

Étude des dommages induits dans l'ADN par irradiation laser X-UV à 21.2 nm

K. Cassou¹, D. Ros¹, S. Kazamias¹, A. Klisnick¹, G. Jamelot¹, O. Guilbaud¹,
B. Rus², M. Kozlová², J. Polan², A.R. Präg², M. Stupka², G. Eot-Houllier³,
E. Sage³, M. Begusová⁴, V. Stísová⁴, M.-A.H. du Penhoat⁵, A. Touati⁵
et A. Chétioui⁵

¹ *Laboratoire d'Interaction du Rayonnement X avec la Matière, LIXAM, Bât. 350, CNRS UMR 8624, Campus de l'Université Paris-Sud XI, 91400 Orsay, France*

² *Department of X-ray Laser/PALS Centre, Institute of Physics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Na Slovance 2, 18221 Prague 8, Czech Republic*

³ *Laboratoire de Génotoxicologie et Cycle Cellulaire, Institut Curie, CNRS UMR 2027, Campus de l'Université Paris-Sud XI, 91400 Orsay, France*

⁴ *Nuclear Physics Institute, Academy of Sciences of the Czech Republic, Na Truhlárce 39/64, 18086 Prague 8, Czech Republic*

⁵ *Groupe de Physique des Solides, Universités Paris VI-VII, CNRS UMR 7588, CEA, France*

Abstract. We report the preliminary result of the application of the collisional Ne-like soft x-ray laser as radiation source to induce DNA damage. The goal of this experiment was a test bed study of the damage yields induced by soft x-ray radiation in dried plasmid DNA sample. The saturated Ne-like soft x-ray laser available at the PALS facility, delivering several millijoules in a single 100 ps pulse at 21.2 nm was used to irradiate two different plasmids: pSP189 and pBS. The study is centered on the dose effect leading to single and double strand break in DNA.

1. INTRODUCTION

Depuis le début de leur développement, les lasers X-UV ont été utilisés pour diverses applications : interférométrie de plasma créé par laser intense, imagerie, microscopie de surface [1] et également comme source d'irradiation [2], [3]. Le laser X-UV collisionnel à 21.2 nm développé au PALS1 [4] est utilisé dans nos expériences comme source d'irradiation. Un des axes majeurs de la radiobiologie est de comprendre les effets biologiques des rayonnements ionisants sur les biomolécules et les mécanismes physiques mis en jeu dans les processus réactionnels. Les rayonnements ionisants engendrent dans l'ADN des dommages ayant des répercussions létales sur la cellule. Le modèle K [5] attribue un rôle prépondérant dans la létalité des cellules aux ionisations en couches internes des atomes de l'ADN ou des molécules d'eau voisines (couches L et K du phosphore et couche K du carbone, de l'azote, et de l'oxygène), bien que ces ionisations ne représentent que quelques pour mille des événements d'interaction des électrons, des photons ou des ions. Une série d'expériences visant à déterminer l'efficacité d'une ionisation en couche interne en termes de létalité, induction de cassures "double brin d'ADN" réputées létales, remaniements chromosomiques immédiats et retardés a été effectuée au LURE [6]. Le présent travail de collaboration visait à compléter les précédentes investigations en se plaçant à une énergie en dessous des seuils d'ionisation en couche interne des atomes constituant l'ADN. Nous nous sommes principalement intéressés à l'effet de dose sur la formation de simples et doubles cassures des brins de la molécule d'ADN.

2. LE LASER X-UV DÉVELOPPÉ AU PALS

Le laser X-UV qui fonctionne au PALS est basé sur le schéma de pompage collisionnel “Quasy-Steady-State” utilisant les ions néonoïdes du zinc émettant à 21.2 nm [7]. Le milieu amplificateur est une colonne de plasma de 3 cm de long produit par une pré-impulsion laser et une impulsion principale laser d’énergies respectives de 3 J en 10 ns et 500 J en 450 ps à 1.315 μm délivrées par ASTERIX IV avec un taux de répétition de 20 minutes. Pour générer un plasma avec des gradients réduits de densité électronique dans la direction transverse, la ligne focale de l’impulsion laser principale d’une largeur de 130 μm est placée dans la partie supérieure de la ligne focale plus large de la pré-impulsion laser. L’émission laser X-UV émergente est réinjectée dans le plasma grâce à un dispositif de demi-cavité. Le faisceau laser X-UV est émis avec une divergence typique de 3.5×5.5 mrad. L’énergie atteint quelques millijoules en une impulsion d’une durée de 90 ± 10 ps. C’est actuellement une des sources laser X-UV les plus brillantes. La qualité du faisceau produit en fait une source adaptée à de nombreuses applications.

3. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

L’échantillon de plasmide est placé à 1370 mm de la sortie du milieu amplificateur. Le faisceau laser X-UV est filtré par des filtres d’aluminium (1%, 10%, 50%), puis réfléchi par un miroir multicouche Mo:Si à 45° vers le porte échantillon comme le montre la figure (voir Fig. 1). Le porte échantillon peut accueillir trois échantillons et un échantillon témoin. La taille du faisceau X-UV sur l’échantillon est de 4.5×7.5 mm.



Figure 1. Schéma expérimental.

Les plasmides sont déposés sur une lame de verre de 1cm^2 . On dépose $4\mu\text{L}$ de solution contenant $10\mu\text{g}$ de plasmide. Le dépôt de plasmide est séché pendant 10-15 minutes à l’air. Le rayon du dépôt est de 1.5 mm. On peut estimer que dans un environnement à sec et sous vide, les molécules d’ADN, sont entourées d’une couche d’eau constituée d’environ cinq molécules d’eau par nucléotide [8].

Le profil radial de l’échantillon nous montre que le dépôt a une épaisseur variant d’environ 600 nm à 1200 nm présente un profil symétrique (voir Fig. 2). Les plasmides utilisés pour cette expérience sont le plasmide BlueScript (pBS) et le plasmide pSP189. Le pBS (2961 paires de bases) a la particularité d’avoir un fort degré d’enroulement. Ce plasmide a déjà été utilisé pour observer les lésions produites par des rayonnements plus énergétiques et des faisceaux d’ions lourds [9], [10]. Le pSP189 (4960 paires de bases) plus lâche est plus sensible au rayonnement ionisant. L’irradiation se fait sous vide (1×10^{-5} mbar). La survie d’un échantillon sous vide étant évaluée à 60 minutes, un échantillon peut recevoir au maximum 3 tirs. Après l’irradiation, les échantillons plasmides irradiés et le témoin non-irradié sont remis en solutions dans $20\mu\text{L}$ d’eau distillée et conservés à -18°C . La détermination de la fraction de molécules d’ADN simplement et doublement cassées se fait par électrophorèse sur gel d’agarose. Une cassure simple brin (CSB) change la forme de la molécule

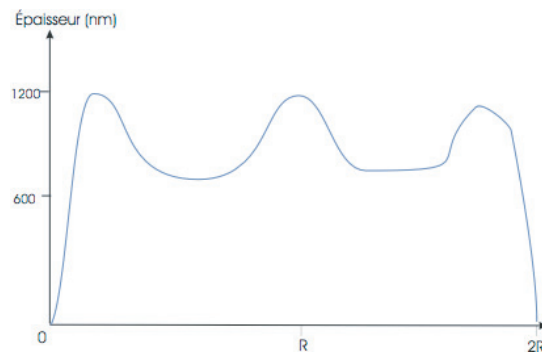


Figure 2. Allure du profil suivant le diamètre du dépôt de plasmide.

d'ADN (surenroulée), en une forme relâchée (circulaire) et une cassure double brin (CDB), en une forme linéaire. Cette technique permet la séparation des trois formes de l'ADN après l'irradiation. Les molécules possédant des géométries différentes et migrent à des vitesses différentes dans un gel poreux sous l'effet d'un champ électrique. Le gel contient du bromure d'éthylène qui est un intercalant de l'ADN, et permet ainsi de visualiser les molécules d'ADN sous UV. La quantification des trois formes d'ADN plasmidiques présentes dans le gel permet de calculer le nombre de CSB et CDB par plasmide.

4. DISCUSSION

Une analyse préliminaire des résultats obtenus, révèle des cassures simple brins (CSB) dans le pSP189 et le pBS, et des cassures double brins (CDB) dans le pSP189.

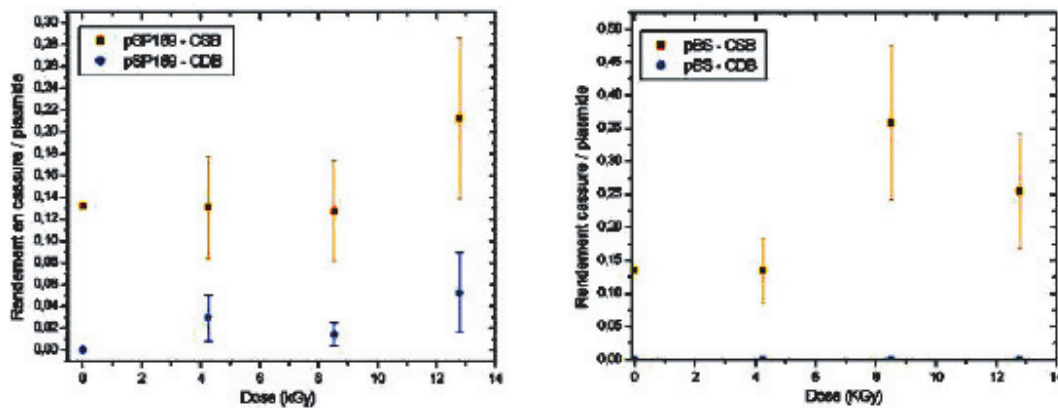


Figure 3. a) Rendement CSB, CDB par plasmide pSP189. b) Rendement CSB, CDB plasmide de pBS.

On remarque une augmentation des CSBs pour les deux plasmides pour la dose la plus élevée 12.8 kGy (Fig. 3). Le rendement de CDB par plasmides est quatre fois inférieur au rendement de CSB pour le pSP189. Les conditions de fonctionnement du laser ASTERIX IV pompant le laser X-UV n'étant pas idéales, nous n'avons pas pu d'atteindre des énergies supérieures à 0.5 mJ et par conséquent les doses reçues par les échantillons sont faibles. En effet, le calcul de la dose reçue par l'échantillon irradié prend en compte, le filtre utilisé, la réflectivité du miroir, le rapport de la taille du faisceau par rapport

à la taille de l'échantillon et le nombre de photons. La dose en Gray est ainsi donnée par la formule suivante :

$$D_0(\text{Gy}) = 1,6 \cdot 10^{22} \left(\frac{\mu}{\rho} \right)_{\text{plasm}} \cdot E_0 \cdot \frac{N}{S}$$

avec μ/ρ le coefficient d'absorption d'énergie par unité de masse, E_0 l'énergie des photons, et N/S le nombre de photons par unité de surface. L'absorption du rayonnement X-UV se fait dans les premiers 100 nm du dépôt, il en résulte qu'environ un sixième des plasmides est affecté. L'énergie des photons X-UV (58.5 eV) est supérieure aux seuils estimés par des études théoriques [11], respectivement de 17 eV et 50 eV pour l'induction de CSB et CDB, tout en restant inférieure à celle des potentiels d'ionisations des atomes constituant l'ADN [12].

5. CONCLUSION

Cette étude préliminaire nous encourage à poursuivre l'induction de dommage dans des plasmides d'ADN avec le laser X-UV. Nous envisageons de continuer cette étude avec un plus large jeu de paramètres: une plus grande variation de la dose, le débit de dose (en utilisant des laser X-UV transitoire à plus courtes durées d'impulsions [13]), l'intensité de l'irradiation (en focalisant le faisceau laser X-UV) et la longueur d'onde pour se placer de part et d'autre des seuils d'ionisation et approfondir l'étude du modèle K. Certains aspects techniques comme un dépôt de plasmides plus mince sont à envisager pour une analyse quantitative plus fine. Nous nous sommes intéressés ici aux dommages créés par le rayonnement laser X-UV sur les brins de l'ADN, l'analyse pourrait de plus être étendue aux dommages créés dans les bases de la molécule d'ADN, ainsi qu'à leurs réparabilités.

Remerciement

Cette étude a été soutenue par une bourse européenne Marie Curie.

Bibliographie

- [1] A. Klisnick, et al., Meas. Sci. Technol. **12**, 1813-1817, 2001.
- [2] D. Ros, et al., LULI report 2001, **C8**.
- [3] P. Jaeglé, et al., J. App. Phys. **81**, 2406-2409, 1997.
- [4] B. Rus, et al., Phys. Rev. A **66**, 063806, 2002.
- [5] M.A. Hervé du Penhouat, et al., Rad. res. **151**, 649-658, 1999.
- [6] A. Eschenbrenner, unpublished work, 2002.
- [7] B. Rus, et al., J.D. Eur. Phys. **22**, 31-40, 2003.
- [8] S.G. Swarts, et al., Int. J. Radiat. Biol. **43**, 269-278, 1998.
- [9] B. Fayard, et al., Radiat. Res. **157**, 2002.
- [10] C. Giustrani, et al., J. Chim. Phys. **157**, 132-137, 1999.
- [11] Folkard, et al., Int. J. Radiat. Biol. **76**, 881-890, 1995.
- [12] P.M. Schweizer, et al., Int. J. Radiat. Biol. **6**, 561-567, 1994.
- [13] A. Klisnick, et al., Phys. Rev. A **65**, 033810/1-4, 2002.