

## Formation de dommages radio-induits dans les protéines

Le présent projet vise à mieux élucider les processus physico-chimiques élémentaires ayant lieu lors de l'irradiation de tissus biologiques. Malgré l'utilisation courante des rayonnements ionisants en médecine (traitement du cancer, examens radiologiques) et les études épidémiologiques (Hiroshima, Tchenobyl), de nombreuses questions relatives aux conséquences d'une irradiation sur la santé restent sans réponses. Ainsi, l'estimation des risques liés à l'exposition à de faibles doses de radiations est devenue une problématique majeure au Japon suite à la catastrophe de Fukushima. Par ailleurs, de nouveaux protocoles thérapeutiques se mettent actuellement en place, qui visent à optimiser le dépôt de dose dans la tumeur tout en épargnant les tissus sains. On peut citer par exemple la radiothérapie par ions lourds, technique utilisant des ions accélérés jusqu'à des vitesses pouvant atteindre plus d'un tiers de la vitesse de la lumière, ou la thérapie par activation photonique, qui utilise le rayonnement X synchrotron pour engendrer des interactions photoélectriques ciblées sur un agent pharmacologique préalablement introduit dans le voisinage proche des cellules tumorales (ligne médicale, ESRF, Grenoble). Ces protocoles conduisent à des distributions spatiales et temporelles de la dose très différentes de celles délivrées dans les radiothérapies conventionnelles et dont il est difficile d'entrevoir aujourd'hui toutes les conséquences [1].

Lorsqu'un tissu biologique est soumis à un rayonnement ionisant, une cascade complexe d'événements physiques, chimiques et biologiques conduit aux dommages observés (mort cellulaire, mutations). Cette cascade d'événements est initiée par l'arrachement d'électrons de molécules présentes dans le milieu. Les molécules ionisées vont alors soit se dissocier et rompre l'architecture de l'ADN ou des protéines, soit former des radicaux libres (lorsque le milieu aqueux est ionisé) qui à leur tour vont induire des dommages biologiques. Notre connaissance des processus de fragmentation initiaux n'est cependant que très partielle, en raison de la grande difficulté de les caractériser expérimentalement **en phase liquide**. Cette connaissance se fonde donc sur des données obtenues en phase gazeuse souvent difficilement transposables à la phase condensée [2]. Elle est cependant nécessaire pour comprendre comment se forment les dommages dans les cellules et donc proposer des modèles permettant d'expliquer les mécanismes d'action des rayonnements ionisants.

Des études pionnières ont été réalisées à la fin des années 1970 par D. T. Goodhead et ses collaborateurs, à l'aide de tubes à rayons X délivrant des rayons X caractéristiques du carbone (278 eV) et de l'aluminium (1487 eV) [3]. Ces rayons X-mous se sont avérés avoir une efficacité biologique accrue par rapport aux rayons X-durs conventionnels ( $> 30$  keV) et aux rayons  $\gamma$ . Les rayons X-mous génèrent dans le milieu des électrons de quelques centaines d'électronvolt, qui ont la propriété de déposer toute leur énergie dans des volumes de dimension nanométrique. Les travaux de Goodhead et collaborateurs ont donc conduit à attribuer **un rôle prépondérant aux micro-dépôts d'énergie intenses à l'échelle du nanomètre**. Par la suite, le rayonnement synchrotron a été utilisé pour sonder de manière sélective les conséquences biologiques de l'ionisation de la couche électronique la plus profonde, la couche K, du phosphore. Ces grands instruments permettent en effet de choisir n'importe quelle énergie d'irradiation, et donc de comparer l'effet de doses égales de rayonnement en dessous et au-dessus du seuil K du phosphore (2153 eV). Les premières expériences ont démontré l'efficacité létale et mutagène des ionisations en couche K des atomes de phosphore de l'ADN [4]. L'ionisation en couche K des atomes de carbone, d'azote et d'oxygène, bien plus abondants que le phosphore dans les cellules, devrait donc jouer un rôle plus important. A. Chetioui et ses collaborateurs ont ainsi proposé que les **ionisations en couche interne des atomes légers de l'ADN** pourraient jouer un rôle majeur dans l'effet létal des ions et des rayons  $\gamma$  [5]. Auparavant négligés car peu probables lors d'une irradiation par des rayons X-durs ou des ions rapides, ces événements sont néanmoins susceptibles d'engendrer des dommages complexes de l'ADN. Au site même d'interaction, la relaxation du trou multichargé<sup>1</sup> entraîne

1 Dans les atomes légers ( $Z < 9$ ), les lacunes en couche K relaxent dans plus de 99 % des cas par effet Auger.

vraisemblablement une explosion coulombienne de la molécule. De plus, les deux électrons éjectés, l'électron Auger et le photo-électron, peuvent à leur tour endommager l'ADN. En utilisant le rayonnement synchrotron X-mou comme sonde de ces événements et en collaboration avec des biologistes (L. Sabatier, CEA, et E. Sage, Institut Curie), l'équipe de l'IMPMC a montré que les ionisations en couche interne des atomes de carbone de l'ADN étaient impliquées dans la mort cellulaire, la formation d'aberrations chromosomiques et l'induction de cassures double brin d'ADN irréparables [6].

**Jusqu'à présent, la plupart des études sur l'effet biologique des rayonnements ionisants se sont concentrées sur l'ADN. Le présent projet vise à étudier la radiolyse d'échantillons d'eau pure et de mélanges eau/protéines irradiés par des rayons X-mous (< 2000 eV) ou par des électrons de basse énergie (100 - 2000 eV), permettant ainsi d'analyser l'effet relatif des ionisations en couche K et des électrons.** L'originalité de l'approche proposée est de combiner des mesures de spectroscopie de photo-électrons et d'électrons Auger sur des dipeptides en solution pour caractériser les premières étapes du dépôt d'énergie, des simulations de dynamique moléculaire *ab initio* pour élucider les mécanismes de fragmentation ultra-rapides de ces dipeptides et des méthodes de quantification de pointe pour la détection des dommages finaux dans les protéines.

Du point de vue expérimental, l'objectif est de **mesurer la radiolyse d'échantillon d'eau pure et de mélanges eau/protéines induite par des photons X-mous ou des électrons, dans la gamme d'énergie de 100 à 2000 eV.** Ces études seront menées dans une cellule microfluidique, développée par l'équipe du NIMBE, utilisant une fenêtre en nitrure de silicium de 150 nm d'épaisseur pour permettre l'irradiation d'un liquide par des rayonnements faiblement pénétrants (*cf* Figure 1). La cellule microfluidique sera utilisée sur différentes sources de rayonnement, un canon à électrons disponible au NIMBE (100 eV - 4 keV) et la ligne de lumière Métrologie du synchrotron SOLEIL (100 eV - 1800 eV). Les expériences sur synchrotron seront réalisées à l'aide du dispositif IRAD développé par l'équipe de l'IMPMC (*cf* Figure 1). Ce dispositif permet d'extraire le faisceau X-mou de la ligne de lumière pour irradier des solutions. Il a récemment permis de mesurer le rendement de formation des radicaux hydroxyles HO° dans des échantillons d'eau liquide [7]. La détection des dommages aux protéines sera basée sur les méthodes FRET. Les dommages causés à une protéine marquée par fluorescence (généralement une albumine sérique) sont observés lors de la fragmentation comme une augmentation de sa fluorescence. Ces expériences, originales de par leur problématique, représentent aussi un challenge expérimental important en raison de la forte atténuation des rayons X-mous dans la matière. Les compétences des physiciens des équipes de l'IMPMC et de SOLEIL et leur expertise dans l'expérimentation utilisant des grands instruments sont indispensables pour la mise en place de telles expériences et leur réussite. Ces expériences demanderont également le développement de sondes très sensibles, travail qui sera supervisé par l'équipe du NIMBE.

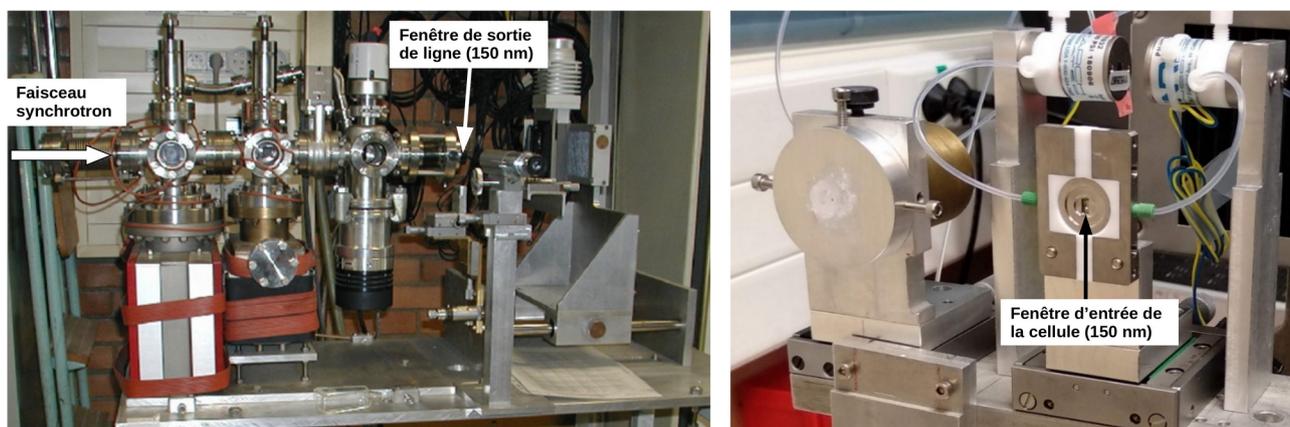


Figure 1. Dispositif expérimental permettant d'extraire le faisceau monochromatique X-mou de la ligne Métrologie à SOLEIL (gauche) et cellule microfluidique (droite).

Du point de vue théorique, le doctorant étudiera **les premières étapes ( $10^{-15}$  à  $10^{-12}$  s) de la dissociation d'un petit dipeptide doublement ionisé, après ionisation en couche K puis effet Auger, et immergé dans l'eau liquide**. Des études de spectroscopie d'électrons seront d'abord réalisées sur ce dipeptide en solution à l'aide du dispositif MultiSpec développé par l'équipe de SOLEIL. Ce dispositif combine un microjet liquide sous vide avec un analyseur d'électrons hémisphérique. Ces mesures permettront de déterminer les états électroniques initiaux. L'étude de la dynamique de fragmentation sera réalisée à l'aide d'une méthode originale, développée par l'équipe de l'IMPIC, en collaboration avec R. Vuilleumier (PASTEUR, ENS, SU) et M.-F. Politis et M.-P. Gaigeot (LAMBE, Université d'Evry). Cette méthode permet de décrire la fragmentation de molécules doublement ionisées immergées dans l'eau liquide. Pour cela, des simulations de dynamique moléculaire couplées à une description de la dynamique des électrons dans le cadre de la théorie de fonctionnelle de densité dépendant du temps (TDDFT) ont été développées. Le système ionisé y est décrit par la propagation d'orbitales moléculaires de Wannier localisées [8]. Celles-ci permettent de séparer les orbitales moléculaires du système ionisé de celles de son environnement. Cette méthode a été appliquée avec succès à l'étude de la fragmentation consécutive à l'ionisation double d'une molécule d'eau dans le liquide [9], puis d'une base de l'ARN, l'uracile isolée [10] et hydratée [2, 11] (cf Figure 2), et enfin du désoxyribose [13]. Le doctorant étudiera donc les conséquences d'ionisations multiples localisées sur le dipeptide et/ou sur des molécules d'eau voisines. L'étape de fragmentation des molécules ionisées sera modélisée par dynamique TDDFT de type Ehrenfest pendant quelques dizaines de femtosecondes. Une fois la fragmentation établie, les premières réactions chimiques des fragments formés avec le milieu seront suivies sur quelques picosecondes par dynamiques moléculaires Born Oppenheimer.

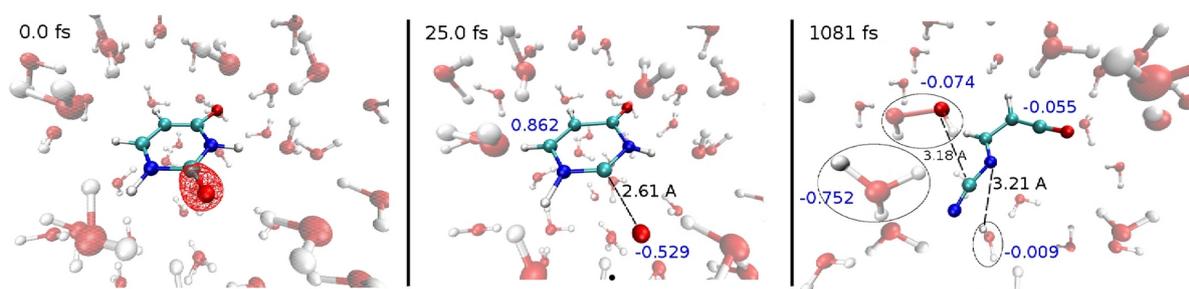


Figure 2. Fragmentation d'une molécule d'uracile doublement ionisée, immergée dans l'eau liquide [2]. À l'instant initial, les deux électrons sont retirés d'une orbitale moléculaire localisée sur une liaison CO de l'uracile (figure de gauche). L'uracile est cassée au bout d'une picoseconde (figure de droite).

## Bibliographie

- [1] Journées thématiques du réseau MELUSYN « Potentialités, Evaluations et Suivis Cliniques de Nouvelles Techniques Focalisées ou Ciblées pour la Radiothérapie », organisée à l'IMPIC en Juillet 2012.
- [2] Lopez-Tarifa *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 3160 (2013).
- [3] Goodhead & Thacker, *Int. J. Radiat. Biol.* **31**, 541 (1977). Goodhead *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.* **36**, 101 (1979).
- [4] Kobayashi *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.* **59**, 643 (1991). Saigusa *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.* **61**, 785 (1992).
- [5] Chetioui *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.* **65**, 511 (1994). Boissière *et al.*, *Radiat. Res.* **167**, 493 (2007).
- [6] Fayard *et al.*, *Radiat. Res.* **157**, 128 (2002). Gobert *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.* **80**, 135 (2004). Hervé du Penhoat *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.* **86**, 205 (2010).
- [7] Huart *et al.*, *J. Phys. Chem. A* (accepté). 10.1021/acs.jpca.9b10539
- [8] Hunt *et al.*, *Chem. Phys. Lett.* **376**, **68** (2003).
- [9] Tavernelli *et al.*, *ChemPhysChem* **9**, 2099 (2008).
- [10] Lopez-Tarifa *et al.*, *Phys. Rev. Lett.* **107**, 023202 (2011).
- [11] Gaigeot *et al.*, *Mutat. Res.-Rev. Mutat.* **704**, 45 (2010).
- [12] Hervé du Penhoat *et al.*, *J. Phys. Chem. A.* **122**, 5311 (2018). Hervé du Penhoat *et al.*, *Quantum Beam Sci.* **3**, 24 (2019).