

# Quel devenir pour une cellule irradiée: survie ou apoptose ?

Evelyne SAGE

CNRS UMR3348  
Institut Curie,  
Université de Paris-Sud (XI)  
Orsay

[Evelyne.Sage@curie.fr](mailto:Evelyne.Sage@curie.fr)

**Société Française de RadioProtection (SFRP)**  
*Recherche et Santé*  
**Journée Faibles Doses**  
Paris, 19 mars 2013

# Risques de cancer associés aux faibles doses de radiation

---

Dommmages de d'ADN → mutations → cancer

la quantité de dommage est proportionnelle à la dose absorbée  
la nature des dommages est la même à faible et forte dose

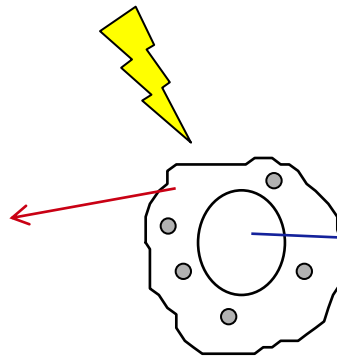
**Les doses les plus faibles soit-elles peuvent accroître la probabilité de développer un cancer**

**Idée mise à l'épreuve (challenged) :**

des expositions aux faibles doses de radiation peuvent-elles avoir un effet bénéfique pour la santé : hormésis

La persistance d'une instabilité génomique transmissible d'une cellule à l'autre et le phénomène de bystander peuvent-ils ou non augmenter le risque de cancer au delà de l'extrapolation du modèle LNT (Little Mutat res 2010)

**Stress oxydatif:**  
Dommages moléculaires  
(lipides, protéines) et  
aux mitochondries



**ADN**

ionisations directes et  
effet indirect via ROS

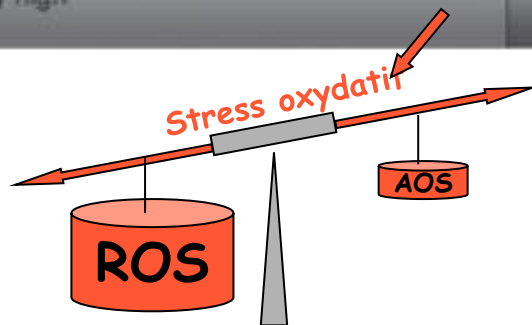
Les niveaux de dommages et de  
réparation conditionnent le devenir  
de la cellule irradiée

**Faibles doses :**  
attention à ne pas  
faire les erreurs de  
l'apprenti sorcier

*Szumiel IJRB 2012*

10 mGy

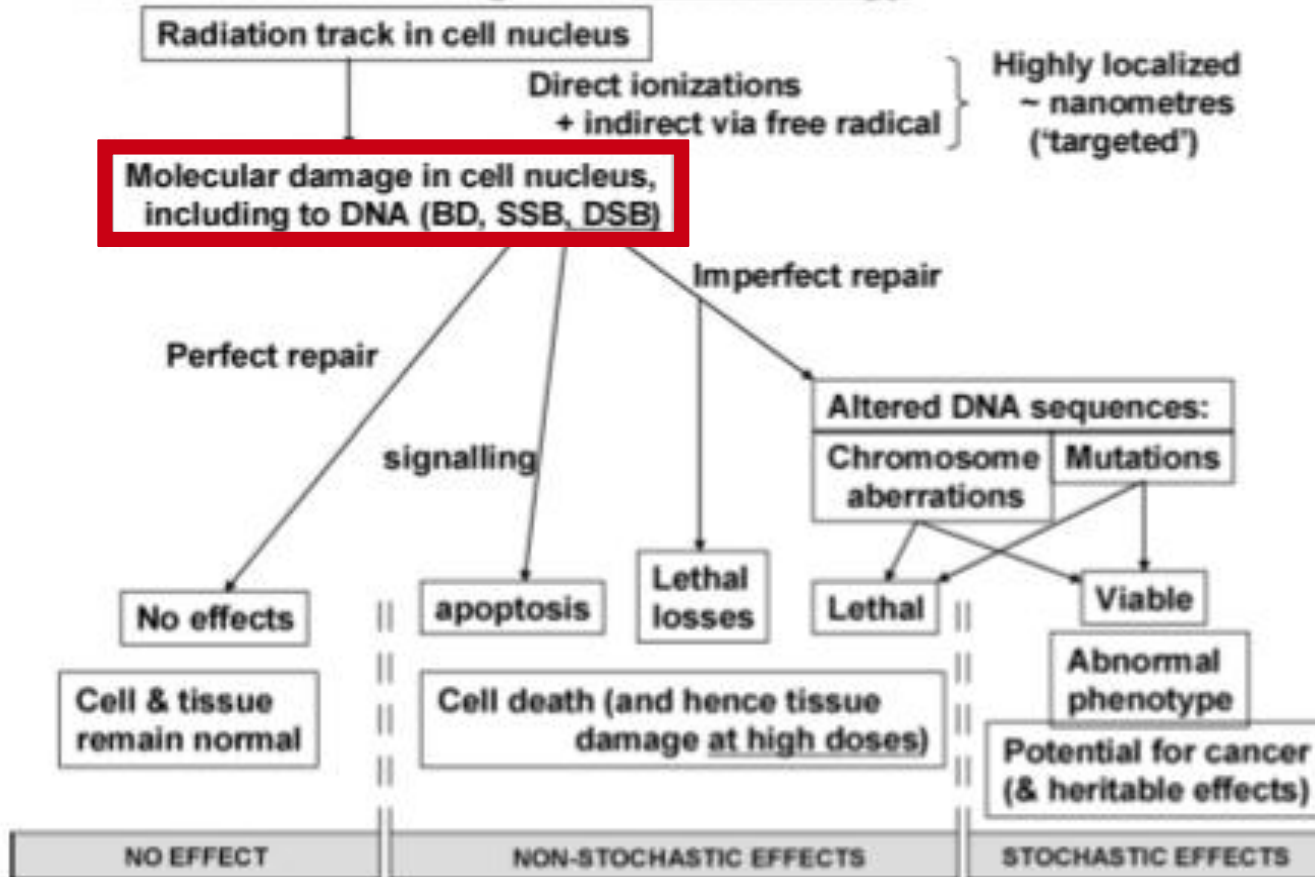
CELLULAR ROS LEVEL	SIGNALLING ROS	EXCESSIVE (SURPLUS) ROS
	<b>STRESS</b>	<b>MOLECULAR LESIONS</b>
Low	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stimulated proliferation</li> <li>• Signalling</li> </ul>	
Medium	Adaptive processes: <ul style="list-style-type: none"> <li>• stimulated transcription of the antioxidant defence genes;</li> <li>• autophagy induction</li> </ul>	
High	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apoptosis</li> <li>• Senescence</li> </ul>	
Very high		



Une balance entre les fonctions de  
signaling et de défense des ROS et  
ses effets endommageants décide  
du devenir de la cellule irradiée

# Paradigme pour les risques associés aux radiations et à la radioprotection

## Conventional Paradigm for Radiobiology:



Etat des connaissances sur les phénomènes radiobiologiques qui ne suivent pas ce paradigme encore insuffisant pour en formuler de nouveaux

# Dommages de l'ADN et leur réparation

Types of damage	Number of radio-induced damage per Gy per cell
Oxidized bases	2000
Single strand breaks	1000
Abasic sites	250
Double strand breaks	40
DNA-protein crosslinks	150
Clustered lesions	130 *

dommages oxydatifs isolés:  
réparation rapide et fidèle  
qqmin à 2-3 hrs  
par BER

\* For X or  $\gamma$  rays :

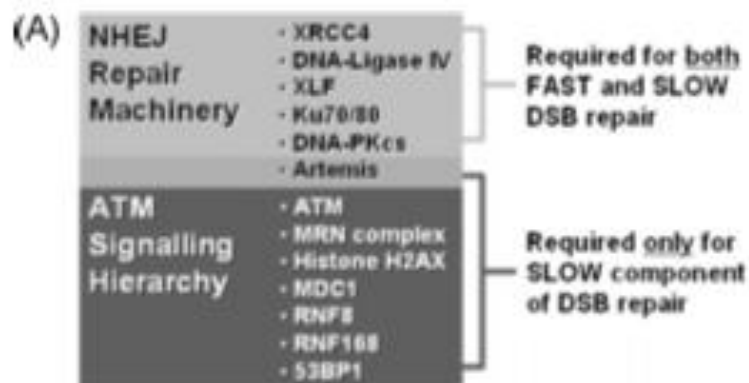
1 DSB / 2 oxybase clusters / 1.3 abasic cluster  
augmentent avec le TEL

(Burkart W et al. *CR Acad Sci III* 1999; 322:89-101;  
Ward JF *Prog Nucl Acids Res Mol Biol.* 1988; 35: 95-125)

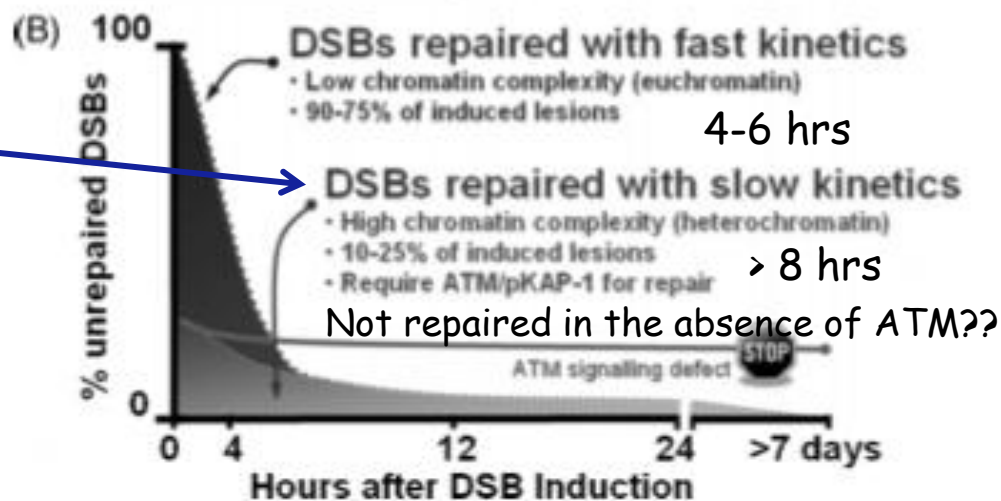
\* Georgakilas, ...Sutherland, 2004 *NAR* 32, 5609-5620

# Dommmages de l'ADN et leur réparation

Types of damage	Number of radio-induced damage per Gy per cell
Oxidized bases	2000
Single strand breaks	1000
Abasic sites	250
Double strand breaks	40
DNA-protein crosslinks	150
Clustered lesions	130 *



DSB complexes  
DSB clusters



(Burkart W et al. CR Acad Sci III 1999; 322:89-; Ward JF Prog Nucl Acids Res Mol Biol. 1988; 35: 5

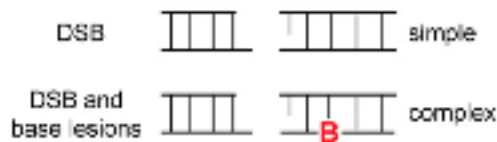
\* Georgakilas, ...Sutherland, 2004 NAR 32, 5609.

Godaarzi, Jeggo, Löbrich 2010 DNA repair 9(12) 1273- 1282

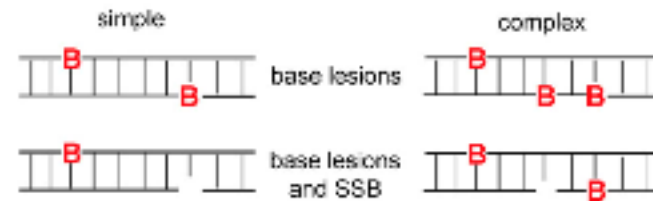
# Clustered lesions or Multiply Damaged Sites (MDS):

Accumulation of DNA lesions ( $\geq 2$ ), including base damage, abasic sites and strand breaks distributed on both strands within 1 or 2 helix turns, produced by a single radiation track

## DSB-clustered DNA damage



## non-DSB-clustered DNA damage



*Eccles et al 2011*

In cultured human cells, oxidized base and abasic clusters are slowly repaired compared to DSB

Complex DSB are poorly repaired

Persistent clustered DNA lesions detected in mouse skin 20 weeks after irradiation\*

**They may lead to mutations, chromosomal instability and cell death**

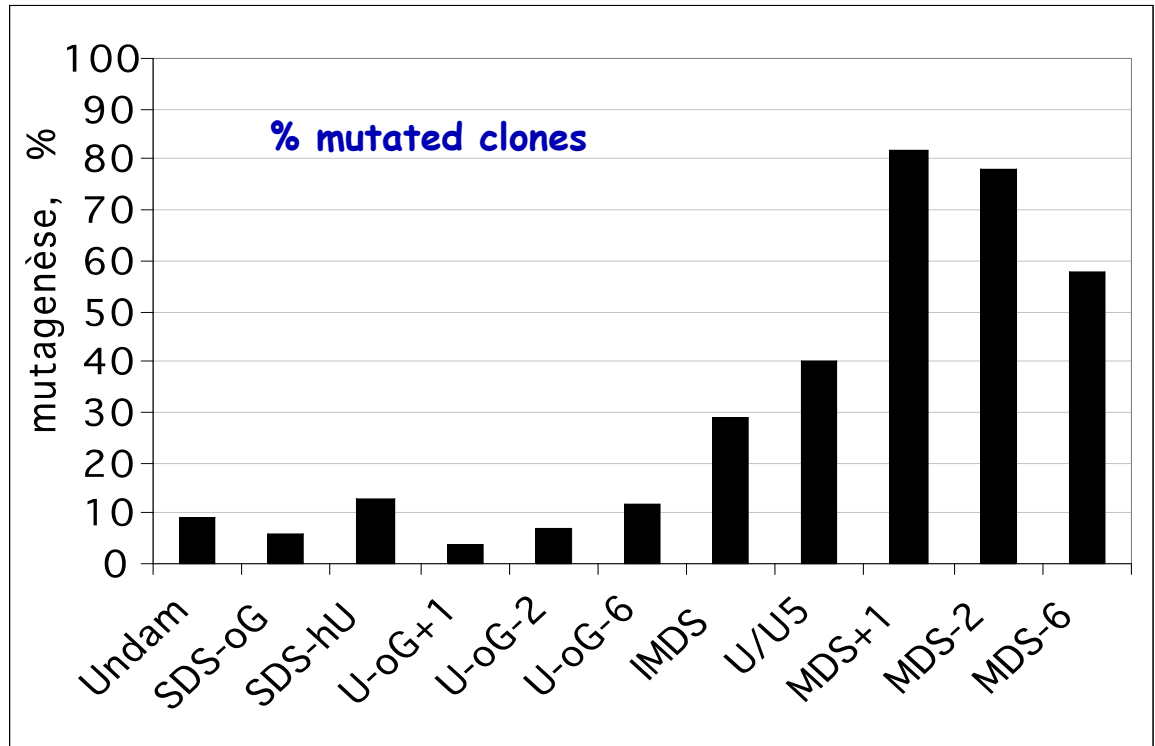
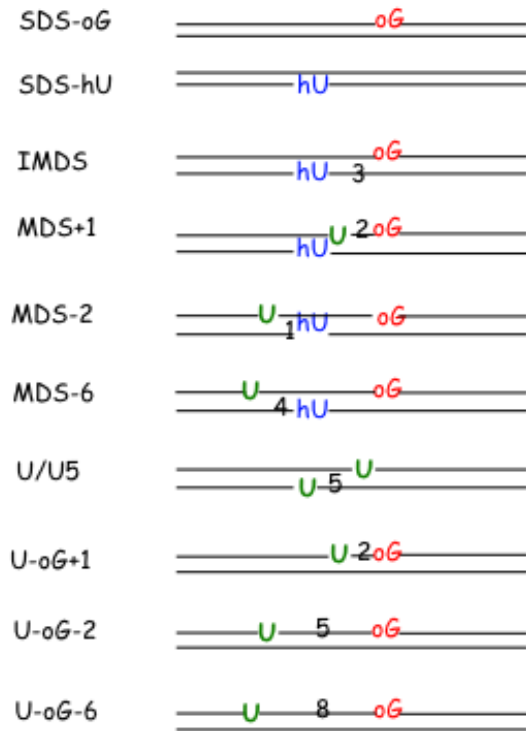
*For review :*

*L Eccles, P O'Neill, M Lomax, Mutat. Res.711, 134-141, 2011*

*E Sage & L Harrison, Mutat. Res.711, 123-133, 2011*

*\* Gollapalle et al, Radiat Res 167, 207-2016, 2007*

# Mutagenesis is drastically enhanced at MDS



Human cells MRC5-VI

- 2 lesions on same strand (U-oG) : poorly mutagenic
- 2 opposite lesions (IMDS, U/U) : mutation level more than additive (x 1.5-2)
- 3 opposite lesions (MDS): mutagenesis x3-4 but decreases when distance between lesions increase (MDS-6)

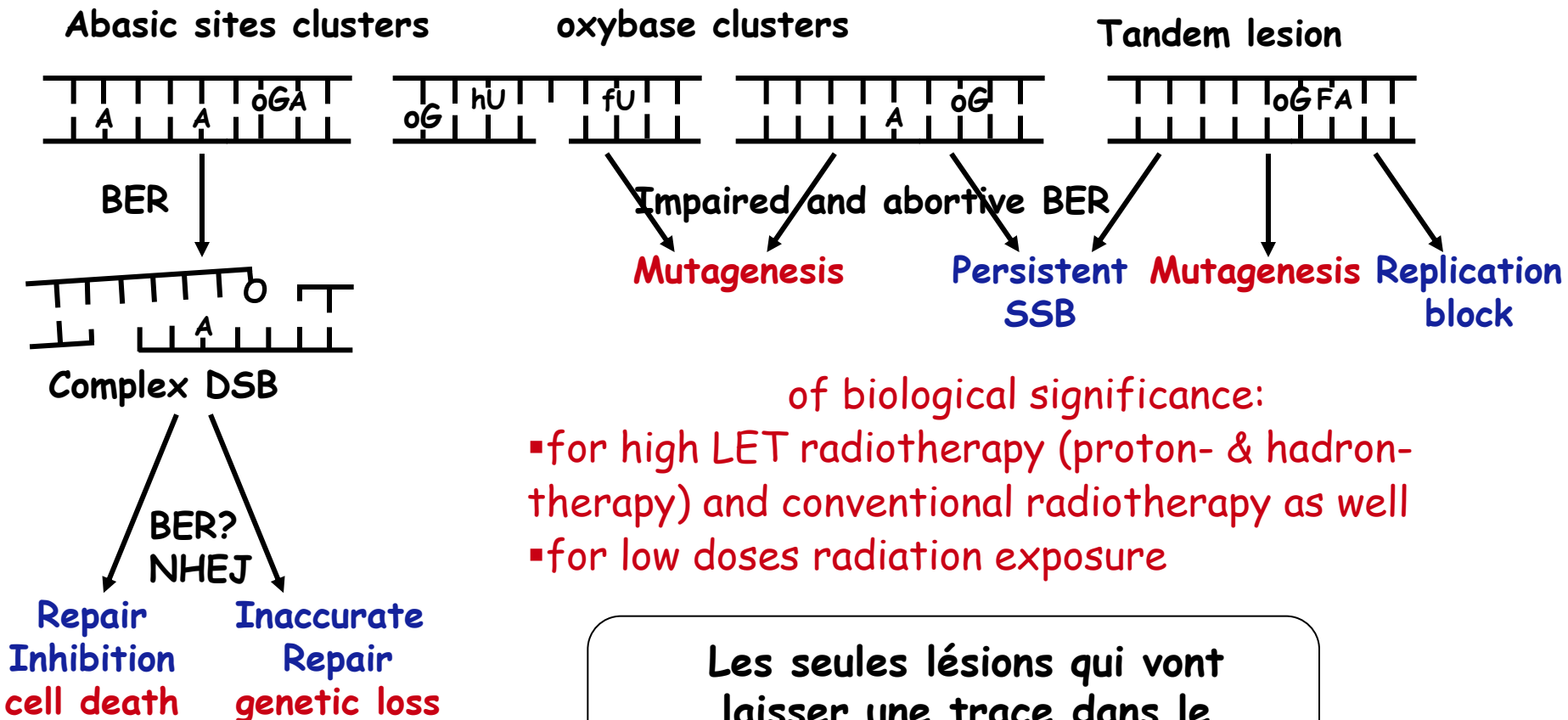
**Up to 80% of mutated clones for MDS**

*Sedletska & Sage to be published*



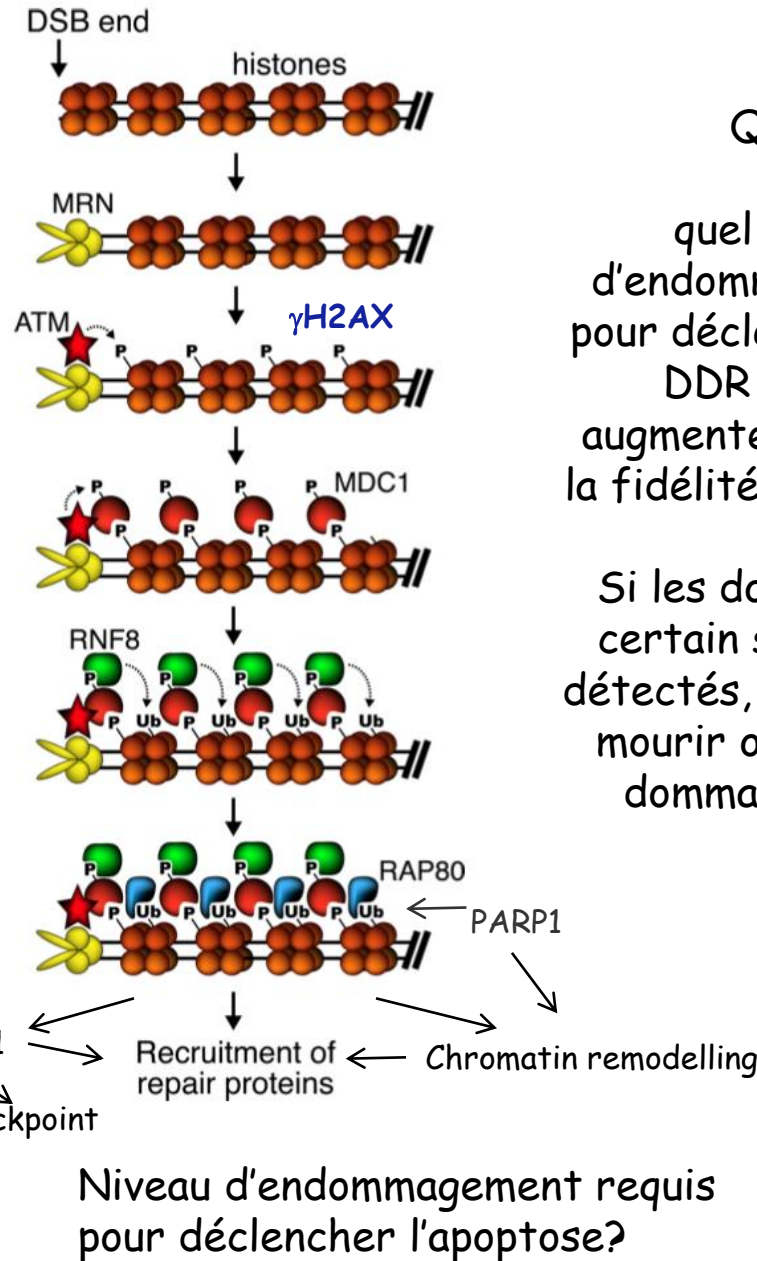
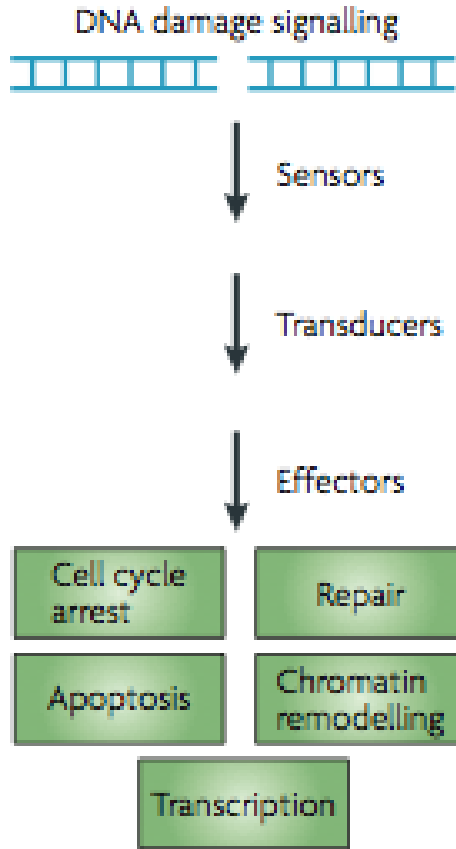
# More generally: biological consequences of clustered DNA damage in eukaryotes

## Non-DSB Bistranded Lesion



Les seules lésions qui vont  
laisser une trace dans le  
génomme à faible dose !

# Réponse cellulaire aux dommages (DSB)



Questions:

quel est le niveau d'endommagement requis pour déclencher la réponse DDR et donc pour augmenter l'efficacité et la fidélité de la réparation?

Si les dommages sous un certain seuil ne sont pas détectés, la cellule pourrait mourir ou accumuler des dommages génétiques

# Induction and repair of DSB at low doses of X rays

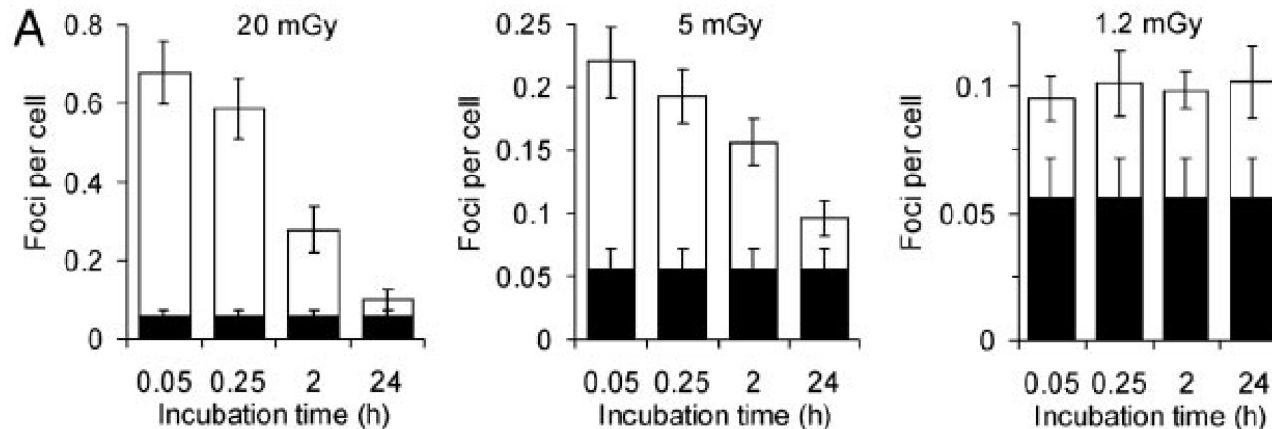


$\gamma$ -H2AX foci

at 2 Gy, 200 mGy, 20 mGy : efficient repair

at 5 mGy repair is slower and less efficient

at **1,2 mGy, 0.1 DSB formed per cell**. (1 every 10 cells) : **no repair** at 24h and persist up to 7 days, then cell death by apoptosis



Background in the absence of irradiation : 0.05 DSB per cell

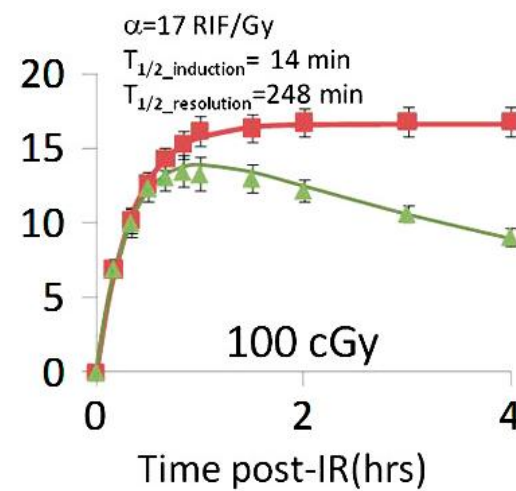
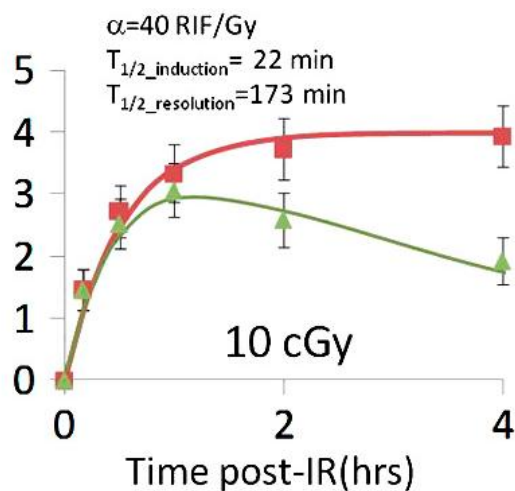
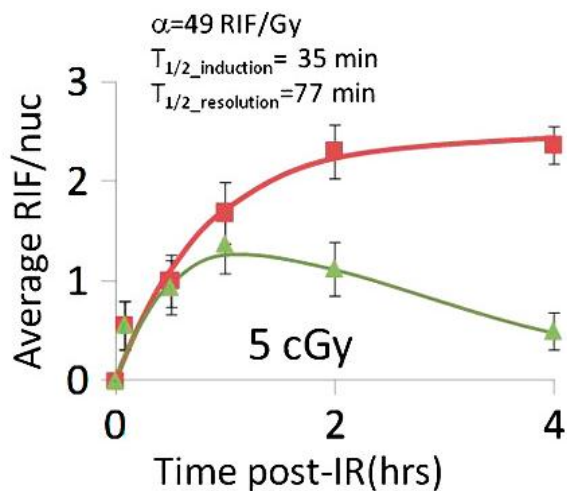
**At very low dose no repair (no signalling, thus cell death?)**

**Réponse DDR dès 1 mGy détectée par les foyers  $\gamma$ -H2AX**

# Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells

Publication de Costes et col : Neumaier et al PNAS 109, jan 2012, 443-448

RX 0.1 à 1 Gy - MCF10A - foyers (RIF) 53BP1 - time-lapse



## Conclusions

The total number of RIF was not proportional to dose, was relatively lower at higher doses (73 vs 28 RIF/Gy at 0.1 and 1 Gy respectively)

RIF induced at low doses appeared more slowly and were resolved faster than after 1Gy

Average RIF diameter of 0.64  $\mu\text{m}$  for both high & low doses

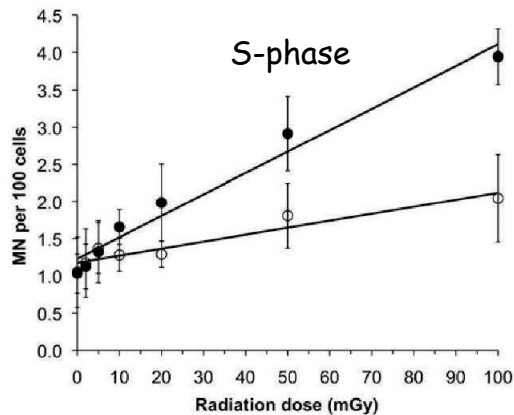


# Altérations génétiques - instabilité génomique

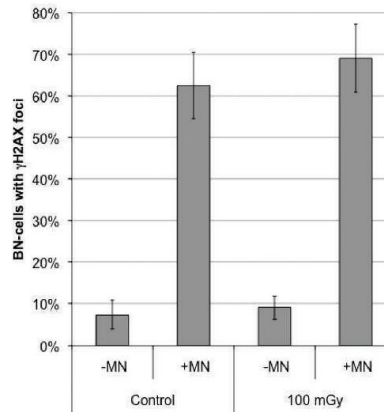
No threshold for the induction of chromosomal damage at clinically relevant low doses of X-Rays (2 - 100 mGy)

micronoyaux (MN)  
après 1<sup>ère</sup> mitose

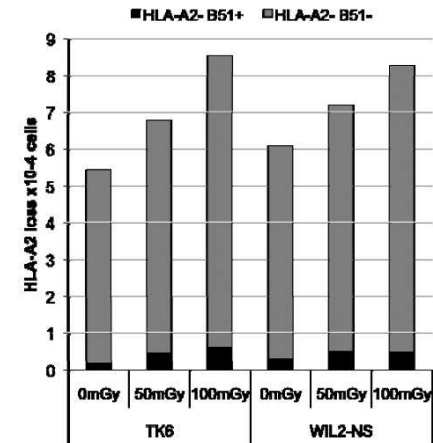
Cellules destinées à mourir? Pas sûr!



MN avec foci  $\gamma$ H2AX  
( = DSB non-réparées)



LOH (up to 1 Mb)  
après plusieurs divisions



0.5% des DSB ne seraient pas refermées par la machinerie de réparation, quelque soit la dose (contexte chromatinien ou complexité des lésions multiples)

Perte d'hétérozygotie dans des cellules viables !

**Une fraction des cellules endommagées par de faibles doses de radiation peut survivre au prix d'un RISQUE accru d'instabilité génomique qui pourrait conduire par ex à une perte d'hétérozygotie de gènes suppresseurs de tumeur**

## Anomalies chromosomiques, détectées par FISH, et aneuploidie apparaissent plusieurs générations après 50 - 500 mGy de rayons X type mammographie, dans des cellules porteuses de mutation BRCA1 et BRCA2

---

*Frankenberg-Schwager & Gregus IJRB 88, 846 (2012)*

Pour des doses  $> 0.5$  Gy, ces anomalies ont disparu après plusieurs doublement, par élimination de la population proliférante, ce qui n'est pas le cas pour des doses  $< 0.5$  Gy !

Effets retardés de l'instabilité chromosomique dans la descendance des cellules humaines hétérozygotes pour BRCA après exposition aux faibles doses mais pas aux doses élevées de R-X

*Les R-X de type mammographie déposent 4-5 fois plus de dose/hit que les rayons  $\gamma$   $^{60}\text{Co}$*

**Les faibles doses sont plus efficaces pour induire une instabilité génomique et les faibles doses de radiation de haut TEL sont plus efficaces que les radiations de bas TEL**

# Les altérations épigénétiques, méthylation de l'ADN et expression des miRNA après irradiation à faible et haut TEL (0,1-1 Gy)

Sur cellules hydrides hamster/homme; R-X 2 keV/ $\mu\text{m}$  0,5 - 1 Gy; Fe 150 keV/ $\mu\text{m}$  0,1 - 1 Gy  
Analyse dans clones chromosomiquement stables (16-20 générations)

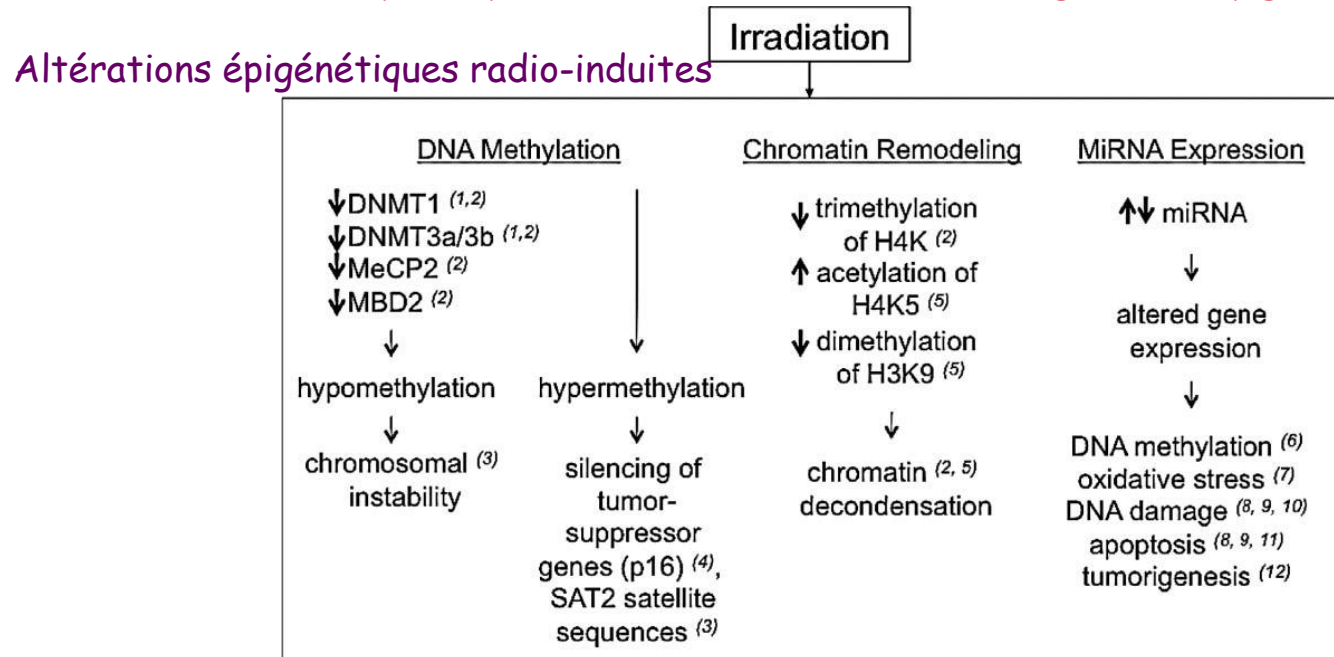
Endpoints : méthylation locus spécifique et à CpG et non-CpG et expression de miRNA

hypo > hyperméthylation et tendances différentes entre haut et faible TEL, (dose-dépendance?)

miRNA altérés impliqués dans remodelage de la chromatine, DNA méthylation, apoptose

Un plus grand nombre de miRNA altérés après R-X (6) que radiation haut TEL (3)

**ROS et stress oxydant pourraient contribuer à ces changements épigénétiques**



Dans cellules cancéreuses, dérégulations de miRNA observées !

...le lien manquant pour comprendre l'instabilité génétique et la cancérogénèse radio-induites ???

**Sage 's team**

**Lab. Biology of Radiation**

**CNRS UMR 3348, Institut Curie, Univ. Paris-Sud XI, Orsay (France)**

**Yuliya Sedletska, post-doc**

Stanislav Kozmin, post-doc

Séverine Eon-Marchais, post-doc

Grégory Eot-Houllier, doc

Marta Gonera, doc

Anne Reynaud-Angelin, assistant

**Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques  
INAC/SCIB, CEA-UJF, CEA-Grenoble (France)**

Jean Luc Ravanat

Didier Gasparutto

**Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, CEA, Fontenay aux  
Roses (France)**

Pablo Radicella

**Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Orléans (France)**

Bertrand Castaing

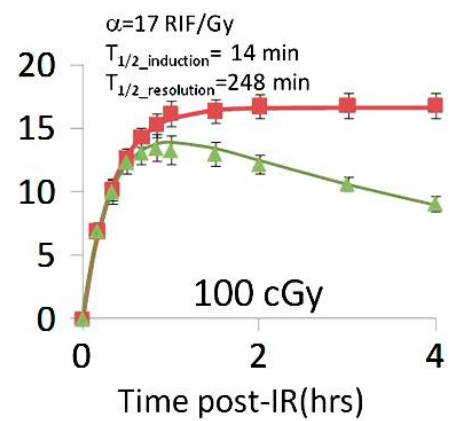
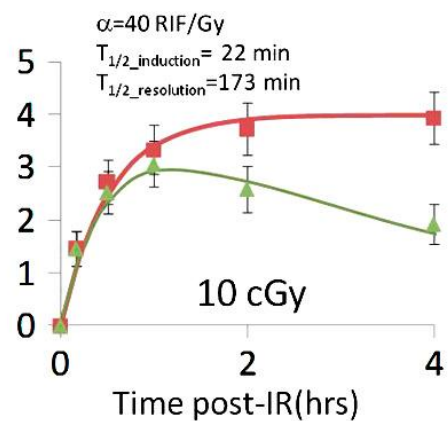
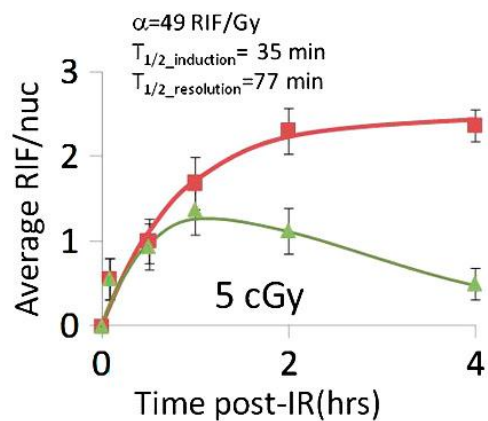
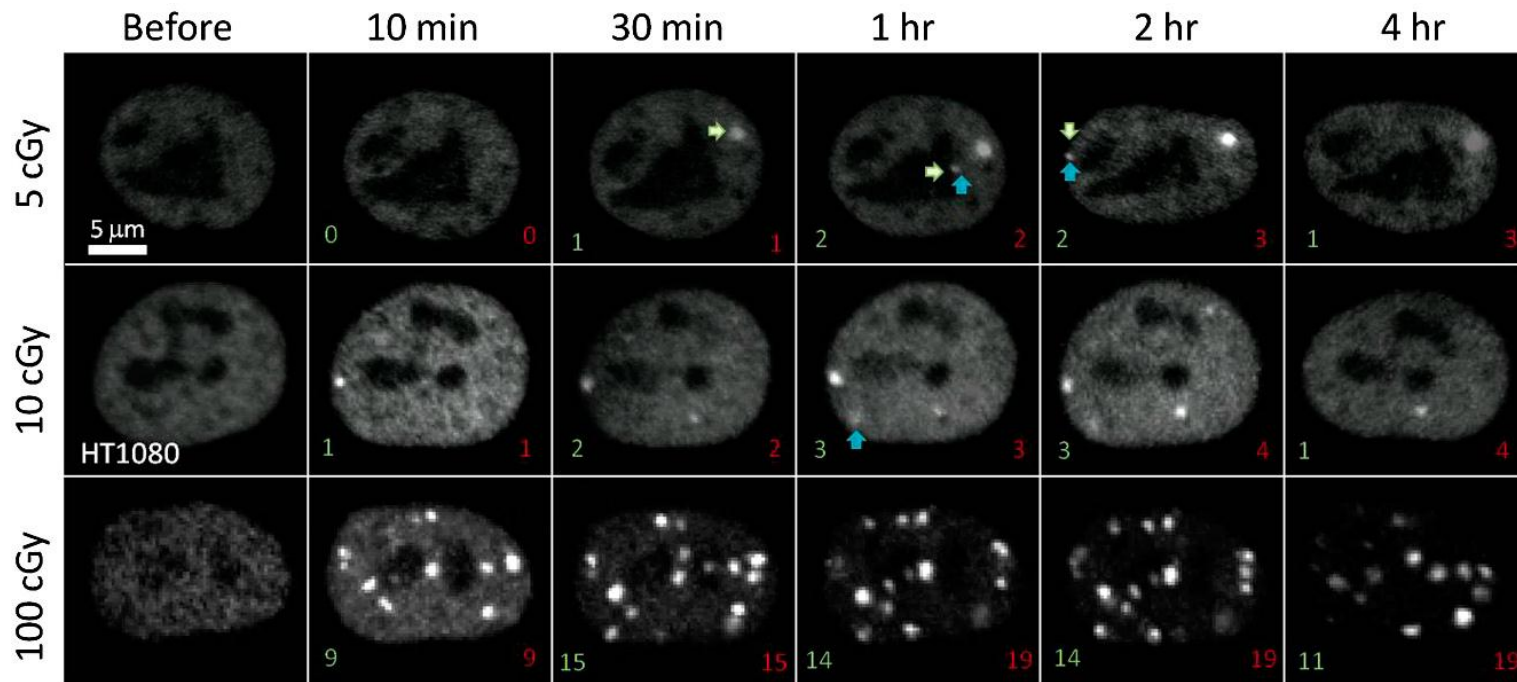
Serge Boiteux



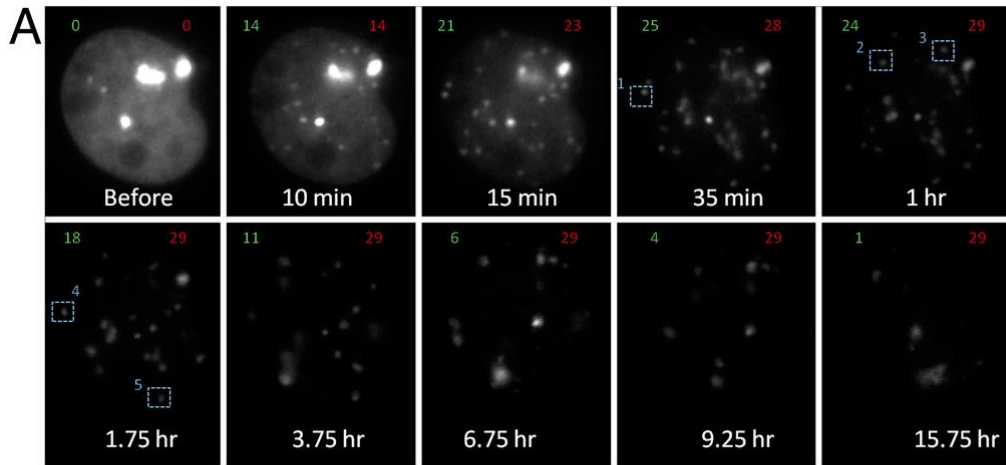
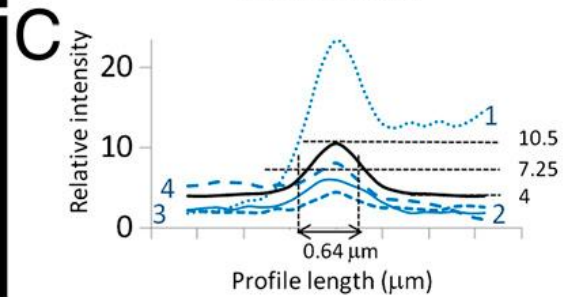
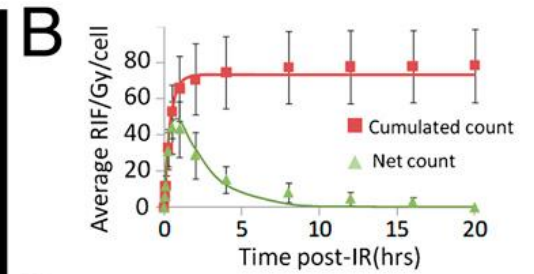
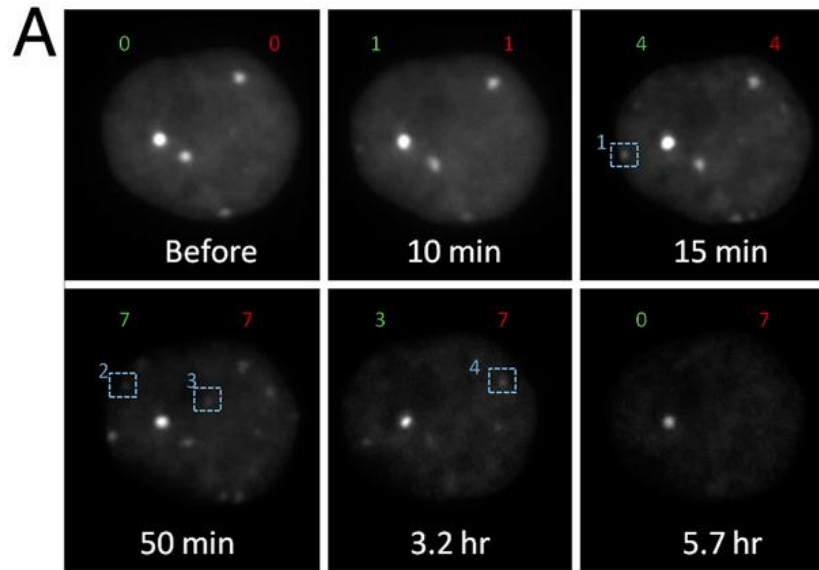




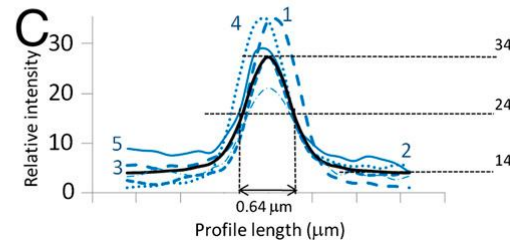
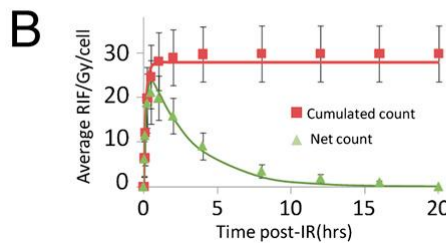
Thank you



0.1 Gy →

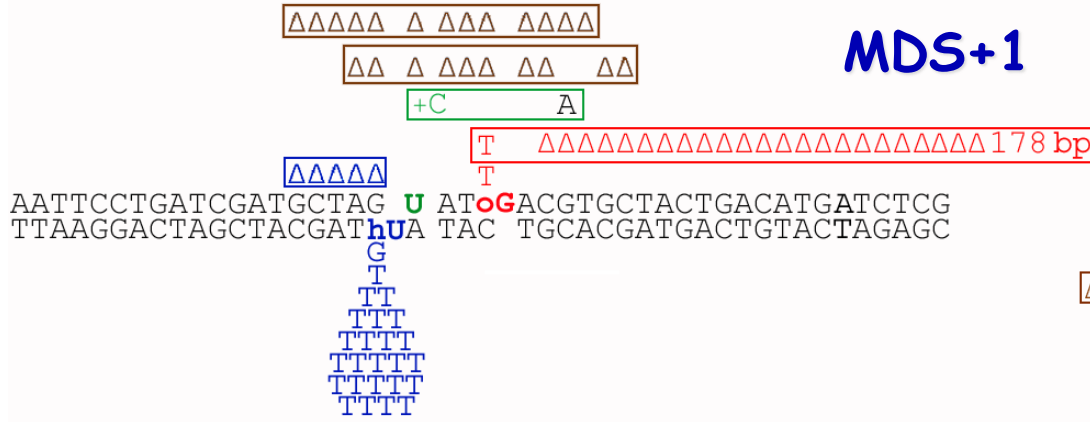


← 1 Gy



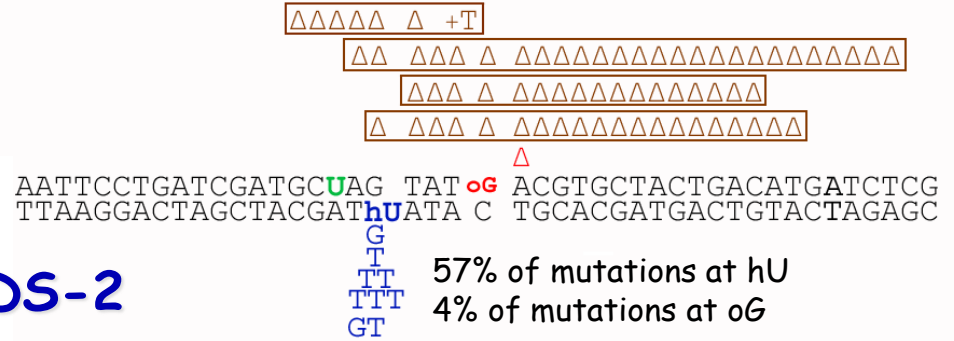
# Mutation spectra of MDS-U/hU/oG

## MDS+1



63% of mutations at hU  
3% of mutations at oG

## MDS-2



57% of mutations at hU  
4% of mutations at oG

## MDS-6



21% of mutations at hU  
10% of mutations at oG

Deletions are larger than for  
MDS+1 & MDS-2

# Mutation spectra of MDS

AATTCCTGATCGAT GCTA G TATGACGTGCTACTCACATGATCTCG  
 TTAAGGACTAGCTA CGAT<sup>h</sup>UATACTGCACGATGAGTGTACTAGAGC

T  
T  
TT  
+A T

A A T A C  
A A T Δ C  
AATTCCTGATCGATGCTAGTAT<sup>o</sup>GACGTGCTACTGACATGTCTCG  
 TTAAGGACTAGCTACGATCATA C TGCACGATGACTGTACAGAGC

ΔΔΔΔΔΔΔΔΔ ΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔ  
 ΔΔΔΔΔΔΔΔ ΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔ

ΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔ+157pb

AATTCCTGATCGATGCTAG TAT<sup>o</sup>GACGTGCTACTGACATGATCTCG  
 TTAAGGACTAGCTACGAT<sup>h</sup>UATAC TGCACGATGACTGTACTAGAGC

Δ  
Δ  
T  
C CT  
T  
T  
T

Δ  
T  
TT  
TTT  
T A  
T T ΔΔ ΔΔΔΔ  
T ΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔ+ 117pb  
G  
G G  
Δ Δ Δ

IMDS

AATTCCTGATCGATGCTAGTATGACGTGC<sup>u</sup>ACTCACATGATCTCG  
 TTAAGGACTAGCTACGATCATA<sup>u</sup>GCACGATGAGTGTACTAGAGC

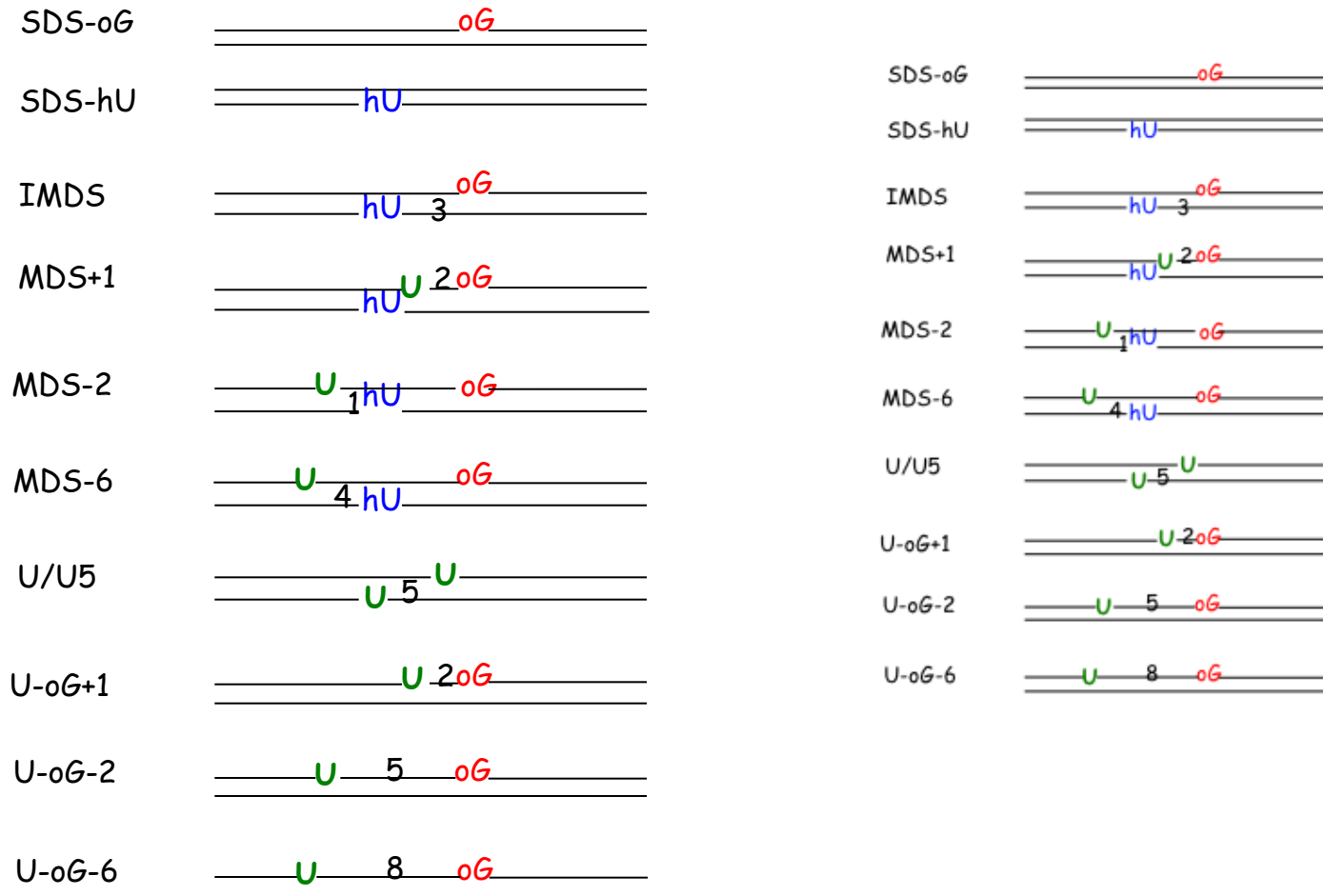
ΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔ+ 62 bp

ΔΔΔΔΔ  
 ΔΔΔΔΔΔΔΔΔ  
 ΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔ  
 ΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔ+15 bp  
 ΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔ+167 bp+734 bp  
 ΔΔΔΔ+75 bp

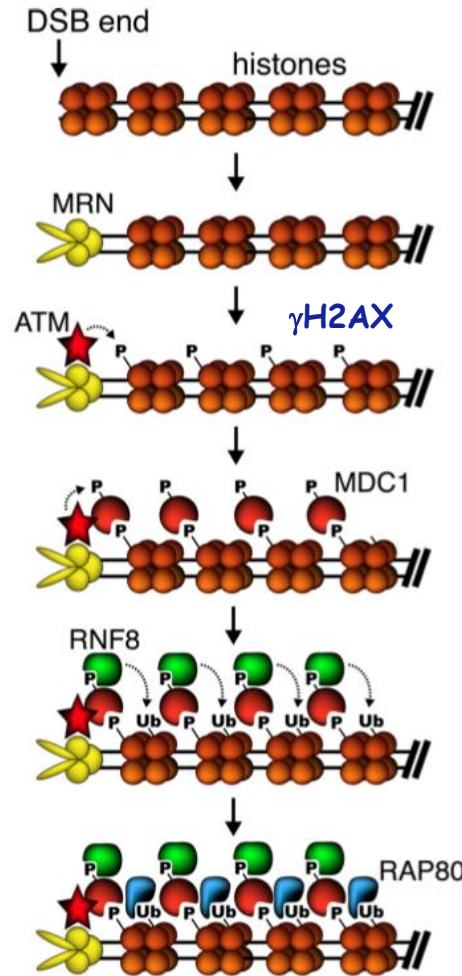
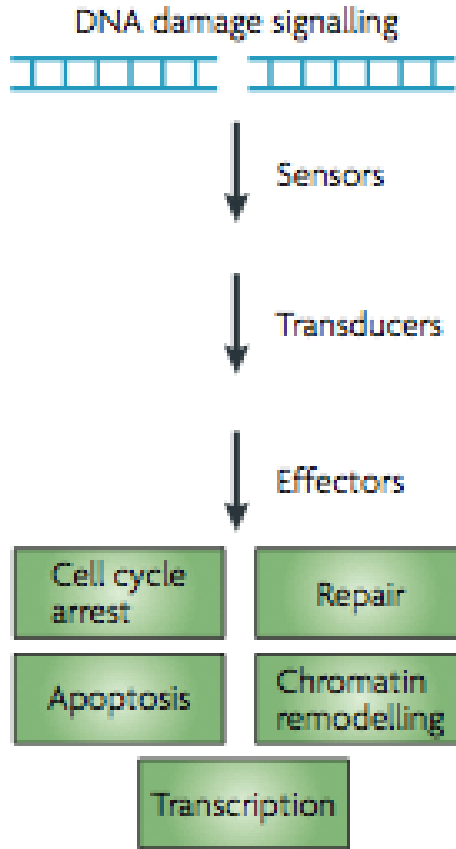
U/U5



# Mutagenesis is drastically enhanced at MDS



# Réponse cellulaire aux dommages (DSB)



## Importance des modifications épigénétiques

Les modifications des histones constituent un **code histone** qui permet de sélectionner les interactions contrôlées dans le temps, et dirige le recrutement des protéines impliquées dans la signalisation du dommage et dans la réparation et de sélectionner la voie de réparation

