



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

Université Ibn Khaldoun, Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Equipe de formation Biologie moléculaire et cellulaire



Toxicogénétique

Document de cours destiné aux étudiants de Licence et Master

Filières : Sciences Biologiques, Sciences Agronomiques, Biotechnologies, Ecologie et

Document assemble et prepapre par :

Dr. Khaled TAÏBI

Dr. Leila AIT ABDERRAHIM

Janvier 2020

Table des matières

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre 1

Toxicogénétique

1. Xénobiotiques.....	2
2. Toxicocinétique et toxicodynamie	2
2.1 Absorption et distribution des xénobiotiques	2
2.2 Métabolisme des xénobiotiques	3
2.2 Régulation du métabolisme des xénobiotiques	6

Chapitre 2

Mutagènes

1. Les mutations.....	7
2. Fréquence des mutations	7
3. Types de mutations.....	7
1. Les substitutions de paires de nucléotides	7
2. Les modifications du cadre de lecture	8
4. Les mutagènes	8
4.1 Les mutagènes chimiques	8
4.2 Les radiations	9

Chapitre 3

Mécanismes de réparation de l'ADN

1. Introduction	12
2. Nature et origine des dommages à l'ADN.....	12
3. Voies de signalisation des dommages	12
4. Systèmes de réparation de l'ADN	14
4.1 Restauration de la zone endommagée	14
4.2 Suppression de la zone endommagée	16
4.3 Tolérance de la zone endommagée.....	17

Chapitre 4

Les cassures doubles brins de l'ADN : production, signalisation et réparation

1. Nature des cassures double brins (CDB).....	20
2. Voies activées par les CDB	20
2.1. Réparation des cassures double brins par la recombinaison non homologie (NHEJ) ..	21
2.2. Réparation des cassures double brins par la recombinaison homologue (RH)	22

Introduction

La toxicogénétique, toxicologie génétique, ou génotoxicologie est une discipline qui vise à détecter les facteurs physico-chimiques qui interagissent, d'une manière directe ou indirecte, avec l'ADN des cellules somatiques et/ou germinales et qui, en l'absence de réparation fidèle, sont susceptibles de provoquer des mutations génétiques et/ou chromosomiques.

Les mutations génétiques et/ou chromosomiques sont susceptibles d'initier un processus cancérogène lorsqu'elles ont lieu sur des cellules somatiques. En cas d'atteinte des cellules germinales, l'effet génotoxique risque d'entraîner une toxicité vis-à-vis de la reproduction (reprotoxicité), et/ou un risque de transmission des mutations à la descendance.

En général, trois types de dommages génétiques sont responsables des pathologies à savoir : (i) les mutations géniques qui sont des modifications d'une ou de quelques paires de base dans un seul gène, (ii) les mutations chromosomiques de structure qui sont des translocations et inversions consécutives à des cassures double-brins directes ou indirectes, et (iii) les mutations aneugènes qui induisent une perte de chromosomes entiers.

Il est à noter que la plupart des stratégies réglementaires visant à autoriser la mise sur le marché des différents produits chimiques commercialisés et leurs conditions d'emploi recourent à la combinaison d'un examen ou test de mutations géniques sur cellules procaryotes, d'un test *in vitro* de mutation chromosomique sur cellules de mammifères, et d'un test de mutation chromosomique *in vivo* sur la moelle osseuse de rongeurs.

Chapitre 1

Toxicogénétique

1. Xénobiotiques

Les xénobiotiques sont des molécules, étrangères à l'organisme, de faible masse moléculaire. Il s'agit par exemple des médicaments, des polluants de l'eau ou de l'atmosphère, des additifs alimentaires mais également de certains composés naturels des aliments.

Les êtres vivants sont obligatoirement exposés aux xénobiotiques et doivent faire face à certaines de leurs propriétés potentiellement délétères, telles que l'hydrophobie, qui ne permet pas leur élimination de l'organisme ou leur réactivité chimique avec certains composés cellulaires.

2. Toxicocinétique et toxicodynamie

La toxicocinétique permet de déterminer la quantité de substance toxique susceptible d'atteindre sa cible et de préciser sous quelle forme (composé initial ou métabolites) elle y parvient. Cela implique les phénomènes d'absorption, de distribution tissulaire, de métabolisme et d'excrétion des xénobiotiques.

La toxicodynamie examine l'interaction du xénobiotique avec sa cible et l'effet toxique que cela produit.

L'effet toxique sera d'autant plus important que la forme toxique d'un xénobiotique est capable d'atteindre la cible et que cette dernière est sensible à l'agent exogène. De ce fait, la toxicocinétique est un élément critique de la caractérisation du danger d'une substance chimique.

Pour comprendre le mécanisme d'action des xénobiotiques, il est nécessaire de tenir compte des voies de métabolisme et de détoxification, qui paradoxalement peuvent conduire à des métabolites intermédiaires très toxiques.

La toxicité d'un composé sera donc dépendante de son mode d'absorption, mais également de son métabolisme.

2.1. Absorption et distribution des xénobiotiques

Selon les propriétés physicochimiques (masse moléculaire, degré d'ionisation, réactivité, solubilité) et les sources d'exposition, les xénobiotiques peuvent être absorbés de différentes façons (voie cutanée, orale, pulmonaire...) et distribués dans différents tissus de manière active

ou passive. Des différences existent selon la nature de la barrière à franchir (peau, poumon, paroi intestinale...) et la taille des molécules, les petites molécules pouvant franchir une ou plusieurs membranes de manière passive.

Les substances lipophiles peuvent plus facilement traverser une membrane dont les constituants sont des lipides alors que les substances ionisées seront arrêtées sauf au niveau des pores membranaires pour les plus petites molécules. La membrane des cellules constitue ainsi une barrière efficace protégeant les cellules contre des xénobiotiques hydrosolubles.

A l'inverse, les molécules hydrophobes peuvent s'accumuler et atteindre un seuil de toxicité. La relation entre la dose externe et la dose interne dépend essentiellement du niveau d'absorption, lui-même affecté par le caractère lipophile de la substance ou encore de l'efficacité des systèmes de pompes à efflux. En effet, au cours de leur évolution, les organismes ont développé des systèmes limitant l'accumulation des xénobiotiques : il s'agit en particulier de transporteurs membranaires permettant une sortie rapide des molécules indésirables et également des systèmes de détoxification. La distribution tissulaire est le processus par lequel une substance absorbée (ou ses métabolites) se répartissent dans les différents organes et tissus.

Comme pour l'absorption, les mécanismes de diffusion dépendent en premier lieu des propriétés physico-chimiques des substances. Notons que si le composé est absorbé par voie orale, il passera directement dans le foie par le système porte et sera alors distribué dans tout l'organisme (premier passage hépatique) ; s'il est inhalé (voie pulmonaire), il sera distribué dans l'organisme avant d'avoir atteint le foie.

L'élimination des substances non ionisées lipophiles (qui sont facilement absorbées et distribuées) implique l'intervention des systèmes de détoxification pour être rendues hydrosolubles et ainsi excrétées par les voies biliaire et urinaire. Ce processus de métabolisme et d'excrétion des xénobiotiques implique de nombreux systèmes enzymatiques. Il est classiquement séparé en deux phases. Au cours de la première, le xénobiotique lipophile est oxydé, réduit ou hydrolysé puis il est, au cours de la deuxième phase, conjugué à un groupement sulfate ou acétate au glutathion ou à un acide aminé.

2.2. Métabolisme des xénobiotiques

Compte tenu de la grande diversité et de la nature imprévisible de la structure chimique des xénobiotiques, les êtres vivants doivent disposer d'un arsenal diversifié d'enzymes (et d'isoenzymes) pouvant effectuer un large spectre de réactions chimiques sur des substrats ayant des structures très diverses.

Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) ont été classés selon le schéma de la figure.

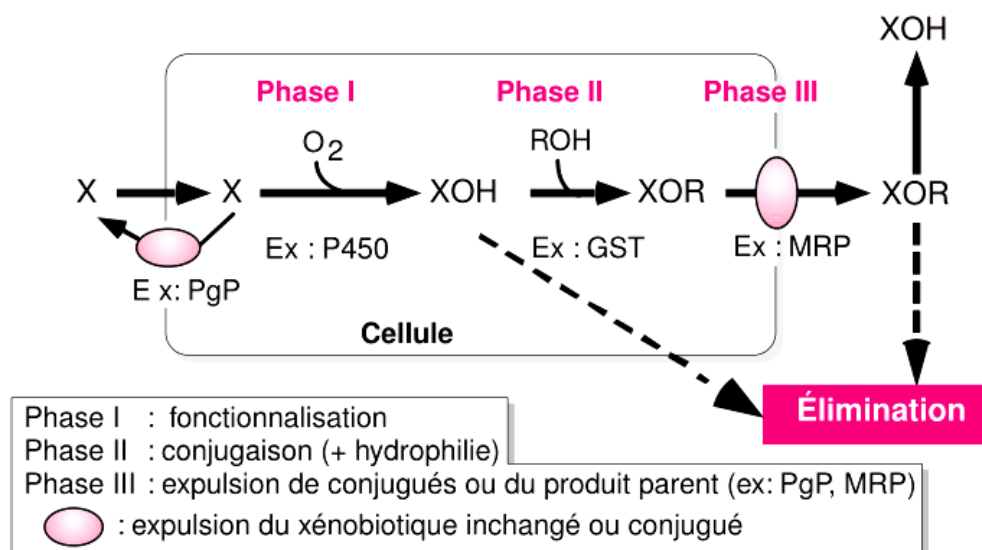


Figure. Métabolisme des xénobiotiques.

Les xénobiotiques peuvent pénétrer dans la cellule car ils sont généralement hydrophobes. Ils peuvent en être expulsés par des protéines comme la PgP, produit du gène *mdr*. Ils peuvent ensuite être fonctionnalisés par des enzymes de phase I comme les mono-oxygénases à cytochromes P450 (CYP) puis/ou être conjugués par des enzymes de phase II. Les produits de ce métabolisme peuvent ensuite être éliminés de la cellule soit directement, soit par des protéines dites de phase III comme *mrp*. Les produits finaux sont ensuite éliminés dans la bile ou les urines. Bien que des enzymes du métabolisme des xénobiotiques se retrouvent dans tous les tissus, l'essentiel de ce processus se déroule dans les hépatocytes.

Les xénobiotiques pénètrent facilement dans la cellule s'ils sont hydrophobes, mais ils peuvent également en être expulsés via des pompes telles que la PgP (P-glyco-protéine), produit du gène *mdr* (*multi drug resistance*). Les xénobiotiques sont alors pris en charge par des enzymes de phase I, dits de fonctionnalisation, dont les plus importants sont les cytochromes P450 (CYP) qui catalysent une réaction de mono-oxygénation.

Les enzymes de phase II conjuguent les xénobiotiques, fonctionnalisés ou non, avec un groupement (glutathion, acide glucuronique, méthyl, acétyl...), dont le rôle est soit de neutraliser un groupement réactif (thiol, amine, aldéhyde), soit de rendre le xénobiotique hydrophile afin de faciliter son élimination par l'organisme.

Enfin, si le métabolite obtenu est très hydrophile, il devra être transporté à travers la membrane cellulaire par des protéines de phase III, telles que le transporteur *mrp* (*multidrug related protein*). Cette famille de transporteurs comprend de nombreux membres, et s'accroît régulièrement.

Le métabolite ainsi produit pourra soit être éliminé dans la bile ou les urines, soit, après transport dans le sang ou dans la bile, être métabolisé de nouveau dans d'autres tissus possédant un autre spectre d'EMX (phase IV).

Cette classification est destinée à clarifier la compréhension du métabolisme complexe des xénobiotiques. Toutes les étapes ne sont pas obligatoires et le métabolisme de chaque composé est particulier. De nombreux métabolites peuvent être produits ; ils peuvent être plus ou moins toxiques que le produit parent, ou, s'il s'agit d'un médicament, plus ou moins actifs.

Les conséquences de ce métabolisme en termes de toxicologie sont résumées dans la figure. Certains métabolites sont plus actifs (pro-drogues), d'autres n'ont pas d'activité ou une activité différente. L'équilibre entre les métabolites toxiques et non toxiques, actifs et inactifs, dépend de la nature et de la quantité des EMX dont l'expression varie fortement en fonction de facteurs génétiques, environnementaux et physiopathologiques (figure).

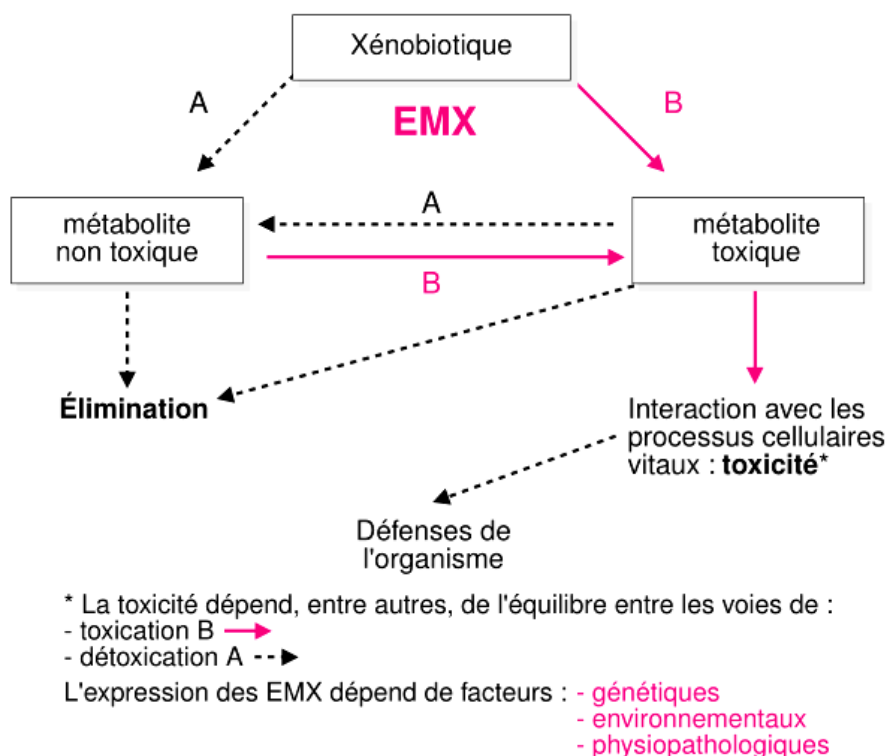


Figure. Équilibre toxication/détoxication.

Les xénobiotiques sont transformés en métabolites plus ou moins toxiques (plus ou moins actifs sur le plan pharmacologique). L'équilibre entre ces voies de toxication et de détoxification dépend de la nature et de la quantité des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX). Cette expression est très variable, en fonction de facteurs génétiques, environnementaux et physiopathologiques qui vont intervenir dans la susceptibilité individuelle aux xénobiotiques

Avant d'aborder ces variations, il est important de relever quelques propriétés particulières de ces enzymes, résumées ainsi :

- Nombreux isoenzymes
- Spécificité de substrat relative et chevauchante
- Variabilité d'expression importante :
 - Induction/répression
 - Polymorphismes génétiques
- Isoenzymes redondants
- Activité spécifique faible
- Inhibition
- Variations physiopathologiques

La spécificité relative et chevauchante (un CYP peut métaboliser plusieurs substrats, un substrat peut être métabolisé par plusieurs CYP) ainsi que la redondance (plusieurs enzymes, ou isoenzymes, peuvent prendre en charge le même substrat) sont particulièrement importantes, car elles peuvent rendre compte, par exemple, de la fréquence élevée des polymorphismes génétiques à l'origine d'un déficit enzymatique.

2.3. Régulation du métabolisme des xénobiotiques

La régulation des EMX, et plus particulièrement celle des CYPs constitue un paramètre capital de l'élimination et de l'innocuité des molécules chimiques formées après métabolisation des xénobiotiques. L'expression de ces enzymes membranaires localisées dans le réticulum endoplasmique est inductible. Elle dépend généralement de la liaison des composés à des récepteurs et constitue la première étape nécessaire à l'adaptabilité de la cellule, entraînant la transcription des enzymes de phase I et de II, ainsi que des transporteurs de la phase III. L'induction, activation ou inhibition des différentes formes de CYP peut se traduire par une modification des taux de synthèse des hormones lorsqu'elles sont prises en charge par ces enzymes. Par exemple, l'atrazine est un inducteur du CYP2C19 (aromatase) favorisant une surproduction d'œstrogène et entraînant des effets féminisants. Par des effets anti-aromatase, d'autres pesticides (propiconazole, kétoconazole, tributylétain, organochlorés) perturbent la fonction androgénique.

Il existe un polymorphisme génétique important pour plusieurs CYP, en particulier les formes 2C9, 2C19 et 2D6, conduisant à des niveaux d'expression enzymatiques très différents selon les individus. Ce polymorphisme se traduit par des différences interindividuelles de susceptibilité à l'action des toxiques. Les enzymes de phase II peuvent être également induites ou inhibées par des xénobiotiques mais dans une moindre mesure que les cytochromes P450.

Chapitre 2

Mutagènes

1. Les mutations

Les mutations sont des modifications du matériel génétique qui peuvent avoir des conséquences délétères/avantageuses sur l'organisme. Elles sont à l'origine des modifications évolutives.

Il est à distinguer entre les mutations *germinales* qui affectent les gamètes et les mutations *somatiques* qui affectent les autres cellules : les premières sont transmissibles, les autres sont une cause importante de cancers. Une mutation est rarement réversible : le plus souvent le gène muté est réparé ou détruit.

2. Fréquence des mutations

La fréquence des mutations est liée, d'une part à la dimension du gène, plus le gène renferme de régions codantes et plus la probabilité de mutation est forte), d'autre part à l'existence dans le gène de séquences fortement mutagènes ou "points chauds".

Chez l'Homme, le taux de mutations est estimé à une moyenne de 1×10^{-6} par gène et par génération. Ce taux est semblable à celui estimé chez les micro-organismes eucaryotes et procaryotes.

3. Types de mutations

3.1. Les substitutions de paires de nucléotides

Elles sont de deux types :

- *les transitions* : purine remplacée par une purine (A-G) ou pyrimidine par une pyrimidine (T-C)
- *les transversions* : pyrimidine remplacée par une purine ou l'inverse (ex. A-C).

Elles peuvent être silencieuses c'est à dire ne pas engendrer de modification d'acide aminé dans la protéine (ce qui est le plus souvent pour les modifications affectant la troisième base du triplet).

Elles peuvent aussi engendrer le remplacement d'un acide aminé par un autre (ex. CTC→Glu ; CAC→Val dans le cas de la drépanocytose) ou générer un codon "stop" écourtant prématurément la protéine : c'est une mutation efficace.

Des substitutions peuvent intervenir dans le promoteur ou la zone régulatrice du gène ou encore dans un intron et affecter la transcription, la traduction ou l'épissage de l'ARNm (cas de nombreuses hémoglobinopathies).

3.2. Les modifications du cadre de lecture

Ce sont les délétions ou les insertions.

Ex. avec la séquence d'ARNm :	AUG	CAG	AUA	AAC	GCU	GCA	UAA
On obtient	met	gln	ile	asn	ala	ala	stop
Une délétion du A initial donne :	UGC	AGA	UAA	ACG	CUG	CAU	...
	cys	arg	stop				

Les protéines résultantes sont donc écourtées et souvent non fonctionnelles.

4. Les mutagènes

Un mutagène est un agent naturel ou résultant de l'activité humaine, physique ou chimique qui peut altérer la structure de l'ADN.

4.1. Les mutagènes chimiques

On les distingue par leur mode d'action ; certains agissent par des mécanismes semblables aux mécanismes spontanés, d'autres agissent davantage comme les radiations.

4.1.1. Les analogues des bases

Leur structure chimique rappelle les purines et pyrimidines. Ils peuvent être incorporés à l'ADN lors de la réplication.

Le bromo-uracile (BU), semblable à T (Br remplace CH₃), s'apparie à A. Il a une forte tendance à se tautomériser en «enol». Elle s'apparie alors à G.

L'aminopurine, analogue de A s'apparie avec T et cause des transitions de A-T en G-C ou l'inverse.

4.1.2. Les substances chimiques altérant la structure et l'appariement des bases

L'acide nitreux provient de la digestion des nitrites (conservateurs des aliments). Il est à l'origine de déaminations (perte d'un groupe NH₃) (ex: C → U ; meC → T ; A → hypoxanthine).

La nitroso-guanidine, le méthyl-méthane-sulfonate, l'éthyl-méthane-sulfonate réagissent avec les bases en ajoutant des groupements méthyl ou éthyl. La dégradation peut aller jusqu'à la production de sites sans bases ce qui, à la réplication, est générateur de mutations.

4.1.3. Les agents intercalants

Acridine, proflavine, bromure d'éthidium sont des molécules qui s'insèrent entre les bases de l'ADN. Ceci entraîne un étirement de l'ADN. La polymérase insère alors une base surnuméraire en face de la molécule étrangère.

4.1.4. Les agents altérant la structure de l'ADN

Certaines grosses molécules se lient aux bases et qui deviennent ainsi « non codantes » (ex. NAAAF).

D'autres agents causent des liaisons intra et inter brins (ex. le psoralène trouvé dans les végétaux et utilisé dans les traitements de la peau).

Des produits chimiques causent des ruptures dans l'ADN (ex. peroxydes).

Ces agents n'induisent sans doute pas directement les mutations mais induisent des processus de réparation qui sont mutagéniques.

4.2. Les radiations

Elles sont le principal agent mutagène.

4.2.1. Le spectre électromagnétique

La lumière visible et les autres formes de radiations sont des radiations électromagnétiques. Leur longueur d'onde varie et est inversement proportionnelle à leur énergie. Parmi les courtes longueurs d'onde, l'énergie est croissante dans cet ordre: ondes FM, TV, micro-ondes, Infrarouge, visible, UV, rayons X et gamma. La fraction biologiquement active est constituée par les UV, les rayons X et gamma.

4.2.2. Les radiations ionisantes

Les rayons X et gamma sont assez énergétiques pour produire des ions réactifs (atomes chargés ou molécules) quand ils interagissent avec les molécules biologiques. On parle ainsi de radiations ionisantes.

On regroupe également sous ce terme les radiations corpusculaires, flux de particules atomiques et subatomiques émises par les éléments radioactifs. Elles sont de deux types : les particules alpha (noyau de l'hélium $2H^+ + 2$ neutrons) et les particules bêta (des électrons).

Les UV ne sont pas ionisants mais peuvent réagir avec l'ADN ou d'autres molécules biologiques. L'unité utilisée pour évaluer les radiations ionisantes est le rem (Röntgen Equivalent Man): 1 rem de n'importe quelle radiation ionisante produit le même effet biologique.

4.2.3. Les sources de radiations

Les sources naturelles produisent des radiations "d'arrière-plan". Ce sont les rayons cosmiques (incluant le rayonnement solaire), les éléments radioactifs du sol ou des produits du sol (bois, pierre) et de l'atmosphère (radon).

Les autres sources sont artificielles : rayons X pour le diagnostic, essais nucléaires, TV, etc. Dans l'ensemble, le taux moyen d'exposition est de 350 mrem/an, l'essentiel étant dû au radon.

4.2.4. Effets biologiques des radiations

Les dégâts causés aux cellules par les radiations sont le résultat de la production de radicaux libres issus de l'eau (le radical OH ou hydroxyl). Les radicaux libres possèdent des électrons non appariés et sont chimiquement très réactifs. Ils interagissent avec l'ADN, les protéines et les lipides des membranes.

Les dégâts causés ont pour conséquences l'atteinte d'organelles, le blocage de la division cellulaire ou la mort de la cellule.

Les cellules à cycle cellulaire court (cellules souches de la moelle osseuse, lignée du tractus gastro-intestinal) sont les plus touchées.

La sévérité des effets dépend de la dose reçue :

- *Dose létale* (100-250 rems): nausées et vomissements, période de latence de 1 à 2 semaines suivie de malaises, anorexie, diarrhée, perte des cheveux, puis récupération.
- *Dose sub-létale* (350-450 rems): nausées et vomissements, latence d'une semaine suivie par des symptômes sévères avec des hémorragies internes ; 50% de risque mortel dû à l'altération des cellules sanguines et gastro-intestinales
- *Dose supra-létale* (>650 rems): nausées et vomissements, état de choc, douleurs abdominales, diarrhées, fièvres, et mort en quelques heures en raison d'atteintes du système nerveux et du cœur.

4.2.5. Les effets génétiques des radiations ionisantes

Les radiations ionisantes ont de nombreux effets sur l'ADN à la fois par les radicaux libres qu'elles créent et par action directe:

- Ruptures dans l'un ou les deux brins (qui peuvent conduire à des réarrangements, délétions, perte de fragments de chromosome, ou la mort de la cellule en l'absence de réparation).
- Altération ou perte de bases (mutations)
- Enchevêtrement de l'ADN avec lui-même ou avec des protéines

Il y a une relation entre la dose de rayonnement et le taux de mutations, l'effet des radiations étant cumulatif.

4.2.6. Les effets des UV

Ils ne sont pas parmi les plus énergétiques et ne sont pas ionisants, mais leurs longueurs d'onde sont absorbées préférentiellement par des bases de l'ADN et par les acides aminés aromatiques des protéines.

On distingue parmi les UV:

- les UV-C (180-290 nm): les plus énergétiques. Ils sont létaux mais absorbés par la couche d'ozone.
- les UV-B (290-320 nm): ils peuvent être létaux. Ils constituent le rayonnement mutagène de la lumière solaire.
- les UV-A (320-visible): ils ont des effets délétères parce qu'ils créent des radicaux oxygène mais ils produisent peu de dimères de la pyrimidine.

Les lampes à bronzer produisent des UV-A et des UV-B.

La plupart des lésions létales sont des dimères entre bases pyrimidiques (T-T ou T-C) dans l'ADN, résultat de l'établissement d'une liaison covalente entre pyrimidines adjacentes sur un brin.

Ces dimères comme la majeure partie des lésions d'origine chimique, bloquent la transcription et la réplication. Elles sont létales si elles ne sont pas réparées. Elles génèrent aussi des mutations et des réarrangements chromosomiques.

Chapitre 3

Mécanismes de réparation de l'ADN

1. Introduction

En dépit du fait que l'ADN soit important pour la vie cellulaire, celui-ci est fragile. Il peut être soumis à de nombreux stress naturels qu'ils soient endogènes ou exogènes.

2. Nature et origine des dommages à l'ADN

Le métabolisme cellulaire normal produit entre autres des espèces réactives de l'oxygène, sources de nombreux dommages. D'autre part, l'environnement soumet en permanence un organisme à différentes agressions, tel le rayonnement ultraviolet (UV), les radiations ionisantes ou des agents génotoxiques. Parfois, des molécules toxiques pour l'ADN sont utilisées comme outil thérapeutique, notamment en chimiothérapie. Les lésions ainsi générées sont de natures très diverses : bases altérées ou perdues, liens intra- ou inter-brins, dimères de thymines, cassure simple ou double brin.

Il est intéressant de noter que le métabolisme de l'ADN lui-même est source de dommages. Ainsi, les polymérases, qui réalisent la copie à l'identique de l'ADN lors de la réplication, commettent parfois des erreurs qui rompent la complémentarité entre les deux brins.

Ainsi, de nombreux dommages peuvent survenir au niveau de l'ADN. S'ils sont laissés tels quels, les conséquences peuvent être graves pour la cellule et ses descendantes, en fonction de la nature de la lésion. Les lésions nucléotidiques peuvent résulter en des mutations ponctuelles transmises à la descendance, ce qui est à l'origine de nombreuses maladies génétiques. Par exemple, de nombreuses mutations ponctuelles dans le gène de la dyskérine ont été identifiées comme responsables de la dyskératose congénitale, une maladie liée à des problèmes télomériques. Une cassure double brin non réparée peut quant à elle résulter en la perte de la portion du chromosome ne comportant pas de centromère lors de la division cellulaire, perte délétère pour la cellule. Elle peut ainsi entraîner une aneuploïdie (nombre anormal de chromosomes dans une cellule) ou des translocations entre régions de chromosomes, ce qui peut rapidement affecter la viabilité cellulaire en supprimant ou modifiant une partie de l'information génétique disponible.

3. Voies de signalisation des dommages

La reconnaissance d'un dommage à l'ADN met en place, en parallèle de la réparation, une voie de signalisation qui optimise les conditions cellulaires pour la réparation du dommage (Figure).

Chez *S. cerevisiae*, elle implique l'activation de deux protéines kinases centrales, Tel1 (ATM chez les Mammifères) et Mec1 (ATR chez les Mammifères). Le point de contrôle Tel1 reconnaît de préférence les extrémités franches des cassures double brins. Par contre, le point de contrôle Mec1 est activé préférentiellement par l'ADN simple brin. Rappelons qu'excepté au brin discontinu des fourches de réplication et aux télomères, l'ADN simple brin n'est pas une structure ordinaire dans la cellule. Il est souvent un intermédiaire pour la réparation des dommages, notamment par les voies d'excision de base et de nucléotides.

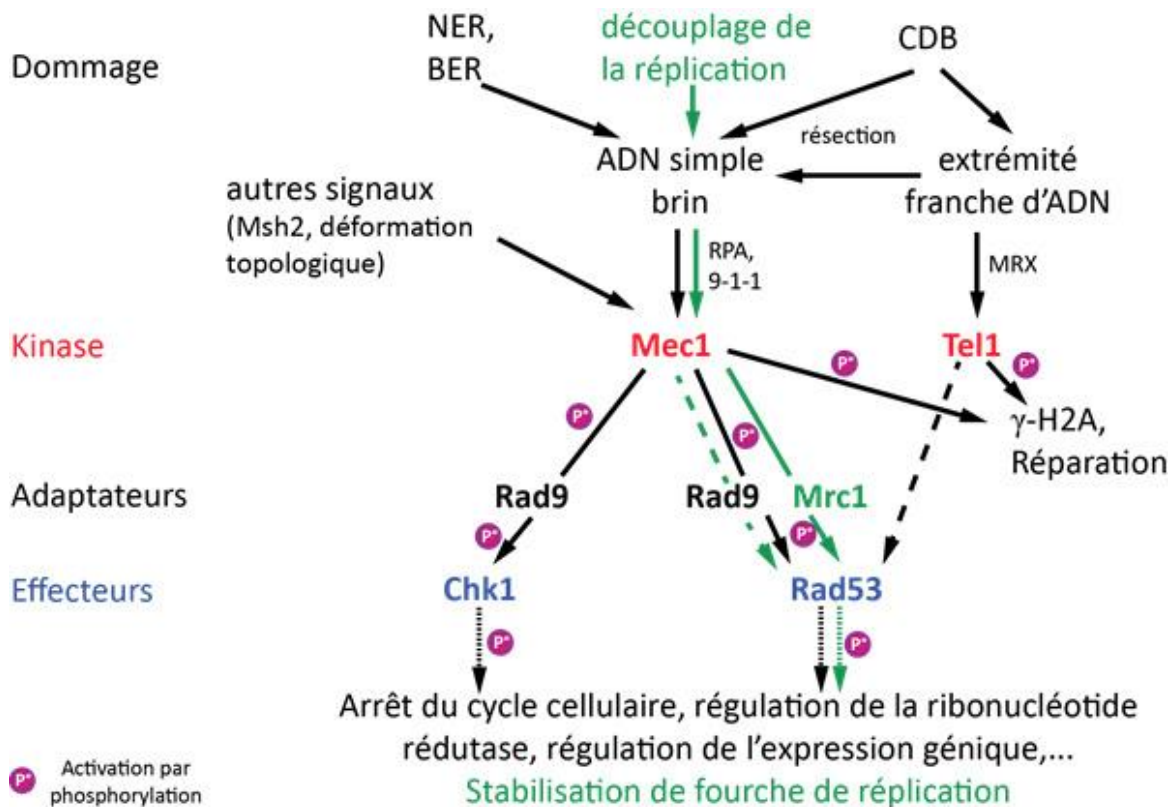


Figure. Voie de signalisation des dommages à l'ADN

Les principaux constituants de la voie de signalisation en réponse à un dommage à l'ADN chez *S. cerevisiae* sont représentés, ainsi que les événements de phosphorylation. L'apparition d'un dommage à l'ADN crée des structures qui permettent l'activation des points de contrôles cellulaires Mec1 et Tel1. Ceux-ci activent la transduction du signal par une cascade de phosphorylations. En vert, la voie de signalisation activée en cas de dommage réplcatif. Les tirets indiquent une voie secondaire.

L'activation de Tel1 et Mec1 permet la phosphorylation de l'histone H2A sur plusieurs milliers de bases autour de la cassure, ce qui favorise la réparation. L'activation de Mec1 entraîne alors la transduction du signal via une cascade de phosphorylations ce qui conduit à une grande variété de réponses. L'arrêt du cycle cellulaire en G2/M est essentiel pour permettre la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue, un processus qui nécessite plusieurs fois la durée normale d'une division cellulaire. De plus, le pool de nucléotides dans la cellule est modifié et l'expression de nombreux gènes est changée. Cette signalisation permet aussi la stabilisation des fourches de réplication en phase S. Ces nombreuses réponses mettent en place

les conditions cellulaires favorables à la réparation, et Mec1 est l'acteur central de cette cascade de signalisation.

Un mécanisme similaire est mis en place par les homologues de ces protéines chez les Mammifères et implique notamment p53, un suppresseur de tumeur central dans la signalisation des dommages à l'ADN.

Une fois le dommage réparé, un processus de récupération se met en place. La réparation de la lésion entraîne l'arrêt de sa reconnaissance comme un dommage et, accompagnée d'une désactivation de la cascade de signalisation par déphosphorylation de ses composants, permet à la cellule de retrouver un cycle cellulaire normal. Tout au long de la signalisation et de la récupération, le signal est régulé finement grâce à la dégradation de ses composants par le système ubiquitine-protéasome. Parfois, quand le dommage ne peut être réparé, un processus similaire d'adaptation permet à la cellule de redémarrer son cycle cellulaire pour quelques divisions, avant que les conséquences directes du dommage non-résolu n'entraînent la mort cellulaire. Ainsi, la voie de signalisation des dommages permet de coordonner l'ensemble de la réponse cellulaire à la présence d'une lésion à l'ADN.

4. Systèmes de réparation de l'ADN

Les dommages à l'ADN intervenant spontanément et résultant d'agents de l'environnement existant en permanence, la plupart des organismes possèdent des capacités à réparer leur ADN.

Une fois la signalisation des dommages radio-induits mise en place, une partie de la réponse cellulaire aux dommages consiste à activer les systèmes de réparation des lésions de l'ADN. La signalisation et la réparation des dommages sont par ailleurs deux phénomènes très liés. Pour réparer les cassures induites, la cellule dispose de plusieurs mécanismes de réparation qui sont spécifiques des dommages. Ces systèmes sont très importants et leur dysfonctionnement entraîne un syndrome souvent caractérisé par une instabilité génétique et une prédisposition au cancer.

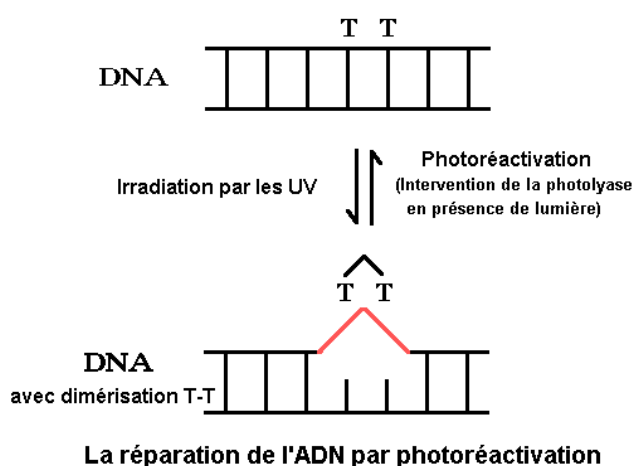
L'ADN est la seule macromolécule à être réparée par les cellules. Les mécanismes sont de trois types:

- *la restauration de la zone endommagée* : c'est le plus simple. Une action enzymatique restaure la structure sans casser le squelette
- *la suppression de la zone endommagée* : les bases ou le groupe de nucléotides incorrects sont remplacés.
- *la tolérance de la zone endommagée* : il n'y a pas de réparation ; le dommage est accepté.

4.1. Restauration de la zone endommagée

4.1.1. La photo-réactivation

Il est à la fois le plus simple et sans doute le plus ancien des systèmes de réparation. Une simple enzyme peut dissocier la dimérisation (en cassant les liaisons covalentes) en présence de lumière. L'enzyme est une *photolyase* ; elle est présente et fonctionnelle chez les procaryotes. Elle est également présente chez de nombreux eucaryotes, comme les levures, les plantes et la plupart des animaux. Elle n'est pas présente chez les mammifères placentaires, et donc chez l'homme, mais existe en revanche chez les mammifères marsupiaux.



De nombreux eucaryotes évolués possèdent de plus une protéine homologue appelée *cryptochrome*, dépourvue d'activité de réparation de l'ADN, qui est impliquée dans des activités régulatrices photosensibles comme celle influençant les rythmes circadiens.

La photolyase est une enzyme qui répare certains des dommages causés dans l'ADN par les ultraviolets et en particulier les dimères de thymine ou plus généralement de pyrimidine. La protéine agit sous l'action d'une lumière bleue ou UV proche, qui excite un cofacteur : la flavine réduite. Celle-ci peut alors transférer un électron au dimère de pyrimidines, ce qui entraîne la scission de ce dimère et la réparation de l'ADN. Ce mécanisme très rapide est encore mal connu mais il implique deux photo-réactions bien distinctes :

- *La photo-activation* sert à mettre le cofacteur FAD de l'enzyme sous la forme doublement réduite (FADH^-) à partir de la forme semi-réduite (FADH^\bullet , un radical qui est assez stable dans la photolyase). Cette réaction peut être déclenchée par la lumière visible (jusqu'à 680 nm) absorbée par FADH^\bullet .

- *La photo-réparation* a lieu lorsque l'enzyme se lie à l'ADN qui porte un CPD (Cyclobutane Pyrimidine Dimère : Liaisons covalentes entre 2 pyrimidines : généré par UV).

Cette réaction nécessite l'excitation du FADH^- par un photon bleu ou proche UV.

4.1.2. La réparation des ruptures sur un seul brin

Les rayons X et quelques produits chimiques comme les peroxydes peuvent causer des ruptures dans le squelette de l'ADN.

Les ruptures sur un seul brin sont rapidement réparées par une ligase. Les microbes mutants n'ayant pas cette ligase ont tendance à avoir des taux de recombinaisons élevés puisque les extrémités de l'ADN sont très recombinantes. On connaît un cas chez l'Humain (46BR) avec des mutations sur les deux gènes codant pour les ligases I de l'ADN : sa croissance est ralentie ; il est immuno-déficient, a une sensibilité accrue aux UV et décède précocement d'un lymphome.

Les fibroblastes de 46BR sont très sensibles aux agents mutagènes. Le bloom syndrome (défiance héréditaire rare) est également en rapport avec une défiance de la ligase de l'ADN (bien que la protéine mise en cause soit une ADN hélicase). Les patients ont de fort taux d'aberrations chromosomiques et de nombreuses mutations spontanées.

4.2. Suppression de la zone endommagée

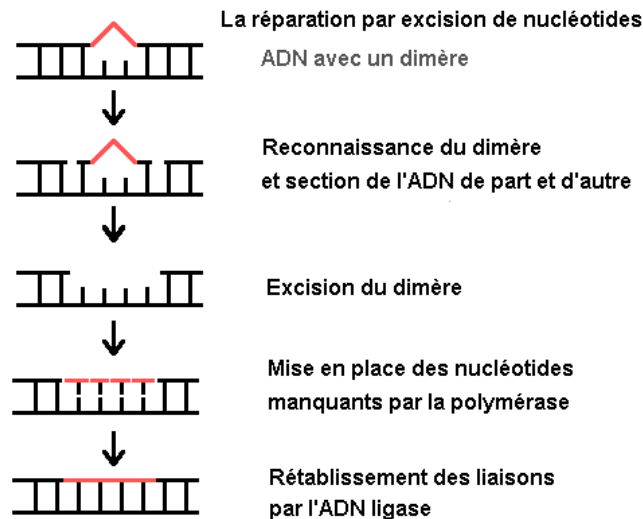
4.2.1. La réparation par excision de bases

La base inappropriée est détachée de sa liaison avec le sucre et remplacée. Ce sont des glycosylases qui rompent la liaison. Par exemple l'uracile-glycosylase sépare l'uracile de l'ADN. L'uracile n'est pas habituellement dans l'ADN, mais peut exister si la cytosine est désaminée (ce qui est potentiellement mutagène). L'enzyme reconnaît l'uracile et coupe la liaison glycosyl avec le désoxyribose. La base est alors excisée et une nouvelle base est insérée par la polymérase en utilisant le deuxième brin comme matrice. Les mutants qui ont une absence de l'uracile-glycosylase ont un taux élevé de mutations (la mutation C→U n'est pas réparée ce qui aboutit à des transitions) et une hypersensibilité à l'acide nitreux (ce qui entraîne des mutations C→U par désamination).

4.2.2. La réparation par excision de nucléotides

Ce mécanisme intervient sur les dommages importants de l'ADN qui créent des blocages de la réplication et de la transcription (tels que les dimères induits par les UV et des produits chimiques). Ils ne sont sans doute pas reconnus comme des défauts de structure mais par la distorsion de la double hélice qu'ils engendrent.

Il consiste en un clivage du brin d'ADN de chaque côté de la liaison par des endonucléases. La polymérase complète ensuite la zone manquante. Des mutants qui ne peuvent mettre en place ce type de réparation ont été isolés : ils sont sensibles à l'UV et aux produits chimiques agissant comme les UV.



Ainsi l'affection héréditaire *Xeroderma pigmentosum* caractérisée par une sensibilité accrue au soleil est responsable de l'apparition de cancers de la peau dans les zones exposées. Ils ont des gènes de réparation par excision déficients. Les organismes inférieurs présentant une sensibilité accrue aux UV ont un taux élevé de mutations: ils sont incapables de réparer les dimères de pyrimidine et font appel à des systèmes mutagènes ou recombinants.

4.2.3. La réparation des mauvais appariements

Ce processus intervient après la réplication de l'ADN à la manière d'un "correcteur orthographique". Il est réalisé par un groupe de protéines qui peuvent "scanner" l'ADN et détecter les paires de bases incorrectes ou mal appariées. Le nucléotide incorrect est supprimé et l'ADN-polymérase opère un deuxième passage pour rétablir la séquence convenable.

Des protéines réparatrices de mauvais appariements ont été récemment identifiées chez l'Homme. Elles sont très semblables à celles de *Escherichia Coli* et la levure; des mutations ayant une incidence sur ces protéines affectent la lignée germinale et génèrent quelques cancers héréditaires (colon).

4.3. Tolérance de la zone endommagée

Tous les dommages de l'ADN ne peuvent être réparés immédiatement, certains persistent. Si un œil de réplication contient des altérations (par exemple un dimère de pyrimidine), il y a normalement blocage de la réplication.

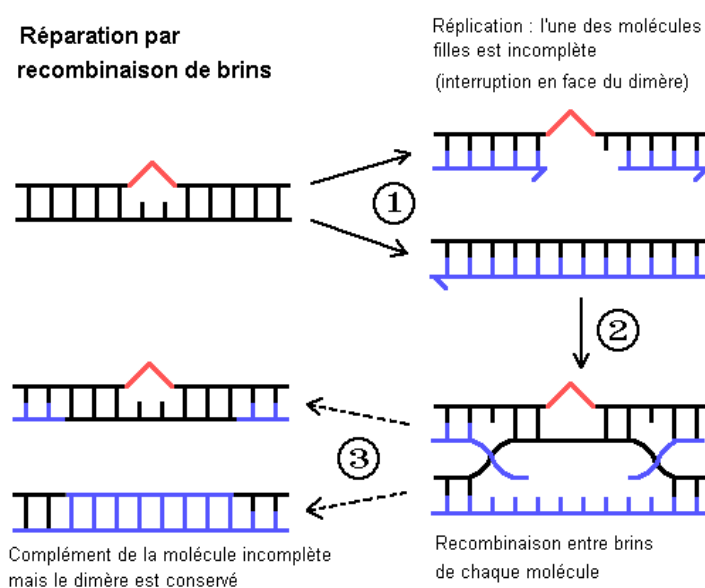
Cependant, chez les Eucaryotes, la réplication peut être initiée à de nombreux endroits. Elle peut donc reprendre au-delà du dimère, laissant un secteur de la molécule non répliqué. Ceci peut avoir des conséquences importantes en cas de division cellulaire. Toutefois, il y a un moyen de

réparation par recombinaison avec l'autre chromatide ou la chromatide sœur, ce qui aboutit à deux molécules sœur intactes, l'une d'elle contenant encore le dimère.

4.3.1. La réparation par recombinaison entre molécules-filles

Ce mécanisme induit une recombinaison pour résoudre une interruption sur l'une des molécules-filles et traiter une lésion non codante sur l'ADN. Ce mode est en général précis (bien que pouvant être à l'origine de doubles allèles récessifs altérés). Il requiert une chromatide-sœur ou homologue.

Les produits des gènes de susceptibilité au cancer du poumon (gène BRCA1 et BRCA2) peuvent être concernés par ce type de réparation (homologues des gènes RAD51 et RAD52 de la levure).

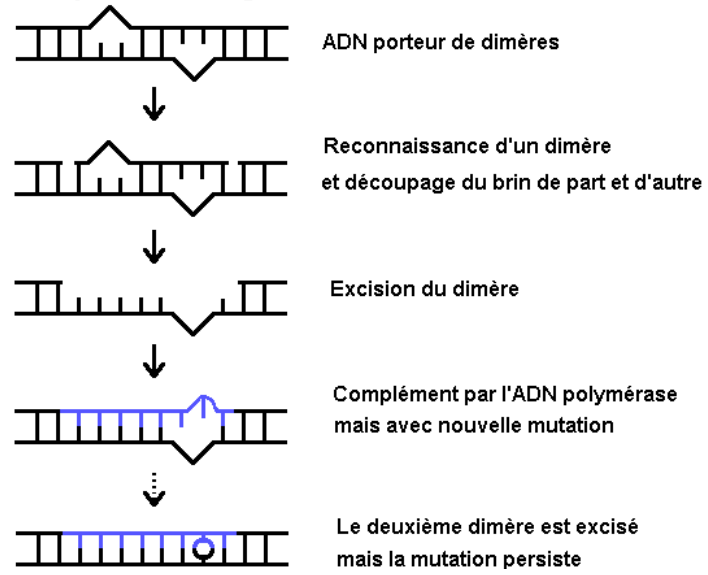


Un autre type de réparation par recombinaison (utilisé pour réparer les extrémités cassées de l'ADN) est la réaction d'union d'extrémités non homologues. Ce système est aussi employé par les Lymphocytes B et T pour les réarrangements géniques. Les protéines KU70, KU80 et la protéine-kinase ADN-dépendante sont requises. Les lignées cellulaires déficientes au niveau de ces gènes sont sensibles aux radiations ionisantes et déficientes dans le réarrangement pour les cellules immunitaires.

4.3.2. La réparation mutagène

Un scénario alternatif au blocage de la réplication par un dimère est d'insérer un nucléotide en face du dimère pour poursuivre la réplication (scénario "mute" ou "meurt"). Ce mécanisme est connu chez les bactéries et intervient probablement chez les Eucaryotes.

La réparation mutagène



Chapitre 1

Les cassures doubles brins de l'ADN : production, signalisation et réparation

1. Nature des cassures double brins (CDB)

Plusieurs types de dommages sont induites par le métabolisme cellulaire ou par des conditions environnementales. Parmi les lésions les plus fréquentes on retrouve les cassures simple brins, les pontages de l'ADN ou les cassures double brins.

Les cassures double brins de l'ADN peuvent être générées, à une faible fréquence, par le métabolisme ou suite à la réplication à proximité d'une cassure simple brin. Mal réparées ou non réparées, ces lésions peuvent entraîner la mort de la cellule par apoptose c'est pour ça qu'elles sont considérées les plus toxiques pour la cellule. Alternativement, une cassure peut engendrer des réarrangements chromosomiques, sources d'instabilité génomique.

2. Voies activées par les CDB

Après l'induction des cassures, la cellule détecte et signale les cassures double brins en mettant en jeu plusieurs mécanismes qui font intervenir des protéines de détection des dommages (complexe MRE11/RAD50/NBS1, Ku), des protéines de transduction (kinases ATM, ATR et DNA-PKcs) et des protéines effectrices (protéines de la réparation, du contrôle du cycle cellulaire ou de l'apoptose).

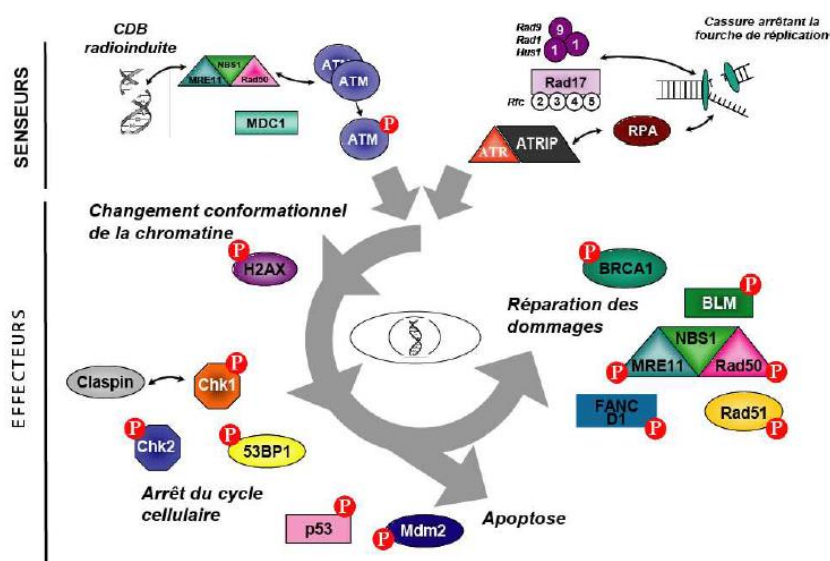


Figure. Signalisation des dommages de l'ADN.

L'induction d'une cassure double brin induit respectivement la reconnaissance de cassures radioinduites par ATM (CBD radioinduite), ou par ATR (pour le blocage au niveau d'une fourche de réplication). Ces deux kinases vont ensuite phosphoryler les protéines effectrices de la réponse cellulaire intervenant dans les différents modèles (Arrêt du cycle, apoptose ou réparation).

Ces voies de signalisations coordonnent la réponse cellulaire consécutive à l'irradiation qui regroupe les points de contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation par NHEJ ou RH dans un réseau complexe. Certaines mutations de ces protéines sont à l'origine de plusieurs pathologies humaines.

Les cassures doubles brins sont réparées par deux mécanismes distincts : (i) la recombinaison homologue (RH) qui nécessite l'utilisation d'une molécule d'ADN homologue à la molécule lésée (ii) la ligature des extrémités de la cassure n'utilisant pas ou peu d'homologie de séquences (NHEJ).

2.1. Réparation des cassures double brins par la recombinaison non homologie (NHEJ)

- Mécanismes moléculaires de la recombinaison non homologue

A l'heure actuelle, il est admis que la voie par re-ligation non homologue (Non Homologous End Joining 'NHEJ') est prépondérante dans les cellules de mammifères. Le NHEJ est opérationnel dans toutes les phases du cycle cellulaire et il pourrait s'agir d'un mécanisme de réparation immédiat dans les cellules humaines.

Un modèle simplifié, actuellement admis, présente les premières étapes du NHEJ comme suit : l'hétérodimère Ku70/80 fixe les extrémités d'ADN double brin au niveau de la cassure, puis DNA-pkcs est recrutée et interagit avec l'ADN fixé à Ku pour former le complexe DNA-PK. Deux protéines DNA-PKcs, de part et d'autre de la cassure, en association avec Ku, assurent le maintien des extrémités dans une configuration permettant la maturation puis la ligation des extrémités d'ADN. Une fois activée, DNA-PKcs phosphoryle XRCC4 stimulant l'activité de ligation de XRCC4/Ligase IV.

Le complexe XRCC4/Ligase IV associé à la protéine XLF assure l'alignement des deux extrémités d'ADN indispensable à la poursuite de la réaction. Les extrémités sont susceptibles d'être modifiées quelques peu (remplissage par des polymérases des extrémités) pour poursuivre les étapes de ligation. Dans le cas où des cassures complexes sont générées (traitement aux rayonnements ionisants, agent génotoxiques), les CDBs peuvent adopter une conformation stable et non digérable par les enzymes de dégradation dites en épingles à cheveux. Après le recrutement du complexe DNA-PK aux sites de cassures, ces structures sont prises en charge par une exonucléase qui facilite l'ouverture de ces structures en épingles nécessaires à une réaction efficace de ligation.

- Les voies alternatives du NHEJ

In vivo, l'analyse par électrophorèse en champ pulsé a montré l'existence de deux composantes de réparation des CDB : (i) une composante rapide (30 min) majoritaire en présence de DNA-PKcs et (ii) une composante lente (12 h) qui permet de prendre en charge une proportion similaire de DSB en l'absence de DNA-PKcs. On parle ainsi de deux composantes distinctes D-NHEJ (DNA-PK-

dependent-NHEJ) et B-NHEJ (Backup-NHEJ). Parmi les acteurs potentiels de cette voie alternative, le complexe Lig III/XRCC1 pourrait assurer la ligature de CDB persistantes.

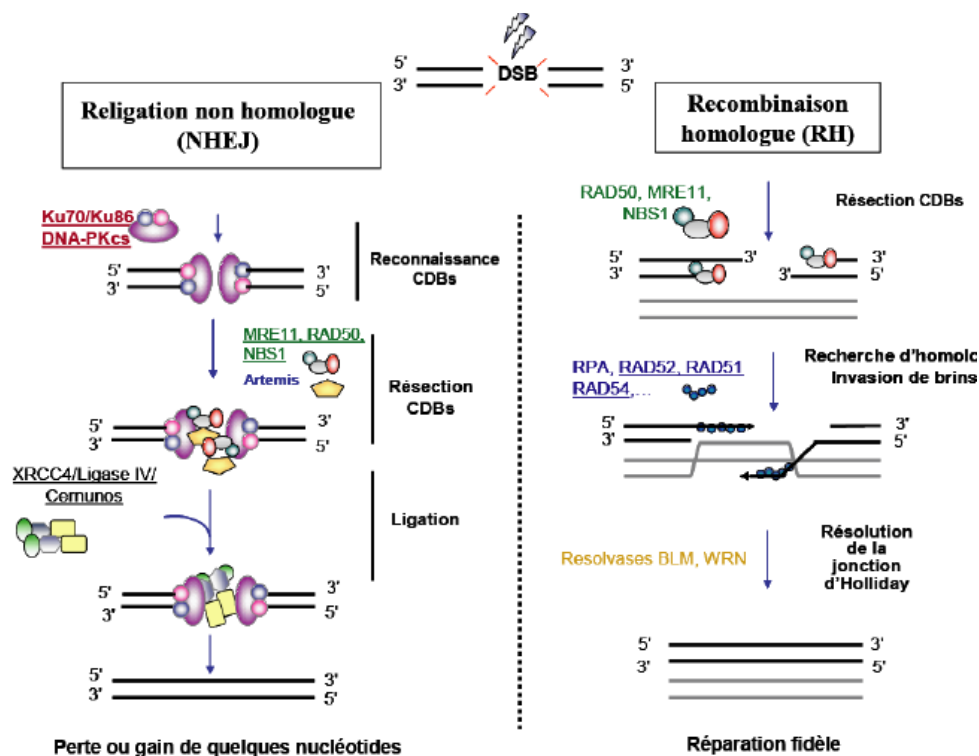


Figure. Description des mécanismes de la réparation des cassures doubles brins. (Gauche) Réparation par NHEJ, (Droite) Réparation par recombinaison homologue

2.2. Réparation des cassures double brins par la recombinaison homologue (RH)

Les cellules de mammifères ont recours moins fréquemment à la recombinaison homologue (RH) pour réparer les cassures doubles brins. Cette voie est davantage utilisée pour la réparation des cassures formées en S/G2. La RH nécessite l'appariement d'un fragment d'ADN avec une séquence homologue servant de matrice à la synthèse réparatrice.

- Les différents modèles de recombinaison homologue

Deux grands mécanismes de recombinaison homologue sont décrits : la conversion génique (CG) et le BIR (Break-Induced Replication). Dans certains cas, une CDB peut être réparée par un troisième mécanisme, Le SSA (Single-Strand Annealing) qui peut s'apparenter à la RH.

a) Conversion génique

La conversion génique est définie comme un échange d'information génétique non réciproque entre une séquence d'ADN receveuse et une séquence homologue donneuse. D'une façon générale, elle résulte du remplacement d'une portion d'ADN lésé sur une chromatide par une portion d'ADN portée par une chromatide du chromosome homologue. Le modèle de conversion génique peut parfaitement expliquer les évènements de recombinaison observés en mitose. Deux

modèles non exclusifs peuvent rendre compte de la conversion génique : le modèle de réparation des cassures double brin de Szostak et le modèle de Synthesis-Dependent Strand Annealing (SDSA) (Figure).

b) BIR

Un modèle de recombinaison associé à la présence d'une fourche de réplication a été proposé. Ce modèle permet d'expliquer des longs événements de conversion génique impliquant tous les marqueurs d'un même bras de chromosomes. On parle de réplication induite par une cassure ou BIR 'Break Induced replication'. Le BIR est un mécanisme de recombinaison qui peut se substituer dans certains cas à la conversion génique (Figure). Ce modèle décrit chez la levure n'a pas encore été observé dans les cellules de mammifères.

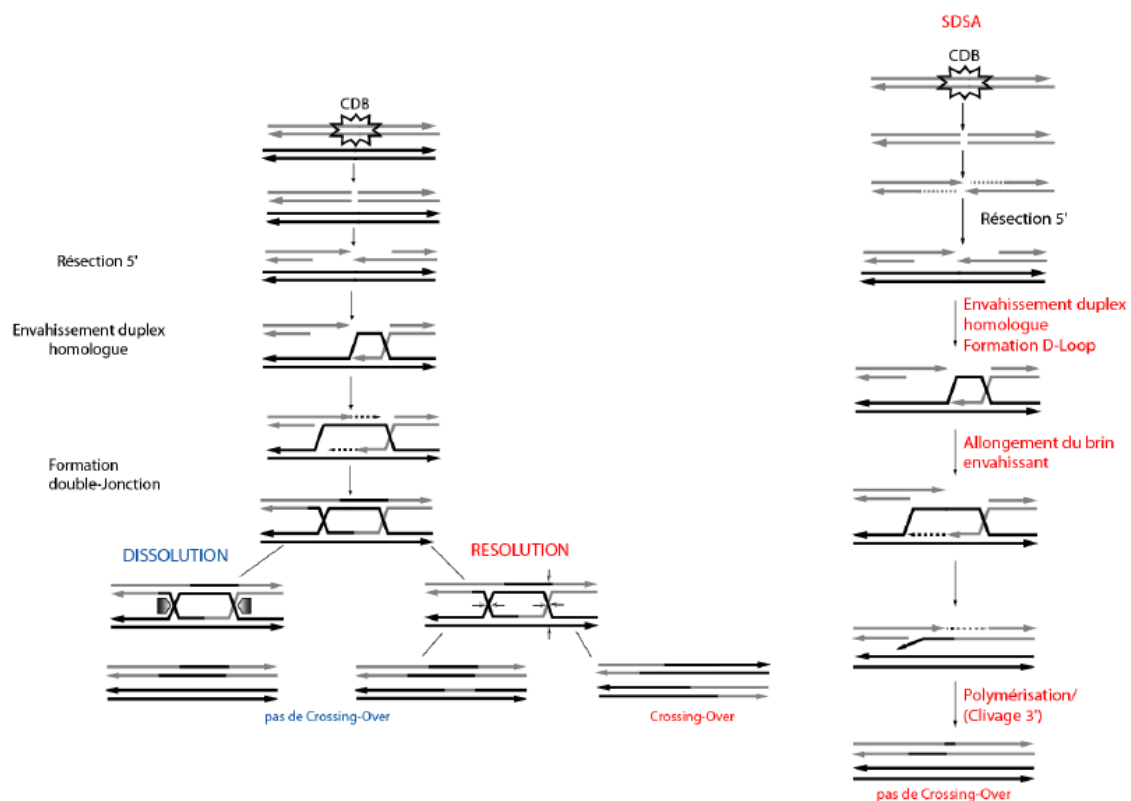


Figure. Mécanismes de conversion génique.

A Gauche le **Modèle de Szostak** : Les extrémités 5' de la cassure sont ensuite dégradées, ce qui libère des ADN simple brin. Après recherche d'homologie, l'un des ADN simple chaîne envahit le duplex homologue, créant une structure en D-loop. L'extrémité 3'OH envahissante est alors capable d'initier la synthèse réparatrice. La synthèse entraîne la migration de la D-loop, qui peut s'apparier avec la seconde extrémité simple brin de la cassure. Cette seconde extrémité 3'-OH est alors capable d'initier une seconde synthèse. La capture des extrémités peut ensuite entraîner la formation d'une double Jonction Holliday. Si les deux jonctions sont coupées et liées symétriquement, alors la résolution n'est pas associée à un CO. Au contraire si la double Jonction Holliday est coupée de façon asymétrique, alors la résolution est associée à un CO.

A Droite la voie de « **Synthesis-Dependent Strand-Annealing** » (SDSA) permet la réparation de la CDB en déplaçant le brin envahissant en dehors du duplex et son appariement au brin 3' libre de l'autre extrémité de la CDB. Des étapes de synthèse d'ADN et de clivage des séquences non appariées peuvent être nécessaires. Cette voie de recombinaison n'implique pas d'échange réciproque de séquences d'ADN entre le substrat contenant la CDB et la matrice contenant la séquence homologue

c) SSA

Lorsqu'une cassure survient entre deux séquences répétées en orientation directe, le mécanisme de dégradation, hybridation aussi appelée SSA (single strand annealing) peut conduire à une réparation efficace. Le mécanisme de dégradation-hybridation n'implique pas de recherche d'homologie active

entre un ADN simple brin et un duplexe homologue, mais une hybridation de séquences complémentaires.

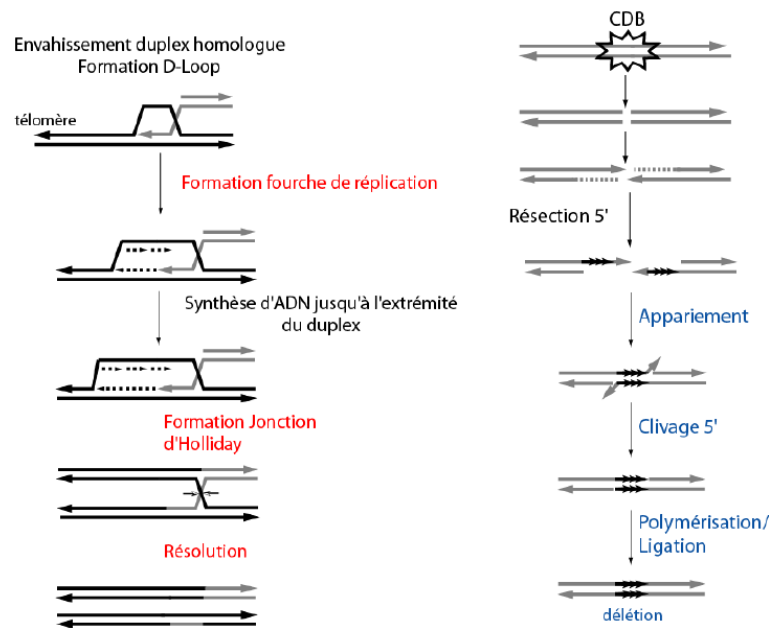


Figure. Modèles de réparation des cassures doubles brins par RH.

(Gauche) Mécanisme de Break Induced Repaired « **BIR** », (Droite) Mécanisme de Single Strand Annealing « **SSA** ». Ce mécanisme requiert l'action des protéines Rad52 et ERCC1/XPF pour respectivement assurer l'hybridation des séquences complémentaires et l'élimination des séquences non appariées.

- Mécanismes moléculaires de la recombinaison homologue

Les cassures doubles brins ou simples brins peuvent être générés par le métabolisme cellulaire ou par des agents génotoxiques. Les cassures doubles chaînes sont prises en charge par le complexe MRE11/RAD50/NBS qui agit en tant qu'effecteur de la recombinaison réalisant la résection des extrémités des cassures doubles brins à l'aide de son activité. Les cassures sont ensuite maturées afin de générer les extrémités d'ADN simple brin qui initient les événements de recombinaison (Figure).

Les protéines Rad52 et RPA se fixent sur les extrémités pour faciliter le recrutement de la protéine RAD51 en éliminant les structures secondaires de l'ADN. Une extrémité 3' de la molécule lésée envahit la molécule duplexe homologue et s'apparie au brin matrice. La protéine RAD51 peut alors se fixer sur les extrémités d'ADN simples brins ainsi générés.

Par la suite le processus synaptique se met en place. Elle se déroule en plusieurs étapes : (i) recherche d'homologie entre l'ADN simple brin et le duplexe (ii) l'appariement entre l'extrémité simple brin envahissante et le duplexe de l'ADN (iii) l'échange de brins qui initie la formation de l'hétéroduplexe.

Sous le contrôle de BRCA1 et BRCA2, RAD51 recherche la séquence correspondante sur le chromosome homologue pour ensuite envahir l'autre brin. Cette invasion de brins est facilitée

par la protéine Rad54. En effet, cette protéine forme des enroulements négatifs au niveau du duplex qui facilite l'accès et l'invasion de brins.

Pour aboutir à un échange de brins complet, l'hétéroduplexe forme est étendu. L'extension de l'hétéroduplexe peut se faire de deux façons. (i) Soit la protéine RAD51 continue l'échange de brins avec une polarité 5' vers 3' par rapport au brin déplacé : l'échange de brins est donc unidirectionnel. (ii) Soit l'extension de l'hétéroduplexe est assurée par la migration de la jonction Holiday forme par l'initiation d'échanges de brins.