

EXTRAIT DE LA
REVUE FRANÇAISE D'ÉTUDES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES 1964

NUMÉRO 8 — VOLUME IX — PAGES 878-883

Revue générale

ACTIONS MUTAGÈNE ET CANCÉRIGÈNE
DES AGENTS ALCOYLANTS

W. G. VERLY

(Université de Liège, Biochimie, Laboratoire des Isotopes, Belgique)

ACTIONS MUTAGÈNE ET CANCÉRIGÈNE DES AGENTS ALCOYLANTS

W. G. VERLY

(Université de Liège, Biochimie, Laboratoire des Isotopes, Belgique)

Les agents alcoylants ont une action cytotoxique : ils provoquent des lésions des chromosomes, des altérations de la mitose, voire la mort de la cellule au moment où celle-ci essaie de se diviser ; ils sont également mutagènes et cancérigènes.

Comme le montre le tableau I, ils appartiennent à plusieurs classes : moutardes soufrées, moutardes azotées, éthylène-imines, époxydes, esters sulfuriques et sulfoniques, etc... On peut aussi les diviser en *monofonctionnels* qui ne possèdent qu'un pôle alcoylant et *bifonctionnels*, ou même *polyfonctionnels*, qui en possèdent plusieurs. Un seul pôle actif suffit pour que la substance soit mutagène, mais l'effet cytotoxique des agents polyfonctionnels est beaucoup plus important que celui des monofonctionnels.

agents alcoylants bifonctionnels sont beaucoup plus toxiques que les monofonctionnels parce qu'en réagissant simultanément avec les deux pôles actifs, ils peuvent créer des ponts alcoyle entre des macromolécules ; ces ponts désorganisent la mitose et provoquent des lésions chromosomiques.

ACTION MUTAGÈNE

Celle-ci est attribuée à l'alcoylation de l'ADN.

Bref rappel de la structure de l'ADN. L'ADN est un polymère formé par l'union de nucléotides. Il existe 4 variétés (principales) de nucléotides ; chacun contient une base, du désoxyribose et de l'acide phosphorique. Les nucléotides diffèrent par la nature

ACTION CYTOTOXIQUE DES AGENTS ALCOYLANTS

Les agents alcoylants réagissent avec les centres nucléophiles : $-SH$, $-COOH$, $-NH_2$, $=PO_4^-$, etc... Dans les cellules, ils attaquent principalement les protéines et surtout les groupes $-SH$ de celles-ci ; la réaction avec les acides nucléiques est, quantitativement, très discrète. Il semble donc que l'action cytotoxique des agents alcoylants ne soit qu'accessoirement due à l'alcoylation des acides nucléiques et, en particulier, de l'ADN, mais que la cause principale se trouve dans l'inactivation d'enzymes, l'alcoylation de protéines soufrées qui jouent un rôle dans la mitose, etc... Les

TABEAU I
Agents alcoylants

	MONOFONCTIONNELS	BIFONCTIONNELS
Moutardes au soufre	$S \begin{cases} CH_2-CH_2OH \\ CH_2-CH_2-Cl \end{cases}$ 2-chloroéthyl-2-hydroxyéthyl-sulfure	$S \begin{cases} CH_2-CH_2-Cl \\ CH_2-CH_2-Cl \end{cases}$ ypérite
Moutardes à l'azote		$CH_3-N \begin{cases} CH_2-CH_2-Cl \\ CH_2-CH_2-Cl \end{cases}$ bis (2-chloroéthyl)-méthylamine
Époxydes	$\begin{array}{c} CH_2-CH_2 \\ \diagdown \quad / \\ O \end{array}$ oxyde d'éthylène	$\begin{array}{c} CH_2-CH-CH-CH_2 \\ \diagdown \quad / \quad \diagdown \quad / \\ O \quad O \end{array}$ diépoxybutane
Éthylène-imines	$\begin{array}{c} CH_2-CH_2 \\ \diagdown \quad / \\ NH \end{array}$ éthylène-imine	
Esters sulfoniques	$CH_3-SO_2-CH_2-CH_3$ EMS	$\begin{array}{l} CH_3-SO_2-CH_2-CH_2 \\ CH_2-SO_2-CH_2-CH_2 \end{array}$ mylerand

de la base (fig. 1) qui peut être une purine, guanine ou adénine, ou bien une pyrimidine, thymine ou cytosine. Le désoxyribose se trouve sous une forme cyclique et c'est la fonction alcool 5' qui est estérifiée par H_3PO_4 .

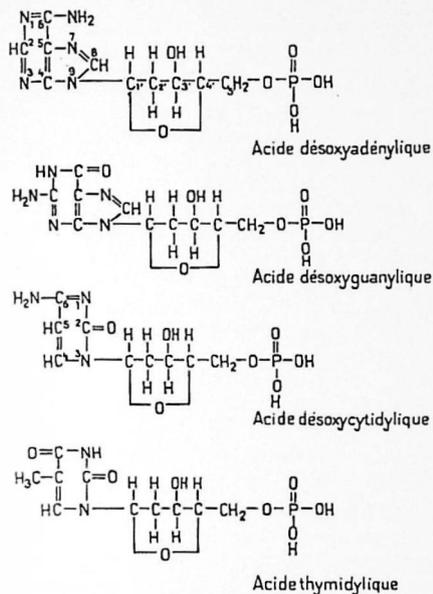


FIG. 1.
Nucléotides de l'ADN.

Les nucléotides sont unis de manière à former une chaîne : l'acide phosphorique d'un nucléotide estérifie la fonction alcool 3' du nucléotide voisin. La chaîne est formée par une alternance monotone de sucre et d'acide phosphorique (fig. 2) ; elle n'est pas symétrique, mais possède un sens, parce que la liaison est 3' d'un côté de l'acide phosphorique et 5' de l'autre. Les bases sont attachées latéralement aux résidus de désoxyribose et c'est la suite des bases qui constitue le message génétique qui, indirectement, guide la synthèse des protéines.

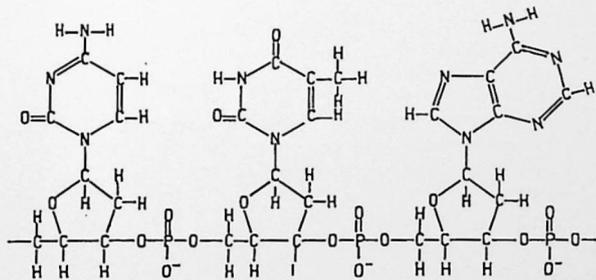


FIG. 2.

Mais l'ADN natif, sauf exception chez quelques bactériophages, est constitué de deux chaînes de sens opposés disposées parallèlement. Ces deux chaînes sont enroulées de manière à former une double hélice (fig. 3) ; les bases se trouvent à l'intérieur dans des plans perpendiculaires à l'axe de la macromolécule : l'ensemble forme une sorte d'escalier en colimaçon. A chaque marche, on trouve une purine d'une chaîne unie par des liaisons hydrogène à une pyrimidine de l'autre chaîne ; ces couples s'établissent très spécifiquement entre la guanine et la cytosine d'une part, l'adénine et la thymine d'autre part (fig. 4) La complémentarité des bases entraîne la complémentarité des chaînes qui permet la reproduction de la macromolécule : chaque chaîne peut servir de matrice pour l'édification d'une chaîne complémentaire. La complémentarité des chaînes est donc la base physique de l'hérité. Des résultats très récents semblent indiquer que, naturellement, une seule des chaînes joue un rôle génétique, c'est-à-dire guide la biosynthèse des protéines et le développement de la cellule ou de l'organisme.

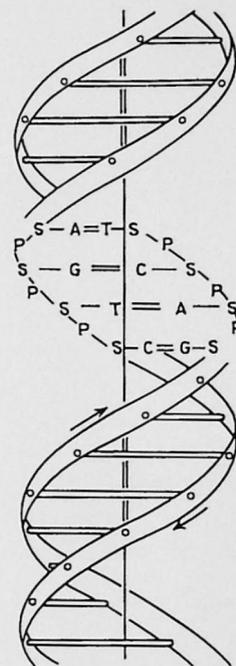


FIG. 3.

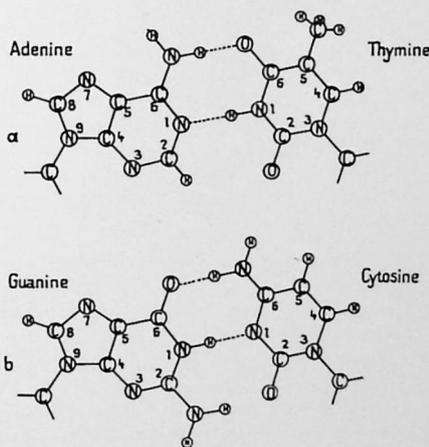


FIG. 4.

Réactions chimiques entre l'ADN et les agents alcoylants. Selon Alexander (1), ce sont les phosphates qui se font d'abord estérifier. Les triesters formés (fig. 5) n'ont qu'une existence très éphémère : a) ou bien l'alcoyle est hydrolysé et l'ADN restauré; b) ou bien, il est transféré sur une base, à l'intérieur de la double hélice, au niveau d'un site électronégatif (transalcoylation); c) ou bien l'hydrolyse du triester, en se faisant au niveau d'une liaison avec le désoxyribose, entraîne la rupture de la chaîne sucre-phosphate.

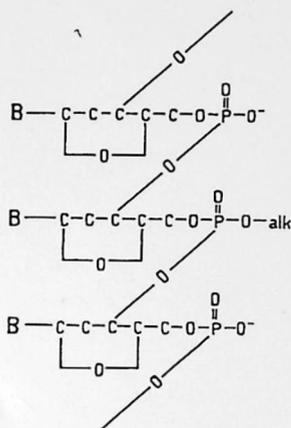


FIG. 5.
Alcoylation
d'un phosphate de l'ADN.

phates : tous les alcoyles fixés sont attachés à des bases ; mais rien ne permet d'exclure que ces alcoyles aient été transférés à partir des phosphates.

L'alcoylation des bases de l'ADN se fait différemment suivant que l'on soumet à la réaction l'ADN natif à double chaîne ou l'ADN dénaturé où les chaînes ont été séparées : dans l'ADN natif, les liaisons hydrogènes empêchent l'alcoylation des sites négatifs engagés dans ces liaisons. Lorsqu'on utilise la macromolécule bicaténaire, les agents alcoylants monofonctionnels marqués réagissent pour 80 p. 100 avec le N-7 de la guanine qui n'est engagé dans aucune liaison hydrogène (fig. 4) et qui est disponible dans la grande gouttière de l'ADN ; le reste se trouve à peu près exclusivement fixé sur le N-3 de l'adénine qui est aussi libre, mais dans la petite gouttière (fig. 4) (il y en a très peu sur le N-1 de l'adénine et le N-1 de la cytosine qui sont aussi réactionnels, mais qui sont masqués par des liaisons hydrogène).

Les purines alcoylées sont transformées en ammoniums quaternaires (fig. 6) et la redistribution des électrons qui s'ensuit entraîne une fragilité de la liaison avec le sucre ; l'hydrolyse de la base alcoylée porte le nom de dépurination. Cette dépurination se fait 6 fois plus vite pour l'adénine alcoylée que pour la guanine alcoylée quel que soit le substituant alcoyle. Cependant la nature du groupe alcoyle influence beaucoup la vitesse de dépurination ; suivant l'agent alcoylant utilisé, la vitesse de la réaction décroît dans

l'ordre suivant : sulfure de 2-chloroéthyl-2-hydroxyéthyle, méthanesulfonate de méthyle (MMS) et méthanesulfonate d'éthyle (EMS) ainsi que Brookes et Lawley l'ont constaté. Dans nos expériences avec le myleran tritié (un agent bifonctionnel), la dépurination est pratiquement inexistante.

La dépurination, lorsqu'elle a lieu, est suivie d'une rupture hydrolytique de la chaîne sucre-phosphate.

Les agents alcoylants bifonctionnels réagissent de la même manière que les monofonctionnels, mais ils possèdent, en plus, la propriété d'établir des ponts en réagissant avec les deux extrémités de la molécule. Exemple : le réactif alcoyle le N-7 d'une guanine (cas le plus fréquent) ; si l'autre pôle alcoylant est toujours intact, la molécule, en s'agitant autour de son point d'insertion, cherche un deuxième site négatif à alcoyler ; elle établit un pont si elle trouve ce site avant que la deuxième fonction alcoylante ne soit hydrolysée. La persistance d'une fonction active dans une molécule qui a déjà réagi, a été très bien mise en évidence par Dorskocil et Sormova (5) : si on rapproche les molécules d'ADN en les précipitant sous la forme de fibres immédiatement après avoir fait agir un agent alcoylant bifonctionnel, il se forme des ponts entre les molécules.

Il semble bien que, dans des conditions plus naturelles, le pontage se fasse entre deux points de la même molécule. L'emploi de traceurs suivi de l'hydrolyse de l'ADN alcoylé a montré que le pont s'établissait le plus souvent entre les N-7 de deux molécules

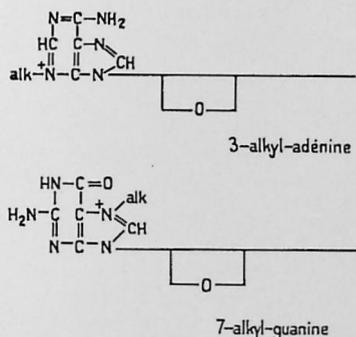
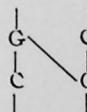


FIG. 6.
Purines alcoylées.

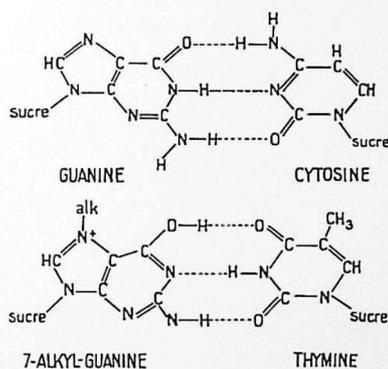
de guanine. D'après Brookes et Lawley (2), ces guanines n'appartiendraient pas à la même chaîne, mais se trouveraient à des étages contigus de la macromolécule :



Quelle est la fréquence du pontage quand on utilise un agent alcoylant bifonctionnel ? Les résultats qui se trouvent dans la littérature ont été obtenus avec de l'ADN de thymus de veau. En utilisant de la ^{35}S -ypérite, Brookes et Lawley (2) ont constaté que 1 alcoyle sur 4 formait un pont ; avec du myleran tritié, nous avons observé seulement un taux de 1 sur 10.

Les réactions de l'ADN ne semblent pas différentes, en ce qui concerne l'alcoylation des bases, lorsque la macromolécule est entourée de protéines. En particulier, il ne semble pas se former de ponts entre la protéine et l'ADN. Ces résultats ont été obtenus avec des bactériophages.

Interprétation de l'action mutagène. Alexander (1) a soutenu autrefois l'hypothèse que l'alcoylation des phosphates était la cause principale des mutations. L'extrême labilité des alcoyl phosphates rend cette interprétation peu probable. Toutefois, exceptionnellement, l'hydrolyse du triester entraîne la rupture de la chaîne sucre phosphate : la délétion d'une partie de la chaîne ainsi touchée, au moment de la duplication de l'ADN, pourrait être une cause de mutation ou de létalité.



Bases complémentaires de la guanine et de la 7-alcoyl-guanine.

La modification de l'acidité des N de la guanine après alcoylation en 7 donne naissance à un tautomère énolique qui s'accouple avec la thymine au lieu de la cytosine au moment de la reproduction de l'ADN (fig. 7) : cette erreur conduit à une transition qui peut entraîner une mutation phénotypiquement reconnaissable. Rien de semblable ne se passe dans le cas de l'adénine alcoylée qui continue à s'accoupler avec la thymine, de sorte que la transition n'est pas réversible par ce mécanisme.

La dépurination pourrait aussi entraîner une mutation : a) la chaîne sucre phosphate est respectée,

mais le départ de la base alcoylée laisse un trou en face duquel peut se placer n'importe quelle base au moment de la reproduction de l'ADN (transition ou transversion). On peut aussi imaginer que le trou est oublié et qu'il y a délétion d'un nucléotide dans la chaîne nouvellement formée ; b) la dépurination est suivie d'une rupture de la chaîne sucre phosphate, cas qui a déjà été traité dans le cas de l'hydrolyse du triester.

Avec les agents alcoylants bifonctionnels, le pontage entre les hélices complémentaires vient ajouter une autre cause de létalité ou de mutation : la molécule pontée ne peut pas se reproduire. Théoriquement, le pontage doit se distinguer de toutes les autres causes de mutations qui n'atteignent qu'une des deux hélices : s'il y a pontage, la mutation doit atteindre toute la descendance ; dans les autres cas, la mutation n'atteint que 50 p. 100 de la descendance, celle qui, pour son héritage, dépend de la chaîne lésée.

ÉTUDES EXPÉRIMENTALES

A) Bactériophages

a) *Létalité du bactériophage T₂ et T₁.* La particule de virus contient une seule molécule d'ADN formée de deux chaînes.

Lorsqu'on utilise un agent alcoylant bifonctionnel marqué, on constate qu'il suffit de fixer un alcoyle par particule pour empêcher la multiplication du virus, mais que toutes les alcoylations ne sont pas efficaces. La meilleure interprétation semble être que ce sont les alcoyles qui forment des ponts entre les deux chaînes d'une même molécule qui sont responsables de l'action létale.

Lorsque l'agent alcoylant est monofonctionnel, il faut fixer simultanément plusieurs alcoyles dans la molécule d'ADN du virus pour le tuer. Cette action létale n'est pas immédiate, mais son apparition est d'autant plus précoce que l'agent alcoylant utilisé provoque une dépurination plus rapide. On pense donc que c'est la dépurination qui est ici le phénomène important ou, plutôt la rupture de la chaîne sucre phosphate consécutive à la dépurination. La létalité n'apparaîtrait que si les deux chaînes se rompaient en des points voisins, ce qui expliquerait la nécessité de fixer de nombreux alcoyles à la même molécule pour obtenir l'effet.

b) *Effet mutagène chez ces bactériophages.* Le pontage, qui est mortel, ne doit pas être considéré.

L'action mutagène des agents alcoylants monofonctionnels est d'autant plus grande qu'ils entraînent moins de dépurination ; par exemple, chez les T pairs, le méthanesulfonate d'éthyle est mutagène (Loveless). L'effet apparaît sans délai. Il semble donc qu'il faille éviter la dépurination et la rupture de la chaîne sucre phosphate qui la suit, et que l'effet mutagène soit dû essentiellement à la transition provoquée par la formation de N-7 alkyl-guanine : comme on l'a dit antérieurement, le couple G-C se fait remplacer par le couple A-T.

B) Bactéries

Nous avons étudié le passage de la sensibilité à la résistance à la streptomycine chez *Escherichia coli* K 12 souche Y 20 sous l'action d'agents mono- et bi-fonctionnels (résultats non publiés).

Le méthanesulfonate d'éthyle (EMS), agent alcoylant monofonctionnel, (1 heure à 37 °C ; concentrations allant jusque 0,2 M) est mutagène, mais l'expression phénotypique de la mutation n'apparaît qu'après un certain délai. Ce délai cependant n'est utile que si les cellules peuvent se multiplier : après 6 heures à 37 °C dans un milieu nutritif adéquat, le taux de mutants est maximum et stable. Cette latence n'a donc rien à voir avec une réaction chimique de dépurination qui serait indépendante de la multiplication cellulaire. La plupart des cellules de *E. coli* sont plurinucléées et, après action de l'EMS, un seul noyau a des chances d'être muté ; il faut attendre plusieurs divisions cellulaires avant de pouvoir réunir dans une même cellule uniquement des noyaux mutés, condition nécessaire à l'expression phénotypique de la résistance à la streptomycine.

Avec le myleran (200 mg par litre = 0,0008 M), on observe aucun effet mutagène même quand on prolonge le traitement pendant 24 heures à 37 °C. En admettant que le myleran pénètre dans la cellule (ce que nous devons encore prouver), il semble que, à cause de sa très faible solubilité dans l'eau, la concentration utilisée soit trop faible pour rendre détectables les mutations dues à des lésions du type monofonctionnel (atteignant une seule hélice de l'ADN). Le pontage, par ailleurs, ne semble déterminer aucune mutation : l'observation de Cairns montrant que le noyau de *coli* ne contient qu'une seule molécule bicaténaire d'ADN en forme d'anneau, explique vraisemblablement notre observation : le pontage est létal pour le noyau, il ne peut pas être mutagène. La létalité d'un noyau n'entraîne pas la mort de la cellule parce que celle-ci est plurinucléée. Par ailleurs, la létalité, par action cytoplasmique du myleran, n'est pas non plus détectable chez *E. coli*.

C) *Action mutagène des agents mono- et bi-fonctionnels chez des cellules dont les chromosomes sont formés par plusieurs molécules d'ADN soudées par des liens protéiques fragiles*

On peut admettre que, dans cette situation, la délétion d'une molécule d'ADN ne soit pas nécessairement létale et qu'elle puisse causer une mutation phénotypiquement reconnaissable. Dès lors, on peut distinguer les mutations dues à des pontages et celles dues à une lésion atteignant une seule chaîne : les premières se retrouvent dans toute la descendance du génome, tandis que les secondes n'apparaissent que dans la moitié de la descendance. Il semblerait que, dans le cas des agents alcoylants bi-fonctionnels qui, comme le myleran, ne provoquent guère de dépurination, le mécanisme principal de l'action mutagène soit le pontage.

Ces hypothèses ont servi de base à un travail que nous avons fait chez une algue monocellulaire haploïde, *Chlamydomonas eugametos*, qui était normalement résistante à la streptomycine. La mutation observée était la perte de cette résistance.

Les cellules ont été soumises à l'action de myleran tritié de très haute activité spécifique. Après ce traitement, une partie des cellules a été soumise à l'analyse génétique ; la technique utilisée ne permettait de dépister la mutation que si elle atteignait toutes les cellules issues de la cellule traitée. D'autre part, l'isolement de l'ADN et des mesures de radioactivité ont permis, connaissant l'activité spécifique du myleran tritié utilisé, de calculer le nombre de groupements alcoyle fixé par millions de nucléotides. La relation mathématique entre l'alcoylation et l'action mutagène montre qu'il suffit de fixer un groupe alcoyle dans une cible dont la grandeur apparente est de 900 000 u.m.a., cible unique dans cette cellule haploïde, pour faire disparaître la résistance à la

streptomycine. Nous avons supposé que le coup efficace était le pontage des hélices complémentaires de la molécule d'ADN porteuse du locus génétique dont dépend la résistance à la streptomycine ; si on admet que 1 alcoyle sur 10 seulement peut former un pont (valeur trouvée avec le myleran et l'ADN de thymus de veau), la grandeur réelle de la cible serait 9 000 000 u.m.a.

Cette valeur provisoire est de l'ordre de grandeur du poids d'une molécule d'ADN ; le résultat semble donc soutenir l'hypothèse utilisée pour expliquer l'action mutagène du myleran. Le myleran tritié donnerait donc le moyen de mesurer « in situ » la grandeur d'une molécule d'ADN biologiquement définie. L'utilisation du myleran devrait aussi permettre d'étudier les associations de loci génétiques à l'intérieur d'une même molécule d'ADN. Enfin les résultats de cette expérience s'accordent avec les modèles de chromosome proposés par Freese, Taylor, Rizet, Lissouba, etc... où des molécules d'ADN individualisées sont tenues par une reliure vraisemblablement protéique de manière à former une superstructure présentant les mêmes propriétés de complémentarité que la molécule d'ADN elle-même.

ACTION CANCÉRIGÈNE

Nous ignorons la cause de l'action cancérigène des agents alcoylants. Il est possible qu'il ne s'agisse que d'un cas particulier de l'action mutagène. Maisin (communication personnelle) a observé que le myleran était fortement cancérigène chez le Rat. Nous sommes tenté d'attribuer cette action à des pontages entraînant, au moment de la mitose, des délétions, simples ou multiples, de molécules d'ADN des génomes des cellules cancérisées.

RÉSUMÉ

Cette brève revue est consacrée principalement à la description du mécanisme de l'action mutagène des agents alcoylants.

*Après un rappel sommaire de la structure de l'ADN, les différents modes de réaction de cette macromolécule avec les agents alcoylants mono- et bi-fonctionnels ont été énumérés. De la connaissance des lésions chimiques, on a théoriquement déduit des causes de mutations. La vraisemblance de ces hypothèses a été confrontée avec des résultats expérimentaux obtenus chez les bactériophages, *Escherichia coli* et *Chlamydomonas*.*

SUMMARY

A short review is given of the mutational action of alkylating agents.

*The molecular structure of deoxyribonucleic acid is recalled and the various reactions of this macromolecule with mono- and bi-functional alkylating agents are described. Knowledge of the chemical damage enabled suggestions for the mechanisms of mutation to be made. These hypotheses have been compared with experimental results obtained with bacteriophages, *Escherichia coli* and *Chlamydomonas*.*

BIBLIOGRAPHIE

1. ALEXANDER (P.), LETT (J.T.) et PARKINS (G.). Instability of alkylated deoxyribonucleic acid in relation to the mechanism of chemical mutagenesis (Biochim. Biophys. Acta, 1961, 48, 423).
2. BROOKES (P.) et LAWLEY (P. D.). The reaction of mono- and di-functional alkylating agents with nucleic acids (Biochem. J., 1961, 80, 496).
3. BROOKES (P.) et LAWLEY (P. D.). Effects of alkylating agents on T₂ and T₄ bacteriophages (Biochem. J., 1963, 89, 138).
4. CAIRNS (J.). The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography (J. Mol. Biol., 1963, 6, 208).
5. DOSKOCIL (J.) et SORMOVA (Z.). Post-treatment cross-linking of DNA reacted with polyfunctional alkylating agents (Biochem. Biophys. Acta, 1963, 68, 313).
6. FREESE (E.). Molecular mechanism of mutations p. 207, in Molecular Genetics, édité par J. H. Taylor (New-York, 1963, Academic Press, ed.).
7. LAWLEY (P. D.) et BROOKES (P.). Ionization of DNA bases or bases analogues as a possible explanation of mutagenesis, with a special reference to 5-bromo-deoxyuridine (J. Mol. Biol., 1962, 4, 216).
8. LAWLEY (P. D.) et BROOKES (P.). Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides (Biochem. J., 1963, 89, 127).
9. LISSOUBA (P.). Mise en évidence d'une unité génétique polarisée et essai d'analyse d'un cas d'interférence négative (Ann. Sc. Nat. Bot., 1960, 1, 44).
10. MARMUR (J.) et GREENSPAN (C. M.). Transcription « in vivo » of DNA from bacteriophage SP 8 (Science, 1963, 142, 387).
11. ROBERTS (J. J.) et WARWICK (G. P.). Metabolism of myleran (Nature, 1959, 183, 1509).
12. VERLY (W. G.), DEWANDRE (A.), MOUTSCHEN-DAHMEN (J.) et MOTTSCHEH-DAHMEN (M.). Study of genetic targets with labelled mutagens. The action of myleran on the resistance to streptomycin of Chlamydomonas engametos (J. Mol. Biol., 1963, 6, 175).