

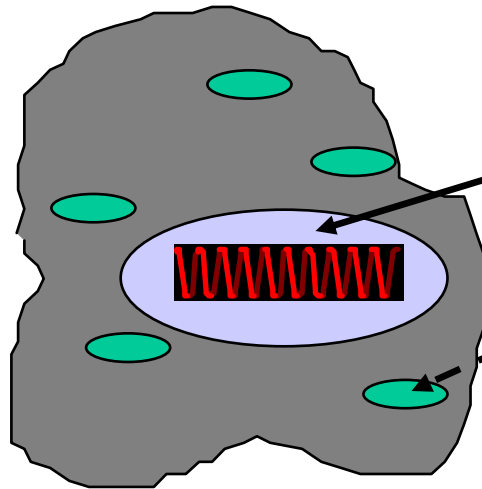
Actualités sur les réponses cellulaires à l'irradiation ionisante - Partie 2 -

Dietrich Averbeck,

Institut Curie-Section de Recherche,
UMR 2027 CNRS, LCR-V29 CEA,
Centre Universitaire d'Orsay, Bât. 110,
F-91405 Orsay Cedex

Concept des cibles cellulaires des radiations ionisantes

Anciennement



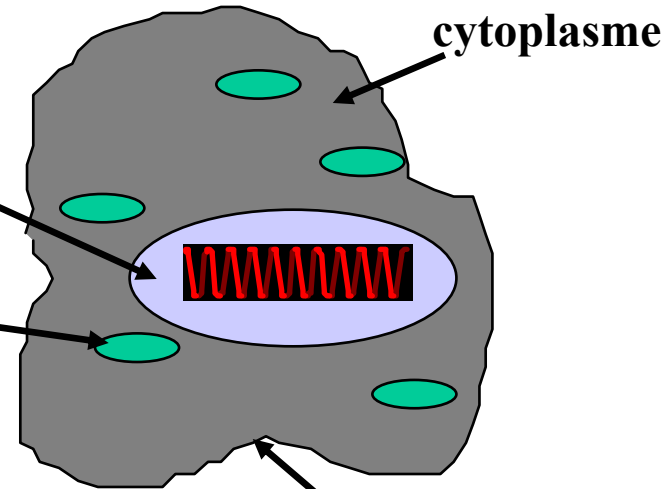
Noyau

Mitochondrie
(centre énergétique)

L'ADN (compacté sous forme de chromosomes dans le noyau)
est la cible principale.

L'intégrité de l'ADN détermine
la réponse cellulaire aux radiations.
(membranes, cytoplasme et
mitochondries
d'importance plus faible)

Actuellement



cytoplasme

Membrane

L'état des membranes (récepteurs), du
cytoplasme (protéines
de signalisation), des mitochondries
(centres énergétiques et implication dans
l'apoptose) ainsi que
de l'ADN conditionnent
la réponse cellulaire aux radiations

Pourquoi sommes-nous intéressés aux actualités sur les réponses cellulaires à l'irradiation ionisante?

La recherche en radiobiologie a beaucoup évolué ces derniers temps en particulier grâce à l'apport de la biologie moléculaire.

De nouvelles données sont susceptibles de changer certains paradigmes et concepts établis en radioprotection.

Ceci concerne essentiellement:

1) La notion de la cible

Des phénomènes de signalisation intracellulaire impliquant les *membranes*, le *cytoplasme* avec ses organelles et le *noyau* et intercellulaire impliquant les *messages moléculaires* venant des cellules irradiées (effet bystander) ont été observés.

→ **Le concept microdosimétrique centré sur le noyau doit évoluer. Les cibles en dehors de l'ADN sont aussi importantes.**

2) Les dommages radioinduits:

De nouvelles lésions telles que les *lésions multiples localisées* ou LMDS (lésions considérées comme très délétères) ainsi que d'autres *lésions complexes* peut-être spécifiques de l'irradiation ionisante et impliquant des bases de l'ADN ont été mises en évidence.

3) La signalisation des dommages:

- Au niveau cellulaire, des *voies de signalisation* activées par les dommages membranaires et/ou par les lésions de l'ADN peuvent être distinguées. Elles sont importantes pour la survie cellulaire en *déclenchant la réparation ou l'apoptose*.
- La signalisation entre cellules endommagées et cellules voisines non endommagées constitue l'*effet bystander* (voir exposé de Carmel Mothersill)

4) La réparation de l'ADN:

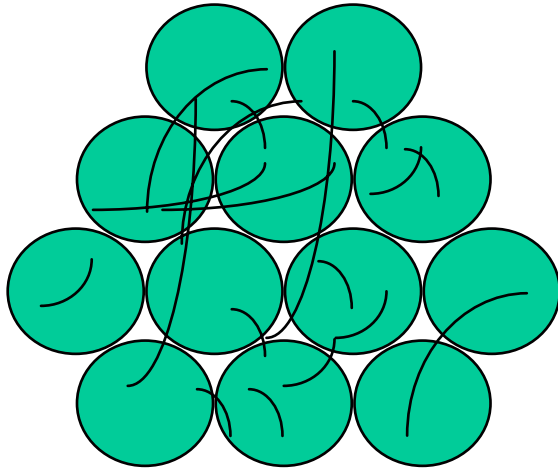
- *Plusieurs mécanismes de réparation*, la plupart spécifiques d'un type de lésion, sont mis en route après irradiation.
- Leurs activités dépendent de la signalisation des dommages, de la constitution génétique et de l'état physiologique cellulaire.
- L'absence de capacités normales de réparation donne lieu à des syndromes humains prédisposant aux cancers. De plus, certains *polymorphismes de gènes de réparation* ont été trouvés chez des patients atteints de cancer.

Distribution de particules dans le tissu

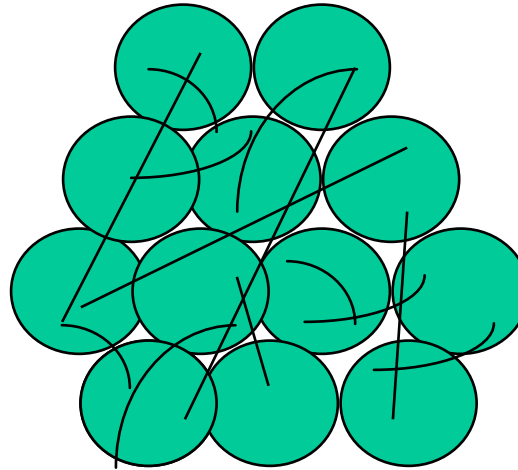
(Feinendegen L.E. et M. Pollycove, J Nucl Med 2001;42:17N-26N42, 2001)

DOSE= 0,01 Gy ; masse cellulaire: 1 ng

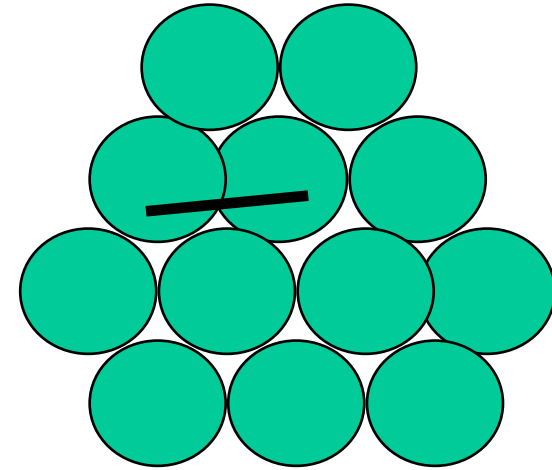
Rayons X (250 keV)



Protons (10MeV)

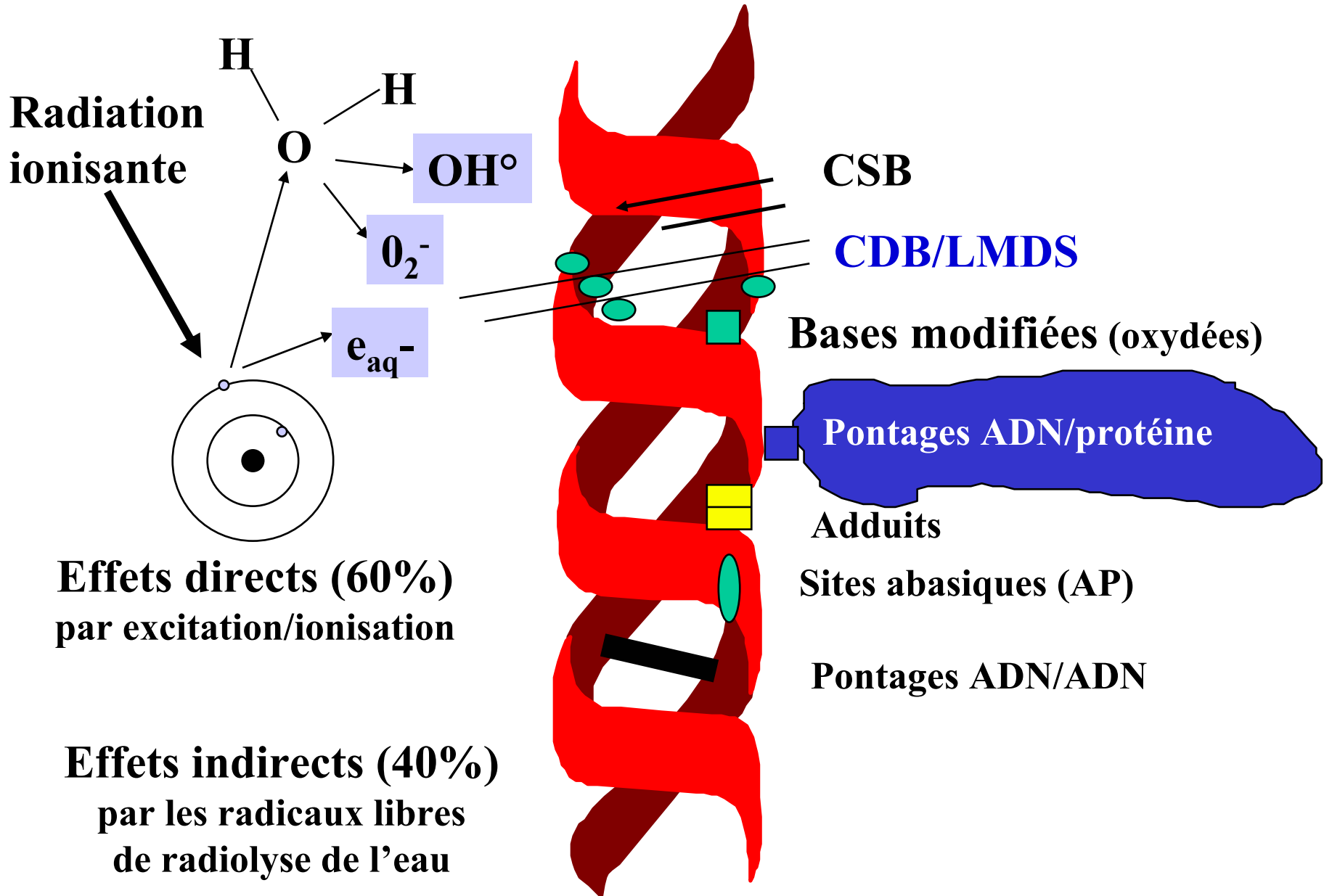


Particules α (4 MeV)



TEL	0,2 keV/ μm	4,6 keV/ μm	108 keV/ μm
Dose	0,0009 Gy	0,006 Gy	0,35 Gy
Cellules affectées	100%	81%	2,8%
Trajectoires	11,63	2,02	1,01

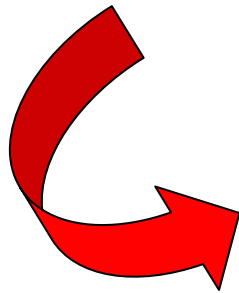
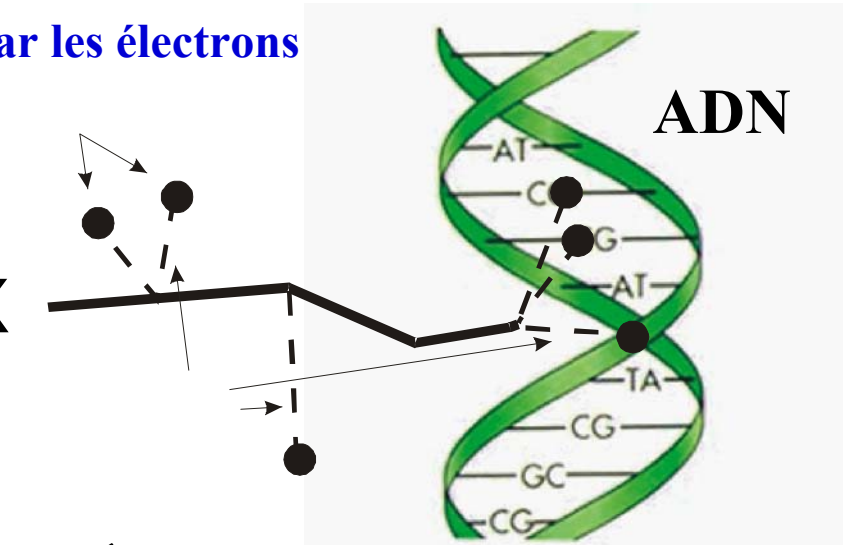
Les lésions radio-induites dans l'ADN



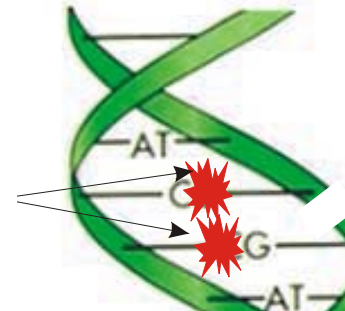
Dommmages multiples localisés (LMDS)

Dépôt d'énergie par les électrons en fin de parcours

Rayons X

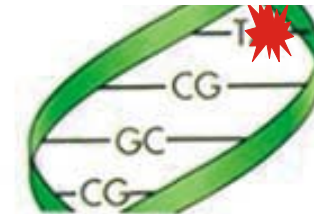


Dommmage oxydatif



Cassure simple brin

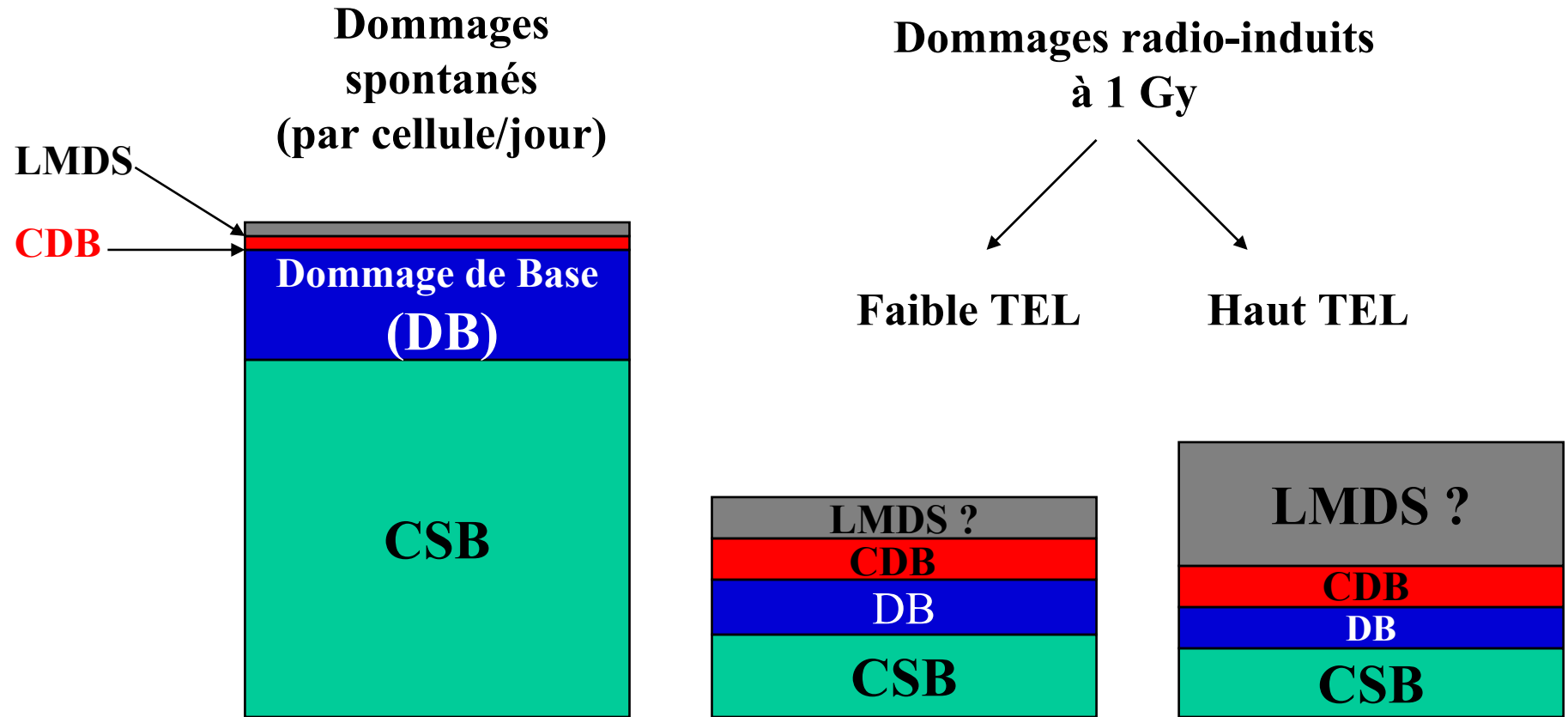
Cassure double brin



Dommages endogènes et radio-induits de l'ADN

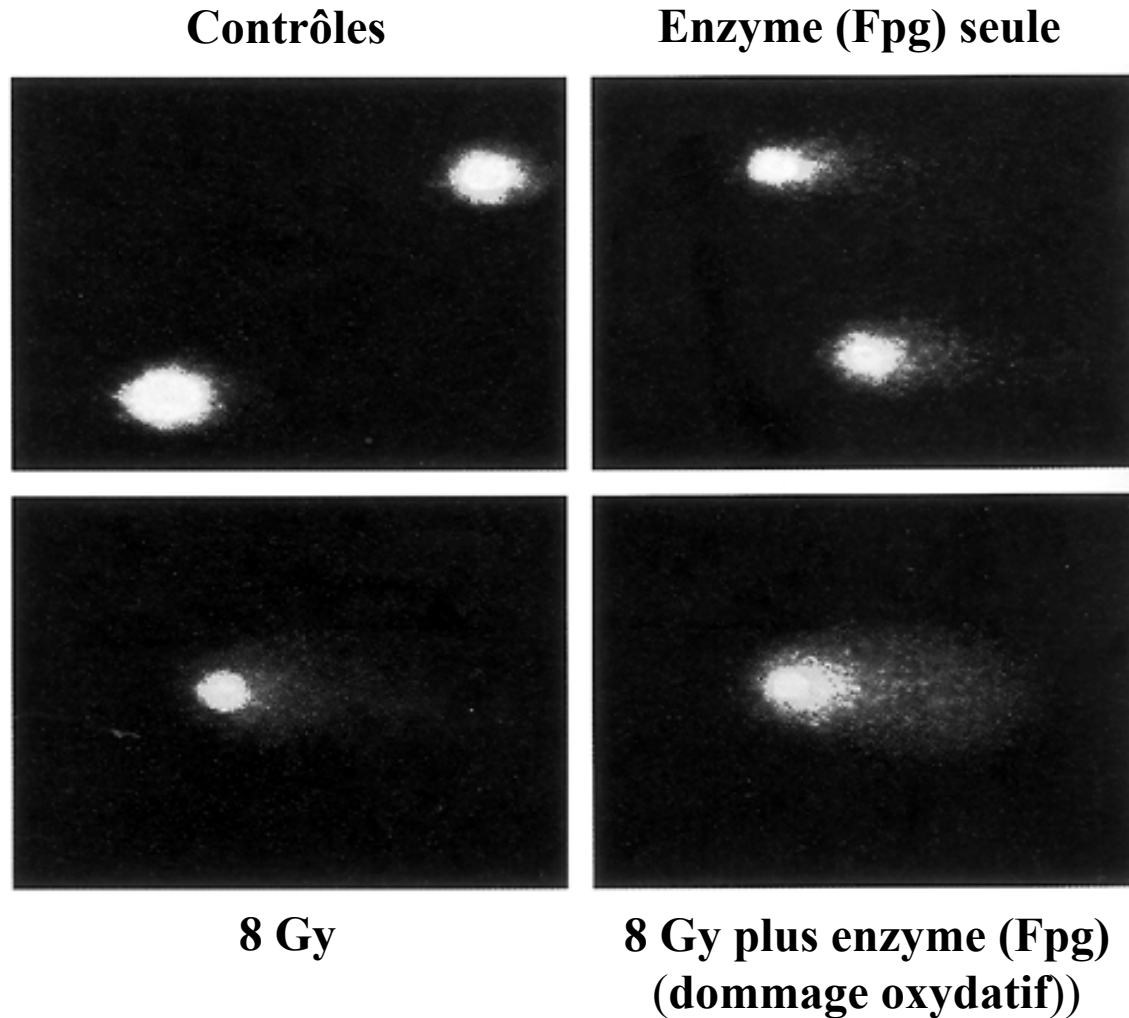
Dommages	endogènes /cellule/jour	radio-induits /Gy
Cassures simple brin	55 000	1000
Pertes de bases	12 600	?
Dommages de bases	3 200	2000
Cassures double brin	8	40
Pontages ADN/ADN	8	30
Pontages ADN/protéine	quelques-unes	150
Lésions multiples localisées (LMDS)	quelques-unes?	?

Induction relative des dommages spontanés et radio-induits



Effets de l'irradiation: Induction de lésions complexes (CDB, LMDS) susceptibles de provoquer des mutations (délétions), des instabilités génétiques et des cancers

Détection des cassures simple brin par le test de comètes



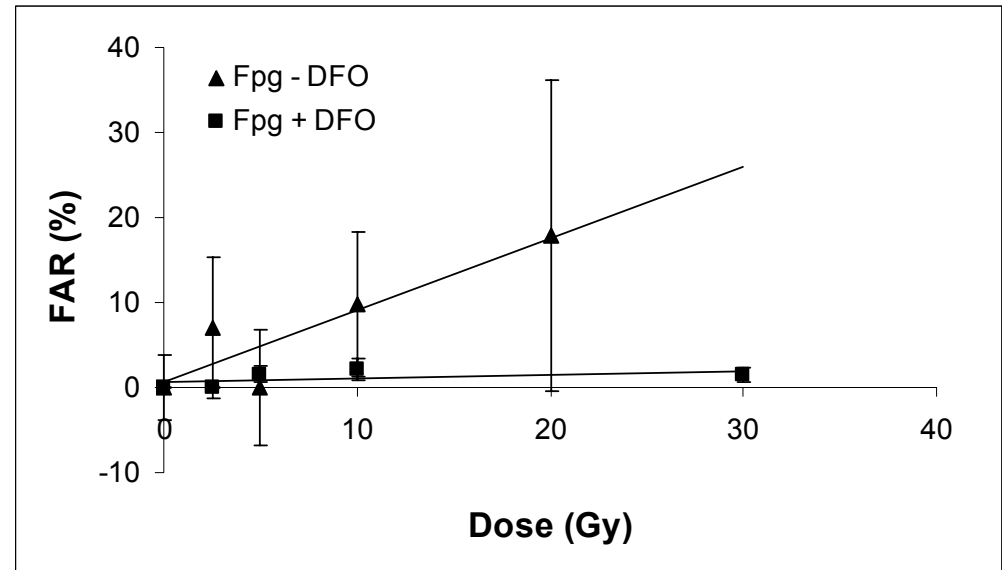
Les dommages oxydatifs radio-induits sont détectés après traitement enzymatique des noyaux des cellules avec une enzyme (Fpg)

Controverse sur les dommages radio-induits

Les dommages multiples localisés (LMDS):

Dans les cellules irradiées par les rayons gamma nous mesurons une quantité de LMDS nettement plus faible (Boucher et al. 2004 en préparation) que celle rapportée dans la littérature (Sutherland et al. 2000, PNAS).

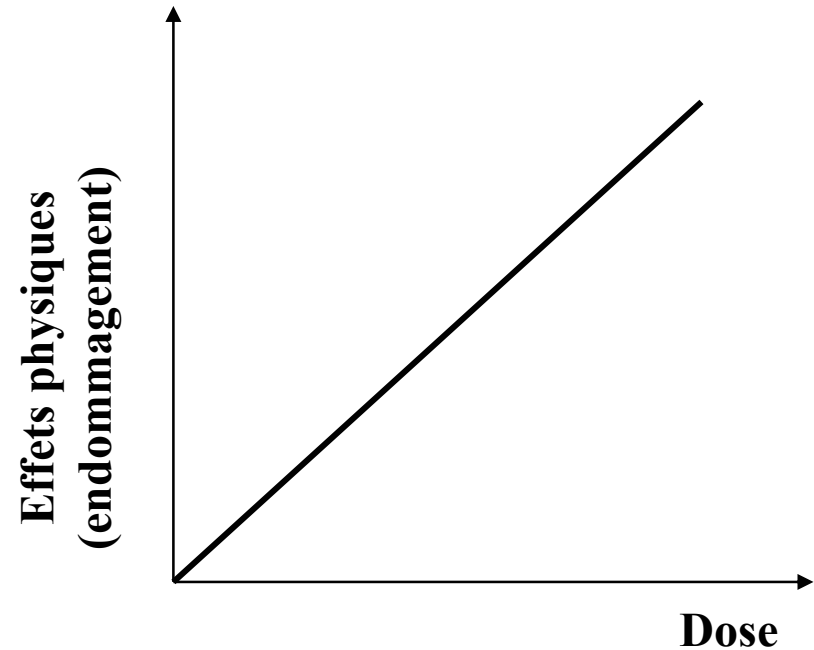
Induction de LMDS dans les cellules de mammifère en fonction de la dose d'irradiation mesurée par deux protocoles: l'un avec et l'autre sans ajout de l'antioxydant DFO pendant la lyse cellulaire .



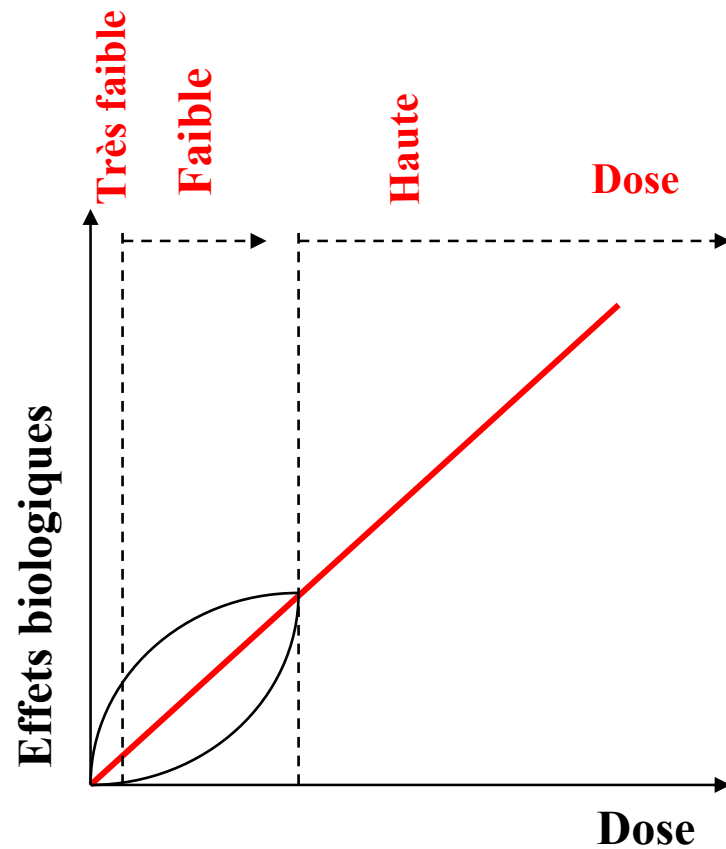
Résultats: Induction d'un taux faible de LMDS et absence d'une dose dépendance

→ Parmi les lésions radio-induites les plus dangereuses, les CDB sont apparemment les plus fréquentes.

Effet dose : le modèle de linéarité sans seuil

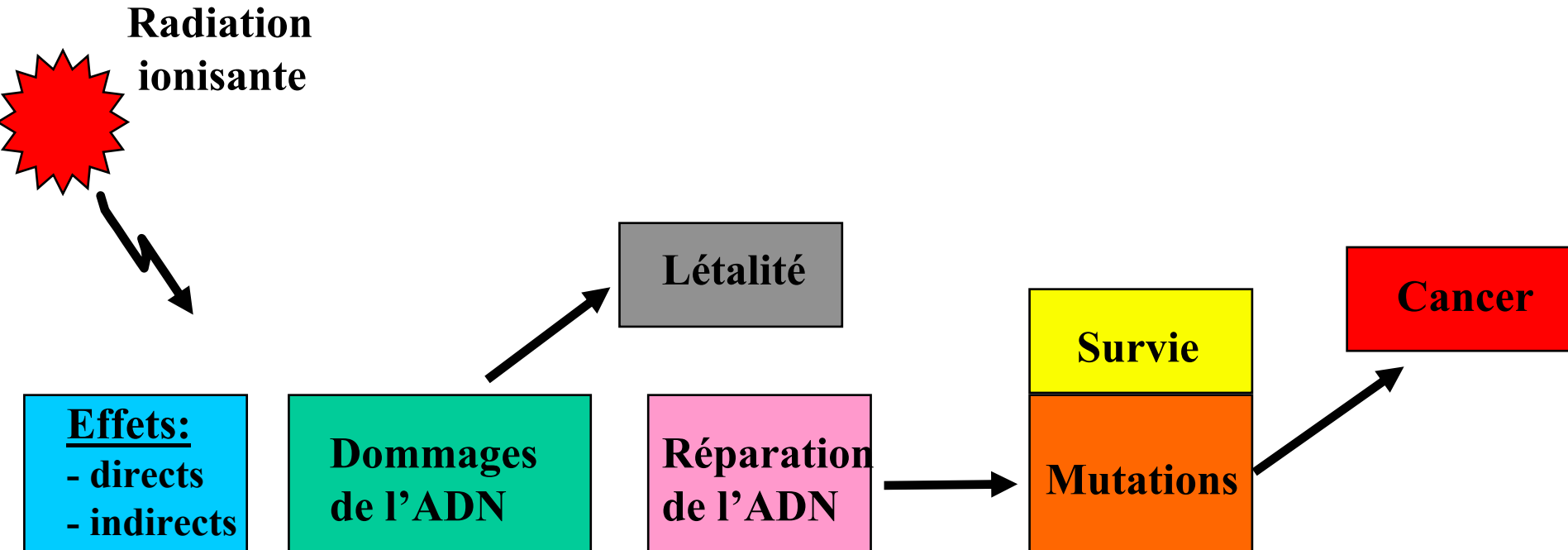


Les événements physiques et chimiques sont qualitativement les mêmes à hautes et à faibles doses



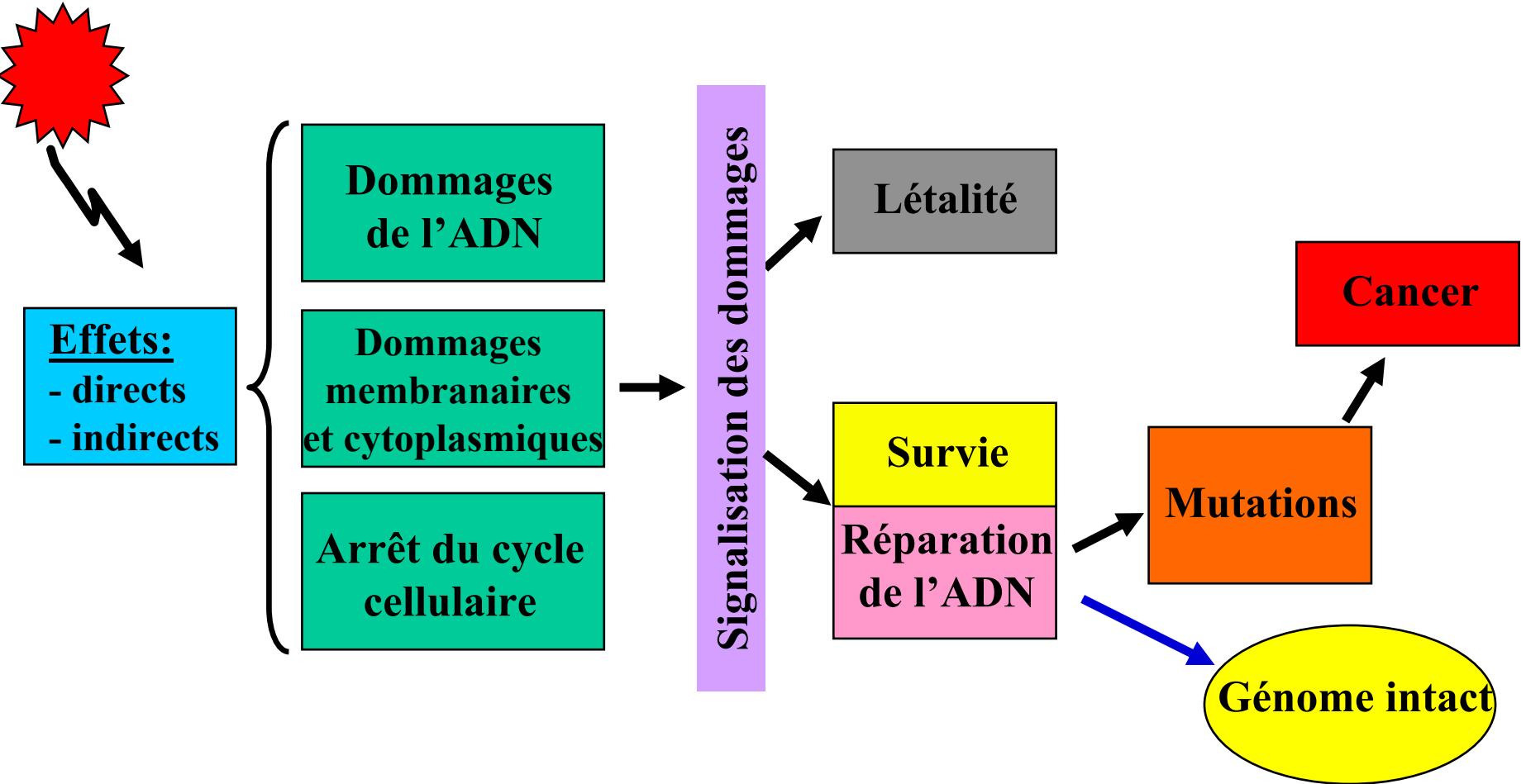
Les réponses cellulaires diffèrent à très faibles, faibles et hautes doses

Interaction des radiations ionisantes avec l'ADN et conséquences biologiques (1)



Interaction des radiations ionisantes avec l'ADN et conséquences biologiques

Radiation
ionisante



La signalisation et les effets biologiques sont dose-dépendants

- **Après irradiation les protéines de signalisation sont activées conduisant à :**

---> *blocage de la prolifération*

(activation des points de contrôle du cycle cellulaire)

---> *réparation des radio-lésions ou apoptose*

- **Le niveau de dose est déterminant pour les effets biologiques:**

---> *à très faible dose (1 mGy) : pas de signalisation vers une réparation. Les quelques cellules irradiées sont éliminées (probablement) par apoptose.*

----> *à des doses plus élevées (>5mGy) : signalisation des dommages et activation des voies de réparation pouvant être fidèles ou fautives.*

Une réparation fautive est mutagène et peut augmenter le risque de cancer.

----> *à des doses beaucoup plus élevées (> 200mGy) : compétition entre réparation et apoptose.*

Signalisation cellulaire après irradiation ionisante (RI)

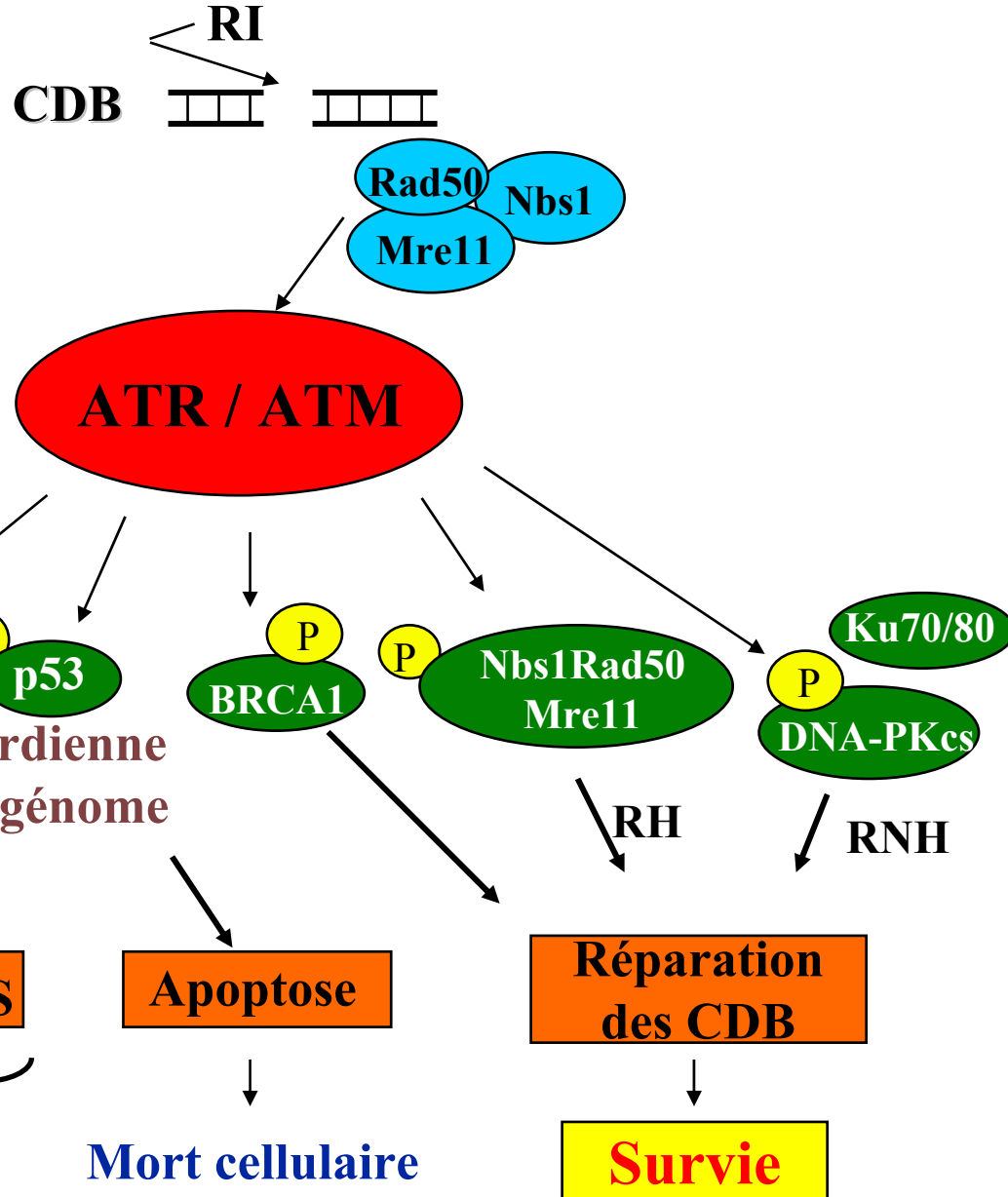
Dommages de l'ADN

Protéines détectrices

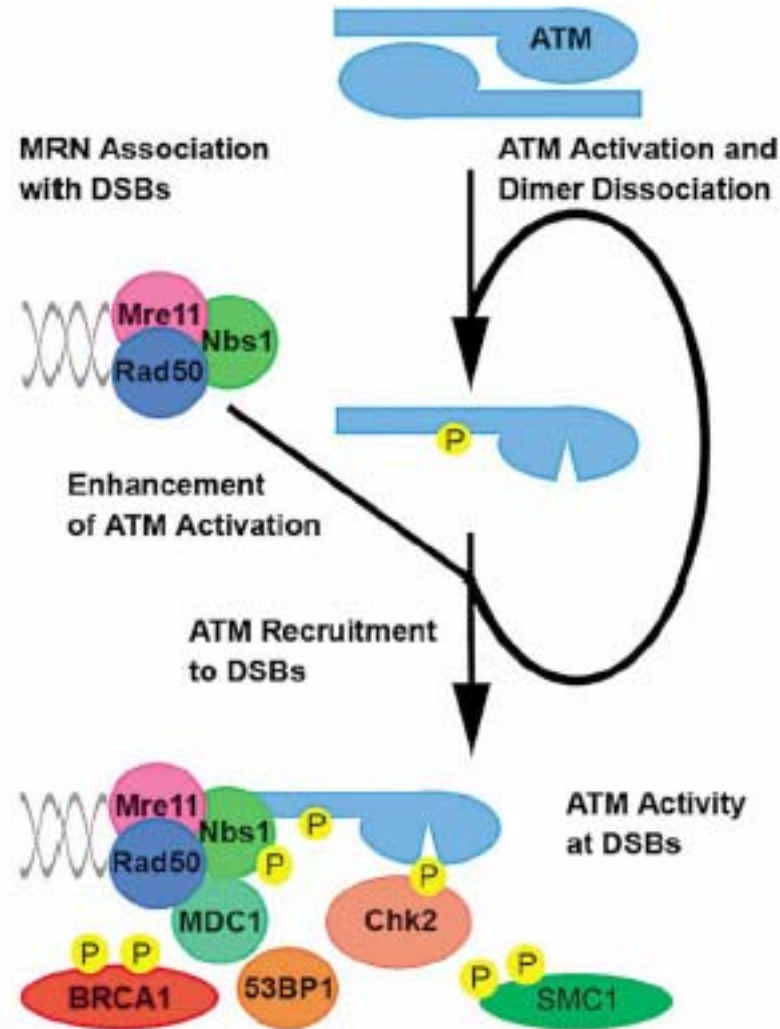
Transmetteurs du signal

Protéines effectrices

Effets biologiques



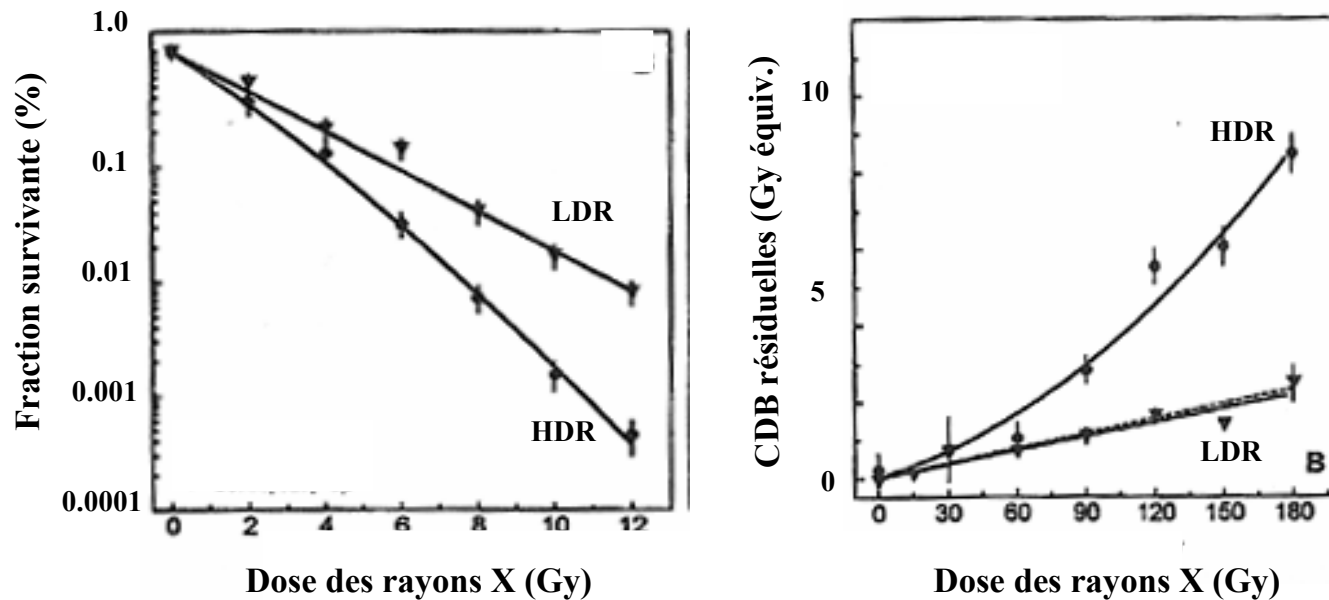
Signalisation par la protéine ATM



Les effets biologiques dépendent du débit de dose

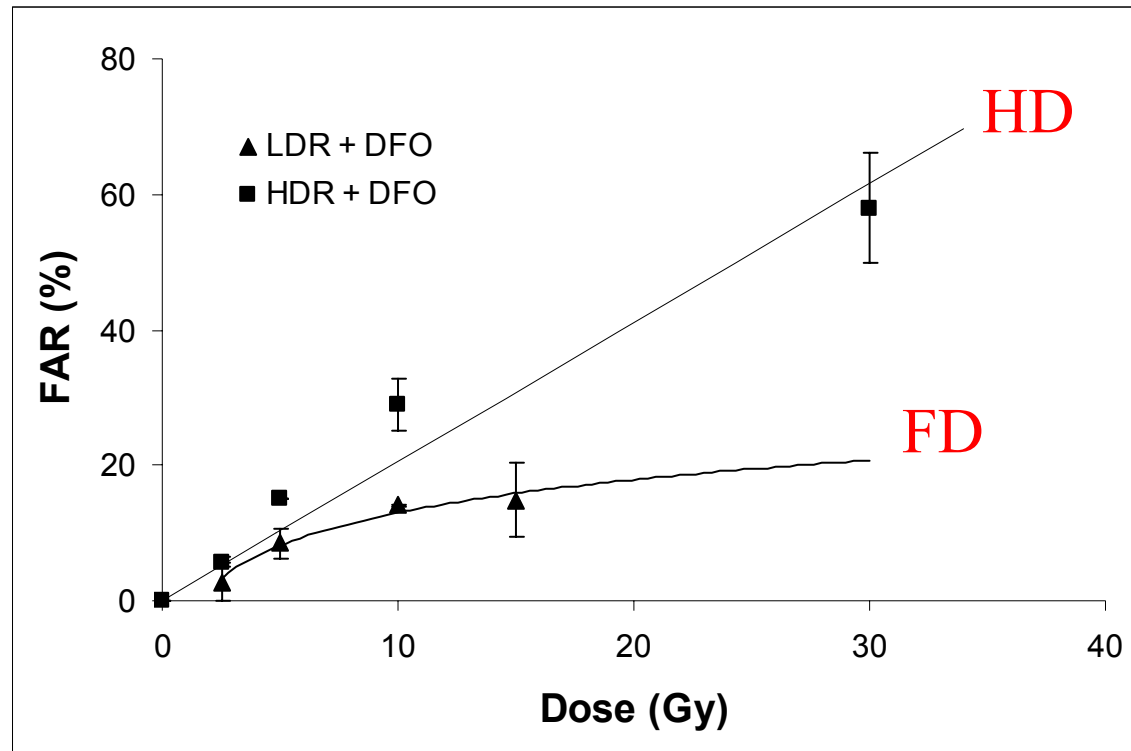
Effets du débit de dose sur la survie et sur l'induction de CDB dans les cellules de mammifère:

Effet du débit de dose rayons X (E. Dikomey et I. Brammer 2000)



Effet du débit de dose de rayons gamma sur l'induction de CDB dans les cellules de mammifère (CHO-K1)

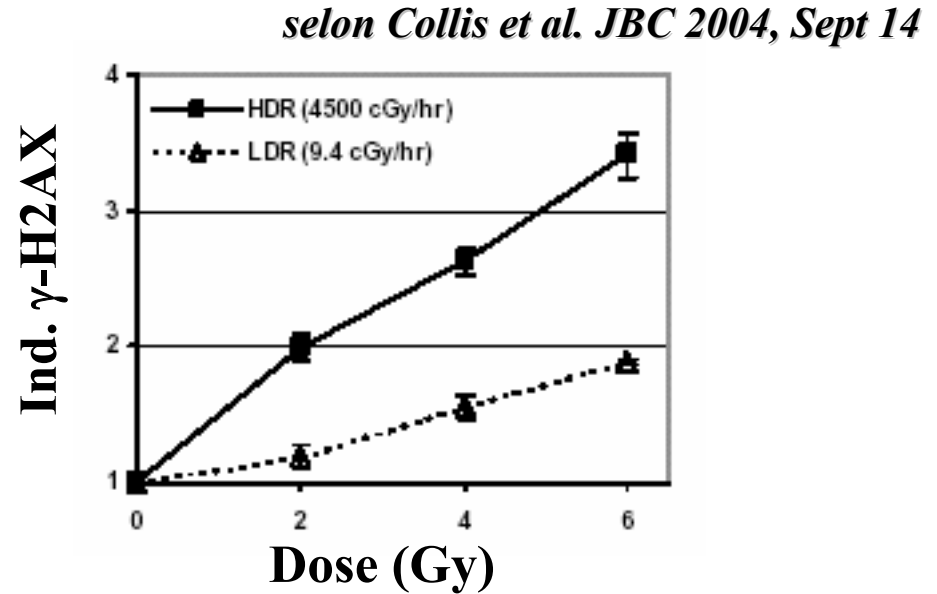
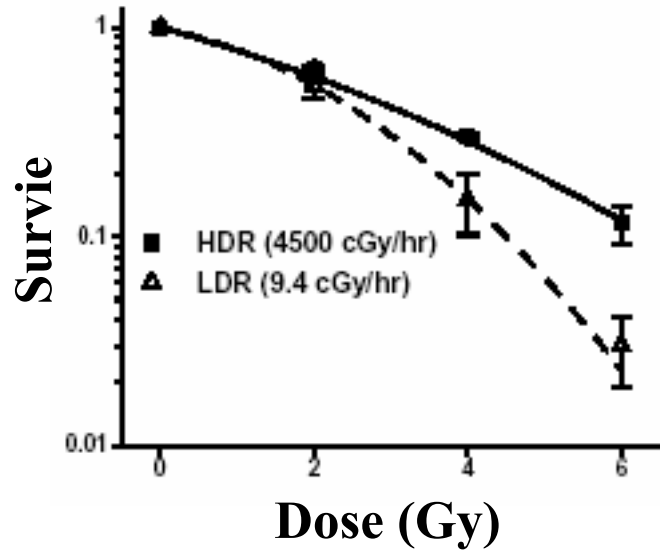
FAR : Fraction de l'ADN fragmenté après irradiation



L'induction est réduite après irradiation à faible débit (FD) (0.05 Gy/min) par rapport au haut débit de dose (HD) (3,5 Gy/min)

(voir Boucher et al. Can. J Phys. Pharmacol. 2004; 82(2): 125-132)

Absence de signalisation des CDB à très faible débit de dose

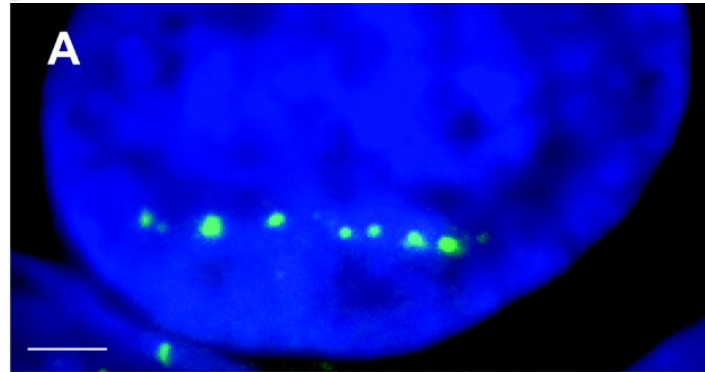


En prenant l'activation de H2AX (phosphorylation par ATM) comme indicateur des CDB radio-induites, les auteurs montrent qu'à *très faible débit de dose* (94 mGy/h), *les CDB ne sont pas réparées car elles ne sont pas reconnues* par les protéines détectrices (MRE11-RAD50-NBS1) à cause d'un défaut dans l'activation d'ATM.

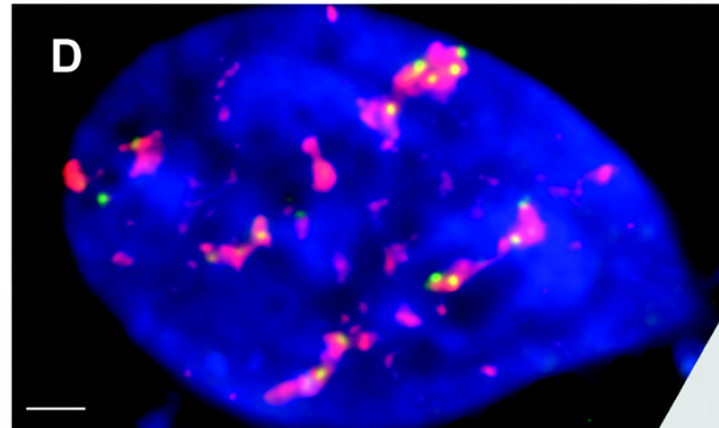
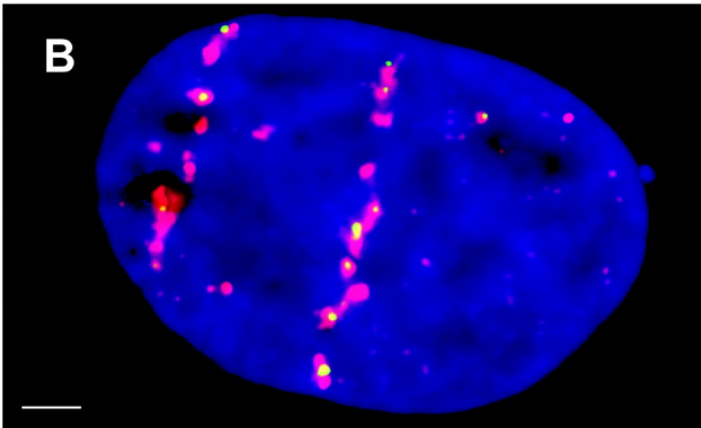
----> **Comme dans le cas des faibles doses, un seuil de débit de dose semble exister pour la signalisation par ATM et pour la réparation.**

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 (selon Aten et al. 2003)

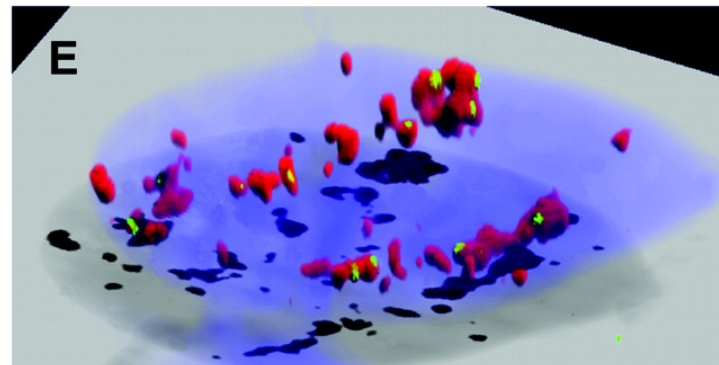
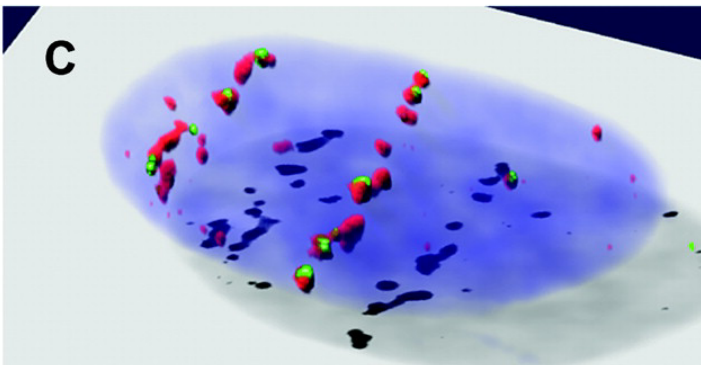
A: Rad51



B & C: Rad51 + γ -H2AX ; 30 min



D & E: Rad51 + γ -H2AX ; 60 min



Effet du débit de dose sur l'induction de gènes

A très faible débit de dose (1 mG/min) on observe que certains gènes impliqués dans la réparation de l'ADN ne sont pas induits contrairement aux gènes impliqués dans le métabolisme énergétique (Mercier et al. 2004).

De plus, Amundson et al. (2003) ont montré que certains gènes (CDKN1A, GADD45A, MDM2) *régulés par p53 sont induits linéairement avec la dose* entre 20 et 500 mGy et que certains gènes sont sensibles au débit de dose (XPC, DDB2) et d'autres (ERCC1 et MDM2) pas.

La réparation de l'ADN

Plusieurs systèmes de réparation de radiolésions ont été décryptés.

Les systèmes fidèles

- Ligation directe
- Réparation des mésappariements de bases
- Excision de bases (base excision repair= BER)
- Excision de nucléotides (nucleotide excision repair= NER)
- Recombinaison homologue

Radiolésions concernées

Cassures simples brin (CSB)
Bases mal appariées
Bases modifiées, CSB
Adduits
CDB , LMDS (?)

Le système peu fidèle:

- Religation non homologue (non homologous end-joining= NHEJ)

CDB , LMDS (?)

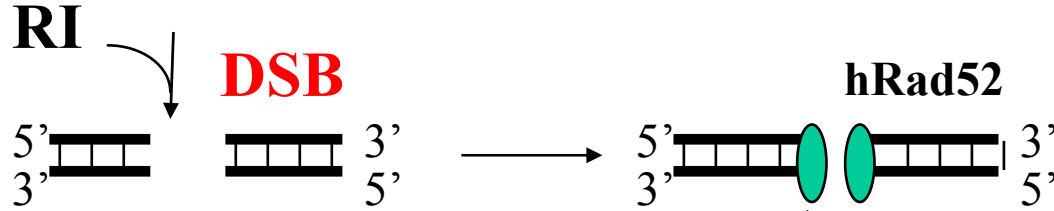
Systemes de réparation des radiolésions (1)

1. Réversion directe de certaines cassures simples brin par une enzyme, la ligase I.
2. Réparation des bases mal appariées : élimination de ces bases et insertion de bases correctes par un processus multienzymatique.
3. Excision de bases modifiées et réparation des cassures simple brin (BER):
 - élimination par excision enzymatique des bases par des glycosylases et des endonucléases (Fpg, Nth, Nfo, Anp1, Ogg1)
 - réparation de sites abasiques
 - reconnaissance enzymatique (par la Poly(ADP-ribosyl) transférase, PARP) et réparation des cassures simple brin: après façonnage des brins, insertion de nucléotides corrects (1 à 5) et ligation des brins
4. Excision de nucléotides: système très spécialisé dans l'excision des lésions encombrantes (glycols de thymine, dimères etc.) peu souvent induites après irradiation ionisante.

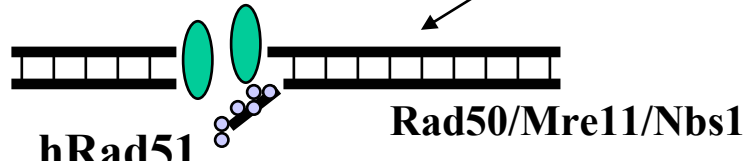
Systemes de réparation des radiolésions (2)

- 5. Réparation des cassures double brin (CDB) par recombinaison homologue:**
système fidèle nécessitant la présence de l'ADN homologue, donc dépendant de la phase du cycle cellulaire. La réparation implique
- (1) une reconnaissance des CDB par un complexe protéique (Mre11 Rad50, Nbs1)**
 - (2) une recherche d'ADN homologue (Rad51, Rad52)**
 - (3) un échange de brins d'ADN**
 - (4) une résolution des jonctions (résolvase, polymérase)**
 - (5) une ligation des brins par la ligase I**
- 6. Réparation des cassures double brin (CDB) par relication non homologue:**
système de réparation souvent fautif car il implique une relication de brins endommagés après un façonnage. La réparation implique
- (1) une reconnaissance des CDB par des protéines (Ku70/80, DNA-PKcs)**
 - (2) un façonnage**
 - (3) une ligation des brins par des enzymes (XRCC4 and ligase IV)**

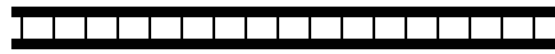
Réparation par recombinaison homologue



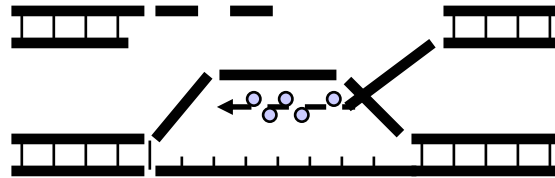
Dommage



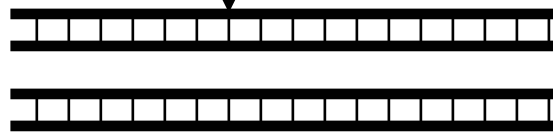
ADN homologue



**Recombinaison
homologue entre
les deux ADN**



**Ligation par
Ligase I**



Reconstitution fidèle de l'ADN

Reconnaissance



**Façonnage et recherche
d'homologie**



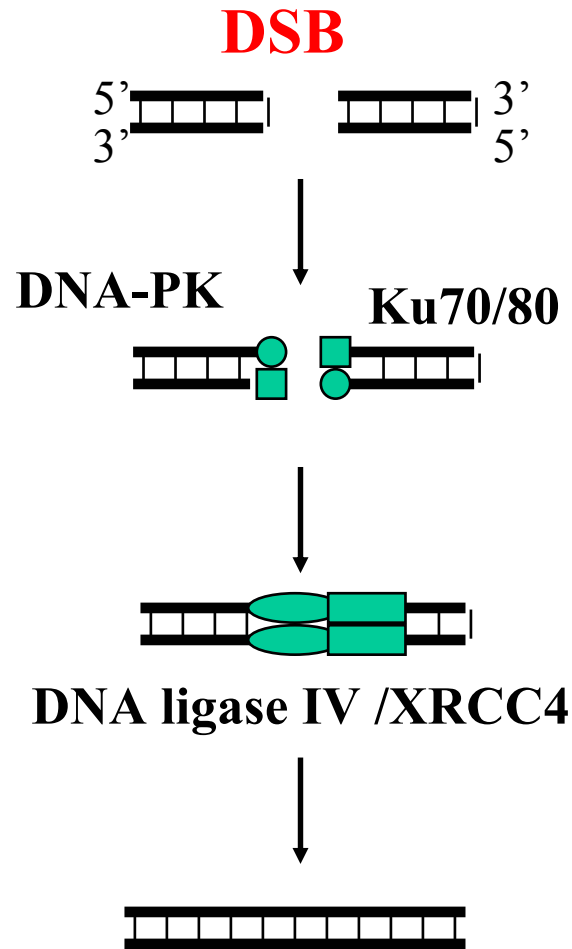
**Invasion et
échange de brins**



Ligation

Réparation de CDB par relication non homologue (NHEJ)

Radiation ionisante



Reconnaissance

Recrutement et
façonnage

Alignement

Ligation

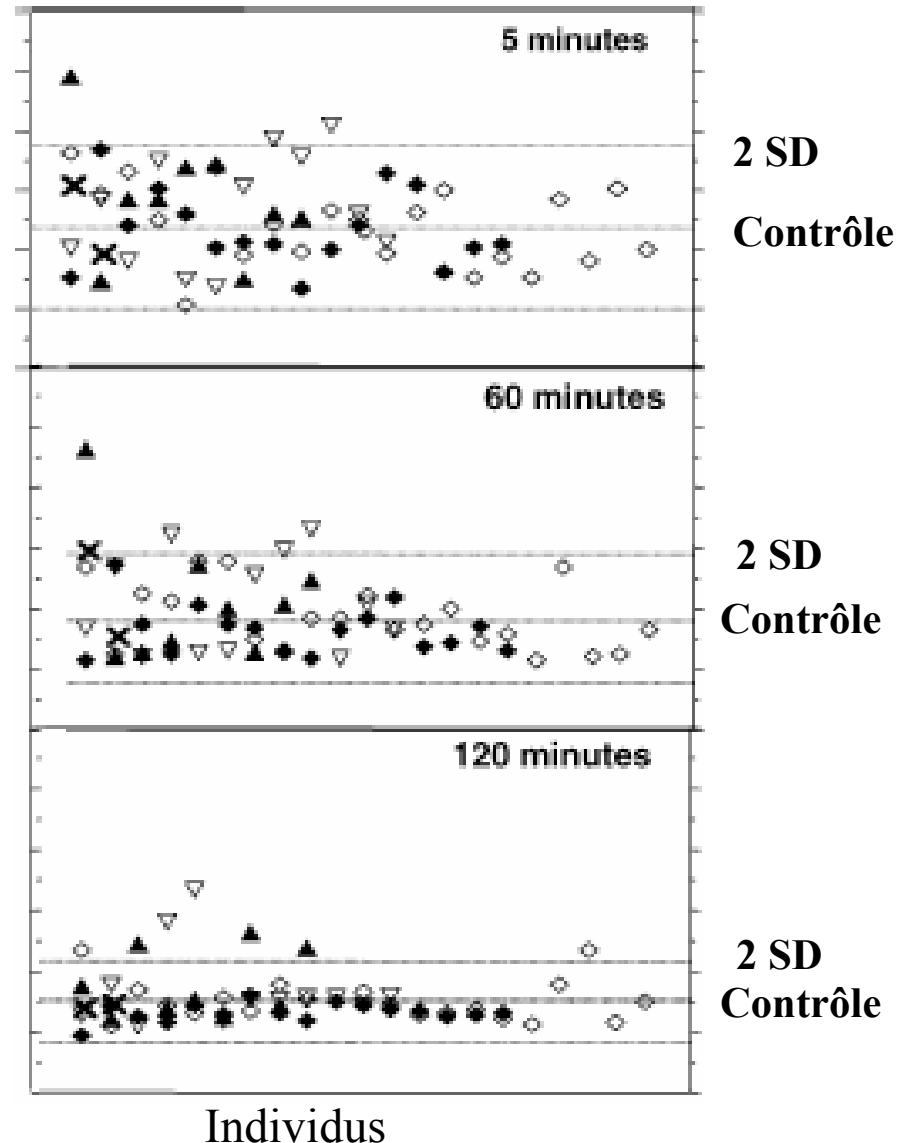
Reconstitution non fidèle de l'ADN

Variation individuelle de la capacité de réparation

(*Test de comètes: Aka P. et al. Mut. Res. 2004;556:169-181*)

- **Travailleurs du Nucléaire en Belgique montrant différents polymorphismes (variants) (Ser/Ser, Ser/Cys, Ser/Ser et Cys/Cys) du gène OGG1.**
- **OGG1 est un gène qui intervient dans la réparation des dommages oxydatifs radioinduits.**
- **Dans 71% des individus variants Ser/Cys (OGG1) les dommages radioinduits (2 Gy) n'ont pas été réparés au bout de 2h après irradiation.**

Les variants XRCC1 et XRCC3 n'ont pas d'effet.



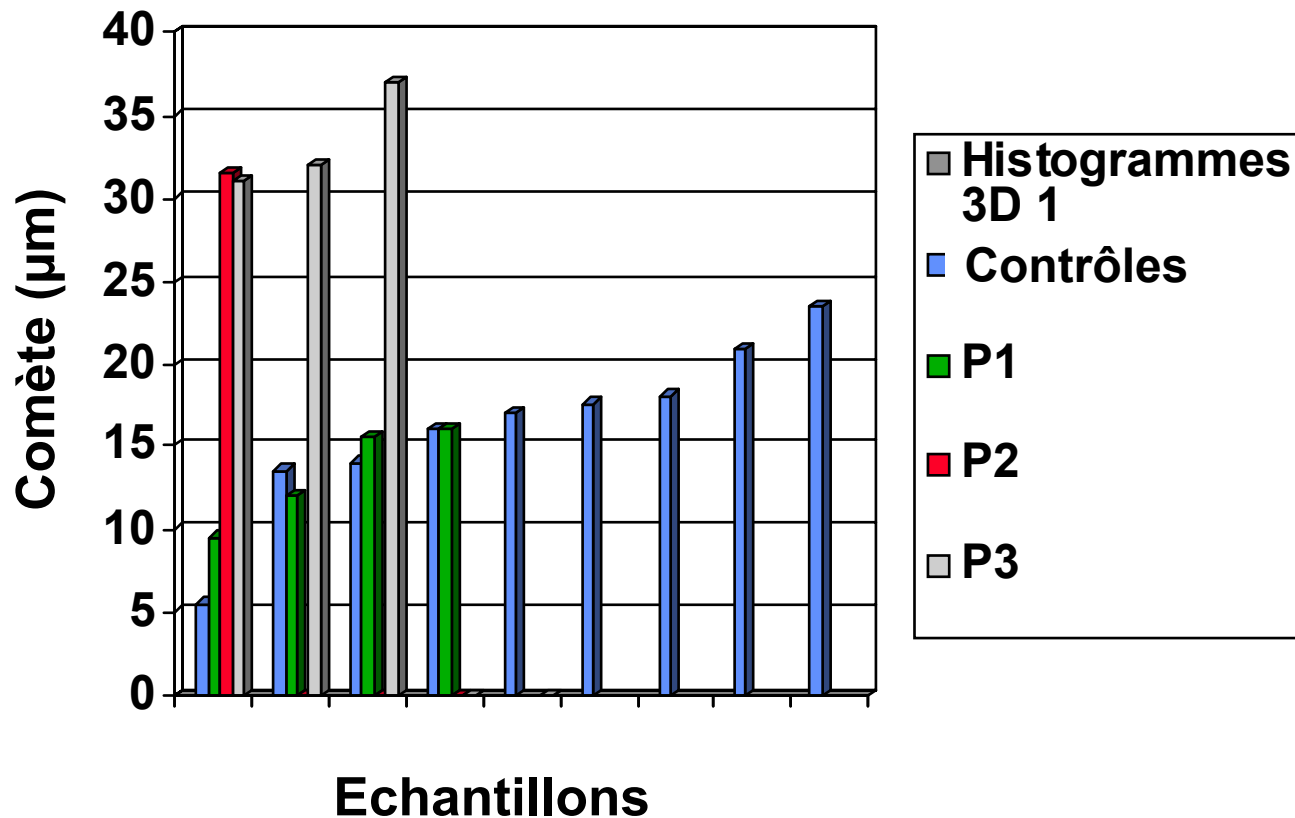
Capacité de réparation de lymphocytes (5 Gy) chez les patients hyperréactifs sous radiothérapie (Test de comètes)

Hyperréactivité



Réaction normale

Cassures de l'ADN résiduelles après 60 min



Variations de l'efficacité de la réparation

- selon le patrimoine génétique ==> *sensibilité individuelle*
(mutations ou polymorphismes de gènes de réparation dans la population)
 - > les défauts dans la signalisation ou la réparation de radiolésions sont souvent associés à une prédisposition aux cancers (ATM, BRCA1, BRCA2, LigIV ..)
 - ATM==> lymphomes, cancer du sein*
 - BRCA1/BRCA2---> cancer du sein et de l'ovaire*
 - LigIV---> déficience immunitaire*
- selon l'état de *différenciation des cellules* et des tissus
- selon l'*âge*

Conclusions (1)

Les données récentes de la recherche montrent que l'ancienne théorie de la cible et les concepts microdosimétriques ne rendent pas compte de la *complexité des réponses biologiques aux radiations ionisantes*.

- Les *dommages radioinduits s'ajoutent* aux dommages dus au métabolisme normal cellulaire. De plus, l'irradiation provoque plus de *lésions complexes* telles que les CDB et les LMDS qui constituent des lésions délétères susceptibles d'être à l'origine de *mutations, d'instabilités chromosomiques et de cancers*. Toutefois, le taux de LMDS radioinduit reste encore en discussion.

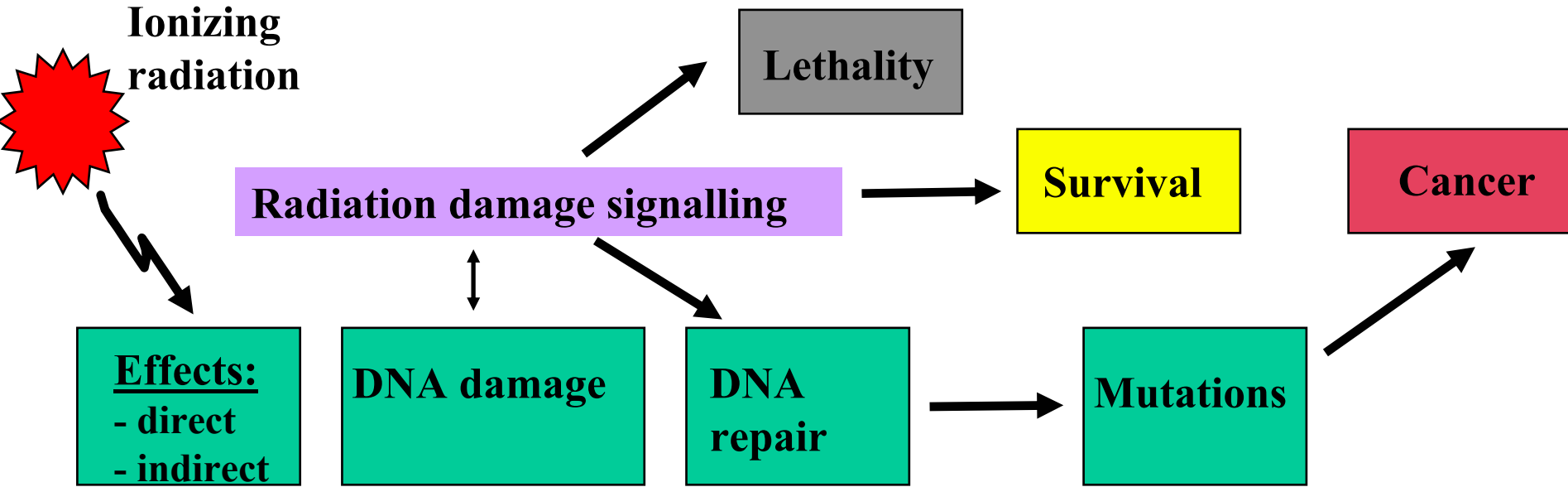
- Après irradiation une *signalisation* du dommage radioinduit est déclenchée provoquant l'activation de plusieurs gènes et protéines. Ceci conduit selon le niveau de dose et de débit de dose à *l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation ou l'apoptose*.

Conclusions (2)

- Les *mécanismes de réponse à l'irradiation ne sont pas identiques* et dépendent du niveau de dose et de débit de dose.
- La signalisation et la réparation du dommage radioinduit peut être *différente d'un individu à l'autre et peut varier selon le type cellulaire, le tissu ou l'organe.*

Les différences observées dans les mécanismes de réponses cellulaires aux radiations à différents niveaux de doses et de débits de dose sont susceptibles d'affecter les extrapolations en radioprotection.

Interaction des radiations ionisantes avec l'ADN et conséquences biologiques



**Excitation
Ionization**

**Modifications of
bases/nucleotides**

**Excision
(BER, NER)**

**-Chromosomal
aberrations
-Genetic instability
loss of heterozygosity**

**K-shell
activation**

**SSB →
DSB →**

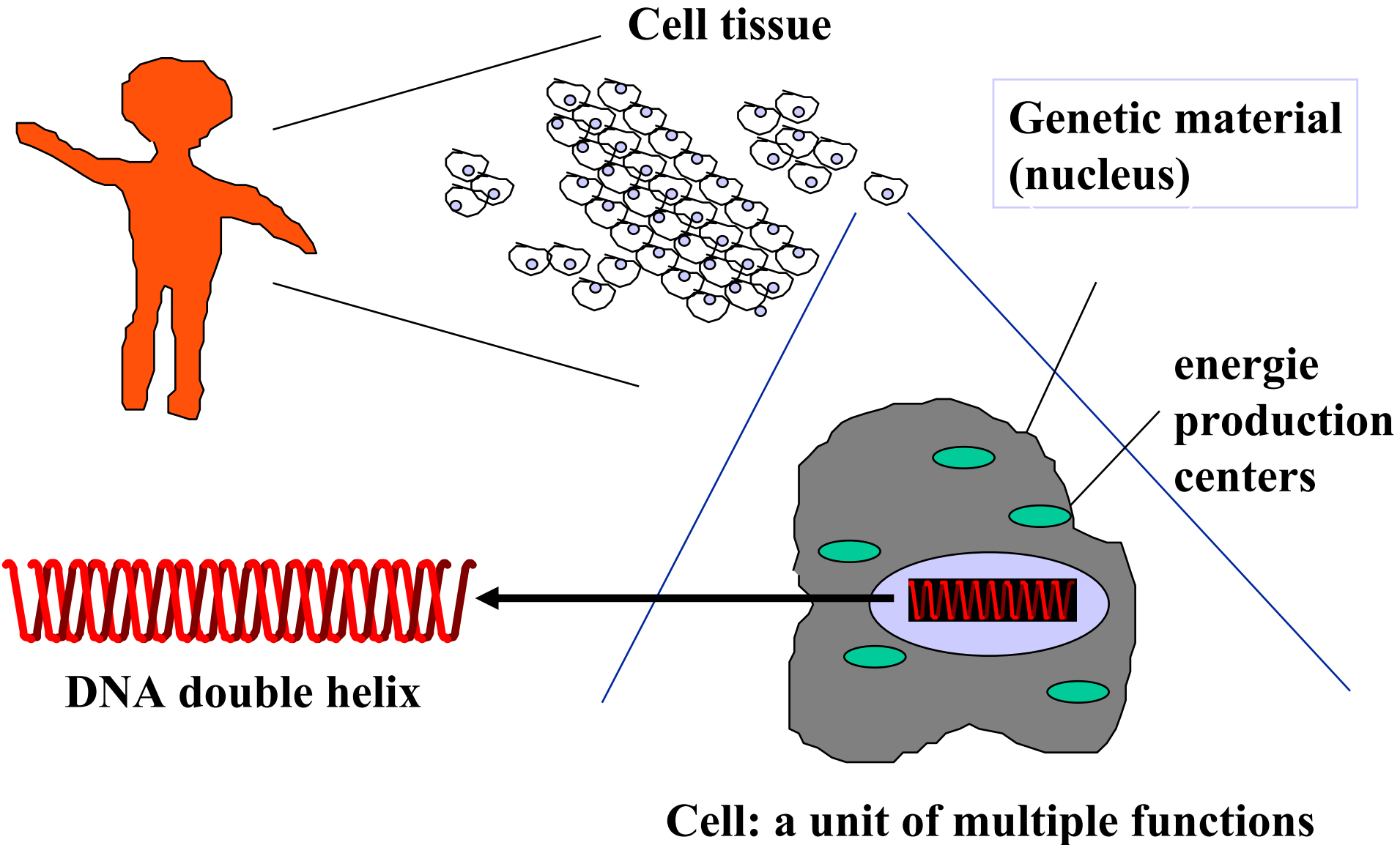
**Ligation
Homologous recombination
Non homologous end-
joining (NHEJ)***

**Dissociative
attachment
of electrons**

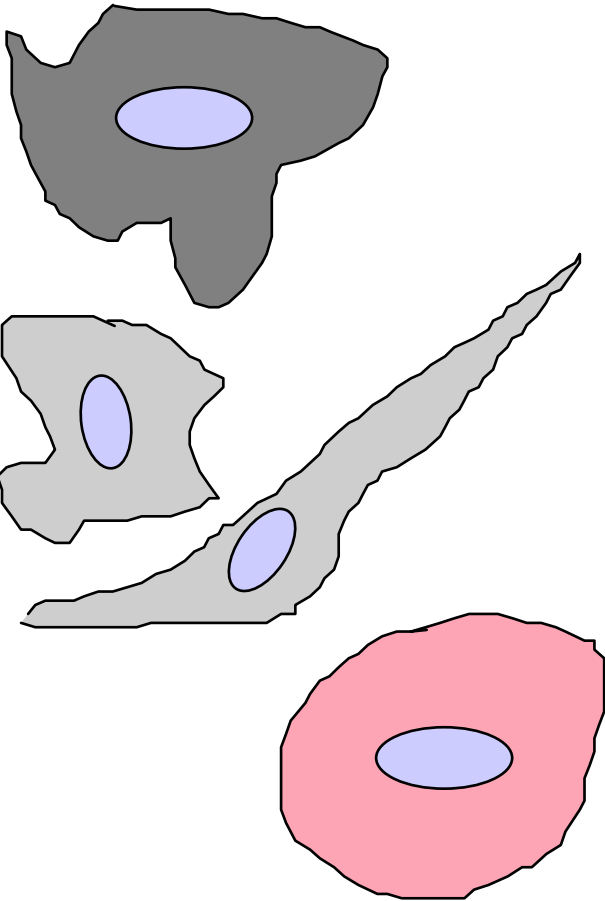
**Locally multiply
damaged sites
(LMDS) →**

??

The human body is constituted by several billions of cells
(most of them are regularly renewed)



Les fonctions cellulaires comme bases de la vie



- Production d'énergie et maintien du métabolisme de l'oxygène
- Maintien des tissus et des organes
- Prolifération cellulaire
- **Dépistage de stress interne et externe et activation des systèmes de sauvegarde**
- **Élimination des cellules fortement endommagées**
- **Conservation des caractéristiques génétiques et héréditaires**

Le métabolisme énergétique normal de la cellule produit des radicaux qui provoquent des lésions:

- > 10 000 à 55 000 cassures simple brin par jour/cellule**
- > 5000 dommages de bases par jour/cellule**
- > 8 cassures double brin par jour/cellule**
- > ? lésions multiples localisées**

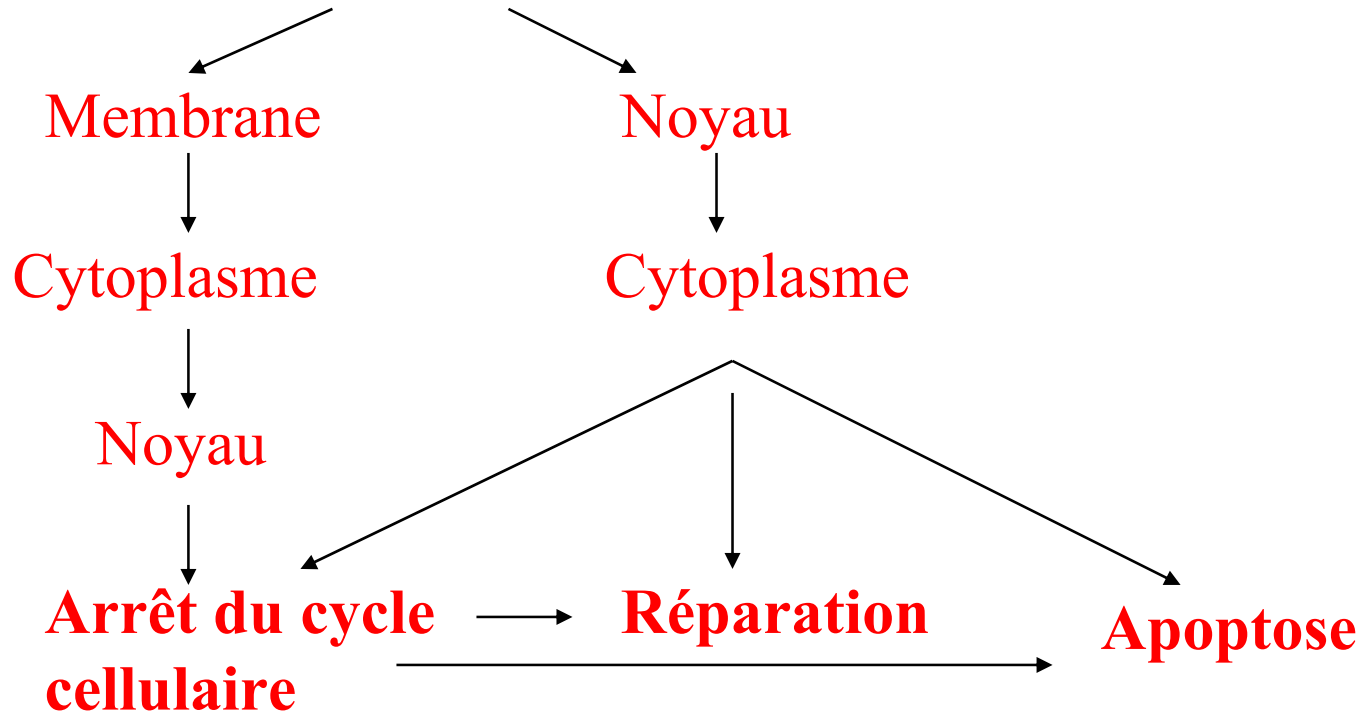
Les radiations ionisantes induisent des lésions supplémentaires

- > 1000 cassures simple brin/Gy**
- > 400 dommages de bases/Gy**
- > 40 cassures double brin/Gy**
- > 100 dommages complexes**
(Lésions multiples localisées (LMDS) et pontages ADN-protéines)

Les plus délétères sont les CDB et les LMDS !

Cellule irradiée

Cascade de signalisation



Les premières étapes dans la réponse cellulaire aux radiations

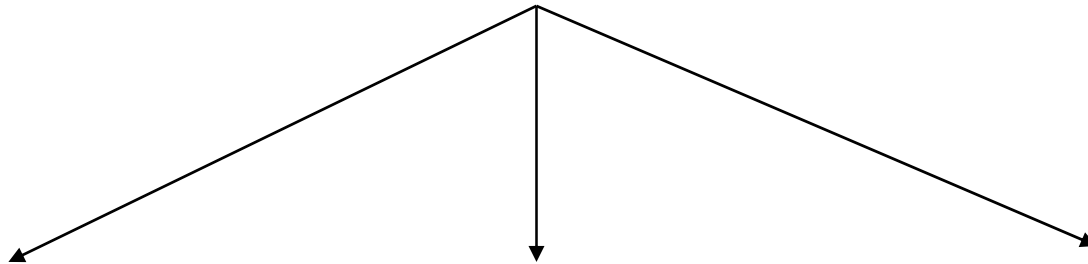
Reconnaissance du dommage (MRE11, NBS1, Rad51)



Signalisation du dommage par les protéines transmetteurs (ATM, ATR)



Activation des protéines effecteurs



Protéines des points de contrôle du cycle cellulaire

Protéines de contrôle de l'apoptose

Protéines de réparation (BRCA1, DNA-PK)