

## **INSTABILITE GENOMIQUE ET INDUCTION DE MUTATIONS APRES IRRADIATION IONISANTE : CONSEQUENCES POUR LA DESCENDANCE**

**Laurent Miccoli, Ruth Barber, Jaime F. Angulo, Yuri E. Dubrova**

**Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité (CEA/DSV/DRR), Fontenay-aux-Roses,  
France ; Department of Genetics, University of Leicester, Leicester, UK.**

L'irradiation peut induire une instabilité génétique transmissible à la descendance. La persistance d'une instabilité génétique chez la souris sur plusieurs générations de descendants en absence de nouvelle irradiation soulève la question d'un risque génétique différé. Ces données suggèrent que les rayonnements ionisants (RI) peuvent avoir un effet indirect sur l'instabilité du génome des cellules somatiques, et que cet effet est transmissible par l'intermédiaire de la lignée germinale des géniteurs irradiés. Elle peut également conférer une prédisposition au cancer chez la descendance. L'étude de modèles possédant des constitutions génétiques bien caractérisées capables de perturber la stabilité du génome peut avoir des répercussions importantes au niveau de la prévention pour des individus possédant une radio-sensibilité élevée.

*La transmission transgénérationnelle d'une l'instabilité génomique est-elle déterminée par des gènes particuliers ?* Les mécanismes de transmission de l'instabilité génétique à travers les générations issues de parents irradiés restent inconnus. Pour mieux comprendre la nature du processus de transmission d'une instabilité génomique par l'intermédiaire de la lignée germinale des géniteurs irradiés, nous nous proposons d'étudier l'influence de certains gènes de la réparation de l'ADN impliqués dans la réponse aux RI sur la transmission de cette instabilité. L'utilisation de modèles de souris génétiquement modifiées possédant des constitutions génétiques bien caractérisées capables de perturber la stabilité du génome, comme les souris déficientes pour la protéine PARP-1, peut permettre d'apporter des réponses sur les mécanismes mis en jeu.

*Intérêt des souris déficientes PARP-1-/- ?* L'enzyme PARP-1 participe au processus de réparation de l'ADN par excision de bases et à la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN créés par les agents génotoxiques. Les souris PARP-1-/- sont très sensibles aux effets des agents alkylants et des RI. Ces souris sont également hypersensibles aux agents provoquant des lésions réparables par le processus d'excision de bases car l'étape de réunion du brin cassé est très rallongée. L'action d'agents génotoxiques sur des cellules dépourvues de l'activité de la protéine PARP-1 augmente la fréquence de recombinaison, d'amplification génique, d'échanges de chromatides sœurs et la formation de micronoyaux. De nombreux gains et pertes chromosomiques ont également été détectés affectant l'expression des protéines p53, Rb et Jun. De plus, les souris PARP-1-/- présentent spontanément un taux 5 fois plus élevé d'échanges de chromatides sœurs comparé au génotype sauvage. Cela traduit une instabilité chromosomique inhérente au modèle. Les souris PARP-1-/-, possédant spontanément une instabilité génétique, constituent donc un modèle de choix pour l'étude de la transmission transgénérationnelle *in vivo* d'une instabilité après une exposition à des RI.

### **Déroulement expérimental de l'étude**

La fréquence de mutations est mesurée dans 4 groupes d'environ 100 descendants. Les descendants de 2 des 4 groupes ont été conçus 6-8 semaines après irradiation paternelle (1 Gy <sup>137</sup>Cs). L'accouplement des mâles a été différé de 6-8 semaines après l'irradiation pour permettre un renouvellement complet du tissu germinale. L'expérience a nécessité 10 mâles PARP-1-/- et 20 femelles de type sauvage. Un schéma de l'expérience réalisée est représenté dans la Figure 1.

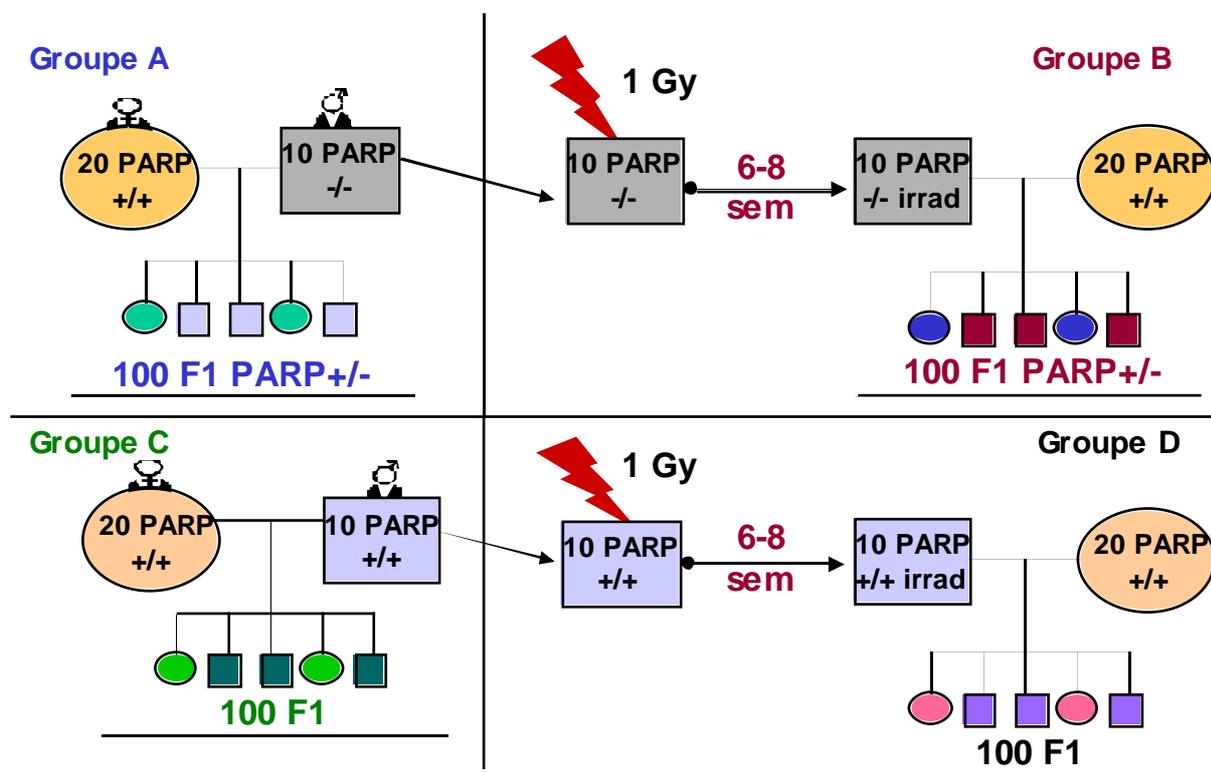


Figure 1. Schéma des expérimentations proposées

### Choix des séquences permettant la détection des mutations

La mesure directe du taux de mutations dans la lignée germinale humaine est difficile à réaliser. L'induction de mutations germinales par les RI sur les animaux a été tout d'abord recherchée par des méthodes dont la fréquence de mutation est de l'ordre de  $10^{-5}$ /Gy/locus. L'évaluation des effets génétiques des RI avec de telles fréquences faibles nécessite des dizaines de milliers d'animaux.

La détection de mutations par la comparaison des bandes d'ADN révélées par des sondes spécifiques des ESTR (« expanded simple tandem repeat ») permet une évaluation indirecte du risque d'exposition aux RI. En effet, avec un nombre limité d'échantillons ( $n=200$ ), une irradiation de l'ordre de 0,35 Gy permet de détecter une augmentation de 2 fois du taux de mutations ; résultats similaires à la moyenne obtenue par les autres systèmes (0,32 Gy) mais qui nécessitent un nombre beaucoup plus important d'échantillons.

Les ESTR (type de minisatellites particuliers) sont des régions non codantes du génome, répétées en tandem (loci de 0,5 à 30 kb). Les minisatellites présentent une fréquence élevée de mutations spontanées dans les cellules germinales mâles et elles sont très sensibles à l'induction de mutations par les RI. Compte tenu du taux de mutations élevé des minisatellites dans les cellules germinales, ces séquences constituent un système capable d'amplifier la détection de mutations dans une fraction restreinte de la population.

La fonction biologique précise des minisatellites est inconnue. Cependant, l'implication des minisatellites dans la régulation de la transcription semble se confirmer et souligne l'importance de tels loci dans le génome. L'accumulation de mutations dans la lignée germinale mâle au niveau des minisatellites peut contribuer à augmenter la susceptibilité génétique des descendants à des maladies de type polygénique, complexes et d'apparition tardive dans la vie adulte.

### Méthode de détection

L'ADN est préparé à partir de la queue des descendants prélevée 15 jours après la naissance. Après une digestion de l'ADN par l'enzyme de restriction *AluI*, le profil des minisatellites sera déterminé par *Southern Blot* suivi de l'hybridation avec des sondes de minisatellites *single-locus* (Ms6-hm et Hm-2).

### Résultats et discussion

Les premiers résultats montrent que les géniteurs PARP-1<sup>-/-</sup> possèdent un taux de mutations spontanées très élevé dans la lignée germinale au niveau des loci ESTR ; augmentation de 3 fois du taux de mutagenèse par rapport aux géniteurs sauvages (Figure 2). Cependant, l'irradiation des mêmes géniteurs ne permet pas d'augmenter l'instabilité génomique inhérente au modèle PARP-1<sup>-/-</sup> ; le taux de mutations reste stable. L'instabilité génomique des séquences ESTR est donc transmissible aux générations futures et les RI n'induisent pas l'amplification de cette instabilité génomique. Bien que les souris PARP-1<sup>-/-</sup> possèdent une radiosensibilité élevée, l'absence d'augmentation du taux de mutations peut être expliquée par une mort cellulaire importante au niveau germinale induite par l'irradiation, par un dérapage de la réplication, ou par la modification de certains facteurs épi génétiques.

En conclusion, afin de préciser les mécanismes responsables de l'instabilité génomique au niveau des séquences ESTR, nous nous proposons d'étudier la déficience d'un autre gène de la famille PARP, le gène PARP-2. En effet, les protéines PARP-1 et PARP-2 possèdent des fonctions complémentaires et non redondantes pour le maintien de la stabilité génomique.

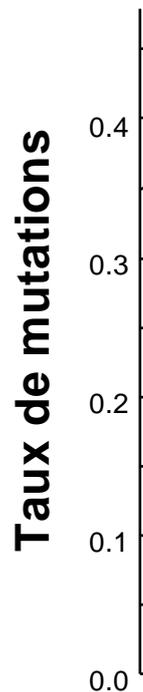


Figure 2. Mesure du taux de mutations avant et après irradiation sur les descendants issus de géniteurs sauvages et déficients pour PARP-1.