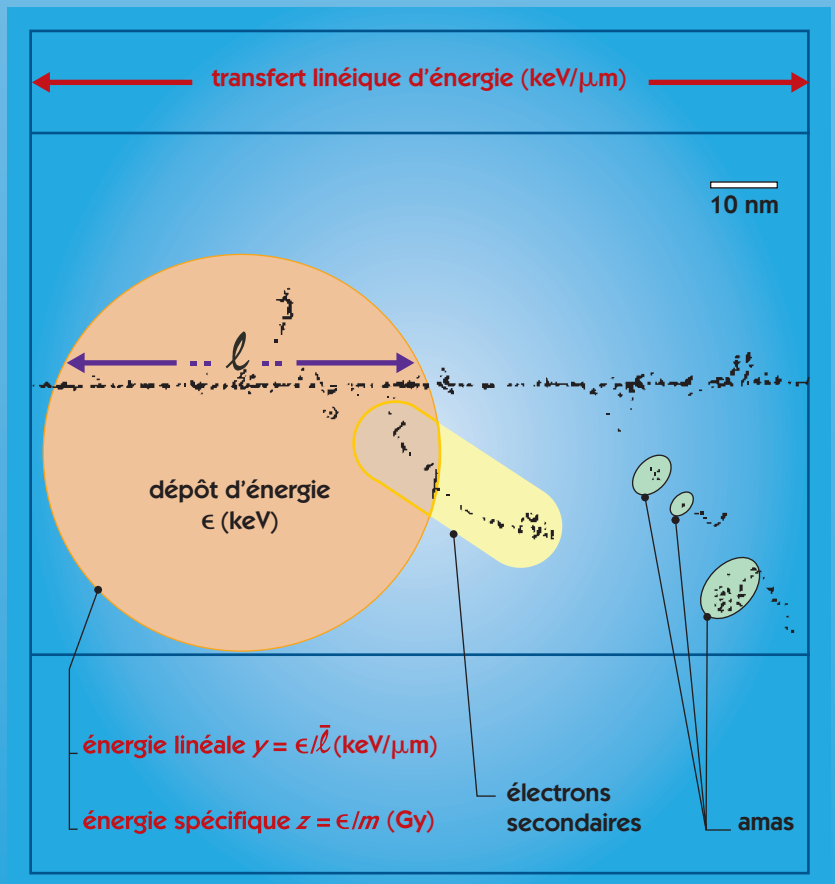
Connaissant les distributions $f(z;D)$ et $f_1(z)$, ou $f_1(y)$, si les données biologiques sont suffisantes, des corrélations phénoménologiques peuvent être recherchées pour établir des fonctions de réponse biologique empiriques $e(z)$ ou $e(y)$. Celles-ci permettent de prédire l'**effet biologique**, $E(D)$, suivant une relation du type :

$$E(D) \sim \int e(z)\, f(z;D)\, dz.$$

À faible dose, l'**efficacité biologique**, $E(D)/D$, du rayonnement se déduit d'une relation du type :

$$E(D) \sim D \int e(y)\, f_1(y)\, dy.$$

Le schéma ci-dessous montre une trace de particule ionisante et les paramètres caractéristiques du dépôt d'énergie dans une cible simulant un **noyau** cellulaire, généralement une sphère de quelques dizaines de nanomètres à quelques micromètres (1 µm = 10^{-6} m) de diamètre. Toutefois, les électrons secondaires énergétiques, issus de l'ionisation des atomes de la cible par les électrons éjectés lors des ionisations initiales, qui s'éloignent de la trajectoire de la particule terminent leur course par des concentrations locales élevées d'ionisations ou "amas" d'électrons secondaires. De même, les électrons éjectés à grande vitesse au cours des ionisations initiales, appelés électrons delta, forment des concentrations locales élevées d'ionisations en fin de parcours. Ces dépôts d'énergie peuvent avoir un impact important à l'échelle subcellulaire.



(D'après Goodhead, D. T., *The Dosimetry of Ionizing Radiation*, Vol II, édité par K. R. Kase, B. E. Bjängard et F. H. Attix, Academic Press Inc., London, 1987, p. 1-78)

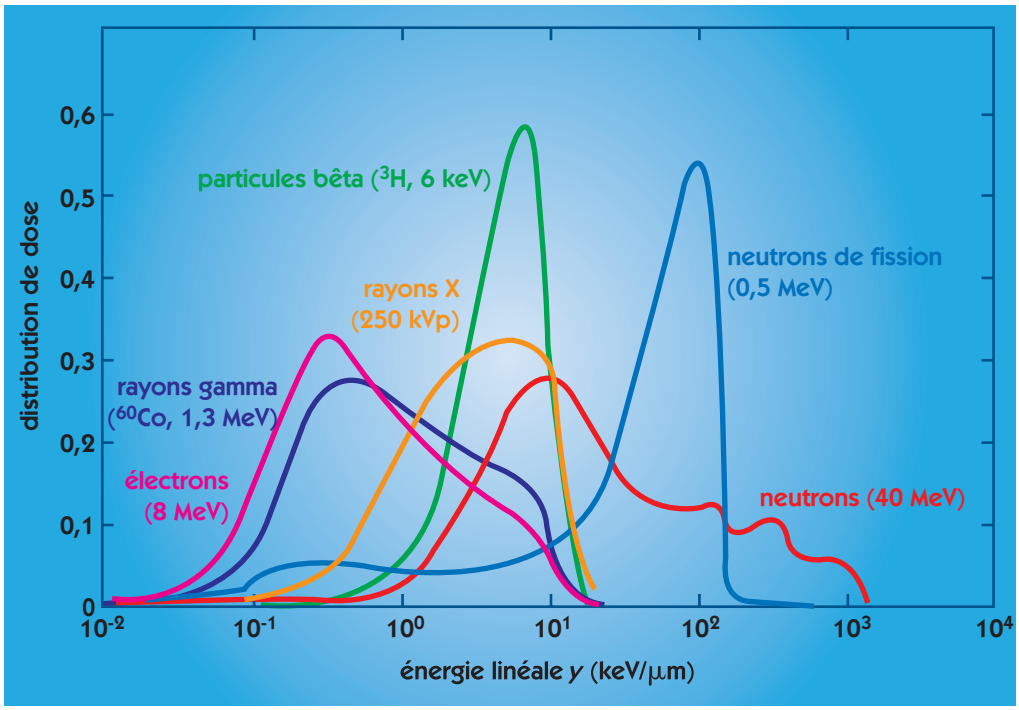


Figure 1. Spectres microdosimétriques établis pour une cible biologique de diamètre 1 µm pour divers rayonnements directement (électrons) et indirectement (gamma, X, neutrons) ionisants. Cette représentation a permis d'étudier la validité de relations simplifiées de l'efficacité biologique relative pour prédire les variations de ce coefficient d'un rayonnement à l'autre dans différentes applications en radiothérapie et en radioprotection.

nécessaire de développer des outils permettant une représentation physique plus fine de l'énergie cédée à l'échelle des cibles biologiques.

L'analyse du dépôt d'énergie

L'impact physique d'une particule ionisante sur un milieu biologique est finement décrit par la "trace" de la particule, étudiée point par point d'interaction, sur un grand nombre de trajectoires. Cette information est rendue accessible par des techniques de calcul aléatoire et les capacités accrues des outils informatiques. Elle n'en reste pas moins trop détaillée pour répondre directement aux besoins de la radiobiologie, sauf à la simplifier en la réduisant à quelques paramètres caractéristiques et à la fluctuation statistique autour de leur valeur moyenne.

Si l'énergie transférée par la particule au milieu biologique est en moyenne bien représentée par la densité d'ionisations sur son parcours, ou encore par le *TLE*, la microdosimétrie réalise une approche différente en s'intéressant au dépôt d'énergie, défini par l'énergie cédée dans un volume censé simuler une cible biologique, coupé par la trajectoire de la particule. La microdosimétrie décrit la fluctuation du dépôt d'énergie d'une trajectoire à l'autre et la balistique de ces trajectoires dans des cibles de dimension choisie, exposées à une dose de rayonnement donnée (encadré 2). L'intérêt est de pouvoir aligner une large gamme de rayonnements directement ou indirectement ionisants sur un même modèle de représentation afin de comparer l'efficacité biologique des rayonnements entre eux (figure 1) à défaut d'en comprendre les mécanismes. La microdosimétrie permet de comparer numériquement divers rayonnements ionisants par la fréquence et la taille moyenne des dépôts d'énergie, ou "événements", dans la cible présumée (tableau).

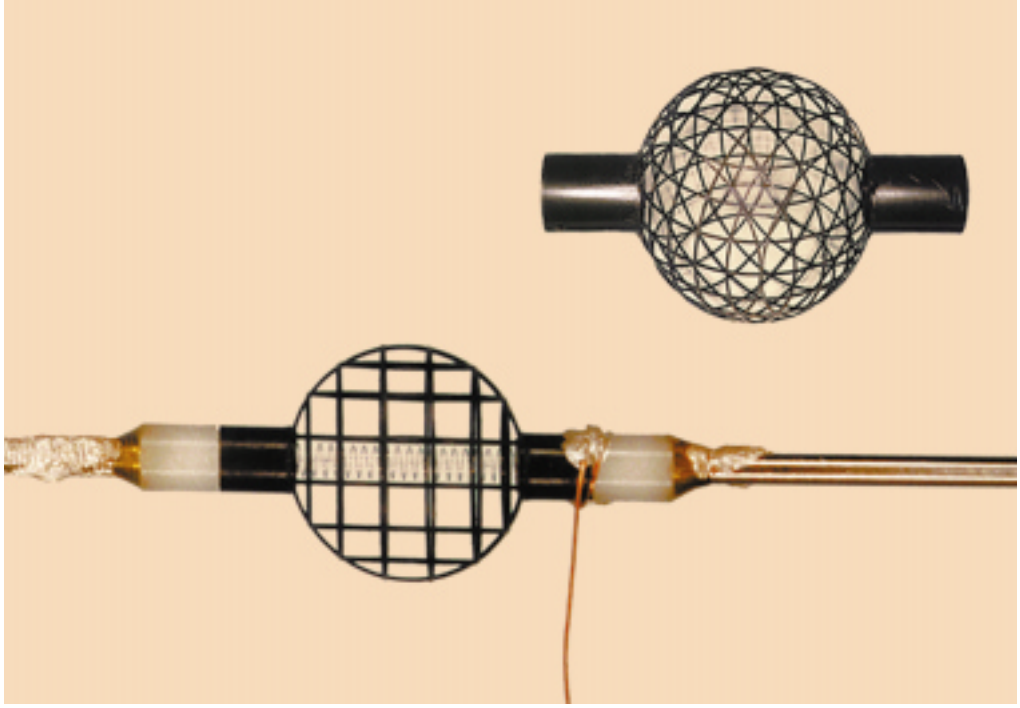
Le dépôt d'énergie : un outil puissant pour la dosimétrie

La relation entre la dose absorbée et la distribution des dépôts d'énergie est un outil puissant pour la radiobiologie et ses applications, en radiothérapie et en radioprotection. La comparaison du schéma de l'encadré 1 et de la figure 1 explique la démarche générale qui consiste à relier le résultat observable des lésions radioinduites au produit de la dose absorbée

cibles / rayonnements	noyau cellulaire (~ 1 µm)	fibre d'ADN (~ 10 nm)	molécule d'ADN (~ 2 nm)	paramètres
rayons gamma (^{60}Co, 1,3 MeV)	1,2 0,2 1,6	$6\cdot10^{-6}$ 60 16,8	$7\cdot10^{-8}$ 440 37,4	$\bar{n}$ σ_z $\overline{y_D}$
rayons X (250 kVp)	0,5 0,3 3,35	$5\cdot10^{-6}$ 60 17,5	$7\cdot10^{-8}$ 440 38,3	$\bar{n}$ σ_z $\overline{y_D}$
particules bêta (^{3}H, 6 keV)	0,2 0,3 4,8	$6\cdot10^{-6}$ 60 18,0	$6\cdot10^{-8}$ 460 41,2	$\bar{n}$ σ_z $\overline{y_D}$
neutrons de fission (0,5 MeV)	$9\cdot10^{-3}$ 1,3 85,5	10^{-6} 135 90,2	$5\cdot10^{-8}$ 730 104,4	$\bar{n}$ σ_z $\overline{y_D}$

Tableau. Paramètres microdosimétriques évalués pour différents rayonnements ionisants et cibles biologiques simulées. $\bar{n}$ représente le nombre moyen d'événements ou la fréquence des dépôts d'énergie dans la cible pour une dose d'exposition D = 0,1 Gy ; σ_z, dont l'unité est le Gy, correspond à l'écart-type de l'énergie spécifique dans la cible pour la même dose d'exposition ; $\overline{y_D}$, exprimé en keV/µm, se rapporte à la valeur moyenne de l'énergie linéale, ou "taille" de l'événement, sur la distribution de dose.

Le compteur proportionnel utilisant une paroi et un gaz de compositions aussi proches que possible de celle du tissu biologique a largement contribué au développement de la microdosimétrie expérimentale. La photo montre des détecteurs où la paroi solide a été remplacée par une grille pour simuler la cible biologique de la manière la plus homogène possible. La dimension des compteurs (de quelques mm à quelques cm) et la pression de gaz sont ajustées en fonction de la taille de la cible simulée, classiquement de l'ordre de quelques micromètres. Cependant, de tels compteurs "miniatures" (dimension physique inférieure au mm) permettent aujourd'hui d'étudier des cibles nanométriques.



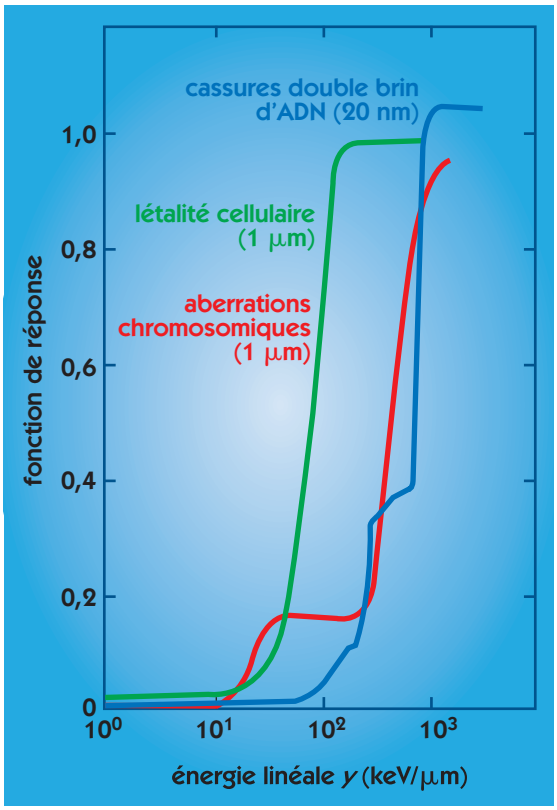
Gary Johnson/COLUMBIA UNIVERSITY/Center For Radiological Research

et d'un facteur de pondération estimant l'**efficacité biologique relative** (*EBR*) du rayonnement en fonction de son spectre microdosimétrique. L'intérêt de cette formulation est d'abord pratique puisque les spectres microdosimétriques peuvent être évalués pour presque tous les rayonnements et même être mesurés dans des conditions difficiles à simuler par le calcul, comme dans des champs de rayonnement complexes. Il s'agit toutefois d'applications purement phénoménologiques.

Une approche essentiellement empirique

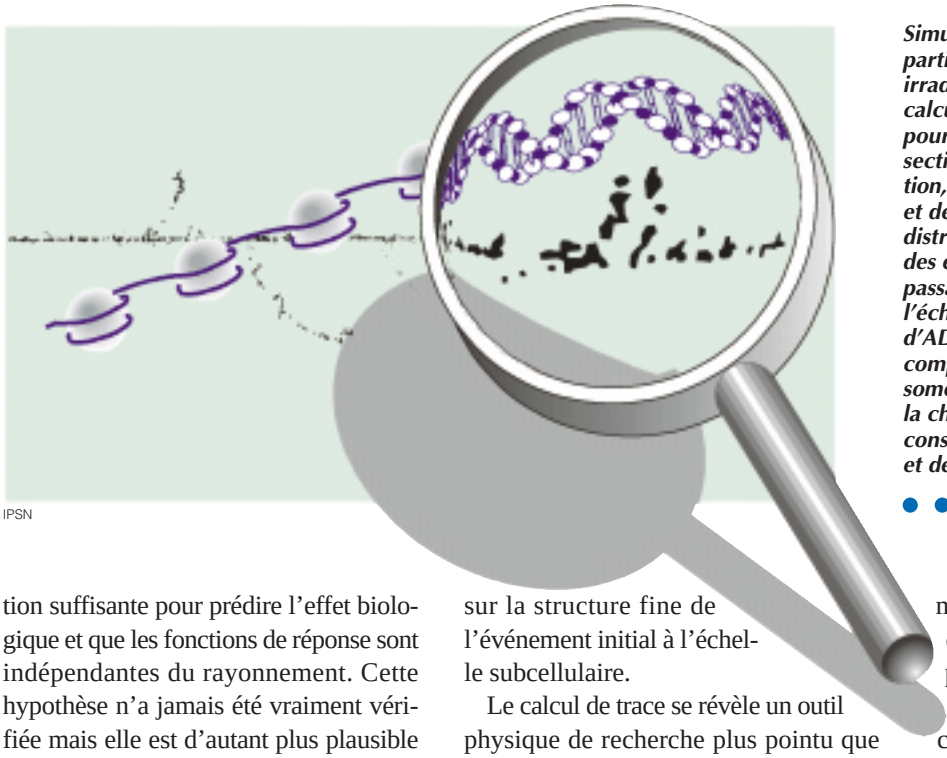
Le dépôt d'énergie est une expression des événements primaires, des ionisations et des excitations, déclenchés par le passage du rayonnement dans la cible biologique. En raison des nombreux mécanismes qui interviennent par la suite, la connaissance de ces événements ne permet pas de rendre compte de l'effet biologique constaté, comme il est difficile de relier cet effet aux dommages moléculaires initiaux. En première analyse, seules des corrélations empiriques peuvent donc être tentées en rapprochant le dépôt d'énergie des effets biologiques observés dans les mêmes conditions. La relation dose-effet en est le premier exemple. En microdosimétrie, cette approche phénoménologique revient à rechercher une fonction d'efficacité biologique ou "fonction de réponse" (encadré 2), parfois établie de façon purement numérique, par ajustements successifs des données biologiques aux spectres microdosimétriques observés.

Une fois obtenues, ces fonctions de réponse peuvent être conjuguées avec les spectres microdosimétriques d'un rayonnement donné pour estimer le paramètre biologique visé en accord avec les données expérimentales qui ont été utilisées pour les établir initialement. Pour une cible biologique, ces fonctions déterminent la probabilité qu'un dépôt d'énergie donné produise tel ou tel effet spécifique (figure 2). Cette interprétation est assez immédiate pour un rayonnement de type bien défini. Lorsqu'il s'agit de plusieurs rayonnements, il est implicitement admis que le dépôt d'énergie est une informa-



(D'après Morstin, K., *et al.*, *Radiation Research* **120** (1989) 383-402)

*Figure 2. Exemples de fonctions de réponse, sous la forme e(y), établies en comparant les données biologiques observées pour différents types d'effets et les spectres microdosimétriques correspondant aux mêmes rayonnements et tailles de cibles présumées. La courbe relative à l'induction de dommages à l'ADN pourrait s'expliquer par l'expression de deux mécanismes, des cassures double brin d'emblée dues à des événements simples au-delà de 600 keV/µm, et des cassures double brin résultant de deux cassures simple brin pour des dépôts d'énergie inférieurs. La similitude des courbes relatives aux effets d'aberrations chromosomiques et de **létalité** cellulaire avec la précédente s'expliquerait par le fait que les lésions qui en sont à l'origine sont des cassures double brin.*



IPSN

Simulation de la trace d'une particule au sein du milieu irradié. Des techniques de calcul aléatoire sont utilisées pour décrire, sur la base des sections efficaces d'interaction, le transport des électrons et des ions dans la matière. La distribution des ionisations et des excitations créées sur leur passage est ici représentée à l'échelle de la molécule d'ADN et de structures plus compactes comme les nucléosomes, unités élémentaires de la chromatine, complexe constitué par l'ADN cellulaire et des protéines.

tion suffisante pour prédire l'effet biologique et que les fonctions de réponse sont indépendantes du rayonnement. Cette hypothèse n'a jamais été vraiment vérifiée mais elle est d'autant plus plausible que la dose est faible et que les événements sont rares.

Ces fonctions de réponse sont donc avant tout des relations empiriques, dans lesquelles la taille de la cible (tableau et figure 1) n'est pas un paramètre fixe, mais dépend de la corrélation obtenue. Ceci n'interdit pas d'interpréter *a posteriori* l'allure des fonctions de réponse suivant le critère biologique et la taille présumée de la cible, et de la relier à certains mécanismes de formation des lésions comme, par exemple, l'interaction de cassures simple **brin** de l'ADN ou la création simultanée de cassures double brin (figure 2).

Le calcul de trace : un outil de recherche indispensable

Le dépôt d'énergie ne suffit pas pour comprendre d'emblée les mécanismes de formation des lésions, d'où l'intérêt d'une approche phénoménologique, certes plus réductrice et de portée plus limitée. Les effets importants induits par des rayonnements dont le parcours moyen est de l'ordre du nanomètre (1 nm = 10^{-9} m) illustrent les limites de cette approche. Pour des électrons de très faibles énergies (inférieures à 1 keV) en particulier, la courbe dose-effet peut sous certaines conditions être semblable à celle obtenue pour des particules de haut *TLE*, ce qui conduit à s'interroger sur la structure fine de l'événement initial à l'échelle subcellulaire.

Le calcul de trace se révèle un outil physique de recherche plus pointu que le dépôt d'énergie. Il permet en effet de décrire toutes les interactions des électrons secondaires qui "terminent" l'histoire de la particule primaire. La modélisation de la trace met en jeu des sections efficaces d'interaction. Elle offrira par exemple la possibilité de suivre la distribution des distances entre collisions. Pour accéder à ces informations statistiques et les comparer aux dommages de l'ADN observés, une simulation est réalisée sur un grand nombre de traces. Il est en particulier intéressant d'étudier les concentrations locales d'ionisations ou amas d'électrons secondaires (encadré 2) et la distribution spatiale de tels objets à l'échelle de l'ADN.

L'utilisation d'un de ces paramètres, *a priori* plus proche des dommages moléculaires initiaux, est séduisante. Par rapport au calcul du dépôt d'énergie ou de la dose absorbée, elle pourrait conduire à un "concept unifié" plus fondamental. Cette approche est cependant limitée par la fiabilité des calculs en raison des incertitudes sur les données physiques de base et de la complexité du milieu biologique. Néanmoins, le calcul de trace permet de mieux comprendre les mécanismes d'action du rayonnement. La capacité grandissante de la modélisation à prendre en compte les phénomènes physiques initiaux et le transport des espèces chimiques créées représente ici un atout précieux. Toutefois, les communications intercellulaires compliquent fortement la modélisation. Il est par exemple possible d'observer des effets dans une cellule distante de celle touchée par le rayonnement.

Quelle démarche pour l'avenir ?

Le choix entre dépôt d'énergie et calcul de trace dépend avant tout de la nature des données biologiques à interpréter. Le calcul de trace intéressera davantage une démarche mécaniste, en fournissant des données d'entrée à la modélisation, pour vérifier ou infirmer la validité des hypothèses sur la nature des lésions biologiques radio-induites. Le dépôt d'énergie et les grandeurs dérivées s'inscrivent plus dans la représentation physique de l'efficacité biologique en s'appuyant sur la corrélation entre les données observées pour le système biologique et l'application visée. Un des attraits de la recherche en microdosimétrie est sans doute de faire appel à ces deux démarches. Cependant, le défi des années à venir reste la possible remise en question du concept de cible d'un rayonnement. Elle pourrait amener à revoir profondément les modèles de représentation ainsi que la façon d'interpréter les données physiques.

Pascal Pihet
Département de protection de la santé de l'homme et de dosimétrie
Institut de protection et de sûreté nucléaire
Fontenay-aux-Roses

II. RÉPONSES PRÉCOCES ET PROCESSUS DE RÉPARATION

Réaction immédiate : réparer ou mourir

La cellule réagit immédiatement à l'atteinte de son ADN, dans les minutes, les heures et les jours qui suivent l'agression. Elle a d'ailleurs l'habitude de réparer les erreurs de la nature. L'organisme humain, qui renouvelle de l'ordre de 250 milliards de cellules chaque jour, n'est en effet pas à l'abri d'erreurs dans la synthèse des nouvelles molécules d'ADN. À ces erreurs spontanées s'ajoutent celles provenant d'agressions physiques, chimiques ou thermiques, dont les rayonnements, d'origine naturelle ou non, font partie. Des systèmes moléculaires plus ou moins complexes visant à maintenir l'intégrité du patrimoine génétique sont donc présents au sein des cellules. L'existence de pathologies humaines liées au dysfonctionnement de l'un ou l'autre de ces systèmes a permis de les caractériser et d'en souligner l'importance.

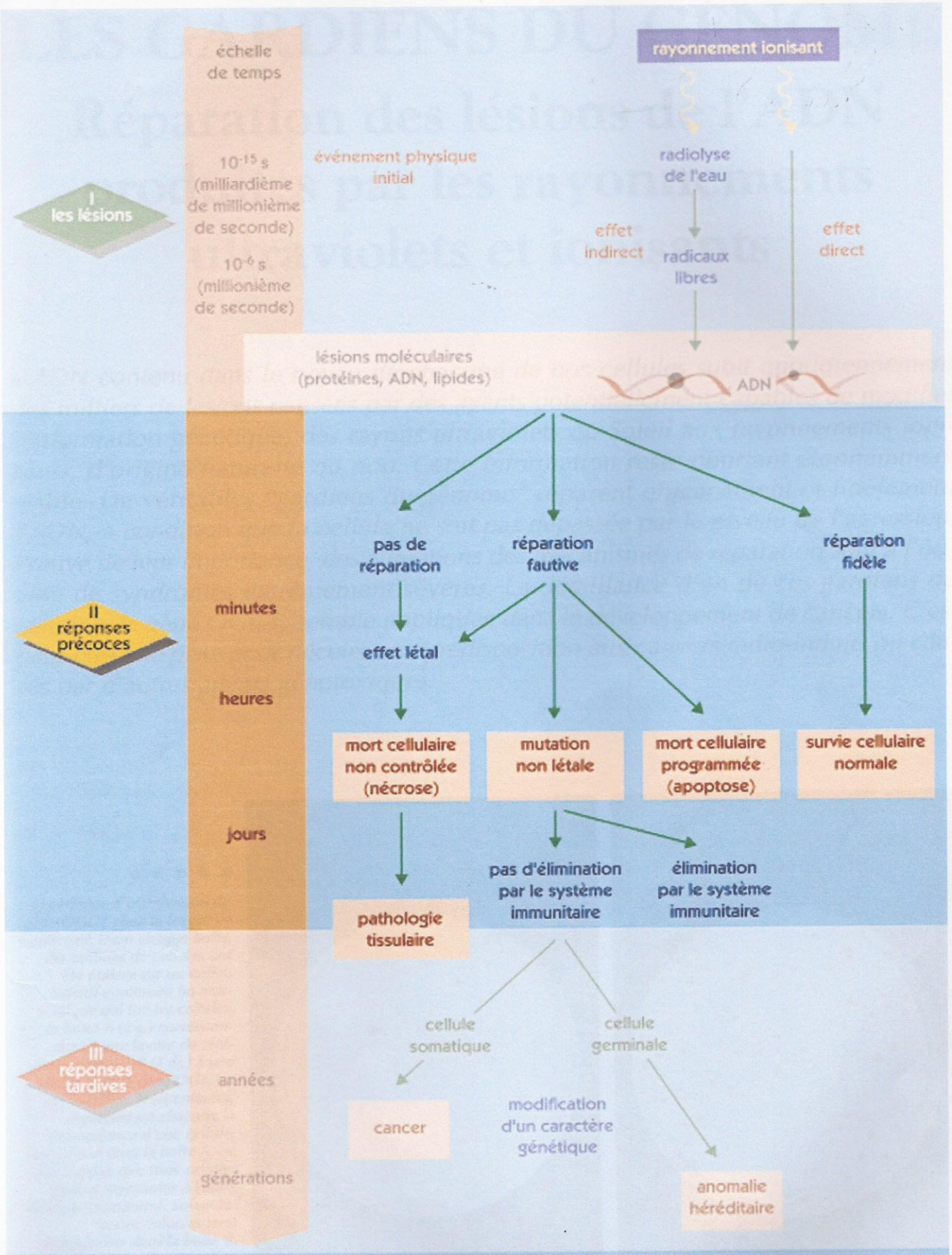
Dans le cas où la cellule ne se divise pas, et si la lésion n'affecte qu'un seul brin de l'ADN, une succession d'enzymes de réparation spécialisées élimine par coupure la séquence endommagée puis utilise la séquence complémentaire présente sur l'autre brin comme modèle exact pour une resynthèse rapide et fidèle du morceau excisé. En revanche, en cas de cassure simultanée des deux brins, la réparation est lente et rendue difficile par l'absence de modèle : elle fait appel à plusieurs voies enzymatiques. La protéine p53, en particulier, interagit avec ces enzymes spécialisées pour faciliter la réparation de l'ADN. Chez l'homme, de nombreux gènes impliqués dans les différentes voies de réparation sont mis en évidence par similarité avec ceux existant chez les bactéries ou les levures, voire dans le règne végétal.

Dans le cas de cellules se divisant avec une fréquence élevée, un ralentissement du cycle cellulaire, ou même son blocage, survient. Son interruption permet à différents systèmes de réparation de s'enclencher afin de restaurer, avec plus ou moins de fidélité, l'intégrité du matériel génétique avant l'étape cruciale de la duplication du stock d'ADN. Le mécanisme de surveillance induit un arrêt du cycle en des points de contrôle se situant à la transition entre une des phases de "préparation" et un des deux temps "moteurs" du cycle, la duplication de l'ADN d'une part et la division de la cellule de l'autre. De nouveau, la protéine p53 intervient pour "piloter" les gènes engagés dans le contrôle du cycle.

Si la réparation est inefficace face à des dommages de l'ADN trop importants, ou en l'absence d'arrêt du cycle cellulaire, la cellule se suicide. Cette mort programmée élimine de l'organisme des cellules pouvant être porteuses d'erreurs génétiques. Ce phénomène naturel est également à la base de changements morphologiques et physiologiques pendant la genèse de l'embryon et au cours du développement de l'individu. Là encore, la protéine p53 est impliquée. La mort de cellules irradiées constitue donc un rempart à la prolifération de cellules anormales potentiellement cancéreuses.

L'évaluation quantitative d'anomalies chromosomiques et d'effets visibles liés notamment à la dégradation de l'ADN au cours du suicide cellulaire offre, au niveau moléculaire, un indicateur biologique des dommages induits et complète ainsi les méthodes physiques de dosimétrie. Elle contribue à évaluer plus précisément des effets dont les chercheurs s'attachent par ailleurs à mieux comprendre les causes.

Marie-Claude Gaillard
Institut national des sciences et techniques nucléaires
CEA/Saclay



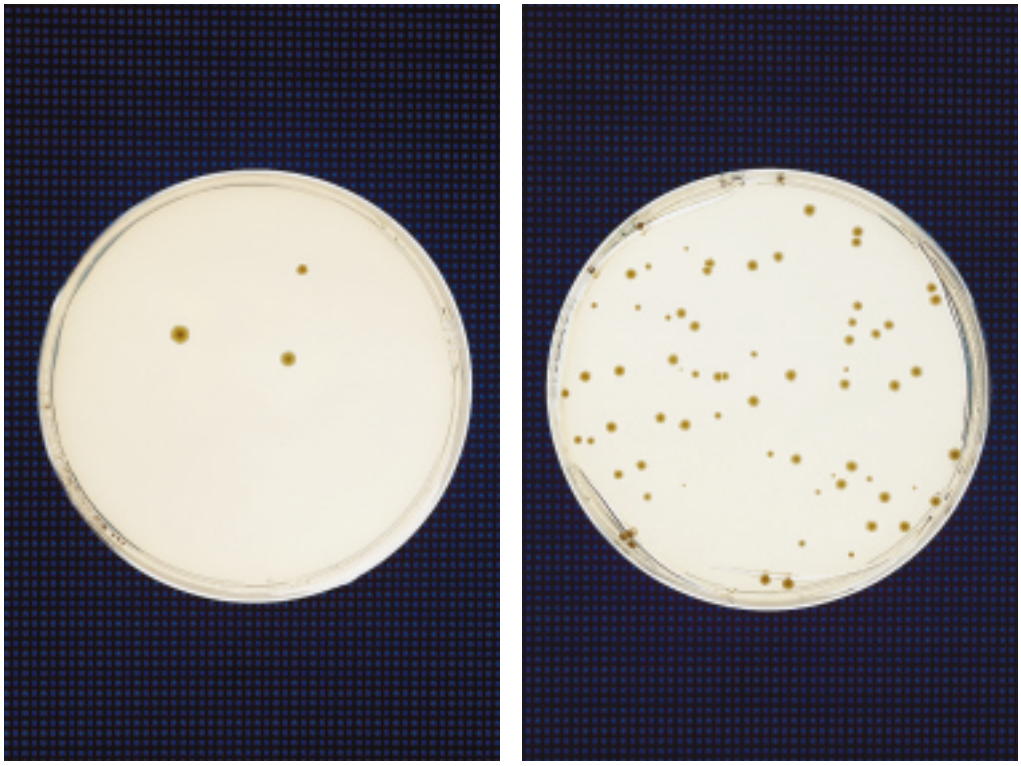
Effets biologiques des rayonnements ionisants. Évolutions possibles au niveau cellulaire en fonction du temps.

N.B. *Tous les événements indiqués n'ont pas la même probabilité de se produire. La survie cellulaire normale, par exemple, est le cas le plus fréquent après réparation de l'ADN.*

LES GARDIENS DU GÉNOME

Réparation des lésions de l'ADN produites par les rayonnements ultraviolets et ionisants

L'ADN contenu dans le noyau de chacune de nos cellules subit quotidiennement des milliers de lésions causées par des agents potentiellement capables de modifier l'information génétique, des rayons ultraviolets du Soleil aux rayonnements ionisants, d'origine naturelle ou non. Cette information reste pourtant étonnamment stable. De véritables "gardiens du génome" réparent efficacement et fidèlement l'ADN, à condition que la cellule ne soit pas dépassée par le niveau de l'agression. Preuve de leur importance, des altérations des mécanismes de réparation sont à l'origine de syndromes extrêmement sévères. La défaillance d'un de ces gardiens du génome, le gène OGG1, semble impliquée dans le développement de cancers. C'est peut-être une piste pour déceler une prédisposition aux cancers radio-induits ou causés par d'autres agents génotoxiques.



Expérience d'inactivation du gène OGG1 chez la levure de boulanger. Dans chaque boîte, dix millions de cellules ont été étalées sur un milieu nutritif contenant un antibiotique qui tue les cellules, la boîte A (à g.) correspondant à une levure de référence, la boîte B (à dr.) à une levure dont le gène OGG1 a été inactivé. Trois colonies, représentant chacune la descendance d'une cellule, ont poussé dans la boîte A, ce qui signifie que trois cellules étaient résistantes à l'antibiotique (mutantes). Soixante-quatre colonies sont dénombrées dans la boîte B, montrant que l'inactivation du gène OGG1 s'est traduite par la multiplication d'un facteur 21 (64/3) de la fréquence de mutations.

A. Gonin/CEA

Nécessité et mécanismes de la réparation de l'ADN

L'**ADN** est soumis à de multiples attaques, inévitables, de la part du milieu intracellulaire et de l'environnement. Ces agressions provoquent la formation de plusieurs milliers de lésions par jour et par **cellule**. Les espèces réactives de l'oxygène, produites par les cellules lors de l'utilisation de l'oxygène au cours de la respiration et aussi, le cas échéant, par la **radiolyse** de l'eau, sont susceptibles de générer des lésions de l'ADN. La lumière solaire est en partie composée de radiations ultraviolettes qui altèrent l'ADN par action directe (UVB) ou indirecte (UVA) après excitation de molécules réceptrices normalement présentes dans la cellule. L'ADN est également très sensible aux attaques des **rayonnements ionisants** d'origine naturelle (radioactivité terrestre et rayons cosmiques) et de ceux générés par l'activité humaine (médecine nucléaire et, dans une très faible mesure, production d'énergie).

Les mécanismes de formation et la nature des lésions induites dans l'ADN ont été décrits dans le chapitre I. Le fait que l'ADN s'altère très rapidement est en contradiction apparente avec la stabilité observée de l'information génétique au fil des générations. En effet, l'étude des fréquences de **mutations** suggère une instabilité inférieure à une erreur pour 10 milliards de **nucléotides** copiés, soit moins d'une erreur par génération dans un **génome** humain.

Excision et resynthèse

L'évolution a résolu ce paradoxe en mettant en place des mécanismes de réparation de l'ADN efficaces et fidèles. La présence de lésions induites par les rayonnements ultraviolets solaires ou ionisants dans l'ADN est en effet un problème majeur pour la cellule, puisqu'elles peuvent conduire soit à la mort de la cellule, soit à une altération du message génétique (mutation). La réfection par *excision* et *resynthèse* est la voie principale de réparation chez tous les organismes vivants. Elle consiste à éliminer (excision) une lésion et à restituer l'information initiale (resynthèse). Ce mécanisme implique l'existence "d'agents de reconnaissance" qui détectent les lésions de l'ADN et "d'équipes d'intervention" qui assurent l'élimination de la lésion et la reconstruction à l'identique (figure 1). Ces rôles sont tenus dans la cellule par les **protéines** de réparation de l'ADN. Il s'agit d'enzymes capables d'agir avant sa **réplication** dans la cellule (encadré B, ***La réplication de l'ADN : une fidélité quasi parfaite***).

L'ADN réparé par excision et resynthèse est identique à ce qu'il était avant la formation de la lésion. Il s'agit donc d'un mécanisme conservatif, qui tend à préserver l'information génétique au fil des générations. L'existence et l'efficacité de tels mécanismes moléculaires expliquent comment l'ADN de la cellule peut préserver l'intégrité du message génétique au cours du temps. Il est important de noter que les mécanismes de réparation de l'ADN sont très semblables depuis les **bactéries**, organismes vivants les plus simples, jusqu'à l'homme. Cette identité signifie que ces mécanismes sont apparus très tôt au cours de l'évolution et souligne leur nécessité dans un monde vivant qui utilise l'ADN pour stocker son information génétique.

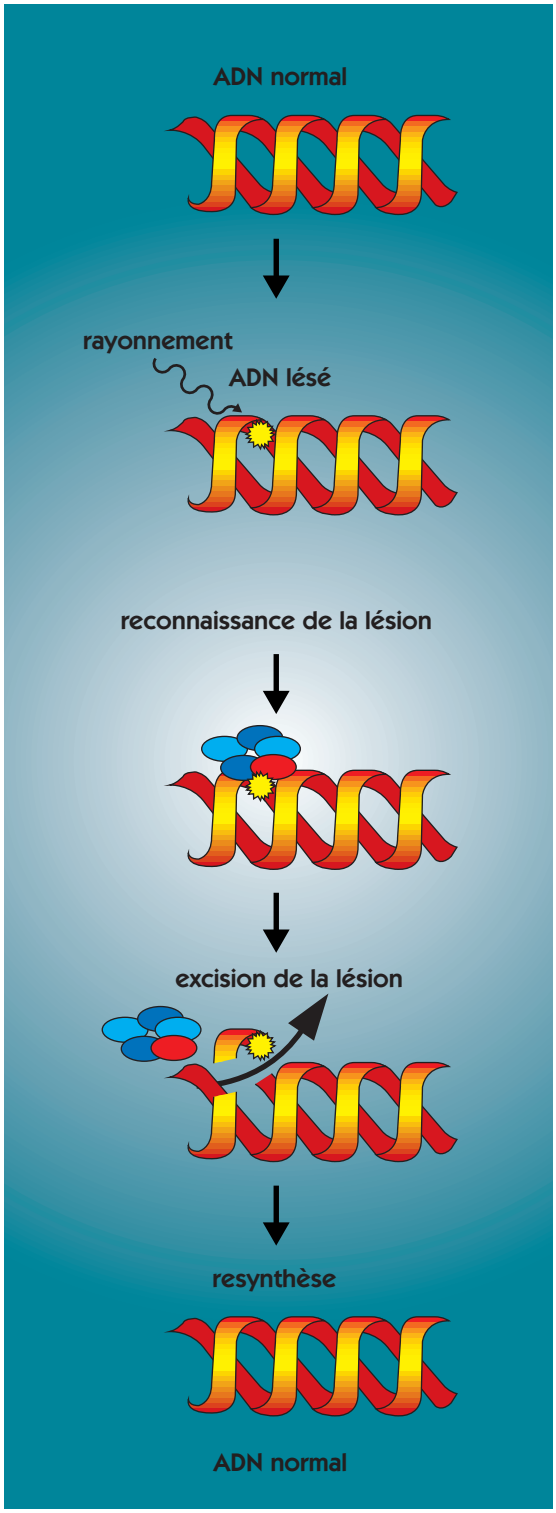


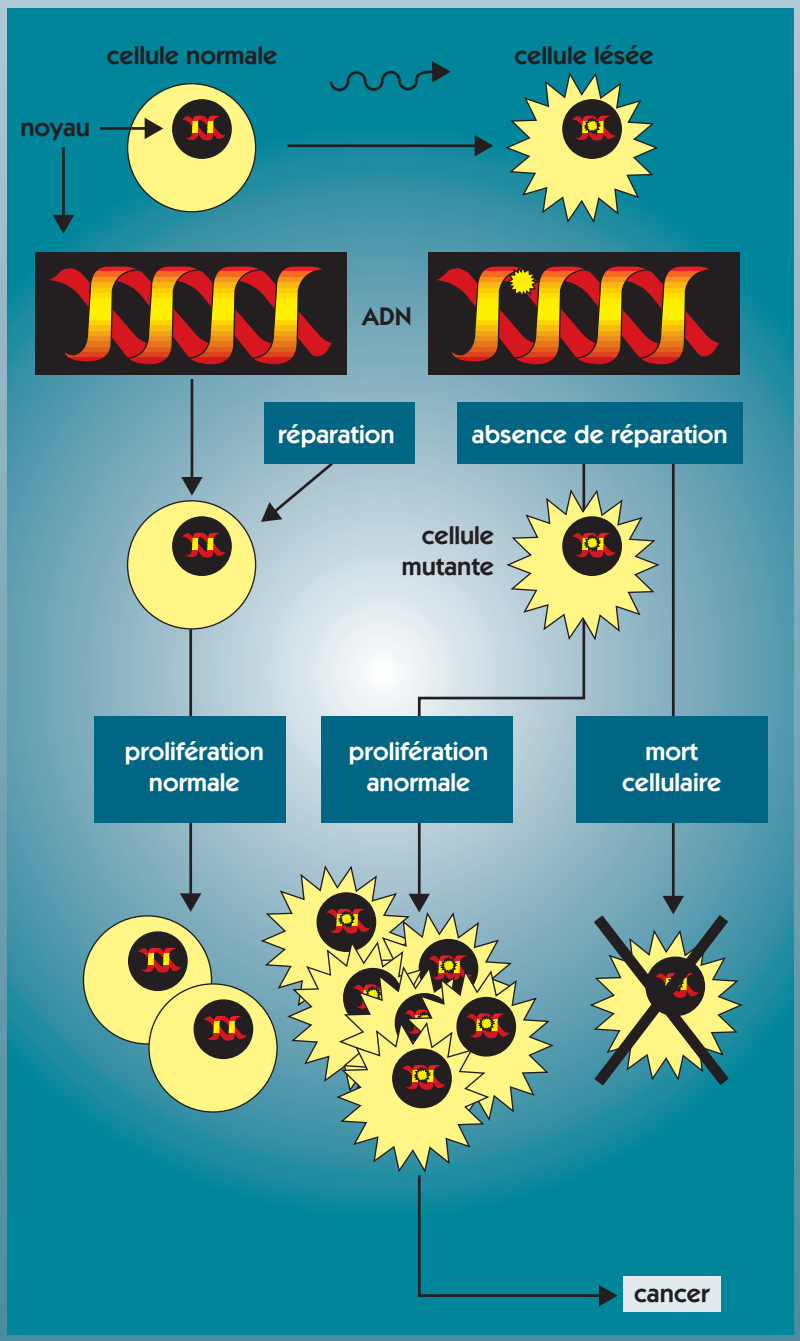
Figure 1. Réparation de l'ADN par excision et resynthèse. Les enzymes de réparation de l'ADN "travaillent" en excisant, c'est-à-dire en coupant de part et d'autre de la lésion préalablement reconnue, la séquence endommagée sur l'un des deux brins de l'ADN. Pour reformer le fragment éliminé tel qu'il était avant d'être lésé, il suffit de construire la séquence complémentaire de celle qui lui fait face sur l'autre brin de l'ADN.

Réparation de l'ADN et maladies génétiques

L'importance des mécanismes de réparation de l'ADN chez l'homme est démontrée par l'étude de diverses maladies génétiques comme le *xeroderma pigmentosum*, le *syndrome de Cockayne* ou l'*ataxia telengiectasia*. Il s'agit là de maladies **autosomales récessives** rares, qui se caractérisent du point de vue clinique par trois types d'affections graves : l'apparition précoce de cancers, un retard mental et un retard du développement physique. Elles sont extrêmement sévères dans la mesure où, dans la majorité des cas, les individus atteints meurent avant l'âge adulte. Deux de ces maladies, *xeroderma pigmentosum* et le *syndrome de Cockayne*, sont la conséquence directe d'une déficience dans la voie de réparation par excision et resynthèse des lésions induites dans l'ADN par les radiations solaires UVB et de nombreux agents chimiques cancérogènes. Le développement précoce des cancers chez les patients souffrant de *xeroderma pigmentosum* est la conséquence des mutations qui sont causées par l'accumulation des lésions non réparées dans l'ADN. Ces mutations modifient le fonctionnement de certains **gènes** et confèrent des propriétés de prolifération anormales aux cellules **mutantes**. Cette prolifération non programmée peut parfois donner naissance à une tumeur cancéreuse (encadré 1). Dans le cas de l'*ataxia telengiectasia*, les cellules des patients sont hypersensibles aux rayonnements ionisants. Le défaut moléculaire responsable a été identifié sous la forme de mutations dans le gène ATM. Ce gène ne code pas directement une protéine de réparation de l'ADN, mais participe à une voie complexe qui renforce l'efficacité des mécanismes de réparation des lésions de l'ADN induites par les rayonnements ionisants. L'importance des mécanismes de réparation de l'ADN a également été mise en évidence chez la souris dont certains gènes peuvent être expérimentalement inactivés. Des études récentes montrent que l'inactivation des gènes *HAP1* et *POLβ* impliqués dans la voie de réparation par excision et resynthèse provoque la mort embryonnaire précoce des individus qui

Réparation de l'ADN et cancérogenèse 1

La cellule dont l'ADN a été endommagé peut avoir différentes destinées. Dans la majorité des cas, l'ADN est réparé fidèlement et le programme génétique est en mesure de se dérouler normalement. Lorsque la réparation est absente ou incomplète, et selon la nature des lésions, la cellule va mourir ou muter. Des mutations dans des gènes qui gouvernent le cycle cellulaire (encadré E, ***Le cycle cellulaire : duplication sous contrôle***) vont conférer aux cellules la propriété de proliférer de manière incontrôlée et finalement aboutir au cancer. Ce schéma illustre comment la réparation de l'ADN contribue à prévenir l'apparition des cancers chez l'homme en éliminant les lésions induites par les rayonnements ou les agents chimiques. C'est cette action de prévention des altérations du message génétique qui sous-tend le concept de "gardien du génome".

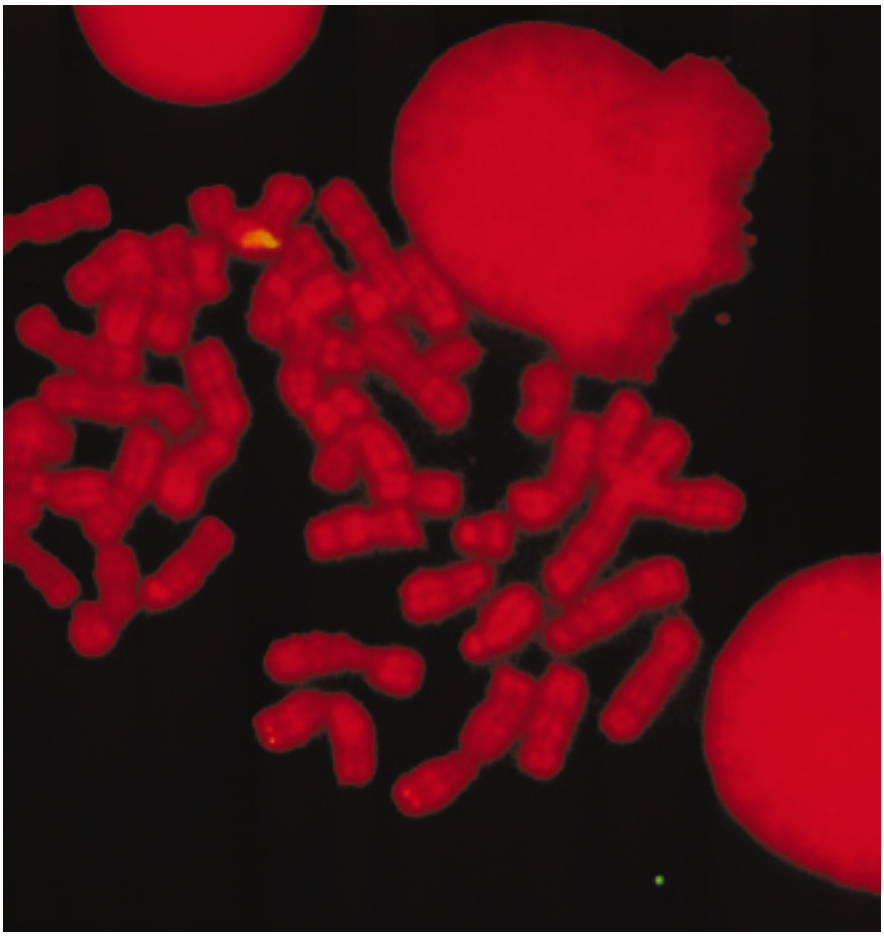


en sont porteurs. Il est important de noter que ces gènes ont leur équivalent dans les cellules humaines.

Ces différentes observations confirment que la réparation de l'ADN est nécessaire à la survie des organismes, en particulier chez les mammifères. La prédisposition au cancer des individus porteurs de gènes de réparation de l'ADN mutés suggère aussi que les mécanismes de réparation jouent un rôle essentiel dans la prévention du processus de **cancérogenèse**. Chez les patients atteints de *xeroderma pigmentosum*, le délai d'apparition des tumeurs est réduit de plusieurs dizaines d'années par rapport à la population normale. Ceci permet d'introduire le concept de gardiens du génome pour les protéines de réparation de l'ADN qui assurent la stabilité de l'information génétique et retardent ainsi l'émergence des cancers chez l'homme (encadré 1).

Le gène *OGG1*, un gardien du génome

Le nombre des gènes directement impliqués dans la réparation de l'ADN chez les mammifères pourrait être de l'ordre de plusieurs dizaines. Dans le cas de la réparation par excision et resynthèse, la diversité réside principalement dans l'étape initiale de reconnaissance des différentes lésions. Il est remarquable de constater que face à l'extraordinaire variété des lésions générées dans l'ADN, la cellule n'utilise qu'un nombre restreint de protéines de réparation. En fait, la plupart d'entre elles sont polyvalentes et reconnaissent plusieurs types de lésions. Les recherches menées dans les laboratoires du Commissariat à l'énergie atomique (CEA) en association avec le Centre national de la recherche scientifique (CNRS) portent en particulier sur la réparation et l'impact biologiques d'une lésion radio-induite qui est réparée par excision et resynthèse, la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua). Cette modification de l'ADN provoque des mutations qui se traduisent finalement par le remplacement d'une paire **guanine-cytosine** par une paire **thymine-adénine**. Une équipe mixte CEA-CNRS a isolé le gène *OGG1* codant la protéine qui reconnaît et excise cette lésion chez la **levure** de boulanger, *Saccharomyces*



CEA-CNRS

Les quatre petits points fluorescents indiquent l'emplacement du gène OGG1 humain à l'extrémité du bras court du chromosome 3 (région p). Cette localisation est potentiellement importante dans la mesure où des réarrangements de cette région sont fréquents dans de nombreuses tumeurs humaines, principalement du poumon et du rein. Ce résultat a été obtenu en collaboration avec le Dr. Chantal Desmaze (Laboratoire de radiobiologie et oncologie au CEA/Fontenay-aux-Roses).

cerevisiae. L'inactivation du gène *OGG1* de cette levure cause une augmentation de l'instabilité génétique qui est caractérisée par une fréquence de mutations spontanées de 20 à 100 fois supérieure à celle observée dans une levure de boulanger possédant cette fonction de réparation de l'ADN. Cette instabilité se caractérise par exemple par l'apparition au sein d'une population d'un nombre accru de cellules mutantes résistant à un antibiotique.

D'une longueur totale d'environ deux mètres, mises bout à bout, les molécules d'**ADN** présentes dans le noyau de chaque cellule humaine portent la totalité de l'information génétique de l'organisme sous forme de dizaines de milliers de **gènes** qui constituent son **génome**, soit plusieurs milliards de paires de **nucléotides**. Les gènes ne sont pas des entités visuellement individualisées mais une suite d'informations, un programme d'instructions. En revanche, les **chromosomes**, qui en sont les supports, sont des éléments parfaitement distincts, du moins entre le moment de leur apparition lors des premières phases de la division cellulaire et celui de leur disparition, une fois celle-ci terminée (voir l'encadré E, ***Le cycle cellulaire : duplication sous contrôle***). Chaque molécule d'ADN portant les gènes prend en effet des aspects très différents suivant le moment du cycle où elle est observée. Avant la division cellulaire, elle apparaît comme une structure lâche dispersée dans le noyau. Ce n'est que lorsque la division est sur le point de se déclencher qu'elle s'enroule pour se transformer, à l'aide de molécules associées, en une structure compacte et ordonnée, les chromosomes. Le complexe constitué par ces molécules spécialisées (les **histones**

V. Estiot/BSIP

Caryotypes humains, comprenant 46 chromosomes : 22 paires plus une paire de chromosomes sexuels,

Les chromosomes, supports matériels des gènes

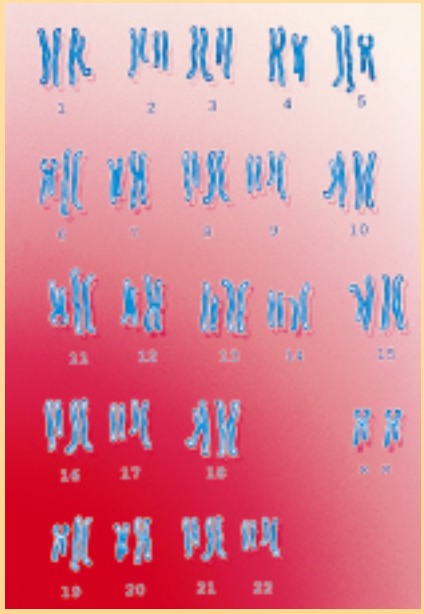
C

ainsi que d'autres protéines chromosomiques) et l'ADN cellulaire est appelé **chromatine**. L'association des histones avec l'ADN produit les **nucléosomes**, unités élémentaires de la chromatine.

BSIP

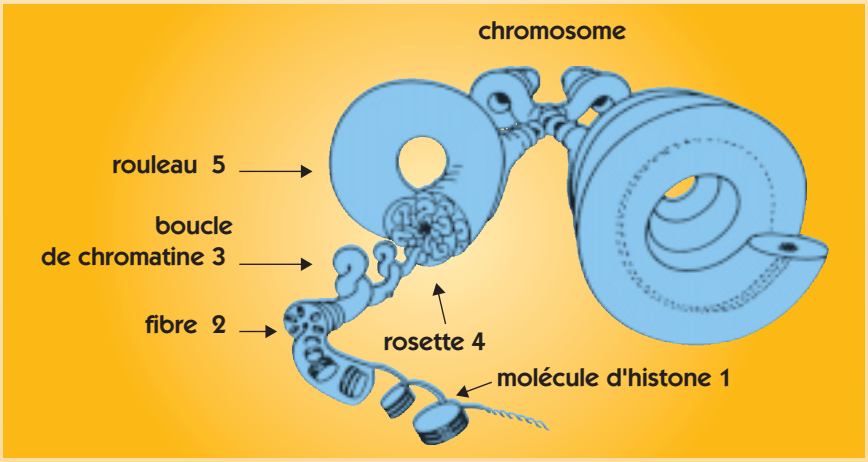
Les gènes sont situés sur des bandes transversales caractéristiques d'un chromosome donné.

Pour former les chromosomes, de longs morceaux d'ADN se trouvent repliés suivant différents enroulements successifs (schéma ci-contre) et pas seulement à l'échelle de la double hélice. Celle-ci s'enroule d'abord autour d'une "perle" (7 à 10 nm de diamètre, un nanomètre = 10^{-9} m) composée d'un assemblage de huit molécules d'histones (1). Le "collier de perles" ainsi obtenu se contracte sur lui-même par enroulement pour devenir une fibre de 30 nm de diamètre (2). La fibre forme ensuite des boucles de chromatine (3). Six de ces boucles constituent à leur tour une rosette (4). Ces rosettes sont rassemblées pour donner une fibre de 300 nm, s'enroulant elle-même pour créer un rouleau (5) lors de la métaphase. La longueur totale d'un chromosome humain est de 1 000 à 10 000 nm. Le **caryotype**, qui correspond à l'ensemble des chromosomes d'une cellule en métaphase, comprend pour l'espèce humaine 46 chromosomes (22 paires de chromosomes homologues ou **autosomes** et 1 paire de chromosomes sexuels, XX chez la femme et XY chez l'homme).



X et Y chez l'homme (en vert), X et X chez la femme (en rouge).

J. Filipski, Institut Jacques Monod



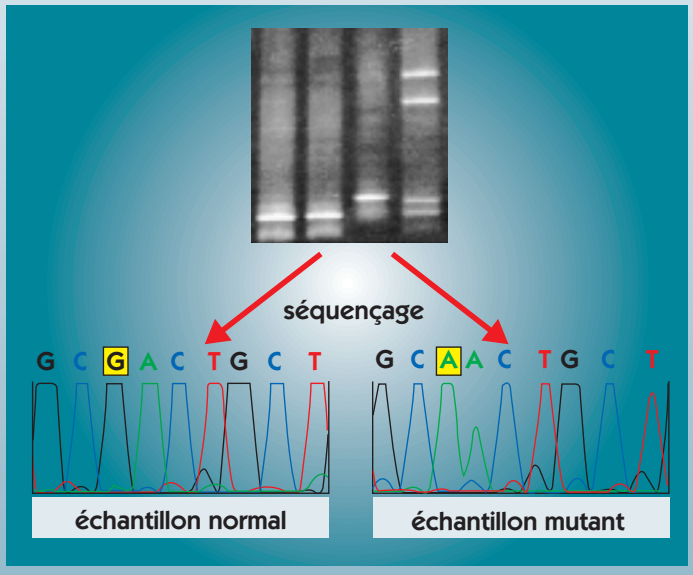
La molécule d'ADN d'un chromosome contient trois séquences nucléotidiques indispensables à sa réplication : des "**origines de réplication**", un **centromère** et des **télomères**. Pour se répliquer, une molécule d'ADN a en effet besoin d'une séquence particulière qui marque le point de départ. Le centromère sert pour sa part à maintenir ensemble les deux copies du chromosome dupliqué, appelées **chromatides**, et à les attacher au fuseau mitotique lors de la mitose, de sorte qu'une copie soit distribuée à chaque cellule fille. Le troisième élément de séquence, situé aux deux extrémités du chromosome, est le télomère. Sa fonction ? Éviter que la chaîne d'ADN soit raccourcie à chaque cycle de réplication. Périodiquement allongée par une enzyme, la **télomérase**, cette séquence compense la perte des quelques nucléotides de l'ADN des télomères et permet la réplication d'un chromosome dans sa totalité.

Différentes techniques de coloration permettent de faire apparaître sur les chromosomes des bandes transversales caractéristiques de chacun d'eux. Les bandes G distinguent les régions de l'ADN riches en paires de nucléotides adénine-thymine tandis que les bandes R montrent celles riches en paires de nucléotides guanine-cytosine. Les bandes C marquent entre autres les centromères. Les gènes sont situés sur les bandes G et R. Les **allèles** d'un gène donné occupent la même position (***locus***) sur des chromosomes homologues, l'un d'origine paternelle, l'autre d'origine maternelle. Si les deux allèles sont identiques, l'individu est dit **homozygote** pour ce type de gène ; dans le cas contraire, il est dit **hétérozygote**. Les deux allèles remplissent une même fonction, comme par exemple la synthèse d'une protéine. La longueur d'un gène, entre quelques dizaines et quelques milliers de paires de nucléotides, dépend de la complexité de la protéine qu'il détermine. L'**expression d'un gène** donné nécessite soit la présence d'un seul allèle de type **dominant** sur l'un des deux chromosomes homologues, soit celle de deux allèles de type **récessif** sur chacun d'eux.

La recherche des mutations d'*OGG1* dans des tumeurs humaines

2

Quel est le lien entre certains cancers humains et l'inactivation du gène *OGG1* ? L'étude de la qualité du gène dans des cellules tumorales peut fournir une réponse. Afin de rechercher la présence de mutations dans le gène, du matériel génétique a été extrait de tumeurs et de tissu sain du même patient. Après avoir spécifiquement **amplifié** le gène *OGG1*, l'ADN, qui est naturellement électriquement chargé, est placé dans un champ d'électrophorèse où il migre, apparaissant sous forme de bandes blanches (figure). À un temps donné, si l'échantillon est mutant (les deux colonnes de droite) l'ADN ne migre pas comme l'ADN normal (les deux colonnes de gauche) : c'est la preuve que le gène *OGG1* est muté.

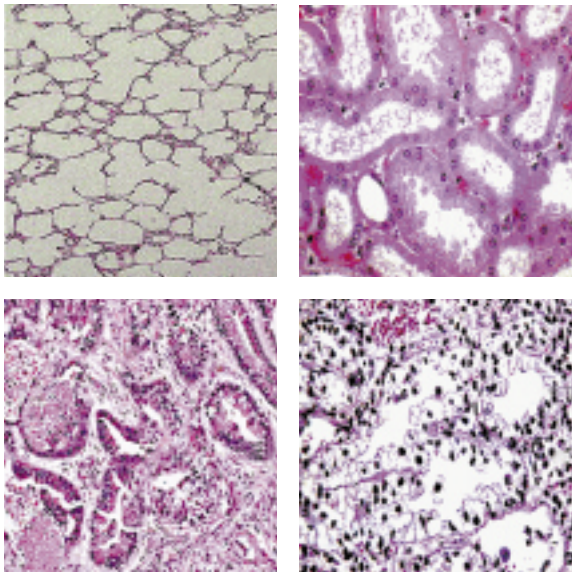


Il s'agit ensuite de caractériser la mutation, qui se traduit par une modification de l'ordre des bases (adénine, thymine, guanine et cytosine) constituant l'information génétique contenue dans l'ADN selon un code à 4 "lettres" (encadré A, ***La molécule d'ADN, vecteur de l'hérédité***). Ce code peut être décrypté par la technique de **séquençage**. Il apparaît ainsi qu'en troisième position la guanine (G) de l'échantillon normal est remplacée par une adénine (A) dans l'échantillon mutant. Cette modification suffit à expliquer le non fonctionnement de la protéine Ogg1.

De la levure à l'homme

Bien entendu, il restait un pas essentiel à franchir : le passage à l'homme. Il l'a été par la même équipe en 1997, date à laquelle celle-ci a réalisé le **clonage** du gène *OGG1* chez l'homme et la souris. Le gène *OGG1* est **exprimé** dans tous les tissus humains analysés, ce qui est compatible avec l'idée que sa fonction primordiale est d'éliminer les lésions résultant du **métabolisme** respiratoire de la cellule. Le gène *OGG1* est situé sur le bras court du **chromosome** 3 chez l'homme. La localisation subcellulaire de la protéine Ogg1 humaine à montré une accumulation dans le noyau des cellules, où se trouve l'ADN. Le but de ces recherches est d'élucider le rôle biologique du gène *OGG1* par des études chez l'homme et la souris.

Le gène *OGG1* est donc potentiellement un des gardiens du génome qui, en assurant l'élimination de lésions **mutagènes** de l'ADN, retardent le développement de certains cancers chez l'homme. En conséquence, la perte de ce gène pourrait favoriser la formation de mutations et accélérer la cancérogenèse



Chevillard/LCE/CEA

Coupes de poumon normal (en haut) et d'une tumeur de cet organe (en bas). Coupes de rein normal (en haut) et d'une tumeur de cet organe (en bas).

A. Gonin/CEA

Séquenceur automatique d'ADN. Le gel échantillon est introduit à l'aide d'une seringue dans le séquenceur. Chaque couleur sur l'écran correspond à une base d'ADN après analyse de la séquence.

dans les organes cibles. Comment valider cette hypothèse chez l'homme ? Si des cancers sont associés à la perte de la fonction *OGG1*, les chercheurs s'attendent à trouver des altérations de ce gène dans l'ADN des cellules tumorales. Ils ont donc entrepris l'analyse de la "qualité" du gène *OGG1* dans des tumeurs humaines du rein et du poumon (encadré 2). Les résultats indiquent que dans le cancer du rein, environ 5 % des tumeurs analysées présentent une mutation dans le gène *OGG1*. Ces données, encore préliminaires, suggèrent une corrélation entre certains cancers du rein et l'inactivation du gène *OGG1*.

Dépister des populations à risque ?

À long terme, le statut du gène *OGG1* pourrait être étudié au sein de la population afin de définir d'éventuelles "populations à risque" présentant une prédisposition aux cancers radio-induits ou imputables à l'exposition à des agents **génotoxiques** agissant également par oxydation au niveau de l'ADN. D'une manière générale, la détection de mutations dans des gènes de réparation pourrait aider à définir les catégories de personnes auxquelles il serait conseillé de s'exposer le moins possible à certains agents de l'environnement naturel, professionnel ou sanitaire.

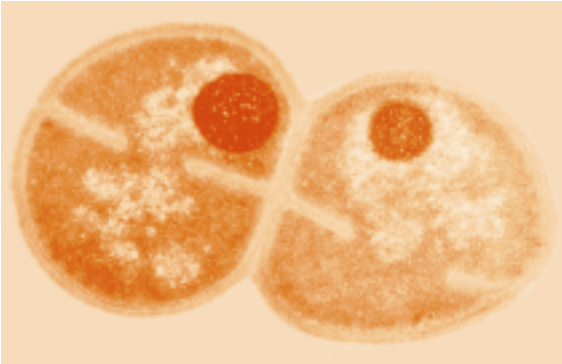
Serge Boiteux, **Juan Pablo Radicella**
UMR217 CNRS-CEA Radiobiologie moléculaire et cellulaire
et **Sylvie Chevillard**
Laboratoire de cancérogenèse expérimentale

Département de radiobiologie et radiopathologie
Direction des sciences du vivant
CEA/Fontenay-aux-Roses

DES BACTÉRIES RÉSISTANTES

Les êtres vivants ne sont pas égaux face aux rayonnements ionisants. La palme de la résistance revient sans conteste à certaines bactéries. La championne toutes catégories supporte des doses de rayonnement dont un seul millième tuerait un homme !

Bactérie* Deinococcus radiodurans *(longueur environ 3 micromètres).



John R. Battista/LOUISIANA STATE UNIVERSITY

Elle s'appelle *Deinococcus radiodurans*. La particularité de cette **bactérie** est de résister de façon surprenante aux radiations : elle supporte en effet des **rayonnements** 1 000 fois supérieurs à ceux qui peuvent tuer un homme ! Déjà, alors qu'une **dose** de 10 **grays** (Gy) est mortelle pour l'homme, il faut 100 Gy pour tuer la bactérie *Escherichia coli*. *Deinococcus radiodurans* résiste pour sa part à plus de 10 000 Gy !

Les raisons de la résistance de *Deinococcus radiodurans* aux rayonnements sont doubles. Elle est d'abord dotée d'un système de réparation enzymatique de l'**ADN** particulièrement efficace(1) (voir *Les gardiens du génome*). Juste après l'irradiation, la **réplication** de l'ADN se bloque pour que la bactérie puisse utiliser un processus de réparation dit de *recombinaison multiple*. Elle découpe les morceaux intacts d'un **chromosome** endommagé et les recombine avec d'autres morceaux indemnes, reconstituant ainsi un chromosome fonctionnel. Elle possède d'autre part une capacité exceptionnelle à supporter l'action prolongée de l'oxygène, très dommageable pour l'ADN.

(1) Le microbiologiste John Battista, découvreur de *Deinococcus radiodurans*, pense que la bactérie, sur une Terre encore jeune, a développé ce système pour réparer les dommages dus à la déshydratation, très similaires à ceux induits par les rayonnements.

Des qualités biodégradantes

L'industrie nucléaire essaie bien entendu de tirer profit de ces travaux. Une équipe américaine menée par C. C. Lange exploite ainsi les propriétés de *Deinococcus radiodurans* dans le traitement de déchets radioactifs contenant des solvants toxiques, organiques ou chlorés. La bactérie dégrade (pendant plus de 30 heures) le chlorobenzène – qu'elle utilise comme source de carbone et d'énergie – dans un milieu où le **débit de dose** des rayonnements est de l'ordre de 60 Gy/h, alors que *Escherichia coli* ne se développe pas dans de telles conditions d'irradiation.

Il n'est pas possible de parler de résistance ou de sensibilité des bactéries aux rayonnements – dire par exemple qu'une bactérie est tuée par une dose de 100 Gy ou résiste à une dose de 10 000 Gy – sans en préciser le débit de dose. Le nombre des lésions des **brins** de l'ADN d'une cellule bactérienne augmente en effet considérablement en fonction de ce débit.

Au CEA/Cadarache, une équipe du Laboratoire comportement des colis et microbiologie a expérimenté l'effet de très faibles débits de dose sur le comportement des bactéries. L'objectif est ici d'étudier les conséquences de la présence de micro-organismes, tels que ces bactéries, susceptibles de se développer dans l'environnement de colis de déchets faiblement ou moyennement **radioactifs** qui seraient placés dans un site de stockage géologique.

Ces expérimentations simulent différentes conditions de *stress* pour les bactéries, notamment le rayonnement sous un débit de dose proche du débit initial d'un colis de déchets de radioactivité moyenne confinés dans du bitume. Ainsi, des micro-organismes ne manifestant pas à l'origine de facteurs de résistance particuliers vis-à-vis des rayonnements, continuent à se développer, depuis plus de 500 jours au début de l'année 2000, en présence des éléments nutritifs nécessaires, sous un rayonnement ayant un débit de dose d'environ 8 Gy/h, avec une **dose cumulée** atteignant à cette date 100 000 Gy.

Même si les bactéries présentes dans un stockage géologique sont "blindées" contre les effets des rayonnements dans ces conditions, leur **métabolisme** semble peu préjudiciable au confinement des déchets radioactifs. L'équipe de Cadarache a montré qu'elles peuvent, au contraire, réduire la mobilité des **radionucléides** en biodégradant les molécules avec lesquelles ceux-ci forment des complexes chimiques.

Marie Libert
Département d'entreposage
et de stockage des déchets
Direction du cycle du combustible
CEA/Cadarache