

Université de Sherbrooke

PROTECTION DES IONS ORGANIQUES CONTRE LES DOMMAGES
INDUITS À L'ADN PAR LES ÉLECTRONS DE BASSE ÉNERGIE

Par

Ariane Dumont
Département de médecine nucléaire et radiobiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.) en Science des radiations et imagerie biomédicale

Novembre 2009

Évalué par

Pr. Léon Sanche, Département de médecine nucléaire et radiobiologie
Pr. Darel Hunting, Département de médecine nucléaire et radiobiologie
Pr. Benoît Paquette, Département de médecine nucléaire et radiobiologie
Pr. Guylain Boissonneault, Département de Biochimie



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-65629-7
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-65629-7

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

**Les aptitudes sont ce que vous pouvez faire.
La motivation détermine ce que vous faites.
Votre attitude détermine votre degré de réussite.**
-Lou Holtz

TABLE DES MATIÈRES

LISTES DES FIGURES	II
LISTES DES TABLEAUX	IV
LEXIQUE	V
RESUMÉ	
CHAPITRE I. INTRODUCTION	- 1 -
I.1. Phénomènes induits par la radiation ionisante	- 2 -
I.2. Interactions des électrons de basse énergie avec l'ADN	- 6 -
I.2.1. Structure de l'ADN	- 6 -
I.2.2. Les plasmides	- 9 -
I.2.3. Mécanismes d'interactions des électrons de basse énergie avec les sous unités de l'ADN	- 10 -
I.3. Rôle de l'environnement moléculaire de l'ADN	- 14 -
I.3.1. Influence de la présence de molécules d'eau sur l'interaction entre les électrons de basse énergie et l'ADN	- 14 -
I.3.2. Rôle des cations et des histones	- 16 -
I.4. Vue générale du projet	- 18 -
CHAPITRE II. MÉTHODE EXPÉRIMENTALE	- 20 -
II.1. Purification des plasmides	- 20 -
II.2. Préparation des films	- 25 -
II.3. Irradiation avec le canon à électrons	- 27 -
II.4. Analyse par gel d'électrophorèse	- 30 -
II.5. Calcul des rendements de cassures simple brin et de perte d'ADN surenroulé	- 32 -
CHAPITRE III. RÉSULTATS	- 33 -
III.1. Dommages en fonction de l'exposition aux électrons de 10eV	- 33 -
III.2. Comportement des échantillons non irradiés en fonction de la quantité d'ions organiques/ nucléotide	- 36 -
III.3. Dommage en fonction de l'épaisseur du film et du nombre d'ions organiques/ nucléotide dans le film	- 38 -
III.4. Dommage en fonction du nombre d'ions organiques/ nucléotide induit par des électrons de 10eV dans des films d'ADN d'épaisseur constante	- 42 -
CHAPITRE IV. DISCUSSION	- 45 -
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	- 61 -
REMERCIEMENTS	- 67 -
RÉFÉRENCES	- 69 -

LISTES DES FIGURES

- Figure 1:** Événements produits lors du transfert d'énergie de la radiation à la molécule AB - 2 -
- Figure 2:** Diagramme d'énergie potentielle illustrant la résonance d'un électron sur la molécule R-H - 5 -
- Figure 3:** Structure de l'ADN. - 8 -
- Figure 4:** Changement de topologie des plasmides surenroulés suite à une irradiation aux électrons de basse énergie - 9 -
- Figure 5:** Rendements mesurés par électron pour la perte d'ADN Surenroulé (a), l'induction de CSB (b) et de CDB (c) en fonction de l'énergie des électrons incidents - 10 -
- Figure 6:** Mécanisme menant à la rupture du lien phosphodiester - 12 -
- Figure 7:** Structure 5' -TpTpT-3' et positions des bris des liens N-glycosidique (1) et phosphodiester-sucre (C-O) (2-5). Les autres modèles étudiés consistaient en des monomères (pT, Tp, pTp) et des dimères (pTpT, TpTp, pTpTp)..... - 13 -
- Figure 8:** (a) Rendements d'ions H⁺ obtenus des films d' H₂O (triangle ouvert), des films GCAT purs (cercle noir) et des films possédant les deux composantes (cercle ouvert). (b) Rendement de H⁺ obtenu des films H₂O-GCAT auquel a été soustrait le rendement de H⁺ obtenus dans les films H₂O. (c) Rendement de H⁺ obtenu des films H₂O-GCAT auquel a été soustrait le rendement de H⁺ obtenu dans les films GCAT. La courbe pointillée en (c) représente les rendements de D⁺ obtenus dans les films D₂O-GCAT. - 15 -
- Figure 9:** Compaction de l'ADN par les histones - 17 -
- Figure 10:** Principe de chromatographie par exclusion de taille des colonnes sephadex - 22 -
- Figure 11:** A. Structure et poids moléculaire du Tris. B. Structure et poids moléculaire de l'EDTA. - 24 -
- Figure 12:** Vue générale de la chambre d'irradiation. A: Pompe turbo-moléculaire (520Vs); B: Jauge ionique; C: Boite à gants fermée hermétiquement; D: Canon d'électrons; E: Sonde Kelvin; F: Fenêtre; G: Analyseur de gaz résiduel (RGA); H: Fenêtre; I: Porte d'accès; J: soufflet Anti-vibration; K: Commande de

rotation; L: Porte échantillons; M: Alimentations électriques; N: Commande linéaire; O: Fenêtre..... - 28 -

Figure 13 : Porte-échantillons. A: Support à échantillons avec feuille de Tantale, B: Porte échantillons fixé sur un plateau horizontal tournant. - 29 -

Figure 14: Principe du gel d'électrophorèse..... - 30 -

Figure 15: Courbe dose-réponse pour des plasmides irradiés en présence (■) ou absence (●) de 12 ions organiques/ nucléotide. La pente initiale de chaque courbe a été déterminée en utilisant les 3 premiers points. La figure 6A représente la formation de cassures simple brin alors que la figure 6B représente la perte d'ADN surenroulé. La densité de courant a été gardée constante à 1.2×10^{10} électrons/seconde/cm² tout au long de l'expérience. Chaque point correspond à la valeur moyenne de 4 échantillons \pm écart-type. - 34 -

Figure 16 : Pourcentage d'ADN surenroulé dans les échantillons non irradiés déposés sur une surface de tantale, en fonction de la quantité d'ions organiques/ nucléotide. Chaque point correspond à la valeur moyenne de 4 échantillons \pm écart-type. ... - 37 -

Figure 17: A. Rendement expérimental de cassures simple brin induit par les électrons de 10eV en fonction de la quantité d'ions organiques/ nucléotide. - 39 -

Figure 18: Comparaison du rendement théorique de SSB pour des films d'épaisseur constante (5MC), si la présence d'ions organiques n'a aucun effet (ligne pointillée) avec le rendement expérimental (■) à épaisseur constante en fonction du nombre d'ions organique/ nucléotide. Chaque point correspond à la valeur moyenne de 6 échantillons \pm écart-type. - 43 -

Figure 19: Canaux de décroissance de l'anion transitoire formé par un électron d'énergie E_0 sur une base de l'ADN. Les mécanismes 1 à 3 représentent les canaux élastiques, DEA et inélastique, respectivement. e_i^- représente le transfert de l'électron de la base ou du fragment anionique (voie 4) au groupement phosphate..... - 54 -

Figure 20: Décroissance de la guanine anionique par attachement dissociative de l'électron. - 55 -

Figure 21: Restauration de la base déshydrogénée par la molécule Tris..... - 56 -

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1: Épaisseur moyenne des films estimée en nanomètres (nm) en fonction du nombre d'ions organiques/ nucléotide pour des échantillons ayant une quantité constante d'ADN (260ng)..... - 26 -

Tableau 2: Quantité d'ADN nécessaire en nanogrammes (ng) dans des films d'épaisseur constante (5MC) en fonction du nombre d'ion organique/ nucléotide présent dans le film..... - 27 -

LEXIQUE

A : Adénine

ADN: Acide deoxyribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

C : Cytosine

CDB : Cassure double brin

CSB : Cassure simple brin

DEA : Attachement dissociatif d'électrons (dissociative electron attachment)

DFT : théorie de densité fonctionnelle (density functional theory)

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EBE: Électrons de basse énergie (low energy electron)

EDTA : Acide éthylène tetra acétique

eV: Électron volts

G : Guanine

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance (high performance liquid chromatography)

L: ADN linéaire

MC: Monocouche

OSHET : Mécanisme « One-Step-Hydrogen-Electron-Transfer »

p.b. : Paire de base

S: ADN surenroulé (supercoiled DNA)

SE: Électrons secondaires (secondary electrons)

TAE: Tris acetate EDTA

TE: Tris-EDTA

TECPT : Mécanisme « Two-Electron-Coupled-Proton-Transfer »

UHV: Hypervide (ultra high vacuum)

UV: Ultra-violet

RESUMÉ

Il a été démontré que les électrons de basse énergie (EBE) peuvent induire des cassures simple brin (CSB) à l'ADN, via la formation d'anions transitoires qui décroissent par attachement dissociatif, ou dans d'autres états électroniques dissociatifs menant à la fragmentation. Afin d'effectuer une étude complète des effets des électrons de basse énergie sur la matière biologique, il est nécessaire de comprendre leur mécanismes d'interaction non seulement avec l'ADN, mais avec les constituants de son environnement. Les histones sont une composante importante de l'environnement moléculaire de l'ADN. Leur charge positive leur permet de s'associer aux groupements phosphate anionique de l'ADN. Le rôle principal de ces protéines basiques consiste à organiser l'ADN et l'empaqueter afin de former la chromatine. Les cations sont une autre composante importante de la cellule; ils jouent un rôle dans la stabilisation de la conformation B de l'ADN *in vitro* par leurs interactions avec les petits et grands sillons de l'ADN, ainsi qu'avec le groupement phosphate chargé négativement. Avec les histones, ils participent également à la compaction de l'ADN pour former la chromatine. Cette étude a pour but de comprendre comment la présence d'ions organiques (sous forme de Tris et d'EDTA) à proximité de l'ADN modifie le rendement de cassures simple brin induit par les électrons de basse énergie. Le Tris et l'EDTA ont été choisis comme objet d'étude, puisqu'en solution, ils forment le tampon standard pour solubiliser l'ADN dans les expériences *in vitro* (10mM Tris, 1mM EDTA). De plus, la molécule Tris possède un groupement amine alors que l'EDTA possède 4 groupements carboxyliques. Ensembles, ils peuvent se comporter comme un modèle simple pour les acides aminés.

Le ratio molaire de 10 :1 de Tris par rapport à l'EDTA a pour but d'imiter le comportement des histones qui sont riches en arginine et lysine, acides aminés possédant un groupement amine chargé positivement additionnel. Des films d'ADN de différentes épaisseurs, possédant entre 0 et 32 ions organiques/ nucléotide, ont été irradiés avec des électrons de 10eV. Les dommages induits par les électrons, sous forme de cassures, ont été détectés par électrophorèse. Nous avons démontré que le rendement de cassure simple brin diminuait de façon dramatique en fonction du nombre d'ions organiques/ nucléotide. Aussi peu que 2 ions organiques/ nucléotide sont suffisant pour décroître le rendement de SSB de 70%. Cet effet radioprotecteur est en partie expliqué par l'augmentation de l'épaisseur des films, mais surtout par la modification du champ électrique à proximité de l'ADN, due à l'ajout de molécules chargées positivement. La modification du champ électrique près de l'ADN altère les paramètres de résonance comme le temps de vie de l'anion transitoire et la limite de dissociation, qui influent directement sur la section efficace d'attachement dissociatif. L'effet protecteur peut également être expliqué par la restauration des bases anioniques déshydrogénées induites par l'attachement dissociatif de l'électron sur une base (G(-H)). Ce sont les molécules Tris qui, en transférant un atome d'hydrogène ou un proton, restaurent les bases déshydrogénées et inhibent par le fait même la formation de cassures simple brin. Ces résultats indiquent que les histones peuvent également participer à la réparation de dommages précoces induits à l'ADN avant qu'elles ne mènent à des dommages encore plus nocifs et difficiles à réparer, comme les cassures simples brins.

Mots clés : Électrons de basse énergie, dommage à l'ADN, ions organiques, attachement dissociatif de l'électron.

CHAPITRE I. INTRODUCTION

L'amélioration des procédures utilisées en radiothérapie et médecine nucléaire repose sur notre compréhension des effets de la radiation ionisante sur les systèmes biologiques comme l'ADN. En 2008, Statistique Canada estimait qu'il y aurait 166 400 nouveaux cas de cancer et 73 000 décès causés par cette maladie, ce qui explique l'engouement pour la recherche dans cette discipline. Lorsque les particules primaires de haute énergie et autres particules chargées rapides générées par les interactions primaires (effet compton, effet photoélectrique) se propagent à travers le milieu biologique, une grande quantité d'ions, de radicaux libres et d'électrons secondaires, ayant des énergies distribuées majoritairement entre 0 et 30eV, sont produits (INOKUTI, 1971) (UEHARA *et al.*, 1999). En effet, l'absorption d'un photon de 1 MeV donne lieu à la formation d'environ 40 000 électrons secondaires (LAVERNE *et al.*, 1995). Selon Cobut et ses collaborateurs, cette étape, d'une durée de 10^{-15} s, correspond à l'étape physique. Lors de l'étape physico-chimique, s'étendant de 10^{-15} s à 10^{-12} s, les électrons de basse énergie (EBE), qui transportent essentiellement l'énergie des particules primaires, déposent leur énergie cinétique sur de courtes distances dans la matière biologique en produisant des excitations électroniques, des ionisations et des anions transitoires avant d'être thermalisés ou solvatés. Afin d'obtenir une connaissance complète des effets de la radiation ionisante sur les systèmes biologiques et améliorer l'efficacité des traitements de radiothérapie, il devient crucial de comprendre et d'exploiter l'interaction de ces EBE

avec la cible principale de la cellule (ADN), mais aussi avec les constituants de son environnement (molécules d'eau, ions, protéines, etc.).

I.1. Phénomènes induits par la radiation ionisante

Afin de mieux comprendre les phénomènes induits suite au passage de la radiation ionisante dans la matière biologique, utilisons un modèle simple considérant l'interaction de la radiation avec un système condensé formé de molécules AB. Les réactions 1 à 6 correspondent au stade primaire, c'est-à-dire qu'elles représentent l'action directe de la radiation sur la molécule.

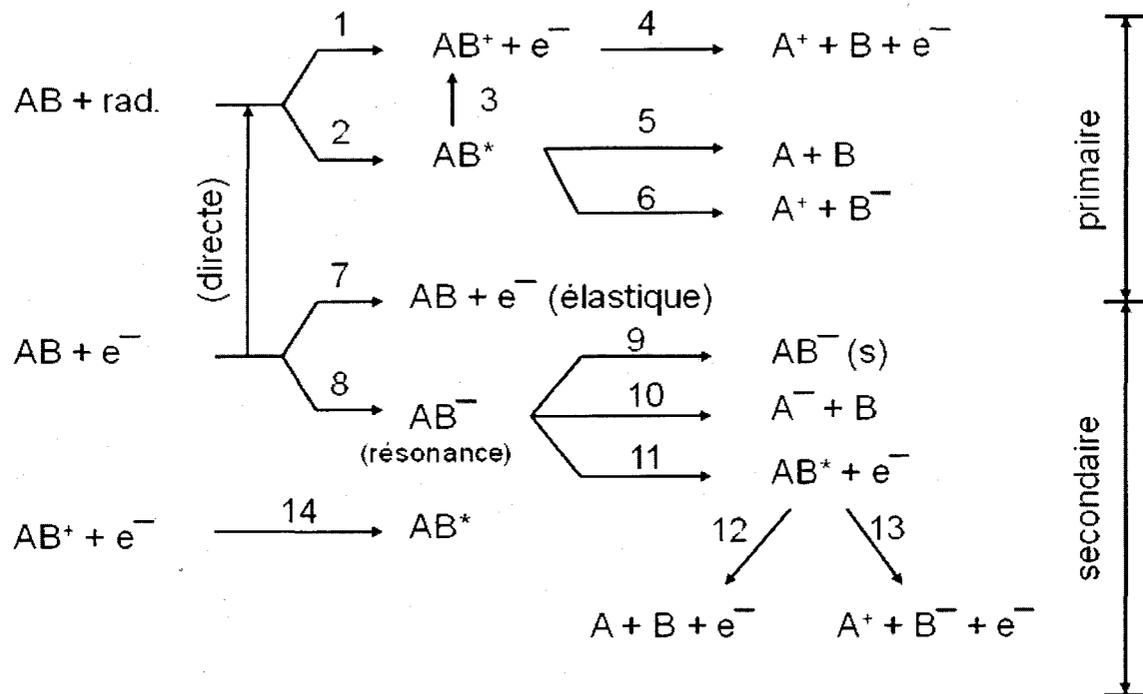


Figure 1: Événements produits lors du transfert d'énergie de la radiation à la molécule AB

En traversant la matière, la radiation dépose son énergie par des ionisations (1) ou des excitations (2). Lors de l'ionisation, un électron sera arraché à la molécule AB. L'électron secondaire créé possèdera alors une énergie bien inférieure à l'énergie de la radiation primaire. Dans certains cas, l'ion positif AB^+ sera dans un état dissociatif, ce qui mènera à la fragmentation de la molécule (4). Lorsque la molécule absorbe l'énergie de la radiation ionisante, on parle alors d'excitation. La molécule AB se trouvera dans un état électronique, rotationnel ou vibrationnel excité. Certains de ces états seront dissociatifs et mèneront à deux fragments neutres (5) ou deux fragments ioniques (6). Ce dernier mécanisme est appelé dissociation dipolaire. Dans le cas où l'énergie de l'état excité est supérieure à l'énergie nécessaire pour ioniser la molécule, il peut y avoir auto-ionisation (3). Les réactions 1 à 6 génèrent donc une très grande quantité d'ions, de radicaux, et d'électrons secondaires (40 000/MeV) dont l'énergie est majoritairement distribuée entre 0 et 30eV (PLATZMAN, 1955). On les nommera les électrons de basse énergie (EBE). Afin d'avoir une connaissance complète des effets de la radiation ionisante sur la matière biologique, il faut se pencher sur l'interaction de ces électrons avec la molécule AB (réactions 7 à 13).

Évidemment, la probabilité de chacune des réactions engendrées par les EBE est différente de celles induites par la radiation primaire, puisqu'à aussi basse énergie, la nature ondulatoire des électrons devient très importante. Selon l'énergie des électrons, ils pourront interagir avec les molécules AB selon les 6 réactions expliquées précédemment, soit en ionisant ou en excitant la molécule. Ils pourront également diffuser de façon élastique avec la molécule AB, c'est-à-dire qu'il n'y aura aucun transfert d'énergie avec

le milieu. Un autre phénomène possible est la résonance de l'électron. Ce phénomène survient lorsque l'électron est temporairement capturé par la molécule AB et forme un anion transitoire AB^- . À l'occasion, l'anion transitoire formé est stable (9), mais son temps de vie est généralement d'approximativement 10^{-10} - 10^{-15} s (SCHULZ, 1973). Si l'anion transitoire est dans un état dissociatif, il y aura fragmentation de la molécule AB et l'électron restera accroché à l'un des fragments. Ce mécanisme, débutant par la capture de l'électron et suivi par la fragmentation de la molécule, se nomme l'attachement dissociatif de l'électron (10). L'électron formant l'anion transitoire peut également s'auto-détacher, en laissant la molécule AB dans un état électronique, rotationnel ou vibrationnel excité. L'énergie de cet électron est alors inférieure à l'énergie initiale. Tel que démontré dans le stade primaire, l'état excité de la molécule AB peut être dissociatif et mener à deux fragments neutres (12) ou deux fragments ioniques (13). Bref, les résonances des électrons sur une molécule mènent très souvent à la dissociation de cette dernière.

Les diagrammes d'énergie potentielle d'une molécule diatomique en fonction de la distance r entre ses atomes sont une autre façon de représenter les résonances d'électron. Ici, nous utiliserons un modèle simple où l'électron est capturé par une molécule neutre se trouvant dans son niveau fondamental, soit son niveau électronique et vibrationnel le plus bas où l'énergie potentielle de la molécule est à 0eV (Voir figure 2).

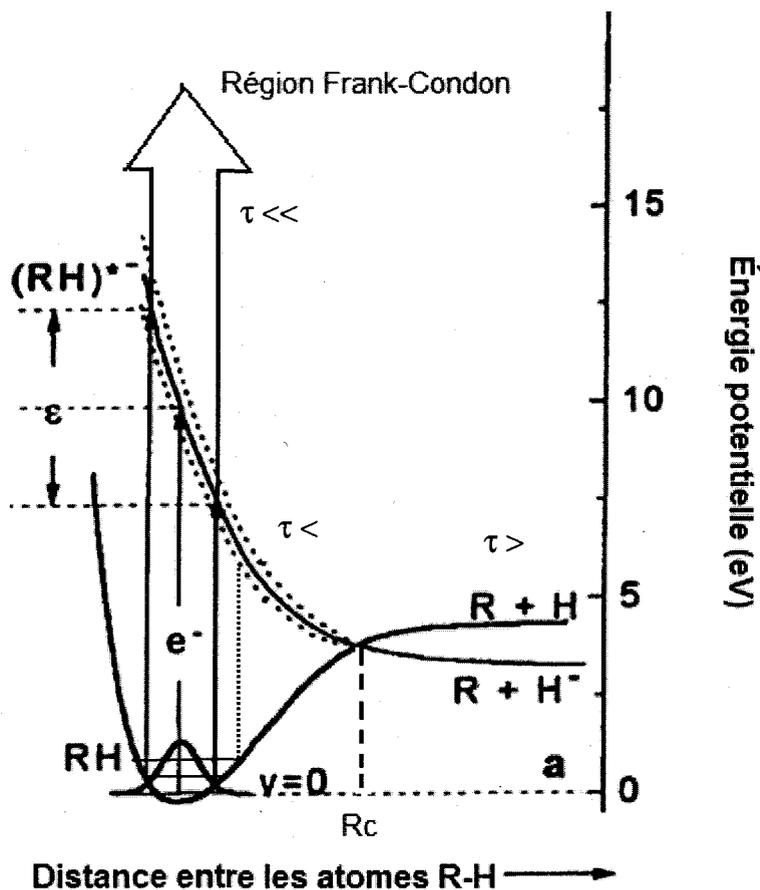


Figure 2: Diagramme d'énergie potentielle illustrant la résonance d'un électron sur la molécule R-H

Bien que l'énergie soit nulle, la distance entre les deux atomes R et H oscille toutefois entre 2 valeurs, due au principe d'incertitude. Pour qu'il y ait résonance, l'électron doit répondre à certaines conditions. Il faut d'abord que sa longueur d'onde soit de l'ordre des distances interatomiques et que l'électron reste plus longtemps dans le voisinage de la molécule que lors d'une diffusion ordinaire. Lorsque la molécule R-H capture l'électron, un anion transitoire (R-H)*⁻ est créé et il évoluera selon une nouvelle courbe de potentielle. Cette transition s'effectue si rapidement que la distance entre les atomes R et H ne varie pratiquement pas. On dit que la transition se fait dans la région de Frank-Condon. La plupart du temps, l'anion transitoire est instable. Il cherchera donc à

revenir à un niveau d'énergie plus bas. C'est le temps de vie de l'anion transitoire qui définira l'état final de la molécule. Lorsque le temps de vie de l'anion transitoire est court, l'électron s'auto-détache en laissant la molécule revenir à son état fondamental. Si le temps de vie de l'anion est un peu plus long, son énergie potentielle diminuera graduellement selon la courbe d'énergie potentielle sur laquelle il se situe. Au moment où l'électron s'auto-détachera, il partira avec une énergie inférieure à l'énergie initiale et la molécule R-H tombera dans un niveau vibrationnel ou rotationnel excité. Enfin, si le temps de vie de l'anion transitoire est assez long pour que sa courbe de potentiel croise celle de la molécule R-H neutre, la dissociation devient la seule voie possible. L'électron restera accroché à l'un des fragments et on parlera alors d'attachement dissociatif. La distance r à laquelle les deux courbes de potentiel se croisent correspond à la limite de dissociation R_c . Le temps de vie de l'anion transitoire n'est pas le seul critère à observer pour qu'il y ait dissociation ou non. Il faut aussi que l'anion soit dissociatif dans la région de Frank-Condon (c'est-à-dire que l'énergie potentielle dans la région Frank-Condon soit supérieure à l'énergie potentielle des fragments dissociés) et que l'un des deux fragments ait une affinité électronique positive (SANCHE, 1991).

I.2. Interactions des électrons de basse énergie avec l'ADN

I.2.1. Structure de l'ADN

L'ADN est composé de deux chaînes de polynucléotides enroulées de sorte à former une hélice. Chaque nucléotide est composé d'une base azotée; adénine (A),

thymine (T), guanine (G) et cytosine (C), fixée sur un désoxyribone par la liaison N-glycosidique qui lui, est lié à un ou plusieurs phosphates. La succession des nucléotides se fait grâce à des liaisons fortes 5'-3' phosphodiester, impliquant le groupement phosphate. La complémentarité des brins d'ADN s'effectue grâce aux quatre bases azotées. Une pyrimidine (thymine, cytosine) sera toujours associée à une purine (adénine, guanine), de sorte que l'adénine sera toujours reliée à la thymine par deux ponts hydrogène et la cytosine sera toujours liée à la guanine par 3 ponts hydrogène. Les brins d'ADN sont antiparallèles, c'est-à-dire que l'extrémité 5' d'un des brins sera en contact avec l'extrémité 3' de l'autre (cette notation est liée à la géométrie du désoxyribose). Ceci explique la présence des petits et grands sillons qui permettent l'accès à la séquence de nucléotide sans avoir à séparer les brins entre eux. La séquence selon laquelle sont disposés les nucléotides constitue le code génétique (CAMPBELL ET MATHIEU, 1995).

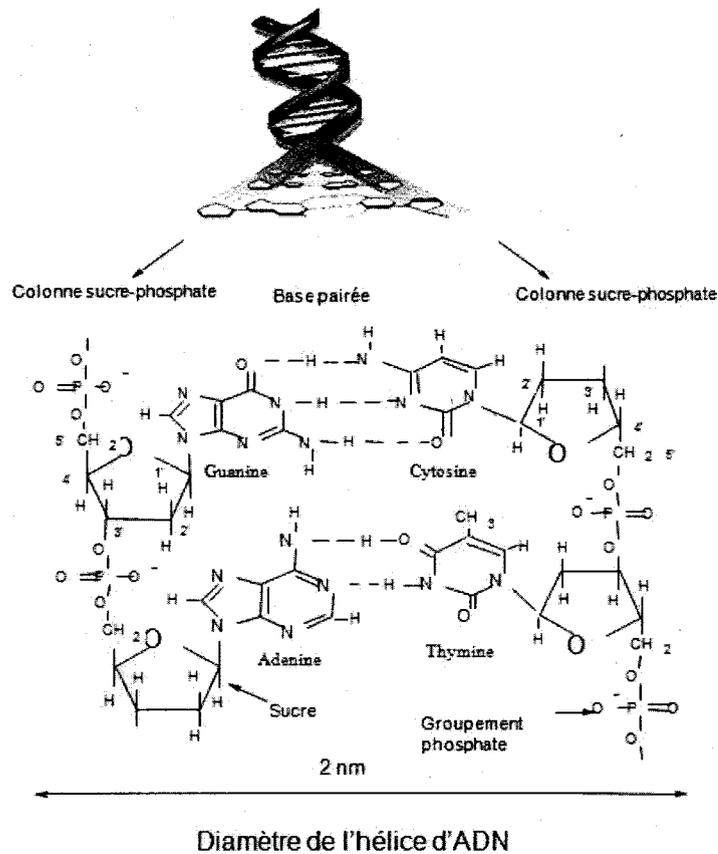


Figure 3: Structure de l'ADN.

Malgré que la complémentarité des bases assurent une certaine stabilité de l'information génétique, des modifications spontanées à la structure chimique de l'ADN peuvent survenir au cours de la réplication, ou encore être induites par des agents génotoxiques, comme le rayonnement ionisant. Parmi ces modifications, on compte les CSB, les CDB, les dimères, la dégradation ou disparition de bases, les pontages avec des protéines, l'oxydation des bases, etc. qui peuvent mener aux processus de mutations, cancérisation et même la mort cellulaire (LINGAHL ET NYBERG, 1972) (SAKUMI ET SEKIGUCHI, 1990) (SANCAR, 1996) (KOHN, 1996). Les modifications peuvent aussi consister en un échange d'une portion d'ADN avec un autre ADN (recombinaison

génétique). Ce phénomène est à l'origine des aberrations chromosomiques souvent associés à la perte d'information génétique. Dans ce travail, nos efforts ont été concentrés sur la détection des cassures simples et doubles brins induites à l'ADN plasmidique par les électrons de basse énergie.

I.2.2. Les plasmides

Un plasmide est une molécule d'ADN distincte de l'ADN chromosomique, capable de réplication autonome et qui n'est pas essentiel à la survie de la cellule. On retrouve les plasmides presque exclusivement dans les bactéries. Le choix d'un plasmide comme cible à irradier est principalement motivé par le fait qu'il est hypersensible aux dommages induits par la radiation ionisante. Une seule cassure est suffisante pour transformer sa topologie. Il est donc très facile de distinguer les plasmides intacts (surenroulé) des plasmides endommagés, soit ceux qui ont subi des cassures simples brins (CSB) menant à la forme circulaire et ceux qui ont subi des cassures doubles brins (CDB) menant à la forme linéaire (voir figure 4).

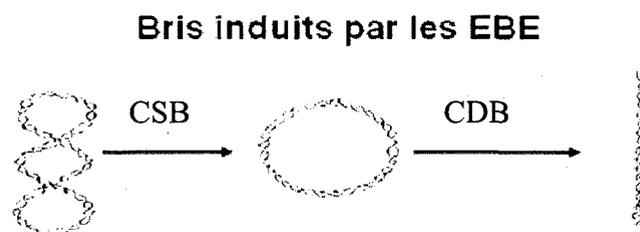


Figure 4: Changement de topologie des plasmides surenroulés suite à une irradiation aux électrons de basse énergie

I.2.3. Mécanismes d'interactions des électrons de basse énergie avec les sous unités de l'ADN

Bien que les résonances aient été expliquées à l'aide d'un modèle simple comportant des molécules diatomiques en phase condensée, ce phénomène est possible et observable sur des molécules d'intérêt biologiques. C'est en 2000 que Boudaïffa *et al.* ont identifiée pour la première fois des structures de résonances localisées autour de 10eV formées par l'interaction d'électrons de basse énergie avec l'ADN.

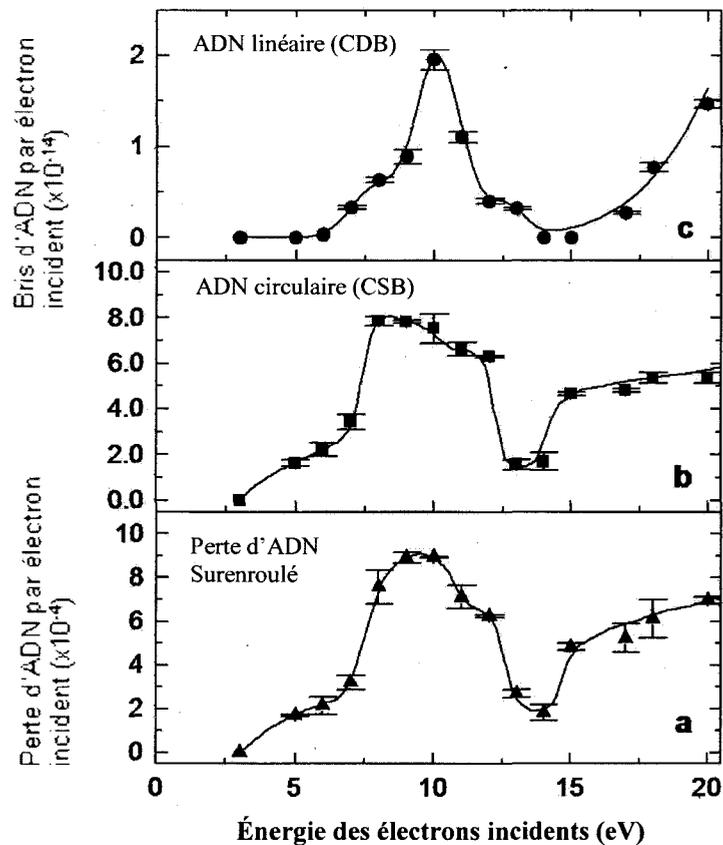


Figure 5: Rendements mesurés par électron pour la perte d'ADN Surenroulé (a), l'induction de CSB (b) et de CDB (c) en fonction de l'énergie des électrons incidents

Ces structures ont été identifiées suite à l'irradiation de plasmides avec des électrons d'énergie incidente variant entre 3 et 20eV (voir figure 5). Ces résultats correspondent au premier exemple du potentiel de ces électrons d'induire des cassures à l'ADN à des énergie inférieure au seuil d'ionisation de l'ADN (7.5-10eV) (COLSON *et al.*, 1992). Le maximum de CSB à l'ADN induits autour de 10eV a été attribué à la capture d'un électron par une des diverses composantes de l'ADN (base, désoxyribose, phosphate ou encore molécule d'eau faisant partie intégrante de la structure de l'ADN) formant ainsi un anion transitoire se trouvant dans un état répulsif. Dans ce cas, la capture de l'électron est suivie par la dissociation de liens spécifiques à l'intérieur du temps de vie de l'anion transitoire (généralement en femtosecondes). Les CDB, elles, ont été attribuées aux produits de la fragmentation qui réagissent localement avec les composantes de l'ADN pour former une 2^e cassure séparée de moins de 10 paires de base d'un bris situé sur le brin opposé (BOUDAÏFFA *et al.*, 2000).

Il a fallu 5 à 8 ans avant de connaître quelles sous-unités de l'ADN étaient impliquées dans la capture de l'électron. Grâce à l'analyse HPLC (high performance liquid chromatography) des fragments générés lors de l'irradiation de courts brins d'ADN, il a été possible d'obtenir de l'information sur la nature des liens brisés à l'intérieur de l'oligonucléotide étudié. Suite à l'irradiation des tétramères CGAT et GCTA, Zheng *et al.* ont détecté des bases non modifiées libres provenant de la rupture directe des liens N-glycosidiques. De plus, la détection de sucres radicalaires ainsi que de fragments contenant un phosphate terminal anionique ont déterminé que le bris du lien C-O entre le sucre et le phosphate était à l'origine de la rupture du lien phosphodiester (voir figure 6).

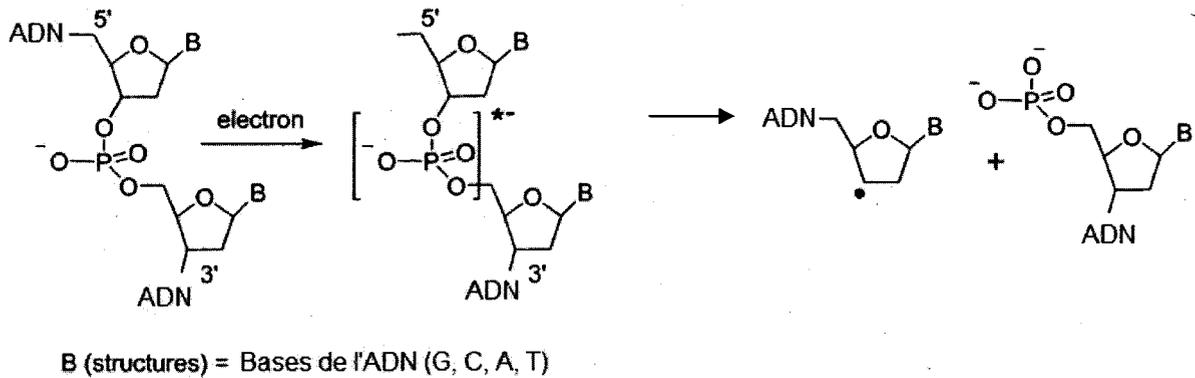


Figure 6: Mécanisme menant à la rupture du lien phosphodiester

Ce mécanisme est donc attribué à la formation d'un anion transitoire sur le groupement phosphate de l'ADN, décroissant par attachement dissociatif (ZHENG *et al.*, 2005) (ZHENG *et al.*, 2006). Toutefois, ce travail ne permet pas de déterminer si la rupture du lien phosphodiester provient de la capture directe de l'électron par le phosphate ou par la capture de l'électron par une base, suivi du transfert de l'électron de la base au phosphate.

Cette question a été résolue par Zheng *et al.* et Li *et al.* qui ont irradié une série de petits fragments d'ADN d'une longueur de 1 à 3 bases possédant ou non un phosphate terminal (dThd, pT, Tp, pTp, TpT, pTpT, TpTp, pTpTp et TpTpT) avec des électrons de 10eV.

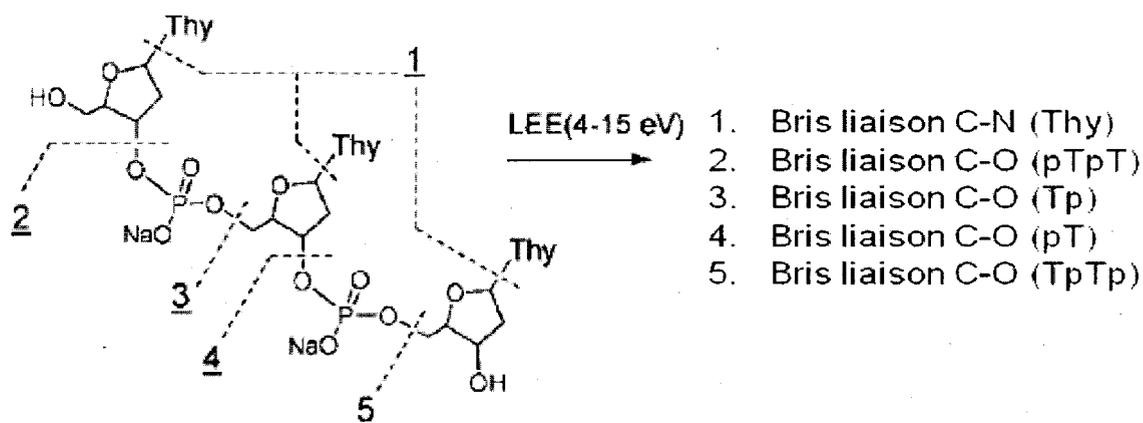


Figure 7: Structure 5' -TpTpT-3' et positions des bris des liens N-glycosidique (1) et phosphodiester-sucre (C-O) (2-5). Les autres modèles étudiés consistaient en des monomères (pT, Tp, pTp) et des dimères (pTpT, TpTp, pTpTp)

L'analyse des fragments obtenus suite à l'irradiation a révélée que l'ajout d'un phosphate terminal augmentait de façon considérable la quantité de dommage totale (basé sur la perte de la molécule initiale), indiquant que le phosphate capture de façon efficace l'électron incident. Par contre, la présence de ce même phosphate terminal a également pour effet de diminuer la quantité de thymine libérée par la rupture du lien C-N (voir figure 7) et réprimer la formation de bris C-O, connu pour être à l'origine des CSB. Ces résultats ont permis de conclure que la capture initiale de l'électron par le phosphate mène à un mécanisme de dommage différent de celui qui génère les fragments induits par la rupture des liens C-N et C-O. La capture initiale de l'électron par une base, suivi du transfert de l'électron au lien phosphodiester (P=O) et rupture du lien C-O correspond donc au mécanisme principal menant aux cassures simples brins. Par contre, la capture initiale de l'électron par le phosphate demeure une voie possible (LI *et al.*, 2008).

I.3. Rôle de l'environnement moléculaire de l'ADN

I.3.1. Influence de la présence de molécules d'eau sur l'interaction entre les électrons de basse énergie et l'ADN

Les études portant sur les interactions entre les EBE et l'ADN ont permis de comprendre les mécanismes fondamentaux menant à la formation de dommages. Toutefois, ces expériences, utilisant des films d'ADN sec sous condition d'ultra-vide, ne reflètent pas les conditions retrouvées en milieu cellulaire. Une série d'expérience a donc été initiée afin de comprendre comment l'environnement de l'ADN modifie son interaction avec les EBE (BRUN *et al.*, 2009) (PTASINSKA ET SANCHE, 2007).

La première expérience de cette série, effectuée par Ptasinska et Sanche, consistait à étudier l'influence des molécules d'eau à proximité de la structure de l'ADN. Un tétramère GCAT a donc été recouvert de 3MC d'eau (H_2O , D_2O et $H_2^{18}O$), représentant 60% de la première couche d'hydratation, sous forme de glace amorphe et a été irradié avec des électrons d'énergie inférieure à 20eV. La désorption des ions H^+ , O^- et OH^- a été analysé à l'aide d'un spectromètre de masse. La figure 8 représente les rendements d'ions H^+ désorbés en fonction de l'énergie des électrons dans les films d' H_2O purs, GCAT pur et H_2O -GCAT (a). Les figures 8b et 8c représentent le signal obtenu dans les films H_2O -GCAT auquel ont été soustraits les signaux obtenus dans les films H_2O et GCAT purs, respectivement.

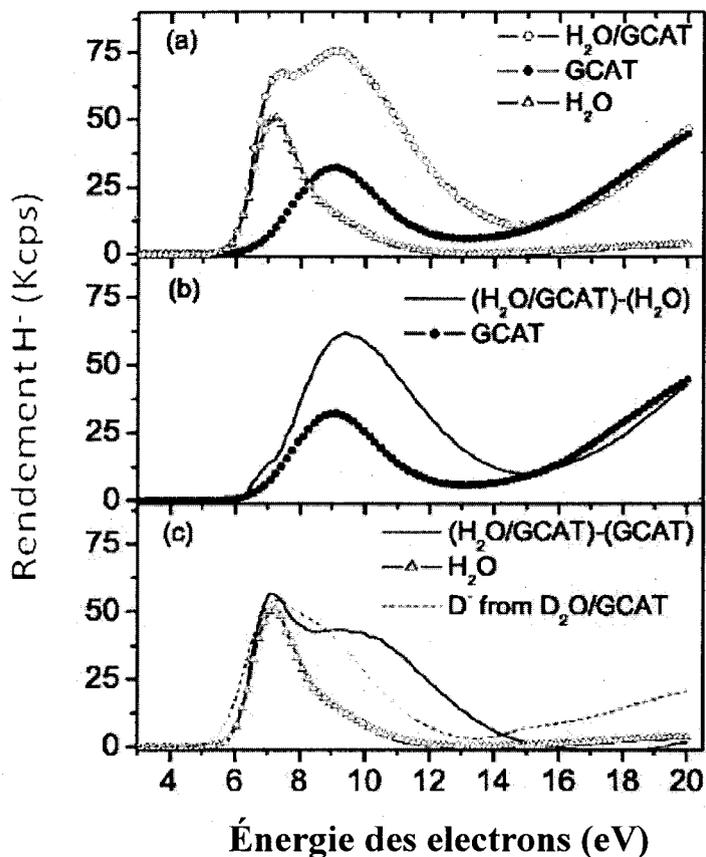


Figure 8: (a) Rendements d'ions H^- obtenus des films d' H_2O (triangle ouvert), des films GCAT purs (cercle noir) et des films possédant les deux composantes (cercle ouvert). (b) Rendement de H^- obtenu des films H_2O -GCAT auquel a été soustrait le rendement de H^- obtenus dans les films H_2O . (c) Rendement de H^- obtenu des films H_2O -GCAT auquel a été soustrait le rendement de H^- obtenus dans les films GCAT. La courbe pointillée en (c) représente les rendements de D^- obtenus dans les films D_2O -GCAT.

À première vue, les deux pics observés dans le signal obtenus des films H_2O -GCAT (en (a)) semblent provenir de l'addition des signaux obtenus pour les films de H_2O et GCAT seuls. Pourtant, la figure 8b démontre que le signal résultant de la soustraction du signal obtenu dans les films d' H_2O seul du signal provenant des films possédant les deux composantes ne correspond pas au signal provenant des films de GCAT purs. Ceci indique que la désorption de H^- provient partiellement ou complètement d'un autre type d'anion transitoire dissociatif. Il a été démontré que cet anion transitoire provenait de la capture de l'électron par le complexe ADN- H_2O

décroissant par attachement dissociatif. Cette nouvelle structure de résonance possède une amplitude et une largeur en énergie différente de celle observée dans les films d'ADN pur (PTASINSKA ET SANCHE, 2007).

Cette expérience est le premier exemple démontrant que l'environnement moléculaire de l'ADN a le potentiel de modifier les mécanismes fondamentaux par lesquels les électrons de basse énergie induisent des dommages à l'ADN.

I.3.2. Rôle des cations et des histones

Les molécules d'eau ne sont pas les seules composantes de l'environnement moléculaire de l'ADN. Les histones, qui sont des protéines basiques, sont également en contact étroit avec la structure de l'ADN. Puisqu'elles sont riches en arginine et lysine (acides aminés possédant un groupement amine additionnel), cela leur confère une charge positive leur permettant de s'associer aux groupements phosphate anionique de l'ADN des eucaryotes (GARRETT ET GRISHAM, 2000). Le rôle principal des histones consiste à organiser l'ADN et l'empaqueter afin de former la chromatine (YOUNGSON, 2006) (NELSON ET COX, 2005). Il en existe 5 types: Les histones H2A, H2B, H3 et H4 vont s'associer pour former un octamère autour duquel 146 paires de base de l'ADN vont s'enrouler créant ainsi ce qu'on appelle un nucléosome (figure 9). Cette première étape correspond au premier niveau de condensation de l'ADN (10nm). L'histone H1, elle, permettra un deuxième degré de compaction sous forme de solénoïde afin de créer une fibre de chromatine de 30nm de diamètre (BHASIN *et al.*, 2006) (HARTL *et al.*, 1988).

Les histones sont également impliquées dans la transcription, la réplication et même la réparation de l'ADN.

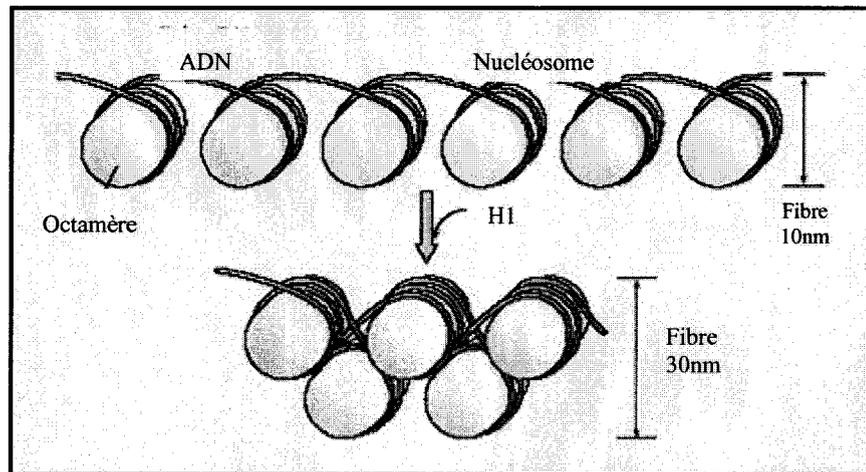


Figure 9: Compaction de l'ADN par les histones

Les cations sont un autre constituant important de la cellule. On les retrouve en ratio stœchiométrique de 1 mol par 2 mol de phosphate. Leur rôle consiste entre autre à stabiliser la conformation B de l'ADN *in vitro* par leur interaction avec les petits et grands sillons de l'ADN, ainsi qu'avec le groupement phosphate chargé négativement (STRISSEL *et al.*, 2004) (MATHIESON ET OLAYEMI, 1975) (MINASOV *et al.*, 1999) (CHIU ET DICKERON, 2000). À l'aide des histones, les cations participent au deuxième degré de condensation de l'ADN. Une étude a démontré que l'augmentation de Na^+ , Mg^{2+} et Ca^{2+} peut induire la compaction de l'ADN sous forme de solénoïde afin de créer la fibre de chromatine (30nm de diamètre) (FELSENFELD ET MCGHEE, 1986).

I.4. Vue générale du projet

À cause de leur promiscuité avec l'ADN, les histones et les cations sont susceptibles d'interagir avec les électrons de basse énergie. La présente étude vise donc à comprendre comment la présence d'ions organiques, sous forme de Tris et d'EDTA, modifie les mécanismes fondamentaux menant aux dommages à l'ADN. Le Tris et l'EDTA ont été choisis comme objet d'étude pour plusieurs raisons. D'abord, une solution de 10mM Tris et 1mM EDTA correspond au tampon standard pour suspendre et conserver l'ADN. Ensuite, tel que démontré à la figure 11 de la section suivante, la molécule Tris possède un groupement amine (NH_2) alors que l'EDTA contient 4 groupements carboxyliques. Ensembles, ils peuvent être utilisés comme modèle simple pour les acides aminés, unités structurales de base des protéines. Enfin, un ratio molaire de 10 :1 de Tris par rapport à l'EDTA permet d'imiter le comportement des histones, riches en arginine et en lysine qui possèdent un groupement amine chargé positivement additionnel. Il est attendu que la charge positive de la molécule Tris soit attirée par le groupement phosphate anionique de l'ADN. Quelques autres molécules se logeront dans les petits et grands sillons de l'ADN. L'interaction avec l'EDTA devrait être beaucoup moins importante due à ses quatre charges négatives.

Ce travail divulgue les résultats d'une série d'expérience sur l'influence du nombre d'ions organiques sur les rendements de cassures simples brins (CSB) induits à l'ADN par les électrons de basse énergie. Cette étude a été effectuée sous condition d'hypervide, en bombardant des films d'ADN de différentes épaisseurs possédant entre 0 et 32

ions organiques/ nucléotide avec des électrons de 10eV. À cette énergie, les dommages à l'ADN sont dominés par la formation d'anions transitoires qui décroissent via deux mécanismes de fragmentation : l'attachement dissociatif de l'électron et les états électroniques dissociatifs. Brièvement, les résultats démontrent que les rendements de cassures simples brins diminuent en fonction du nombre d'ions organiques/ nucléotide dans les films d'ADN d'épaisseur variable ou constante. Cet effet protecteur est partiellement expliqué par une dépendance selon l'épaisseur des films, mais surtout par la modification des paramètres de résonance, et la restauration de fragments anioniques de l'ADN induit par l'attachement dissociatif de l'électron sur les bases de l'ADN. Enfin, les résultats démontrent que certaines molécules chargées positivement en contact étroit avec l'ADN (comme les histones) peuvent participer à la restauration de dommages précoces tels les fragments anioniques de l'ADN induits par l'attachement dissociatif de l'électron sur les bases de l'ADN.

CHAPITRE II. MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

II.1. Purification des plasmides

Le plasmide pGem-3zf(-) possédant 3197 p.b. a été amplifié dans la bactérie E. Coli (JM109) et extrait par la méthode de lyse alcaline. Il a ensuite été purifié à l'aide d'une colonne de résine chromatographique échangeuse d'ions (QIAGEN) afin d'enlever un maximum de protéine et d'ARN. Finalement, l'ADN a été précipité et dissout dans une solution de TE (10mM Tris, 1mM EDTA) permettant de le stabiliser et de le conserver plusieurs mois sans le dégrader.

Dans le cas où les plasmides sont liés à une importante quantité de protéines, des purifications supplémentaires au phénol/chloroforme peuvent être nécessaires afin d'enlever le maximum de protéine. Il faut alors déterminer la proportion de protéine liée au plasmide en calculant le ratio de l'absorbance UV de l'ADN (260nm) et de l'absorbance UV des protéines (280nm). Un ratio de 1.98 a été calculé suite à l'extraction du plasmide signifiant que moins de 15% de protéines sont liés à l'ADN (WARBERG ET CHRISTIAN, 1942) (GLASEL, 1995) (MANCHESTER, 1995) (WILFINGER, 1997). Le plasmide ne requiert donc aucune purification supplémentaire. La valeur de l'absorbance UV de l'ADN permet également de connaître sa concentration, considérant qu'une absorbance de 1.00 correspond à une concentration de 50ug/ml d'ADN double brins (SAMBROOK *et al.*, 1989). Finalement, la qualité du plasmide a été mesurée grâce

à un gel d'électrophorèse démontrant que 95% du plasmide se trouve sous forme surenroulé, 4% sous forme circulaire et 1% sous forme de concatémère.

Pour les besoins de l'étude, un protocole de purification approprié a dû être choisi afin d'enlever un maximum d'ions Tris et EDTA en solution et obtenir des échantillons d'ADN en absence d'ions organiques servant de contrôle. L'efficacité de plusieurs protocoles a été testée et comparée. Parmi ceux-ci, le « nucleotide removal kit » de QIAGEN ainsi que la précipitation à l'acétate d'ammonium ont été jugés inadéquats dû à la perte de près de la moitié de l'ADN suite à chaque purification ainsi qu'à la grande variabilité des résultats. Ce sont plutôt les colonnes sephadex G-50 qui se sont avérées le meilleur choix. Ces colonnes reposent sur le principe de chromatographie par exclusion de taille détaillée à la figure 10 suivante:

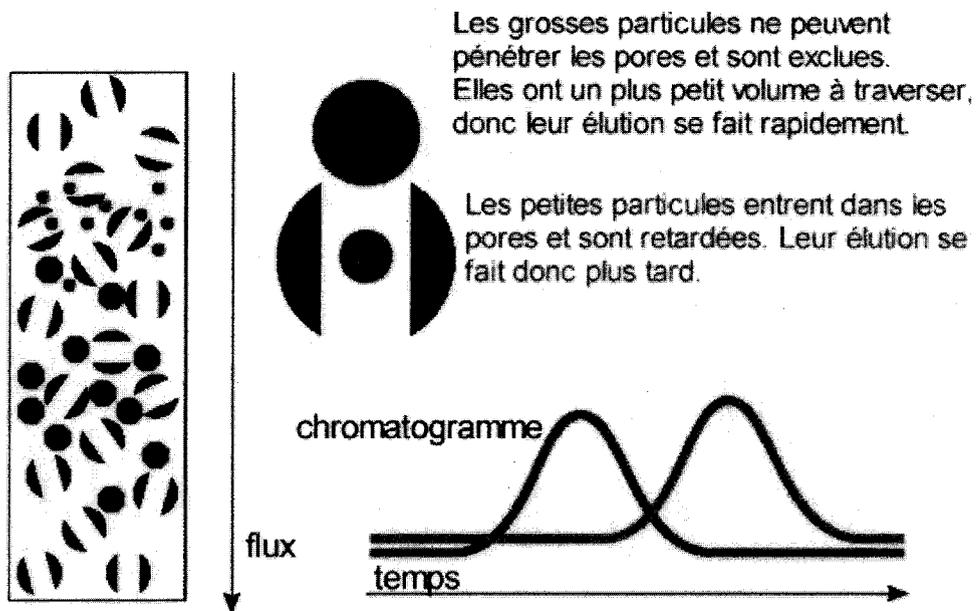


Figure 10: Principe de chromatographie par exclusion de taille des colonnes sephadex.

Les colonnes consistent en des petites particules de gel sphériques compactées dans une colonne, formant ainsi une matrice. Les molécules dont la taille est plus grande que les pores de la matrice (par exemple l'ADN), ne pourront diffuser entre ces pores et passeront tout droit dans la colonne. Comme elles traversent la colonne plus rapidement, elles seront éluées en premier lors de la centrifugation. Les petites particules (comme le Tris et l'EDTA, les sels, etc.), elles, diffusent dans les pores de la matrice. Leur migration est retardée et leur élution se fait donc plus tard. Les molécules sont alors séparées selon leur taille (Gel filtration principles and method handbook, GE healthcare life science). Bien que les colonnes sephadex soient fabriquées en laboratoire et que cela occasionne une certaine variabilité dans les résultats, elles sont beaucoup plus reproductibles que les protocoles cités précédemment. De plus, elles permettent de purifier une petite quantité

d'ADN à la fois, occasionnant beaucoup moins de perte de matériel. Enfin, les colonnes sephadex répondent au critère de sélection le plus important, soit de ne pas endommager l'ADN qui le traverse. Pour chacune des expériences, 7.5ug d'ADN dissout dans une solution de TE (contenant 0.24mg d'ions organiques) a été centrifugé pour une durée de 8 minutes dans 450ul de sephadex G-50 préalablement lavé avec 150ul de ddH₂O. L'ADN récupéré a été purifié une seconde fois dans une deuxième colonne sephadex afin d'enlever le maximum de Tris et EDTA.

L'efficacité des colonnes sephadex G-50 a été vérifiée précédemment par Cecchini *et al* en purifiant des oligonucléotides marqués au P-32. La comparaison de la quantité de radioactivité avant et après le protocole de purification a déterminé que les colonnes pouvaient enlever 99.9% du ³²P [gamma-ATP] libre (qui n'a pas réagit avec les oligonucléotides) dans la solution (CECCHINI *et al.*, 2004). En assumant que l'efficacité des colonnes est approximativement la même pour enlever les molécules de Tris et EDTA, il est estimé que la quantité d'ion restante dans les solutions d'ADN correspond à 1 ion organique/ nucléotide, en plus du contre ion. Les molécules résiduelles de Tris et EDTA sont nécessaires afin de stabiliser l'ADN en solution de produire un minimum de dommage lors de la manipulation des échantillons.

Dans la présentation des résultats inclus dans ce mémoire, il est toujours référé aux quantités de Tris et EDTA ajoutés à l'ADN purifié. Les films d'ADN en absence d'ions organiques/ nucléotide correspondent donc aux échantillons d'ADN purifié contenant une quantité minimale de Tris et d'EDTA. Les autres échantillons nécessaires à

l'étude ont été préparés en ajoutant différentes quantités d'ions organiques variant entre 1 et 32 ions organiques/ nucléotide à l'ADN purifié. Cette plage permet d'étudier l'effet des ions organiques interagissant directement avec l'ADN ainsi que l'effet des ions organiques faisant simplement partie de l'environnement de l'ADN. Les structures du Tris et de l'EDTA, ainsi que leur poids moléculaire respectif sont présentés à la figure 11. Tel qu'expliqué dans l'introduction, la charge positive de la molécule Tris devrait être attirées par le groupement phosphate chargé négativement de l'ADN. D'autres molécules se logeront dans les petits et grands sillons de l'ADN. L'interaction de la molécule EDTA avec l'ADN devrait être beaucoup moins importante due à ses quatre charges négatives.

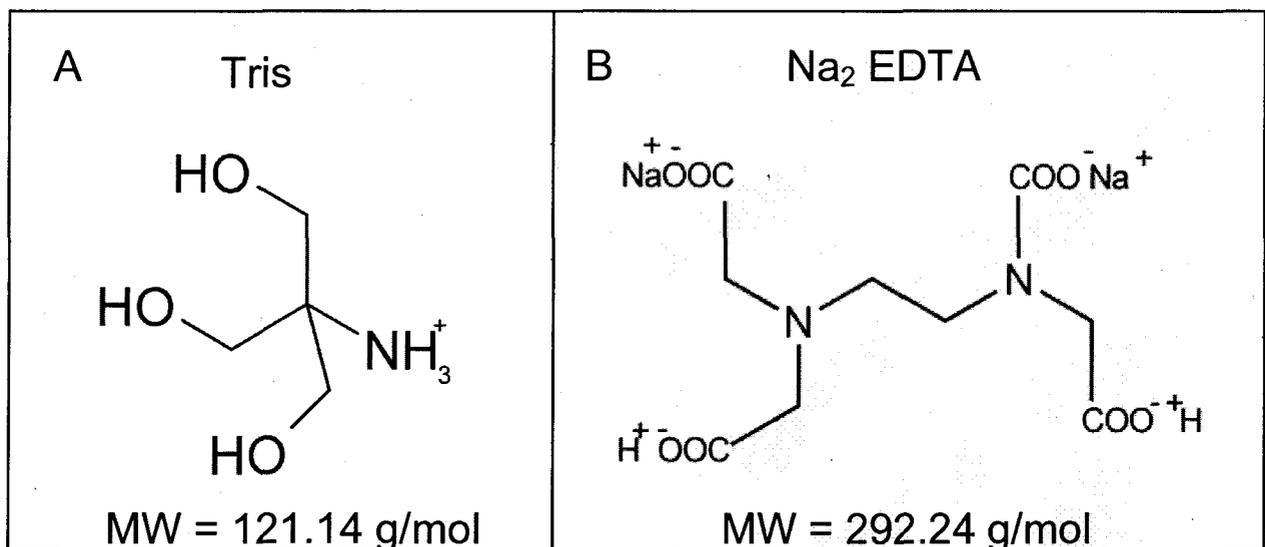


Figure 11: A. Structure et poids moléculaire du Tris. B. Structure et poids moléculaire de l'EDTA.

II.2. Préparation des films

Afin de déterminer à quelle énergie les électrons frappent la cible d'ADN, les plasmides doivent être préalablement déposés sur une surface conductrice qui permettra de mesurer le potentiel des électrons incidents. Bien que plusieurs substrats répondent à ce critère, le choix s'est arrêté sur le tantale, puisque ce métal endommage peu l'ADN suite au processus de lyophilisation, comparativement à d'autres substrats, comme l'or. Ce dernier est connu pour induire jusqu'à 25% de cassures simple brin à l'ADN non irradié (BRUN *et al.*, 2009).

Dans le but d'obtenir les résultats présentés dans les figures 15 à 17, différentes quantités de Tris et d'EDTA variant entre 0 et 32 ions organiques/ nucléotide ont été ajoutées à une quantité constante (260ng) d'ADN. Un volume de 10ul de chacune de ces solutions a ensuite été déposé sur une feuille de tantale (Goodfellow, 99.9% de pureté, 0.025mm d'épaisseur). Chaque échantillon a été refroidi avec de l'azote liquide jusqu'à -70°C pendant 5min, c'est-à-dire jusqu'à ce qu'ils forment une couche de glace. Ils ont ensuite été lyophilisés jusqu'à une pression de 1mTorr pendant 2h afin de sublimer le maximum de molécules d'eau présentes dans le film et obtenir une couche d'ADN sec. En fait, il reste toujours 2.5 molécules d'eau/ nucléotide qui sont impossible à sublimer lors de la lyophilisation, puisqu'elles font partie intégrante de la structure de l'ADN. L'ADN lyophilisé a formé des films de différentes épaisseurs moyennes variant entre 5MC, pour les films en absence d'ion organique, et 60MC dans les cas où ils possédaient

32 ions organiques/ nucléotide. L'épaisseur moyenne des films en fonction du nombre d'ion organique/ nucléotide est listée dans le tableau 1.

Tableau 1: Épaisseur moyenne des films estimée en nanomètres (nm) en fonction du nombre d'ions organiques/ nucléotide pour des échantillons ayant une quantité constante d'ADN (260ng)

	Épaisseur du film (nm)
0 ion organique/ nucléotide	10
1 ions organiques/ nucléotide	14
2 ions organiques/ nucléotide	16
8 ions organiques/ nucléotide	34
32 ion organique/ nucléotide	120

Les résultats présentés à la figure 18 ont été enregistrés dans des films d'ADN contenant entre 0 et 8 ions organiques/ nucléotide. Les échantillons ont reçus le même traitement que celui décrit ci-haut, à l'exception qu'ils ont été déposés sur un film de tantale de $450\text{nm} \pm 50\text{nm}$ d'épaisseur évaporé sur un substrat de silicium de 0.4mm d'épaisseur. Ces films de tantale ont été choisis en remplacement des feuilles de tantale procurées chez Goodfellow, puisque les derniers échantillons de la compagnie possédaient tous des stries profondes à leur surface. Ces défauts avaient pour effet de protéger l'ADN contre les dommages induits par les électrons, et ce, quelque soit leur énergie. Notre hypothèse est que l'ADN déposé sur une surface de tantale striée ne possède pas une distribution uniforme. La formation d'agrégats plus épais empêche probablement les électrons de pénétrer le film et de causer des dommages à l'ADN. Toutefois, aucune explication précise n'a été apportée jusqu'à présent. Des expériences ultérieures permettront de mieux comprendre cet effet. Les films de tantale évaporés sur

une surface de silicium possèdent une surface de très grande qualité (comme un miroir), ce qui permet de mieux contrôler la distribution de l'ADN sur leur surface. Afin d'obtenir des films d'épaisseur constante d'environ 5MC, la quantité d'ADN déposée sur la surface de tantale a dû être réduite à mesure que la quantité d'ion organique/ nucléotide augmentait, tel que décrit dans le tableau 2. Suite à la lyophilisation, tous les échantillons possédaient un diamètre de (3.5 ± 0.2) mm, indépendamment de la quantité d'ADN et d'ions organiques qu'ils comportaient. Les films ont ensuite été transférés dans une chambre ultra-vide jusqu'à ce que la pression atteigne 1×10^{-8} Torr en vue d'être irradiés.

Tableau 2: Quantité d'ADN nécessaire en nanogrammes (ng) dans des films d'épaisseur constante (5MC) en fonction du nombre d'ion organique/ nucléotide présent dans le film.

Nombre d'ion organique/ nucléotide	ADN (ng)
0	260
1	168
2	126
5	78
8	56

II.3. Irradiation avec le canon à électrons

Le montage expérimental comporte deux parties distinctes :

La première partie, appelée chambre de préparation, est constituée d'une boîte à gant où il est possible de travailler sous atmosphère contrôlée d'azote sec. Cette chambre est reliée à un système à vide qui permet d'abaisser la pression jusqu'à 10^{-10} Torr. C'est dans cette partie que se déroule la lyophilisation des échantillons expliquée ci-haut.

La deuxième partie de l'appareil, illustrée en détail à la figure 12, sert de chambre à irradiation. Les échantillons y sont immédiatement insérés après la lyophilisation et on y atteint une pression de 10^{-8} à 10^{-9} Torr. Dans cette chambre se trouve un canon à électrons (0 à 50uA) formé d'un filament de tungstène émettant des électrons de basse énergie (0 à 100eV) ainsi qu'une série de lentilles sur lesquelles sont appliqués différents potentiels afin d'accélérer et focaliser les électrons. Ceux-ci quittent finalement le monochromateur sélectionnant l'énergie désirée avant de percuter la cible. La taille du faisceau d'électrons peut être déterminée en variant la tension appliquée sur chaque lentille et sa distribution spatiale peut être visualisée grâce à un écran phosphore qui fluoresce lors de l'interaction avec les électrons. Avant chaque irradiation, la taille du faisceau d'électron est minutieusement fixée afin d'obtenir le même diamètre que la surface d'ADN à irradier.

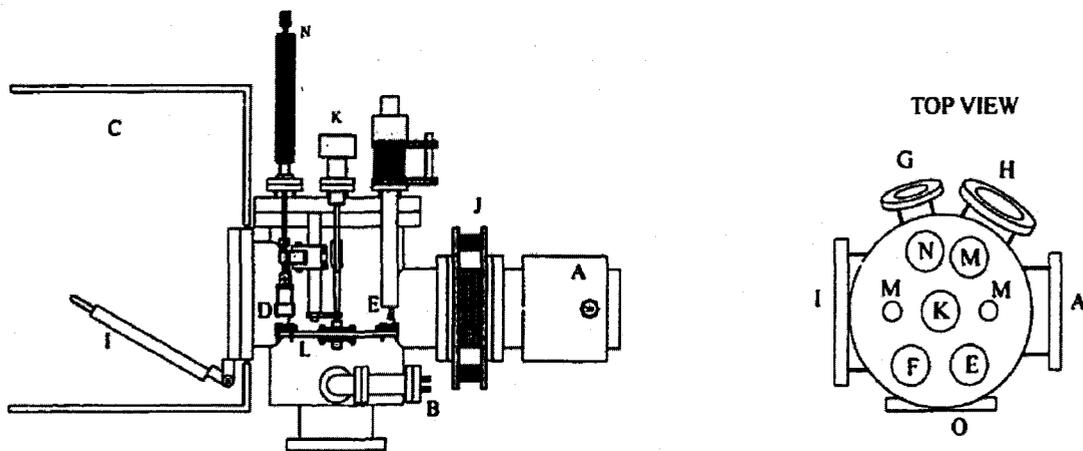


Figure 12: Vue générale de la chambre d'irradiation. A: Pompe turbo-moléculaire (520Vs); B: Jauge ionique; C: Boîte à gants fermée hermétiquement; D: Canon d'électrons; E: Sonde Kelvin; F: Fenêtre; G: Analyseur de gaz résiduel (RGA); H:

Fenêtre; 1: Porte d'accès; J: soufflet Anti-vibration; K: Commande de rotation; L: Porte échantillons; M: Alimentations électriques; N: Commande linéaire; O: Fenêtre.

La chambre à irradiation comporte également une plaque tournante servant de porte-échantillons pouvant accueillir 10 cibles. Afin de s'assurer qu'une seule cible est irradiée à la fois, un potentiel de -9V est appliqué sur les autres échantillons afin de repousser les électrons qui pourraient être déviés. Ce porte-échantillons est illustré à la figure 13 :

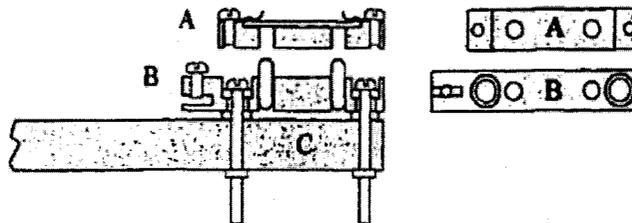


Figure 13 : Porte-échantillons. A: Support à échantillons avec feuille de Tantale, B: Porte échantillons fixé sur un plateau horizontal tournant.

Enfin, une cage de Faraday munie d'une fente de 0.33mm occupe un site du porte-échantillons afin de permettre la mesure du courant d'électrons transmis.

Lors de l'étude sur l'influence de l'environnement moléculaire sur les dommages induits à l'ADN par les EBE, un courant transmis de 1.5nA (1.2×10^{10} électrons/seconde/cm²) a été gardé constant, l'énergie a été fixée à 10 ± 0.5 eV et le nombre d'électrons incidents sur la cible a varié de 0 à 25.3×10^{11} électrons (temps d'irradiation entre 0 et 3min).

II.4. Analyse par gel d'électrophorèse

Une fois irradiés par les électrons de 10eV, les échantillons d'ADN sont retirés de la chambre d'irradiation et récupérés dans 10ul de solution TE (10mM Tris, 1mM EDTA). À chacune de ces solutions sont ajoutées 3ul de tampon augmentant la densité de la solution (15% ficoll, 0.25% xylène cyanol) ainsi que 3ul de SYBR GREEN I 100x dilué dans le DMSO. Avant d'être introduits dans le gel (préalablement marqué avec 8ul de SYBR GREEN I 10000x), les échantillons sont incubés 15 minutes à 4°C afin de laisser la molécule fluorescente s'intercaler entre les bases de l'ADN. Les dommages sont ensuite analysés par électrophorèse (Figure 14) dont le principe est le suivant :

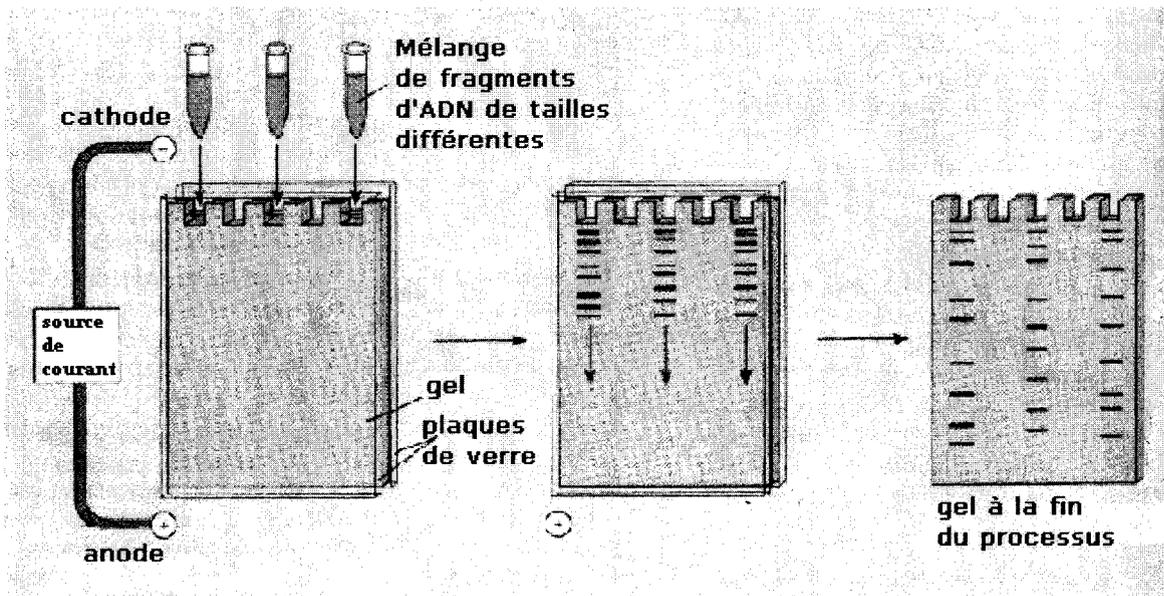


Figure 14: Principe du gel d'électrophorèse

Une solution d'ADN contenant des fragments de différentes tailles est placée à l'intérieur d'une matrice semi-solide. Lorsqu'un champ électrique est appliqué sur le gel, les fragments chargés se déplacent à une vitesse qui dépend de leur taille et de leur charge. Les petits fragments migreront donc plus rapidement à travers les pores que les plus gros fragments. Suivant ce principe, les solutions d'ADN irradiées et marquées au SYBR GREEN I ont été déposées sur un gel d'agarose 1% baignant dans une solution de TAE (Tris base, acétique glacial et EDTA). Les échantillons ont migrés dans un champ électrique de 100V pendant 7 min et de 75V pendant les 90 minutes suivantes permettant de séparer les plasmides de formes surenroulés, circulaires et linéaires.

Suite à la migration des échantillons, le gel a été balayé avec le STORM860 utilisé en mode « blue fluorescence » (Molecular dynamics) avec une longueur d'onde d'excitation de 450nm, correspondant à celle du SYBR GREEN I. Afin de se désexciter, la molécule fluorescente émet une lumière verte de 550nm. C'est cette lumière qui est détectée et qui permet de visualiser les bandes sur le gel. L'intensité de chaque bande peut ensuite être analysée par un logiciel tel Image Quant afin de quantifier l'ADN dans chacune des formes.

Bien que le SYBR GREEN I soit une excellente alternative au bromure d'éthidium dû à sa toxicité inférieure et sa plus grande sensibilité, son principal défaut est qu'il se lie plus facilement à l'ADN linéaire qu'à l'ADN de forme surenroulé, sous-estimant la quantité de ce dernier. Afin de remédier à ce problème, un facteur de

correction a été calculé en comparant l'intensité de 235ng d'ADN de forme surenroulée avec 235ng d'ADN de forme linéaire déposés dans deux puits différents d'un gel d'électrophorèse. L'ADN linéaire a été obtenu en incubant, pendant 1h00 à 37 °C, 4.7ul de plasmide de concentration 0.05ug/ul avec 0.5ul d'enzyme de restriction ECOR1 (qui coupe entre les bases G et A), 1ul de tampon no.1 servant à optimiser la digestion et 3.8ul de ddH₂O afin d'avoir un volume total de 10ul. En comparant l'intensité des deux bandes, il a été déterminé que le SYBR GREEN se lie 1.2 fois plus à l'ADN linéaire. Ce facteur a été utilisé dans les calculs afin de normaliser les résultats. Il est important de noter que ce facteur doit être recalculé après chaque extraction d'ADN. Dans ce cas-ci, le même facteur a pu être utilisé pour toute la durée des expériences puisqu'elles ont toutes été effectuées avec des plasmides provenant de la même extraction.

II.5. Calcul des rendements de cassures simple brin et de perte d'ADN surenroulé

Les rendements (nb. de bris par électron incident par molécule d'ADN) pour la formation de cassures simple brin et la perte d'ADN surenroulé ont été calculés à partir de la pente initiale (S, %/ électron) des courbes dose-réponse grâce à l'équation suivante :

$$Y = \frac{S \text{ (\%/ électron)} \times \text{nb. molécules d'ADN}}{f(\%) \times \text{nb. molécules d'ADN}} \quad \text{Équation 1}$$

où f est le pourcentage d'ADN surenroulé dans les échantillons conservés en solution.

CHAPITRE III. RÉSULTATS

III.1. Dommages en fonction de l'exposition aux électrons de 10eV

Plusieurs études précédentes ont été consacrées sur le comportement des courbes dose-réponse pour la formation de cassures simples brins et la perte d'ADN surenroulé induites par des électrons de différentes énergies. Ces expériences ont permis de démontrer qu'à faible exposition, le pourcentage d'ADN circulaire et surenroulé dépend de façon linéaire du nombre d'électrons incidents. Ces expériences sont primordiales, puisque les pentes initiales des courbes dose-réponse serviront à calculer les rendements de cassures simples brins et de perte d'ADN surenroulé.

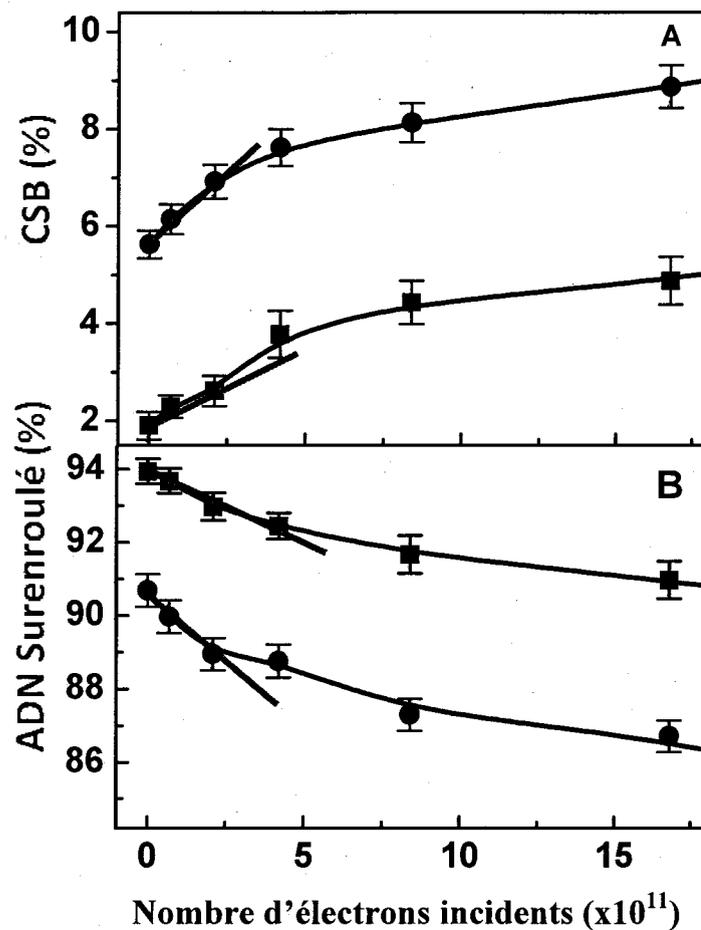


Figure 15: Courbe dose-réponse pour des plasmides irradiés en présence (■) ou absence (●) de 12 ions organiques/ nucléotide. La pente initiale de chaque courbe a été déterminée en utilisant les 3 premiers points. La figure 6A représente la formation de cassures simple brin alors que la figure 6B représente la perte d'ADN surenroulé. La densité de courant a été gardée constante à 1.2×10^{10} électrons/seconde/cm² tout au long de l'expérience. Chaque point correspond à la valeur moyenne de 4 échantillons \pm écart-type.

La figure 15 illustre donc les courbes dose-réponse pour des plasmides irradiés avec des électrons de 10eV en présence (■) ou absence (●) de 12 ions organiques/ nucléotide pour des durées variant entre 0 et 2min (0 à 17×10^{11} électrons incidents). Le panneau A représente la formation de cassures simple brin en fonction du nombre d'électrons incidents alors que le panneau B représente la perte d'ADN surenroulé. La densité de courant a été gardée constante à 1.2×10^{10} électrons/s/cm² toute la durée de l'expérience. Chaque point correspond à la valeur moyenne de 4 échantillons \pm l'écart-type. À dose nulle, les échantillons représentent des films d'ADN qui ont été lyophilisés, mis sous vide sans jamais être irradiés et récupérés. Le pourcentage d'ADN surenroulé dans les films non irradiés en présence de 12 ions organiques/ nucléotide est plus élevé qu'en absence de Tris et d'EDTA, soit 94% comparativement à 91% respectivement. Cette observation mène à un premier indice quant à un effet protecteur induit par les ions organiques, et ce, même en absence d'irradiation. Tel qu'attendu, le pourcentage d'ADN circulaire augmente continuellement avec l'exposition, alors que le pourcentage d'ADN surenroulé diminue et ce, pour les deux types de films. De plus, la portion linéaire de la courbe dose-réponse se trouve entre 0 et 2.5×10^{11} électrons incidents, indépendamment de la quantité d'ions organique présente dans les films d'ADN. Par contre, la valeur des pentes initiales, calculées à partir des 3 premiers points de chaque courbe, diffère selon la quantité d'ions organiques présente. En effet, la figure 15 démontre que la pente est deux fois plus élevée en absence d'ion organique qu'en présence de 12 ions organiques/ nucléotide, supposant que l'ADN est 2 fois plus fragile en absence de Tris et d'EDTA.

III.2. Comportement des échantillons non irradiés en fonction de la quantité d'ions organiques/ nucléotide

Avant de comprendre comment la présence d'ions organiques modifie l'interaction des EBE avec l'ADN, il est primordial de connaître le comportement des échantillons non irradiés en présence de différentes quantités de Tris et d'EDTA. Différents films d'ADN possédant entre 0 et 32 ions organiques/ nucléotide ont été déposés sur le tantale, lyophilisés, mis sous vide et récupérés, mais n'ont subi aucune exposition aux électrons. La figure 16 démontre le pourcentage d'ADN surenroulé mesuré en fonction du nombre d'ions organiques/ nucléotide présent dans les films d'ADN. Chaque point correspond à la valeur moyenne de 4 échantillons \pm l'écart-type.

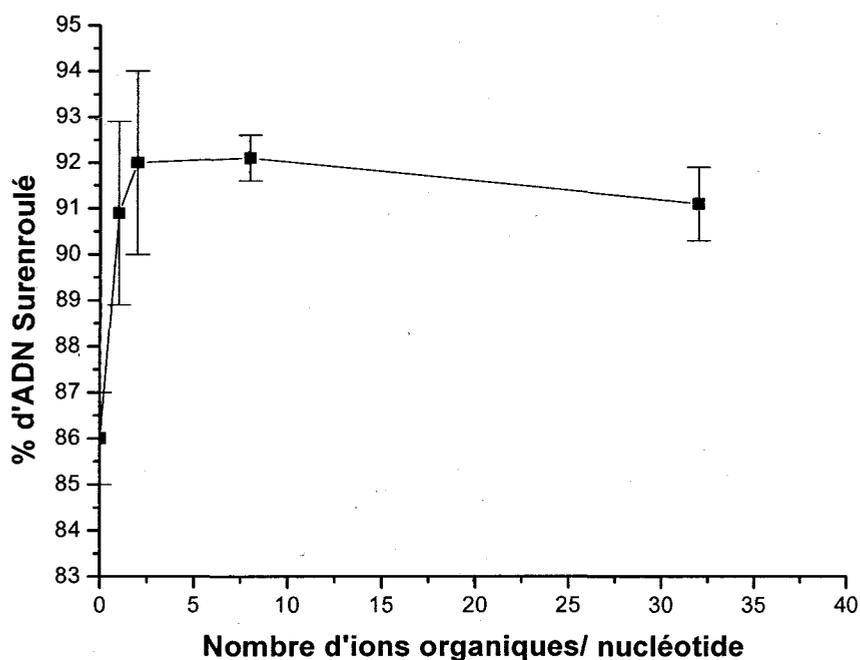


Figure 16 : Pourcentage d'ADN surenroulé dans les échantillons non irradiés déposés sur une surface de tantale, en fonction de la quantité d'ions organiques/ nucléotide. Chaque point correspond à la valeur moyenne de 4 échantillons \pm écart-type.

C'est en absence de Tris et d'EDTA que le pourcentage d'ADN surenroulé est le plus bas, soit 86%. De plus, la grande erreur sur la mesure démontre l'instabilité de l'ADN lorsqu'il est dépourvu d'ion organique à sa proximité. Un fait surprenant est que la présence d'un seul ion/ nucléotide a un effet drastique sur la proportion d'ADN surenroulé, l'augmentant de 86% à 91%. Ce pourcentage continue d'augmenter pour atteindre un maximum de 92% en présence de 2 ions organiques/ nucléotide. Au-delà de cette valeur, l'ajout d'ions organiques supplémentaires n'a aucun effet significatif sur le pourcentage d'ADN surenroulé dans le film, comme l'illustre le plateau qui s'étend jusqu'à 32 ions organiques/ nucléotide. Dans les films d'ADN en présence d'une

importante quantité de Tris et d'EDTA, les échantillons sont beaucoup plus stables et reproductibles tels que démontrent les plus petites erreurs sur les mesures. La figure 16 démontre clairement que la présence d'ions organiques dans les films d'ADN non irradiés diminue de façon importante la quantité de cassures simple brin, supportant l'hypothèse d'un rôle protecteur.

III.3. Dommage en fonction de l'épaisseur du film et du nombre d'ions organiques/ nucléotide dans le film

La meilleure stratégie afin d'étudier l'influence des ions organiques sur les dommages induits à l'ADN par les EBE consiste à mesurer le rendement de cassures simples brins dans des films contenant différente quantité de Tris et d'EDTA.

Pour chacune des proportions d'ions organiques étudiées, 12 échantillons (contenant tous 260ng d'ADN) ont été utilisés comme contrôles non irradiés, c'est-à-dire lyophilisés, mis sous vide et récupérés, alors que 12 autres échantillons identiques ont été exposés aux électrons de 10eV pour une durée de 15sec (1.4×10^{11} électrons). Ce temps d'exposition a été choisi, puisqu'il se situe dans la portion linéaire de la courbe dose-réponse (voir figure 15). La pente linéaire a pu être déterminée de façon précise et a permis de calculer le rendement de cassures simples brins grâce à l'équation 1. Cette mesure exprime le nombre de bris induit à une molécule d'ADN par un électron de 10eV.

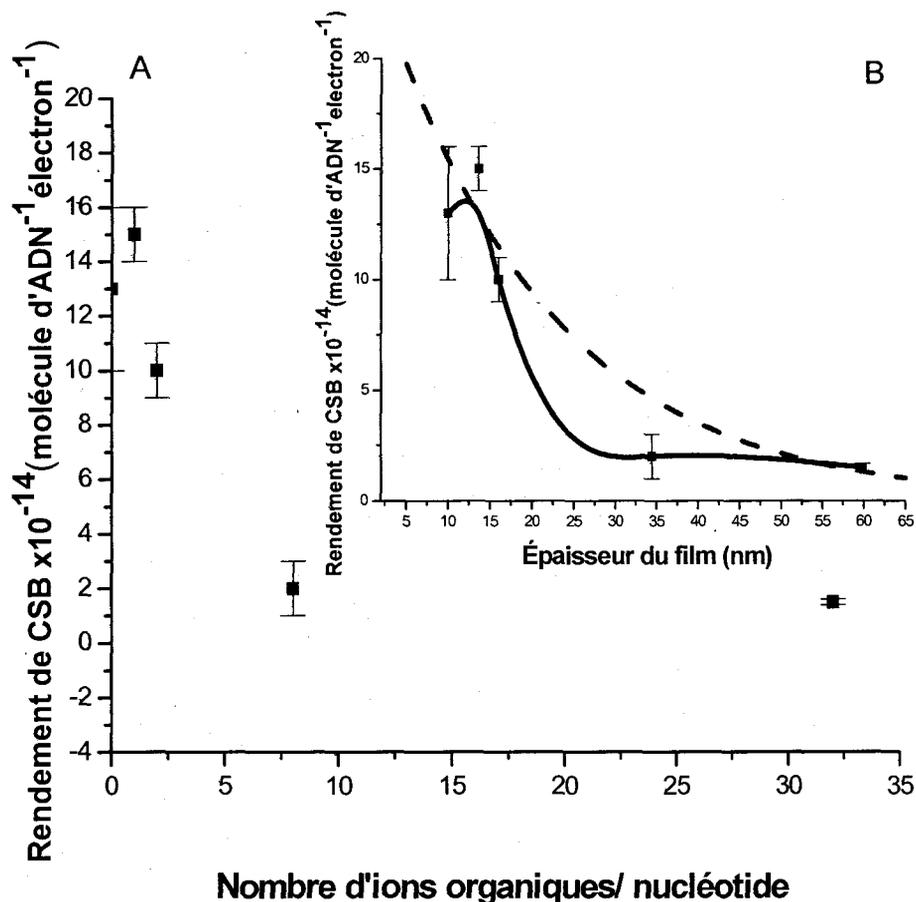


Figure 17: A. Rendement expérimental de cassures simple brin induit par les électrons de 10eV en fonction de la quantité d'ions organiques/ nucléotide.

B. Comparaison du rendement expérimental (■) avec le rendement attendu (ligne pointillée) pour la formation de cassures simple brin induite par des électrons de 10eV, en fonction de l'épaisseur du film d'ADN. La ligne continue correspond au lissage des points expérimentaux. Chaque point correspond à la valeur moyenne de 12 échantillons irradiés 15 sec. (dans la portion linéaire de la courbe dose-réponse) \pm écart-type. La densité de courant était de 1.2×10^{10} électrons/seconde/cm²

La figure 17A illustre les rendements de cassures simple brins en fonction du nombre d'ions organiques/ nucléotide. Encore une fois, la grande erreur sur la mesure du rendement dans les échantillons en absence d'ion organique reflète l'instabilité de l'ADN dans cette condition. C'est également en absence de Tris et d'EDTA que le rendement est pratiquement le plus élevé, soit 13×10^{-14} bris/molécule d'ADN/électron. L'augmentation

apparente du rendement par l'ajout d'un ion organique/ nucléotide n'est pas significative à l'intérieur des erreurs. Le rendement de cassures simples brins diminue ensuite de façon drastique jusqu'à 8 ions organiques/ nucléotide pour atteindre une valeur de 2×10^{-14} bris/molécule d'ADN/électron, ce qui correspond à une diminution de 85%. On peut ensuite observer un effet de saturation jusqu'à 32 ions organiques/ nucléotide. C'est donc l'ajout de 8 ions organiques/ nucléotide qui semble offrir l'effet protecteur maximal.

Tel qu'illustré par la figure 11, les molécules Tris et EDTA sont relativement grosses et contribuent de façon importante à l'épaisseur des films. Les rendements expérimentaux de cassures simples brins mesurés à la figure 17A sont donc exprimés en fonction de l'épaisseur des films à la figure 17B. Ces épaisseurs ont été estimées en assumant que la densité des ions organiques était la même que l'ADN, soit 1.7g/cm^3 (FASMAN, 1975) et en tenant compte que chaque échantillon possède une quantité constante d'ADN (260ng) qui contribue à 10nm de l'épaisseur totale du film. Les épaisseurs calculées sont listées au tableau 1 de la section précédente en fonction du nombre d'ions organiques présents dans le film. Ce tableau démontre que l'ajout d'aussi peu que 8 ions organiques/ nucléotide augmente l'épaisseur du film de 3.4 fois. Dans ce cas, l'ADN représente seulement 29% de l'épaisseur totale du film. Il est donc essentiel de connaître la quantité d'ions présents pendant la préparation des échantillons afin d'inclure leur contribution dans les calculs d'épaisseurs des films. Les rendements expérimentaux mesurés à la figure 17A sont exprimés à la figure 17B en fonction de l'épaisseur moyenne des films. La ligne solide correspond au lissage des points expérimentaux.

Lorsque les électrons traversent le film d'ADN, ils perdent progressivement de l'énergie en faisant des collisions inélastiques avec les molécules qu'ils rencontrent. La section efficace pour l'induction de cassures simple brin varie donc continuellement à mesure que les électrons pénètrent dans le film. À un certain point, ces derniers n'auront plus l'énergie suffisante pour induire des cassures supplémentaires à l'ADN. Le nombre d'électrons pouvant induire des bris va donc décroître en fonction de l'épaisseur des films, menant à la décroissance du rendement de cassures simple brin. Cette atténuation du nombre d'électron en fonction de l'épaisseur des films peut être décrite mathématiquement par une multiplication de décroissances exponentielles qui dépendent de l'énergie de l'électron (CAI *et al.*, 2006). La ligne pointillée à la figure 17B représente la meilleure exponentielle décroissante passant par les données expérimentales des cassures simple brin. En d'autres termes, cette courbe représente les rendements attendus dépendant strictement de l'épaisseur des films. Clairement, cette courbe ne superpose pas correctement les rendements mesurés, indiquant que les résultats obtenus ne peuvent pas être expliqués seulement par un effet d'épaisseur des films. En effet, la comparaison des rendements expérimentaux avec la courbe pointillée démontre que les valeurs mesurées décroissent beaucoup plus rapidement en fonction de l'épaisseur des films que ce qui était attendu, indiquant qu'un autre facteur intervient dans la diminution du rendement de cassures simple brin.

III.4. Dommages en fonction du nombre d'ions organiques/ nucléotide induit par des électrons de 10eV dans des films d'ADN d'épaisseur constante

L'expérience suivante a pour mandat de démontrer que la diminution du rendement de cassures simples brins observée à la figure 17 n'est pas seulement due à l'épaisseur croissante des films, mais qu'elle est plutôt générée par un effet protecteur des ions organiques. Différents films d'ADN possédant entre 0 et 8 ions organiques/ nucléotide ont été préparés en s'assurant que l'épaisseur demeurait constante à 5MC, afin que le rendement mesuré soit indépendant de l'épaisseur. La quantité d'ADN dans le film décroît donc à mesure que la quantité d'ions organiques augmente (voir tableau 2, section méthode expérimentale). Les rendements de cassures simples brins ont été mesurés de la même façon qu'à la figure 17 et sont donnés à la figure 18 en fonction de la quantité d'ions organiques/ nucléotide (■). Chaque mesure correspond à la valeur moyenne de 6 échantillons \pm l'écart-type.

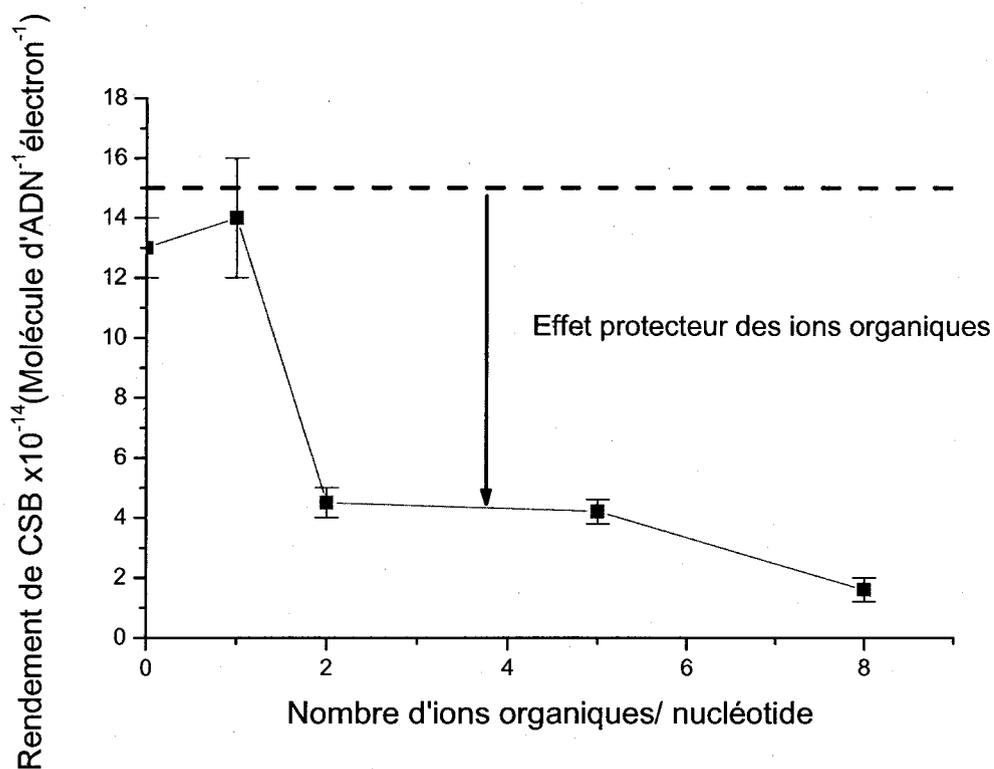


Figure 18: Comparaison du rendement théorique de CSB pour des films d'épaisseur constante (5MC), si la présence d'ions organiques n'a aucun effet (ligne pointillée) avec le rendement expérimental (■) à épaisseur constante en fonction du nombre d'ions organique/ nucléotide. Chaque point correspond à la valeur moyenne de 6 échantillons \pm écart-type.

En absence d'ion organique, le rendement est très élevé, soit 13×10^{-14} bris/ molécule d'ADN/ électron. Le rendement diminue ensuite de façon dramatique en fonction du nombre d'ions organiques/ nucléotide dans le film. Encore une fois, l'augmentation du rendement en présence d'un ion/ nucléotide n'est pas significative. La présence de 2 ions organiques/ nucléotide est suffisante pour décroître le rendement d'approximativement 70%, alors que la présence de 8 ions organiques/ nucléotide diminue le rendement de 88%. Pour les besoins de l'étude, le nombre d'ions organiques/ nucléotide a été limité à 8, puisque pour conserver des films de 5MC d'épaisseur, l'ajout

d'ions organiques supplémentaires résultent en une quantité insuffisante d'ADN pour effectuer une analyse précise des dommages. Il est important de noter que cette expérience a été effectuée sur un substrat de tantale différent que celui utilisé pour mesurer les rendements mesurés à la figure 17 (tantale évaporé sur silicium vs feuille de tantale, respectivement). Pour cette raison, les rendements absolus de cassures simples brins obtenus à la figure 18 ne peuvent être comparés à ceux obtenus à la figure 17. Seules les tendances obtenues sur une même surface seront analysées.

La ligne pointillée représente les rendements de CSB attendus dans des films d'épaisseur constante dans le cas où les ions organiques n'ont aucun effet. La comparaison de cette courbe avec les rendements expérimentaux de cassures simples brins démontre clairement que les ions organiques protègent l'ADN des dommages induits par les électrons de 10eV.

CHAPITRE IV. DISCUSSION

La présente étude avait pour but de comprendre comment la présence d'ions organiques sous forme de Tris et EDTA à proximité de l'ADN pouvait modifier l'interaction des électrons de basse énergie avec l'ADN afin de mieux connaître les mécanismes fondamentaux menant aux dommages à l'ADN dans des conditions se rapprochant un peu plus des conditions cellulaires. À cause de sa charge positive sur son groupement NH_3 , il est attendu que la molécule Tris soit attirée par la charge négative du groupement phosphate de l'ADN. Quelques autres molécules devraient se loger à l'intérieur des petits et grands sillons de l'hélice d'ADN alors que les molécules supplémentaires vont probablement se cristalliser au moment de la lyophilisation. Par contre, la probabilité que la molécule d'EDTA interagisse avec l'ADN est beaucoup plus faible due à la présence de ses quatre charges négatives. À première vue, les molécules d'EDTA faisant partie de l'environnement moléculaire de l'ADN semblent prendre part à l'augmentation de l'épaisseur des films, sans toutefois jouer un rôle significatif dans la diminution du rendement de cassures simples brins induit par les électrons de 10eV. C'est plutôt la molécule Tris qui semble être responsable du phénomène de radioprotection observé.

L'expérience en fonction de l'exposition aux électrons de 10eV avec des films en absence ou présence de 12 ions organiques/ nucléotide a démontré que même en absence d'irradiation, soit à dose nulle, les ions organiques semblent avoir un effet stabilisateur ou protecteur. En effet, le pourcentage d'ADN surenroulé dans les films en présence de 12

ions organiques/ nucléotide est plus élevé que dans les films en absence de Tris et EDTA. À partir de ces résultats, il demeure tout de même difficile de dire de quelle source de dommages les ions protègent l'ADN. Les cassures peuvent être induites par le substrat de tantale, par le procédé de lyophilisation ou même lors de la récupération des échantillons.

La réponse linéaire en fonction de l'exposition se situe toujours entre 0 et 2.5×10^{11} électrons et ce, pour les deux types de films. La présence d'ions organiques influence par contre la valeur de la pente initiale de la courbe dose-réponse qui est proportionnelle au nombre de bris induit à une molécule d'ADN par un électron de 10eV. La comparaison des pentes affirme que les électrons de 10eV induisent deux fois plus de bris dans les films d'ADN dépourvus d'ion organique, ce qui indique que l'ADN est plus fragile en absence de Tris et EDTA. Ce sont les premiers résultats à supporter l'hypothèse que les ions organiques, protègent l'ADN des dommages induits par les électrons de basse énergie.

Une analyse du comportement des contrôles non irradiés en fonction du nombre d'ions organiques/nucléotide dans les films d'ADN a permis de confirmer que leur présence empêchait la dégradation de l'ADN lors du dépôt sur le tantale, de la lyophilisation et de la récupération des échantillons. L'ajout d'un seul ion organique/nucléotide permet d'augmenter la proportion d'ADN surenroulé de 86% à 91%. Par contre, cet effet sature très rapidement, puisqu'au delà de 2 ions organiques/nucléotide, il est impossible d'augmenter le pourcentage d'ADN surenroulé au-dessus de 92%.

A priori, il est difficile de déterminer de façon exacte quelles étapes du processus qu'ont subi les échantillons non irradiés sont à l'origine de la formation de cassures à l'ADN. En supposant que la surface de tantale en soit responsable, la couche d'ADN directement en contact avec le substrat serait complètement détruite. Dans un film d'ADN de 5MC d'épaisseur, dont les molécules sont uniformément distribuées sur la surface, cela impliquerait que 20% du film serait endommagé par le tantale, laissant 80% de l'ADN intact (soit sous la forme surenroulé). Or, le pourcentage d'ADN surenroulé mesuré dans les échantillons non irradiés en absence de Tris et d'EDTA est de 86%. Sachant que nos films comportent des irrégularités dans la distribution d'ADN, démontré par les images obtenues au microscope à fluorescence, ce résultat est tout à fait en accord avec l'hypothèse que le tantale joue un rôle important dans l'induction de cassures simple brin à l'ADN. L'ajout d'un ion organique/nucléotide aux échantillons purifiés entraîne également l'augmentation de l'épaisseur du film de 10nm à 14nm. En supposant toujours que le tantale soit responsable des cassures simple brin dans les échantillons non irradiés, seule la monocouche directement en contact avec le substrat serait endommagée. Le pourcentage d'ADN surenroulé dans les films d'ADN uniformément distribué passerait de 20% à 14%. Selon cette hypothèse, la présence d'un ion organique/ nucléotide dans les films d'ADN non irradiés augmenterait la proportion d'ADN surenroulé de 6%. En effet, la figure 16 a démontré que le pourcentage d'ADN surenroulé a passé de 86% à 91% grâce à l'ajout d'un ion organique/ nucléotide. L'analyse des résultats de la figure 16 a donc permis d'élucider que le tantale détruisait la couche d'ADN reposant sur celui-ci, expliquant la formation de cassures simple brin avant même l'exposition aux radiations. La protection apportée par la présence des ions organiques constitue donc une protection

physique qui se traduit par le fait qu'en présence de Tris et d'EDTA, l'épaisseur du film augmente alors que seule la couche d'ADN reposant sur le tantale subit des dommages. Donc, plus la quantité d'ions organiques augmente dans le film, plus petite est la proportion d'ADN endommagé et plus grande est la proportion d'ADN qui demeure intacte.

Dans l'expérience en fonction de l'exposition aux électrons, le pourcentage d'ADN surenroulé dans les films d'ADN non irradiés en absence d'ion organique était de 91%, alors qu'à la figure 16, il est de 86%. Cette différence s'explique entre autre par le fait qu'il existe une grande variabilité dans la distribution d'ADN sur le tantale entre les différentes lyophilisations. De plus, le tantale, étant nettoyé aux ultrasons et réutilisé après chaque expérience, est également une source de variabilité selon le nombre de fois qu'il a été utilisé.

Aucun mécanisme n'a été identifié pour expliquer que le tantale représente une source de dommages pour l'ADN. Il est important de noter que nous travaillons avec un oxyde de tantale. Les dommages ne peuvent donc pas être attribués suite à l'oxydation. Nous proposons que le tantale perturbe les orbitales électroniques des molécules constituant l'ADN, entraînant un changement possible dans sa conformation. L'ADN devient ainsi plus sensible à l'induction de cassures simple brin. Évidemment, une étude plus approfondie portant sur la mesure de la distribution d'ADN sur le tantale à l'aide d'un microscope à force atomique permettrait d'identifier plus clairement le mécanisme à l'origine de cette observation.

La mesure du rendement de cassure simple brin dans des films d'ADN (260ng) ayant entre 0 et 32 ions organiques/ nucléotide a permis d'identifier de façon plus directe une protection induite par les molécules Tris et EDTA (figure 17). C'est en absence d'ion organique que les électrons de 10eV génèrent le plus de cassures simple brin dans les films d'ADN, démontrant une fois de plus la fragilité de l'ADN lorsqu'il est dépourvu d'ion à sa proximité. Le rendement de CSB décroît ensuite de 85% par l'ajout de 8 ions organiques/ nucléotide, ce qui représente la protection maximale pouvant être apportée par le Tris et l'EDTA. Les rendements de CSB saturent ensuite à une valeur de 2×10^{-14} bris/molécule d'ADN/électron jusqu'à 32 ions organiques/ nucléotide. Il est important d'accorder une attention particulière aux unités dans lesquelles le rendement de cassures simple brin est exprimé. Chacun des rendements mesurés au cours de cette expérience est donné par molécule d'ADN. Les rendements sont donc indépendant du nombre de molécules d'ADN que possèdent les films irradiés et donc indépendant de la dilution de l'ADN par la présence des molécules Tris et EDTA. Ceci implique que la diminution du rendement de cassures simple brin observée en fonction du nombre d'ions organiques/ nucléotide dans des films possédant 260ng d'ADN ne peut être expliquée par un effet de dilution. Afin d'élucider l'origine du puissant effet protecteur des ions organiques, il faudra considérer la dépendance du rendement de CSB en fonction de l'énergie des électrons, de l'intensité du faisceau d'électrons ainsi que de l'épaisseur des films.

L'estimation de l'épaisseur des films contenant 260ng d'ADN en fonction de la quantité d'ions organiques/ nucléotide présente a permis de démontrer l'importante

contribution qu'apportent les molécules Tris et EDTA à l'épaisseur totale du film. L'ajout de 8 ions organiques/ nucléotide a eu pour conséquence d'augmenter d'un facteur 3.4 l'épaisseur du film, ce qui signifie que l'ADN ne représente que 29% de l'épaisseur totale. La figure 17B illustre bien cette rapide augmentation de l'épaisseur en fonction de la quantité de Tris et EDTA passant de 10nm pour les films en absence d'ion organique, jusqu'à 120nm pour les films ayant 32 ions organiques/ nucléotide. Il est donc essentiel de connaître la quantité de tout autres molécules présentes lors de la préparation des échantillons, que se soit des ions, des sels ou des protéines, afin d'inclure leur contribution dans les calculs d'épaisseur. Ne pas considérer la contribution de ces molécules dans les calculs d'épaisseur aurait pour effet de donner des valeurs erronées de sections efficaces et de longueurs effectives d'électron. En effet, lorsque les électrons traversent le film d'ADN, ils perdent graduellement de l'énergie en faisant des collisions inélastiques avec les molécules qu'ils rencontrent. Comme les sections efficaces dépendent de l'énergie, elles varient à leur tour à mesure que les électrons pénètrent le film, expliquant l'importance de connaître l'épaisseur exacte de ceux-ci. Par exemple, si les films d'ADN sont en réalité plus épais que ce qu'il avait été préalablement estimé, les sections efficaces pour l'induction de cassures simple brin seront sous estimées. Heureusement, les sections efficaces pour la formation de cassures simple brin induite par les électrons de basse énergie calculées par Panajotovic *et al.* ont été mesurées dans des films d'ADN purifié, i.e contenant une quantité minimale de Tris et EDTA (PANAJOTOVIC *et al.* 2006).

À première vue, la décroissance des cassures simple brin observée à la figure 17A pourrait être attribuée au fait qu'à partir d'une certaine épaisseur, les électrons ne peuvent pas atteindre les molécules d'ADN plus profondes et leur induire des dommages. La comparaison des rendements expérimentaux en fonction de l'épaisseur des films (illustrée à la figure 17B) avec les rendements attendus dépendant strictement de l'effet d'épaisseur (ligne pointillée) démontre que la décroissance des dommages à l'ADN est en partie expliquée par cet effet d'épaisseur croissante des films. Néanmoins, le rendement mesuré décroît beaucoup trop rapidement pour être expliqué par seule l'atténuation des électrons en fonction de la profondeur du film. Nécessairement, un second facteur intervient afin de réprimer la formation de cassures simple brin. Puisque les rendements sont exprimés par molécule d'ADN, la dilution de l'ADN par la présence des molécules Tris et EDTA ne peut expliquer la protection observée. La protection de l'ADN contre les dommages induits par les électrons de basse énergie par la présence d'ions organiques demeure une explication plausible. Cependant, ces derniers résultats ne sont pas suffisants pour confirmer l'hypothèse, puisque l'augmentation rapide de l'épaisseur des films camoufle en partie la diminution du rendement de cassures simple brin due à la présence d'ions organiques. Une seconde expérience a donc été effectuée en irradiant des films d'épaisseur constante (5MC) contenant différentes quantités d'ions organiques variant entre 0 et 8 ions organiques/ nucléotide avec des électrons de 10eV afin de vérifier plus précisément si ces dernières molécules répriment la formation de bris.

L'irradiation des films d'épaisseur constante de 5MC contenant des ions organiques variant entre 0 et 8 ions organiques/ nucléotide avec des électrons de 10eV a permis de

mesurer avec exactitude l'influence des molécules Tris et EDTA sur les dommages induits à l'ADN, puisque cette expérience est indépendante de l'épaisseur des films, indépendante du nombre de molécule d'ADN dans les films et par le fait même indépendante de l'effet de dilution. Les mesures ont démontré que le rendement de cassures simple brin est maximal en absence d'ion organique, soit 13×10^{-14} bris/ molécule d'ADN/ électron, et qu'il diminue ensuite de façon drastique en fonction de la quantité d'ion organique/ nucléotide présente. La présence de 2 ions organiques/ nucléotide a diminué le rendement de 70% alors que l'ajout de 8 ions organiques/ nucléotide a diminué le rendement de 88%. Étant donné que le rendement de cassures simple brin est indépendant de l'épaisseur du film et du nombre de molécules d'ADN, cela implique que si les ions organiques n'influencent pas le nombre de bris induit par les électrons de basse énergie, le rendement de CSB sera constant (ligne pointillée, figure 18). La comparaison des rendements mesurés et des rendements attendus si les ions n'ont aucun effet confirme que la présence d'ions organiques protège l'ADN des dommages induits par les électrons de basse énergie et illustre l'amplitude de cet effet protecteur en fonction du nombre d'ions organiques présent dans le film. Le fait que le rendement de cassures simple brin diminue de façon aussi importante entre 0 et 2 ions organiques/ nucléotide démontre que ce sont les molécules à proximité de la structure de l'ADN qui ont la plus forte influence sur la formation de bris.

Plusieurs molécules ayant des propriétés « radioprotectrices » sont connues pour agir sur une échelle de temps radiochimique (10^{-13} - 10^{-10} s). Par exemple, les composés possédant un thiol sont d'excellents « scavengers » de radicaux libres pour les espèces

réactives tels que les radicaux hydroxyl (CADET *et al.*, 1999) (CADET *et al.*, 2005). Par contre, il n'existe aucun exemple de molécules protégeant l'ADN des dommages induits par les EBE tel que démontré par ce travail. Afin de déterminer comment les ions organiques protègent l'ADN des dommages induits par les EBE, il faut d'abord connaître et comprendre les mécanismes menant à la formation de CSB.

À 10eV, les CSB de l'ADN proviennent essentiellement des résonances « core-excited ». C'est-à-dire que la formation de l'anion transitoire consiste en un électron piégé par l'affinité électronique positive d'un état électronique excité d'une sous-unité de l'ADN. Lorsque l'électron est, par exemple, temporairement capturé par le groupement phosphate de l'ADN, l'état généré peut être dissociatif dans la région de Frank Condon, menant ainsi à la rupture du lien C-O de l'hélice d'ADN (PAN ET SANCHE, 2006) (ZHENG *et al.*, 2005). La rupture de ce lien mène inévitablement à une CSB. L'électron incident peut également être capturé par une base de l'ADN et être ensuite transféré au groupement phosphate donnant lieu à une résonance « core-excited ». Encore une fois, l'anion PO_4^- peut se situer (ou non) dans un état dissociatif menant à la formation de CSB (ZHENG *et al.*, 2005). À 10eV, c'est le transfert de l'électron de la base au phosphate qui représente le mécanisme majeur menant à la formation de CSB (LI *et al.*, 2008). A l'exclusion de la stabilisation de l'électron, les différentes voies de décroissance suivant la capture d'un électron par une base sont illustrées de façon schématique à la figure 19.

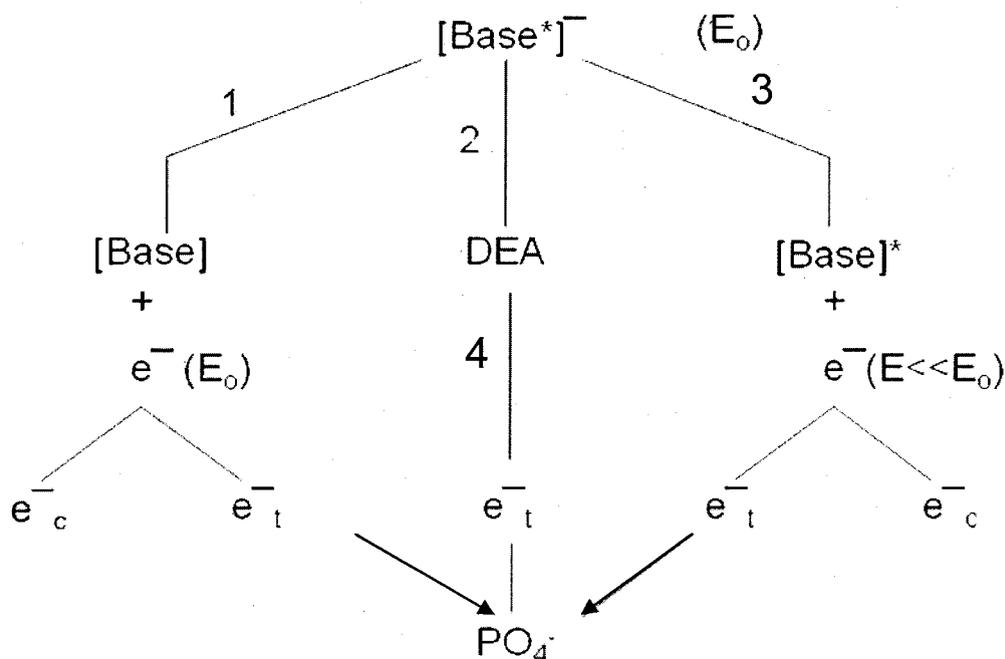


Figure 19: Canaux de décroissance de l'anion transitoire formé par un électron d'énergie E_0 sur une base de l'ADN. Les mécanismes 1 à 3 représentent les canaux élastiques, DEA et inélastique, respectivement. e_t^- représente le transfert de l'électron de la base ou du fragment anionique (voie 4) au groupement phosphate.

À une énergie initiale $E_0 = 10\text{eV}$, l'électron a la possibilité de s'accrocher temporairement à la base créant un anion transitoire « core-excited » $[base^*]^-$. Selon la voie de décroissance 1, l'électron peut être relâché avec son énergie initiale E_0 dans le continuum (e_c^-), c'est-à-dire dans le milieu environnant ou dans le vide. L'électron peut également être transféré (e_t^-) à un autre site de l'ADN où il formera un autre anion transitoire. Comme le démontre le schéma, ce site peut correspondre au groupement phosphate de l'ADN, ce qui peut éventuellement mener à la formation de CSB. La voie de décroissance 3 est similaire, à l'exception que l'électron repart en laissant la base dans un état électronique ou vibrationnel excité. L'électron relâché possède donc une énergie inférieure à l'énergie initiale E_0 . L'anion transitoire formé sur la base peut également

décroître par attachement dissociatif (DEA, voie 2). Dans ce cas, les molécules vont se dissocier et l'électron restera accroché à un des fragments de l'ADN. L'électron situé sur le fragment anionique pourra à son tour être transféré au groupement phosphate (voie 4) et mener à la formation de CSB. Un des mécanismes pouvant expliquer partiellement la protection de l'ADN par la présence d'ions organiques consiste en la restauration des dommages impliqués dans les voies 2 et 4 par le transfert d'un proton de la molécule Tris. La figure 20 suivante montre un exemple de la capture d'un électron par la guanine qui possède le plus petit potentiel d'oxydation des quatre bases.

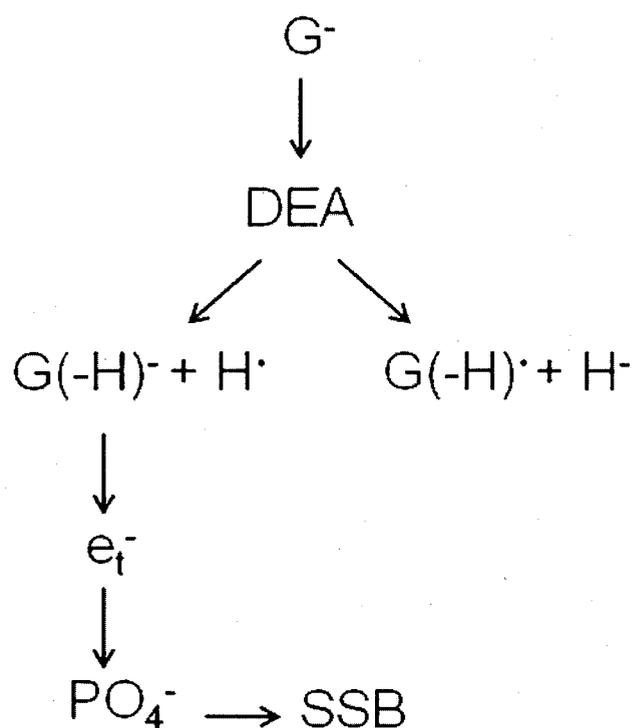


Figure 20: Décroissance de la guanine anionique par attachement dissociatif de l'électron suivi du transfert de l'électron additionnel résidant sur la guanine.

L'anion transitoire G^- peut décroître par attachement dissociatif en une base anionique déshydrogénée et un radical H ou en une base déshydrogénée et un H^- . La formation de la base anionique déshydrogénée peut donc mener à la formation d'une

CSB via la voie 4 de la figure 19. Cependant, la molécule Tris présente dans les films d'ADN peut restaurer la base anionique en lui cédant un atome d'hydrogène et en acceptant un électron de celle-ci. Ce mécanisme, appelé « Two-electron-coupled-proton-transfer » (TECPT) ou « One-step-hydrogen-and-electron-transfer » (OSHET), résulte en une guanine non endommagée (voir figure 21).

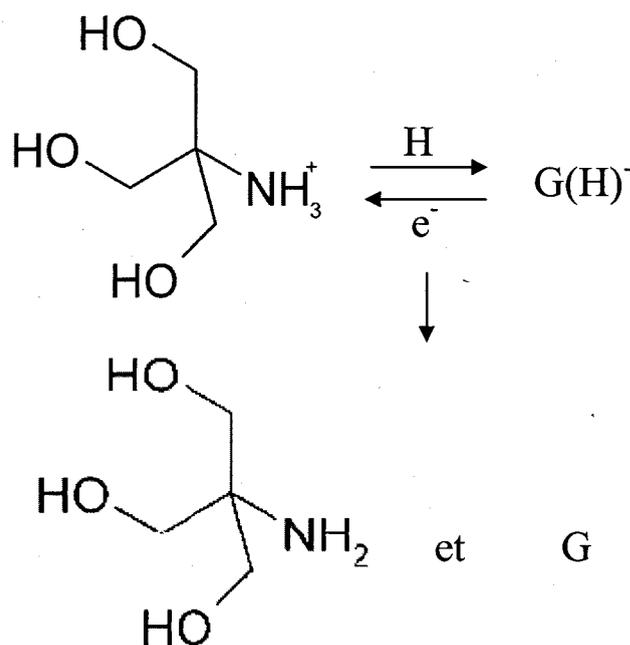


Figure 21: Restauration de la base déshydrogénée par la molécule Tris.

Ce processus empêche le transfert de l'électron du fragment anionique au phosphate et inhibe la voie 4. Évidemment, seules les molécules de Tris très près de la structure de l'ADN (celles se trouvant dans les petits et grands sillons de l'ADN) peuvent participer à ce mécanisme. Cela supporte le fait que ce sont les 2 premiers ions organiques/ nucléotide ajoutés qui engendrent la plus grande protection. Il a d'ailleurs été démontré par le groupe de Jena et ses collaborateurs, à l'aide d'un calcul DFT, que les dommages à l'ADN induits par les EBE, sous la forme de guanine anionique, pouvaient

être réparés par certains acides aminés (cystéine et tyrosine) par les mécanismes TECPT ou OSHET et ce, aussi bien dans la phase gazeuse que aqueuse (JENA *et al.*, 2009). Nos expériences étant effectuées en phase solide, soit en absence de molécules d'eau, ressemblent donc à la phase gazeuse étudiée par Jena *et al.* Le mécanisme de restauration impliquant le transfert d'un hydrogène de la molécule Tris est donc plausible. Comme la molécule d'EDTA a tendance à accepter un atome d'hydrogène, il est peu probable qu'elle participe au processus de réparation.

Il est également possible que les paramètres de résonances des anions transitoires impliqués dans la formation de CSB soient modifiés par la présence d'ions organiques dans les sillons de l'ADN. Ces changements pourraient être en partie responsables de la diminution du rendement de CSB. La section efficace pour l'attachement dissociatif de l'électron sur une base, menant possiblement à la voie 4 (figure 19), est exprimée comme suit :

$$\sigma_{\text{DEA}}(E) = \sigma_{\text{cap}}(E) P_s \quad (1)$$

Où P_s représente la probabilité de survie de l'anion transitoire et $\sigma_{\text{cap}}(E)$, la section efficace de capture de l'électron par la base. $\sigma_{\text{cap}}(E)$ peut être écrit de la façon suivante:

$$\sigma_{\text{cap}}(E) = \lambda^2 g |\chi_v|^2 \left[\frac{\Gamma_a}{\Gamma_d} \right] \quad (2)$$

Tel qu'expliqué dans l'introduction, la résonance est possible lorsque la longueur d'onde de l'électron est de l'ordre des distances interatomiques. λ correspond donc à la longueur

d'onde de Broglie de l'électron incident, g un facteur statistique, χ_v la fonction d'onde normalisé d'une vibration nucléaire. Γ_a est la largeur en énergie de la résonance et Γ_d représente la largeur Frank-Condon. La largeur de la résonance définit un temps de vie τ_a avant l'autodétachement, $\tau_a(R) = \hbar/\Gamma_a(R)$. La probabilité de survie de l'anion transitoire, suite à la capture de l'électron, peut donc être exprimée de la façon suivante :

$$P_s = \exp\left[-\int_{R_E}^{R_c} \frac{dt}{\tau_a(R)}\right] \quad (3)$$

Où R_E est la distance entre les atomes à une énergie E (dans notre cas $E=E_0=10\text{eV}$) et R_c correspond à la limite de dissociation (voir courbe de potentiel, introduction). Si on définit un temps de vie moyen $\bar{\tau}_a$ et que $K \equiv \lambda^2 g |\chi_v|^2$, l'équation 1 devient:

$$\sigma_{\text{DEA}}(E) = K \left[\frac{\Gamma_a}{\Gamma_d} \right] \exp\left[-\frac{\bar{\tau}_c}{\bar{\tau}_a}\right] \quad (4)$$

Ici, $\bar{\tau}_c(E) \equiv |R_c - R_E|/v$, où v est la vitesse relative moyenne de séparation des fragments se dissociant. Par conséquent, la section efficace d'attachement dissociatif de l'électron dépend exponentiellement du ratio du temps de vie de l'anion transitoire et de la vitesse des fragments.

Les mêmes équations peuvent être dérivées pour l'attachement dissociatif de l'électron sur le groupement phosphate. Cependant, dans ce cas, la probabilité de capture dépend de la section efficace de capture directement par le PO_4 à 10eV, de la probabilité de transfert de l'électron via la voie 1 (figure 19) à 10eV et la probabilité de transfert de l'électron via la voie 3 pour des énergies inférieures. De plus, différents états d'anions

transitoires doivent être considérés aux deux différentes énergies. Malgré la complexité du problème, les équations 1 à 4 indiquent qu'un changement dans l'environnement de la base ou du phosphate va nécessairement influencer la valeur de la section efficace d'attachement dissociatif de l'électron, plus spécifiquement en modifiant le temps de vie de l'anion transitoire (τ_a) et la limite de dissociation R_c . Il est connu que l'attachement dissociatif de l'électron sur les solides moléculaires ou sur les biomolécules, comme l'ADN, est fortement dépendant de l'environnement (BASS ET SANCHE, 1998) (SANCHE, 2005). Par exemple, la modification du champ électrique à proximité d'une molécule cible peut considérablement altérer la section efficace d'attachement dissociatif de l'électron (BASS ET SANCHE, 1998). Ceci a été vérifié en changeant la distance entre une molécule subissant l'attachement dissociatif et son substrat de métal en intercalant un diélectrique inerte entre les deux. Pour de grande distance ($\geq 1\text{nm}$), le champ électrique créé par la polarisation dans le diélectrique et le métal (induit par l'anion transitoire) augmente la section efficace de l'attachement dissociatif de l'électron en réduisant la valeur de R_c dans l'équation 3 (BASS ET SANCHE, 1998). À des plus petites distances du métal ($\leq 1\text{nm}$), le champ électrique est suffisamment fort pour diminuer la section efficace de capture de l'électron et réduire le temps de vie τ_a de l'anion transitoire en augmentant le transfert de l'électron au métal (BASS ET SANCHE, 1998) (SANCHE ET PARENTEAU, 1990). Il a été démontré que ce dernier mécanisme pouvait diminuer de deux ordres de grandeur la section efficace d'attachement dissociatif de l'électron sur l' O_2 en phase condensée, lorsque la molécule cible reposait sur un substrat nu. En considérant la sensibilité de l'attachement dissociatif de l'électron aux modifications d'un champ électrique à proximité, il est peu probable que les

modifications du champ électrique dans l'ADN, causées par l'ajout d'ions organiques chargés positivement (Tris), ne changent pas σ_{DEA} , menant à des dommages aux bases et à la rupture du lien C-O de l'hélice d'ADN. Ces changements dans la distribution de charge interne, induits par la présence de cations à proximité de l'ADN, pourraient donc être responsables de la protection de l'ADN contre les dommages induits par les EBE.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Lorsque la radiation ionisante traverse la matière biologique, elle dépose son énergie par des ionisations et des excitations, générant une grande quantité d'ions, de radicaux libres et d'électrons secondaires. Ces derniers, qui représentent l'espèce secondaire la plus abondante (40 000/MeV) (PIMBLOTT *et al.*, 1996) (PIMBLOTT *et al.*, 2007) (PLATZMAN, 1955), possède une énergie se distribuant essentiellement entre 0 et 30eV. À cause du rôle crucial que ces électrons peuvent jouer dans le domaine de la radiobiologie et ses applications (ex. radiothérapie), plusieurs efforts ont été mis en commun pour comprendre leur interaction avec les molécules d'ADN. Il a été démontré que les électrons de basse énergie (EBE) peuvent induire des cassures simples brins (CSB) à l'ADN, via la formation d'anions transitoires qui décroissent par attachement dissociatif, ou dans d'autres états électroniques dissociatifs menant à la fragmentation. Afin d'effectuer une étude complète des effets des électrons de basse énergie sur la matière biologique, il est nécessaire de comprendre leur mécanismes d'interaction non seulement avec l'ADN, mais avec les constituants de son environnement.

Les histones sont une composante importante de l'environnement moléculaire de l'ADN. Leur charge positive leur permet de s'associer aux groupements phosphate anionique de l'ADN. Le rôle principal de ces protéines basiques consiste à organiser l'ADN et l'empaqueter afin de former la chromatine. Les cations sont une autre

composante importante de la cellule; ils jouent un rôle dans la stabilisation de la conformation B de l'ADN *in vitro* par leurs interactions avec les petits et grands sillons de l'ADN, ainsi qu'avec le groupement phosphate chargé négativement. Avec les histones, ils participent également à la compaction de l'ADN pour former la chromatine.

Ce projet visait donc à étudier l'effet des ions organiques, sous forme de Tris et d'EDTA, sur les dommages induits à l'ADN par les électrons de basse énergie afin de mieux comprendre les mécanismes menant aux cassures simple brin dans des conditions se rapprochant un peu plus de celles retrouvées en milieu cellulaire. Le Tris et l'EDTA ont été choisis comme objet d'étude, puisqu'une solution de 10mM Tris et 1mM EDTA correspond au tampon standard pour conserver l'ADN en solution. De plus, la molécule Tris possède un groupement amine (NH_2) et l'EDTA possède 4 groupements carboxyliques (COOH). Ensembles, ils peuvent être utilisés comme modèle simple pour les acides aminés, unités structurales des protéines. Le ratio molaire de 10 :1 de Tris par rapport à l'EDTA a pour but d'imiter le comportement des histones qui sont riches en arginine et lysine, acides aminés possédant un groupement amine chargé positivement additionnel. Des films d'ADN d'épaisseurs variables contenant entre 0 et 32 ions organiques/ nucléotide ont donc été placés sous vide et irradiés avec des électrons de 10eV. Il a été démontré, à partir du comportement des échantillons non irradiés, que le tantale endommage la couche d'ADN directement en contact avec sa surface. La quantité de dommage induite diminue ensuite à mesure que la quantité d'ions organiques/ nucléotide augmente dans le film. Par exemple, l'ajout d'un seul ion organique/ nucléotide augmente le pourcentage d'ADN surenroulé de 86% à 91%. Cette protection

constitue seulement une protection physique attribuée au fait que plus la quantité d'ions organiques/ nucléotide augmente dans le film, plus l'épaisseur du film augmente et plus petite est la proportion d'ADN en contact direct avec le tantale. En d'autres mots, la protection apportée par les ions organiques dans les échantillons non irradiés est expliquée par un effet de dilution de l'ADN. L'épaisseur des films contenant une quantité constante d'ADN (260ng) en fonction de la quantité de Tris et EDTA présente a été estimée en assumant que la densité des ions était la même que l'ADN. Ces valeurs ont démontrées que l'épaisseur des films augmente très rapidement en fonction de la quantité d'ions organiques présente. En effet, l'ajout de 8 ions organiques/ nucléotide augmente de 3.4 fois l'épaisseur totale du film. Ceci démontre l'importance d'inclure la contribution de toute molécule présente lors de la préparation des échantillons, que ce soit des sels, des protéines, des molécules de cisplatine ou des nanoparticules d'or. Ne pas considérer leur contribution dans les calculs d'épaisseur aurait pour effet de donner des valeurs erronées de sections efficaces et de longueurs effectives de l'électron.

La diminution du rendement de cassures simple brin observée dans les films ayant une quantité constante d'ADN est donc fortement modulée par l'épaisseur croissante des films. Lorsque le film est trop épais, les électrons de 10eV ne pénètrent pas suffisamment dans le film pour atteindre les molécules d'ADN trop profondes. Néanmoins, la comparaison des rendements de SSB attendus dépendant strictement de l'effet d'épaisseur avec les rendements mesurés démontre l'existence d'un effet protecteur généré par la présence d'ions organiques, dont l'importance est toutefois difficile à évaluer.

Ce sont les expériences avec les films d'épaisseur constante qui ont permis de confirmer que les ions organiques ont le potentiel de protéger l'ADN contre les dommages induits par les électrons de basse énergie. Selon les rendements de cassures simples brins mesurés, les premiers ions organiques ajoutés offrent la protection maximale. En effet, l'ajout de 2 ions organiques/ nucléotide a diminué de 70% la formation de bris, alors que les ions additionnels n'apportent pratiquement aucune protection supplémentaire. Cet effet est donc attribué aux molécules Tris qui se situent très près de la structure de l'ADN. À cause de leur charge positive, ce sont ces dernières molécules qui sont le plus susceptibles d'être à l'origine de l'effet protecteur observé par leurs interactions avec les petits et grands sillons de l'ADN, ainsi qu'avec le groupement phosphate. Leur promiscuité avec l'ADN induira une modification du champ électrique autour de ce dernier qui aura pour conséquence d'altérer la valeur de la section efficace de capture, du temps de vie de l'anion transitoire formé sur la base et le phosphate, et de la limite de dissociation. Comme la dissociation des liens est fortement sensible à ces paramètres de résonance, les dommages à l'ADN sont réduits par la présence de cations organiques. De plus, les molécules Tris à proximité d'une base de l'ADN (c'est-à-dire celles se logeant dans les petits et grands sillons) ont la capacité de restaurer les bases déshydrogénées induites par l'attachement dissociatif de l'électron. Ce mécanisme de restauration implique le transfert simultané d'un hydrogène du groupement amine de la molécule Tris à la base endommagée et d'un électron de la base à la molécule Tris. Ces mécanismes, appelés « Two-electron-proton-coupled-transfer » ou « One-step-hydrogen-electron-transfer » préviennent le transfert de l'électron situé sur le fragment anionique au

groupement phosphate et inhibent donc la formation de cassures simples brins. Ce phénomène est appuyé par une étude théorique effectuée par Jena *et al.* qui a démontré que certains acides aminés, comme la cystéine et la tyrosine, peuvent restaurer des bases déshydrogénées anioniques induites par l'attachement dissociatif de l'électron et ce, en phase gazeuse et aqueuse.

En plus de permettre de mieux comprendre comment l'environnement de l'ADN modifie l'amplitude des dommages induits par les électrons de basse énergie, ce travail représente la première démonstration expérimentale que les dommages à l'ADN induits par les EBE peuvent être restaurés par des réactions chimiques ultra-rapides, c'est-à-dire se situant sur une échelle de temps aussi petite que l'échelle physique (10^{-16} - 10^{-13} s). Il est connu que les CSB à l'ADN peuvent être réparées par des mécanismes de réparation cellulaire (comme le « base excision repair » ou « nucleotide excision repair ») impliquant plusieurs protéines (SHAROVA, 2005). Les résultats présentés dans cette étude indiquent que les protéines en contact étroit avec l'ADN, comme les histones, peuvent également participer à la réparation de dommages précoces induits à l'ADN, tels les bases déshydrogénées, avant qu'elles ne mènent à des dommages encore plus nocifs et difficiles à réparer, comme les cassures simples brins.

Afin de mieux comprendre l'origine de l'effet protecteur des ions organiques, il serait utile d'effectuer des expériences supplémentaires en ce qui a trait aux paramètres de résonance. Une étude intéressante serait d'irradier des films d'ADN en présence ou absence de 2 ions organiques/ nucléotide (puisque cette concentration offre la protection

maximale) avec des électrons d'énergie incidente variant entre 3 et 20eV. Cette expérience permettrait en outre de vérifier si l'ajout de molécules Tris chargées positivement, à proximité de l'ADN, change la largeur en énergie de la résonance et sa position, mais aussi de vérifier si la présence de ces molécules engendre la formation de nouvelles structures de résonance. Selon le cas, la formation de nouveaux anions transitoires pourrait être étudiée par l'analyse de la désorption des ions grâce à un spectromètre de masse. Enfin, une étude portant sur l'effet des protéines constituerait un pas de plus vers la compréhension des mécanismes fondamentaux menant aux dommages à l'ADN dans des conditions se rapprochant des conditions cellulaires. Une nouvelle stratégie devra toutefois être adoptée, puisque la lyophilisation engendre la dégradation des protéines.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier chaleureusement mes codirecteurs Léon Sanche et Darel hunting. Merci à vous deux de m'avoir permis d'évoluer dans un environnement aussi enrichissant. Léon, merci de faire chaque jour ton travail avec la même passion et de transmettre à tes étudiants le goût de se surpasser. Darel, merci pour tes encouragements et ta compréhension. Grâce à toi, je suis ressortie de chacune de nos réunions toujours plus motivée. Merci d'avoir rendu cette aventure plus humaine.

Mille fois merci à Sonia Girouard, Pierre Cloutier et Daniel Robillard pour votre patience, vos encouragements, vos précieux conseils et les nombreux fous rires que vous avez provoqués. Vous avez rendu mon passage à Sherbrooke des plus mémorables. Pierre, merci d'avoir toujours été là pour moi et d'avoir passé des après-midi à m'aider à résoudre les centaines de problèmes techniques survenus pendant ma maîtrise! Sans toi, je ne m'en serais jamais sortie. Tu es mon idole!

Merci à Marc et Andrew pour les « brainstorming » et les discussions de café afin de m'aider à retrouver mes électrons.

Merci aux Pr. Guylain Boissonneault et Pr. Benoît Paquette pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Enfin, infiniment merci à mes parents, ma sœur et Fabrice pour m'avoir toujours écouté, encouragé et appuyé dans mes choix. Merci d'avoir cru en moi dans les moments plus difficiles.

RÉFÉRENCES

- Barrios, R., Skurski, P., Simons, J. (2002) Mechanism for damage to DNA by low-energy electrons, *J. Phys. Chem.*, **105**, 7991-7994.
- Bass, A.D., Sanche, L. (1998) Absolute and effective cross sections for low-energy electron scattering processes within condensed matter, *Radiat. Environ. Biophys.*, **37**, 243-257.
- Berdys, J., Anusiewicz, I., Skurski, P., Simons, J. (2004) Damage to model DNA fragments from very low-energy (< 1 eV) electrons, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 6441-6447.
- Berdys, J., Skurski, P., Simons, J. (2004) Damage to model DNA fragments by 0.25-1.0 eV electrons attached to a thymine pi* orbital, *J. Phys. Chem. B.*, **108**, 5800-5805.
- Berdys, J., Anusiewicz, I., Skurski, P., Simons, J. (2004) Theoretical study of damage to DNA by 0.2-1.5 eV electrons attached to cytosine, *J. Phys. Chem. A.*, **108**, 2999-3005.
- Bhasin, M., Reinherz, E.L., Reche, P.A. (2006) Recognition and Classification of Histones Using Support Vector Machine. *Journal of Computational Biology*, **13**, 102-112.
- Boudaïffa, B., Cloutier, P., Hunting, D., Huels, M.A., Sanche, L. (2000) Resonant formation of DNA strand breaks by low energy (3-20eV) electrons, *Science*, **287**, 1658-1660.
- Brun, E., Cloutier, P., Sicard-Roselli, C., Fromm, M., Sanche, L. (2009) Damage induced to DNA by low-energy (0-30eV) electrons under vacuum and atmospheric conditions. *J. Phys. Chem. B*, **113**, 10008-10013.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., Gromova, M., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., Romieu, A., Sauvaigo, S. (1999) Radiation-induced damage to DNA : mechanistic aspects and measurement of base lesions, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B*, **151**, 1-7.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., Ravanat, J.L. (2005) Radiation-induced damage to cellular DNA : measurement and biological role, *Radiat. Phys. Chem.*, **72**, 293-299.

- Cai, Z., Dextraze, M.-E., Cloutier, P., Hunting, D., Sanche, L. (2006) Induction of strand breaks by low-energy electrons (8-68eV) in a self assembled monolayer oligonucleotides : Effective cross sections and attenuation lengths. *J. Chem. Phys.*, **124**, 024705.
- Campbell, N.A., Richard, M. (1995) *Biology*, Renouveau pédagogique, Canada, 1190 pages.
- Cecchini, S., Girouard, S., Huels, M.A., Sanche, L., Hunting, D.J. (2004) Single-Strand-Specific Radiosensitization of DNA by Bromodeoxyuridine, *Radiat. Res.*, **162**, 604-615.
- Chiu, T.K., Dickerson, R.E. (2000) A crystal structures of B-DNA reveal sequence-specific binding and groove-specific bending of DNA by magnesium and calcium, *J. Mol. Biol.*, **301**, 915-945.
- Cobut, V. , Frongillo Y., Patau J. P., Goulet T., Fraser M.J., et Jay-Gérin J.-P. (1998) Monte Carlo simulation of fast electron and proton tracks in liquid water-1. Physical and physicochemical aspects. *Radiat. Phys. Chem.* **51**, 229.
- Colson, A.O., Besler, B., Sevilla, M.D. (1992) Abinitio molecular-orbital calculations on dna-base pair radical ions - effect of base-pairing on proton-transfer energies, electron-affinities, and ionization-potentials, *J. Phys. Chem.*, **96**, 9787-9794.
- De Vita, V.T., Hellman, Jr. S., Rosenberg, S.A. (2001) *Cancer: Principle and Practice of Oncology*. Lippincott, Williams and Wilkins, NY, New York.
- Fasman, G.D. (1975) *Handbook of biochemistry and molecular biology*, 3rd edition, volume 1, CRC press, Cleveland, Ohio.
- Felsenfeld G., McGhee, J.D. (1986) Structure of the 30nm chromatin fiber, *Cell*, **44**, 375-377.
- Folkard, M., Prise, K.M., Vojnovic, B., Davies, S., Roper, M.J., Michael, B.D. (1993) Measurement of DNA damage by electrons with energies between 25 and 4000eV, *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**, 651-658.
- Garret, R.H., Grisham, C.M. (2000) *Biochemistry*, 2nd edition, De Boeck Université, France.
- Glasel, J.A. (1995) Validity of nucleic-acid purities monitored by 260nm 280nm absorbency ratios, *BioTechniques*, **18**, 62-63.
- Hartl, D. L., Freifelder, D., Snyder, L.A. (1988), *Basic Genetics*, Jones and Bartlett Publishers.

- Inokuti, M. (1971) Inelastic collisions of fast charged particles with atoms and molecules – The bethe theory revisited, *Rev. Mod. Phys.*, **43**, 297-347.
- Jena, N.R., Misra, P.C., Suhai, S. (2009) Protection against radiation-induced DNA damage by amino acids: a DFT study, *J. Phys. Chem. B.*, **113**, 5633-5644.
- Konh, K.W. (1996) Beyond DNA cross-linking: History and prospects of DNA-targeted cancer treatment - Fifteenth Bruce F. Cain memorial award lecture, *Cancer Res.*, **56**, 5533-5546.
- LaVerne, J.A., Pimblott, S.M. (1995) Electron-energy-loss distributions in solid and gaseous hydrocarbons, *J. Phys. Chem.*, **99**, 10540-10548.
- LaVerne, J.A., Pimblott, S.M. (1995) Electron-energy-loss distributions in solid, dry DNA, *Radiat. Res.*, **141**, 208-215.
- Li, X., Zheng, X., Cloutier, P., Sanche, L., Wagner, R.J. (2008) Low energy electron induced DNA damage: Effects of terminal phosphate and base moieties on the distribution of damage, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 5612-5613.
- Li, X., Sevilla, M.D., Sanche, L. (2003) Density functional theory studies of electron interaction with DNA: Can zero eV electrons induce strand breaks?, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 13668-13669.
- Lindahl T, Nyberg B. (1972) Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **11**, 3610-3618.
- Manchester, K.L. (1995) Value of A (260)/A (280) ratios for measurement of purity of nucleic-acids, *BioTechniques*, **19**, 208-209.
- Manchester, K.L. (1996) Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations, *BioTechniques*, **20**, 968-970.
- Mathieson, A.R., Olayemi, J.Y. (1975) Cations-chromatin binding as shown by ion microscopy, *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 237-243.
- Minasov, G., Tereshko, V., Egli, M. (1999) Atomic-resolution crystal structures of B-DNA reveal specific influences of divalent metal ions on conformation and packing, *J. Mol. Biol.*, **291**, 83-99.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2005) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th edition, W.H. Freeman.

- Pan, X., Sanche, L. (2006) Dissociative electron attachment to DNA basic constituents: The phosphate group, *Chem. Phys. Lett.*, **90**, 208102.
- Panajotovic, R., Martin, F., Cloutier, P., Hunting, D., Sanche, L. (2006) Effective cross sections for production of single-strand breaks in plasmid DNA by 0.1 to 4.7eV electrons, *Radiat. Res.*, **165**, 452-459.
- Pimblott, S.M., LaVerne, J.A., Mozumber, A. (1996) Monte Carlo simulation of range and energy deposition by electrons in gaseous and liquid water, *J. Phys. Chem.*, **100**, 8595-8606.
- Pimblott, S.M., LaVerne, J.A., Mozumber, A. (2007) Production of low-energy electrons by ionizing radiation, *Rad. Phys. Chem.*, **76**, 1244-1247.
- Platzman, R. L., (1955) Subexcitation electrons, *Radiat. Res.*, **2**, 1-7.
- Ptasinska, S., Sanche, L. (2007) Dissociative electron attachment to hydrated single DNA strands, *Phys. Rev.*, **75**, 030915.
- Sakumi, T., Sekiguchi, T. (1990) Structures and functions of DNA glycosylases, *Mutat. Res.*, **236**, 161-172.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 3, App. C.1.
- Sancar, A. (1996) DNA excision repair, *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 43-81.
- Sanche, L. (2005) Low energy electron-driven damage in biomolecules, *Eur. Phys. J.D.*, **35**, 367-390.
- Sanche, L. (2002) Nanoscopic aspects of radiobiological damage: Fragmentation induced by secondary low-energy electrons, *Mass Spectrom.*, **21**, 349-369.
- Sanche, L. (1991) Primary interactions of low energy electrons in condensed matter. In: C. Ferradini and J.-P. Jay-Gerin, Editors, *Excess Electrons in Dielectric Media*, CRC Press, Boca Raton, FL pp. 1-42 (Chapter 1).
- Sanche, L. Parenteau, L. (1990) Surface reactions between O₂ and hydrocarbons induced by dissociative electron attachment, *J. Chem. Phys.*, **93**, 7476-7482.
- Schulz, G.J. (1973) Resonances in electron impact on atoms and diatomic molecules, *Rev. Mod. Phys.*, **45**, 378-486.
- Sharova, N. P. (2005) How does a cell repair damaged DNA?, *Biochemistry*, **70**, 275-291.

- Strissel, P.L., Strick, R., Gavriloz, K.L., Levi-Setti, R. (2004) Specific Mg²⁺ binding at human and Indian muntjac chromosomal Giemsa bands, *Appl. Surf. Sci.*, **231**, 485-489.
- Uehara, S., Nikjoo, H., Goodhead, TD. (1999) Comparison and assessment of electrons cross sections for Monte Carlo track structure codes, *Radiat. Res.* **152**, 202-213.
- Von Sonntag, C. (1987) *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor and Francis, London.
- Warberg O., Christian W. (1942) Isolation and crystallization of enolase, *Biochem.Z.*, **310**, 384-421.
- Wilfinger, W.W. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectro-photometric assessment of nucleic acid purity, *BioTechniques*, **22**, 474-481.
- Youngson, R. M. (2006). *Collins Dictionary of Human Biology*, HarperCollins, Glasgow.
- Zheng, Y., Wagner, R., Sanche, L. (2006) DNA damage induced by low-energy electrons: Electron transfer and diffraction, *Phys. Rev. Lett.*, **96**, 208101.
- Zheng, Y., Cloutier, P., Hunting, D.J., Sanche, L., Wagner, J.R. (2005) Chemical basis of DNA sugar-phosphate cleavage by low-energy electrons, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 16592-16598.