

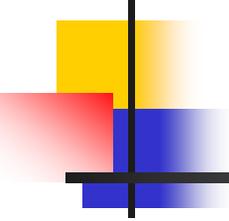
Origine de la radiosensibilité et mécanismes impliqués

Dietrich AVERBECK

**Institut Curie-Section de Recherche,
UMR2027 CNRS/I.C.**

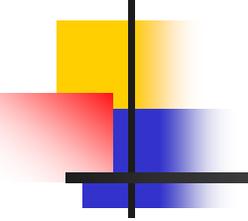
**Centre Universitaire, Bât.110,
91405 Orsay**

Espace Saint Martin, 11 Mars 2008, Paris



Introduction (1)

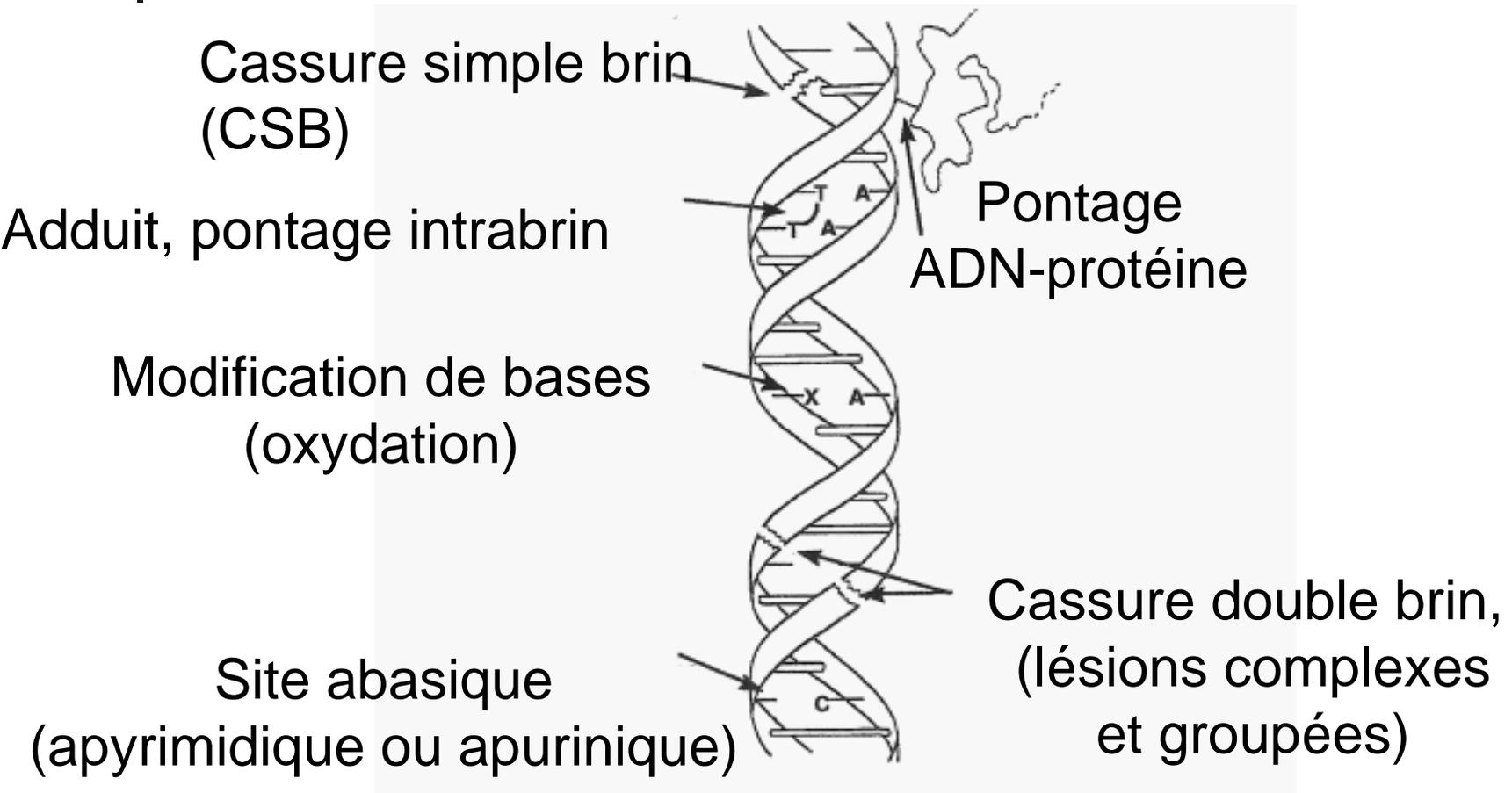
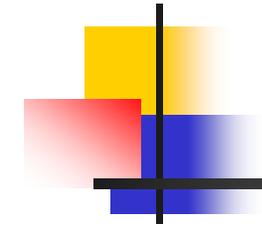
- La sensibilité fait partie de la nature humaine et de tous les organismes vivants.
- Elle constitue une réactivité particulière aux diverses agressions et stress par des agents physiques et chimiques internes d'origine métabolique ou externes d'origine environnementale.
- Elle se manifeste par des réponses caractérisées au niveau cellulaire et au niveau de l'organisme (*érythèmes etc.*).

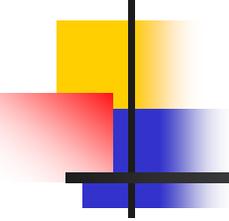


Introduction (2)

- Au cours de l'évolution les cellules et les organismes ont dû s'adapter à la vie à 37°C et aux multiples stress internes et externes.
- Face aux stress, des mécanismes de défense **génétiquement contrôlés** ont été mis en place permettant une protection contre les dommages induits en particulier ceux mettant en danger l'intégrité du génome et l'ADN.

Dommages de l'ADN induits par des agents endogènes et exogènes tels que les rayonnements ionisants

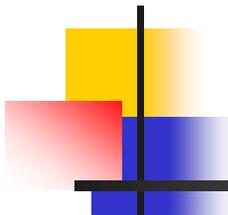




Mise en place de la défense cellulaire (1)

Les systèmes de défense comprennent

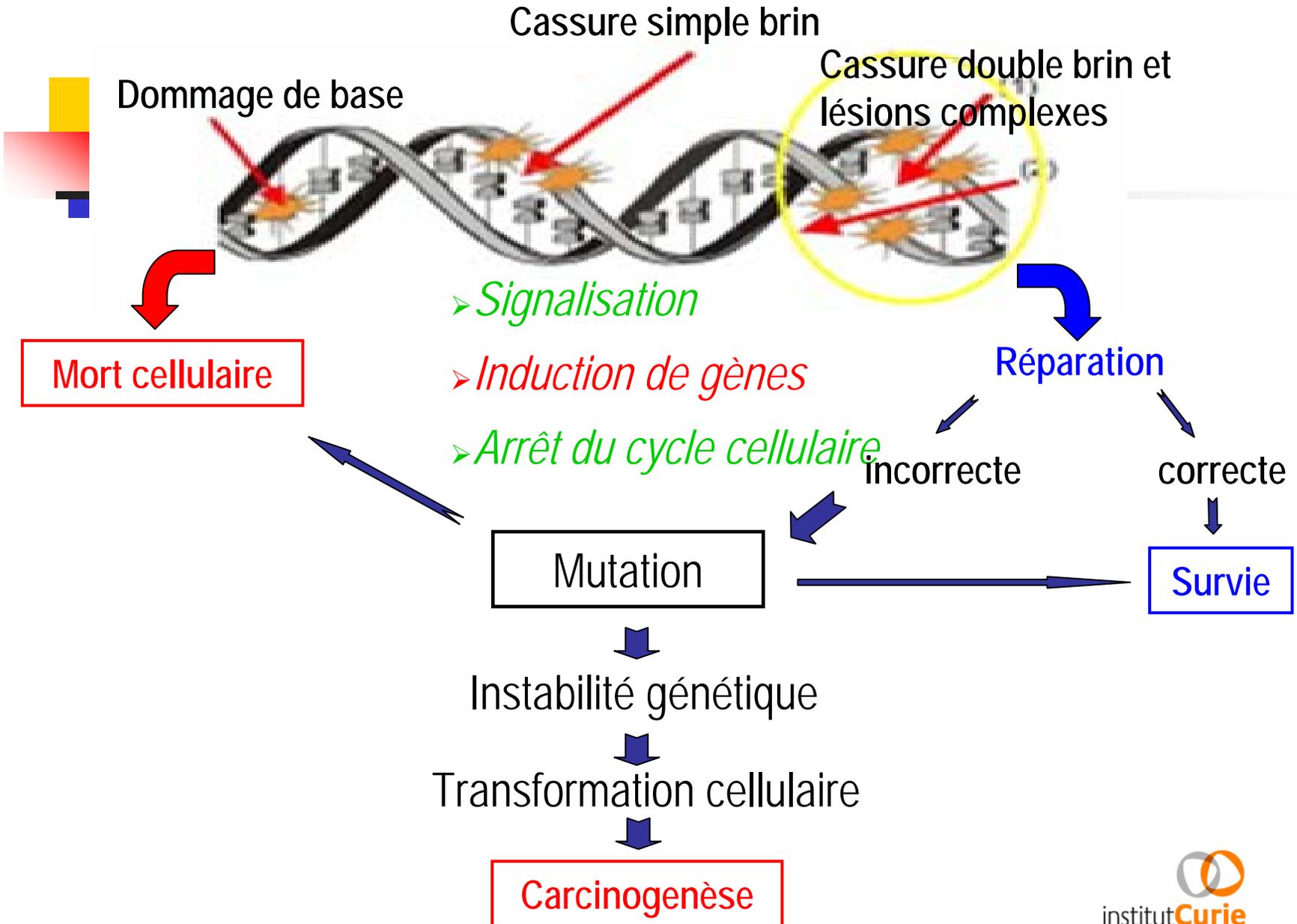
- (1) les systèmes antiradicalaires et antioxydants tels que le glutathion, la glutathion S transférase, la superoxyde dismutase etc. éliminant les espèces réactives d'oxygène générées par le métabolisme oxydatif, les radiations et certains agents chimiques.
- (2) les systèmes de réparation de l'ADN (souvent multi-enzymatiques) capables de réparer efficacement et la plupart du temps sans erreur les lésions induites dans l'ADN assurant ainsi l'intégrité et la stabilité du génome.



Mise en place de la défense cellulaire (2)

- Les découvertes récentes de la biologie moléculaire montrent qu'au niveau cellulaire
- les dommages induits dans l'ADN doivent d'abord être **reconnus** et ensuite **signalés** pour activer les systèmes de contrôle **empêchant la prolifération** des cellules lésées (*arrêt du cycle cellulaire*) et **permettant la réparation des lésions** ou **l'élimination des cellules endommagées** (*activation de la mort cellulaire (apoptose)*).

Réponse aux agents génotoxiques (radiations etc.)

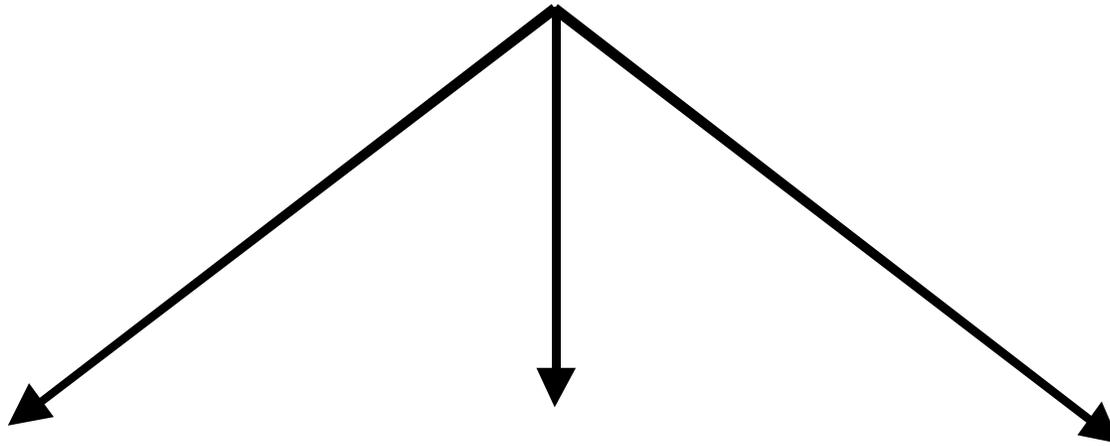


Voies de signalisation

Dommmage de l'ADN



Signalisation

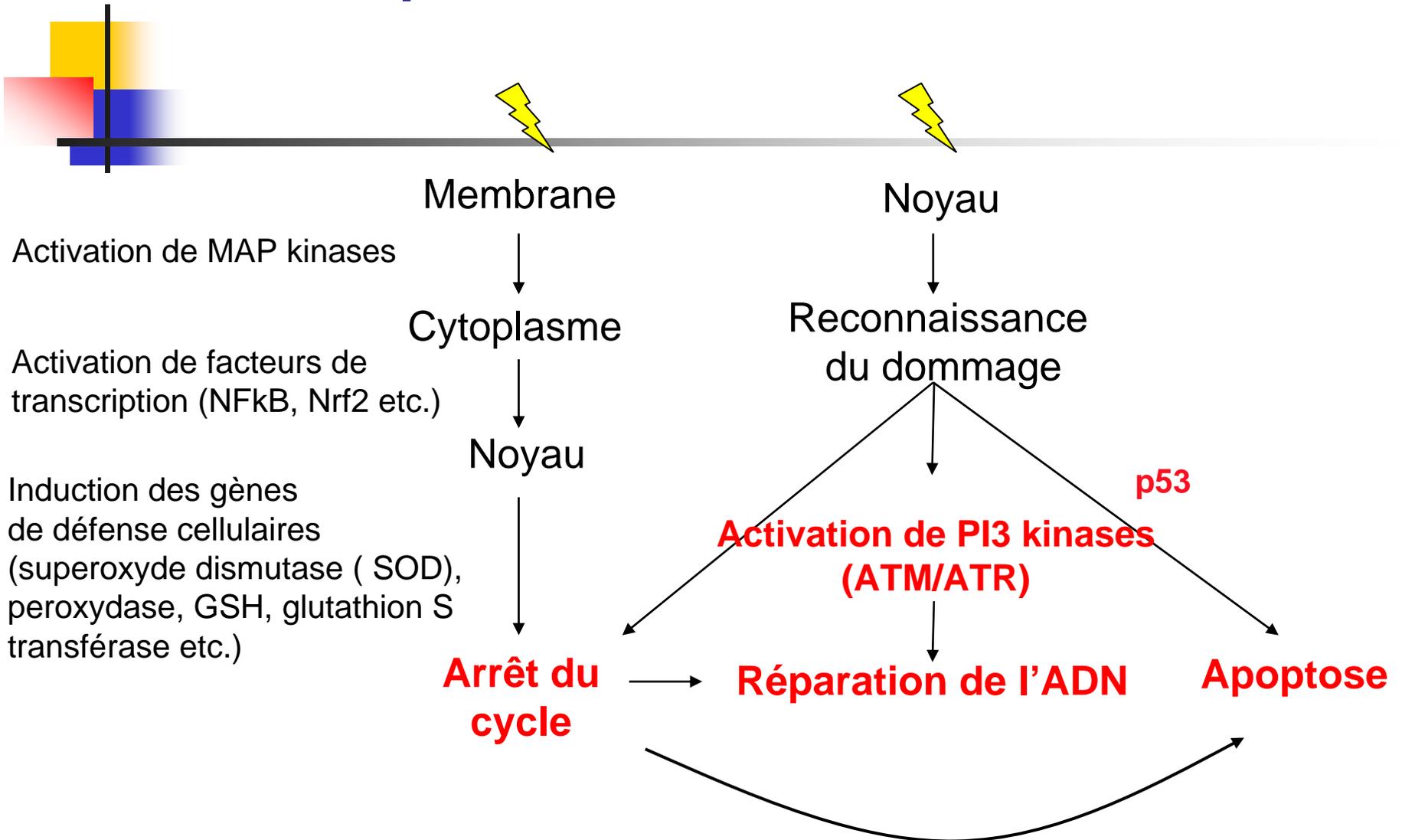


Arrêt du cycle

Réparation

Apoptose

Voies de signalisation activées après irradiation ionisante



Signalisation des cassures double brin (CDB) radioinduites

Reconnaissance de CDB par le complexe (MRE11/RAD50/NBS1)

Signalisation par PI3 kinases (ATM, ATR)

Activation des protéines effectrices

Phosphorylation de l'histone H2AX (chromatine)

Contrôle du cycle cellulaire (Chk1, Chk2)

Contrôle de l'apoptose (p53, Bcl2, Bax...)

Protéines de réparation (RAD51, BRCA1, DNA-PKcs, NBS1, Artémis ...)

Principaux systèmes de réparation sollicités après irradiation ionisante

- Réparation des erreurs répliquatives par le système de Réparation des mésappariements de bases (fidèle)

- Réparation des dommages oxydatifs et des cassures simple brin (CSB) par le système d'Excision de bases (fidèle)

- Réparation des lésions encombrantes (dimères, adduits) par le système d'Excision de nucléotides (fidèle)

- Réparation de cassures double brin et lésions complexes par Recombinaison homologue (fidèle)

- Réparation de cassures double brin et de lésions complexes par Religation non homologue ("NHEJ") (réparation peu ou pas fidèle)

Réparation des dommages radioinduits de l'ADN

Radiations ionisantes → ADN endommagé

Reconnaissance du dommage
et signalisation

(ATM/ATR/OGG1/PARP/MRN/BRCA1/BRCA2/ KU etc.)

Synthèse
translésionnelle

*hREV3, hRAD30
XPV,*

Réparation des
mésappariements

hMLH1
hMSH2

Excision de
bases

OGG1, NTH
HAP1,
NEIL1,
Pol beta,
XRCC1
LIG3

Excision de
nucléotides

XPA, B, C, D,
XPE, F, G
CSA, CSB

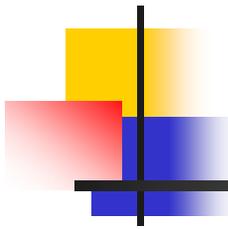
Recombinaison
homologue

hRAD50/
MRE11/NBS1
hRAD51
hRAD52
hRAD54
XRCC2
XRCC3
BRCA1 & 2
BLM

Religation
non homologue

KU86 (XRCC5)
KU70 (XRCC6)
DNA-PK (XRCC7)
XRCC4
LIG IV
Artémis,
Cernunnos

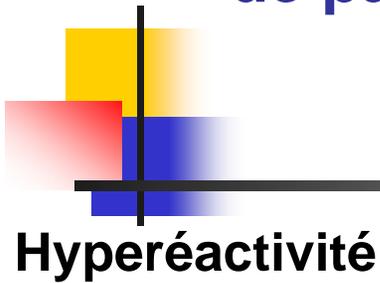
Protéines impliquées



Quelques protéines de reconnaissance de dommages de l'ADN

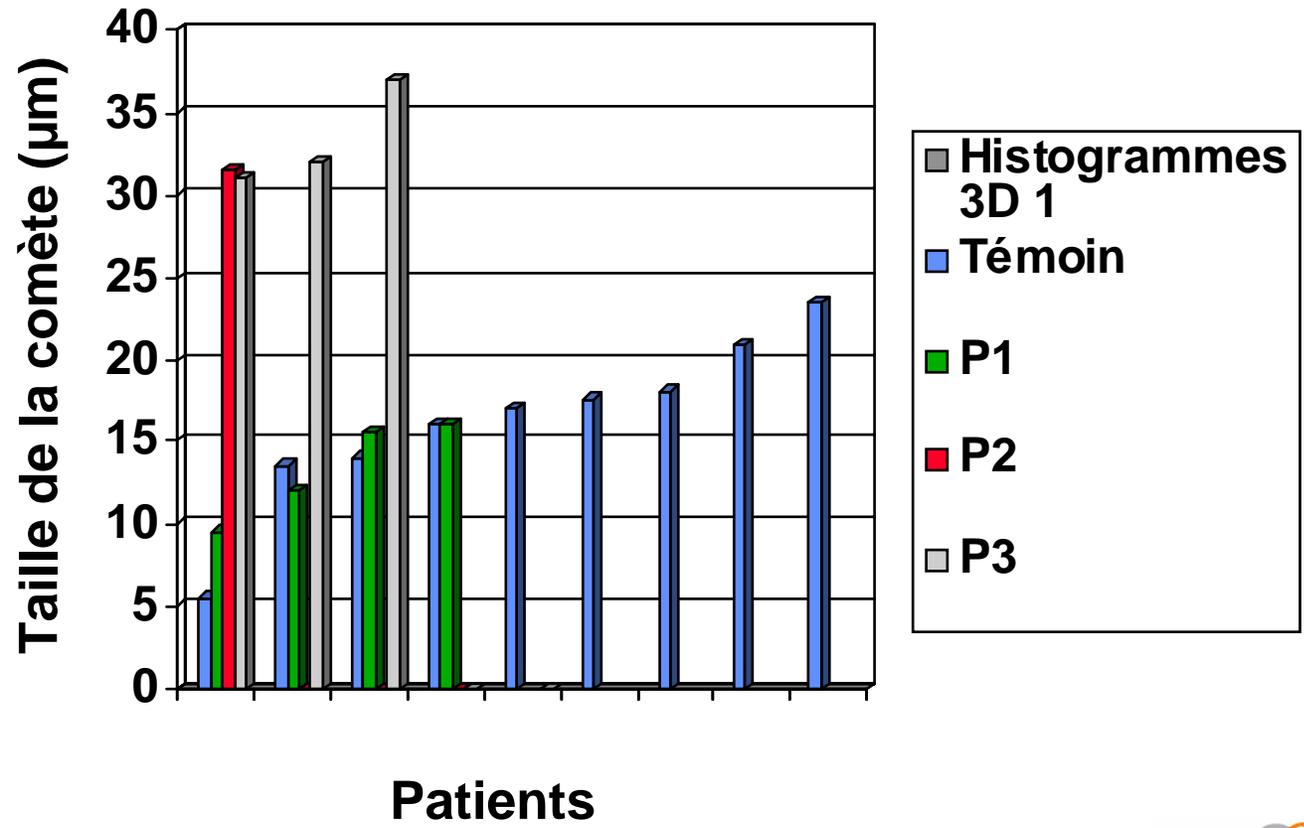
- Glycosylase hOGG1: bases oxydées
- Poly(ADP-ribose)polymérase PARP et aprataxine: cassures simple brin (CSB)
- XPE, hHR23B: adduits, dimères
- MRE11/RAD50/NBS1: cassures double brin (CDB)
- KU86/KU70, DNA-PKcs: cassures double brin (CDB)

Réparation de cassures de l'ADN (5 Gy) de lymphocytes de patients montrant une hyperréactivité après radiothérapie (Test de Comètes)



Réaction normale
→

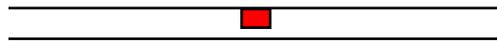
Cassures résiduelles après 60 min



(C. Alapetite et al. Int. J. Cancer 1999; 83: 83-90)

Réparation par excision de bases

1. Reconnaissance

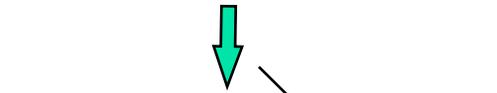


Base endommagée

2. Excision



ADN glycosylases



AP endonucléase

3. Remplissage



**Synthèse par pol β
ou pol δ + PCNA+ FEN**

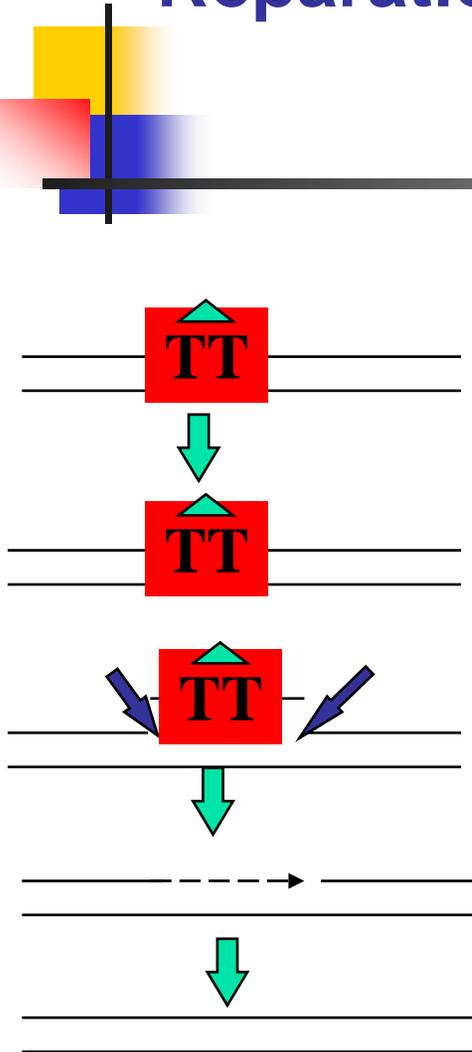
**4. Reconstitution
de l'ADN**



**ADN ligase I ou
ADN ligase III/XRCC1**

ADN réparé

Réparation par excision de nucléotides (NER)



Réparation normale (avec XPC/ hHR23B)

Réparation d'urgence
Réparation couplée à la transcription (TCR)
(avec RNAPol II /CS-B)

Reconnaissance et séparation des brins (TFIIH/ XPA/RPA/XPB/XPD)

Incision et excision de la lésion avec ciseaux moléculaires (ERCC1/XPF + XPG)

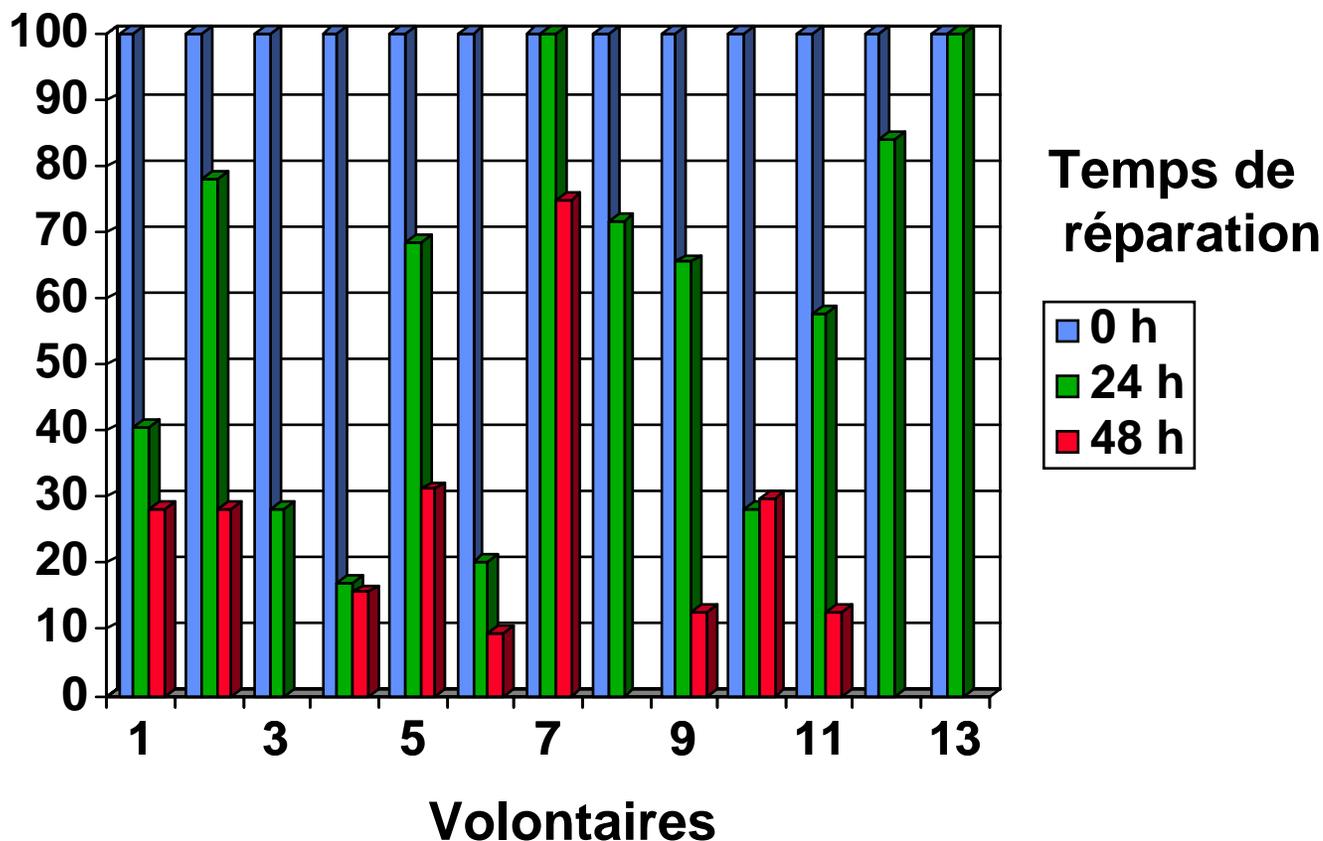
Remplissage par une synthèse réparatrice par Pol δ/ϵ

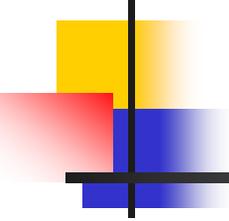
Reconstitution de l'intégrité de l'ADN par l'ADN ligase 1

Variabilité individuelle de la capacité de réparation de photolésions (dimères) chez 13 volontaires après exposition à 40mJ/cm² d'irradiation solaire simulée

(selon G. Xu et al. *Mutation Res.* 2000;459: 195-202)

Photolésions résiduelles (%)

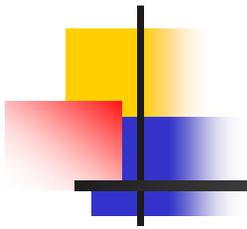




Syndromes humains de réparation

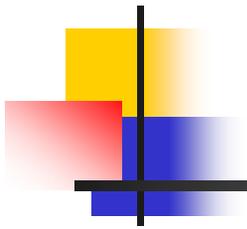
Plusieurs maladies génétiques rares de réparation (autosomales récessives) révèlent un lien direct entre

- une radiosensibilité accrue,
- un défaut dans la réparation de l'ADN
- une prédisposition aux cancers



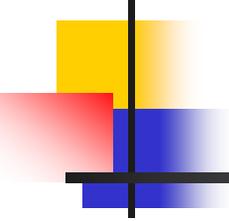
Syndromes d'hypersensibilité aux rayons solaires

- **Xeroderma pigmentosum**, groupes de complémentation A, B, C, D, E, F, G, H (déficience dans l'excision de nucléotides et prédisposition aux cancers de la peau)
- **Xeroderma pigmentosum variant** (déficience dans la synthèse translésionnelle fidèle)
- **Syndrome de Cockayne** CSA, CSB (déficience dans la réparation de l'ADN activement transcrit)



Syndromes d'hypersensibilité aux rayons ionisants

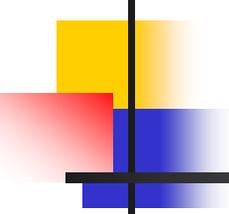
- Ataxia telangiectasia (gène ATM)
(défaut dans la signalisation des cassures double brin, prédisposition aux lymphome, leucémie et cancer du sein)
- Syndromes de Ligase IV (Gène LigIV), d'Artémis (Gène Artémis), de Cernunnos (Gène Cernunnos) et de SCID (Gènes KU86/KU70)
(défaut dans la réparation des CDB par religation non homologue (NHEJ), immunodéficience et prédisposition aux leucémies)
- Syndrome de Bloom (gène BLM)
(défaut dans une hélicase impliquée dans la réparation, prédisposition aux cancers)



Déficiences dans la réparation de radiolésions

associées le plus souvent à

- une hypersensibilité aux radiations
- une immunodéficiência
- une prédisposition aux cancers
- une prédisposition aux maladies neurodégénératives et à un vieillissement précoce (dans certains cas)



Les variants et les polymorphismes de gènes de réparation

- Les nouvelles méthodologies de la biologie moléculaire ont révélé qu'il existe dans la population normale des individus portant des polymorphismes (variants) dans les gènes de réparation et de radiosensibilité tels que ATM, OGG1, BLM etc..
- Ces polymorphismes sont susceptibles d'affecter non seulement la radiosensibilité mais également à long terme la prédisposition individuelle à développer certains cancers.

Variation individuelle de la capacité de réparation

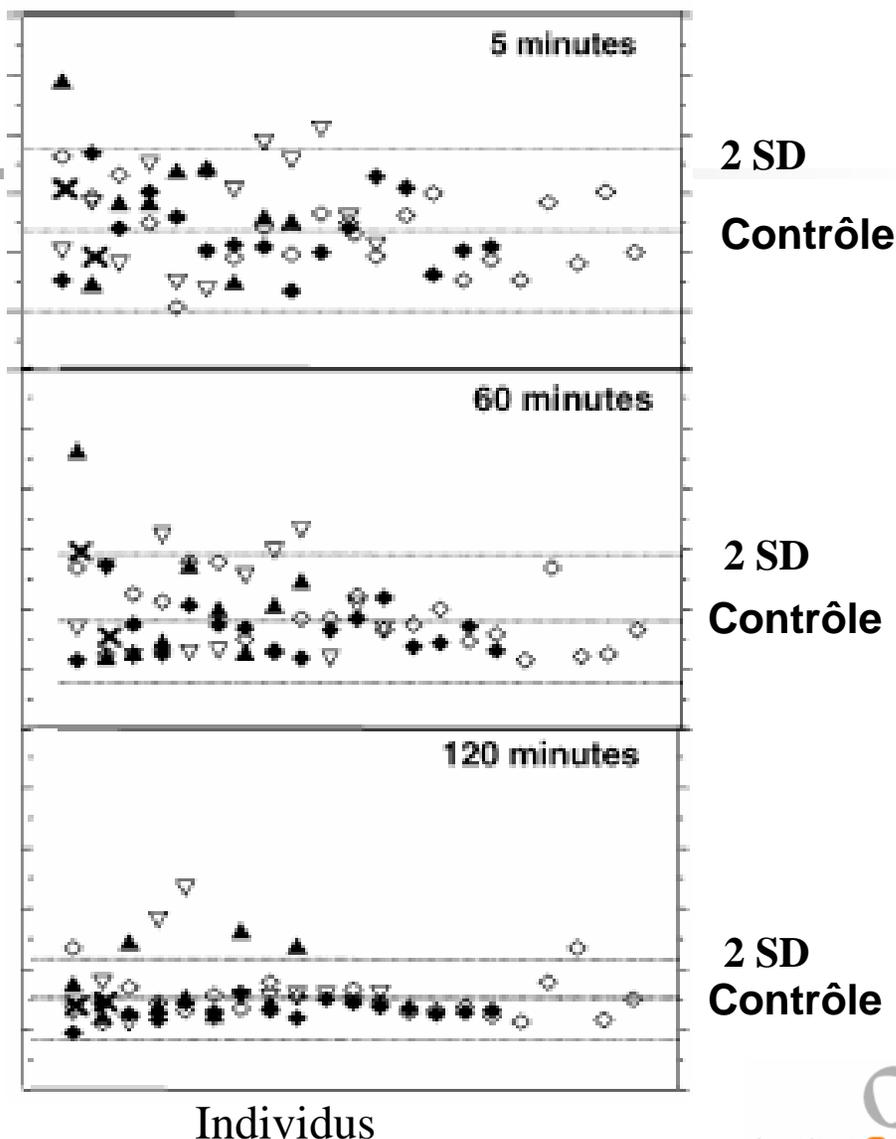
(Comet test: Aka P. et al. Mut. Res. 2004;556:169-181)

- Les travailleurs de l'industrie nucléaire en Belgique montrent des polymorphismes (variants) (Ser/Ser, Ser/Cys et Cys/Cys) du gène hOGG1.

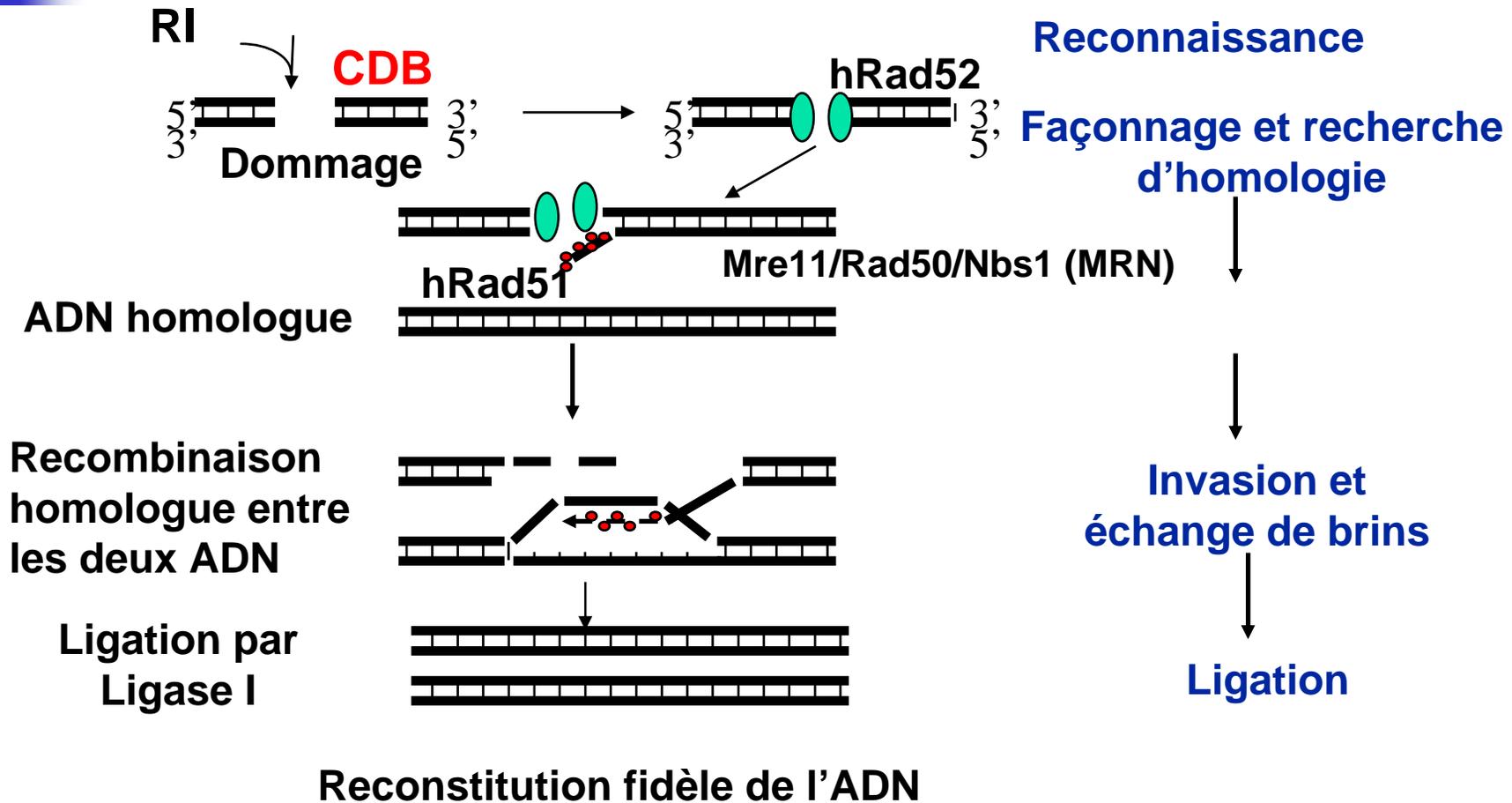
- OGG1 est impliqué dans la réparation de dommages oxydatifs radioinduits

- Les lymphocytes de 71% d'individus variants Ser/Cys (OGG1) ne réparent pas les radiolésions (2Gy) après 2 heures d'incubation post-radique.

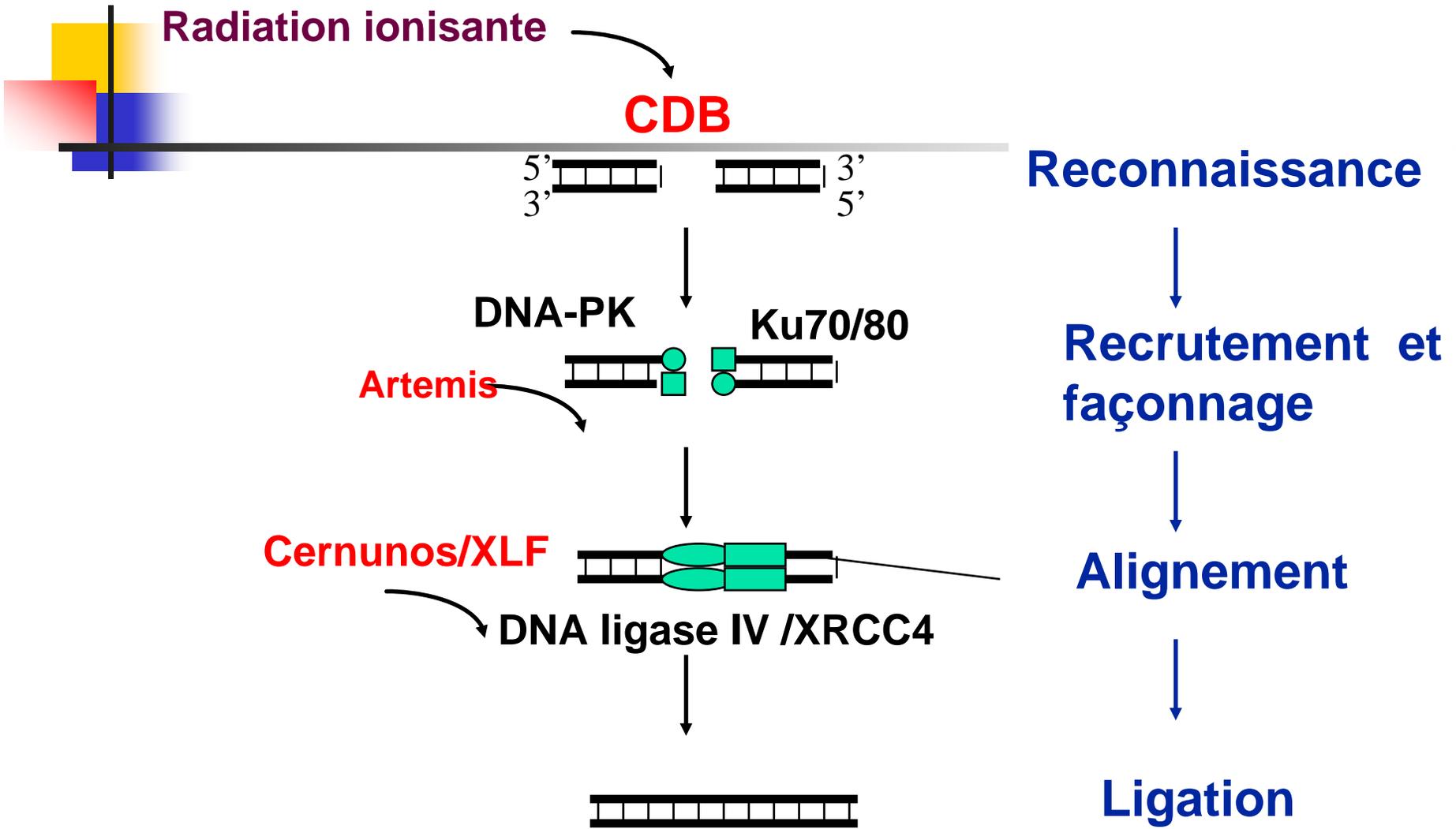
Les variants XRCC1 et XRCC3 n'affectent pas la réparation.



Réparation d'une CDB par recombinaison homologue

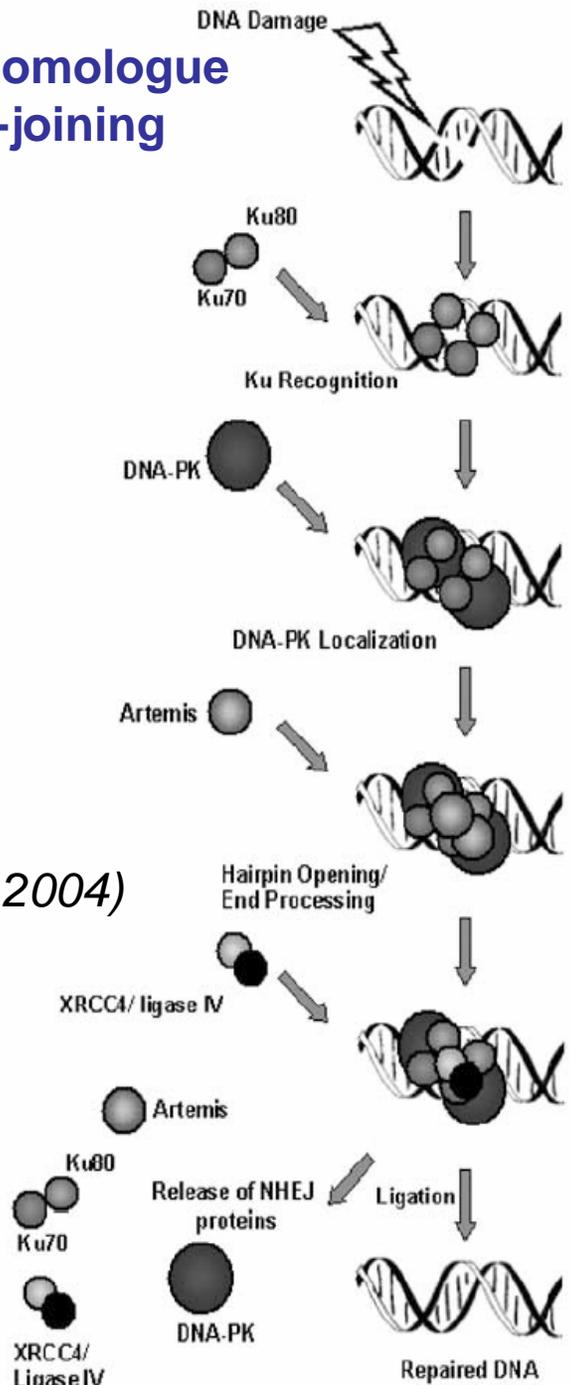


Réparation de CDB par relication non homologue (NHEJ)



Reconstitution non fidèle de l'ADN

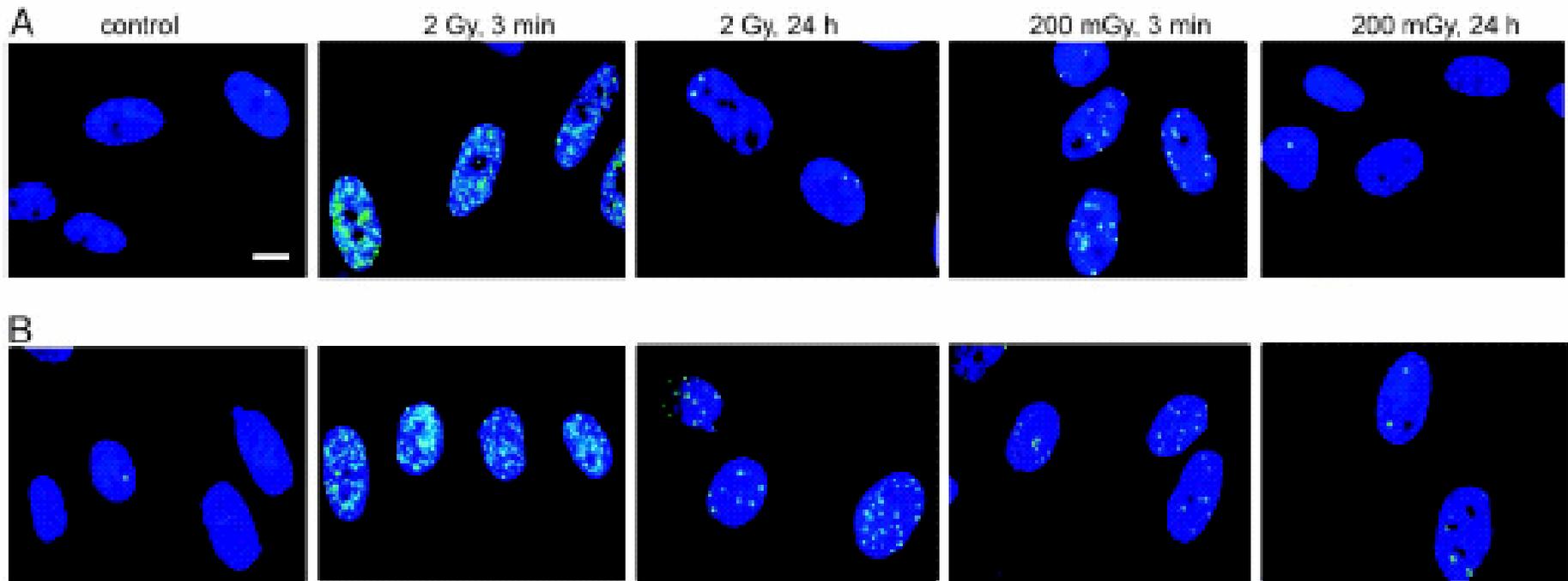
Religation (suture) non homologue 'Non-homologous end-joining (NHEJ)'



(Collis SJ et al. Oncogène 2004)

Induction et réparation des CDB visualisées par immunofluorescence de foyers de γ -H2AX

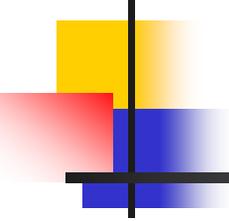
(Rothkamm K, Löbrich M, Proc Natl Acad Sci USA 2003, 100:5057-5062).



A: fibroblastes MRC-5

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

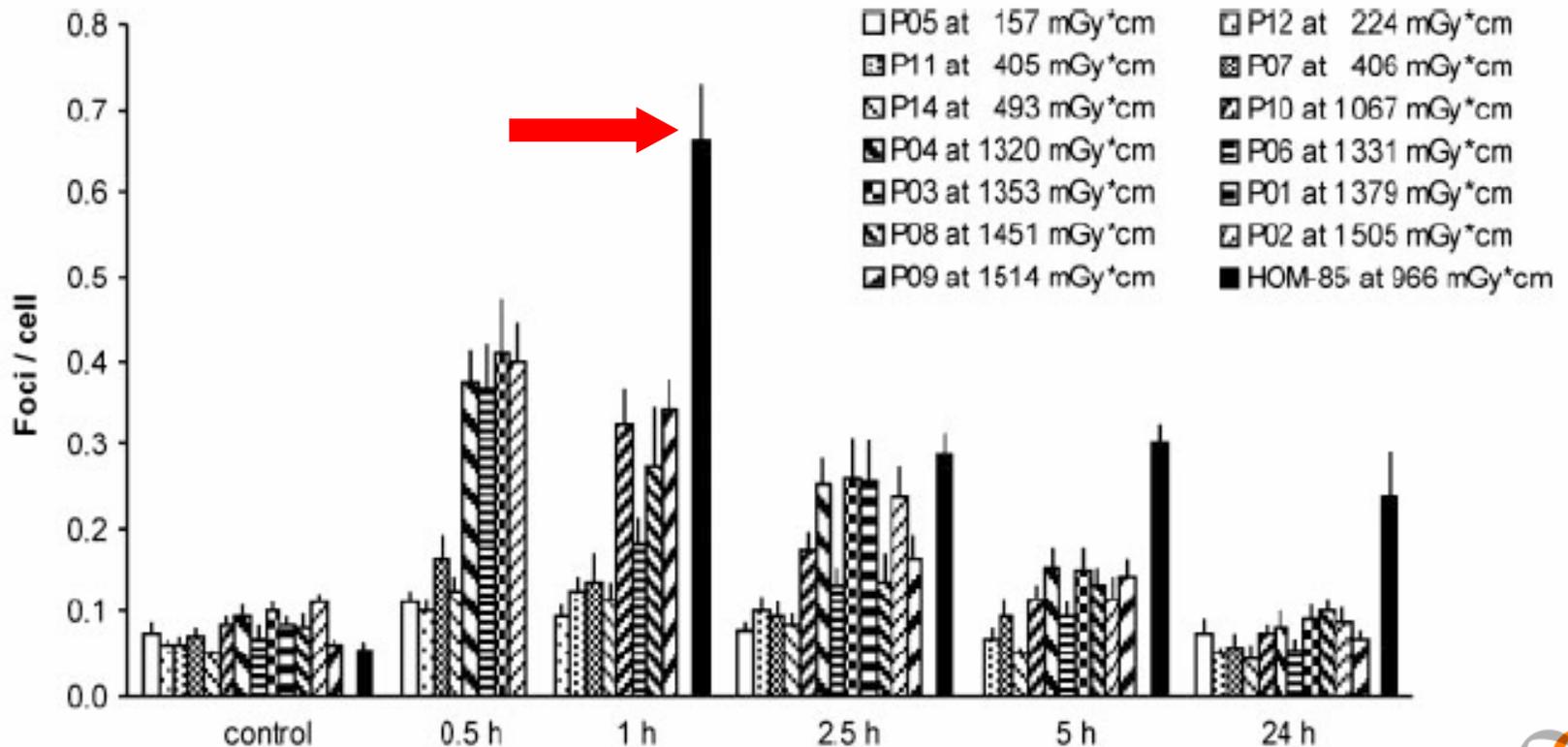
Sensibilité individuelle et polymorphismes ou mutations de gènes de réparation



- La sensibilité individuelle est rare et n'est pas détectable dans les études de populations (études épidémiologiques).
- Des études récentes sur l'induction de micronoyaux par de faibles doses de rayons ionisants (*Angelini S et al. Mutat Res.2005*) suggèrent que certains polymorphismes de gènes de réparation tels que XRCC3, XRCC1 et XPD contribuent aux dommages génétiques chez les individus chroniquement exposés.
- De plus, des différences dans la capacité de réparation ont été mises en évidence chez des patients en radiothérapie et radiodiagnostic (tomographie).

Induction et réparation des CDB (foyers de γ H2AX) dans les lymphocytes de patients après analyse tomographique (CT scan)

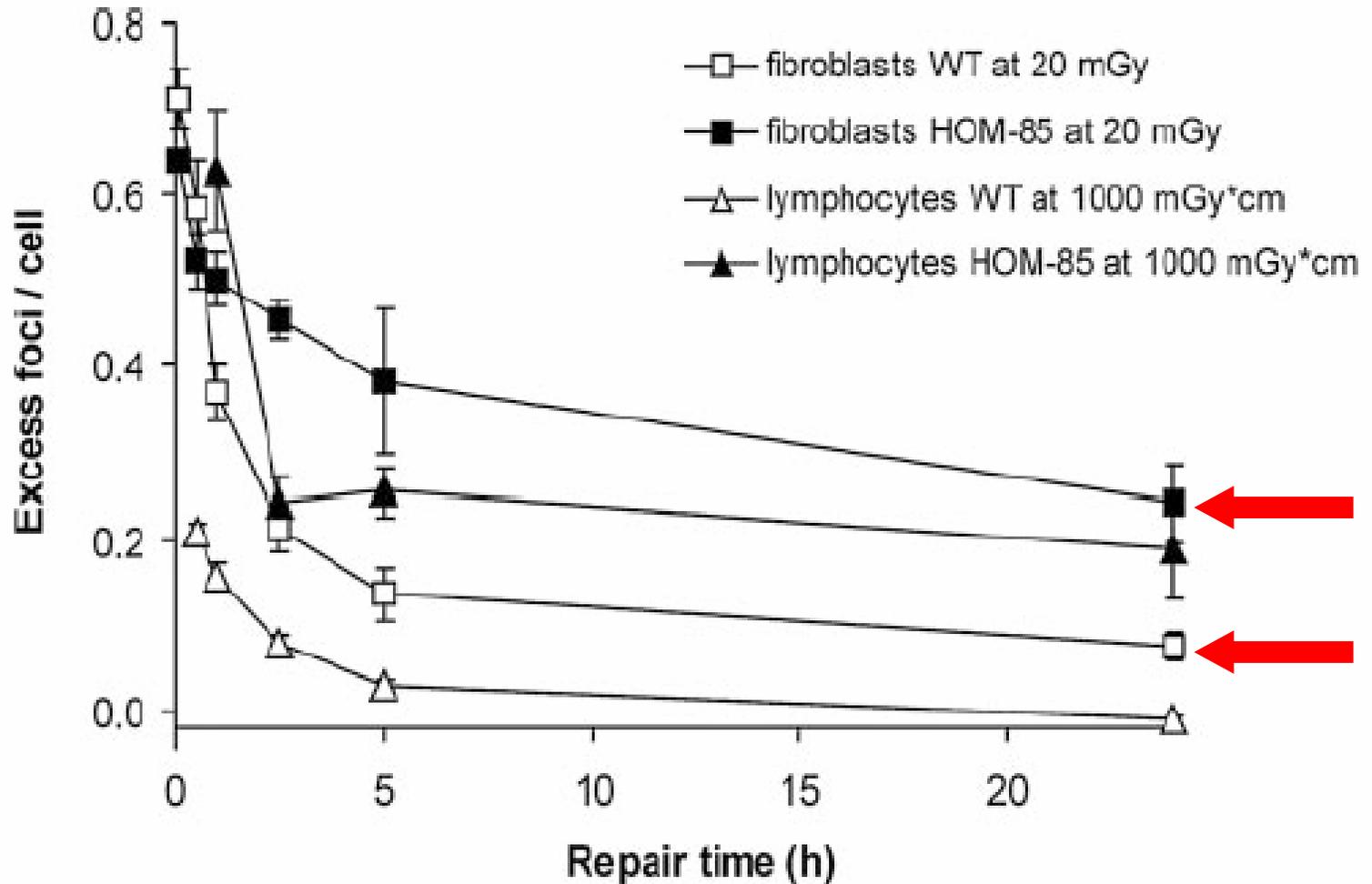
(M.Löbrich et al. 2005 PNAS; 102:8984-9)



Patient radiosensible et déficient dans la réparation

Capacité de réparation réduite chez un patient (radiosensibilité détectable après tomographie (CT scan))

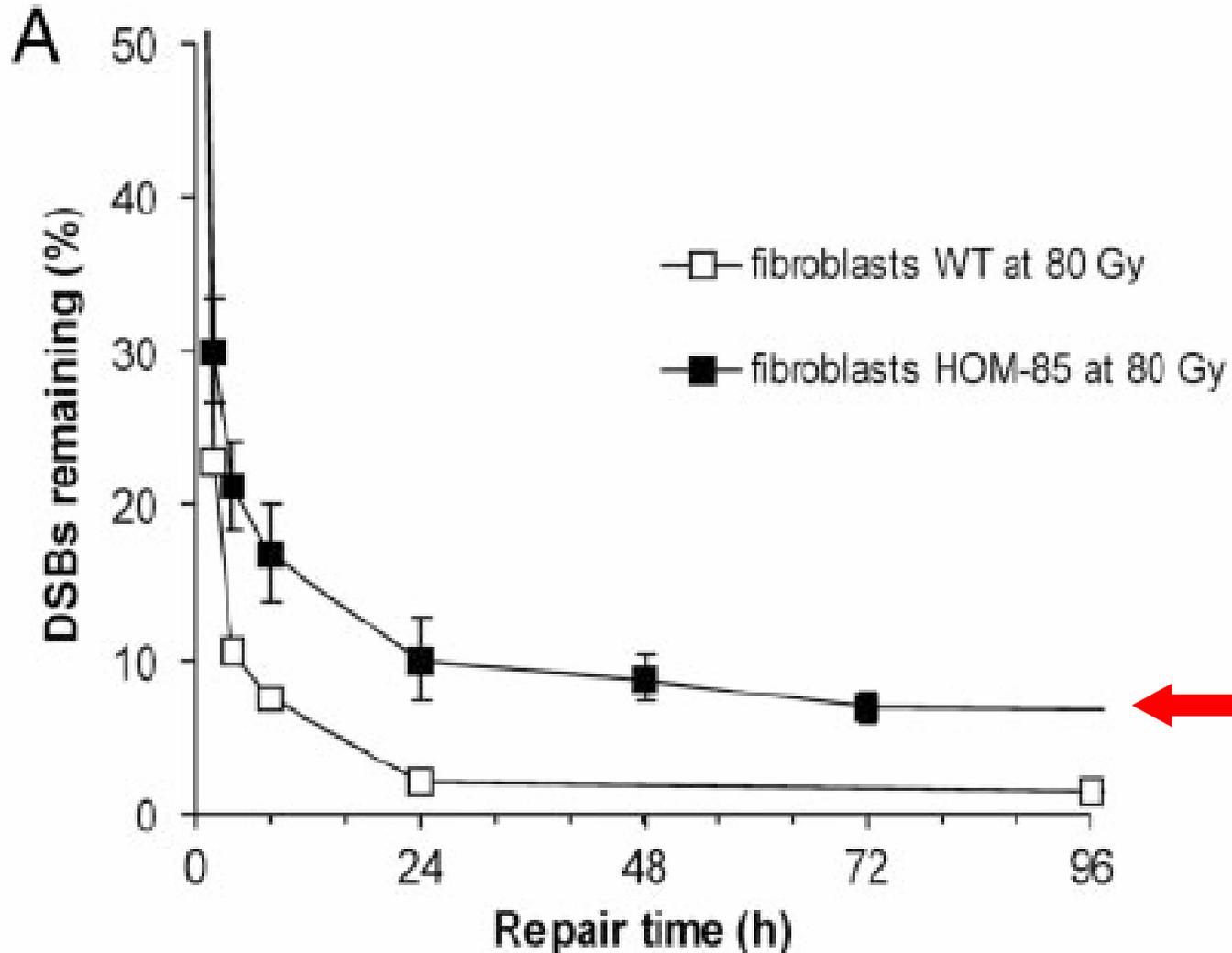
(M.Löbrich et al. 2005 PNAS; 102:8984-9)



→ Patient radiosensible et déficient dans la réparation

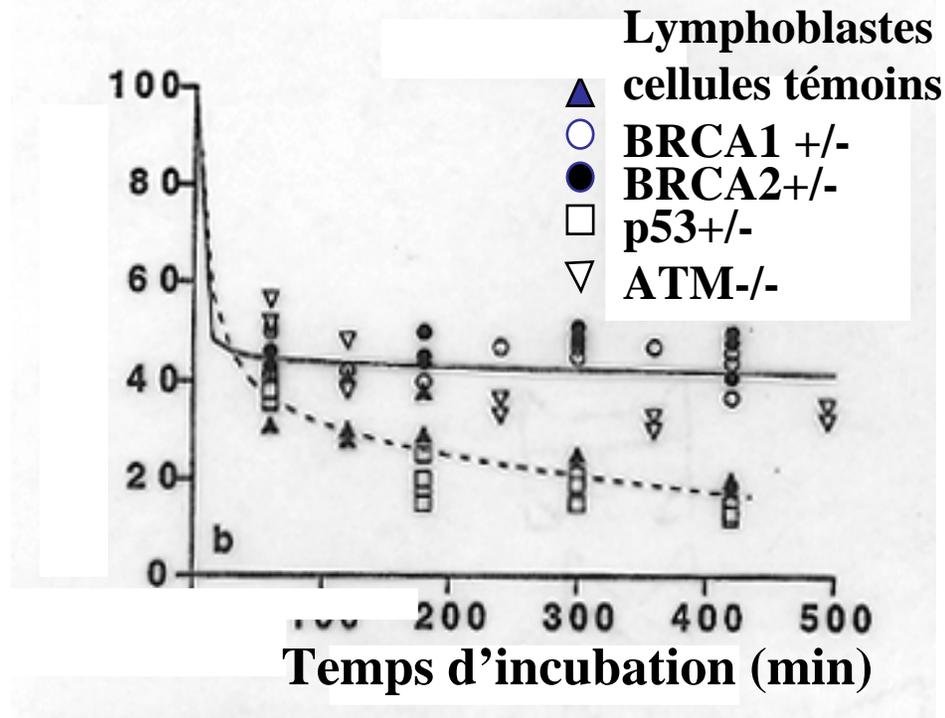
Capacité de réparation réduite chez un patient (radiosensibilité détectable après tomographie (CT scan))

(M.Löbrich et al. 2005 PNAS; 102:8984-9)



Cinétiques de réparation des CDB radioinduites

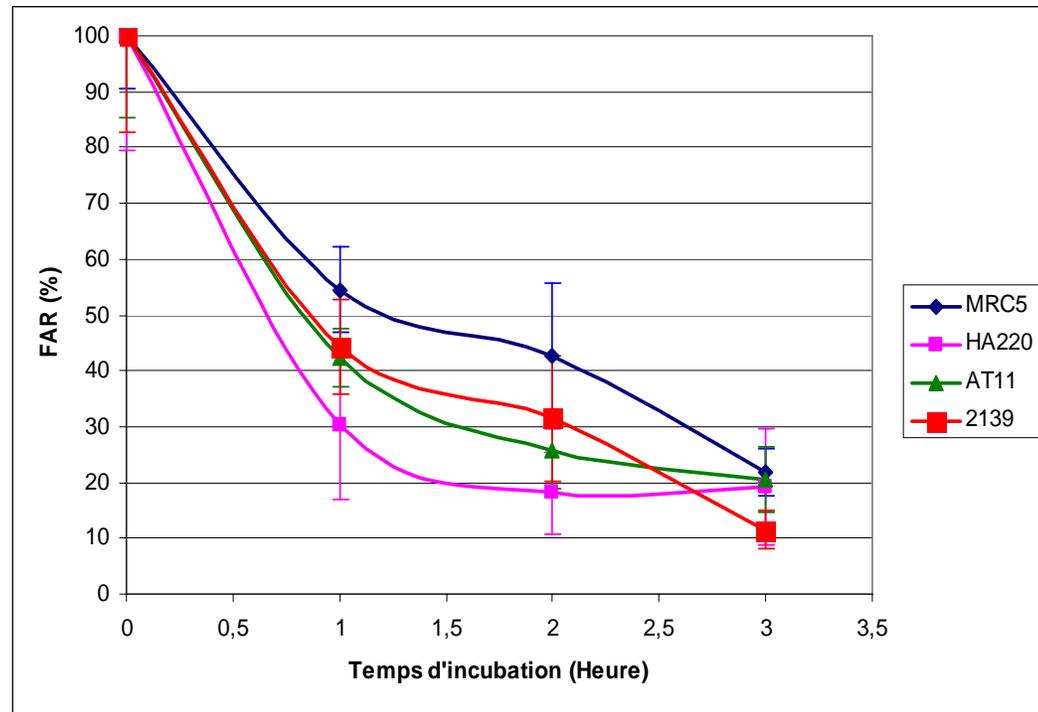
(Foray N. et al., *Biochimie* 1997;79:567-575)



-----> La réparation des CDB radioinduites est compromise dans les lymphoblastes de patients hétérozygotes pour BRCA1 et BRCA2 et homozygotes pour ATM.

Réparation des CDB radioinduites dans des lignées normale, ATM et ATM polymorphe de lymphoblastes humains

(Averbeck et coll. 2008)

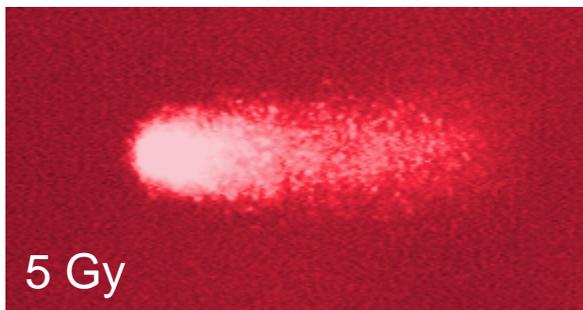
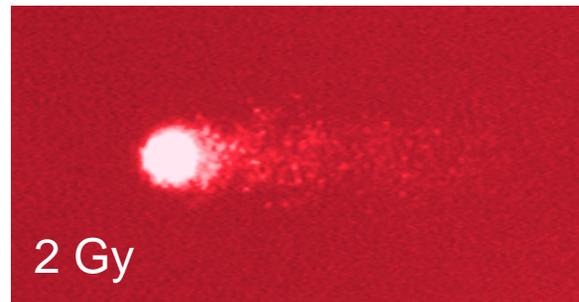
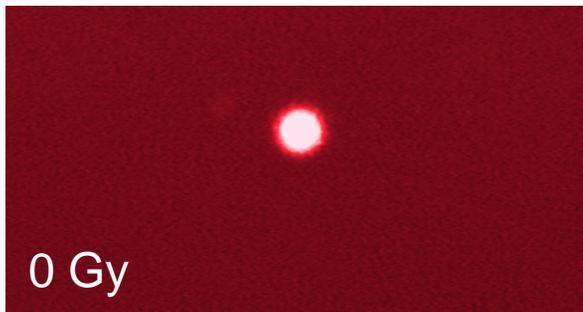


Cinétique de réparation: Après 20 Gy de rayons gamma réparation plus rapide dans les cellules de patients AT (ATM et HA220) que dans les cellules normales dans les premières heures, suivie par un plateau. Par contre, la réparation continue dans les cellules normales (2139).

Test des COMETES

Électrophorèse sur des noyaux de cellules isolées

Fragmentation de l'ADN dans les lymphocytes humains par les rayons ionisants

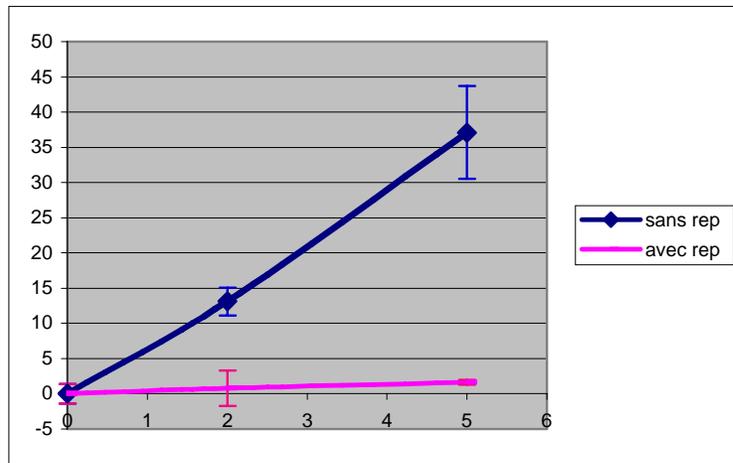


Augmentation du nombre de cassures de l'ADN en fonction de la dose d'irradiation gamma

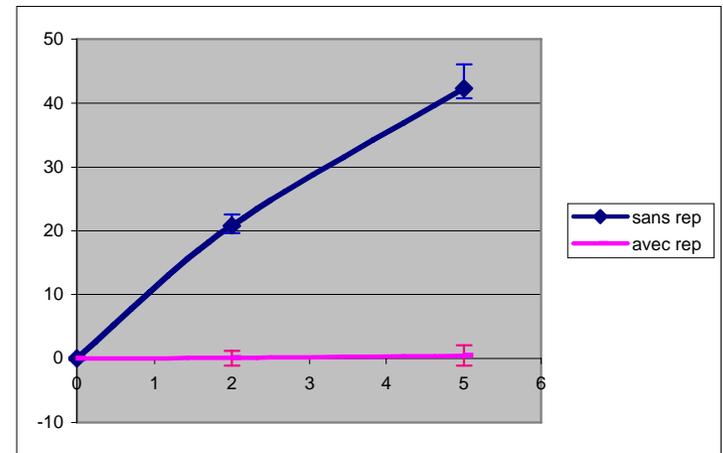
Réparation des cassures (CSB) radioinduites dans des lymphoblastes humains (test de comètes)

(Averbeck et coll. 2008)

Cellules normales (2139)

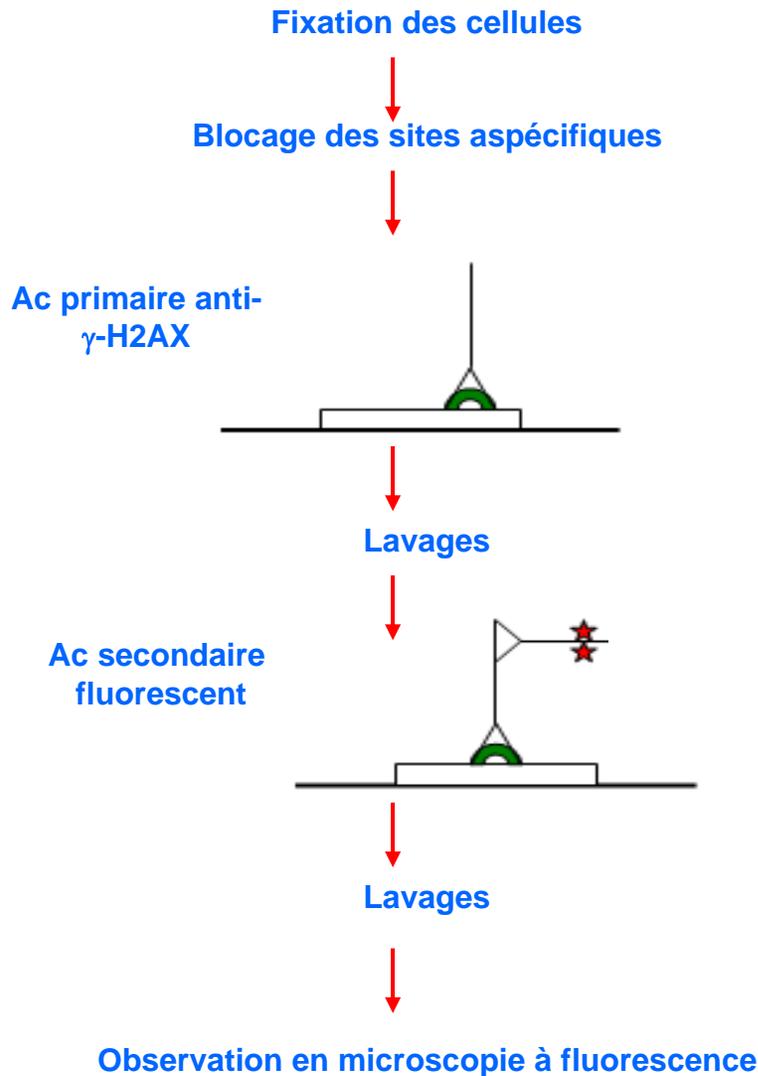


Cellules ATM (AT11)

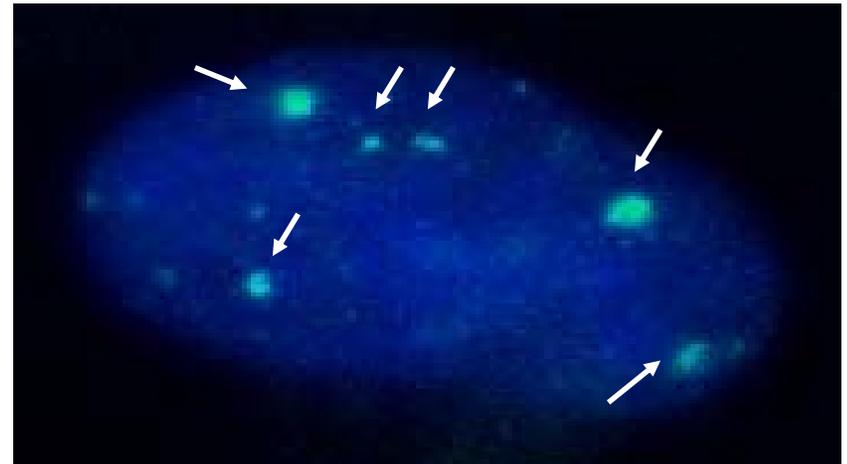


Bonne réparation des cassures de l'ADN dans les deux lignées cellulaires après 2 et 5 Gy de rayons gamma avec et sans incubation postradiative (3 heures). Une lignée polymorphe (variant) (HA220) répare aussi bien.

Détection indirecte de CDB par marquage immunofluorescent de foyers de γ H2AX

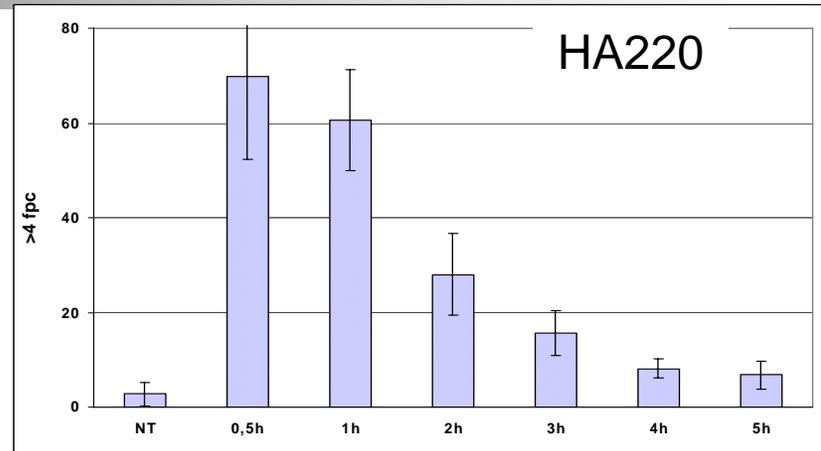
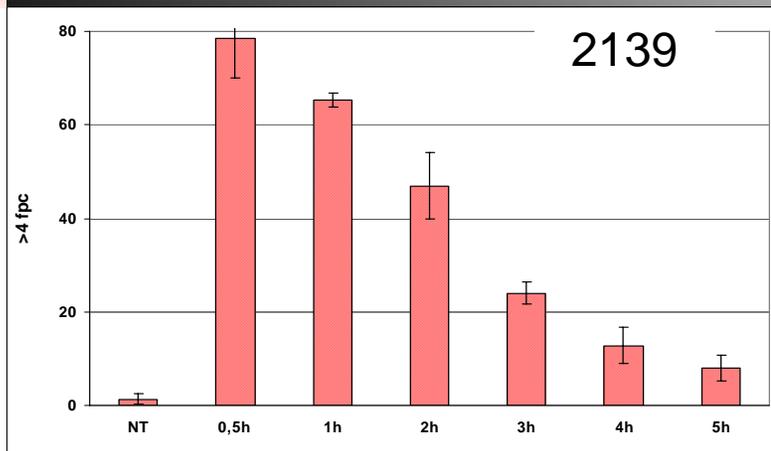


Les foyers de γ H2AX sur les sites de CDB sont quantifiables par des anticorps spécifiques (marquage par immunofluorescence)

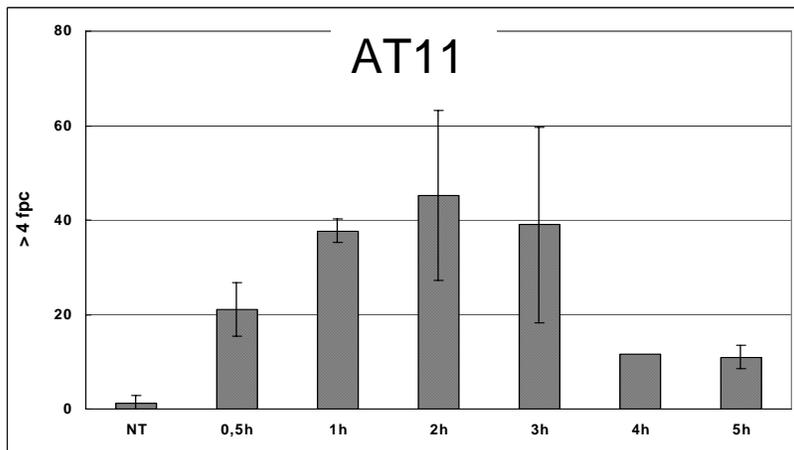


Cinétiques de réparation de CDB radioinduites (foyers de γ -H2AX)

(Averbeck et coll. 2008)



Figures : Cinétiques de la dsparition de foyers de γ H2AX après 0.5 Gy d'irradiation γ

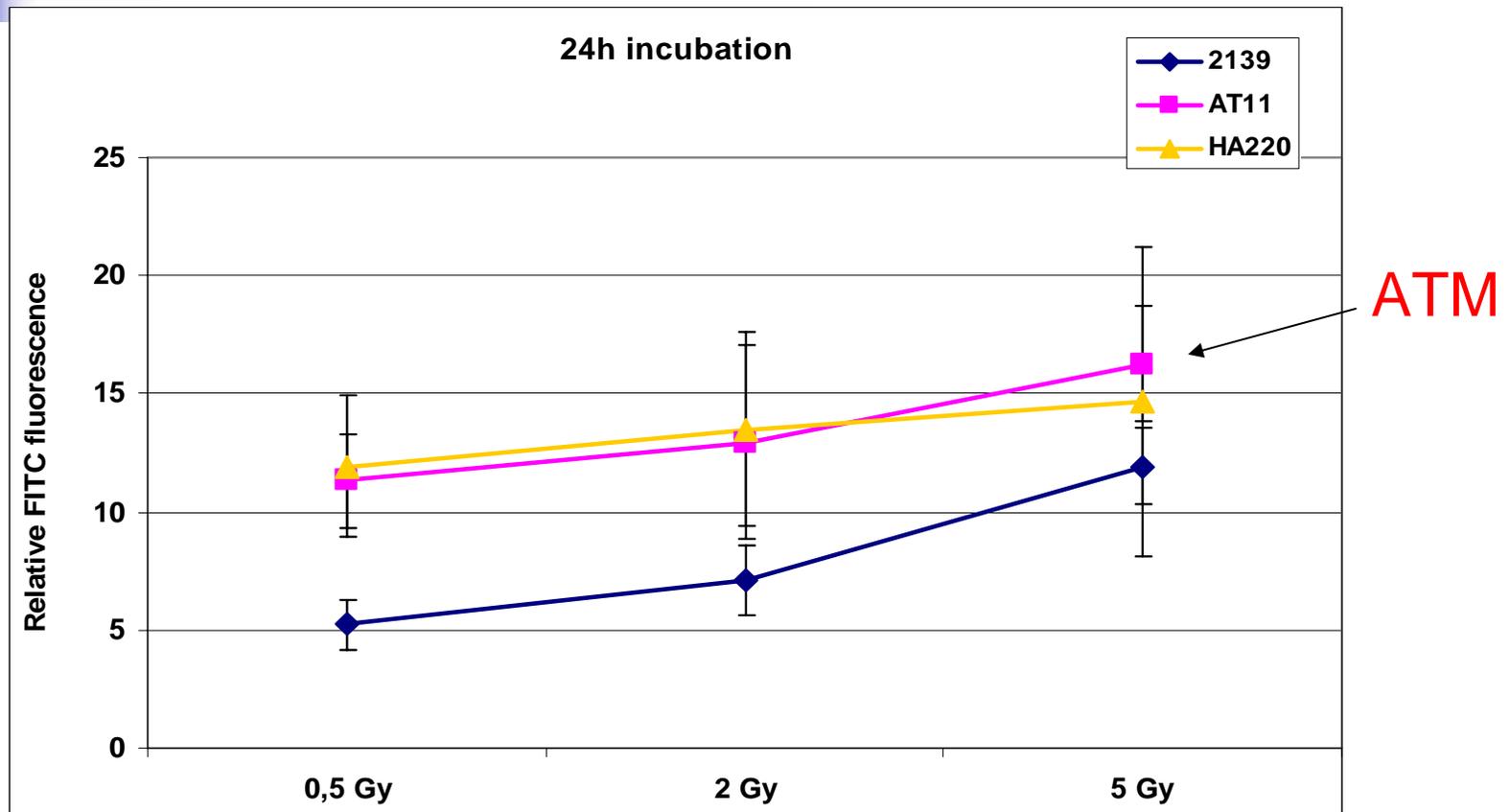


Conclusion: Les lymphoblastes humains ATM sont déficients dans la réparation des CDB, mais la lignée polymorphe (HA220) répare comme les lymphoblastes normaux (2139).

Analyse par γ H2AX en cytométrie de flux de la capacité de réparation de CDB

radioinduites

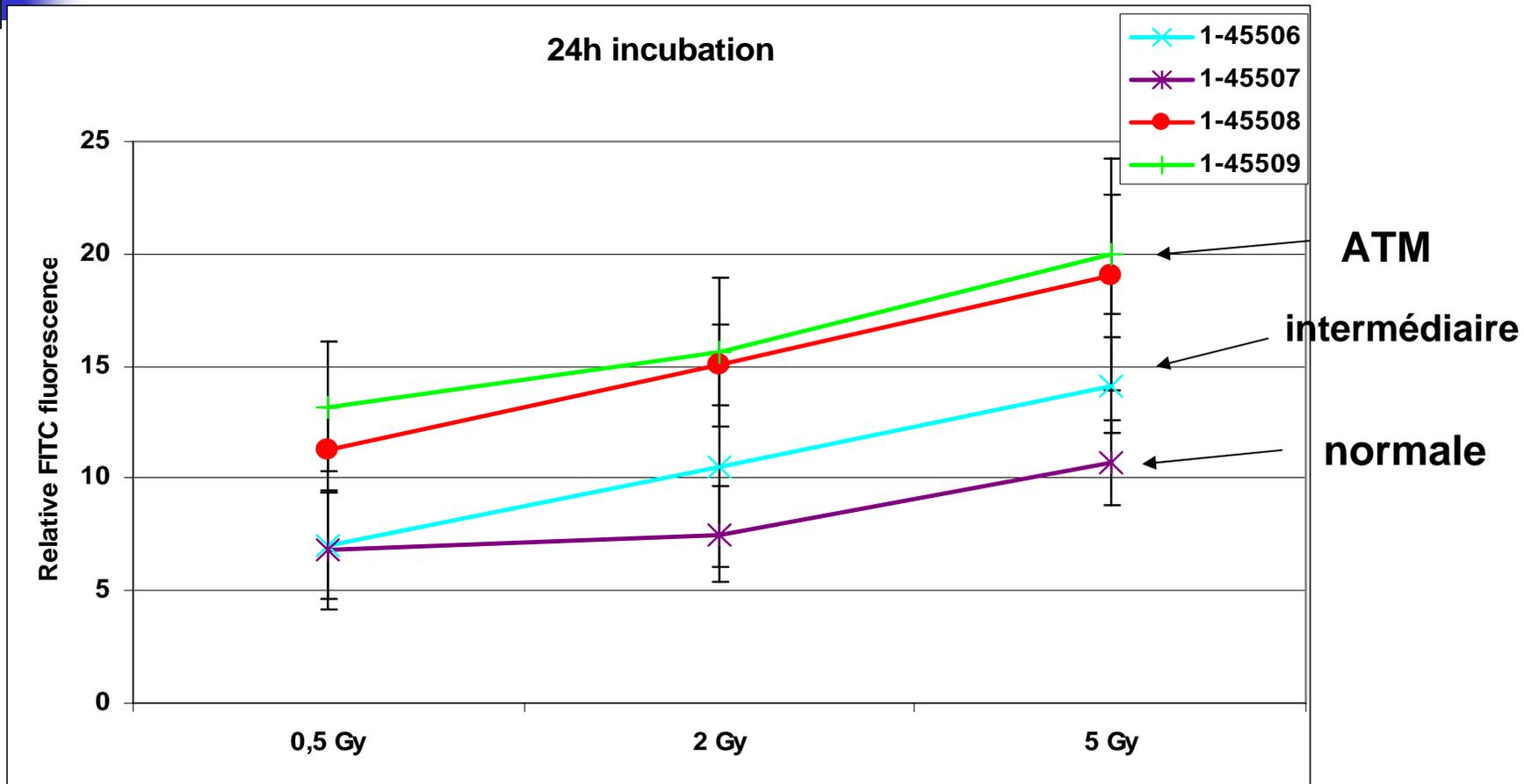
(Averbeck et coll. 2008)



Taux résiduel de CDB (fluorescence de γ H2AX) dans des lymphoblastes normaux et de lignées ATM 24h après irradiation γ .

Analyse par γ H2AX en cytométrie de flux de la capacité de réparation de CDB radioinduites

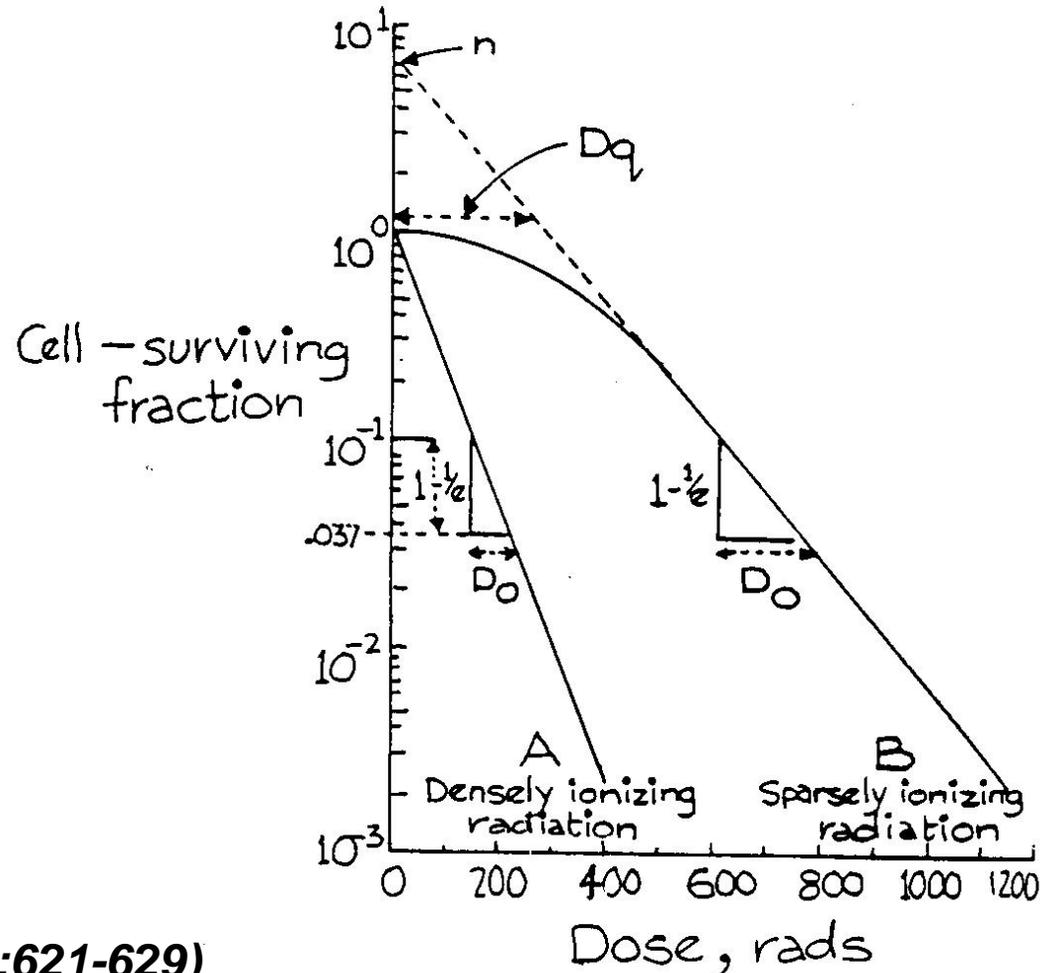
(Averbeck et coll. 2008)



Taux résiduel de CDB (fluorescence de γ H2AX) dans des lignées lymphoblastoïdes dérivées de patients traités par radiothérapie

La radiosensibilité en terme de survie cellulaire et sa modélisation $y = \alpha D + \beta D^2$

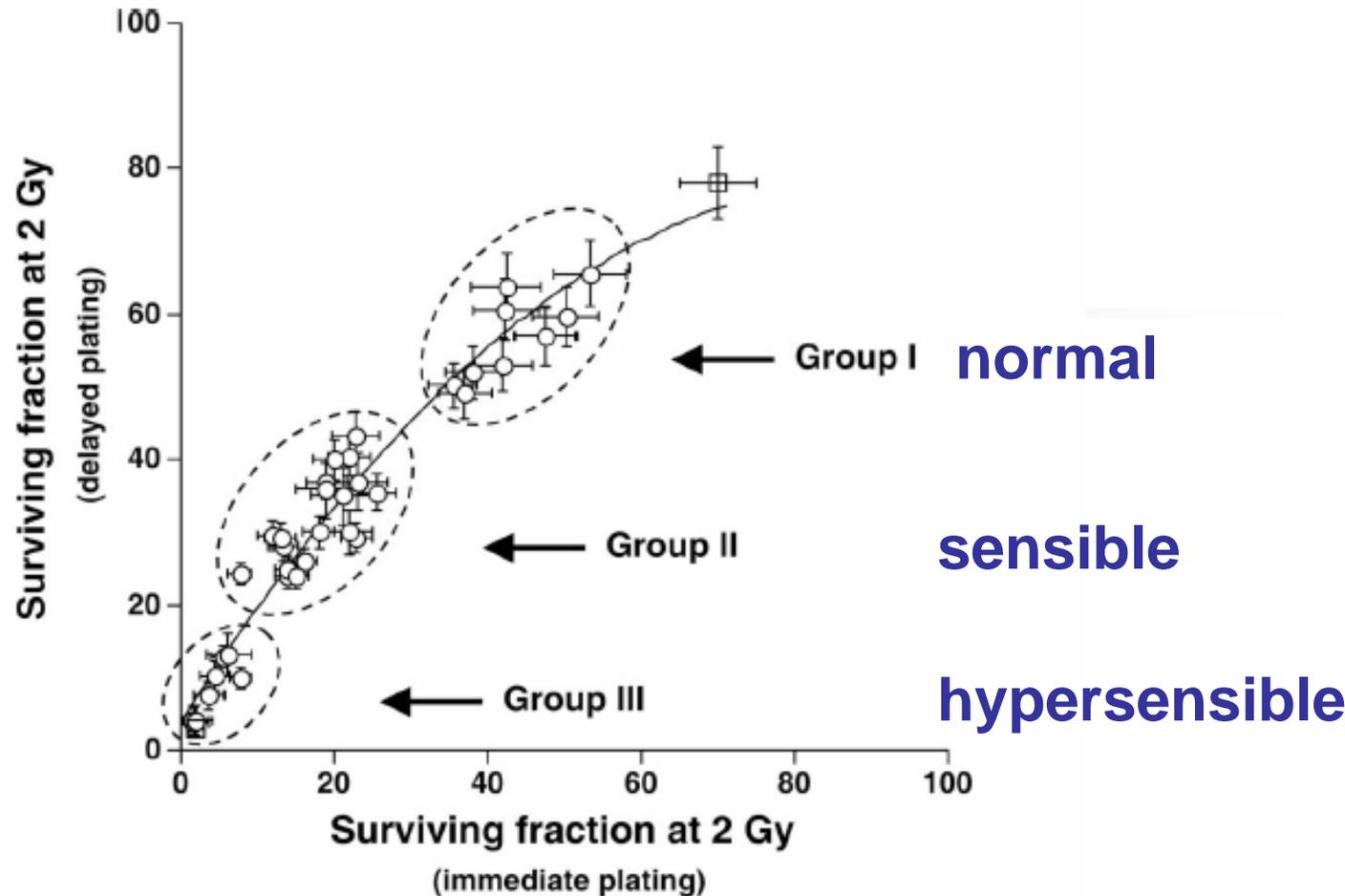
La fraction de survivants à une dose de rayons ionisants de 2 Gy (SF2) indique la radiosensibilité intrinsèque des cellules.



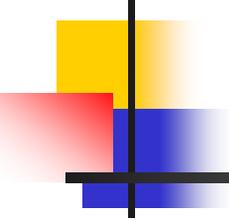
(Fertil B et Malaise EP,
J Radiat Oncol Biol Phys 1981;7:621-629)

Radiosensibilité en terme de survie à 2 Gy (SF2) de fibroblastes humains

(Joubert et al. *Int J Radiat Biol* 2008;84:107-125)

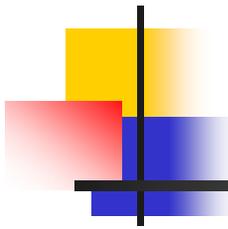


3 groupes de sensibilité différents: I: > 45%; II: 7 à 45 %; III: < 7% .



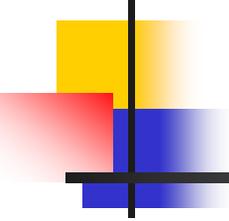
Conclusion (1)

- Des données récentes obtenues sur la diminution de la capacité de réparation de radiolésions (en particulier, celle des CDB radioinduites dans l'ADN) chez certains patients en radiothérapie semblent converger avec certaines observations cliniques d'hyperréactivité tissulaire et une radiosensibilité accrue au niveau cellulaire.
- Les capacités de signalisation et de réparation des radiolésions sont des paramètres fondamentaux de la radiosensibilité individuelle et peut-être même de la cancérogenèse induite par les radiations ou par d'autres agents génotoxiques.



Conclusion (2)

- Mutations et variants (polymorphismes) dans les gènes impliqués dans la signalisation des dommages de l'ADN et la réparation de l'ADN sont très importants pour les réponses individuelles aux radiations mais ne permettent pas une extrapolation au niveau de la population générale.
- Pour l'instant, les études épidémiologiques à grande échelle incluent déjà les réponses (radiosensibilités) individuelles mais seules des études moléculaires associées pourront prouver l'impact de la radiosensibilité individuelle sur la cancérogenèse radioinduite et permettre de définir un facteur de sensibilité dose-dépendant.



Merci pour votre attention!