

**Société Française de Radioprotection « Recherche et
Santé »
Journées Faibles Doses**

**Cascades d'évènements survenants
après une lésion radio-induite de l'ADN**

Dietrich AVERBECK (IRSN/CEA)

Institut Curie-Section de Recherche

Laboratoire Raymond Latarjet

UMR3348 du CNRS « Génotoxicologie et cycle cellulaire »

Bâtiment 110

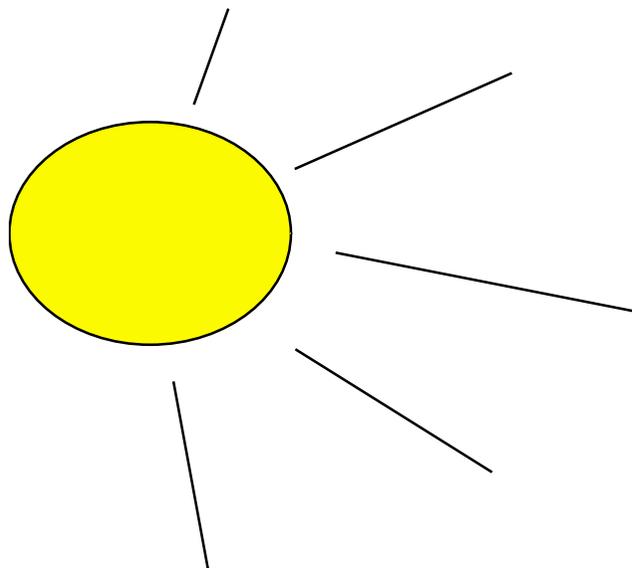
Centre Universitaire d'Orsay Tél.: 0169863096 FAX: 0169869429

E-Mail: dietrich.averbeck@curie.fr

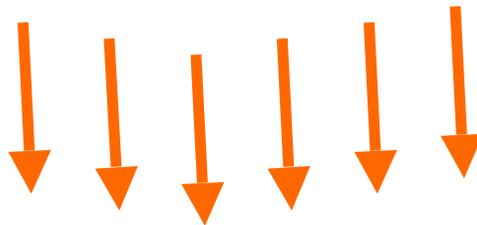


**Mardi 19 Mars 2013
Union Internationale des Chemins de Fer (UIC)
16, rue Jean Rey- 75015 Paris**

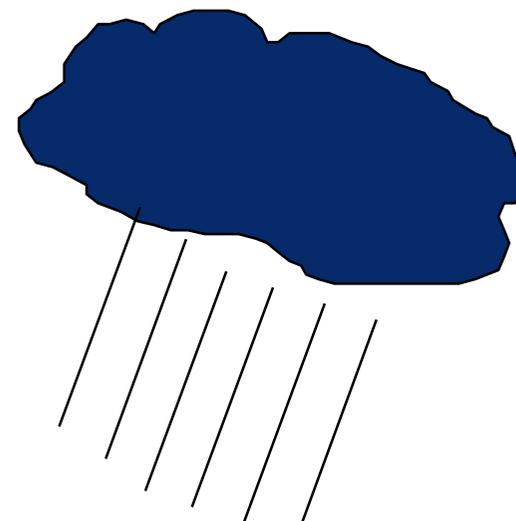
Radiation solaire



Radiation cosmique



Stress environnemental



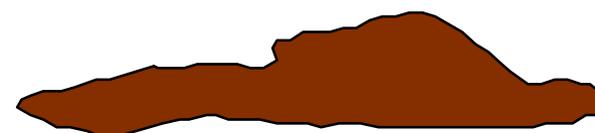
**Pollution
atmosphérique**

Fumée de tabac

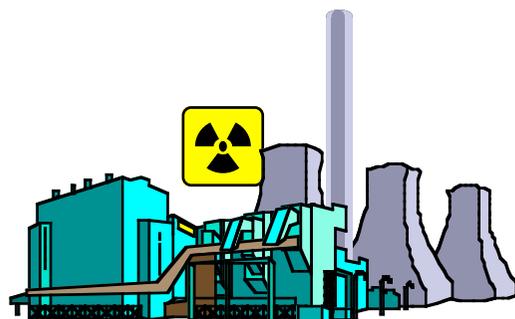


Radon

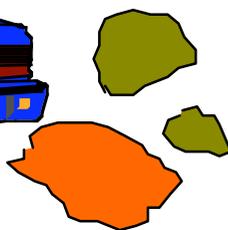
Radiation naturelle



2.4- 40 mSv



Hydrocarbures



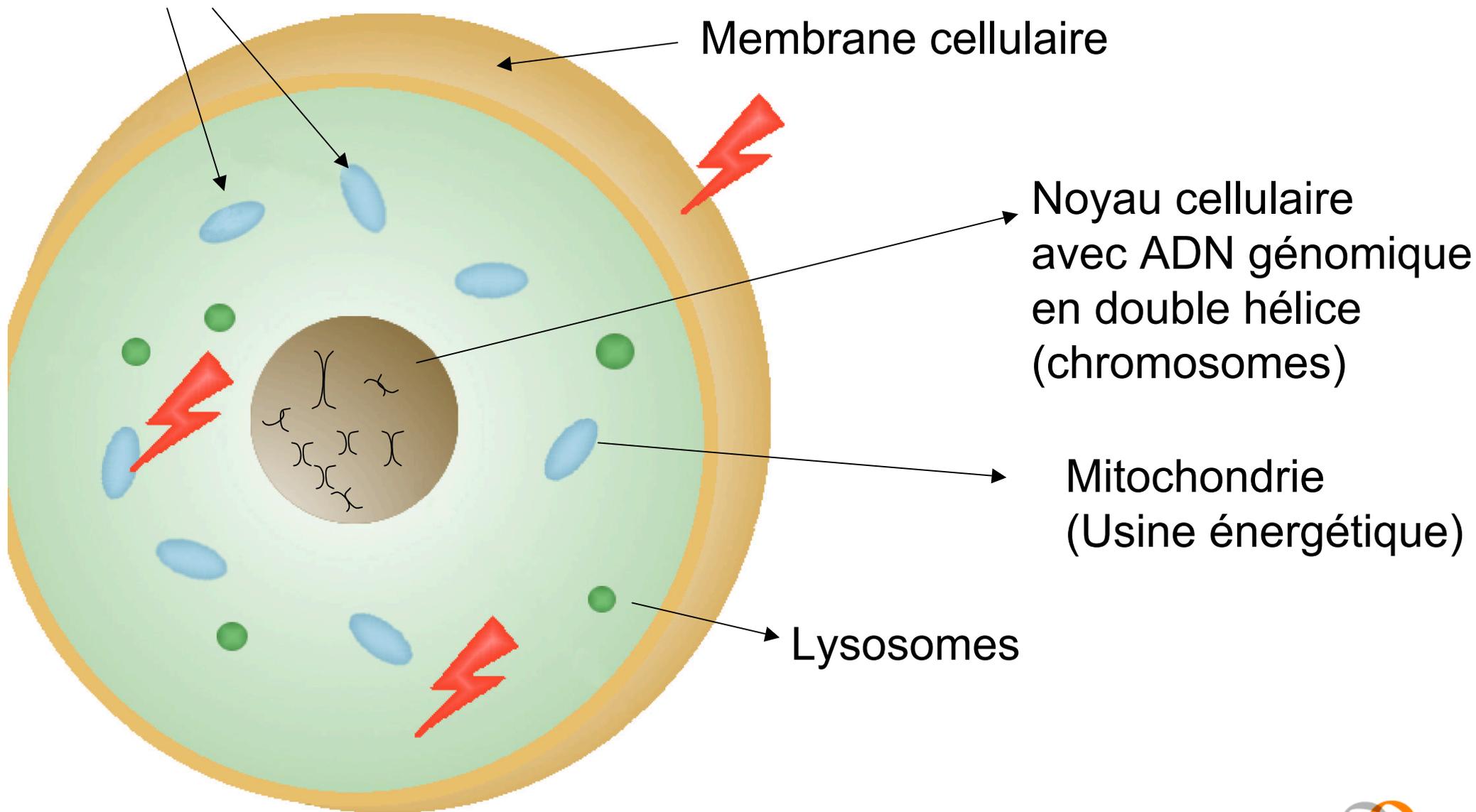
Introduction (1)

La vie est dangereuse:

Notre organisme et nos cellules sont exposées quotidiennement aux nombreux stimuli et **agressions internes** du métabolisme oxydatif (à 37°C) et aux **agressions externes** par des agents physiques (radiations ionisantes et non ionisantes) et chimiques (pollution) de l'environnement.

- Déjà, au cours de l'évolution la vie s'est développée dans un environnement hostile et les cellules ont dû mettre en place de **multiples systèmes de défense, en particulier ceux qui protègent contre les endommagements et préservent l'intégrité du patrimoine génétique donc l'ADN.**

Cellule avec noyau et mitochondries



(Kuncic Z. et al. 2012 Comp. Math. Methods in Med).

Stress quotidien

- **Stress interne**

Les espèces réactives d'oxygène (ERO) produites sont

---> **anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et radical hydroxyl ($\cdot OH$)**

*Ces espèces attaquent **tous les constituants cellulaires (ADN, protéines, lipides)** et peuvent provoquer des dysfonctions de la cellule, des effets létaux et mutagènes, le cancer et d'autres maladies non cancéreuses maladies neurodégénératives, cardiovasculaires, etc.).*

Introduction (2)

Les cellules subissent donc en permanence des endommagements.

Les lésions induites dans l'ADN cellulaire sont particulièrement susceptibles d'entraîner des modifications génomiques, d'empêcher un fonctionnement normal des cellules et d'initier un processus multi-étape de cancérogenèse.

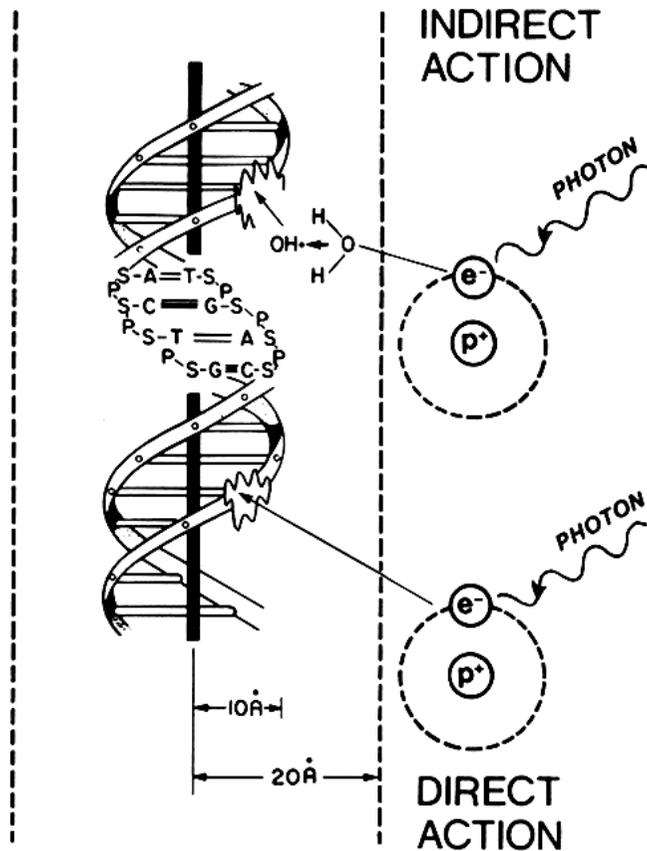
Domage---> mutation--->instabilité génomique---> cancer

D'où l'importance des **mécanismes de défense** à l'échelle cellulaire pour réduire au maximum ces effets génotoxiques et les risques à long terme (cancer).

Mécanismes de défense : antioxydants, systèmes de réparation spécialisés, apoptose, défense immunitaire

Endommagement de l'ADN par les rayonnements ionisants (RI)

Les RI peuvent également endommager tous les constituants cellulaires (ADN, protéines etc.). L'endommagement de l'ADN peut initier la mutagenèse, l'instabilité génomique et la cancérogenèse.



Les dommages de l'ADN sont induits soit: **directement** par un dépôt d'énergie (10^{-15} sec) soit : **indirectement** par radiolyse de l'eau (10^{-5} sec) et génération de radicaux libres d'oxygène. (10^{-3} sec)

Lésions induites:

- cassures simple brin d'ADN
- pontages protéine/ADN
- dommages de bases
- **cassures double brin d'ADN (CDB) (très délétères) et lésions groupées multiples localisées (LMDS)**

Comparaison dommages endogènes versus dommages radioinduits de l'ADN

(selon Ward JF 1988, Burkart W et al. 1999)

Dommages	Endogènes /cellule/ jour	Radio-induites par Gy
Cassures simple brin	10 000 - 55 000	1000
Pertes de bases	12 600	?
Dommages de bases	3 200	2000
Cassures double brin	8	40*

**Les CDB conduisent souvent à l'induction de délétions, de mutations, d'aberrations chromosomiques avec instabilité génomique précurseur de cancers.*

Introduction (3)

Ce qui nous sauve:

C'est la caractéristique fondamentale des cellules de « ressentir » et **d'être « sensibles »** à toute agression externe ou interne qu'elle que soit d'origine chimique ou physique.

Les cellules ont mis en place des **systèmes « d'alarme » et de signalisation** permettant de réagir très rapidement et d'établir des lignes de défense et de contre-mesures efficaces telles que la réparation de lésions induites dans l'ADN, l'élimination de cellules fortement endommagées par une mort programmée (apoptose) ou par des réactions immunitaires.

On distingue **deux signalisations**:

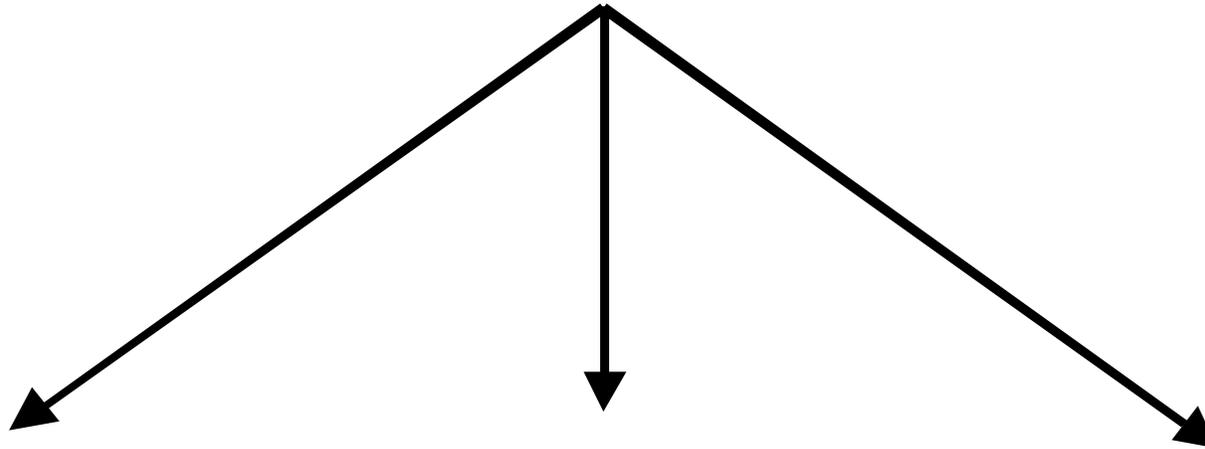
- (1) signalisation à partir des récepteurs membranaires des cellules vers l'intérieur cellulaire par les MAP- kinases et
- (2) **signalisation de l'endommagement de l'ADN**

Voies de signalisation

Dommmage de l'ADN



Signalisation



Arrêt du cycle
cellulaire

Réparation

Apoptose
(mort programmée)

Signalisation de l'endommagement de l'ADN (1)

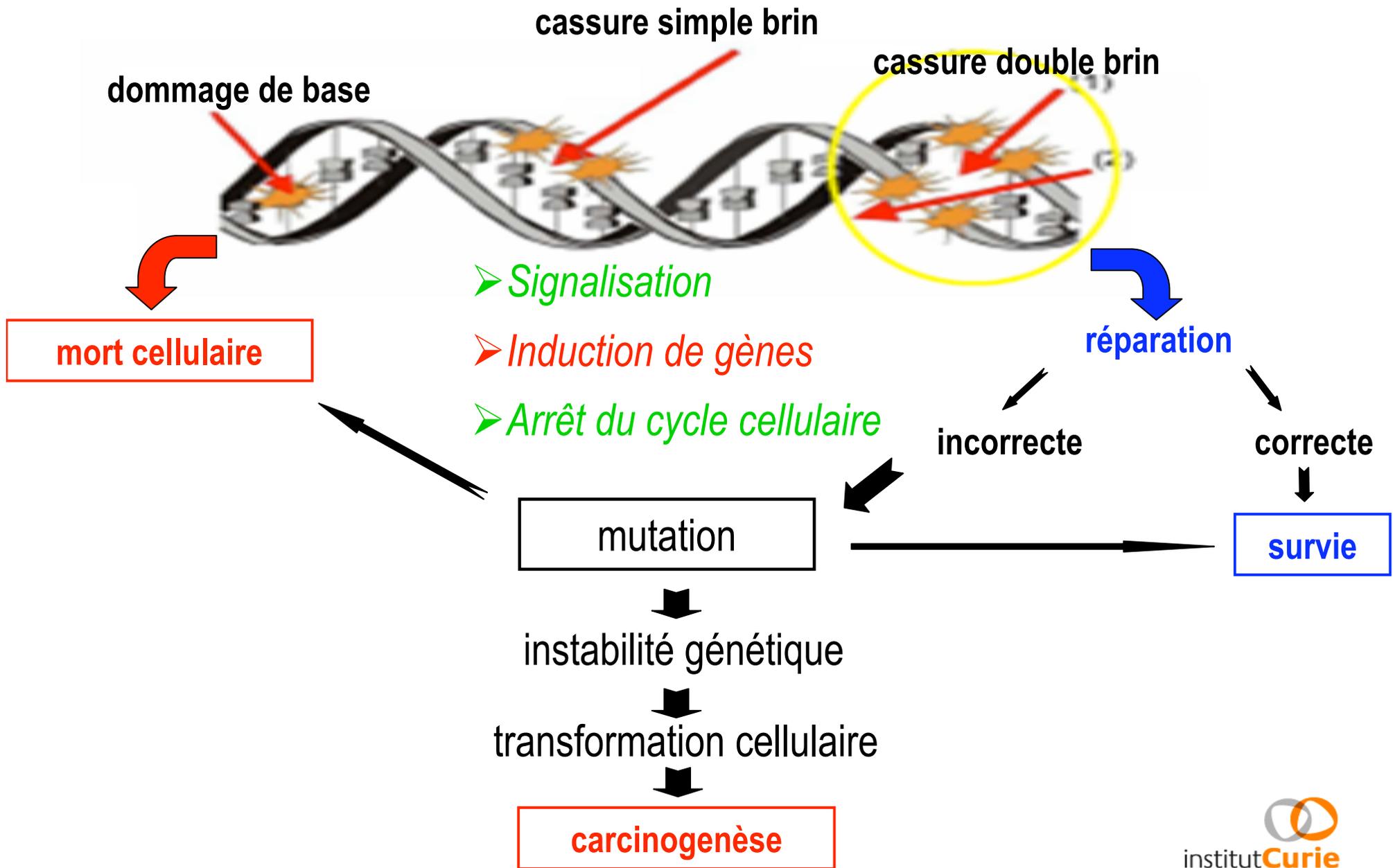
- L'endommagement de l'ADN (**CDB**) dans le noyau cellulaire empêche la réplication de l'ADN (obstacle pour la division cellulaire) et déclenche l'arrêt de la progression du cycle cellulaire, l'activation de certains facteurs de transcription (protéine p53: gardienne du génome), l'activation et même l'induction de certains gènes du métabolisme énergétique et de la réparation, et en cas d'endommagement excessif, la signalisation vers une mort programmée ou l'apoptose.
- **La signalisation des dommages est essentielle pour la réparation de l'ADN.**

Signalisation de l'endommagement de l'ADN (2)

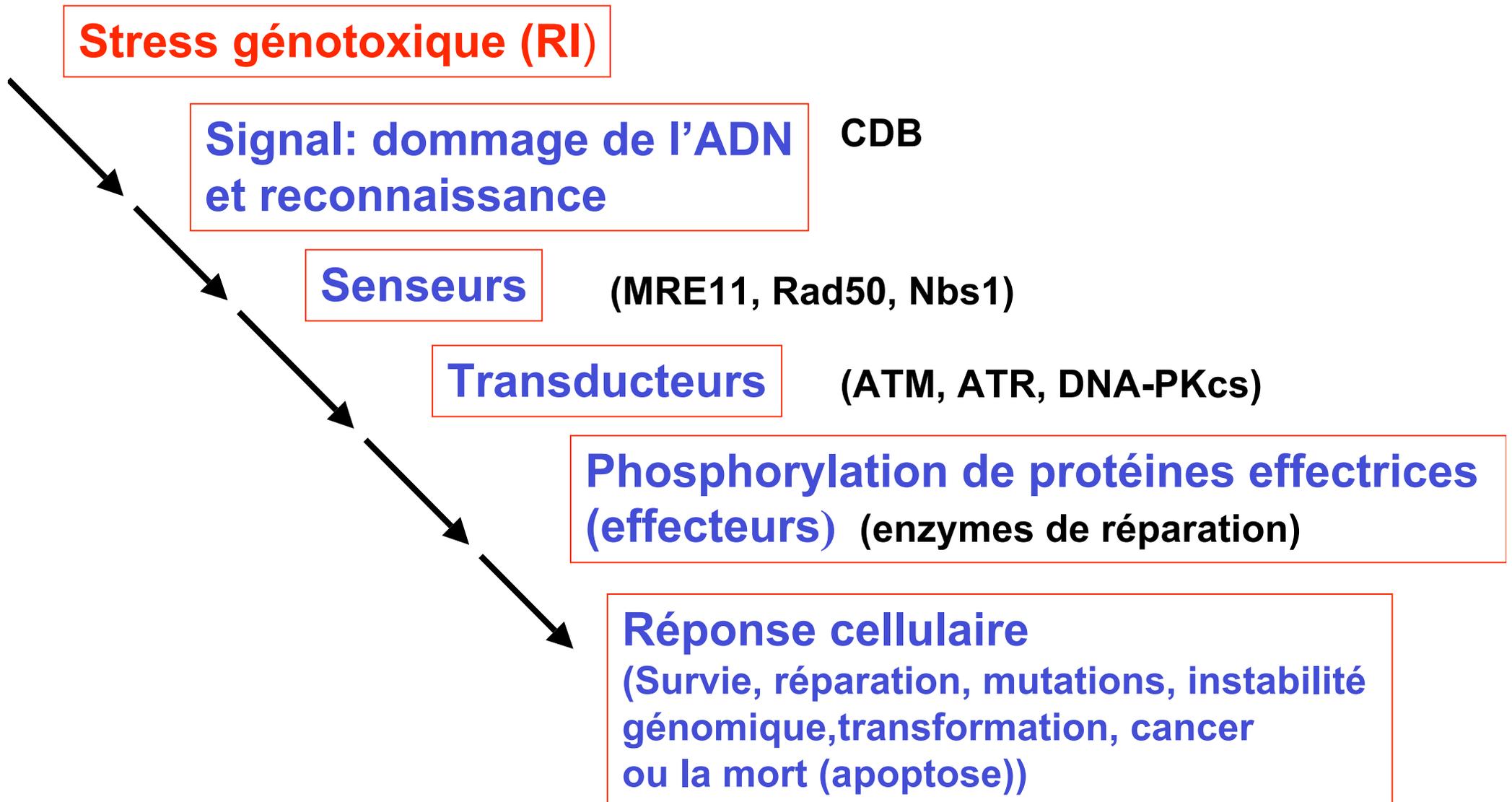
Avancée scientifique:

- La biologie moléculaire a changé notre vision sur la réparation de l'ADN: Il y a encore 20 ans, nous étions persuadés que les enzymes de réparation étaient déjà présentes dans les cellules et qu'en cas d'endommagement de l'ADN elles se liaient à l'ADN pour commencer directement la réparation.
- Maintenant, on sait que ce n'est pas toujours le cas. Les lésions les plus délétères, les cassures double brin (**CDB**), induites par irradiation ionisante (coupant en deux la pelote d'un mètre de longueur d'ADN surenroulé dans le noyau cellulaire) doivent être d'abord reconnues et signalées.
- C'est la signalisation qui active les enzymes de réparation en apportant l'énergie (ATP---> ADP) après une phosphorylation par des enzymes spécialisées (phosphokinases).
- On comprend maintenant pourquoi les patients atteints du syndrome de radiosensibilité extrême de l'Ataxie télangiectasie (AT) possèdent toutes les enzymes de réparation mais sont malgré cela très radiosensibles et prédisposés aux cancers tels que les leucémies et les lymphomes.
- Ces patients n'ont pas d'enzyme de signalisation ATM (AT-mutée).

Réponse aux rayonnements ionisants



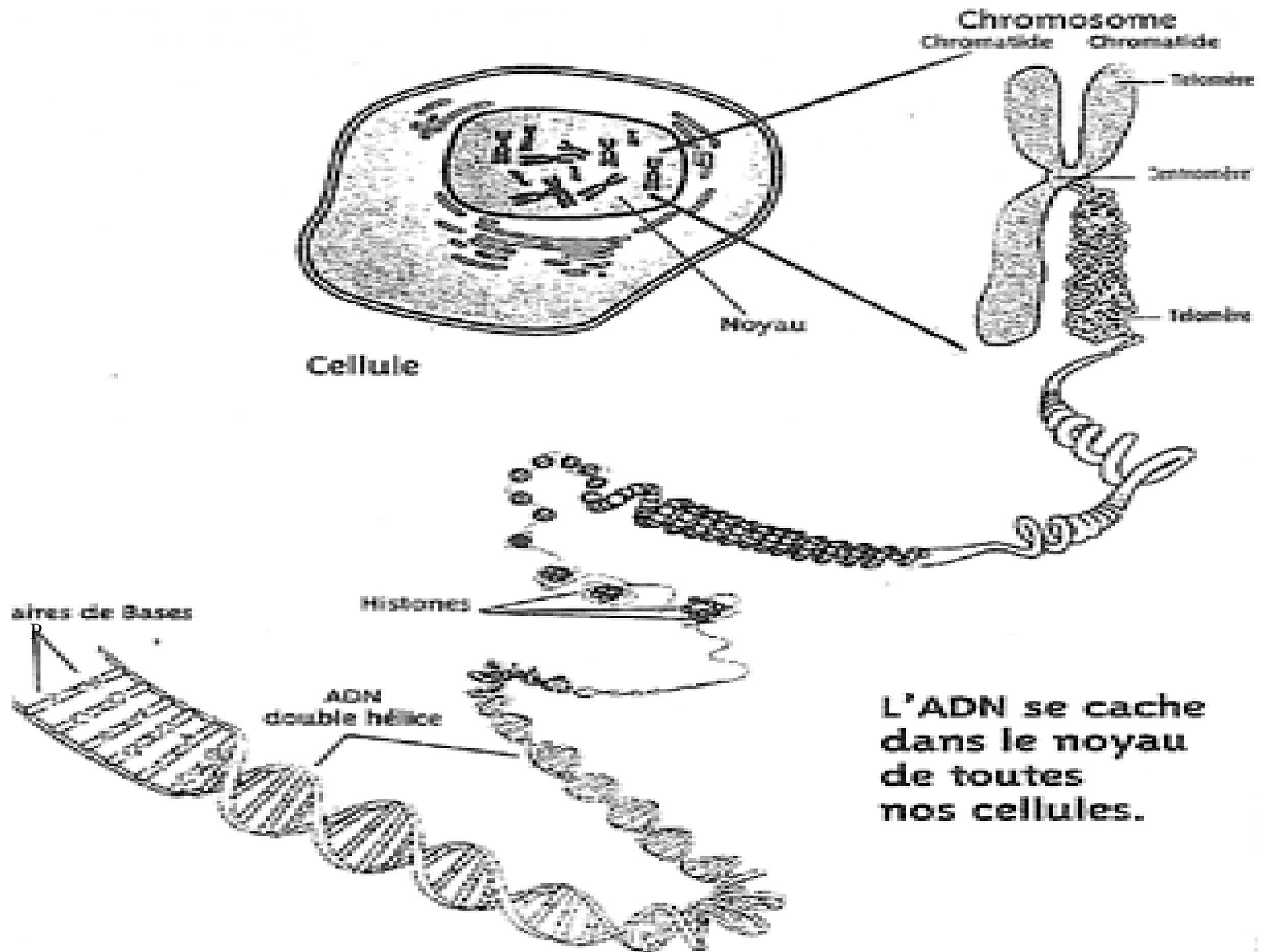
Cascade de la signalisation



Signalisation de l'endommagement de l'ADN (3)

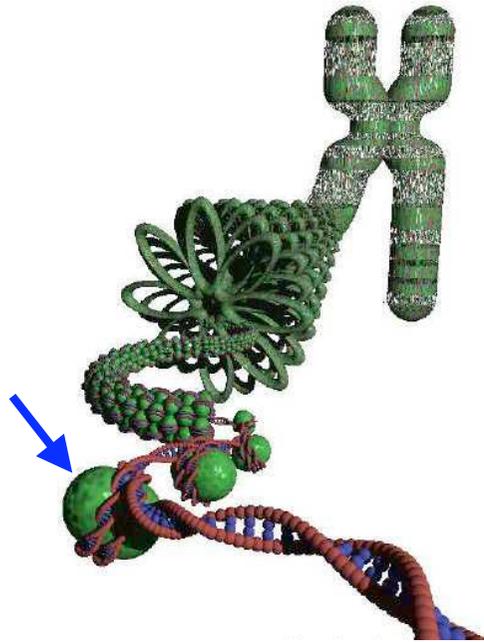
Découverte exceptionnelle: Implication de la structure de la chromatine dans la signalisation des CDB

- Après l'induction de CDB, une protéine appelée H2AX structurant l'ADN dans les chromosomes, de la famille des histones (protectrices de l'ADN), est phosphorylée par la phosphokinase ATM très proche des CDB induites.
- Utilisant des anticorps fluorescents contre ces histones modifiées (phosphorylées) on peut donc visualiser et suivre directement l'induction de CDB dans l'ADN ainsi que leur disparition après réparation.
- La sensibilité pour la détection des CDB est plus de 1000 fois supérieure aux méthodes classiques.



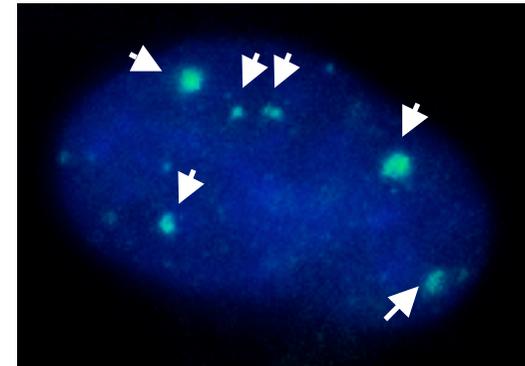
L'ADN se cache dans le noyau de toutes nos cellules.

Détection de CDB par marquage de l'histone H2AX phosphorylée (gamma H2AX)



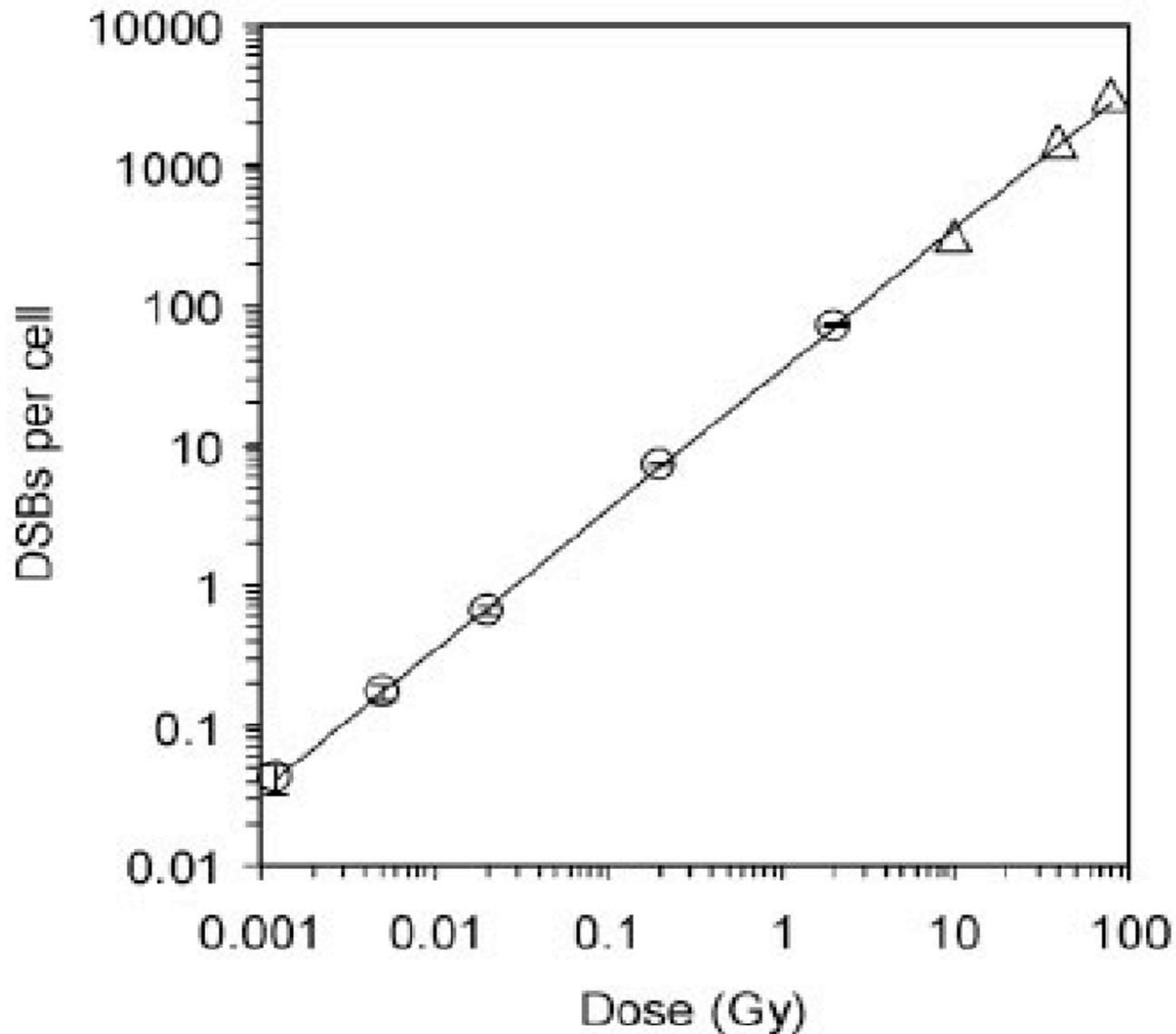
- La protéine H2AX fait partie du complexe d'histones et est phosphorylée par les kinases ATM, ATR et DNA-PKcs **en présence de CDB** (Bakkenist, Kastan 2004, Shiloh 2003).

- Les foyers de γ H2AX sur les sites de CDB sont quantifiables par des anticorps spécifiques (marquage par immunofluorescence (Brenner, Löbrich)



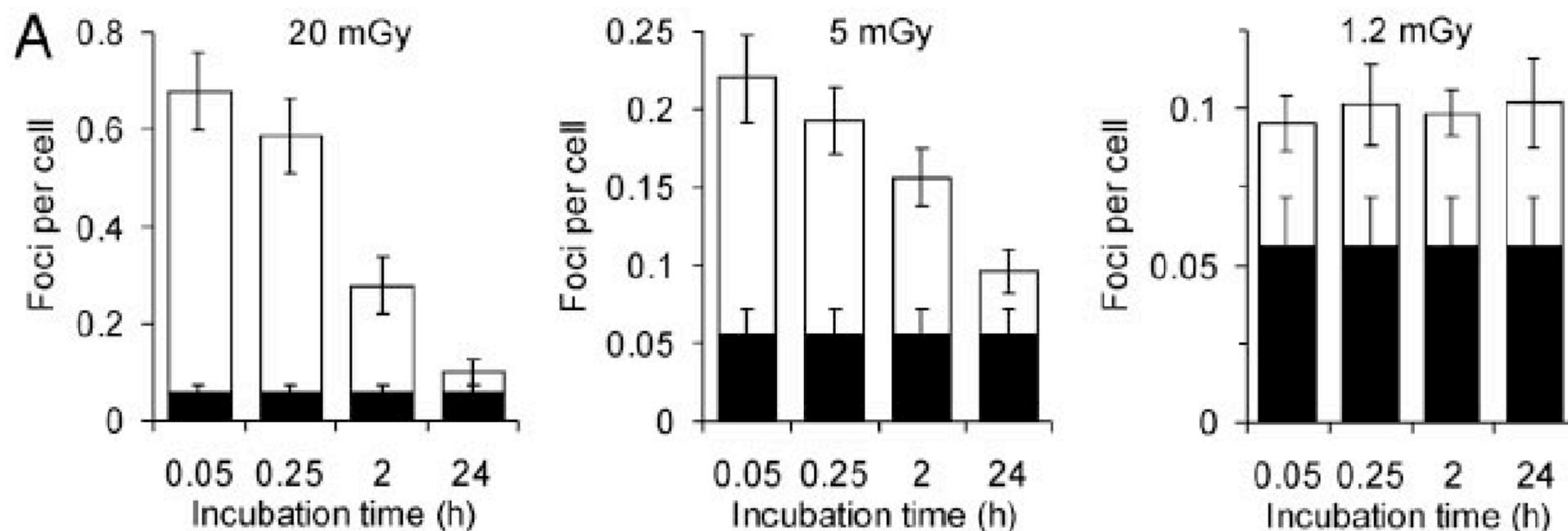
➤ La quantification des foyers de γ H2AX est très sensible et permet de mesurer les CDB radioinduites par de très faibles doses d'irradiation (~1 mGy).

Induction de CDB radioinduites en fonction de la dose



(Rothkamm et Löbrich, PNAS 2003;100:5057-5062)

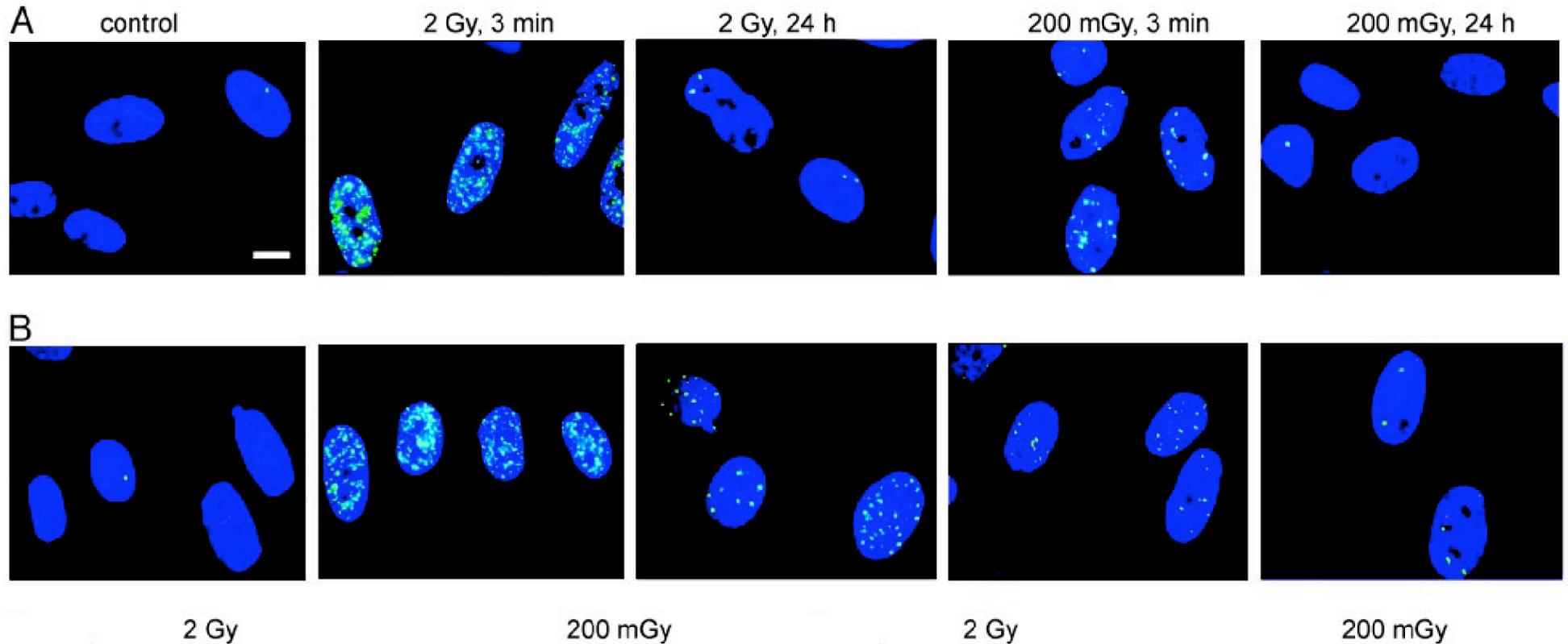
Induction et réparation de CDB après de faibles doses de rayons X



Absence de réparation à très faible dose (1,2 mGy)

(Rothkamm et Löbrich, PNAS 2003;100:5057-5062)

Induction et réparation de CDB radioinduites



A: fibroblastes MRC-5

B: fibroblastes 180 BR : déficients dans la réparation (ligase IV)

(Rothkamm et Löbrich, PNAS 2003;100:5057-5062)

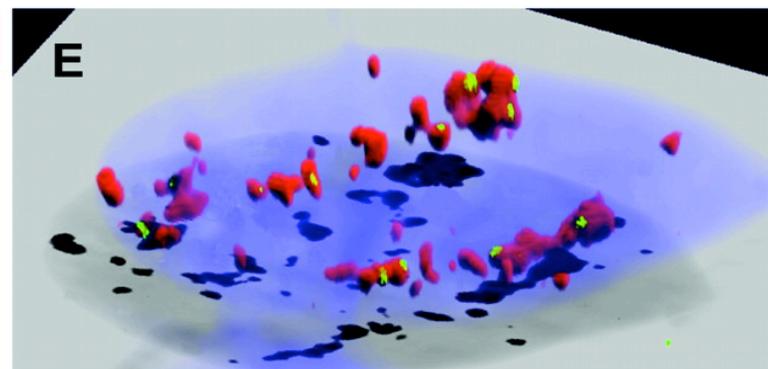
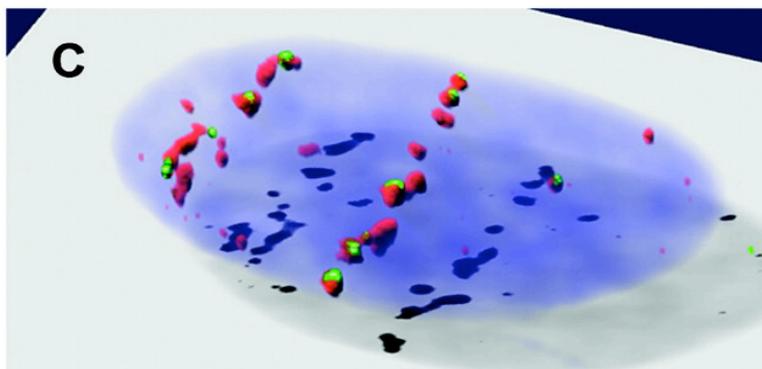
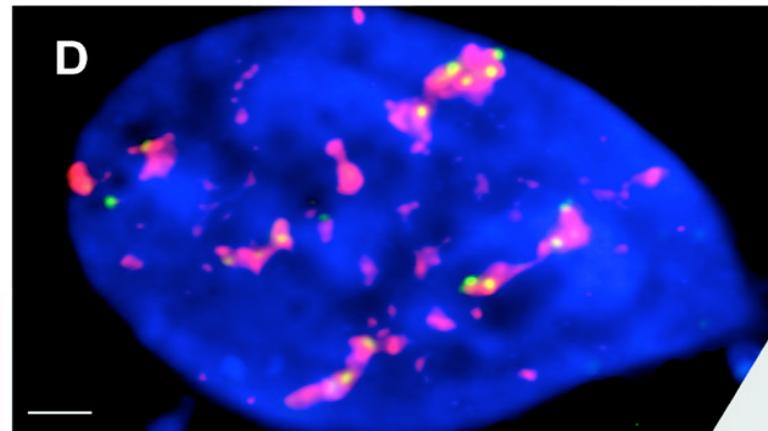
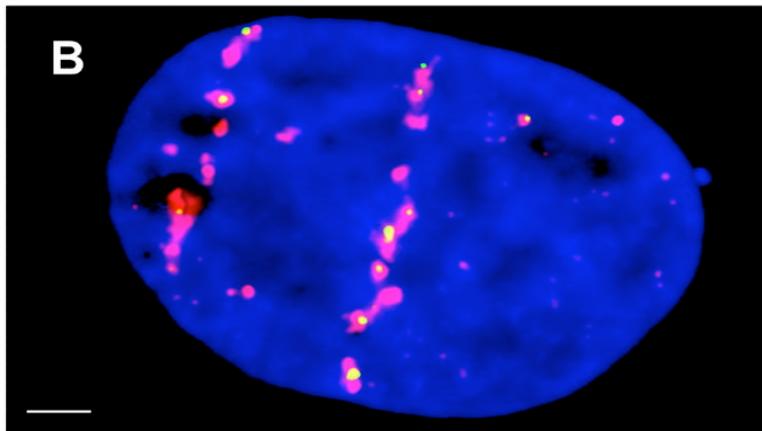
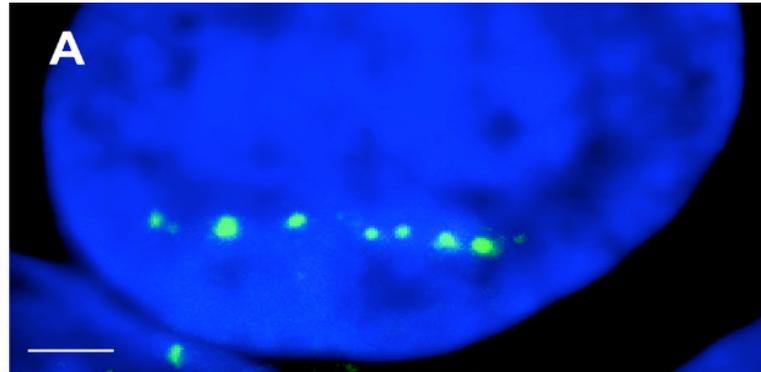
Visualisation des CDB radio-induites par les anticorps d'une protéine de réparation (Rad51) (vert) et de l'histone γ -H2AX (rouge) indicateur de CDB

(Aten JA Science. 2004 Jan 2;303(5654):92-5)

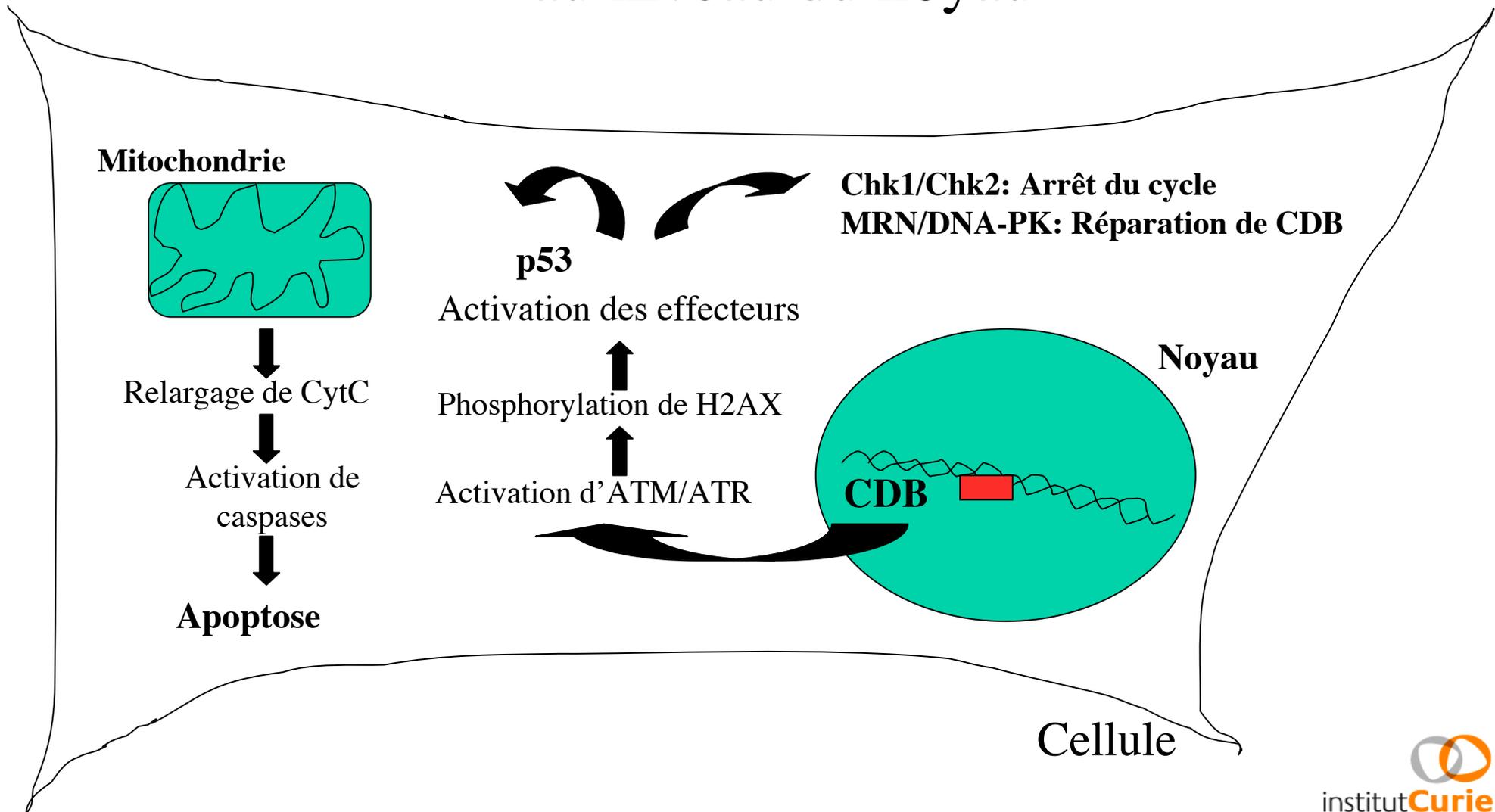
A: Rad51

B & C: Rad51 + γ -H2AX ; 30 min

D & E : Rad51 + γ -H2AX ; 60 min

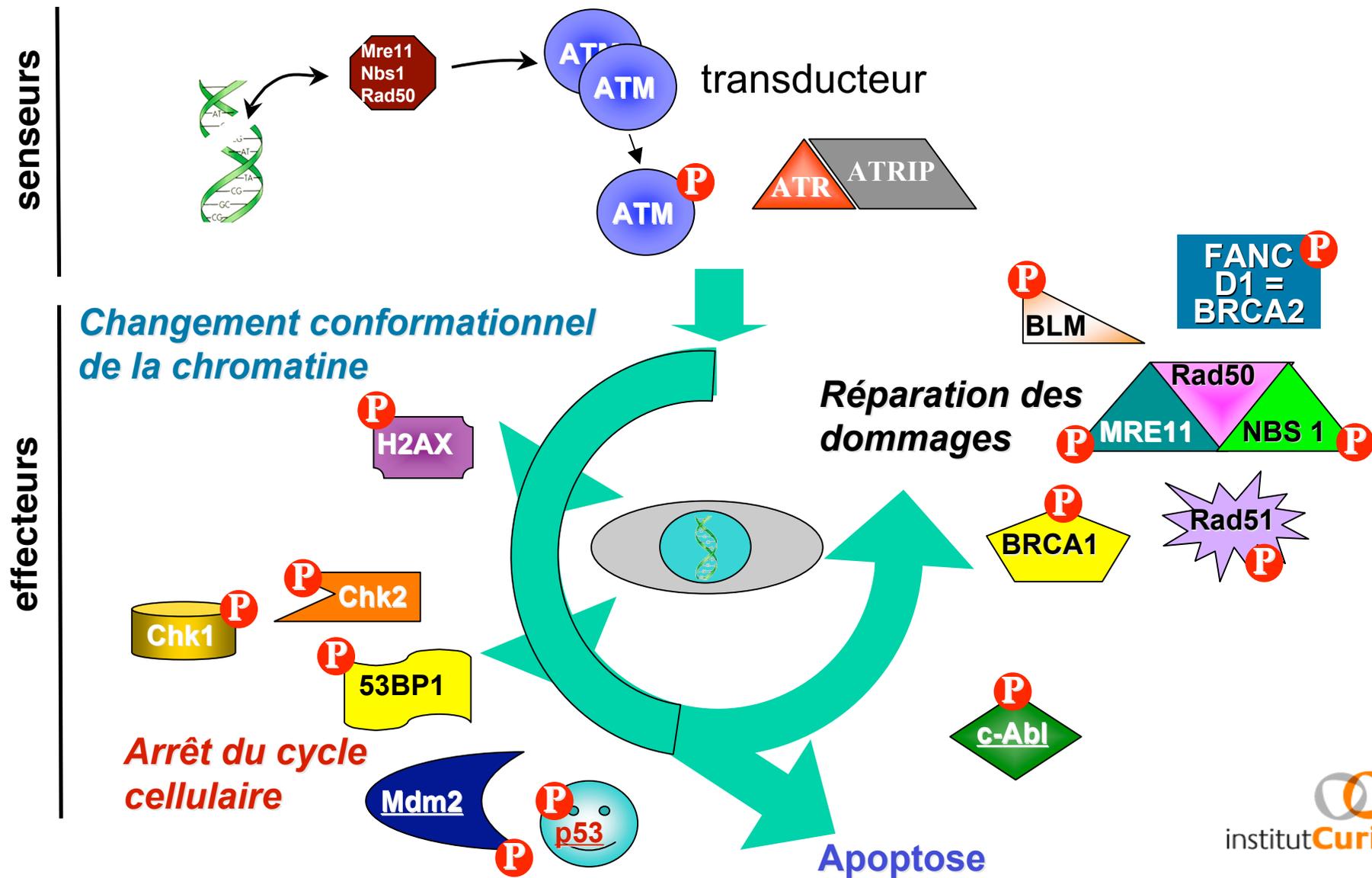


Signalisation des dommages induits au niveau du noyau



Signalisation des CDB radioinduites

(selon Bakkenist CJ et Kastan MB, Cell 2004;118:9-17)



Cascade d'évènements après induction d'une CDB

Réponse au
dommage
de l'ADN (DDR)

Senseurs

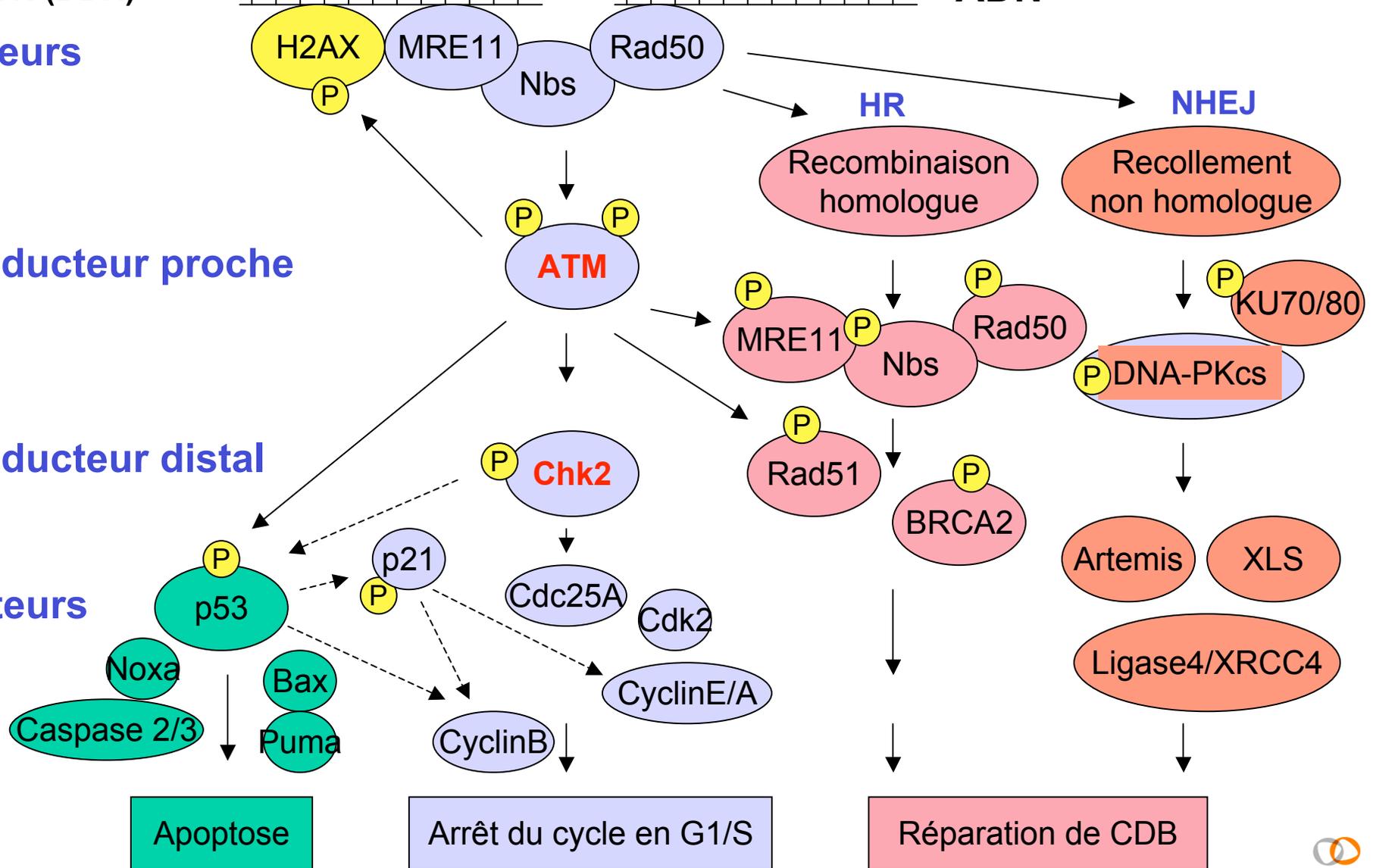
Transducteur proche

Transducteur distal

Effecteurs

RI  **CDB**

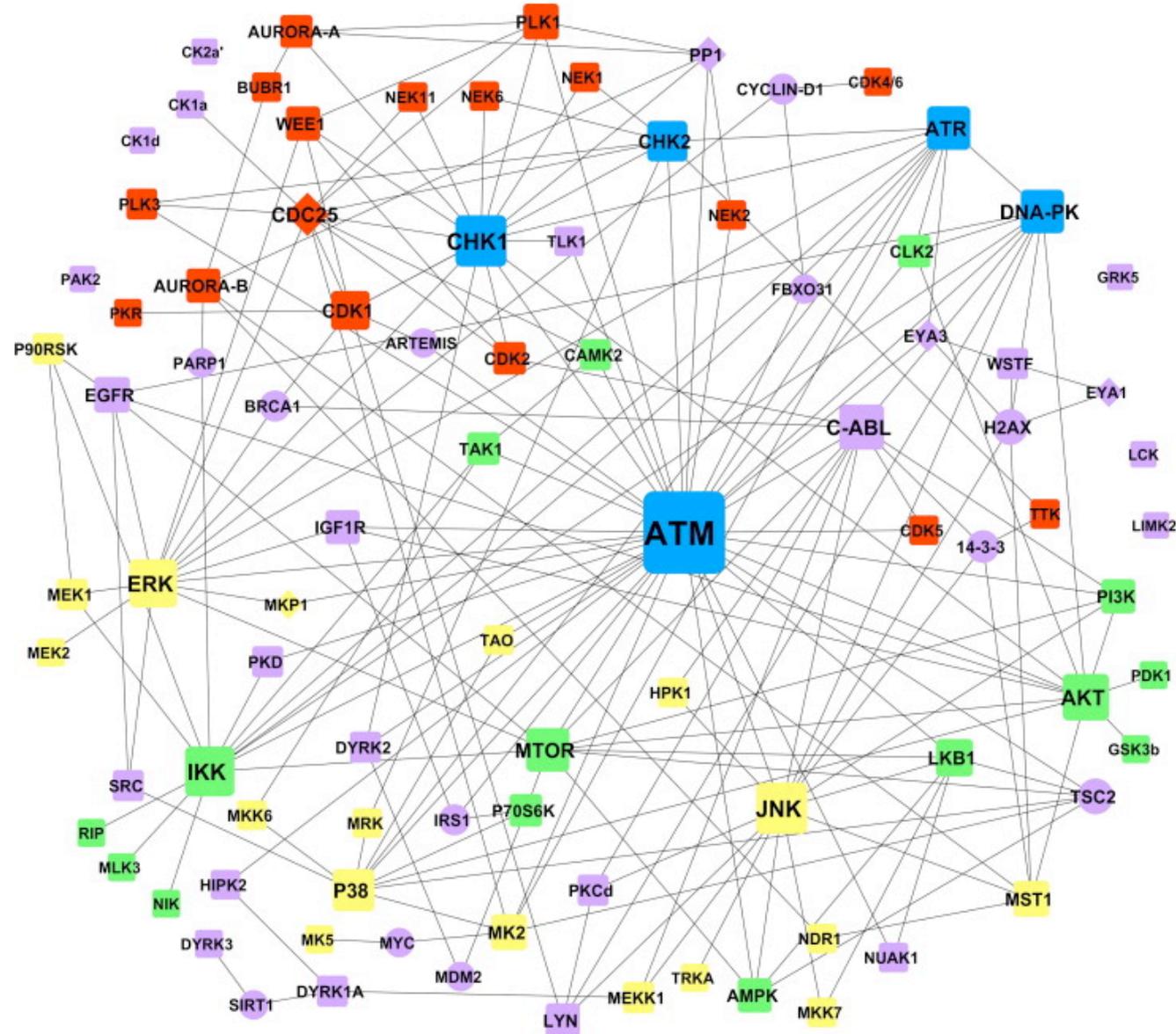
ADN



(Raleigh & Haas-Kogan, *Future Oncol* 2013 9(2))

Réseau de signalisation d'ATM

(Bensimon A. et al. 2011 FEBS Letters , 585,1625-1639)



Cascade d'évènements après induction d'une CDB

Réponse au
dommage
de l'ADN (DDR)

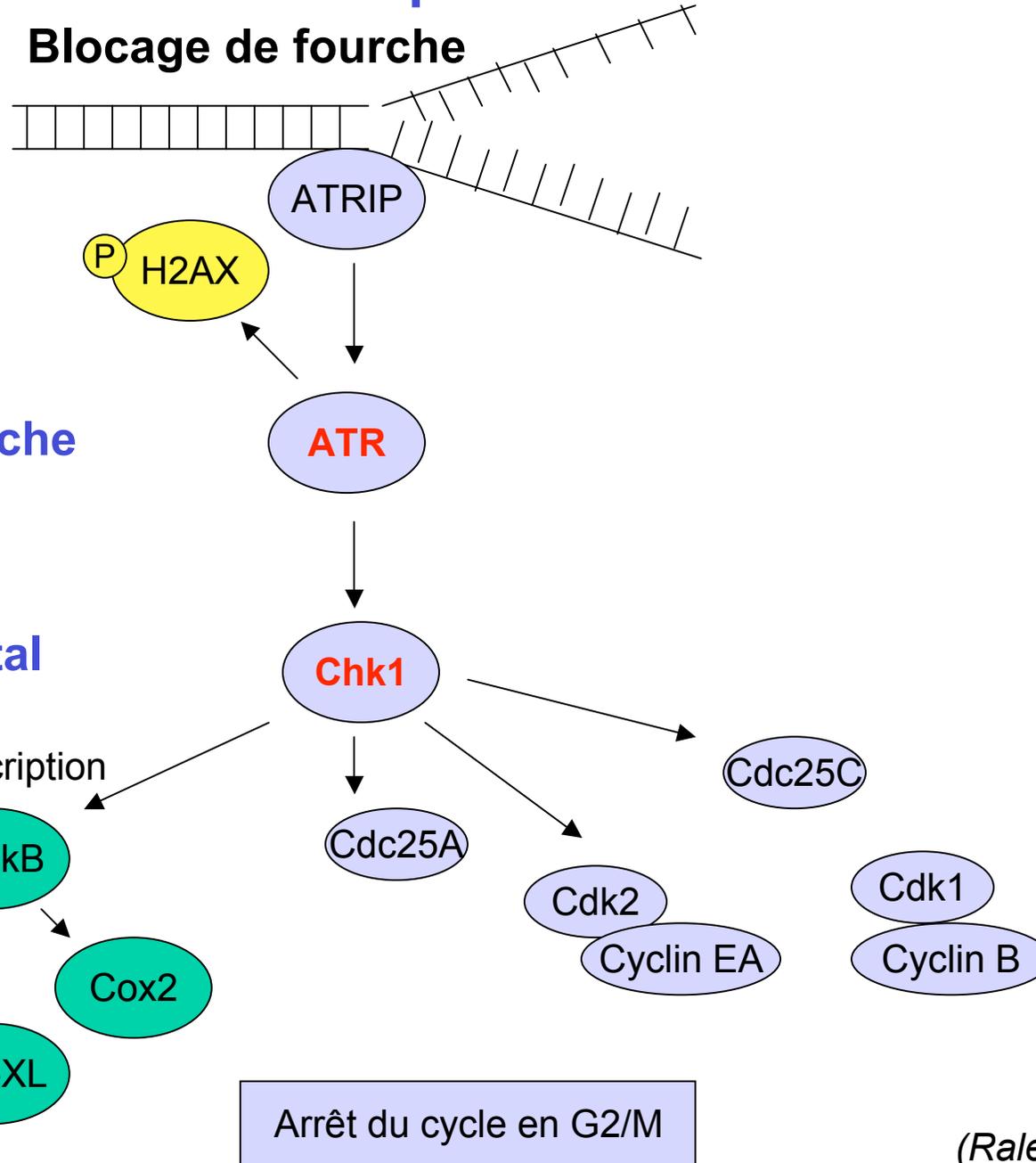
Blocage de fourche

Senseurs

Transducteur proche

Transducteur distal

Effecteurs



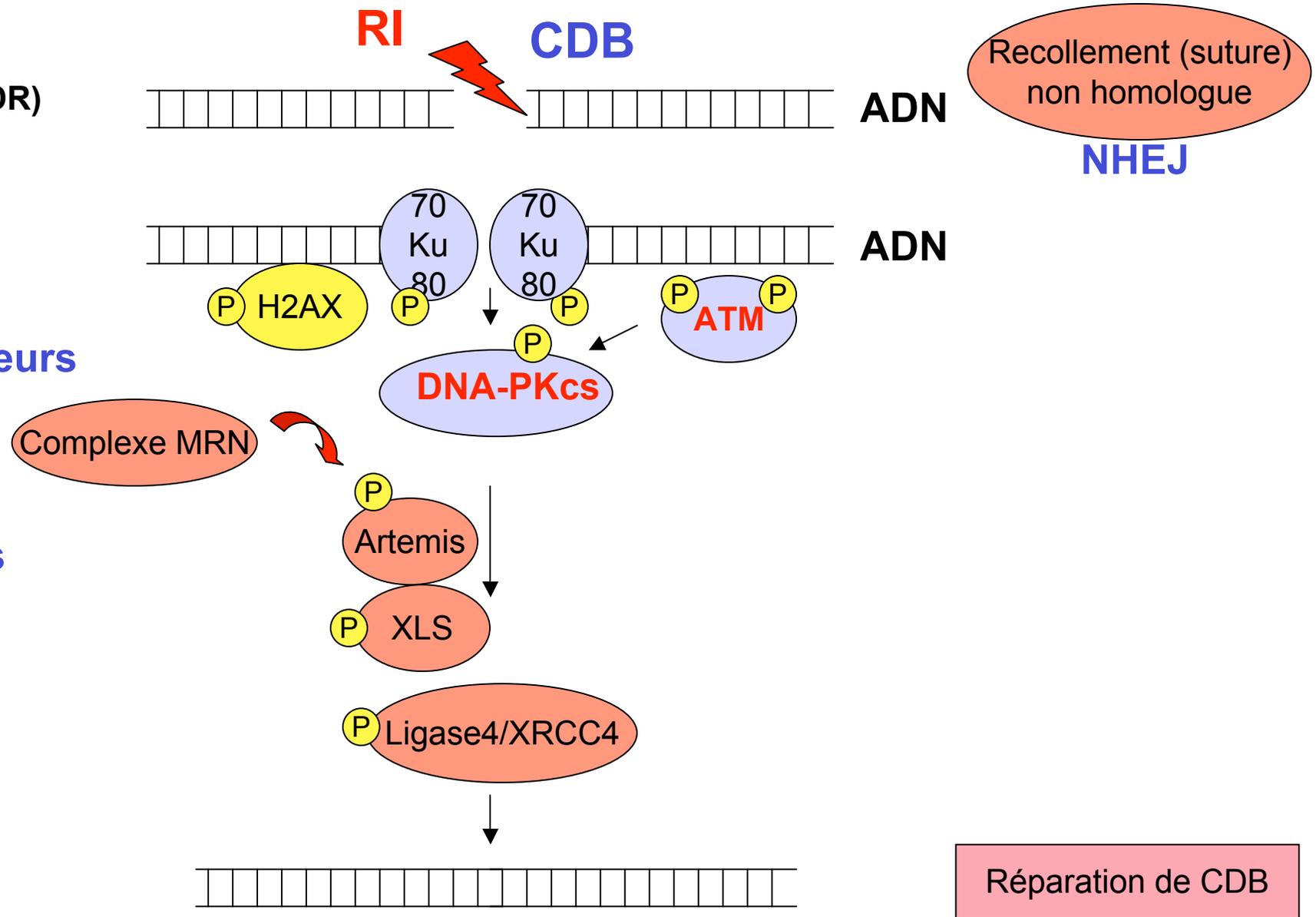
Cascade d'évènements après induction d'une CDB

Réponse au
dommage
de l'ADN (DDR)

Senseurs

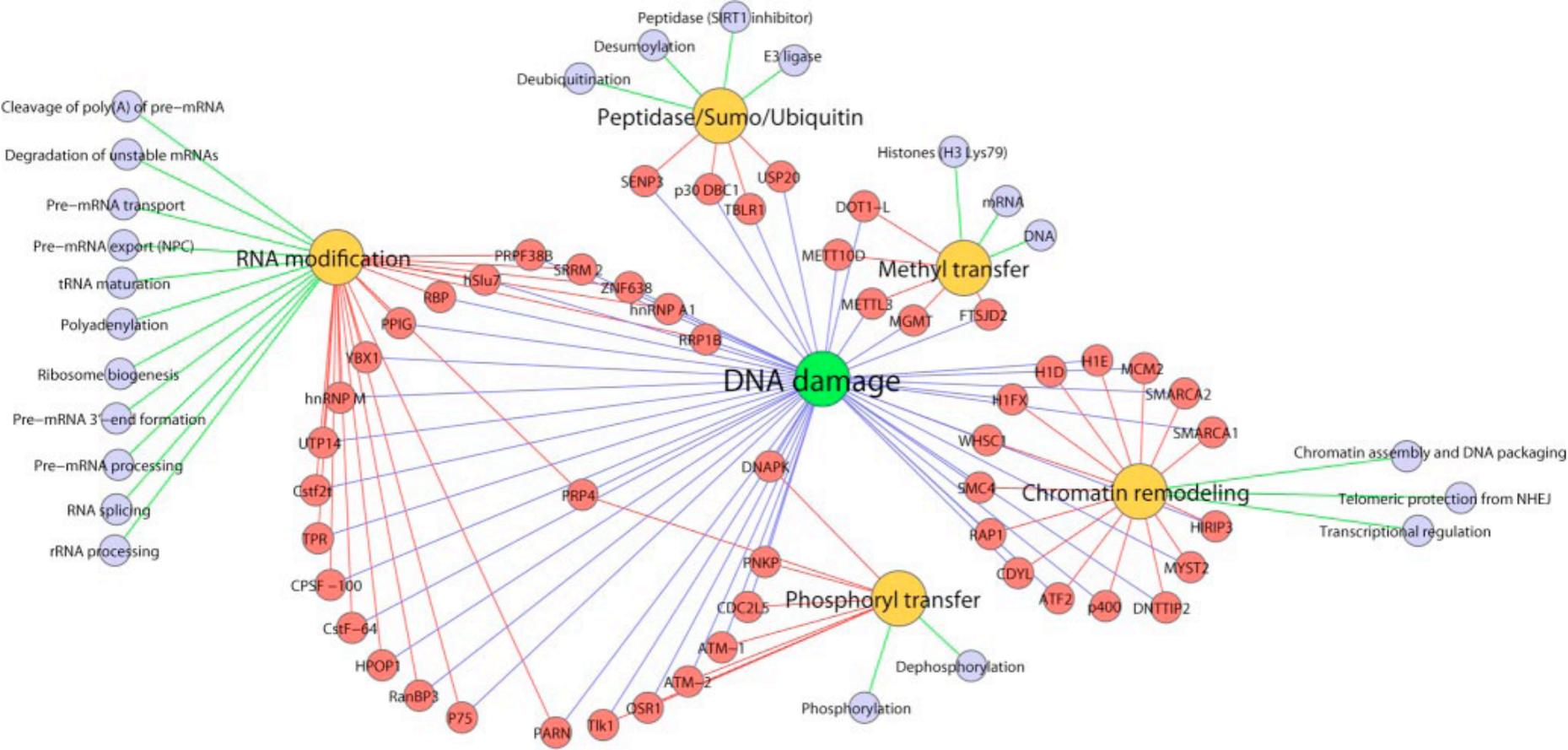
Transducteurs

Effecteurs



(Raleigh & Haas-Kogan, *Future Oncol* 2013 9(2))

Réseaux de réponse aux dommages de l'ADN



(Bennetzen MV et al. 2010 réseaux)

Approche par la biologie des systèmes

- Décryptage de voies métaboliques
- Identification des noeuds (métaboliques) importants
- Détection de précurseurs d'un dysfonctionnement et état pathologique

Absence de signalisation aux très faibles doses

- On a détecté que dans certaines conditions après de très faibles doses d'irradiation, les cellules ne réagissent pas, les CDB ne sont pas réparées, et on constate **une hypersensibilité** aux faibles doses et **une absence d'effet de débit de dose** (qui normalement impliquerait un phénomène de réparation).
- Cette hypersensibilité (Joiner MC & Marples B 2012) aux faibles doses est maintenant exploitée sur le plan radiothérapeutique dans certains traitements antitumoraux (traitement de glioblastome humain xénogreffé sur la souris avec 10 fractions de 0.2 Gy pulsé avec un intervalle de 3 minutes plus témozolomide).

Signalisation de cellules irradiées vers les cellules voisines non irradiées (effet « bystander »)

- La signalisation des dommages ne se fait pas seulement intérieurement en déclenchant le phénomène d'apoptose en cas de très forts endommagements mais également au niveau extracellulaire.
- En effet, les cellules endommagées par l'irradiation ionisante libèrent certains facteurs (« messages ») vers les cellules avoisinantes dans les tissus (pour les avertir de leur détresse?)
- Ces messages peuvent mettre en péril d'autres cellules voisines qui n'ont pas été touchées directement par les rayonnements ionisants (effets de « voisinage » ou effets « bystander »).
- Le plus souvent, il s'agit d'induction de dommages oxydatifs et d'induction de mutations ponctuelles dans les cellules voisines. Ces effets de voisinage ou « à distance » peuvent avoir un effet positif ou négatif.

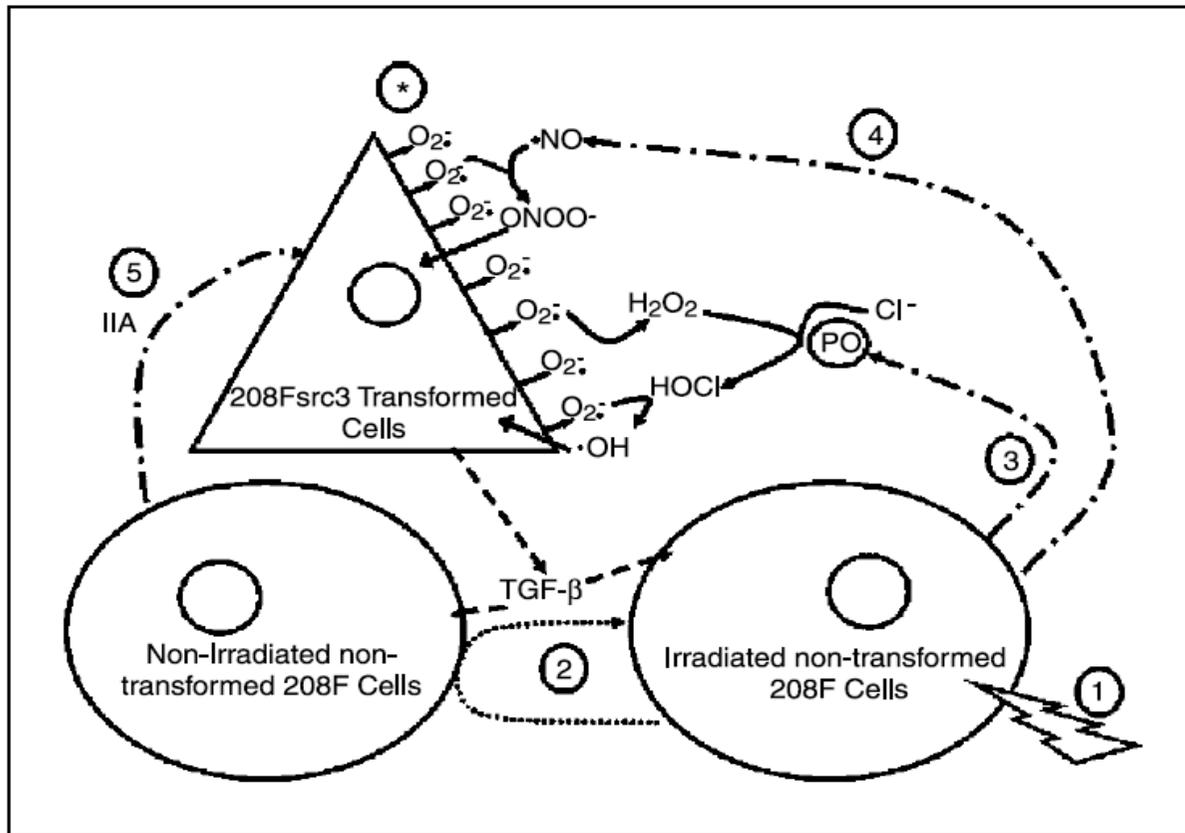
Après de faibles doses d'irradiation gamma les cellules précancéreuses sont éliminées par l'apoptose

(D.I. Portess et al. *Cancer Res.* 2007; 67(3):1246--1253)

Table 1. Comparison of percent apoptosis scored in nonirradiated *src* transformed cells following 65-h coculture with irradiated 208F cells

Experimental conditions	Dose (Gy)	% Apoptosis (\pm SD)
LET comparison	Negative control*	14.52 (\pm 0.90)
γ -Rays	0 [†]	26.70 (\pm 1.54)
	0.5	47.15 (\pm 1.66)
α -Particles	0 [†]	27.24 (\pm 2.47)
	0.5	48.69 (\pm 2.24)

---> L'irradiation de cellules non transformées c208F conduit à l'apoptose les cellules transformées 208F*src3* co-cultivées.



Les cellules normales irradiées par de faibles doses de rayons alpha ou X peuvent envoyer des facteurs vers des cellules pré-cancéreuses déclenchant la mort de celles-ci par l'apoptose.

Figure 4. Proposed mechanism for radiation-stimulated intercellular induction of apoptosis. 1, 208F cells exposed to ionizing radiation. At low doses of α -particles, this will result in some cells receiving an α -particle track, whereas others remain unirradiated. 2, irradiated cells increase the amount of active TGF- β present in the media either through increased activation of existing latent TGF- β present in the media or through secretion of latent TGF- β , which is subsequently activated. 3 and 4, TGF- β acts in an autocrine fashion to stimulate the irradiated cell to produce PO and \bullet NO, which in turn leads to ROS/RNS signaling culminating in transformed cell apoptosis. 5, the active TGF- β released into the media by the irradiated cells will also stimulate nonirradiated neighbor cells to produce PO and \bullet NO (steps 3 and 4). *, key to the selectivity of the signaling system is superoxide produced by membrane-bound NADPH oxidase expressed constitutively in the transformed cells. The nontransformed cells are not susceptible to apoptosis induction as they do not produce the superoxide required to produce the final apoptosis-inducing ROS (\bullet OH and $ONOO^-$).

**(D.I. Portess et al.
Cancer Res. 2007;
67(3):1246--1253)**

Signalisation de cellules irradiées vers les cellules voisines non irradiées (1)

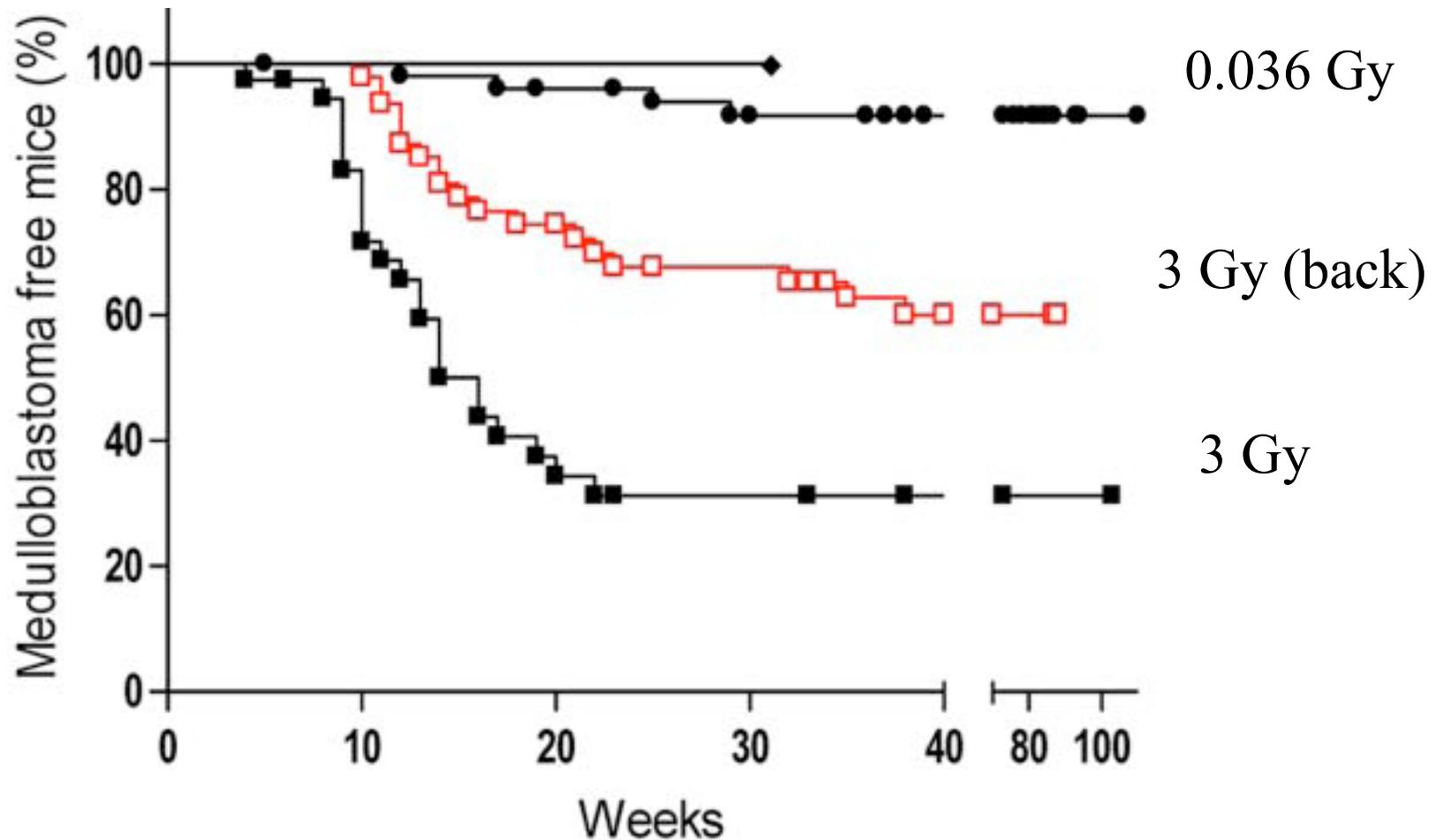
- Des expériences chez les souris prédisposées aux cancers du cerveau ont montré qu'une irradiation de 3 Gy de leur partie arrière peut induire une libération de facteurs (cytokines.....) qui induisent des médulloblastomes dans leur cerveau.



(Manusco et al. 2008 PNAS)

Signalisation de cellules irradiées vers les cellules voisines non irradiées (2)

Souris PTCH1 +/-



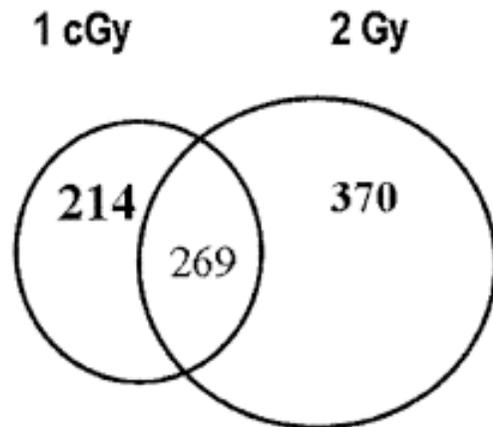
(Manusco et al. 2008 PNAS)

L'induction (transcriptionnelle) de gènes diffère à faible et à haute dose d'irradiation

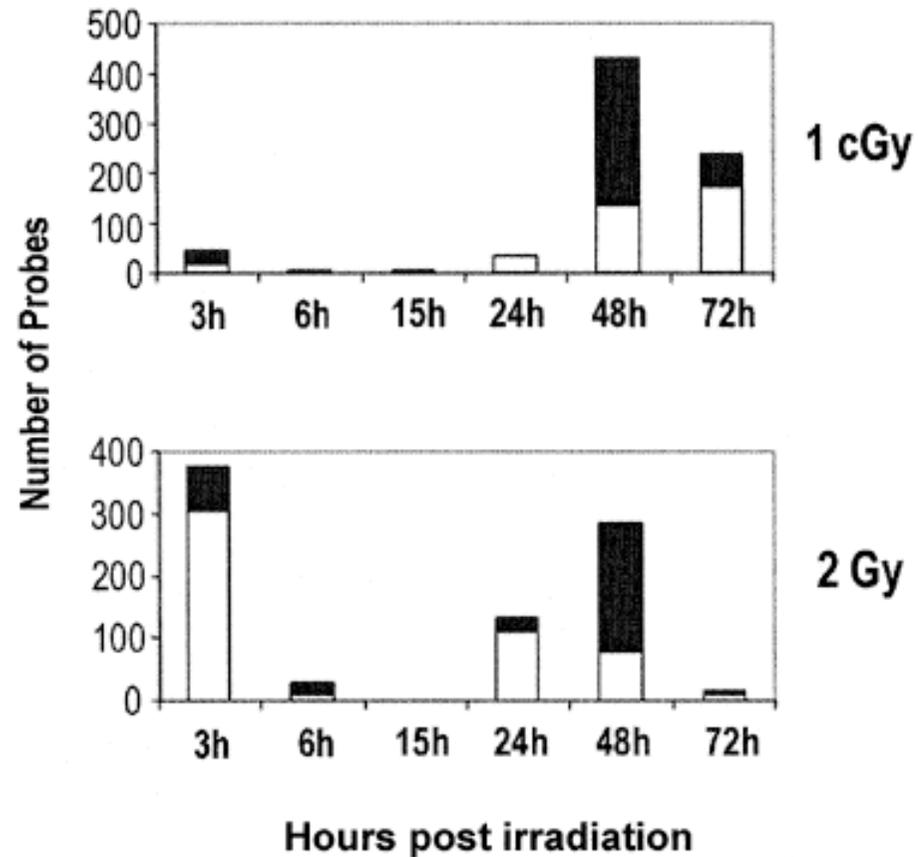
(Franco N et al. *Radiat. Res.* 163, 2005)

LOW-DOSE-SPECIFIC GENE REGULATION IN KERATINOCYTES

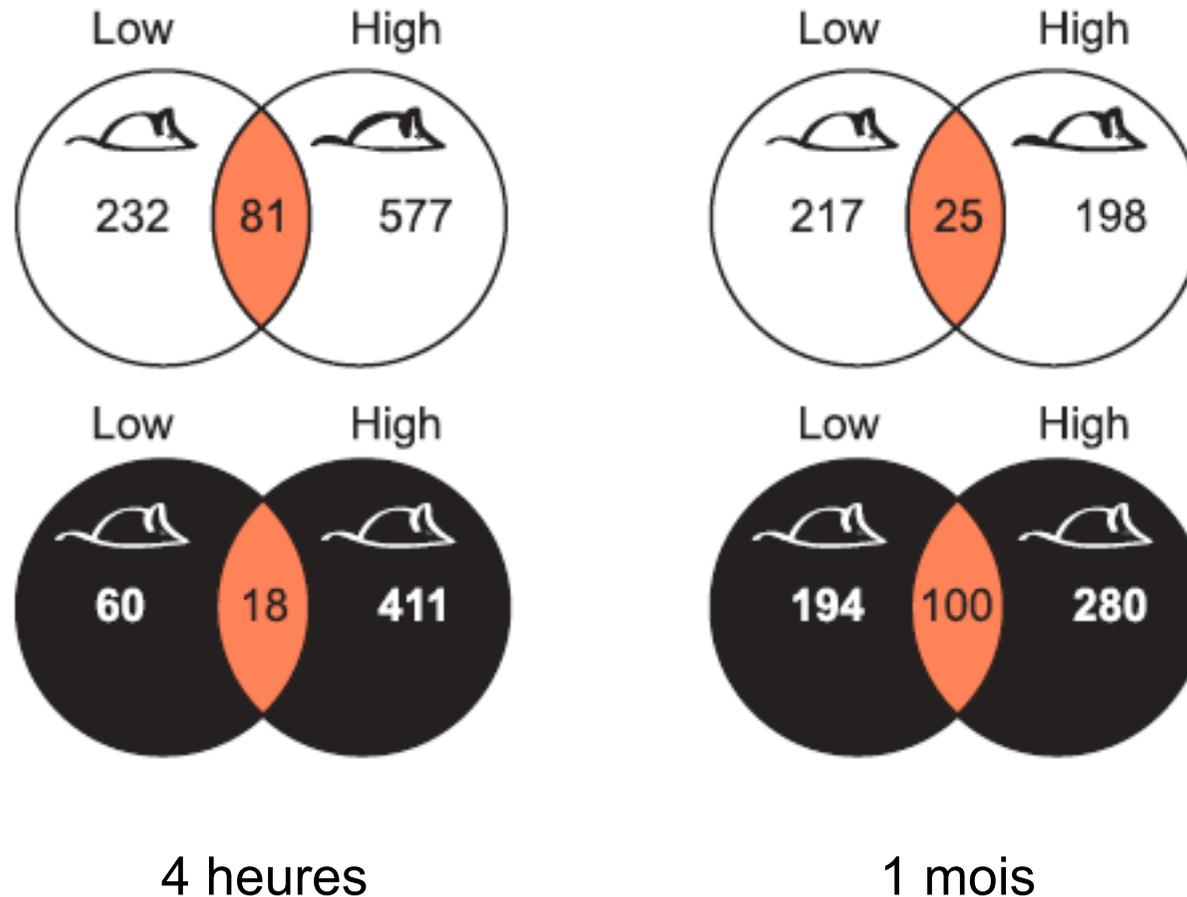
A



B



Réponses transcriptionnelles à faible dose (75 mGy) et à haute dose (1,8 Gy) de souris BALB/c versus C57BL/6



(Snijders AM et al. PLOS one, 1-12, 2013)

L'importance de la signalisation

- Quand la signalisation de dommages est absente (ex: **Ataxie télangiectasie**), il y a **absence de réparation et forte prédisposition aux cancers (lymphomes, leucémies...)**
- Un surcroît de lésions ou une complexité de dommages ajoute aux difficultés d'une réparation de dommages correcte et amène les cellules plutôt vers la mort programmée (**apoptose**).
- Une multiplicité ou mixité de dommages de types différents augmente la possibilité de déclencher une cancérogenèse car ces dommages font souvent appel à des signalisations différentes.

Conclusion (1)

- On constate que **la réactivité (sensibilité) des cellules est un phénomène essentiel** qui nous permet de survivre à la plupart des agressions quotidiennes.
- Toutefois, **il ne faut pas ajouter et surmener ces systèmes** par des agressions trop fortes ou de nature trop complexe donnant lieu à des états inflammatoires et des irritations, et à la persistance de dommages radio-induits.
- Il s'avère donc **essentiel d'analyser avec précision les différentes voies de signalisation des dommages** et leurs performances à différentes doses.
- En effet, **la signalisation dépend fortement de la dose**, il est donc très important de savoir à partir de quel niveau d'endommagement les dommages deviennent irréversibles dépendant des précurseurs et déclencheurs de pathologies et du contexte individuel.

Conclusion (2)

- Ceci fait partie de la recherche sur les risques sanitaires des faibles doses d'irradiation et sur la radioprotection mise en place par les **projets européens DoReMi et MELODI**.
- Pour relier les perturbations et les dommages spécifiques radio-induits aux effets sur la santé, **l'approche de la biologie des systèmes** semble s'imposer, liant le défaut radio-induit au niveau d'une voie métabolique à un dysfonctionnement et un état pathologique spécifique.

Merci pour votre attention!

