

Lésions moléculaires et mécanismes de réparation de l'ADN:



Cours de Nicolas FORAY, présenté par Jacques BALOSSO
U647 Inserm
European Radiation Synchrotron Facility - Grenoble - France

HISTORIQUE : entre nouveaux concepts et nouvelles techniques

- 1895 : Découverte des rayons X (Roentgen)
- 1896 : Première application sur un cancer de l'estomac (Despeignes)
- 1906 : Premières lois (Tribondeau et Bergonié)
- 1930 : Les aberrations chromosomiques, les micronoyaux (Grote)

**Radiobiologie
descriptive**

- 1947 : Théorie de la cible (Lea)
- 1957 : Méthode des colonies (Puck et Markus)
- 1981 : La radiosensibilité intrinsèque (Fertil et Malaise)

**Radiobiologie
quantitative**

- 1980 : Techniques de détection des lésions de l'ADN
- 1990 : Les protéines de réparation de l'ADN
- 2000 : Leur organisation, leur mutation
 - > les syndromes radiosensibles
 - > vers la personnalisation des traitements

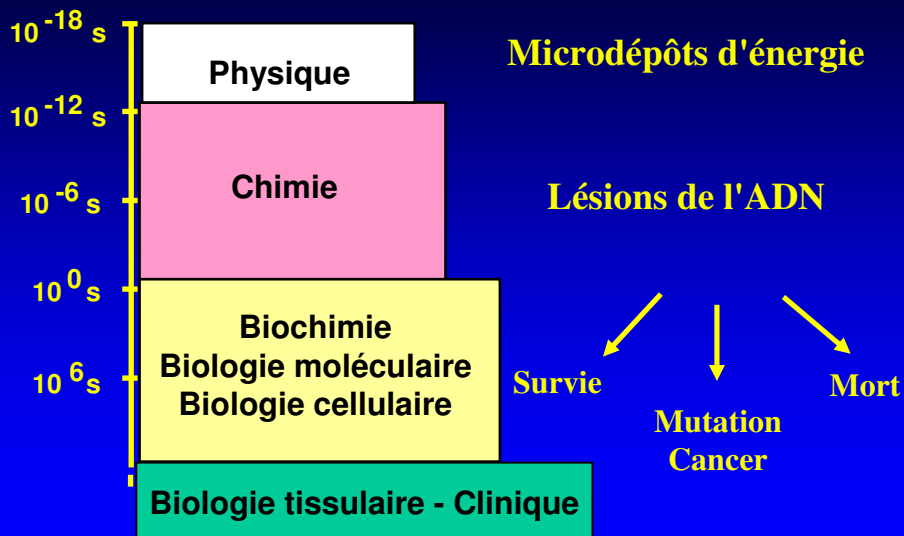
**Bases
moléculaires
de la
radiosensibilité**

1. LES INDISPENSABLES avant d'aborder la réparation

- 1.1 La radiobiologie commence à 14 eV (ionisation de l'eau) !!!
-> importance des microdépôts d'énergie, continuum entre physique et biologie
- 1.2 Importance de l'ADN comme cible privilégiée (exp. de Huang 1996)
-> importance faible des dégâts membranaires ou cytoplasmiques (possibles artéfacts ou très grande spécificité)?
- 1.3 Importance de la condensation de l'ADN
-> L'ADN condensé protège mais peut se relaxer violemment
-> paradoxe de la phase S : moins condensée, plus de cassures mais plus de protéines de réparation présentes : radiorésistance de S
- 1.4 Par CONVENTION : la mort (clonogénique) = perte de capacité de division
-> mort ≠ disparition physique de la cellule !!!
-> prédominance de la mort mitotique et de la sénescence sur l'apoptose
-> une cellule dite morte métabolise et répare !!! (ex: 10, 30, 100 Gy)
-> la mort augmente avec la dose mais la cinétique de réparation est invariable (pas de saturation !!!)

N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

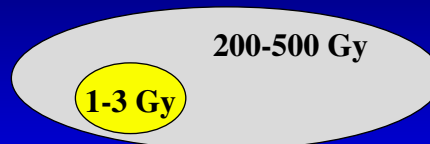
1.1 Chronologie des événements après irradiation : un continuum



N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

1.2 Importance relative de l'ADN dans la létalité

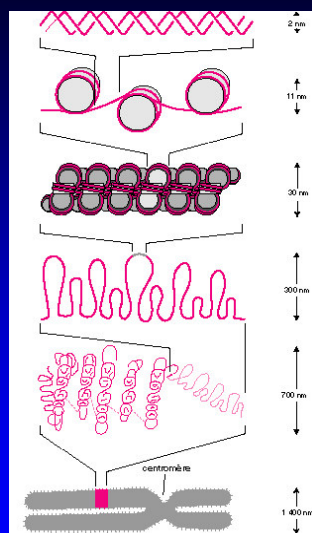
- Pour induire 50% de létalité chez un fibroblaste humain, il faut délivrer au noyau ou au cytoplasme :



- Utilisation des émetteurs β et de la microirradiation
- Expérience de Huang et al. 1996 : micro injection d'un fragment d'ADN de levure dans un fibroblaste humain

N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

1.3 De quel ADN parle-t-on?



Compaction 0 : Double-hélice (S)

Compaction 1 : Modèle solénoïdal (G1)

Compaction 2 : Modèle super-solénoïdal (G1)

Compaction 3 : Boucle=loop (G1)

Compaction 4 : Chromatine - chromosome (S-G2)

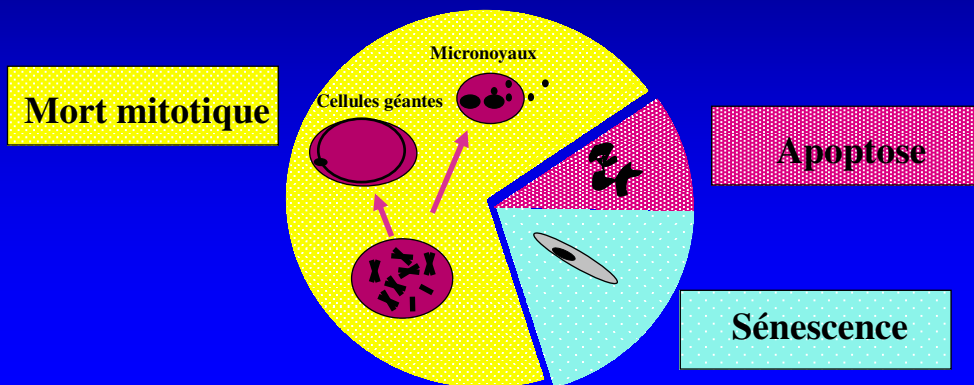
Compaction 5 : Chromosome (M)

Paradoxe de la phase S : moins condensée, plus de cassures mais plus de protéines de réparation présentes : radiorésistance de S

N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

1.4 la mort cellulaire en radiobiologie

- Mort = perte de capacité de division # disparition physique de la cellule !!!
- Une cellule dite morte métabolise et répare !!! (ex: 10, 30, 100 Gy)
- La mort augmente avec la dose mais la cinétique de réparation est invariable !!! (pas de saturation !!!)



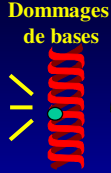

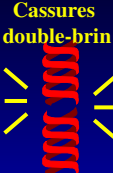
N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

2. Des microdépôts d'énergie aux DSBs

- 2.1 Les différents types de dommages radioduits de l'ADN
 - > importance des microdépôts d'énergie dans la formation des dommages
 - > dommages de bases (BD), cassures simple (SSB) et double (DSB) brin
 - > Les DSBs : issues des gros microdépôts, + rares, mais + longues à réparer
 - > Redondances entre Excision-Resynthèse, Recombinaison et Suture
- 2.2 Les DSBs, les dommages responsables de la mort cellulaire
 - > DSB non réparées -> cassures chromosomiques -> mort
 - > rongeurs ou levures radiosensibles sont déficientes en réparation des DSBs
- 2.3 DSBs : induites ou réparées
 - > la radiosensibilité n'est pas corrélée au nombre de DSBs induites !!!
 - > la radiosensibilité est corrélée au nombre de DSBs non réparées !!! (voir + loin)
- 2.4 Quelles techniques?
 - > fragments (fortes doses requises); immunofluorescence (spécificité des marqueurs)
 - > plasmides (trop *in vitro*?); effet chromatine+fragments (effets mêlés)

N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

2.1 Quels dommages de l'ADN?

	 Dommages de bases	 Cassures simple-brin	 Cassures double-brin
Energie déposée	>1 eV/nm ³	>10 eV/nm ³	>100 eV/nm ³
Incidence	~ 10000 / Gy	~ 1000 / Gy	~ 40 / Gy
50% réparés en :	5-10 min	10-20 min	> 50 min
réparés par :	Excision-Resynthèse		Suture Recombinaison

N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

2.2 Pourquoi s'intéresse-t-on aux DSBs ?

- Rongeurs/levures radiosensibles sont systématiquement déficients en réparation des DSBs

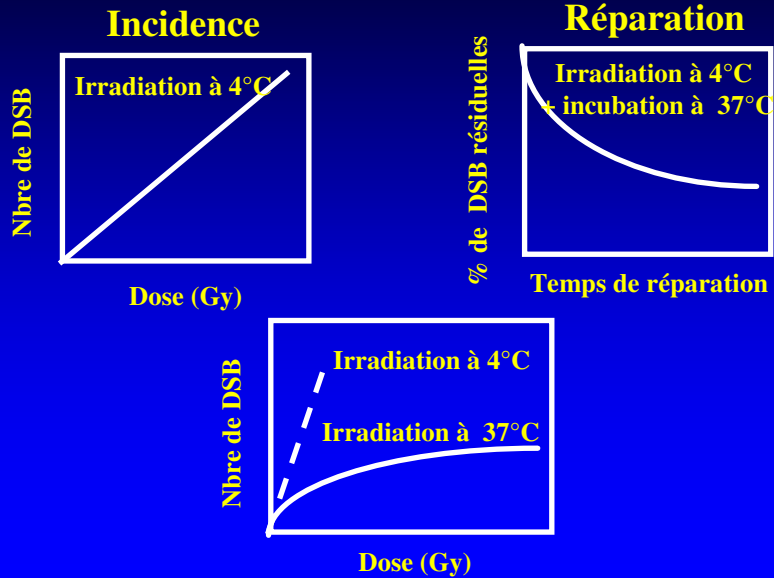
- Arguments supplémentaires :

	H2O2	Hyperthermie	Hypoxie	Radiations de TEL élevé
Létalité	0	+	-	+
Cassures double-brin	0	+	-	+
Cassures simple-brin	+	0	-	-
Bases endommagées	+	0	0	-

(MacMillan et Peacock, 1994)

N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

2.3 Quelles DSBs faut-il étudier ?

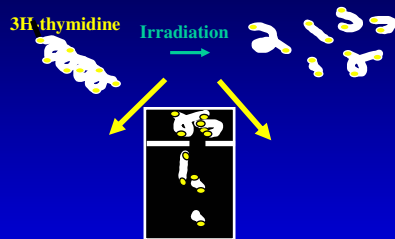


N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

2.4 Quelles techniques de détection des DSBs faut-il choisir ?

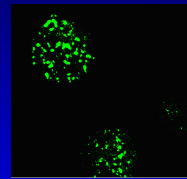
Discrimination des fragments d'ADN

Ex: électrophorèse en champs pulsés



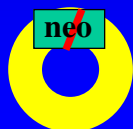
Immunofluorescence

Ex : marqueurs pH2AX



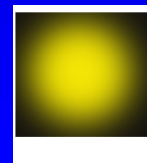
Tests plasmidiques

Ex : end-joining



Effet chromatine+fragments

Ex : comète, halo



N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

3. Des DSBs non réparées à la létalité

- 3.1 Petite histoire de la corrélation survie - réparation des DSBs

- > diversité des rythmes de réparation (trop lents ou trop rapides)
- > SF2 est inversement proportionnelle aux % de DSBs non réparées

- 3.2 Les différents acteurs de la réparation des DSBs

- > défauts de suture = radiosensibilité, immunodéficience
- > suture (G1) : DNA-PK, ligase IV
- > dysfonctionnements de recombinaison = prédisp. au cancer, chimiosensibilité
- > recomb. MRE11-dépendante (G1) : MRE11, NBS1, RAD50,...
- > recomb. RAD51-dépendante (S-G2M) : RAD51, RAD52, BRCA1, BRCA2,...

-3.3 Une compétition entre les modes de réparations - les syndromes génétiques

- > si défaut de suture -> compensation éventuelle en recombinaison
- > si hyperrecombinaison -> trop de réparation fautive, predis. aux cancers
- > ATM : la suprême kinase...

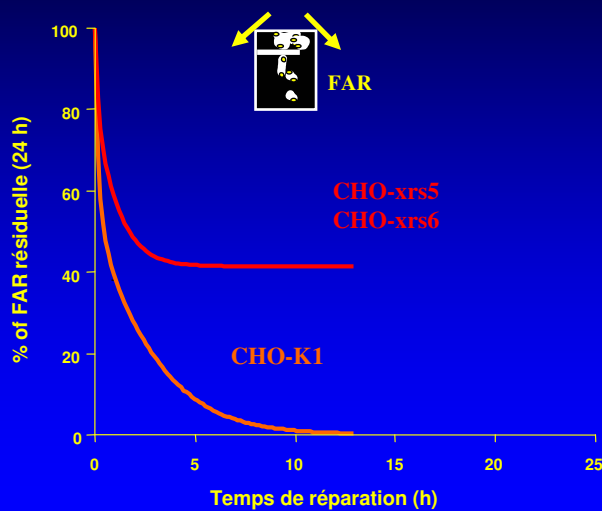
-3.4 Jusqu'à la mort

- > une succession ordonnée de phosphorylations
- > mort mitotique, sénescence ou apoptose?

N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

3.1 Petite histoire de la réparation des DSBs - Episode I

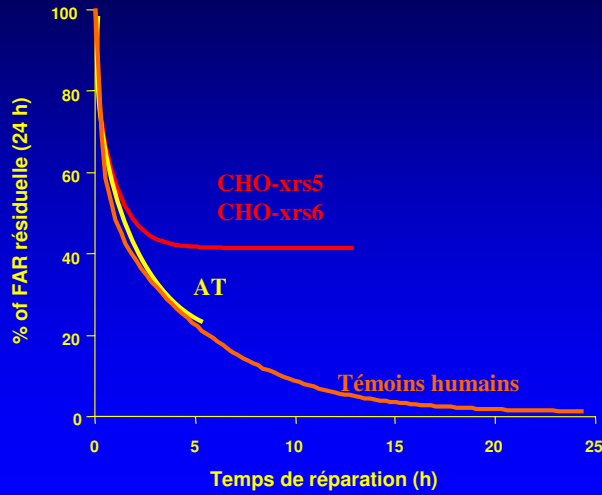
1980 : Les mutants radiosensibles de rongeurs : un loi en tout-ou-rien



N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

3.1 Petite histoire de la réparation des DSBs - Episode II

1985 : La réparation des DSBs des AT *paraît* normale!!! Le doute s'installe



SF2 xrs5 = 1%

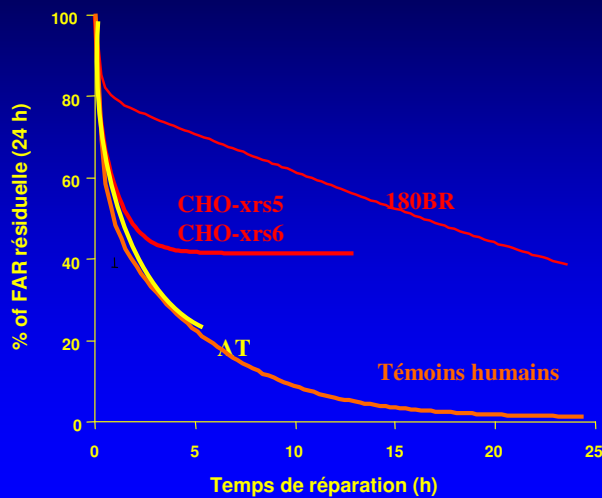
SF2 AT = 1%

SF2 témoins = 70%

N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

3.1 Petite histoire de la réparation des DSBs - Episode III

1995 : Arrivée d'un patient hyperradiosensible non-ataxique (180BR)



SF2 xrs5 = 1%

SF2 AT = 1%

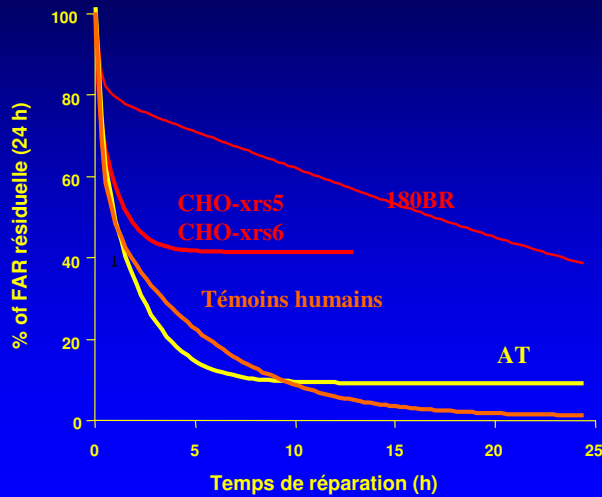
SF2 180BR = 3%

SF2 témoins = 70%

N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

3.1 Petite histoire de la réparation des DSBs - Episode IV

1997 : Mise au point d'une technique plus fine :
les AT réparent plus vite puis plus lentement!

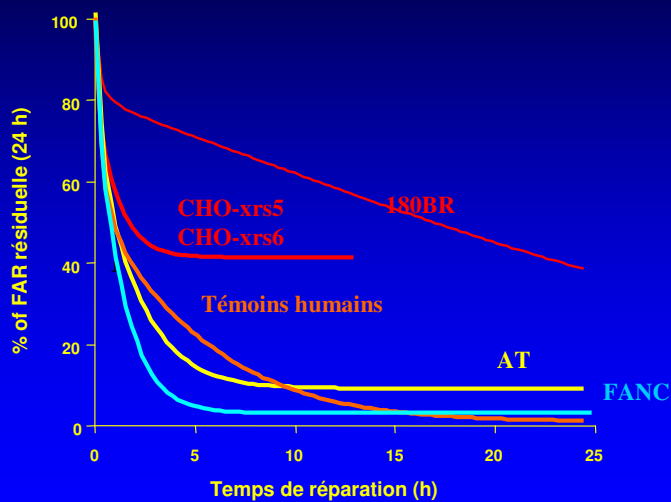


SF2 xrs5 = 1%
SF2 AT = 1%
SF2 180BR = 3%
SF2 k1 = 70%

N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

3.1 Petite histoire de la réparation des DSBs - Episode V

2000-2006 Les lignées moins radiosensibles peuvent réparer encore plus vite!!

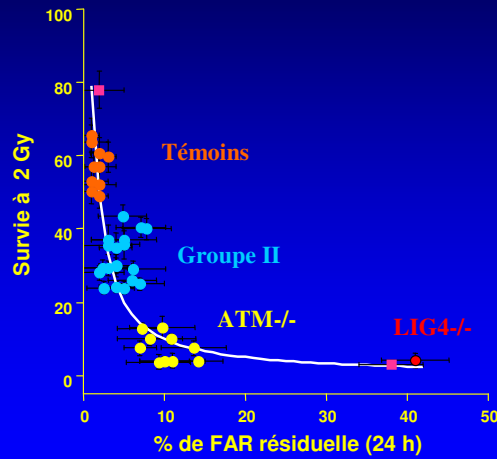


SF2 xrs5 = 1%
SF2 AT = 1%
SF2 180BR = 3%
SF2 fanc = 20%
SF2 k1 = 70%

N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

3.1 Lien survie-DSB non réparées et syndromes radiosensibles majeurs

Une DSB non réparée suffit à produire un effet létal

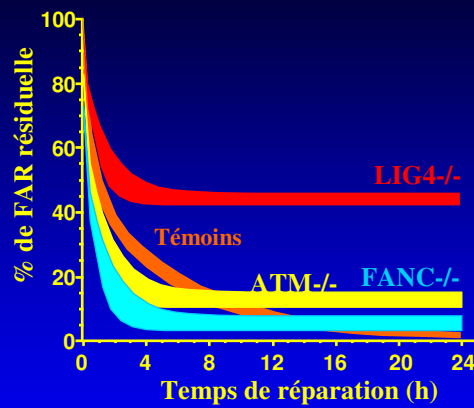


Syndromes radiosensibles majeurs:

- Ataxia-telangiectasia (ATM)
- Syndrome de Nîmègue (NBS)
- Syndrome de Cockayne (CS)
- Xeroderma Pigmentosum (XP)
- Anémie de Fanconi (FANC)
- Syndrome de Bloom (BLM)
- Hypogammaglobulinémie (LIG1)
- Déficience en ligase 4 (LIG4)

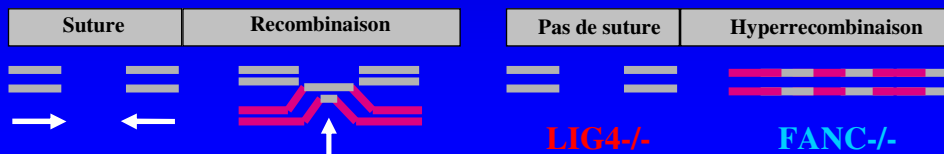
N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

3.2 Deux façons de réparer (suture ou recombinaison) et 2 types de dysfonctionnements !!!



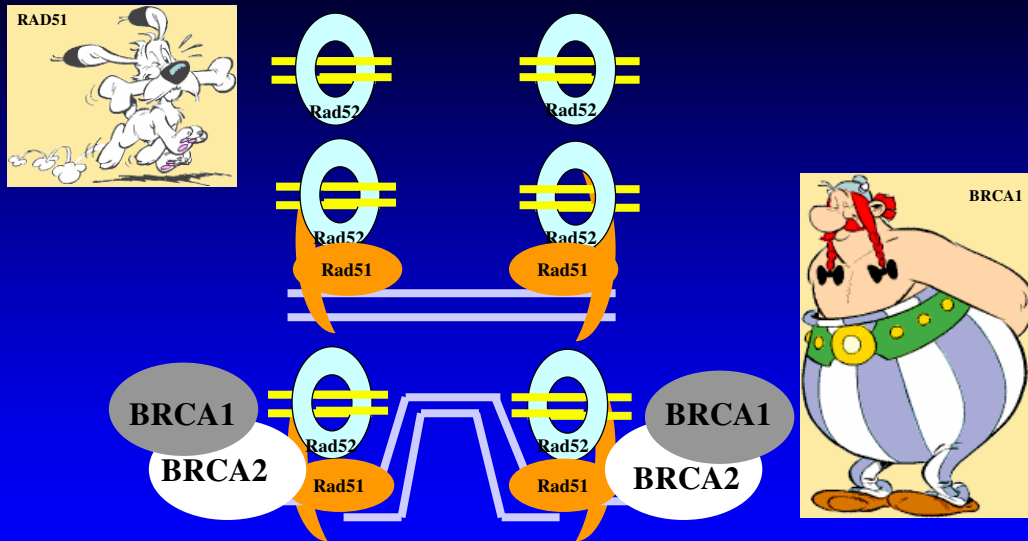
Hyper-recombinaison

Défauts de suture



N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

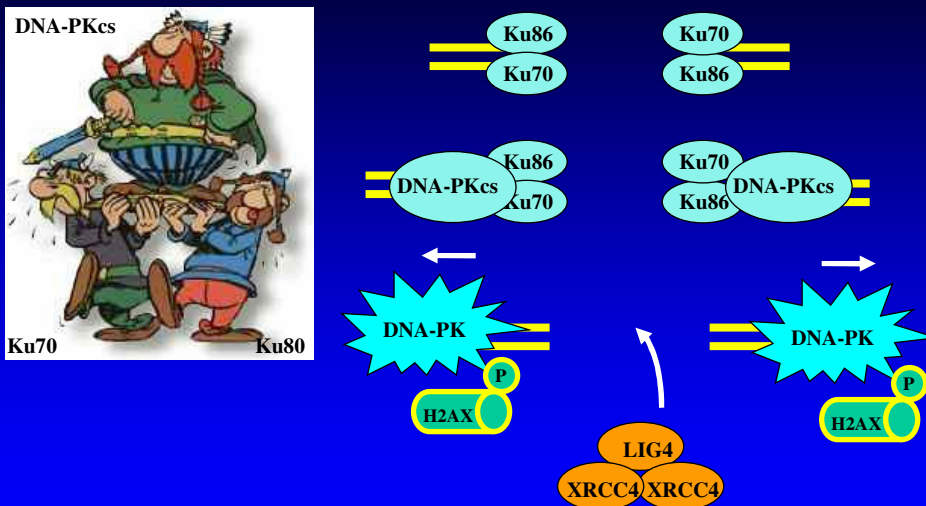
3.2 Réparation des DSBs par recombinaison : ce que l'on sait



Défauts de recombinaison = létalité (méiose, mitose)
 Excès de recombinaison (hyper-recombinaison) = cancérogénèse

N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

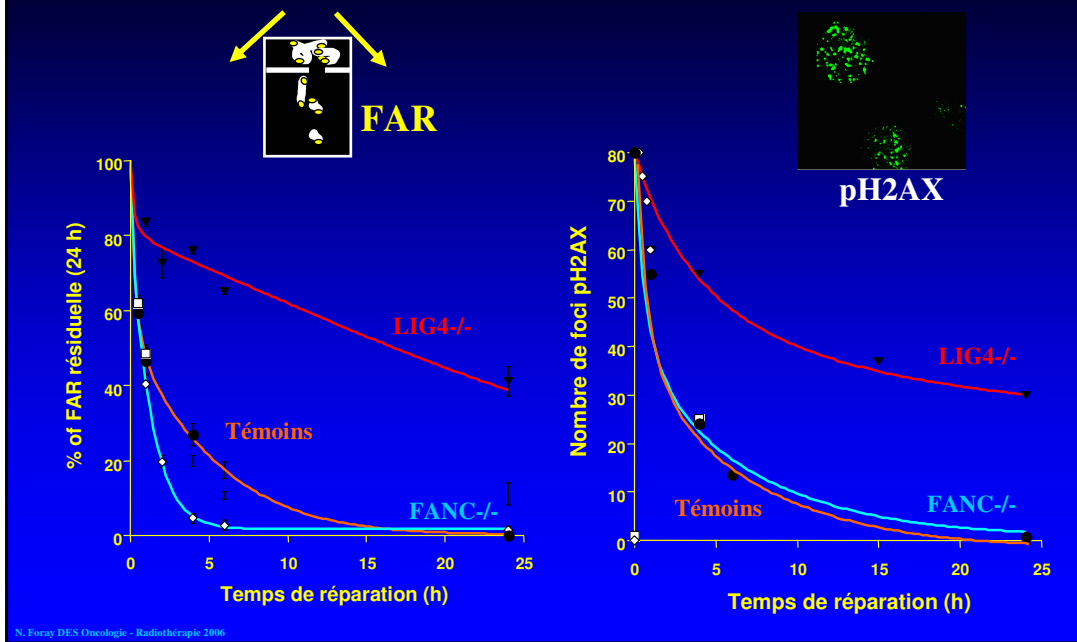
3.2 Réparation des DSBs par suture : ce que l'on sait



Défauts de suture = Radiosensibilité + Immunodéficience

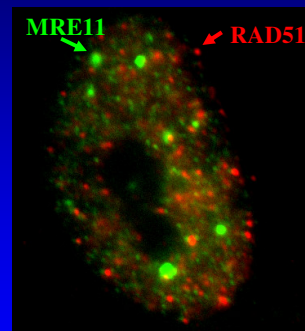
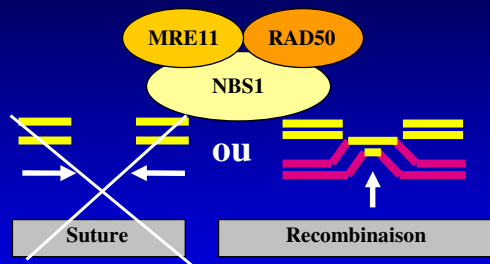
N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

3.2 Comparaison électrophorèse-immunofluorescence pH2AX



3.2 Le complexe MRE11-RAD50-MRE11-NBS1 : ce que l'on sait

Rad51 n'est actif que de S à G2/M

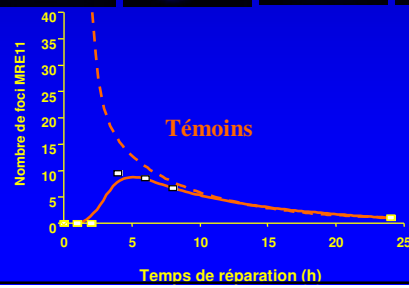
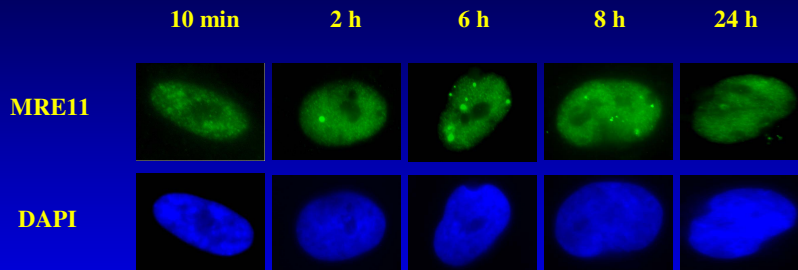


Ou une troisième voie de réparation ?

- MRE11 possède une activité nucléasique...
- Très bien conservé entre espèces...

3.2 Lien survie-DSB avec l'immunofluorescence MRE11

Témoins

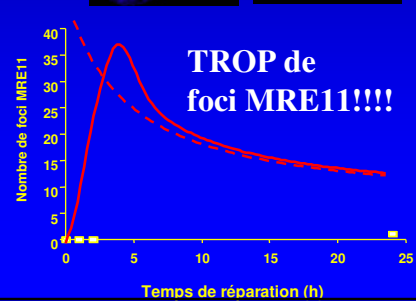
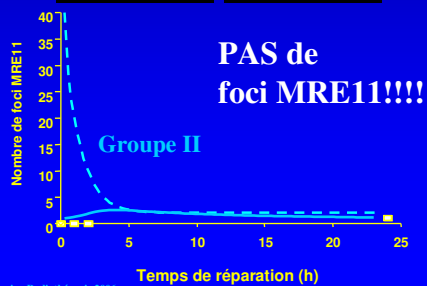
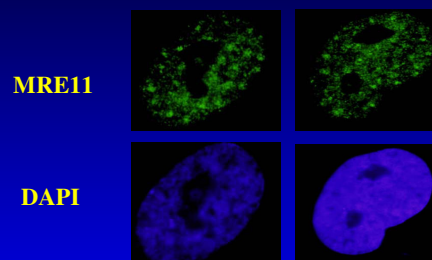
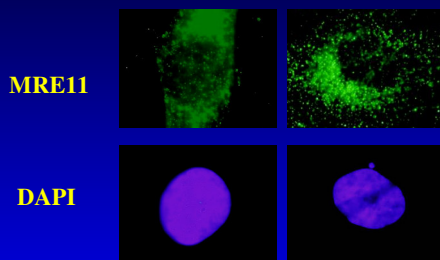


N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

3.2 Lien survie-DSB avec l'immunofluorescence MRE11

Groupe II

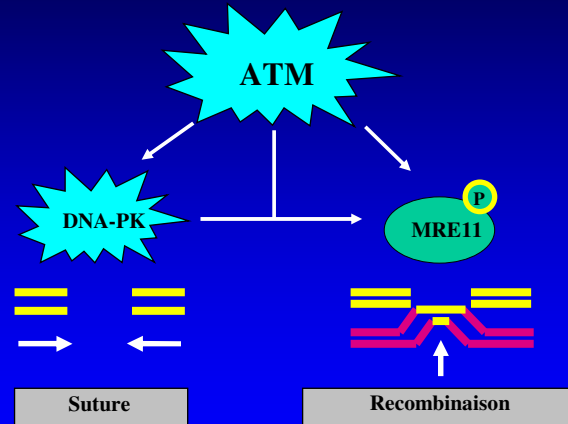
Suture-déficientes



N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

3.3 Proposition de modèle pour les mammifères

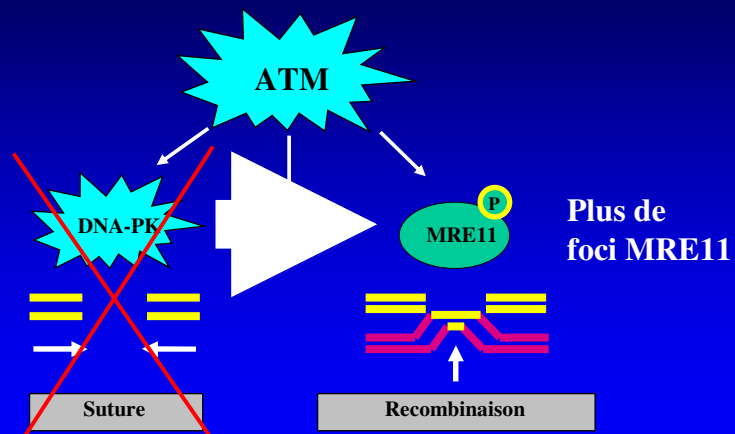
Pour les témoins :



N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

3.3 Proposition de modèle pour les mammifères

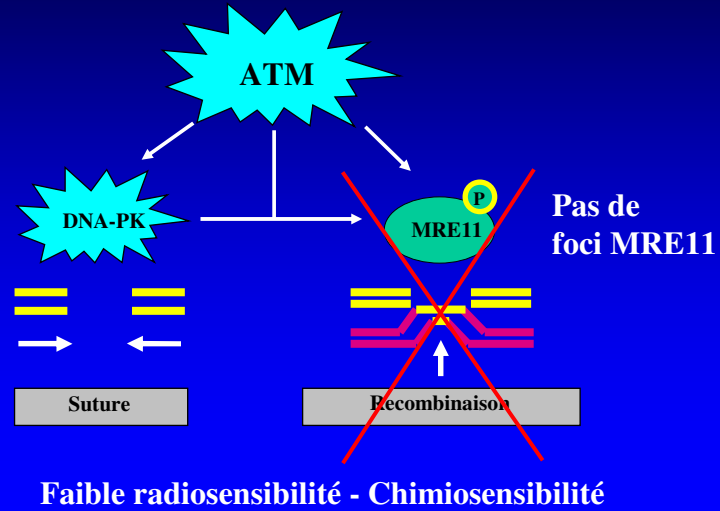
Pour les *LIG4*^{-/-} et *DNA-PK*^{-/-}:



N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

3.3 Proposition de modèle pour les mammifères

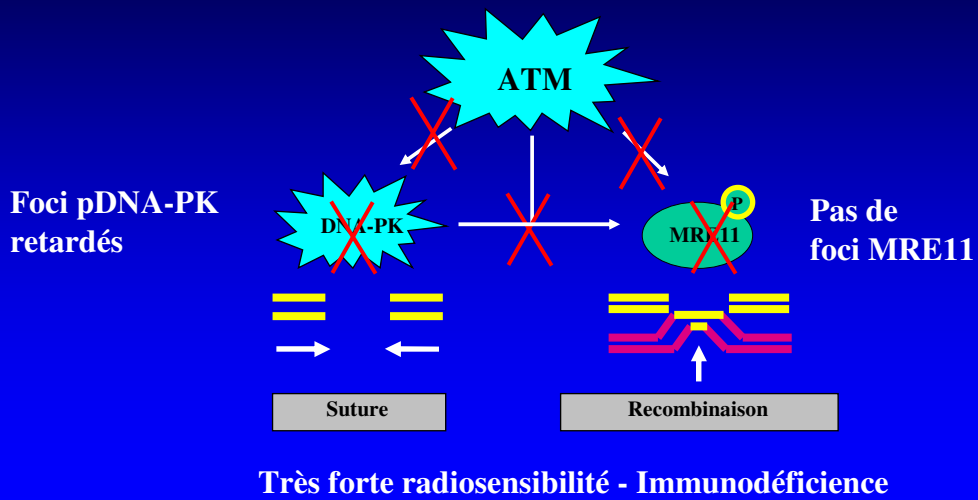
Pour le groupe II:



N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

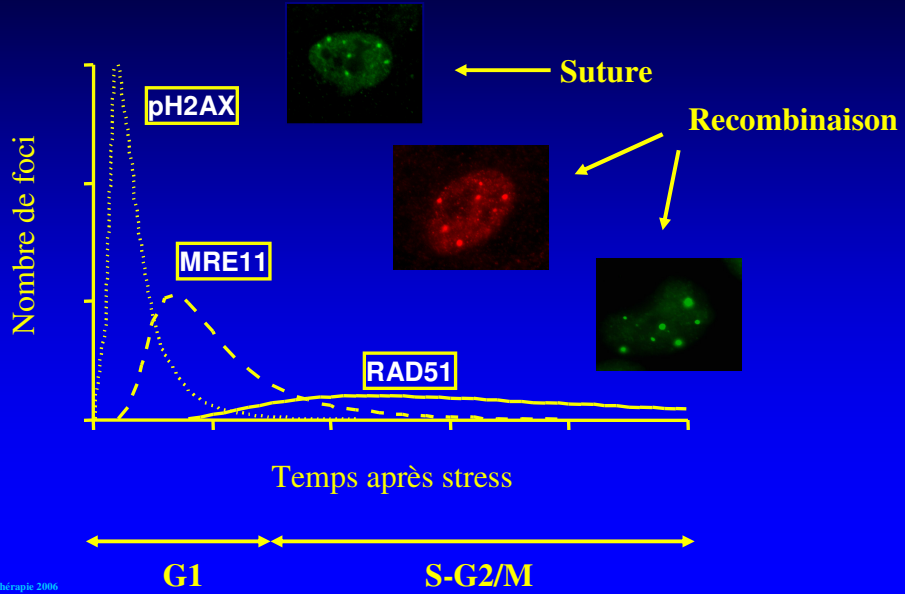
3.3 Proposition de modèle pour les mammifères

Pour les ATM^{-/-}:



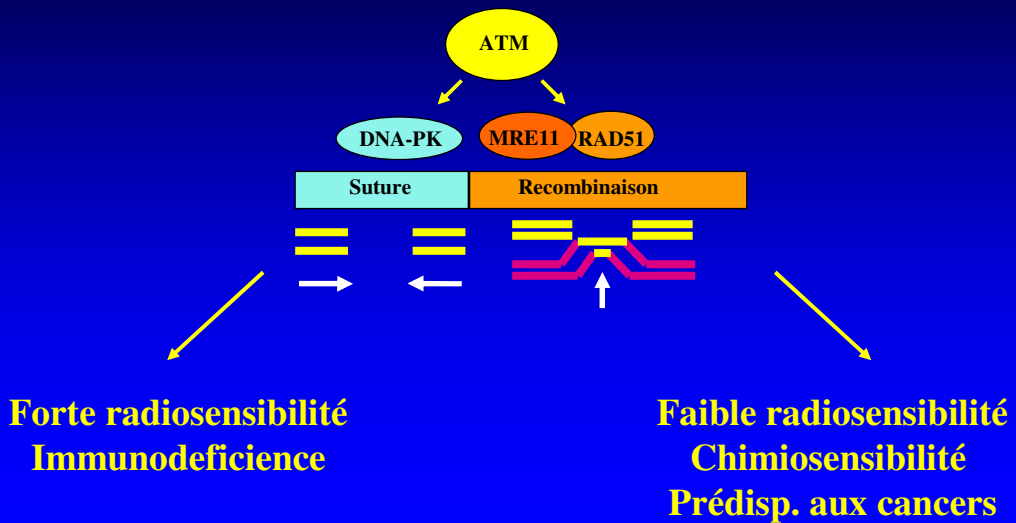
N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

3.3 Récapitulation : trois voies de réparation ?



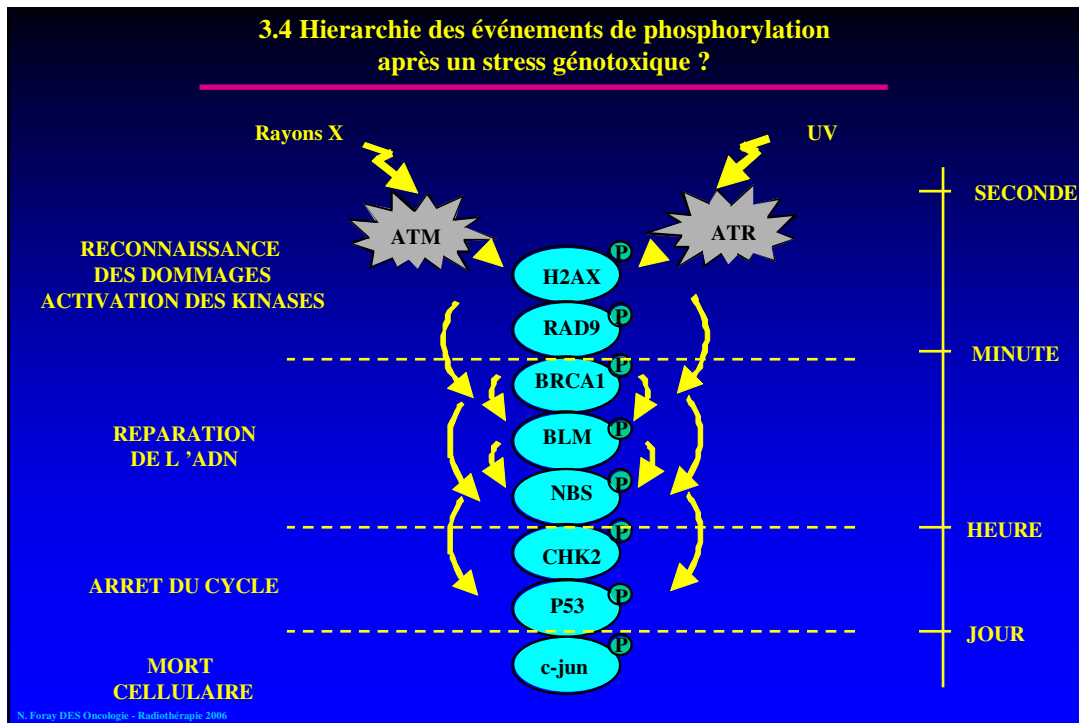
N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

3.3 Récapitulation : trois voies de réparation ?



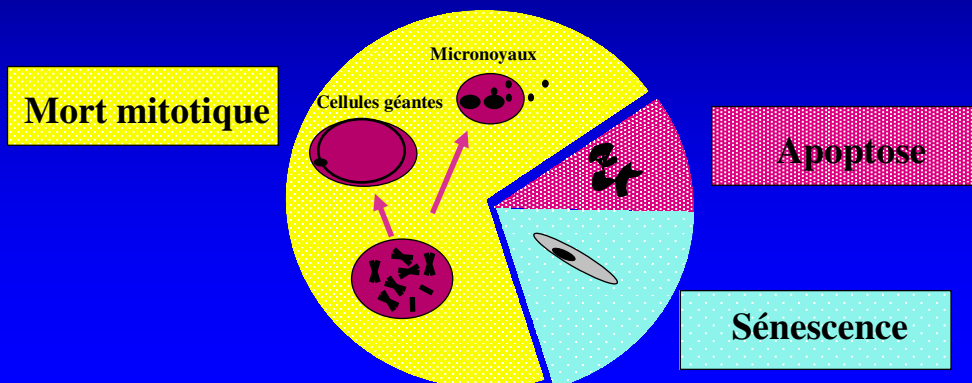
N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006

3.4 Hierarchie des événements de phosphorylation après un stress génotoxique ?

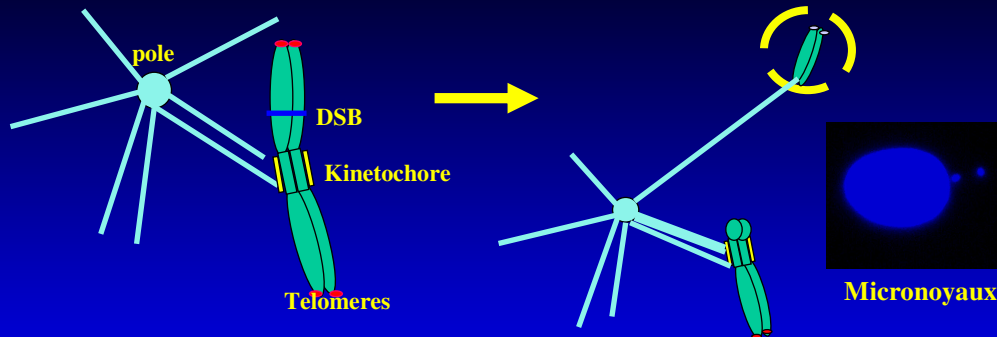


3.4 la mort cellulaire en radiobiologie

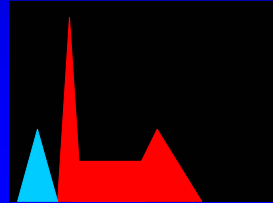
- Mort = perte de capacité de division ≠ disparition physique de la cellule !!!
- Une cellule dite morte métabolise et répare !!! (ex: 10, 30, 100 Gy)
- La mort augmente avec la dose mais le rythme de réparation est invariable !!! (pas de saturation !!!)



3.4 Propagation des DSB - Les différents pièges de la mort cellulaire...



La mort mitotique est trop souvent confondue avec l'apoptose



N. Foray Master de Cancérologie 2005

Conclusions - Perspectives : La réparation de l'ADN en clinique

- **Corrélation DSBs-Radiosensibilité enfin établie :**
 - mais : plusieurs types de réparation et plusieurs dysfonctionnements
 - donc : pas de test prédictif unique (pH2AX+MRE11 par ex.)
 - et : une plus grande complexité dans les tumeurs (effet du cycle, chromatine, etc)
- **Associations thérapeutiques posent le problème de:**
 - la réparation d'autres dommages que les DSBs
 - la redondance/compensation entre les modes de réparation
- **Encore des erreurs d'interprétation:**
 - pas de saturation de la réparation
 - l'excès de dose n'a d'effet létal que si au moins une seule DSB n'est pas réparée
 - surestimation de l'apoptose

**Traquons ensemble les réactions anormales aux traitements
Les radiobiologistes ont besoin de vous !!!**

N. Foray DES Oncologie - Radiothérapie 2006