

Complexation des acides aminés basiques arginine, histidine et lysine avec l'ADN plasmidique en solution aqueuse : participation à la capture de radicaux sous irradiation X à 1,5 keV

Talat Tariq Khalil, Baptiste Taillefumier, Omar Boulanouar, Christophe Mavon and Michel Fromm^a

Université de Bourgogne Franche-Comté, UMR CNRS 6249, Laboratoire Chrono-environnement, F-25030 BESANCON CEDEX, France

Abstract. *The chemical environment of DNA in real biological situation is complex notably due to the presence of histones, i.e. nuclear proteins which are linked approximately in equal mass balance to the DNA macromolecule to form chromatin. Histones have numerous terminal tails made up of basic (positively charged) amino acids arginine and lysine while DNA is a macro-anion which holds one negative charge per phosphate moiety all along the double-helix. As a first attempt, in this study, the complexity of the nuclear chromatin structure is mimicked through the formation of complexes made up of the basic amino acids Arg, His, Lys (which apart from His are protonated at physiological pH) and a DNA plasmid used as a probe. Those three amino acids, when free in aqueous solution are known to be effective radical scavengers, notably for the hydroxyl radical, they might therefore protect DNA against indirect effects when exposed to ionizing radiations. At fixed concentration, the scavenging capacities of free amino acids, σ , for the hydroxyl radical are typically such that $\sigma_{His} \approx \sigma_{Arg} > \sigma_{Lys}$ ($\sigma_{Lys} \approx 0,1 \times \sigma_{Arg}$). We have measured the yields of single strand breaks per plasmid and per Gray (χ) during exposure of aqueous solutions of complexes [amino acid – plasmid DNA] to ultra-soft X-rays (1,5 keV). At equal concentrations, the three complexed amino acids which also are present in large excess in the solutions do not exhibit DNA protection capabilities that are in line with their scavenging capacities ; we find indeed single strand break yields that follow the order $\chi_{His} > \chi_{Arg} > \chi_{Lys}$ ($\chi_{Lys} \approx 0,01 \times \chi_{Arg}$). After having detailed our experimental protocol, we analyze the specific features of basic amino acids interactions with DNA, based on a bibliographic survey. The specificity of Arg interaction with DNA, especially its propensity to create bidentate contacts with bases (principally with the G base) makes it possible to propose a way by which high DNA single strand break damage is favored in the presence of Arg. An inter-molecular radical transfer is suggested which also seems to hold for the Lysine amino acid. As for the unexpected high single strand break yields observed with His, we suggest some possible pathways but complementary experiments still will have to be performed.*

^a michel.fromm@univ-fcomte.fr

L'environnement chimique de l'ADN en situation biologique est complexe notamment en raison de la présence d'histones, protéines nucléaires, associées en quantité approximativement égales à l'ADN pour former la chromatine. Les histones possèdent de nombreux radicaux basiques arginine et lysine chargés positivement et dont la majorité se trouve sur les chaînes émergentes, l'ADN présente quant à lui des charges négatives sur ses groupements phosphates localisés tout au long de la double hélice. Dans cette étude, la complexité de la structure de la chromatine nucléaire est dans un premier temps mimée en solution aqueuse par la formation de complexes entre un ADN plasmidique sonde et les trois acides aminés basiques, Arg, His, Lys, qui, mis à part His, sont protonés au pH physiologique. Ces acides aminés libres en solution sont réputés être des capteurs efficaces de radicaux libres, notamment pour le radical hydroxyle, conférant ainsi un pouvoir protecteur vis-à-vis des effets indirects sur l'ADN en situation d'exposition aux rayonnements ionisants. A concentration fixée, les capacités de capture des acides aminés libres, σ , pour le radical hydroxyle sont typiquement les suivantes $\sigma_{His} \approx \sigma_{Arg} > \sigma_{Lys}$ ($\sigma_{Lys} \approx 0,1 \times \sigma_{Arg}$). Nous avons mesuré les taux de cassures simple brin par plasmide et par Gray (χ) lors d'expositions de solutions aqueuses de complexes [acide aminé – ADN plasmidique] aux rayons X ultra-mous (1,5 keV). A concentrations égales, les trois acides aminés complexés et présents en large excès ne manifestent pas une capacité de protection de l'ADN proportionnelle à leur capacité de capture libre et en solution ; on trouve en effet des taux de cassures dans l'ordre suivant $\chi_{His} > \chi_{Arg} > \chi_{Lys}$ ($\chi_{Lys} \approx 0,01 \chi_{Arg}$). Après avoir détaillé le mode opératoire de ces mesures, nous analyserons sur des bases bibliographiques, les modes spécifiques d'interaction des acides aminés basiques avec l'ADN. La spécificité des liaisons de l'arginine avec l'ADN et plus particulièrement sa propension à être un ligand bidentate qui se lie aux bases (principalement G) de l'ADN nous permet d'expliquer les taux de cassures simple brin particulièrement élevés observés avec Arg. Un mécanisme de transfert de radical intermoléculaire est suggéré pour Arg. Un raisonnement globalement similaire peut être tenu pour la lysine. Pour l'histidine, nous suggérons quelques voies possibles qui conduiraient à expliquer les taux de cassure anormalement élevés observés, mais cela demandera des expériences complémentaires.

1 INTRODUCTION

Bien que toutes les molécules constitutantes du milieu cellulaire puissent être affectées par un Rayonnement Ionisant (RI), l'étude de l'effet des RIs sur le vivant se concentre essentiellement (mais pas uniquement) sur l'identification et la quantification des dégâts produits à la macromolécule d'ADN. Ces derniers sont regroupés en deux classes appelées effets directs et effets indirects. Les effets directs correspondent typiquement aux conséquences de l'ionisation ou de l'excitation directes de l'ADN alors que les effets indirects se rapportent à la production dans le milieu environnant d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont à leur tour capables d'endommager l'ADN [1]. La compréhension des mécanismes intimes par lesquels ces dégâts sont produits est d'un intérêt capital aussi bien en radioprotection que pour l'amélioration de la radiothérapie. En situation réelle, dans un noyau cellulaire, la macromolécule d'ADN est condensée par les histones (protéines basiques), formant des nucléosomes qui entrent dans la structure des chromosomes. Au plan expérimental, deux approches globales se distinguent lorsqu'il s'agit d'élucider les mécanismes d'endommagement de l'ADN : les expériences *in vivo* et les expériences *in vitro*. Avec les approches *in vivo*, on dispose de la machinerie cellulaire dans son ensemble et la complexité du vivant ne permet pas toujours d'isoler dans le détail le ou les mécanismes physico-chimiques, voire biochimiques exacts à l'origine d'une modification donnée ;

cela d'autant plus que des mécanismes de réparation concomitants de l'ADN existent [2]. A l'opposé, les méthodes *in vitro*, en simplifiant le milieu réactionnel parfois à l'extrême, conduisent à donner une vision moléculaire plus évidente des mécanismes mis en jeu, ce qui permet de mettre en lumière d'éventuels mécanismes sous-jacents. L'expérimentation *in vitro* peut elle-même être envisagée suivant deux modalités opposées, à savoir les approches descendante (top-down) et ascendante (bottom-up). L'approche descendante vise par exemple à complexer l'ADN avec des protéines (histones) extraites du milieu cellulaire et à exposer ces complexes, en milieu aqueux, aux rayonnements ionisants [3]. Dans l'approche ascendante, on cherche à recréer l'environnement chimique pas à pas en remontant vers la complexité du milieu biologique réel. C'est cette dernière alternative qui nous intéresse, car nous étudions notamment l'effet des électrons de basse énergie ($E_{\text{cinétique}} < 20 \text{ eV}$), dont les profondeurs de pénétration sont de l'ordre du nanomètre [4] dans la matière condensée mais aussi ceux des rayons X ultra-mous (raie $K\alpha$ de l'aluminium, $E \approx 1,5 \text{ keV}$), qui font l'objet de cette étude. Les photons de 1,5 keV, dont le libre parcours moyen inélastique dans l'eau est $\lambda = 7 \mu\text{m}$ [5], génèrent dans ce milieu des photoélectrons et des électrons Auger qui déposent leur énergie jusqu'à des distances qui typiquement n'excèdent pas 30 nm [6] ; ce qui correspond à la taille d'un nucléosome [4]. Dans un nucléosome, les histones, protéines très riches en acides aminés basiques, sont associées à l'ADN permettant sa compaction [7]. La charge positive des histones basiques permet une interaction forte avec les groupements anioniques phosphate de l'ADN. Les acides aminés basiques sont au nombre de trois, l'arginine (Arg), la lysine (Lys) et l'histidine (His), leur chaîne latérale est généralement protonée au pH physiologique. Notre stratégie consiste à former en solution aqueuse des complexes [ADN • acide aminé] pour ensuite les exposer aux photons de 1,5 keV ; de tels complexes constituent en quelque sorte un modèle de la première couche moléculaire entourant l'ADN dans les histones. Il apparaît que les trois acides aminés basiques ont la propriété d'être de très bons capteurs de radicaux libres (notamment le radical hydroxyle) en solution aqueuse [8], ils sont présents dans nos solutions aqueuses sous forme complexée et à l'état libre car la réaction entre acides aminés et ADN est un *équilibre* de complexation. Dans cette étude, nous allons mesurer les taux de cassures sur un ADN plasmidique sonde (pUC21 avec une longueur de 3266 paires de bases), la solution mère étant en suspension dans l'eau ultra-pure (exempte de tampon). La présence des acides aminés basiques Arg, Lys et His libres en solution ou complexés à l'ADN modulera donc la valeur des rendements de cassures. Ces taux de cassures seront alors comparés aux capacités de capture des acides aminés seuls, ce qui permettra de rendre compte de leur participation aux effets indirects en termes à la fois de protection par capture de radicaux mais aussi d'endommagement de l'ADN.

2 MATERIEL ET METHODES, DISPOSITIF D'IRRADIATION ET DOSIMETRIE

Les solutions complexes sont exposées en environnement atmosphérique à la raie $K\alpha$ de l'aluminium à l'aide d'un générateur de rayons X à cathode froide dont le faisceau a été caractérisé finement [9,10,11]. Le dispositif complet est schématisé en figure 1, il est piloté via une interface LabVIEW. Les paramètres d'opération sont une tension d'accélération de 4 kV, un courant de 2 mA, et une pression interne au tube de 0,07 mbar. Les échantillons liquides d'un volume initial de 100 μL sont placés à une distance de 10 mm dans un air maintenu à 295 K et à une humidité de 98% RH grâce à une enceinte climatique (KBWF 240, Binder) placée en circuit fermé sur la cellule d'irradiation en PMMA qui contient l'échantillon à irradier. Le porte-échantillon est constitué d'une part d'un ascenseur à filetage (positionnement vertical à $\pm 10 \mu\text{m}$) et d'autre part de la cuve (diamètre de 8 mm, hauteur de 2 mm) en polypropylène pur haute qualité.

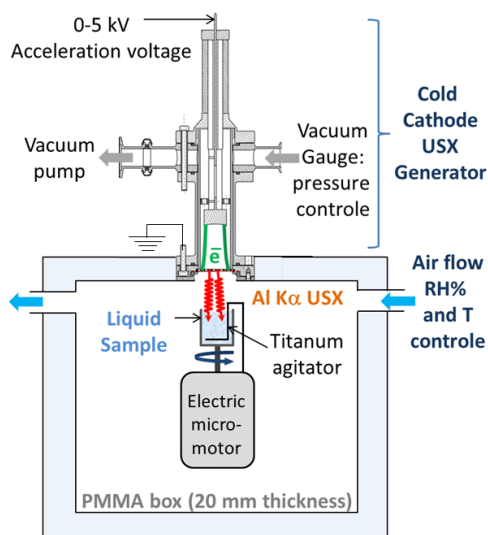


Figure 1. Ultra-Soft X-ray irradiation device. The samples are maintained at a constant temperature (295 K) and humidity (98% RH) by circulating air in the irradiation box using a connection to a Climate Chamber. The samples distance to the X-ray source is determined using a linear roller screw driven positioning stage with a 10 μm precision.

Le système de porte-échantillon est également équipé d'un système d'agitation utilisant un motoréducteur (Modelcraft RB-35, Conrad) qui fait tourner la cuve à une vitesse constante (comprise entre 0 à 120 révolutions.minute⁻¹) alors qu'une tige de titane, fixe, immergée dans la solution assure l'agitation (Fig. 1). L'agitation permet d'assurer un dépôt homogène de la dose dans les 100 μL de solution (2 mm d'épaisseur). L'efficacité de l'agitation sur le dépôt de dose dans la solution aqueuse a été vérifiée de deux façons complémentaires [12]. D'une part, l'utilisation d'ADN plasmidique comme sonde lors d'expériences d'irradiation à durée fixe mais avec des vitesses d'agitation (ω) variant de 0 à 120 révolutions.minute⁻¹ a montré que les taux de cassures simple et double brin croissent avec la vitesse d'agitation et atteignent un palier pour $\omega > \sim 80$ rev.min⁻¹. Par ailleurs, une série de mesures en dosimétrie de Fricke sous agitation constante ($\omega = 110$ rev.min⁻¹) et avec des temps d'irradiation de la solution qui varient de 0 à 40 minutes ont permis de vérifier que le débit de dose est bien constant : il est égal à 2,24 Gy/min dans l'eau. Ces observations, démontrent non-seulement l'efficacité de l'agitation et la dernière d'entre elles démontre en outre que l'évaporation attendue, en raison du faible volume de solution utilisé, est négligeable, puisque le débit de dose demeure constant au cours du temps. L'humidité de 98% RH maintenue dans la cellule d'irradiation assure ainsi un minimum d'évaporation, en tout état de cause il demeure suffisamment faible, pour qu'il n'ait pas d'incidence sur le débit de dose dans la solution aqueuse. Étant donné la sensibilité des expériences vis-à-vis de l'environnement, elles débutent et terminent toutes par le rinçage de la cuve à l'eau ultra-pure afin d'éviter toute contamination. Les solutions dosimétriques sont préparées fraîchement avant l'expérience, la mesure de dose est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (CARY 100 Scan, VARIAN). L'ensemble du protocole de mesure ainsi que la méthode sont détaillés dans une publication récente de notre groupe [12].

3 PREPARATION ET ANALYSE DES ECHANTILLONS

Les acides aminés, Arg, Lys et His ont été achetés chez Sigma Aldrich (France) avec une pureté > 98%, sous forme de chlorhydrate afin d'assurer la protonation de la chaîne latérale. Cette dernière porte le groupement azoté spécifique des acides aminés basiques, à savoir un groupement guanidinium pour Arg, un groupement imidazole pour His et un simple groupement amine pour Lys. La chaîne principale de ces trois acides aminés est un zwitterion. L'ADN plasmidique a été acheté chez PlasmidFactory GmbH & Co. (Allemagne), il s'agit ici de pUC21 (longueur de 3266 paires de bases ; poids moléculaire de $2,13 \times 10^6$ Da) stabilisé par la présence de tampon TE (10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA, soit pH 7,6) à une concentration de $500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. La solution mère est conservée à -20°C , les concentrations des solutions d'ADN préparées pour ce travail ont été contrôlées par spectroscopie UV-Vis, en mesurant l'absorbance à 260 nm et en utilisant $\epsilon_{260} = 5,3 \times 10^7 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ [13]. L'ensemble des solutions a été préparé en utilisant des volumes égaux de chacune des espèces chimiques (ADN et acides aminés), qui une fois mélangés déterminent les concentrations finales attendues ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ pour l'ADN et 1, 10, 100 et 200 mM pour les acides aminés). Des mesures préalables en gel d'électrophorèse montrent que 95% de cet ADN plasmidique se trouve initialement dans la forme surenroulée. Les bandes de gel d'agarose sont imagedées et quantifiées par fluorescence du gel à la longueur d'onde d'excitation de 302 nm en utilisant le système DocTM XR (BioRad) et le logiciel d'analyse spécifique Quantity One (BioRad). Les produits standards nécessaires à ces analyses ont été achetés chez Life Technologies SAS (France). Les paramètres des analyses effectuées en gel d'électrophorèse sont 1% d'agarose dans un tampon TAE à $6.7 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ durant 7 minutes et $5.0 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour 70 minutes. Les échantillons sont imprégnés avec du SYBR® Safe (Life Technologies) ($1\times$ pour le gel et $20\times$ pour l'ADN respectivement). Un traitement statistique permet de déterminer la valeur moyenne des taux de cassures simple (CSB) et double brin (CDB) par plasmide en utilisant les relations suivantes :

$$\text{CSB} = \ln [(1-L)/S] \quad (1)$$

$$\text{CDB} = L/(1-L) \quad (2)$$

où S et L représentent respectivement les fractions (%) détectables de molécules dans l'état topologique surenroulé et linéaire de l'ADN plasmidique [14,15].

4 CONSIDERATIONS PRELIMINAIRES - RADIOLYSE ET CAPTURE DE RADICAUX

Nos expériences d'irradiation étant réalisées entièrement sous atmosphère air, les solutions sont saturées en dioxygène ; typiquement, à saturation, on a $0,25 \text{ mM O}_2$ dissoutes à la température de 25°C [16]. Lors de la radiolyse par les photons X de 1,5 keV, les principales espèces produites (pour des temps supérieurs à 10^{-15} secondes) sont présentées en figure 2.

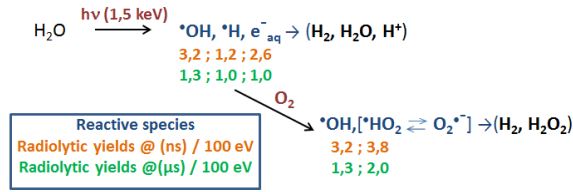


Figure 2. Production of Reactive Oxygen Species by a 1.5 keV USX radiation in water in the presence of molecular oxygen. The radiolytic yields are extracted from [17].

Les rendements radiolytiques sont extraits d'une publication dans laquelle ils ont été estimés pour une large gamme d'énergies d'ions, de photons et d'électrons sur la base de calculs faisant intervenir la diffusion au sein des grappes dans une trace [17]. Le rendement radiolytique le plus élevé correspond au radical hydroxyle (•OH) et aux espèces radicalaires •H et e_{aq}^- . Mais les deux dernières (•H et e_{aq}^-) réagissent sur l'oxygène dissout et forment au cours de la phase physique le couple $\text{•HO}_2 / \text{O}_2^{\bullet-}$ (radicaux peroxyde et superoxyde) qui finalement, après recombinaisons produisent l'hydrogène moléculaire, H_2 et le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 . Pour des temps longs (lorsque la phase chimique est installée, typiquement après 10^{-5} secondes), on est en présence du radical hydroxyle et du peroxyde d'hydrogène, qui sont tous deux des oxydants forts. Mais la durée de vie et/ou la distance moyenne de diffusion de toutes ces espèces dépendent fortement de l'environnement chimique. Il existe en effet des réactions de capture de radicaux ou plus généralement de capture des espèces réactives de l'oxygène (ERO). La capture des EROs est décrite via la capacité de capture σ qui s'exprime en seconde^{-1} [18]. Cette capacité de capture est liée à la constante cinétique k ($\text{L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$) en faisant l'hypothèse d'un processus cinétique régi par la relation 3 :

$$\sigma = k [\text{Capteur}] \quad (3)$$

Il existe des tables de données pour les constantes k , une compilation est disponible en ligne à l'Université de Notre Dame (Notre Dame Radiation Laboratory ; Radiation Chemistry Data Center) pour le radical hydroxyle, •OH , l'électron aqueux, l'anion radical oxyde, •O^- et le radical hydrogène, •H ; ces données correspondent aux données de référence publiées par Buxton et ses collaborateurs [18]. Dans des conditions définies telles que la capacité de capture puisse être calculée sans ambiguïté, il est facile de déterminer le temps de vie d'une ERO ; ce temps τ vaut simplement :

$$\tau = 1/\sigma \quad (4)$$

Ainsi, connaissant les rendements radiolytiques, donc les concentrations d'EROs (au moins initiales), on arrive dans des conditions données à déterminer les durées de vie de ces espèces, dans des cas simples (avec peu d'espèces chimiques en présence). De plus, en faisant l'hypothèse généralement acceptable d'une diffusion brownienne des espèces en présence, il est possible de déterminer à partir des temps de vie moyens, une distance moyenne de diffusion [19], à savoir :

$$\langle x \rangle = 2,26\sqrt{D\tau} \quad (5)$$

La relation 5 est essentiellement équivalente à la distance quadratique moyenne parcourue par une particule en mouvement brownien, à savoir $\langle x^2(t) \rangle = 6D\tau$. Les constantes cinétiques pour la capture du radical hydroxyle par les acides aminés Arg, Lys et His sont respectivement : $k = 3,5 \times 10^9 \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ à $\text{pH} = \sim 7$ [19], $k = 3,5 \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ à $\text{pH} = 6,6$ [20] et $k = 4,8 \times 10^9 \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ à $\text{pH} = 7,5$ [21]. Si l'arginine et l'histidine ont des capacités de captures proches, celle de la lysine est inférieure d'un facteur 10 à ces deux dernières valeurs. Les capteurs de radicaux (ou d'EROs) limitent le champ d'action spatial et temporel de ces espèces réactives. Les travaux de Roots et Okada [19] ont par exemple démontré que le temps de vie moyen du radical $\cdot\text{OH}$ impliqué dans l'endommagement de l'ADN dans des cellules de mammifères est de $3,7 \cdot 10^{-9} \text{ s}$ et sa distance moyenne de diffusion vaut environ 6 nm. La relation 4 permet alors de considérer qu'une concentration de 10 mM d'arginine ou d'histidine est suffisante pour mimer les conditions physiologiques, pour la lysine il faudra en revanche au moins une concentration de 100 mM pour mimer l'environnement cellulaire. Il a été suggéré par ailleurs qu'avec une concentration de 200 mM le capteur de radicaux hydroxyle qui a une constante cinétique $k = 1,5 \times 10^9 \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ [22] ; à savoir le tampon chimique Tris (ou trishydroxyméthylaminométhane), mime efficacement le milieu cellulaire [24]. Nous explorerons ici la gamme de concentrations de capteurs de radicaux (Arg, His, Lys) suivante 1, 10, 100, 200 mM afin d'englober les conditions de protection équivalentes au milieu cellulaire. Des concentrations plus élevées présenteraient le risque de générer dans la solution de trop nombreux radicaux issus de l'interaction directe du rayonnement X primaire avec les capteurs de radicaux qui auraient pour effet de rendre trop complexe l'analyse ultérieure [25]. Lors de nos expériences, les irradiations sont effectuées sur des durées variant de 0 à 40 minutes (0 - 89,6 Gy) en atmosphère humide et dans l'air à 295K, ainsi le renouvellement en dioxygène est permanent, cela d'autant plus que les solutions sont agitées durant l'exposition aux rayonnements Al K α . Ainsi, les espèces primaires de la radiolyse de l'eau qui sont produites en permanence ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{H}$ et e_{aq}^-), lorsqu'elles ne réagissent pas rapidement, se transforment, pour $\cdot\text{H}$ et e_{aq}^- en présence de dioxygène en $\cdot\text{HO}_2$ / $\text{O}_2\cdot^-$ pour donner finalement du peroxyde d'hydrogène (Fig. 2). Il apparaît donc que l'ensemble de ces espèces réactives ne pourra réagir que durant des temps très courts, ou ce qui est équivalent sur des distances de diffusion très faibles. Comme les électrons secondaires générés par la raie K α de l'aluminium se propagent eux-aussi le long de trajectoires erratiques de faible longueur (typiquement 30 nm ou moins), les volumes d'interactions sont faibles et donc les densités d'ionisations sont fortes. Fulford et ses collaborateurs ont par exemple montré qu'un temps de vie du radical hydroxyle de l'ordre de 10^{-6} seconde est requis pour que la majorité de ces radicaux distribués de façon homogène interagissent indifféremment avec l'ADN plasmidique (dans leur cas ; pUC18 avec 2686 paires de bases et une concentration de $33 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$) ou avec le capteur de radicaux présent [26]. Un tel temps de vie correspond typiquement à des concentrations d'arginine ou d'histidine de l'ordre de 0,25 mM et de 2,5 mM pour la lysine. Nous travaillons avec des ADN plasmidiques pUC21 (3266 paires de bases) à une concentration constante de $10 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$, quant aux concentrations des capteurs de radicaux, elles évoluent de 1 à 200 mM. On peut donc affirmer que dans nos expériences, c'est l'effet des capteurs de radicaux qui est privilégié.

5 RESULTATS.

Les irradiations en présence d'arginine ont fait l'objet d'une étude récente [12] qui a notamment permis de valider le protocole expérimental. Le comportement particulier observé avec l'arginine, à savoir des taux d'endommagement de l'ADN (cassures simple brin) bien plus élevés qu'attendus, et notamment plus élevés d'un facteur ≈ 5 par rapport à un capteur ayant une capacité de capture équivalente (le tampon Tris), est expliqué par la spécificité de l'arginine de se lier non-seulement aux groupements phosphate de l'ADN mais aussi et surtout à l'intérieur de la double hélice, en particulier sur la base G (guanine). Il apparaît donc pertinent de mesurer les taux de cassures en présence des deux autres acides aminés basiques, à savoir la lysine et l'histidine, avec des capacités de captures équivalentes. Pour cela, des solutions d'ADN plasmidique pUC21 en présence de concentrations égales à 1, 10, 100 et 200 mM de ces acides aminés sont exposées à des doses croissantes de rayons X ultra mous (Al $K\alpha$ à 1,5 keV) dans la gamme 0 – 90 Gy. En figure 3 nous présentons l'évolution du taux de cassures simple brin (SSB.plasmide⁻¹, relation 1) du pUC21 en fonction de la dose en présence d'histidine et de lysine ; ces données résultent des analyses d'électrophorèse en gel d'agarose qui fournissent les pourcentages des formes surenroulée, circulaire et linéaire après exposition aux rayonnements (relations 1 et 2).

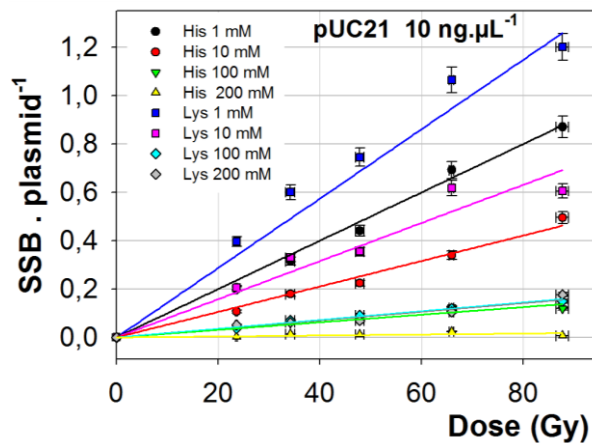


Figure 3. Single Strand Breaks (SSB) per plasmid as a function of delivered dose in aqueous solutions of pUC21 plasmid DNA in the presence of various concentrations of the hydroxyl radical scavengers: Histidine and Lysine.

Des mesures de doses répétées antérieurement à cette expérience ont permis d'évaluer l'incertitude sur la dose en utilisant la déviation maximale par rapport à la valeur moyenne obtenue suite à au moins trois mesures pour chaque dose utilisée. D'une façon équivalente, un ensemble de mesures a mis en évidence que sur trois séries de mesures répétées avec toutes les doses utilisées, la déviation du % de formes surenroulée et circulaire par rapport à la valeur moyenne constituait au maximum 5% de celle-ci. Nous majorons donc l'incertitude expérimentale en prenant des barres d'erreur égales à 5% de la valeur du % de surenroulement mesuré par gel d'électrophorèse.

Les cassures double brin (apparition de la forme linéaire de l'ADN) n'ont été observées qu'au-dessus de 40 Gy et uniquement dans les conditions de faible concentration en acides aminés (1 mM). Dans tous les autres cas, la forme linéaire est absente des résultats d'électrophorèse sur gel d'agarose, ce qui montre bien qu'il y a une capture efficace des radicaux qui se traduit par une probabilité tendant vers zéro d'avoir deux cassures simples à une distance inférieure à 10 paires de bases dans l'ADN (définition de la cassure double). Il apparaît clairement en figure 3 que la concentration de 200 mM en His conduit à une très forte protection de l'ADN par capture efficace du radical hydroxyle. Cela semble donc, *a priori*, indiquer une participation majoritaire du radical hydroxyle à l'endommagement de l'ADN et donc une participation très faible du couple $\cdot\text{HO}_2 / \text{O}_2\cdot$ et de son produit de transformation finale : H_2O_2 . Il est à noter que l'endommagement direct par le peroxyde d'hydrogène *in vivo* ou *in vitro* entraînant une cassure d'un brin de l'ADN n'est pas un mécanisme admis ; pour qu'un endommagement par cassure des brins de l'ADN soit possible avec le peroxyde d'hydrogène, cela requiert la présence d'ions métalliques [27]. Ces derniers peuvent en effet conduire à l'apparition d'une réaction de type Fenton où le peroxyde d'hydrogène est transformé en radical hydroxyle qui est à son tour responsable de la rupture de l'hélice de l'ADN. Lorsque les mécanismes de type Fenton sont minimisés *in vitro*, les dégâts de type radicalaire sont eux-aussi minimisés, seuls des modifications (oxydation) de bases de l'ADN sont observées [28] mais ces dernières ne sont pas quantifiables par électrophorèse sur gel d'agarose. Nous reviendrons sur ce point dans la discussion qui suit.

L'extraction des pentes des droites présentées en figure 3 donne les valeurs des taux de cassure simple brin exprimées en $\text{CSB} \cdot \text{plasmide}^{-1} \cdot \text{Gy}^{-1}$. Nous avons réalisé ce traitement sur l'ensemble des données relatives à la fois à la capture de radicaux par l'histidine et par la lysine aux différentes concentrations utilisées. Les résultats sont présentés dans le tableau 1. Les écarts-type figurant dans ce tableau proviennent directement de l'analyse par régression linéaire de l'ensemble de données expérimentales (voir par exemple fig. 3) à l'aide du logiciel SigmaPlot™.

Ces données sont représentées graphiquement en figure 4. Sur cette figure, nous avons présenté aussi les valeurs expérimentales obtenues dans un travail antérieur [12] en cours d'édition et qui sont relatives aux taux de cassures simple. $\text{plasmide}^{-1} \cdot \text{Gy}^{-1}$ du même ADN plasmidique en présence de concentrations variables d'arginine et du tampon Tris. Ces deux dernières espèces sont également des capteurs efficaces du radical hydroxyle avec des capacités de capture du même ordre de grandeur (voir plus haut pour les valeurs des constantes k). On remarque que si les capacités de capture des espèces utilisées respectent l'ordre suivant $\sigma_{\text{His}} > \sigma_{\text{Arg}} > \sigma_{\text{Tris}} > \sigma_{\text{Lys}}$ ($\sigma_{\text{Lys}} \approx 0,1 \times \sigma_{\text{Arg}}$), les rendements de cassures simples par plasmide et par gray, suivent l'ordre $\chi_{\text{His}} > \chi_{\text{Arg}} > \chi_{\text{Lys}} > \chi_{\text{Tris}}$. L'histidine qui devrait capter le plus efficacement le radical hydroxyle apparaît comme étant l'espèce dont la présence engendre le maximum de dégâts à l'ADN lors de la radiolyse en solution oxygénée.

Table 1. Experimental yields for single strand breaks per plasmid and per Gray determined for various scavenging capacities of Histidine and Lysine. The linear regression slopes and coefficient of determination extracted from figure 3 as well as their respective standard deviations at a given concentration of the amino acids are presented.

Histidine			
Concentration (mM)	CSB . plasmide ⁻¹ . Gy ⁻¹	R ²	Standard deviation
1	0,0102	0,99	0,0005
10	0,0053	0,98	0,0003
100	0,0016	0,93	0,0002
200	0,0013	0,81	0,0001
Lysine			
Concentration (mM)	CSB . plasmide ⁻¹ . Gy ⁻¹	R ²	Standard deviation
1	0,0145	0,95	0,0014
10	0,0077	0,94	0,0009
100	0,0018	0,96	0,0002
200	0,0018	0,95	0,0002

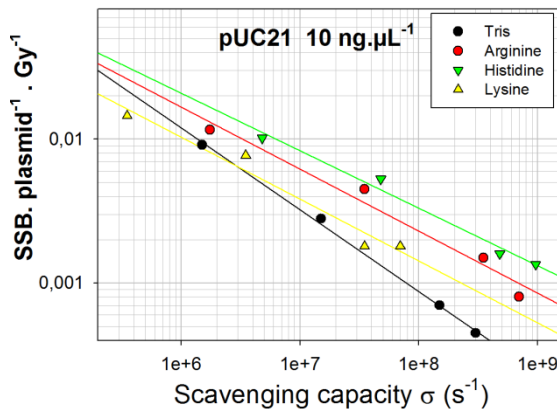


Figure 4. Yields of Single Strand Breaks (SSB) expressed per plasmid and per Gray as a function of the scavenging capacity of Tris, Arg, His and Lys in aqueous solutions of 10 ng.μL⁻¹ pUC21 plasmid DNA. The error bars corresponding to the standard deviations (table 1) are too small to be shown; the size of the dots is scaled so that they match their order of magnitude. Color lines correspond to linear regressions that essentially stand to guide the eye.

6 DISCUSSION.

Si seules les capacités de captures des espèces utilisées dictaient l'ordre des rendements de cassures simples de l'ADN, à concentrations égales des capteurs de radicaux, nous devrions trouver $\chi_{Lys} > \chi_{Tris} > \chi_{Arg} > \chi_{His}$, puisque l'on a $k_{Lys} < k_{Tris} < k_{Arg} < k_{His}$, or nous trouvons $\chi_{His} > \chi_{Arg} > \chi_{Lys} > \chi_{Tris}$. Ainsi, il apparaît que les voies de capture du radical hydroxyle ne sont peut-être pas les seules à envisager. Le maximum de dégâts est observé en présence d'histidine, ce qui est surprenant. En effet, nous avons trouvé que l'arginine produit un effet quasi-semblable dans des conditions identiques (Figure 4) et cela a été expliqué [12] par un effet de « proximité » ou de dégâts collatéraux. A noter que cet effet a été confirmé avec trois types d'ADN plasmidiques de longueurs différentes. Nous suggérons que l'arginine, qui a une capacité de liaison sur et dans la double hélice très élevée, capture de façon effective le radical $\cdot OH$ mais transfère ensuite ce radical sur l'ADN lorsque la capture a lieu sur une molécule d'arginine complexée à l'ADN. Si l'on consulte les données très détaillées d'interactions à l'échelle atomique des différents acides aminés avec l'ADN obtenues à partir de l'analyse fine des structures de 129 complexes ADN/protéine [29], il apparaît que sur les trois acides aminés utilisés dans ce travail, en situation biologique, c'est bien Arg qui est majoritairement lié à l'ADN, suivi de Lys et enfin de His. Le raisonnement proposé pour Arg et qui peut sans doute être étendu à Lys ne semble pas pertinent pour His, puisque cette dernière espèce interagit relativement peu avec l'ADN. Une synthèse des différents modes d'interactions d'Arg, Lys et His avec les groupements spécifiques de la molécule d'ADN est présentée dans le tableau 2.

Table 2. Distribution of hydrogen bonds, Vander Waals contacts and water-mediated bonds according to the participating amino acids of Arg, Lys, His and DNA component. Data are extracted from [29]

Amino acids	DNA bases			DNA strands			Total	%
	Cytosine	Thymine	Adenine	Guanine	Ribose	Phosphate		
H-bonds	24	8	19	98	8	218	375	65
Arg	9	6	4	30	3	109	165	28
Lys	-	1	1	12	-	26	40	7
His	Van der Waals bonds							
Arg	14	31	14	14	87	238	398	42
Lys	4	12	8	17	79	310	430	45
His	9	12	-	1	27	80	129	13
H2O Bridges								
Arg	8	15	11	27	11	113	185	60
Lys	2	11	8	17	6	59	103	33
His	2	1	1	2	-	17	23	7

Il est clair que l'arginine est l'acide aminé basique qui présente les plus importantes capacités de « fixation » sur l'ADN, que ce soit par liaison hydrogène, de Van der Waals ou par pontage utilisant les molécules d'eau. C'est la lysine qui occupe la deuxième position en termes de « fixation » sur l'ADN, elle a même une capacité de fixation par liaisons de Van de Waals légèrement supérieure à Arg. Ces deux acides aminés interagissent très préférentiellement avec les groupements phosphates et dans une moindre proportion mais de façon préférentielle avec la base G. En

termes de pourcentages totaux, l'histidine ne représente respectivement que 7%, 13% et 7% de l'ensemble des liaisons hydrogène, de Van der Waals ou des pontages utilisant les molécules d'eau. On peut donc considérer que l'histidine est faiblement distribuée sur les sites fonctionnels de l'ADN, ce qui implique une faible probabilité de transmission de radical consécutivement à la capture, sauf si les radicaux créés sur l'histidine ont une durée de vie suffisamment grande pour diffuser jusqu'à la macromolécule d'ADN. Une étude récente de la radiolyse des acides aminés basiques en solution aqueuse basée sur des analyses fines de spectrométrie de masse a mis en évidence la nature de leurs produits de décomposition suite à l'exposition de solutions aqueuses aux rayonnements gamma du ^{137}Cs . Dans cette étude [30], ce sont les effets de l'oxydation par le radical hydroxyle qui ont été étudiés. De manière intéressante, il apparaît que l'histidine est l'acide aminé basique dont les produits de radiolyse sont les plus nombreux et variés, contrairement à la lysine et à l'arginine. Cette variété de produits d'oxydation radiolytique s'explique par l'ouverture du cycle imidazole qui peut entraîner la formation de nombreux sous-produits qui ne sont à ce jour pas tous identifiés. Des études de radiolyse pulsée combinées à des analyses spectroscopiques ont en outre mis en évidence la formation de radicaux libres sur l'histidine et sur le cycle imidazole [31]. A ce stade il apparaît cependant difficile d'expliquer pourquoi la présence d'histidine conduit à un taux d'endommagement de l'ADN par cassures simples anormalement élevé, cela d'autant plus que cet acide aminé est le moins enclin à être localisé sur ou dans la double hélice. Cette dernière assertion doit cependant être modulée car nous avons utilisé un sel d'histidine (Chlorhydrate de L-histidine qui en solution aqueuse se dissocie en anion et cation ; la charge positive du cation étant localisée sur le cycle imidazole, en bout de chaîne latérale). La figure 2 indique que le peroxyde d'hydrogène est produit en quantités importantes lors de la radiolyse des solutions aqueuses oxygénées, ce qui est notre cas. Bien que ce peroxyde ne soit pas capable de casser un brin d'ADN à lui seul, la littérature rapporte des exemples de synergie entre le peroxyde d'hydrogène et l'histidine qui conduisent à une dégradation accrue de l'ADN *in vivo* [32]. Des études *in vitro* ont également été menées sur ce cas [33] mais elles montrent clairement que l'endommagement amplifié de l'ADN en présence d'histidine ne se produit qu'en présence d'un métal de transition via un mécanisme de type Fenton. Dans ce travail il est montré que la valeur optimale du rapport $[\text{Fe(II)}] / [\text{Histidine}]$ est 10^{-3} . Il n'y a pas de raison de trouver dans nos solutions des quantités importantes de métaux de transition, seul l'agitateur est en titane mais ce métal est oxydé en surface et présente une barrière d'oxyde qui est réputée être imperméable à l'oxygène moléculaire, on imagine donc mal une réactivité de ce métal avec les espèces en solution. De plus, l'oxyde de titane est TiO_4 , soit donc le Ti (IV), qui ne peut pas être oxydé dans une réaction de type Fenton. Tachon et ses collaborateurs n'excluent pas la possibilité d'endommagement de l'ADN par un radical carboné de l'histidine. Ils citent également une étude [34] qui se focalise sur la formation d'un produit d'oxydation radiolytique des protéines : la 2-Oxo-histidine et suggèrent que cette molécule serait un bon candidat pour expliquer les dégâts oxydatifs à l'ADN médiés par l'histidine. Il se trouve que ce composé est l'une des espèces majoritairement créée lors de l'action du radical hydroxyle sur l'histidine en solution aqueuse [29]. Enfin, Milligan et ses collaborateurs ont reporté [35] que parmi les 6 acides aminés les plus réducteurs, à savoir cysteine, cystine, histidine, methionine, tryptophane et tyrosine, contrairement à tous les autres, seuls la cystine et l'histidine ne présentent pas de capacité à réparer les radicaux guanyls (générés par les effets directs sur la base G de l'ADN).

7 CONCLUSION.

Les taux de cassures simple brin anormalement élevés observés avec les trois acides aminés basiques Arg, Lys et His, comparativement à ceux observés avec le tampon Tris dans des conditions de concentrations initiales égales sont expliquées pour Arg et Lys par leur forte propension à se lier directement dans et sur la macromolécule d'ADN. Cet effet de proximité se traduirait par le transfert du radical créé sur l'acide aminé suite à la capture d'un radical hydroxyle directement vers la macromolécule d'ADN. Dans le cas de l'histidine, les taux de cassure mesurés s'avèrent être encore plus élevés et sont en désaccord avec la prévision faite sur la base de sa forte capacité de capture et en prenant en compte sa faible propension à être localisé dans ou sur la double hélice. Cependant, cet acide aminé est celui qui présente les voies de décomposition radio-oxydative les plus diverses avec des sous-produits radicalaires ou non pour certains non-encore identifiés. De plus, l'utilisation dans ce travail d'un chlorhydrate d'histidine conduisant à produire en solution un site imidazole chargé positivement doit augmenter la probabilité de présence de l'histidine au moins à proximité des groupements phosphates anioniques de la double hélice de l'ADN. Nous allons vérifier si cette hypothèse est acceptable en utilisant une histidine non chargée dans les conditions de pH de nos expériences, c'est-à-dire la molécule pure et pas un sel.

Ce travail a mis en évidence le rôle inattendu des capteurs de radicaux Arg, Lys et His qui sont les espèces chimiques les plus exposés à la surface des protéines de type histones et qui entrent dans la composition de la chromatine nucléaire des cellules biologiques. Bien entendu, les histones sont composées de polypeptides de haut poids moléculaires et il apparaît donc pertinent de poursuivre ce type d'étude en utilisant des molécules de type di- ou tri-peptide pour aller ensuite vers des assemblages plus complexes.

REMERCIEMENTS.

Nous remercions le gouvernement Irakien d'avoir financé la thèse de doctorat de Monsieur T. T. Khakil.

REFERENCES.

- 1 IAEA (2010) Training Course Series 42, Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students. Vienna, International Atomic Energy Agency, 13-32.
- 2 C. R. Hunt et al., Histone Modifications and DNA Double-Strand Break Repair after Exposure to Ionizing Radiations, *Radiation Research* **179**, 383–392, (2013)
- 3 V. A. Sharpatyi, Z. Gennady, Dans: Radiation chemistry of biopolymers. CRC Press, Taylor and Francis Group, (2006).
- 4 O. Boulanouar, et al., Absolute cross section for loss of supercoiled topology induced by 10 eV electrons in highly uniform /DNA/1,3-diaminopropane films deposited on highly ordered pyrolytic graphite. *J. Chem. Phys.* **139**(5), 055104, (2013)
- 5 J. P. Freyer et al., Measurement of the G-value for 1.5 keV X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* **56**(6):885–892, (1989)
- 6 S. Uehara, H. Nikjoo, Monte Carlo simulation of water radiolysis for low-energy charged particles. *J. Radiat. Res.* **47**(1), 69–81, (2006)

- 7 B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, New York: Garland Science, (2002)
- 8 I. Zs.-Nagy, R.A. Floyd, Hydroxyl free radical reactions with amino acids and proteins studied by electron spin resonance spectroscopy and spin-trapping. *Biochimica et Biophysica Acta*, **790**, 238-250, (1984)
- 9 N. Ounoughi, Beam characterization of a lab bench cold cathode ultra-soft X-ray generator, *NIM B*, **305**, 61-66, (2013)
- 10 J.E. Groetz, Conception and realization of a parallel-plate free-air ionization chamber for the absolute dosimetry of an ultrasoft X-ray beam, *Review of Scientific Instruments*, **85**, 83304, (2014)
- 11 N. Ounoughi et al., Spatial Distribution of Air Kerma Rate and Impact of Accelerating Voltage on the Quality of an Ultra Soft X-ray Beam generated by a Cold Cathode Tube in Air. *Radiation Measurements*, **80**, 23-28, (2015)
- 12 M. Souici et al., DNA Strand Break Yield dependence on Tris and Arginine Scavenger concentrations under Ultra-Soft X-ray irradiation: the contribution of Secondary Arginine Radicals. *Accepté dans Radiation and Environmental Biophysics*, (2015)
- 13 K.L. Manchester, Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. *Biotechniques*, **20**(6), 968-970, (1996)
- 14 M. Spothem-Maurizot et al., DNA radiolysis by fast neutrons. *Int. J. Radiat. Biol.* **57**(2), 301-313, (1990)
- 15 M. Spothem-Maurizot et al., DNA radiolysis by fast neutrons. II. Oxygen, thiols and ionic strength effects. *Int. J. Radiat. Biol.* **59**(6), 1313-1324, (1990)
- 16 C. Kemker "Dissolved Oxygen." *Fundamentals of Environmental Measurements*. Fondriest Environmental, (2013), Inc. <http://www.fondriest.com/environmental-Measurements/parameters/water-quality/dissolved-oxygen/>
- 17 H. Yamaguchi, Y. Uchihori, N. Yasuda, M. Takada and H. Kitamura, Estimation of Yields of OH Radicals in Water Irradiated by Ionizing Radiation. *J. Radiat. Res.* **46**, 333-34, (2005)
- 18 G.V. Buxton et al., Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}/\bullet\text{O}^-$) in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **17**, 513-886, (1988)
<https://www3.nd.edu/~ndrlrcdc/Compilations/INTRO.HTM>
- 19 R. Roots, S. Okada, Estimation of Life Times and Diffusion Distances of Radicals Involved in X-Ray-Induced DNA Strand Breaks or Killing of Mammalian Cells. *Radiation Research* **64**, 306-320, (1975)
- 20 G. Scholes, P. Shaw, R.L. Willson, M. Ebert, Dans: *Pulse Radiolysis*, Ebert, M.; Keene, J.P.; Swallow, A.J.; Baxendale, J.H. (eds.), Academic Press, New York, 151-64 (1965).
- 21 T. Masuda, S. Nakano, M. J. Kondo, Rate constants for the reactions of OH radicals with the enzyme proteins as determined by the p-nitrosodimethylaniline method. *J. Radiat. Res.* **14**, 339-345 (1973)
- 22 N. Motohashi and Y. Saito, Competitive measurement of rate constants for hydroxyl radical reactions using radiolytic hydroxylation of benzoate. *Chem. Pharm. Bull.* **41**, 1842-1845. (1993)
- 23 M. Hicks, J. M. Gebicki, Rate constants for reaction of hydroxyl radicals with Tris, Tricine and Hepes buffers. *FEBS Letters*, **199**(1), 92-94 (1986)
- 24 P.S. Hodgkins, M.P. Fairman and P. O'Neill, Rejoining of Gamma-Radiation-Induced Single-Strand Breaks in Plasmid DNA by Human Cell Extracts: Dependence on the Concentration of the Hydroxyl Radical Scavenger, Tris. *Radiation Research* **145**, 24-30 (1996)

- 25 J. R. Milligan, J. A. Aguilera, J. F. Ward, Variation of single-strand break yield with scavenger concentration for plasmid DNA irradiated in aqueous solution. *Radiation Research* **133**(2),151–157 (1993)
- 26 J. Fulford, P. Bonner, D.T. Goodhead, M.A. Hill, P. O'Neill, Experimental Determination of the Dependence of OH Radical Yield on Photon Energy: A Comparison with Theoretical Simulations. *J. Phys. Chem. A* **103**,11345–11349 (1999)
- 27 J. A. Imlay, S. M. Chin, S. Linn, Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*, **240** (4852), 640-642 (1988)
- 28 J.F. Mouret, M. Polverelli, F. Sarrazini, and J. Cadet, Ionic and radical oxidations of DNA by hydrogen peroxide, *Chem.-Biol. Interactions*, **77**, 187-201 (1991)
- 29 N. M. Luscombe, R. A. Laskowski, J. M. Thornton, Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Research*, **29**, 13, 2860-2874 (2001)
- 30 G. Xu, K.Takamoto, and M. R. Chance, Radiolytic Modification of Basic Amino Acid Residues in Peptides: Probes for Examining Protein-Protein Interactions. *Anal. Chem.* **75**, 6995-7007 (2003)
- 31 S. Navaratnam and B. J. Parsons, Reduction potential of histidine free radicals : a pulse radiolysis study. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **94**(17), 2577-2581 (1998)
- 32 O. Cantoni, P. Sestili, G. Brandi, F. Cattabeni, The L-histidine-mediated enhancement of hydrogen peroxide-induced cytotoxicity is a general response in cultured mammalian cell lines and is always associated with the formation of DNA double strand breaks, *FEBS Letters*, **353**, 75-78 (1994)
- 33 P. Tachon, A. Deflandre and P.U. Giacomoni, Modulation by L-histidine of H2O2-mediated damage of cellular and isolated DNA. *Carcinogenesis*, **15**(8),1621-1626 (1994)
- 34 K. Uchida and S. Kawakishi, 2-Oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins. *FEBS Lett.*, **332**, 208-210 (1993)
- 35 J.R. Milligan, J.A. Aguilera, A. Ly, N.Q.Tran, O. Hoang and J. F., Ward Repair of oxidative DNA damage by amino acids. *Nucleic Acids Research*, **31**(21), 6258-6263 (2003)