

LES GARDIENS DU GÉNOME

Réparation des lésions de l'ADN produites par les rayonnements ultraviolets et ionisants

L'ADN contenu dans le noyau de chacune de nos cellules subit quotidiennement des milliers de lésions causées par des agents potentiellement capables de modifier l'information génétique, des rayons ultraviolets du Soleil aux rayonnements ionisants, d'origine naturelle ou non. Cette information reste pourtant étonnamment stable. De véritables "gardiens du génome" réparent efficacement et fidèlement l'ADN, à condition que la cellule ne soit pas dépassée par le niveau de l'agression. Preuve de leur importance, des altérations des mécanismes de réparation sont à l'origine de syndromes extrêmement sévères. La défaillance d'un de ces gardiens du génome, le gène *OGG1*, semble impliquée dans le développement de cancers. C'est peut-être une piste pour déceler une prédisposition aux cancers radio-induits ou causés par d'autres agents génotoxiques.

34

● ● ● ● ●

*Expérience d'inactivation du gène *OGG1* chez la levure de boulanger. Dans chaque boîte, dix millions de cellules ont été étalées sur un milieu nutritif contenant un antibiotique qui tue les cellules, la boîte A (à g.) correspondant à une levure de référence, la boîte B (à dr.) à une levure dont le gène *OGG1* a été inactivé. Trois colonies, représentant chacune la descendance d'une cellule, ont poussé dans la boîte A, ce qui signifie que trois cellules étaient résistantes à l'antibiotique (mutantes). Soixante-quatre colonies sont dénombrées dans la boîte B, montrant que l'inactivation du gène *OGG1* s'est traduite par la multiplication d'un facteur 21 (64/3) de la fréquence de mutations.*



A. Gonin/CEA

Nécessité et mécanismes de la réparation de l'ADN

L'ADN est soumis à de multiples attaques, inévitables, de la part du milieu intracellulaire et de l'environnement. Ces agressions provoquent la formation de plusieurs milliers de lésions par jour et par cellule. Les espèces réactives de l'oxygène, produites par les cellules lors de l'utilisation de l'oxygène au cours de la respiration et aussi, le cas échéant, par la radiolyse de l'eau, sont susceptibles de générer des lésions de l'ADN. La lumière solaire est en partie composée de radiations ultraviolettes qui altèrent l'ADN par action directe (UVB) ou indirecte (UVA) après excitation de molécules réceptrices normalement présentes dans la cellule. L'ADN est également très sensible aux attaques des rayonnements ionisants d'origine naturelle (radioactivité terrestre et rayons cosmiques) et de ceux générés par l'activité humaine (médecine nucléaire et, dans une très faible mesure, production d'énergie).

Les mécanismes de formation et la nature des lésions induites dans l'ADN ont été décrits dans le chapitre I. Le fait que l'ADN s'altère très rapidement est en contradiction apparente avec la stabilité observée de l'information génétique au fil des générations. En effet, l'étude des fréquences de mutations suggère une instabilité inférieure à une erreur pour 10 milliards de nucléotides copiés, soit moins d'une erreur par génération dans un génome humain.

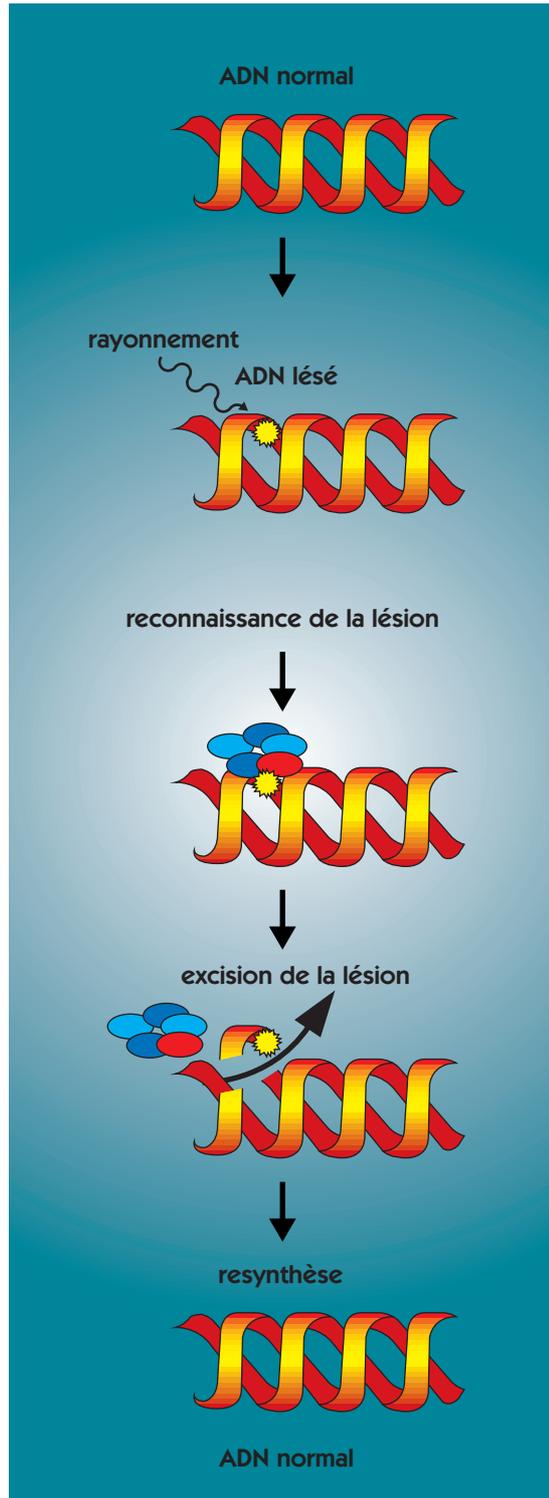
Excision et resynthèse

L'évolution a résolu ce paradoxe en mettant en place des mécanismes de réparation de l'ADN efficaces et fidèles. La présence de lésions induites par les rayonnements ultraviolets solaires ou ionisants dans l'ADN est en effet un problème majeur pour la cellule, puisqu'elles peuvent conduire soit à la mort de la cellule, soit à une altération du message génétique (mutation). La réfection par excision et resynthèse est la voie principale de réparation chez tous les organismes vivants. Elle consiste à éliminer (excision) une lésion et à restituer l'information initiale (resynthèse). Ce mécanisme implique l'existence "d'agents de reconnaissance"

qui détectent les lésions de l'ADN et "d'équipes d'intervention" qui assurent l'élimination de la lésion et la reconstruction à l'identique (figure 1). Ces rôles sont tenus dans la cellule par les protéines de réparation de l'ADN. Il s'agit d'enzymes capables d'agir avant sa réplication dans la cellule (encadré B, *La réplication de l'ADN : une fidélité quasi parfaite*).

L'ADN réparé par excision et resynthèse est identique à ce qu'il était avant la formation de la lésion. Il s'agit donc d'un mécanisme conservatif, qui tend à préserver l'information génétique au fil des générations. L'existence et l'efficacité de tels mécanismes moléculaires expliquent comment l'ADN de la cellule peut préserver l'intégrité du message génétique au cours du temps. Il est important de noter que les mécanismes de réparation de l'ADN sont très semblables depuis les bactéries, organismes vivants les plus simples, jusqu'à l'homme. Cette identité signifie que ces mécanismes sont apparus très tôt au cours de l'évolution et souligne leur nécessité dans un monde vivant qui utilise l'ADN pour stocker son information génétique.

Figure 1. Réparation de l'ADN par excision et resynthèse. Les enzymes de réparation de l'ADN "travaillent" en excisant, c'est-à-dire en coupant de part et d'autre de la lésion préalablement reconnue, la séquence endommagée sur l'un des deux brins de l'ADN. Pour reformer le fragment éliminé tel qu'il était avant d'être lésé, il suffit de construire la séquence complémentaire de celle qui lui fait face sur l'autre brin de l'ADN.



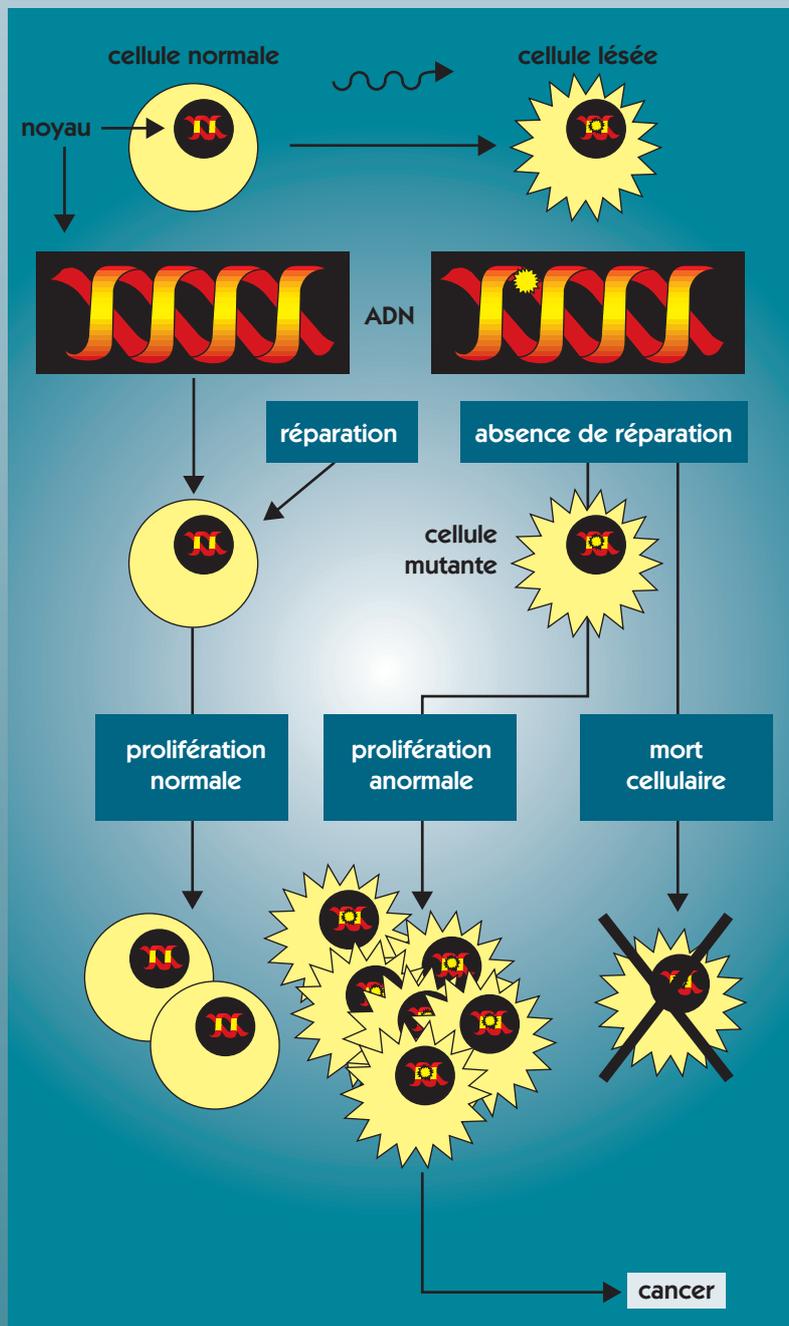
Réparation de l'ADN et maladies génétiques

L'importance des mécanismes de réparation de l'ADN chez l'homme est démontrée par l'étude de diverses maladies génétiques comme le *xeroderma pigmentosum*, le *syndrome de Cockayne* ou l'*ataxia telangiectasia*. Il s'agit là de maladies **autosomales récessives** rares, qui se caractérisent du point de vue clinique par trois types d'affections graves : l'apparition précoce de cancers, un retard mental et un retard du développement physique. Elles sont extrêmement sévères dans la mesure où, dans la majorité des cas, les individus atteints meurent avant l'âge adulte. Deux de ces maladies, *xeroderma pigmentosum* et le *syndrome de Cockayne*, sont la conséquence directe d'une déficience dans la voie de réparation par excision et resynthèse des lésions induites dans l'ADN par les radiations solaires UVB et de nombreux agents chimiques cancérigènes. Le développement précoce des cancers chez les patients souffrant de *xeroderma pigmentosum* est la conséquence des mutations qui sont causées par l'accumulation des lésions non réparées dans l'ADN. Ces mutations modifient le fonctionnement de certains **gènes** et confèrent des propriétés de prolifération anormales aux cellules **mutantes**. Cette prolifération non programmée peut parfois donner naissance à une tumeur cancéreuse (encadré 1). Dans le cas de l'*ataxia telangiectasia*, les cellules des patients sont hypersensibles aux rayonnements ionisants. Le défaut moléculaire responsable a été identifié sous la forme de mutations dans le gène ATM. Ce gène ne code pas directement une protéine de réparation de l'ADN, mais participe à une voie complexe qui renforce l'efficacité des mécanismes de réparation des lésions de l'ADN induites par les rayonnements ionisants. L'importance des mécanismes de réparation de l'ADN a également été mise en évidence chez la souris dont certains gènes peuvent être expérimentalement inactivés. Des études récentes montrent que l'inactivation des gènes *HAP1* et *POLβ* impliqués dans la voie de réparation par excision et resynthèse provoque la mort embryonnaire précoce des individus qui

Réparation de l'ADN et cancérogenèse ¹

La cellule dont l'ADN a été endommagé peut avoir différentes destinées. Dans la majorité des cas, l'ADN est réparé fidèlement et le programme génétique est en mesure de se dérouler normalement. Lorsque la réparation est absente ou incomplète, et selon la nature des lésions, la cellule va mourir ou muter. Des mutations dans des gènes qui gouvernent le cycle cellulaire (encadré E, **Le cycle cellulaire : duplication sous**

contrôle) vont conférer aux cellules la propriété de proliférer de manière incontrôlée et finalement aboutir au cancer. Ce schéma illustre comment la réparation de l'ADN contribue à prévenir l'apparition des cancers chez l'homme en éliminant les lésions induites par les rayonnements ou les agents chimiques. C'est cette action de prévention des altérations du message génétique qui sous-tend le concept de "gardien du génome".

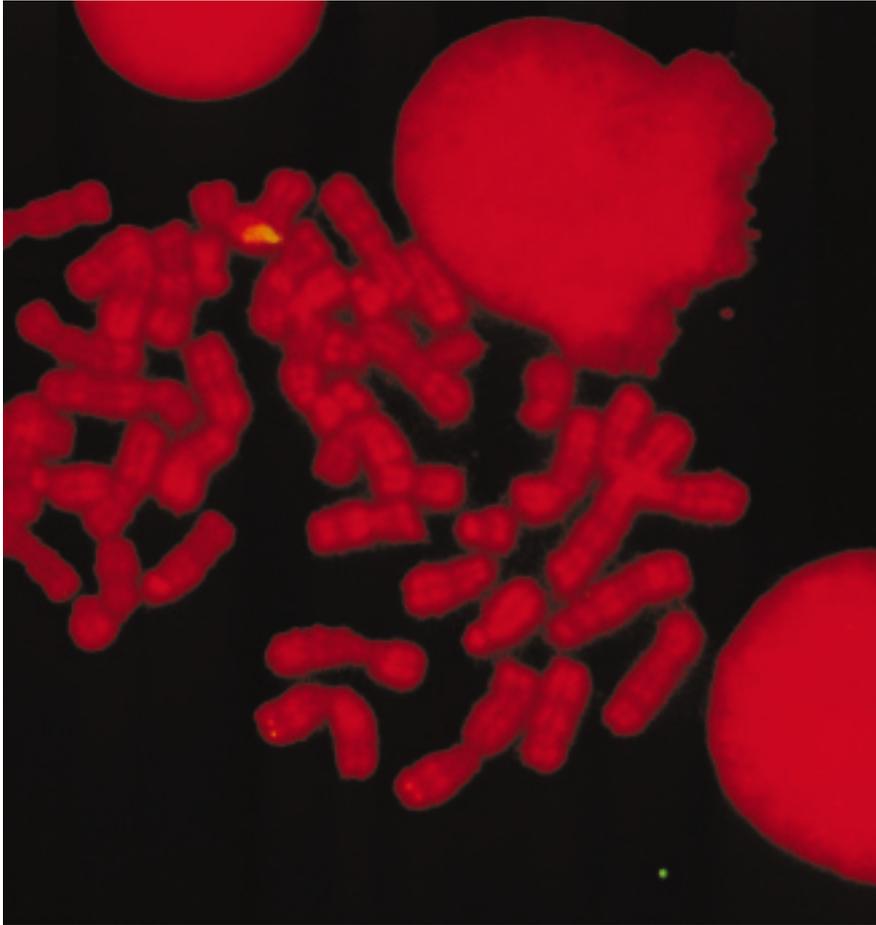


en sont porteurs. Il est important de noter que ces gènes ont leur équivalent dans les cellules humaines.

Ces différentes observations confirment que la réparation de l'ADN est nécessaire à la survie des organismes, en particulier chez les mammifères. La prédisposition au cancer des individus porteurs de gènes de réparation de l'ADN mutés suggère aussi que les mécanismes de réparation jouent un rôle essentiel dans la prévention du processus de **cancérogenèse**. Chez les patients atteints de *xeroderma pigmentosum*, le délai d'apparition des tumeurs est réduit de plusieurs dizaines d'années par rapport à la population normale. Ceci permet d'introduire le concept de gardiens du génome pour les protéines de réparation de l'ADN qui assurent la stabilité de l'information génétique et retardent ainsi l'émergence des cancers chez l'homme (encadré 1).

Le gène *OGG1*, un gardien du génome

Le nombre des gènes directement impliqués dans la réparation de l'ADN chez les mammifères pourrait être de l'ordre de plusieurs dizaines. Dans le cas de la réparation par excision et resynthèse, la diversité réside principalement dans l'étape initiale de reconnaissance des différentes lésions. Il est remarquable de constater que face à l'extraordinaire variété des lésions générées dans l'ADN, la cellule n'utilise qu'un nombre restreint de protéines de réparation. En fait, la plupart d'entre elles sont polyvalentes et reconnaissent plusieurs types de lésions. Les recherches menées dans les laboratoires du Commissariat à l'énergie atomique (CEA) en association avec le Centre national de la recherche scientifique (CNRS) portent en particulier sur la réparation et l'impact biologiques d'une lésion radio-induite qui est réparée par excision et resynthèse, la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua). Cette modification de l'ADN provoque des mutations qui se traduisent finalement par le remplacement d'une paire **guanine-cytosine** par une paire **thymine-adénine**. Une équipe mixte CEA-CNRS a isolé le gène *OGG1* codant la protéine qui reconnaît et excise cette lésion chez la **levure** de boulanger, *Saccharomyces*



CEA-CNRS

Les quatre petits points fluorescents indiquent l'emplacement du gène *OGG1* humain à l'extrémité du bras court du chromosome 3 (région p). Cette localisation est potentiellement importante dans la mesure où des réarrangements de cette région sont fréquents dans de nombreuses tumeurs humaines, principalement du poumon et du rein. Ce résultat a été obtenu en collaboration avec le Dr. Chantal Desmaze (Laboratoire de radiobiologie et oncologie au CEA/Fontenay-aux-Roses).



cerevisiae. L'inactivation du gène *OGG1* de cette levure cause une augmentation de l'instabilité génétique qui est caractérisée par une fréquence de mutations spontanées de 20 à 100 fois supérieure à celle observée dans une levure de boulanger possédant cette fonction de réparation de l'ADN. Cette instabilité se caractérise par exemple par l'apparition au sein d'une population d'un nombre accru de cellules mutantes résistant à un antibiotique.

D'une longueur totale d'environ deux mètres, mises bout à bout, les molécules d'ADN présentes dans le noyau de chaque cellule humaine portent la totalité de l'information génétique de l'organisme sous forme de dizaines de milliers de gènes qui constituent son génome, soit plusieurs milliards de paires de nucléotides. Les gènes ne sont pas des entités visuellement individualisées mais une suite d'informations, un programme d'instructions. En revanche, les chromosomes, qui en sont les supports, sont des éléments parfaitement distincts, du moins entre le moment de leur apparition lors des premières phases de la division cellulaire et celui de leur disparition, une fois celle-ci terminée (voir l'encadré E, *Le cycle cellulaire : duplication sous contrôle*). Chaque molécule d'ADN portant les gènes prend en effet des aspects très différents suivant le moment du cycle où elle est observée. Avant la division cellulaire, elle apparaît comme une structure lâche dispersée dans le noyau. Ce n'est que lorsque la division est sur le point de se déclencher qu'elle s'enroule pour se transformer, à l'aide de molécules associées, en une structure compacte et ordonnée, les chromosomes. Le complexe constitué par ces molécules spécialisées (les histones



Caryotypes humains, comprenant 46 chromosomes : 22 paires plus une paire de chromosomes sexuels,

Les chromosomes, supports matériels des gènes

ainsi que d'autres protéines chromosomiques) et l'ADN cellulaire est appelé **chromatine**. L'association des histones avec l'ADN produit les **nucléosomes**, unités élémentaires de la chromatine.



BSIP

Les gènes sont situés sur des bandes transversales caractéristiques d'un chromosome donné.

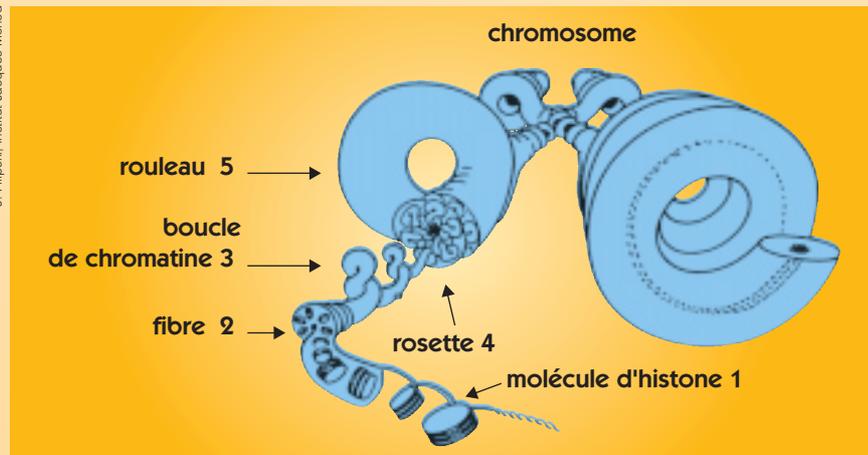
Pour former les chromosomes, de longs morceaux d'ADN se trouvent pliés suivant différents enroulements successifs (schéma ci-contre) et pas seulement à l'échelle de la double hélice. Celle-ci s'enroule d'abord autour d'une "perle" (7 à 10 nm de diamètre, un nano-

mètre = 10^{-9} m) composée d'un assemblage de huit molécules d'histones (1). Le "collier de perles" ainsi obtenu se contracte sur lui-même par enroulement pour devenir une fibre de 30 nm de diamètre (2). La fibre forme ensuite des boucles de chromatine (3). Six de ces boucles constituent à leur tour une rosette (4). Ces rosettes sont rassemblées pour donner une fibre de 300 nm, s'enroulant elle-même pour créer un rouleau (5) lors de la métaphase. La longueur totale d'un chromosome humain est de 1 000 à 10 000 nm. Le **caryotype**, qui correspond à l'ensemble des chromosomes d'une cellule en métaphase, comprend pour l'espèce humaine 46 chromosomes (22 paires de chromosomes homologues ou **autosomes** et 1 paire de chromosomes sexuels, XX chez la femme et XY chez l'homme).

la chaîne d'ADN soit raccourcie à chaque cycle de réplication. Périodiquement allongée par une enzyme, la **téломérase**, cette séquence compense la perte des quelques nucléotides de l'ADN des télomères et permet la réplication d'un chromosome dans sa totalité.

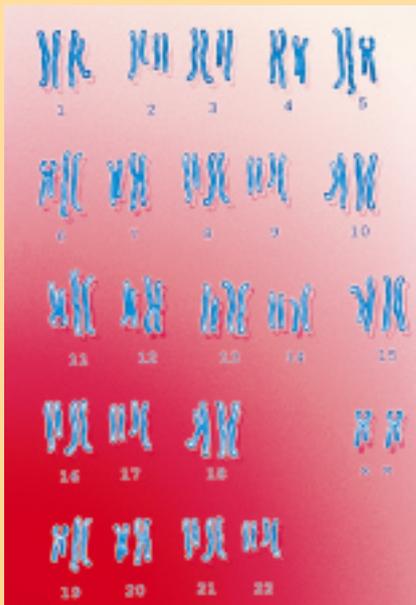
Différentes techniques de coloration permettent de faire apparaître sur les chromosomes des bandes transversales caractéristiques de chacun d'eux. Les bandes G distinguent les régions de l'ADN riches en paires de nucléotides adénine-thymine tandis que les bandes R montrent celles riches en paires de nucléotides guanine-cytosine. Les bandes C marquent entre autres les centromères. Les gènes sont situés sur les bandes G et R. Les **allèles** d'un gène donné occupent la même position (**locus**) sur des chro-

J. Filipinski, Institut Jacques Monod



La molécule d'ADN d'un chromosome contient trois séquences nucléotidiques indispensables à sa réplication : des "**origines de réplication**", un **centromère** et des **télomères**. Pour se répliquer, une molécule d'ADN a en effet besoin d'une séquence particulière qui marque le point de départ. Le centromère sert pour sa part à maintenir ensemble les deux copies du chromosome dupliqué, appelées **chromatides**, et à les attacher au fuseau mitotique lors de la mitose, de sorte qu'une copie soit distribuée à chaque cellule fille. Le troisième élément de séquence, situé aux deux extrémités du chromosome, est le télomère. Sa fonction ? Éviter que

mosomes homologues, l'un d'origine paternelle, l'autre d'origine maternelle. Si les deux allèles sont identiques, l'individu est dit **homozygote** pour ce type de gène ; dans le cas contraire, il est dit **hétérozygote**. Les deux allèles remplissent une même fonction, comme par exemple la synthèse d'une protéine. La longueur d'un gène, entre quelques dizaines et quelques milliers de paires de nucléotides, dépend de la complexité de la protéine qu'il détermine. L'**expression d'un gène** donné nécessite soit la présence d'un seul allèle de type **dominant** sur l'un des deux chromosomes homologues, soit celle de deux allèles de type **récessif** sur chacun d'eux.



X et Y chez l'homme (en vert),
X et X chez la femme (en rouge).

La recherche des mutations d'*OGG1* dans des tumeurs humaines

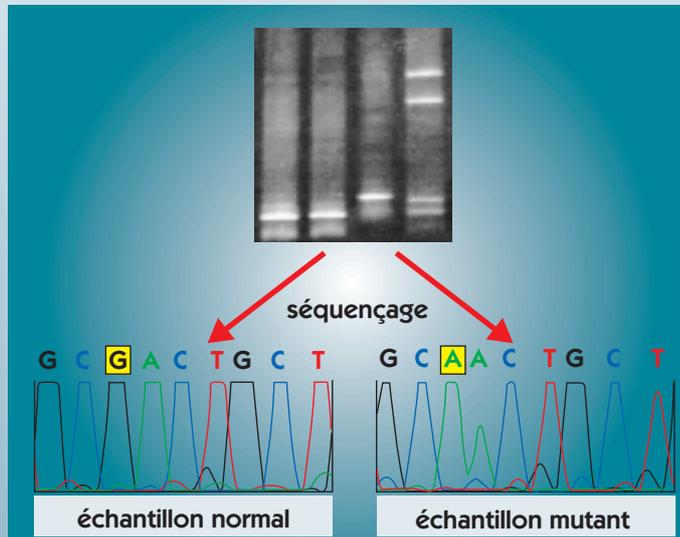
Quel est le lien entre certains cancers humains et l'inactivation du gène *OGG1* ? L'étude de la qualité du gène dans des cellules tumorales peut fournir une réponse. Afin de rechercher la présence de mutations dans le gène, du matériel génétique a été extrait de tumeurs et de tissu sain du même patient. Après avoir spécifiquement **amplifié** le gène *OGG1*, l'ADN, qui est naturellement électriquement chargé, est placé dans un champ d'électrophorèse où il migre, apparaissant sous forme de bandes

blanches (figure). À un temps donné, si l'échantillon est mutant (les deux

colonnes de droite) l'ADN ne migre pas comme l'ADN normal (les deux

colonnes de gauche) : c'est la preuve que le gène *OGG1* est muté.

Il s'agit ensuite de caractériser la mutation, qui se traduit par une modification de l'ordre des bases (adénine, thymine, guanine et cytosine) constituant l'information génétique contenue dans l'ADN selon un code à 4 "lettres" (encadré A, **La molécule d'ADN, vecteur de l'hérédité**). Ce code peut être décrypté par la technique de **séquençage**. Il apparaît ainsi qu'en troisième position la guanine (G) de l'échantillon normal est remplacée par une adénine (A) dans l'échantillon mutant. Cette modification suffit à expliquer le non fonctionnement de la protéine Ogg1.



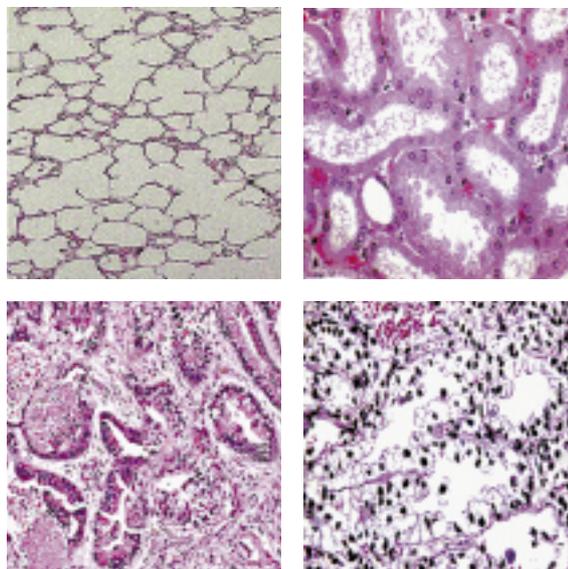
De la levure à l'homme

Bien entendu, il restait un pas essentiel à franchir : le passage à l'homme. Il l'a été par la même équipe en 1997, date à laquelle celle-ci a réalisé le **clonage** du gène *OGG1* chez l'homme et la souris. Le gène *OGG1* est **exprimé** dans tous les tissus humains analysés, ce qui est compatible avec l'idée que sa fonction primordiale est d'éliminer les lésions résultant du **métabolisme** respiratoire de la cellule. Le gène *OGG1* est situé sur le bras court du **chromosome 3** chez l'homme. La localisation subcellulaire de la protéine Ogg1 humaine a montré une accumulation dans le noyau des cellules, où se trouve l'ADN. Le but de ces recherches est d'élucider le rôle biologique du gène *OGG1* par des études chez l'homme et la souris.

Le gène *OGG1* est donc potentiellement un des gardiens du génome qui, en assurant l'élimination de lésions **mutagènes** de l'ADN, retardent le développement de certains cancers chez l'homme. En conséquence, la perte de ce gène pourrait favoriser la formation de mutations et accélérer la cancérogenèse

40

● ● ● ● ●
 Coupes de poumon normal (en haut) et d'une tumeur de cet organe (en bas).
 Coupes de rein normal (en haut) et d'une tumeur de cet organe (en bas).



Chevillard/LCE/CEA



Séquenceur automatique d'ADN. Le gel échantillon est introduit à l'aide d'une seringue dans le séquenceur. Chaque couleur sur l'écran correspond à une base d'ADN après analyse de la séquence.



A. Gonin/CEA

dans les organes cibles. Comment valider cette hypothèse chez l'homme ? Si des cancers sont associés à la perte de la fonction *OGGI*, les chercheurs s'attendent à trouver des altérations de ce gène dans l'ADN des cellules tumorales. Ils ont donc entrepris l'analyse de la "qualité" du gène *OGGI* dans des tumeurs humaines du rein et du poumon (encadré 2). Les résultats indiquent que dans le cancer du rein, environ 5 % des tumeurs analysées présentent une mutation dans le gène *OGGI*. Ces données, encore préliminaires, suggèrent une corrélation entre certains cancers du rein et l'inactivation du gène *OGGI*.

Dépister des populations à risque ?

À long terme, le statut du gène *OGGI* pourrait être étudié au sein de la population afin de définir d'éventuelles "populations à risque" présentant une

prédisposition aux cancers radio-induits ou imputables à l'exposition à des agents **génotoxiques** agissant également par oxydation au niveau de l'ADN. D'une manière générale, la détection de mutations dans des gènes de réparation pourrait aider à définir les catégories de personnes auxquelles il serait conseillé de s'exposer le moins possible à certains agents de l'environnement naturel, professionnel ou sanitaire. ●

Serge Boiteux, Juan Pablo Radicella
UMR217 CNRS-CEA Radiobiologie
moléculaire et cellulaire
et **Sylvie Chevillard**
Laboratoire de cancérogenèse
expérimentale

Département de radiobiologie
et radiopathologie
Direction des sciences du vivant
CEA/Fontenay-aux-Roses