

Les nouvelles orientations en radiobiologie et radiopathologie
SFRP - 18 novembre 2004



De la physico-chimie à la radiobiologie

Les radicaux libres

Pr. Monique Gardès-Albert

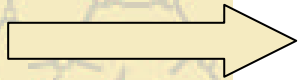


Laboratoire de Chimie-Physique
CNRS UMR 8601
Université Paris 5
45, rue des Saints Pères
75270 Paris cedex 06

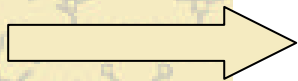


Introduction

Les radicaux libres



Intermédiaires chimiques incontournables



Générés lors de l'action des rayonnements ionisants

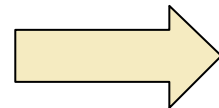
Introduction

Qu'est-ce qu'un radical libre ?

Espèce chimique

→ 1 électron célibataire

(non apparié)



Instable (très réactif)



Réaction d'échange d'un seul électron

Exemples : $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{CH}_3$

Introduction

Conséquences de la grande réactivité

Radicaux libres



Durées de vie très brèves

Quelques nanosecondes (10^{-9} s)

à

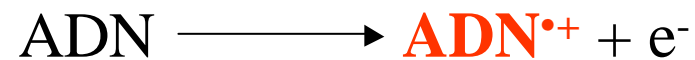
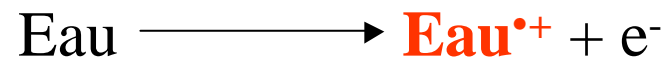
Quelques millisecondes (10^{-3} s)

Les réactions
bioradicalaires ont des
cinétiques rapides



Cibles biologiques

Première étape de l'action des rayonnements ionisants



.....



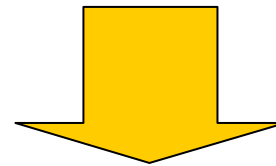
La radiolyse de l'eau

en milieu aéré

Source de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène



Susceptibles d'attaquer tous les matériaux biologiques
(*effet indirect*)



STRESS OXYDANT initié par les
rayonnements ionisants



Deux types de radicaux libres

- Addition sur les bases (80 %)
- Arrachement d'atome H sur les sucres (20 %)

Dommmages chimique stables ←

Bases oxydées

→ *En particulier la guanine*

Cassures de brins (CSB ou CDB)

→ *Evolution des radicaux sucres*

Pertes de bases

→ *Evolution des radicaux sucres*

Pontages ADN-protéines

Si pas de réparation → mutations (modification du génome), mort cellulaire

Cibles potentielles

Tous les acides aminés sont des cibles potentielles des radicaux libres

→ a.a aromatiques

Trp → Trp(OH), N-formylkynurénine, ...

Phe → Phe(OH), Phe(OH)₂, ...

Tyr → (Tyr)₂, Phe(OH)₂, ...

His → oxoHis, ...

→ a.a soufrés

Cis → Cystine

Met → MetSulfoxyde, ...

→ a.a aliphatiques

(carbonylation)

Thr → acide 2-amino-3-cetobutyrique, ...

Pro → Pro(OH), semi-aldéhyde butyrique, ...

Lys → semi-aldéhyde α-aminoadipique, ...

...

Autres dommages oxydatifs : fragmentation de la chaîne peptidique



Protéines

Modélisation du stress oxydant *in vitro*

→ **via la radiolyse de l'eau**

Problématique

Identifier et caractériser les dommages oxydatifs de protéines soumises à l'action de rayonnements ionisants

Déterminer les **mécanismes de formation** de ces modifications oxydatives

Analyse protéomique par MS

Spectrométrie de masse (MS) moléculaire

Caractérisation de la protéine

Séquence des acides aminés

Bases de données (Internet)

Modifications post-traductionnelles

Modifications chimiques

Phosphorylation

Glycosylation

Nitrosylation

Oxydation

MS supramoléculaire → maintien des liaisons non-covalentes

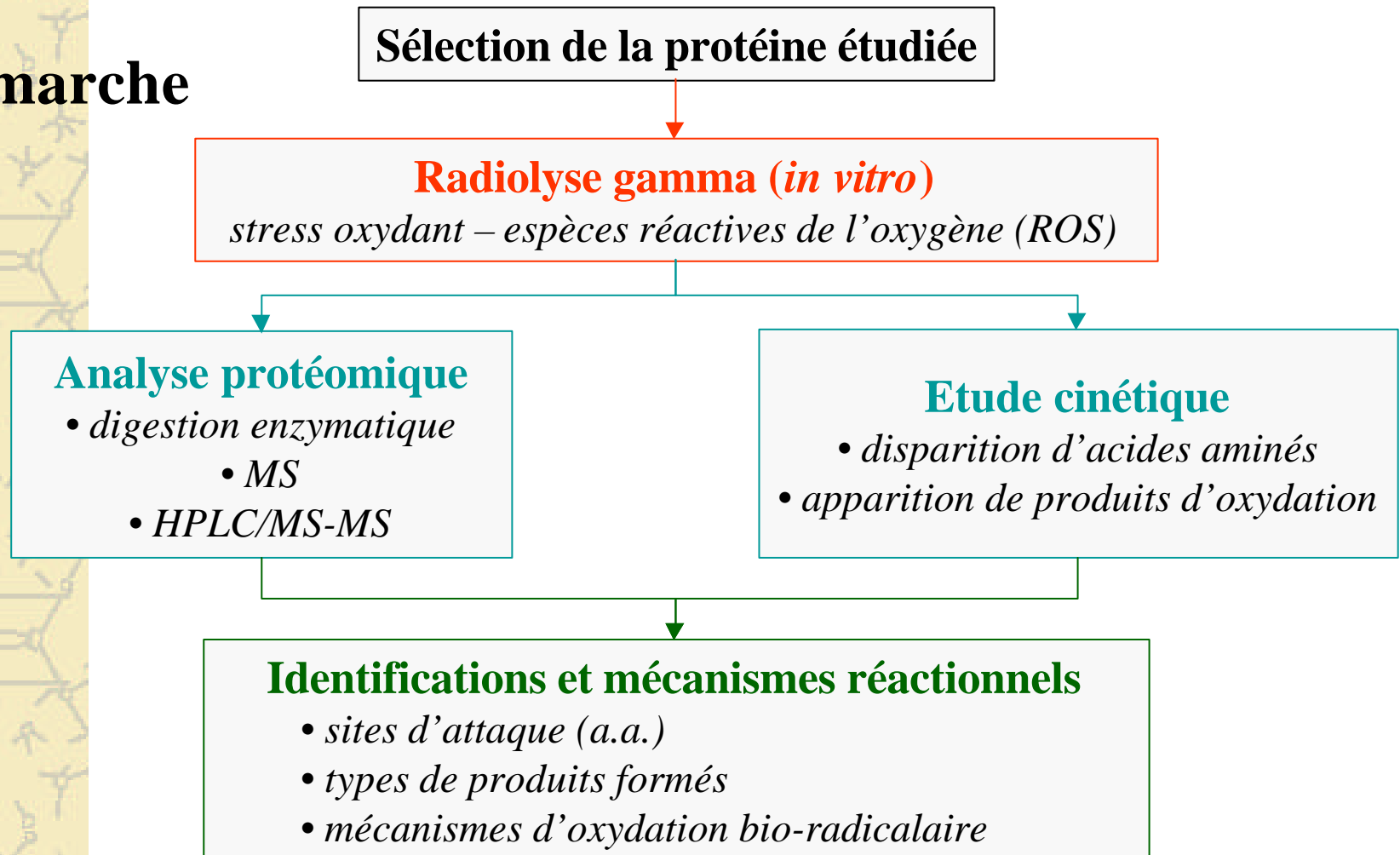
Caractérisation du complexe

Partenaires d'interaction
(Protéine, ligand, ion métallique)

Stoechiométrie

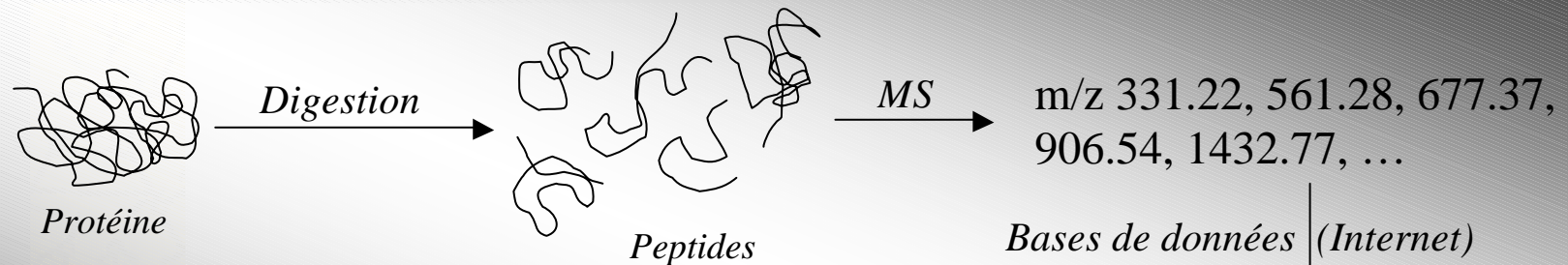
Analyse protéomique par MS

Démarche



Analyse protéomique par MS

Outils de l'analyse protéomique



Protéine non-oxydée HKTGPNLHGLFGR

Protéine oxydée HKTGPNL*HGLFGR

GKK, KATNE,
YIPGTK, MIFAGIKK,
HKTGPNLHGLFGR

Développement méthodologique

Acide(s) aminé(s) oxydé(s) + type d'oxydation

Identification précise des positions

Carbonylation, peroxydation, ...

Cytochrome c

- Protéine de la **chaîne respiratoire mitochondriale** (12 384 Da, 104 a.a.)
- Rôle important dans **l'apoptose**
- **Sensible à l'environnement lipidique**
 - Phospholipides anioniques (2 sites)

Analyses produits d'oxydation + données cinétiques = **MECANISMES**

- Carbonyles (2,4-dinitrophénylhydrazine)
- Tryptophane
- diTyrosine
- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide, coloration au bleu de coomassie (intégrité de la protéine)
- Western blot/immunorévélation (fragments)

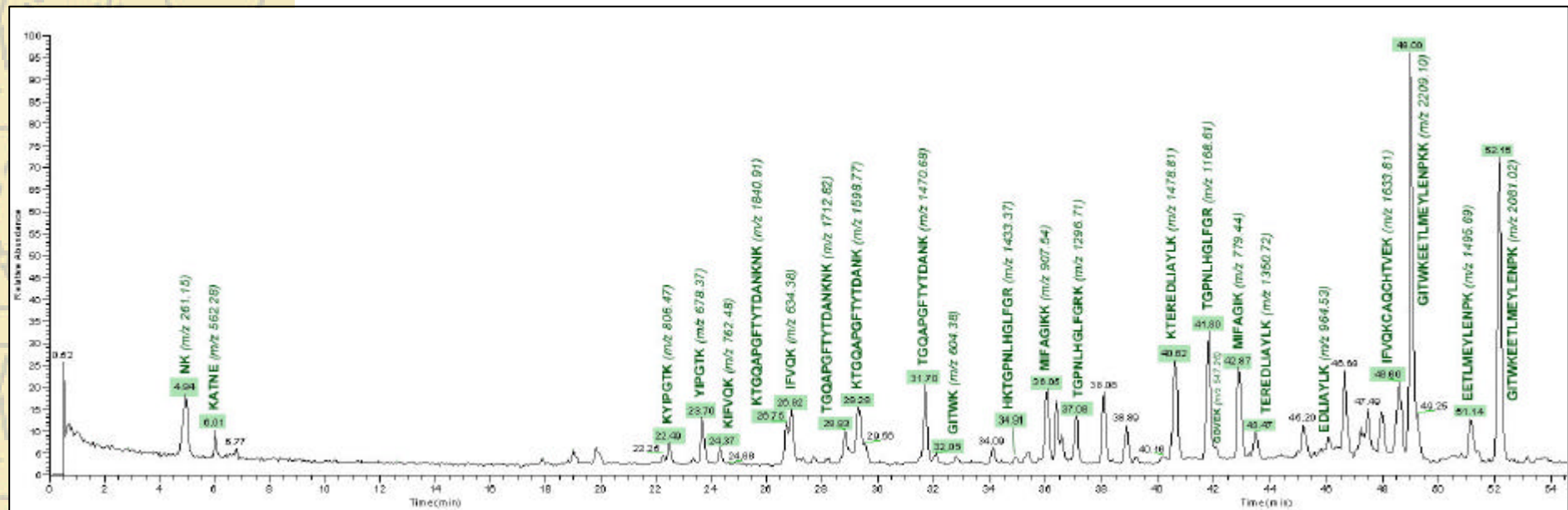
Projet

Identification et **caractérisation** (HPLC/MS-MS) : séquences peptidiques oxydées et a.a. carbonylés – Fragmentation oxydative

Cytochrome c

Chromatogramme HPLC/MS

↳ Cyt c non irradié, après digestion tryptique



23 peptides détectés → 97% de couverture de séquence

Cytochrome c

Cyt c irradié (600 Gy) → comparaison avec cyt c témoin

Détection de peptides oxydés

Peptides oxydés (600 Gy)

TGPNLHGLFGR (+16)
GITWKEETLMEYLENPK (+16)
MIFAGIKK (+16)
KTEREDLIAYLK (+16)
YIPGTK (+16)

Puis **fragmentation MS/MS** pour séquençage
et identification de l'a.a. oxydé

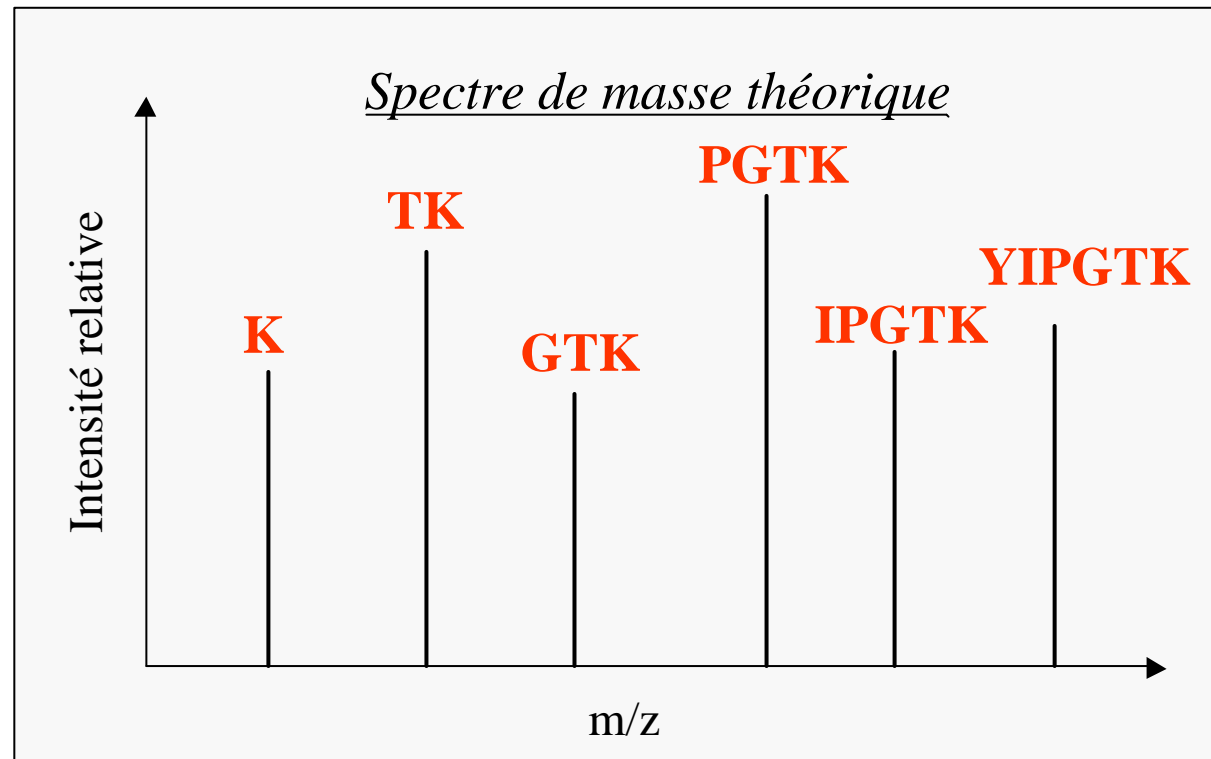
Cytochrome c

Fragmentation MS/MS

→ Coupures au niveau des **liaisons peptidiques**

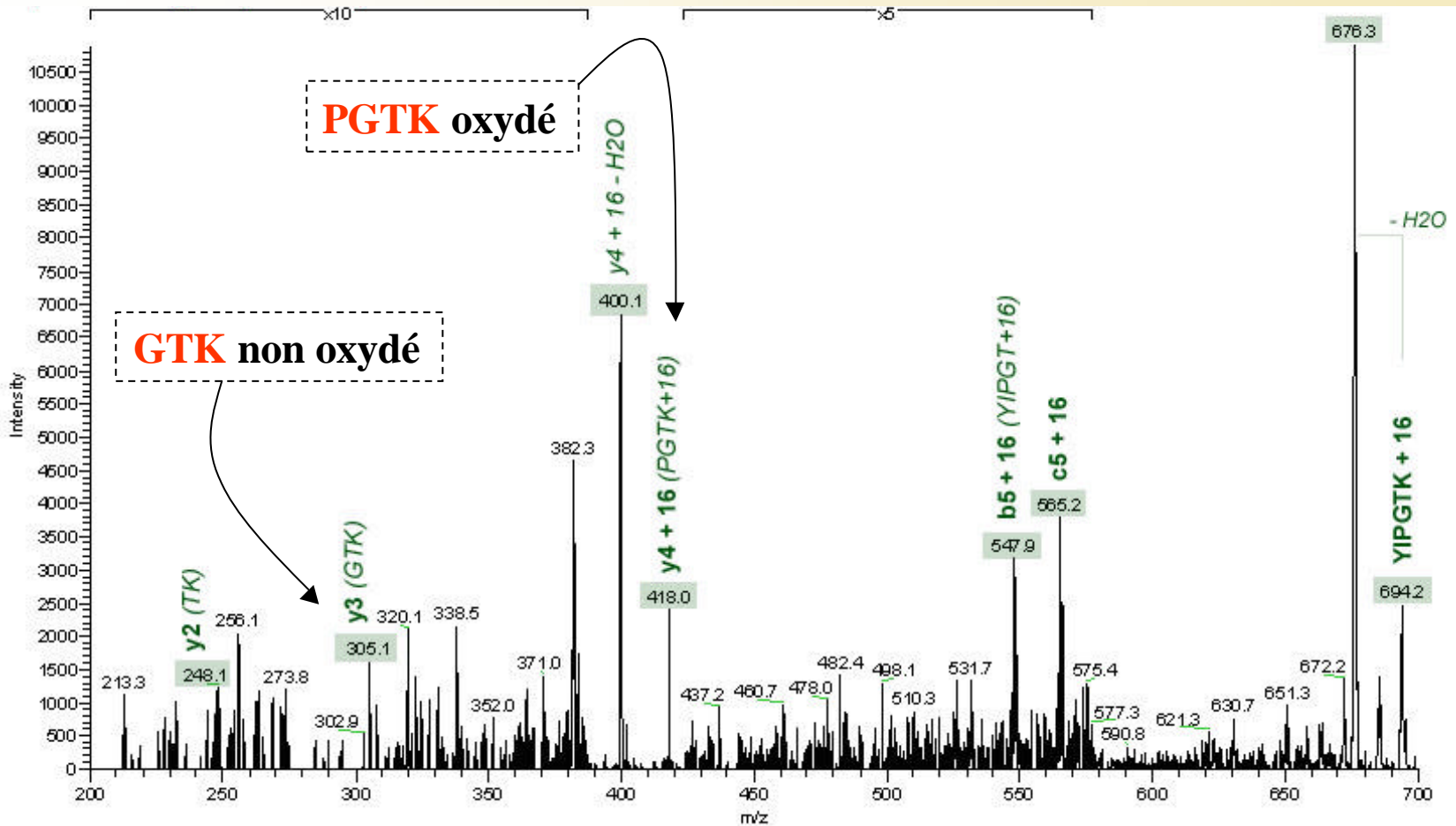
Ex : **YIPGTK**

écarts entre les pics
=
masses des a.a.



Cytochrome c

Spectre de masse YIPGTK oxydé



→ Cyt c oxydé sur la **proline (P)**

L'équipe...



UFR Biomédicale des Saints-Pères

- ✿ Monique Gardès-Albert
- ✿ Daniel Jore
- ✿ Fabrice Collin
- ✿ Samy Rémita
- ✿ Catherine Marchetti
- ✿ Heidi Vitrac
- ✿ Hadi Milane
- ✿ Hania Khouri
- ✿ Jamila Mekloufi
- ✿ Juliette Thariat



UFR de Pharmacie (collaborations)

- ✿ Dominique Bonnefont-Rousselot
- ✿ Patrice Théron
- ✿ Alain Legrand