

En 2003, nos équipes du CEA à Grenoble et de l'Institut Curie ont montré qu'en plus de ces mécanismes d'oxydation qui leur sont spécifiques, les ultraviolets A endommagent l'ADN comme le font les ultraviolets B. Nous avons obtenu ces résultats dans des cellules en culture et, en 2006, en collaboration avec l'Institut de recherche Pierre Fabre, nous les avons confirmés dans la peau humaine. Examinons ce qu'il en est.

Pour comprendre pourquoi les ultraviolets créent des mutations, les photochimistes étudient comment l'absorption d'un photon endommage l'ADN. Les bases (et non le squelette sucre-phosphate) absorbent les photons ultraviolets, ce qui modifie la structure électronique des atomes (la configuration des électrons autour des noyaux) : l'ADN se retrouve dans un état dit « excité », c'est-à-dire que son énergie est supérieure à celle de son état habituel. Ses constituants peuvent alors réagir les uns avec les autres.

Si les premiers travaux réalisés dès les années 1960 ont été consacrés aux bases isolées de l'ADN, nous étudions aujourd'hui les états excités de l'ADN double-brin. Ces progrès ont été rendus possibles grâce, d'une part, à la puissance des ordinateurs permettant des calculs complexes, et, d'autre part, à la spectroscopie résolue en temps, une technique qui fournit la durée de vie des espèces chimiques intermédiaires avant l'apparition d'un photoproduit (voir l'encadré ci-contre).

Nous avons d'abord étudié comment une double-hélice d'ADN absorbe les ultraviolets A. Nous avons fabriqué en laboratoire un modèle d'ADN constitué de 20 paires de bases adénine-thymine : cet ADN présente une absorption faible, mais réelle, des ultraviolets A (voir la figure 2). Au contraire, un mélange de ces bases isolées n'absorbe pas ces longueurs d'onde. Ces résultats montrent que, à l'inverse de ce que l'on a longtemps cru, les réactions photochimiques de l'ADN sont possibles non seulement avec les ultraviolets C et B, mais aussi avec les ultraviolets A.

Ensuite, grâce à la spectrométrie résolue en temps, nous avons montré que les états excités responsables de l'absorption des ultraviolets A diffèrent de ceux qui donnent lieu à l'absorption des ultraviolets B et C : ce sont des états dits à transfert de charge. En d'autres termes, dans la configuration électronique corres-

pondante, certaines bases sont chargées positivement et d'autres négativement, de sorte qu'elles peuvent réagir les unes avec les autres.

Que devient l'énergie du rayonnement ultraviolet absorbée par l'ADN ? Une part importante est dissipée sous forme de chaleur dans l'environnement de l'ADN. Une autre se répartit entre les bases, qui passent d'un état excité à un autre. Au laboratoire, nous avons montré qu'un tel transfert d'énergie commence moins de 100 femtosecondes (100×10^{-15} seconde) après l'absorption. Une toute petite fraction de l'ADN excité émet alors un rayonnement de fluorescence. Une autre, encore plus petite, subit des réactions chimiques.

La fusion des bases par les ultraviolets B

Visualiser en temps réel l'apparition d'un photoproduit dans une double hélice d'ADN reste pour le moment un défi. En effet, la probabilité de réaction de l'ADN est très faible. Pourtant, les photochimistes progressent en étudiant un simple brin formé uniquement de thymines, ce brin étant bien plus réactif qu'une double hélice. Nous avons ainsi appris que le temps qui

sépare l'absorption d'un photon ultraviolet C et la formation d'un photoproduit dépend beaucoup de la structure chimique de ce dernier. Par exemple, les dimères de thymines – des photoproduits formés de deux thymines liées – de la classe des cyclobutanes apparaissent en moins d'une picoseconde (10^{-12} seconde), alors que quatre millisecondes sont nécessaires à la formation de ceux de la classe des photoproduits (6-4) (leur nom provient de la position des atomes qui réagissent dans la molécule), car la réaction met en jeu un composé intermédiaire.

Entre 1960 et 1990, les chimistes ont étudié la structure des photoproduits découlant de ces états excités. Ils ont effectué la plupart des expériences sur de courts fragments d'ADN, faciles à obtenir en grande quantité, en les exposant à de fortes doses de rayons ultraviolets B. Ils ont ainsi montré que seulement deux des quatre bases de l'ADN sont concernées : la thymine et la cytosine, qui appartiennent à la famille des pyrimidines. Quand ces bases sont côte à côte sur un brin d'ADN, de nouvelles liaisons covalentes – des liaisons chimiques fortes – se créent entre elles, ce qui engendre des photoproduits dimériques.

L'ADN excité et ses photoproduits

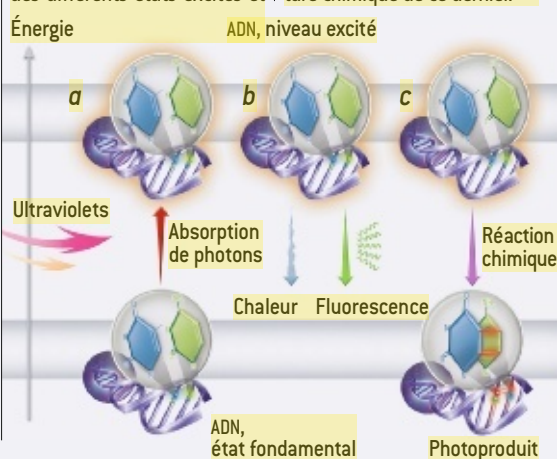
L'absorption des ultraviolets par l'ADN déclenche une série de mécanismes qui précèdent l'apparition des dommages ou photoproduits. Pour caractériser ces étapes intermédiaires, qui permettent de comprendre la formation des lésions, les photochimistes utilisent la spectroscopie résolue en temps.

L'ADN est excité par un laser ultraviolet pendant un instant très court (a). Une partie de l'énergie absorbée par l'ADN est dissipée sous forme de chaleur dans l'environnement (b). Une autre est transférée aux bases, qui passent d'un état excité à un autre. Une petite fraction de cet ADN excité émet de la fluorescence (b), tandis qu'une autre, encore plus petite, subit des réactions chimiques avec formation de photoproduits (c).

Ainsi, on détecte pendant des durées très brèves, allant de la centaine de femtosecondes à quelques nanosecondes, des signaux dont les propriétés dépendent des espèces engendrées par les rayons ultraviolets. La détection de fluorescence renseigne sur l'énergie des différents états excités et

sur leur durée de vie. On peut même identifier par le calcul le temps de présence d'espèces intermédiaires qui n'émettent pas de photons.

On a ainsi déterminé que le temps qui sépare l'absorption d'un photon et l'apparition d'un photoproduit dépend de la structure chimique de ce dernier.



Pourquoi les pyrimidines sont-elles les seules à réagir quand elles sont excitées ? Elles présentent dans leur structure chimique une double liaison entre deux atomes de carbone. En 1958, l'équipe néer-

convertis, en réagissant avec une molécule d'eau, en dérivés de l'uracile, une base de l'ARN, l'autre acide nucléique rencontré dans les cellules. Ensuite, des hétérogénéités apparaissent dans la localisation

ments, étudiée depuis des systèmes simples jusqu'à la peau humaine, a permis aux scientifiques d'expliquer l'effet biologique des ultraviolets et de nombreuses caractéristiques des cancers de la peau. Dans la cellule, la présence d'un ADN lésé peut avoir trois conséquences (voir l'encadré ci-dessous).

On a d'abord prouvé que les photoproduits peuvent engendrer l'apoptose des cellules, une mort programmée – un suicide cellulaire – capable d'éviter la division de cellules dont le génome est endommagé.

LES ULTRAVIOLETS A REPRÉSENTENT UNE GRANDE PARTIE du spectre solaire atteignant la peau et ils créent des liaisons chimiques dans l'ADN, comme le font les ultraviolets B.

landaise de R. Beukers et de W. Berends a identifié le premier produit résultant du réarrangement des doubles liaisons de deux thymine. Une telle structure contenant un cycle à quatre atomes est un dimère de type cyclobutane. Depuis cette découverte, on a identifié d'autres photoproduits et on a mis en évidence le même type de réactions entre deux cytosines, ou une thymine et une cytosine.

On retrouve donc un grand nombre de photoproduits dans l'ADN. Pour les détecter, on a développé des méthodes qui combinent des approches biochimiques, avec la production chez le lapin d'anticorps reconnaissant les photoproduits, et de chimie analytique, par exemple avec une séparation chromatographique des photoproduits de l'ADN (voir l'encadré page 51). On peut alors quantifier la formation des différents photoproduits.

Ainsi, les séquences thymine-thymine et thymine-cytosine réagissent davantage sous l'effet des ultraviolets que les couples cytosine-thymine et cytosine-cytosine. Outre son influence sur l'efficacité de la réaction, la séquence modifie le rapport entre dimères cyclobutanes et photoproduits (6-4). Cette répartition des différents photoproduits est la même dans l'ADN pur en solution et dans les cellules et la peau : une fois le photon absorbé, l'environnement modifie peu la photochimie de l'ADN. En revanche, le rendement des réactions diminue quand on passe des cellules isolées à la peau, du fait de sa pigmentation. En effet, la mélanine, un biopolymère absorbant les ultraviolets, protège la peau, les peaux foncées, plus riches en mélanine, résistant mieux aux rayons du Soleil.

En plus de ces informations sur l'efficacité de formation des photoproduits, on a aussi déterminé certaines propriétés des dommages causés à l'ADN. Tout d'abord, on sait que les photoproduits de la cytosine sont relativement instables : ils sont

des photoproduits le long d'un gène : certaines régions réagissent plus que d'autres et sont donc plus riches en photoproduits. Des effets structuraux sont sans doute en cause dans ces variations. Et d'autres facteurs modifient la réactivité locale, par exemple la présence de protéines fixées sur l'ADN.

Que se passe-t-il quand l'ADN est endommagé, c'est-à-dire qu'il contient des photoproduits ? Une suite d'évène-

Du dommage à la mutation

Par ailleurs, dès les années 1970, des études sur des cellules en culture ont montré que les mutations de l'ADN provoquées par les ultraviolets impliquaient des dimères thymine-cytosine ou cytosine-cytosine. Et au début des années 1990, Douglas

QUE DEVIENT L'ADN ENDOMMAGÉ ?

Sous l'effet des ultraviolets, les bases de l'ADN subissent des réactions chimiques. Par exemple, une base thymine forme deux liaisons avec une base cytosine pour donner un photoproduit de type cyclobutane (a). Dans une cellule, l'ADN ainsi lésé peut suivre trois voies. Souvent, le photoproduit déclenche la mort de la cellule et est, par conséquent, lui-même éliminé avec la cellule (b). Parfois, mais beaucoup plus rarement, il provoque une mutation (c) : il réagit avec une molécule d'eau, de sorte que le cycle de la cytosine dans le photoproduit devient un dérivé de l'uracile, une base de structure semblable à la thymine. Si la cellule se divise, cet ADN est recopié par des enzymes qui ne reconnaissent pas la cytosine (transformée en uracile) et la prennent pour une thymine : elles synthétisent donc un brin muté où une thymine remplace la cytosine initiale. Toutefois, des systèmes de réparation existent dans les cellules (d). Une enzyme reconnaît le photoproduit et d'autres ouvrent les deux brins de l'ADN ; la région lésée est éliminée, de sorte que des enzymes peuvent synthétiser un nouveau brin intact.

