

Université Paris VI

École Doctorale : La Physique de la Particule au Solide ; Modèles & Expériences

Contribution « K » à l'effet biologique des rayonnements ionisants

présentée par

Mr Arnaud BOISSIÈRE

08 septembre 2004

Thèse réalisée dans les laboratoires d'accueil :









Équipe 'Mécanismes Physiques de Létalité et Mutagenèse' (MPLM) – GPS, UPMC Paris 6 :

A. Chetioui – Directrice de Thèse

Laboratoire de Radiobiologie et Oncologie (LRO) – DSV/DRR, CEA Fontenay-aux-Roses :

L. Sabatier

Plan de l'exposé

- Introduction 
- Contexte & Objectifs  
- Méthodes expérimentales 
- Résultats
 1. Survie cellulaire 
 2. Aberrations chromosomiques 
 3. Contribution « K » à la létalité des rayonnements γ 
- Conclusions et perspectives 

- Introduction

- Contexte & Objectifs

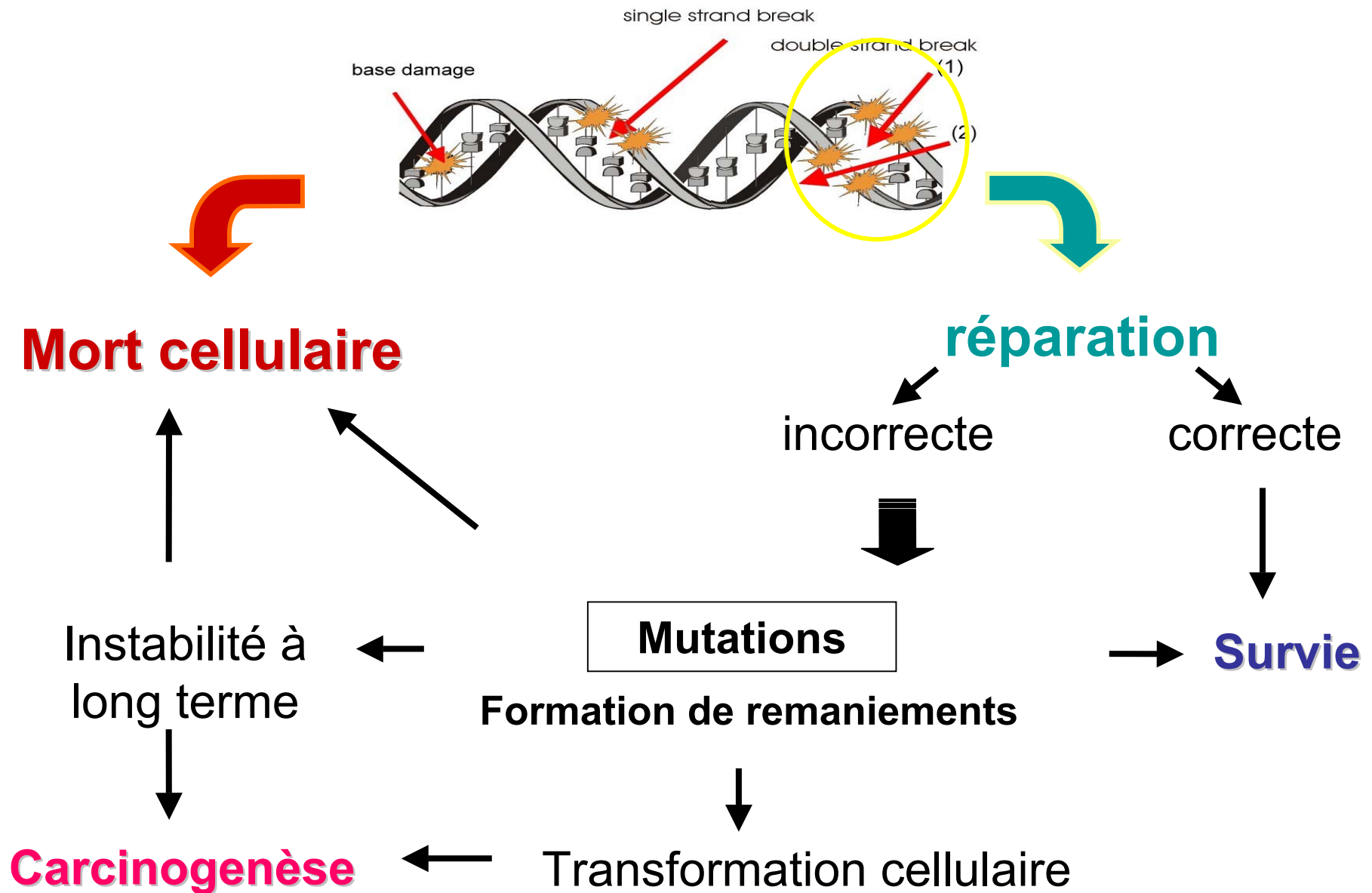
- Méthodes expérimentales

- Résultats

1. Survie cellulaire
2. Aberrations chromosomiques
3. Contribution « K » à la létalité des rayonnements γ

- Conclusions et perspectives

Chronologie des événements après irradiation



Interaction rayonnement-matière

Dommages primaires physiques et biologiques dans des cellules de mammifères irradiées sous faible TEL (1Gy, rayons γ)

[H. Nikjoo et al. (I.J.R.B, 1998)]

Rayonnement :	faible TEL
Traces dans le noyau	1000
Ionisations dans le noyau	100000
Ionisations dans l'ADN	1500
Excitations dans l'ADN	1500
Dommages de bases	10 ⁴
Cassures simple-brin d'ADN csb	850
Cassures double-brin d'ADN cdb	40
Aberrations chromosomiques	0,3
Dicentriques	0,1
Lésions létales	0,3
% Inactivation cellulaire	30%

- Quels sont les événements critiques à l'origine des effets biologiques des rayonnements ionisants ?
- Rôle des événements d'ionisation en couche interne (I.C.I) dans la mort cellulaire (rayons X, rayons γ et e^- rapides)?
- Rôle des événements de cœur dans l'induction d'aberrations chromosomiques et d'instabilité génomique ?

- **Introduction**

- **Contexte & Objectifs**

- **Méthodes expérimentales**

- **Résultats**

1. Survie cellulaire

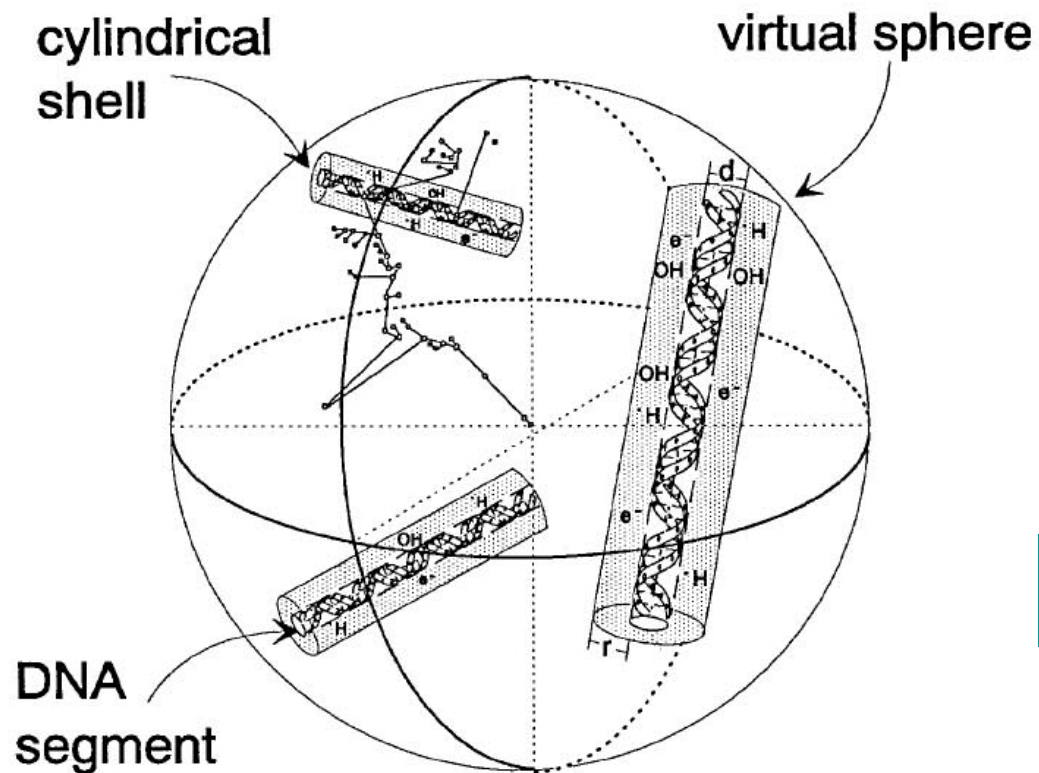
2. Aberrations chromosomiques

3. Contribution « K » à la létalité des rayonnements γ

- **Conclusions et perspectives**

Premier modèle d'événements physiques critiques (*Goodhead et al.*)

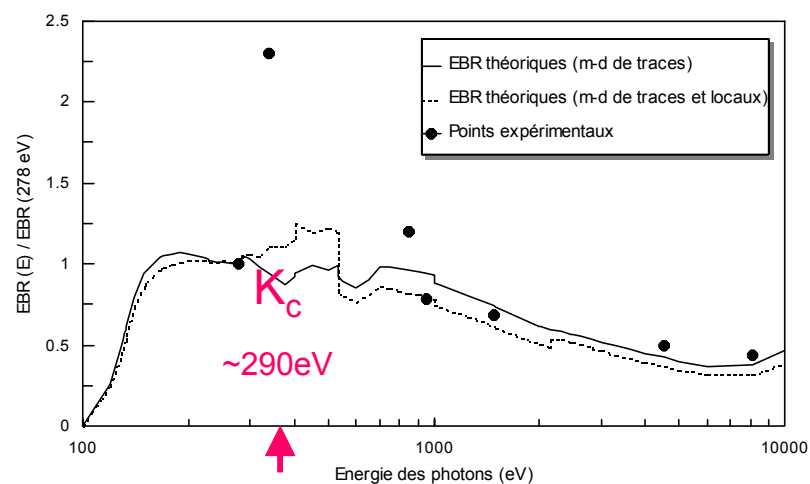
Mort cellulaire attribuée à l'action sur l'ADN des grappes d'ionisation (clusters) en fin de trace des électrons secondaires



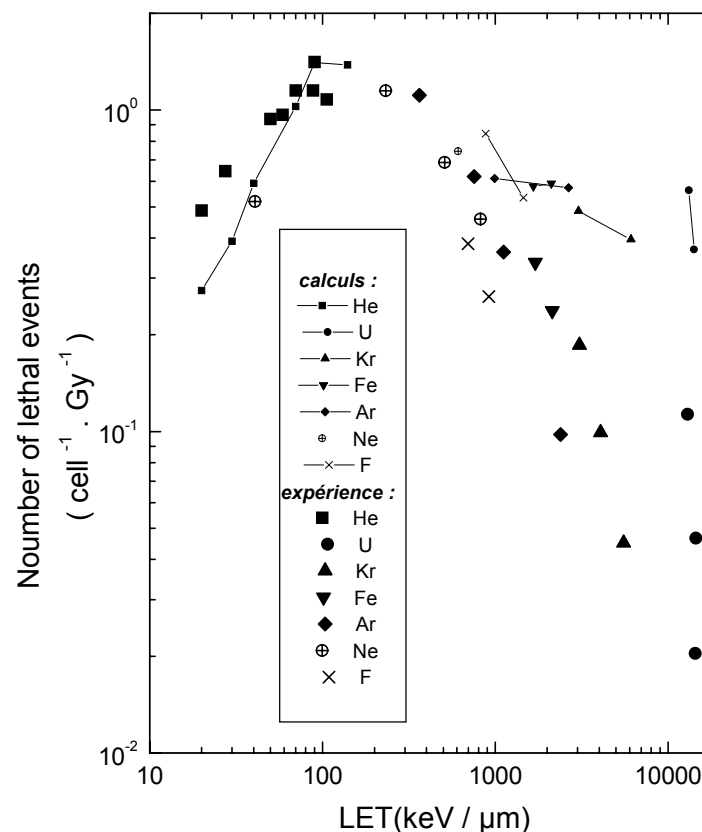
$$N_{\text{lét}} = \epsilon_{\text{lét}} \times N_{\text{cluster}}$$

Mise en évidence de désaccords entre le modèle et l'expérience

- Rayonnements électromagnétiques :



- Ions :



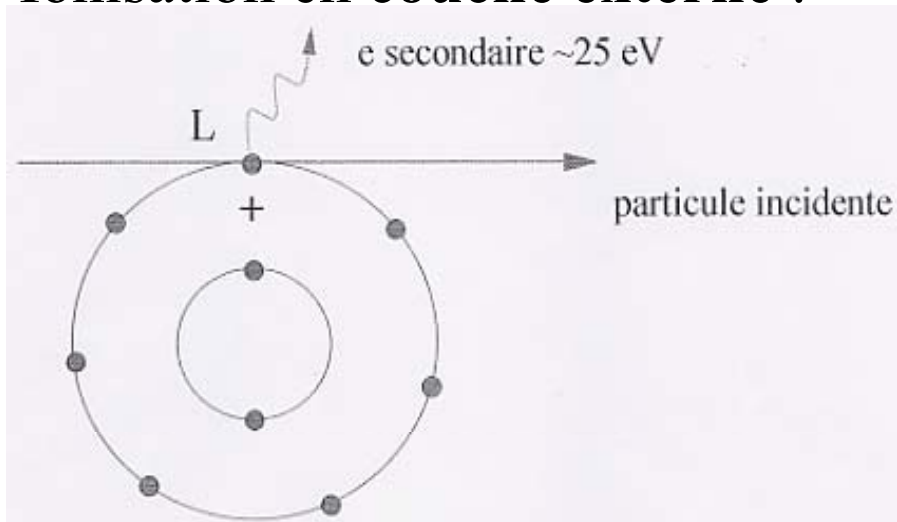
Rappel :

EBR : efficacité biologique relative ; rapport des doses de 2 rayonnements pour induire le même effet – proportionnel au nombre d'événement létaux.

TEL : transfert d'énergie linéique ; dE/dx (keV/μm).

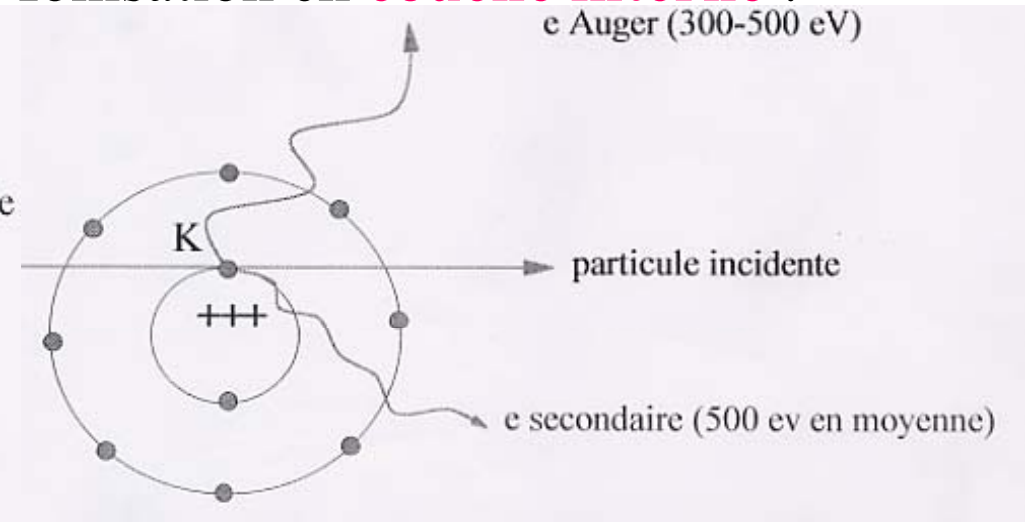
Modèle d'événements de cœur (*MPLM et LRO*)

Ionisation en **couche externe** :



Plus de **99%** des événements

Ionisation en **couche interne** :

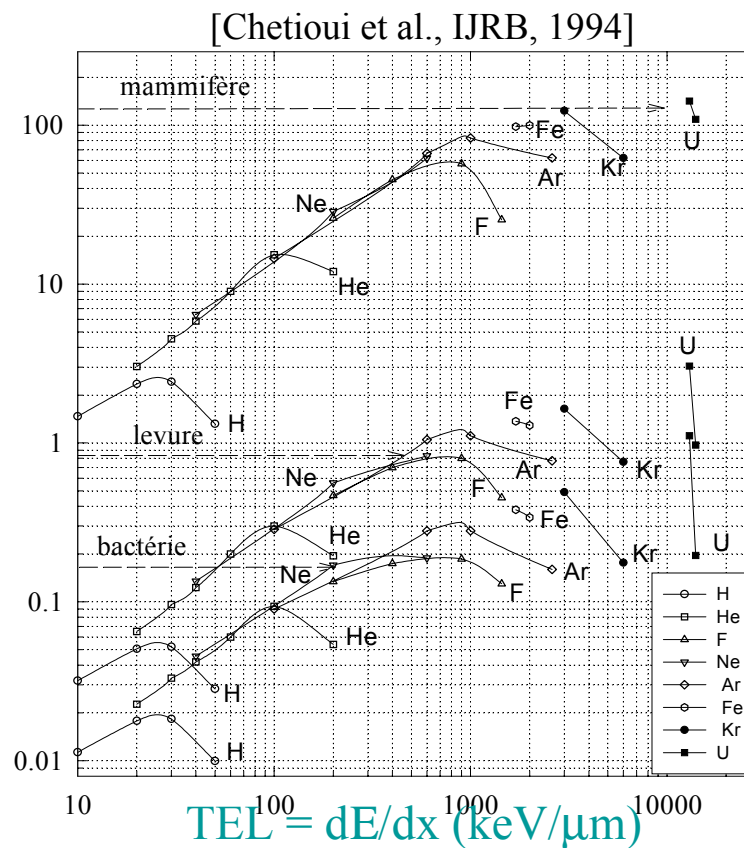
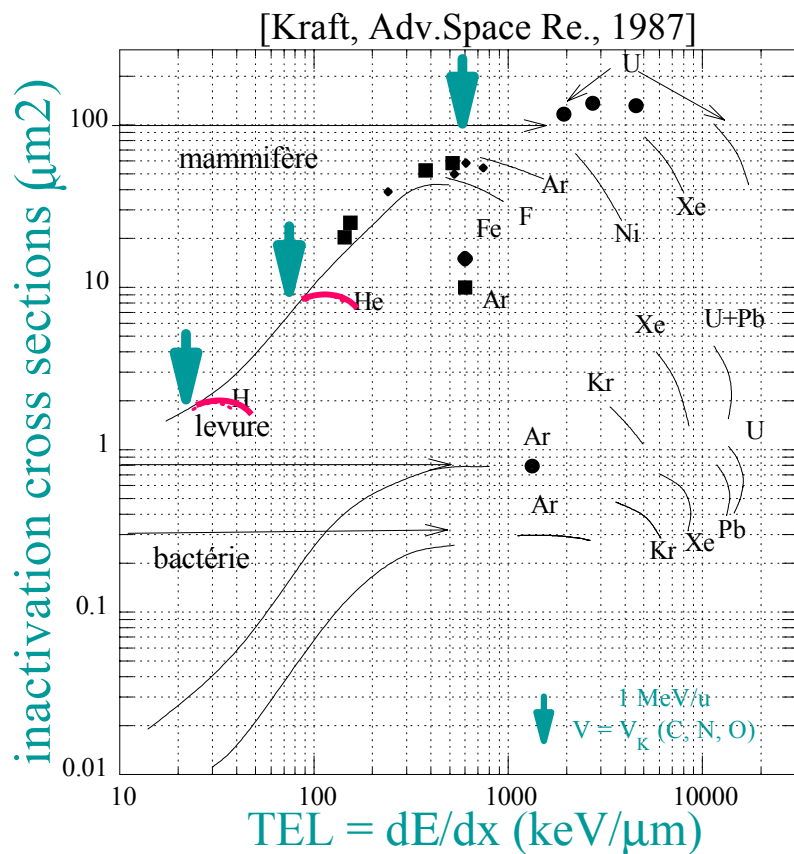


Complexe

~500 fois moins probable

mais dégage ~30 fois plus d'énergie

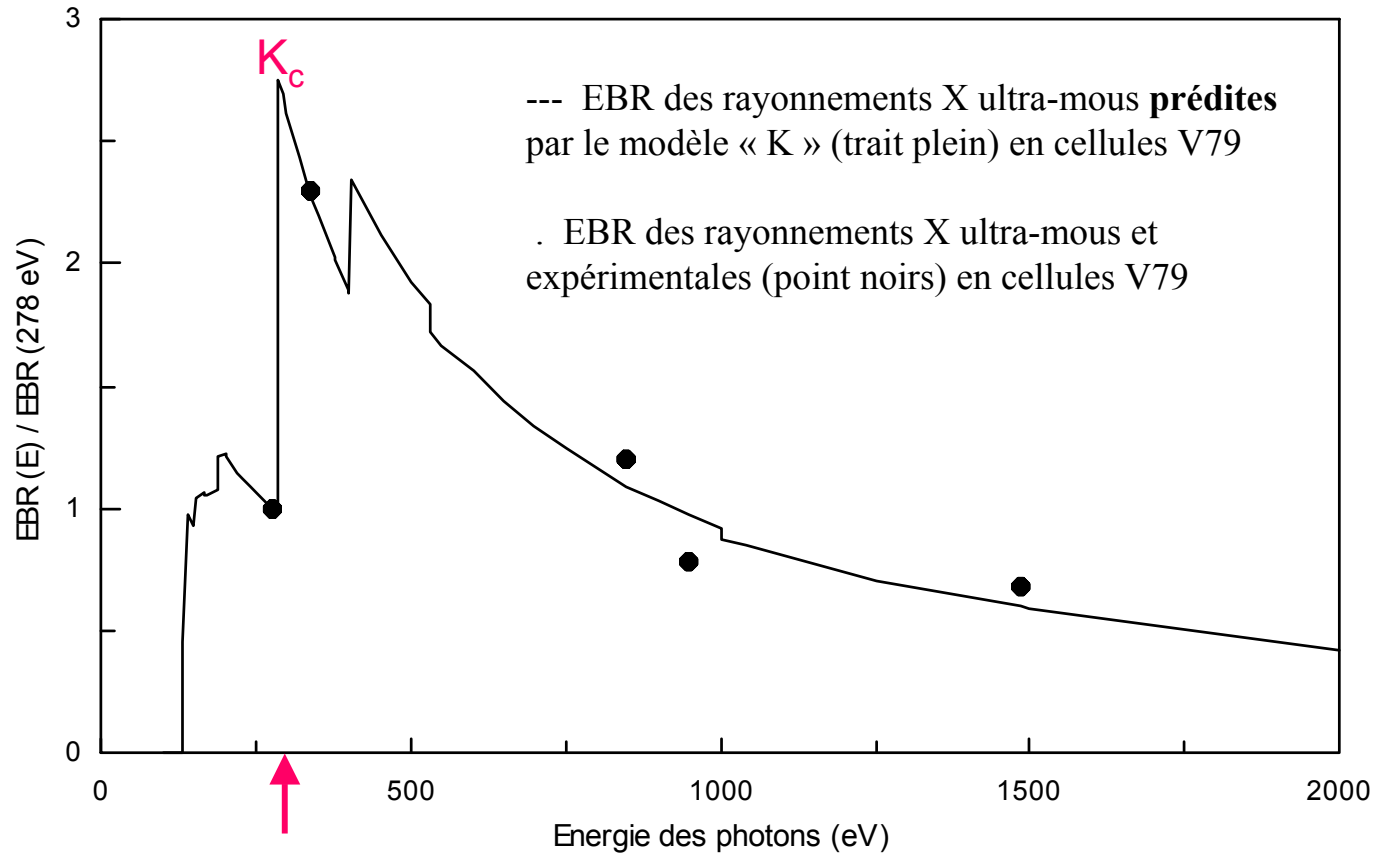
Comparaison des sections efficaces expérimentales d'inactivation cellulaire par ions et des prédictions du modèle d'évènements de coeur



- comportement en « crochet »

- décroissance à haut TEL (*paradoxe ?*)

Comparaison des EBR expérimentales d'inactivation cellulaire par rayonnement électromagnétique et des prédictions du modèle d'événements de cœur.



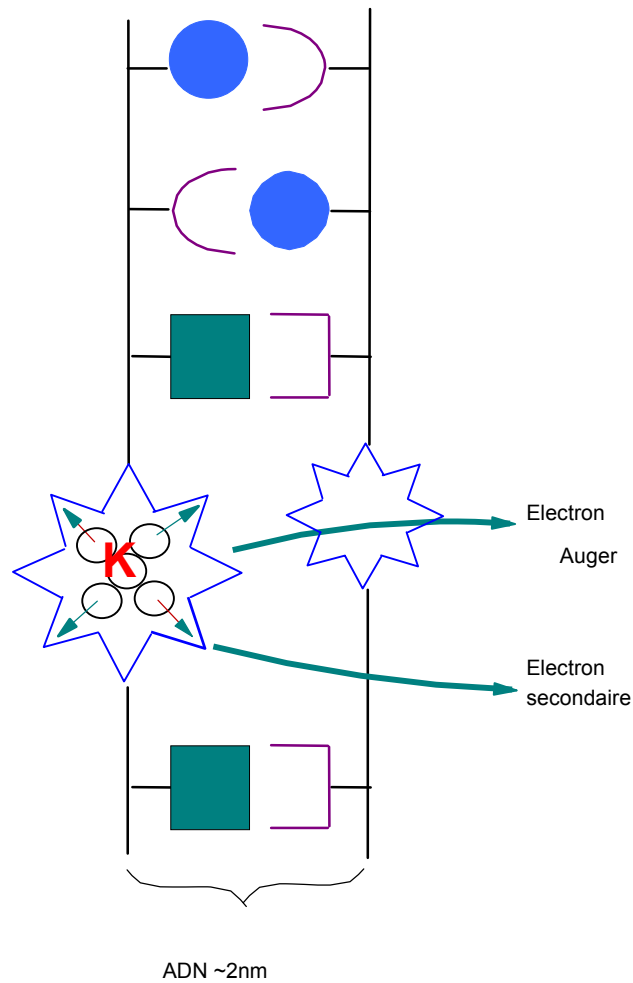
Accroissement abrupt d'un facteur 2 de l'EBR au seuil K du carbone



augmentation d'un facteur 2 du nombre d'I.C.I des atomes de l'ADN

Contribution « K » à l'effet biologique des rayonnements ionisants

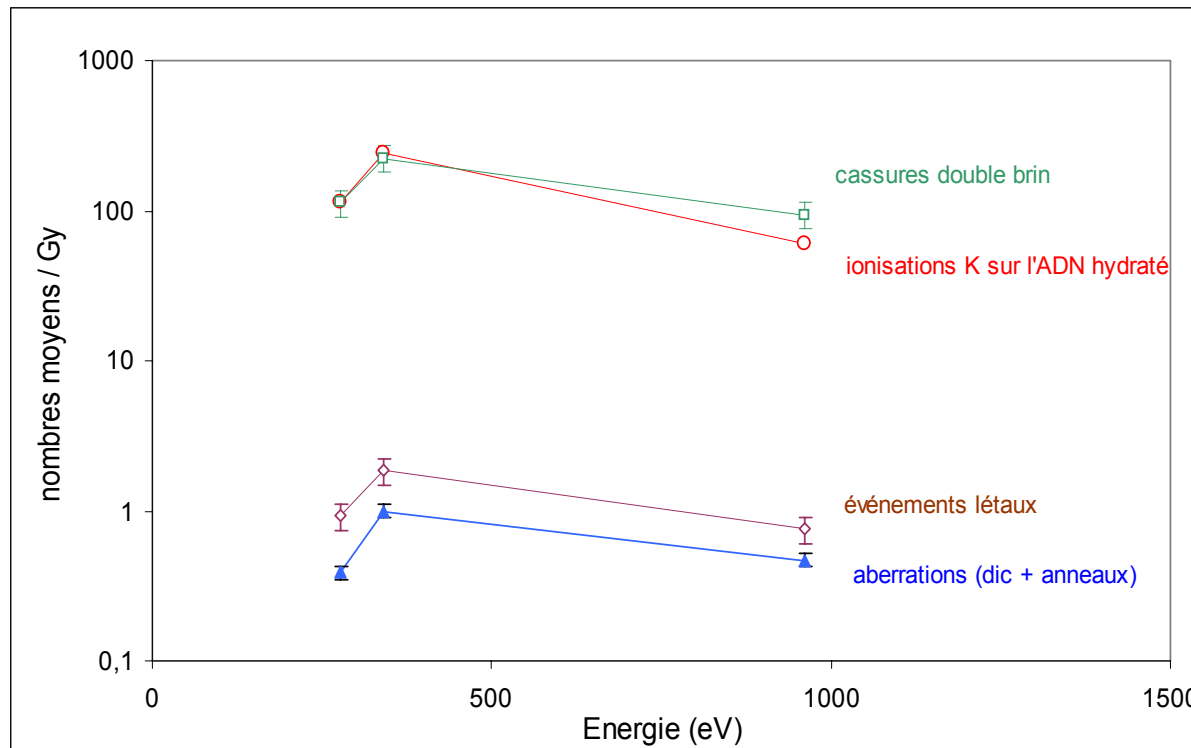
Schéma proposé pour l'induction de cassures complexes de l'ADN par événements de cœur



Événements de cœur sur l'ADN conjuguent interaction physique la plus intense et site le plus « stratégique » de la cellule

→ Ils sont donc proposés comme vecteurs d'effets biologiques

Derniers résultats en faveur du modèle « K » (en cellules V79 sous rayons X ultra-mous)



- Événements « K » = événements physiques responsables des effets biologiques des rayons X ultra-mous

- **Introduction**

- **Contexte & Objectifs**

- **Méthodes expérimentales**

- **Résultats**

1. Survie cellulaire

2. Aberrations chromosomiques

3. Contribution « K » à la létalité des rayonnements γ

- **Conclusions et perspectives**

Objectifs

- Corrélation mort cellulaire - événements « K » pour d'autres types cellulaires ?
 - survie de cellules humaines (B3) à des irradiations X ultra-mous (et ions)
- Corrélation translocations (aberrations impliquées dans le cancer) - événements « K » ?
 - cellules B3 irradiées en X ultra-mous
- Étude quantitative de la contribution « K » à la létalité des rayonnements rencontrés dans la pratique : e^- rapides et γ .

- Introduction

- Contexte & Objectifs

- Méthodes expérimentales

- Résultats

1. Survie cellulaire

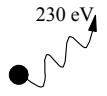
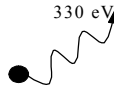

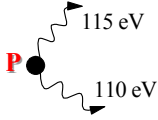
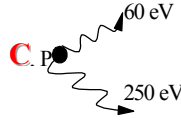
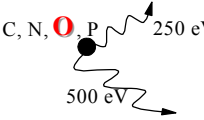
2. Aberrations chromosomiques

3. Contribution « K » à la létalité des rayonnements γ

- Conclusions et perspectives

Événements « K » sondés par les rayons X ultra-mous (utilisation du rayonnement synchrotron)

- Utilisation de la propriété unique de ces rayons d'interagir avec la matière biologique presque exclusivement par ICI

Énergies des X ultra-mous	250 eV	350 eV	810 eV
Ionisations en couche externe I.C.E	 <p style="text-align: center;">230 eV</p>	 <p style="text-align: center;">330 eV</p>	 <p style="text-align: center;">780 eV</p>
	70%	26%	6%
Ionisations « K » (I.C.I)	 <p style="text-align: center;">P</p>	 <p style="text-align: center;">C, P</p>	 <p style="text-align: center;">C, N, O, P</p>
	30%	74%	94%
Nombre d'événements «K» /Gy	114	245	74

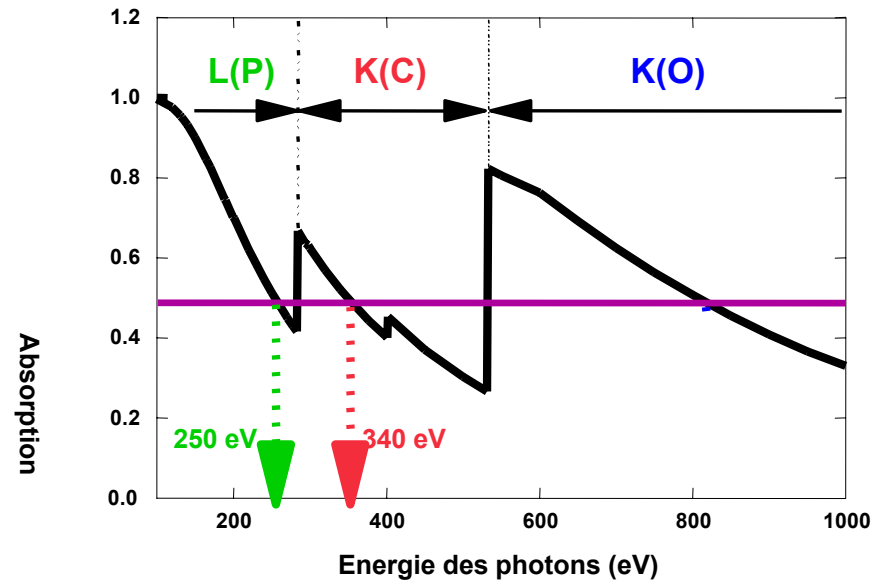
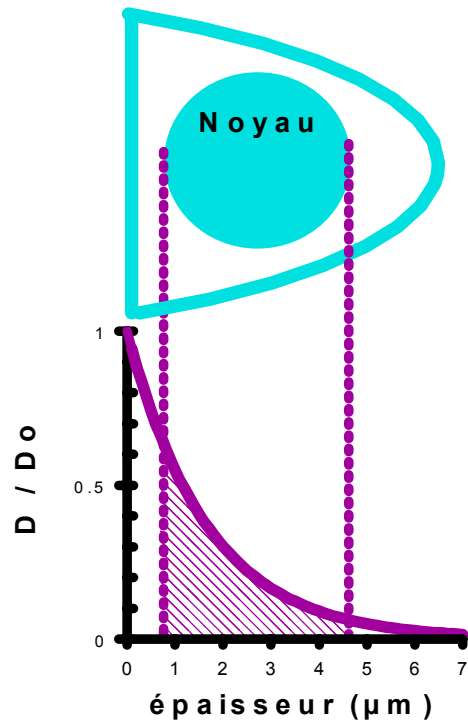
- ajuster l'énergie X \leftrightarrow fixer l'énergie des électrons émis

- sélection d'un seuil K d'un atome \leftrightarrow cibler 1 atome donné
: variation nb ICI /ADN

→ Test décisif du rôle des événements de cœur

- Choix d'énergies X assurant l'isoatténuation dans la cellule

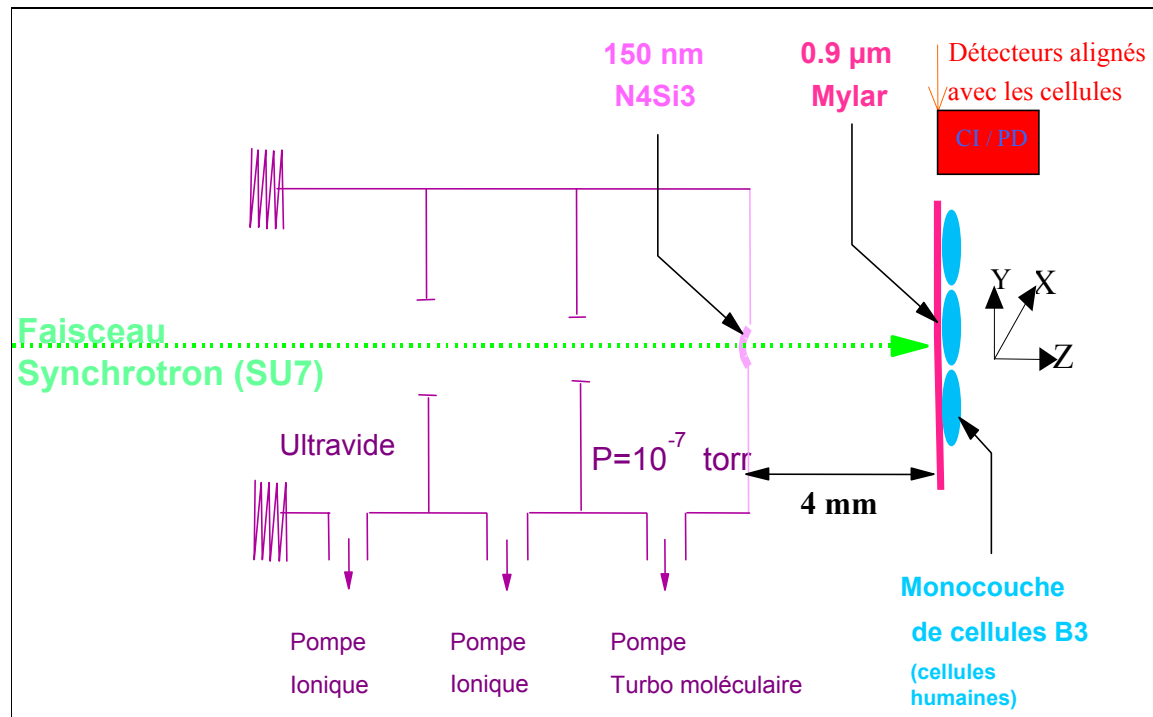
Choix des énergies de rayons X ultra-mous isoatténuées



. Même profil de dose dans la cellule

. Possibilité de comparer les effets entre énergies

Dispositif d'extraction du faisceau d'X



- Impératif physique : minimum d'épaisseurs interposées entre le faisceau et la cible
- Impératif biologique : irradiation à l'air et à pression atmosphérique

Techniques physiques

- Caractérisation du faisceau :

- mesure des harmoniques par mesure d'absorption de matériaux calibrés en épaisseur

- Dosimétrie :

- Étalonnage en efficacité de détecteur de rayons X ultra-mous (photodiode) par référence à un détecteur absolu (chambre d'ionisation)

- Détermination très précise des épaisseurs

- des matériaux interposées dans le faisceau
- des 200 supports cellulaires (5 points par support)
- des divers compartiments cellulaires eux-mêmes

} méthodes nucléaire
d'analyse – Van de
Graaf (GPS)

→ microscopie confocale
(MRC Harwell)

Tests et études préliminaires :

- culture des cellules en monocouche sur mylar
- cycle cellulaire : 24h
- protocoles d'irradiation :
 - . mises au point pour la culture et l'analyse
 - . cellules en phase G_0/G_1
 - . récolte des cellules sur mylar

Étude de la survie cellulaire classique

- à 11j (>50 cellules survivantes par colonies)

Étude des aberrations chromosomiques :

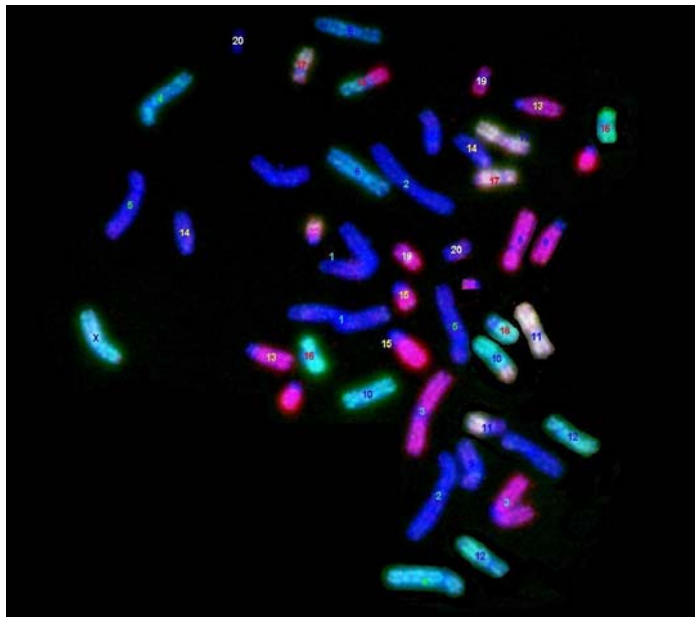
- Caryotype 24h après l'irradiation
- Hybridation *in situ* : télomères et mFISH

Les cellules B3

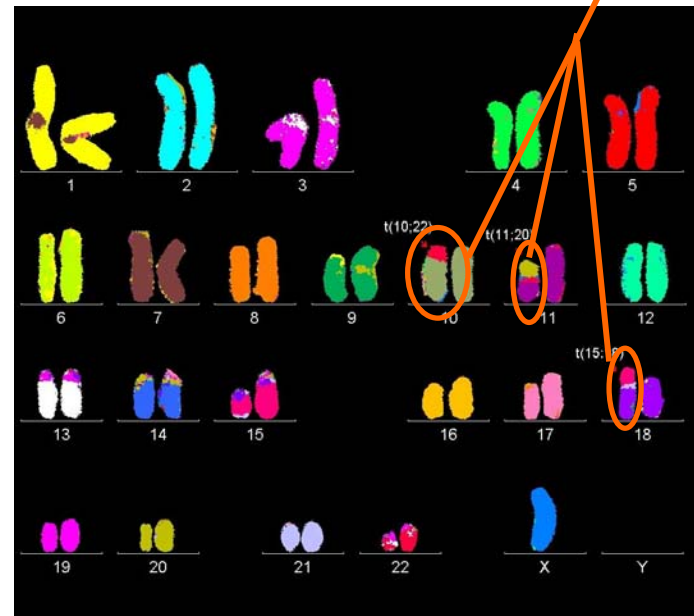
Cellules humaines provenant de sous-clônes de cellules du carcinome de la vessie (E.J Blader)

Caryotype témoin (non irradié) :

3 translocations clonales



Caryotype établi par méthode mFISH



$t(10;22) - t(11;20) - t(15;17)$

- Introduction

- Contexte & Objectifs

- Méthodes expérimentales

- Résultats

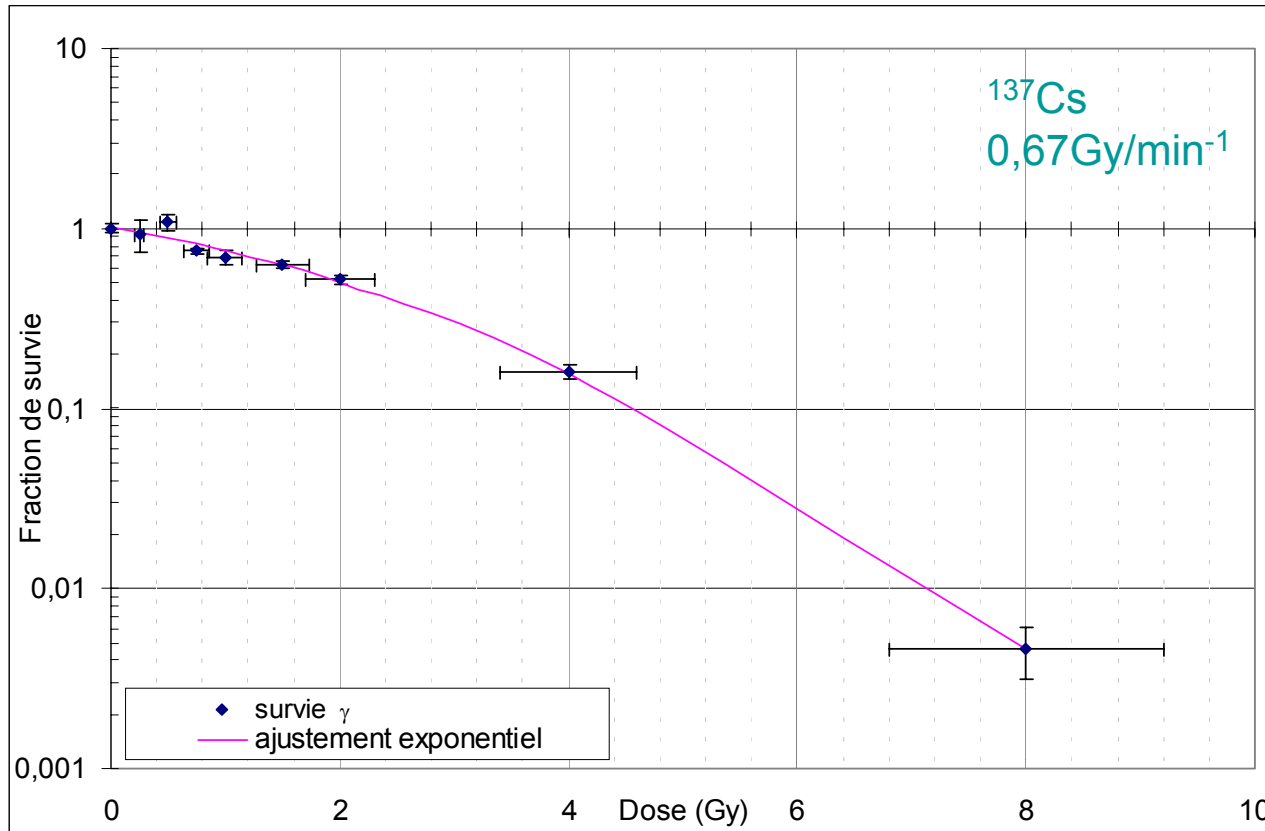
1. Survie cellulaire

2. Aberrations chromosomiques

3. Contribution « K » à la létalité des rayonnements γ

- Conclusions et perspectives

Survie cellulaire en rayonnement gamma



rappel
modèle L-Q :

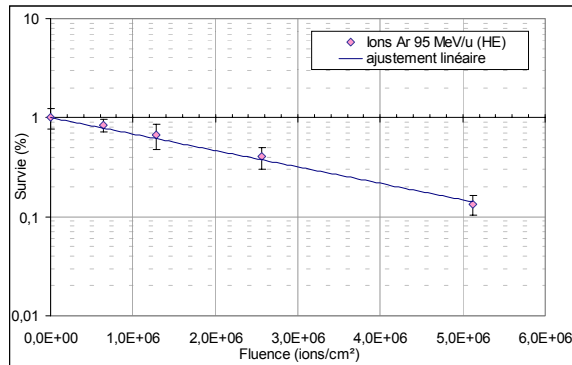
$$S(D) = e^{-\alpha \cdot D + \beta D^2}$$

$\alpha \sim 0,23/\text{Gy}$
 $\beta \sim 0,062/\text{Gy}^2$

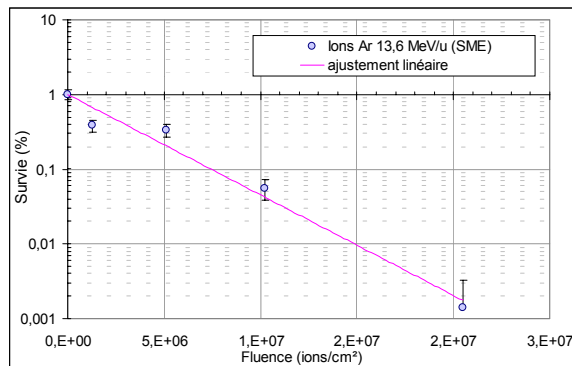
$D_{1/10} (\gamma) = 4,6 \text{ Gy} \rightarrow \text{B3 plus radiosensibles que V79 } (D_{1/10} \sim 7 \text{ Gy})$

Survie cellulaire en ions lourds

Cellules B3

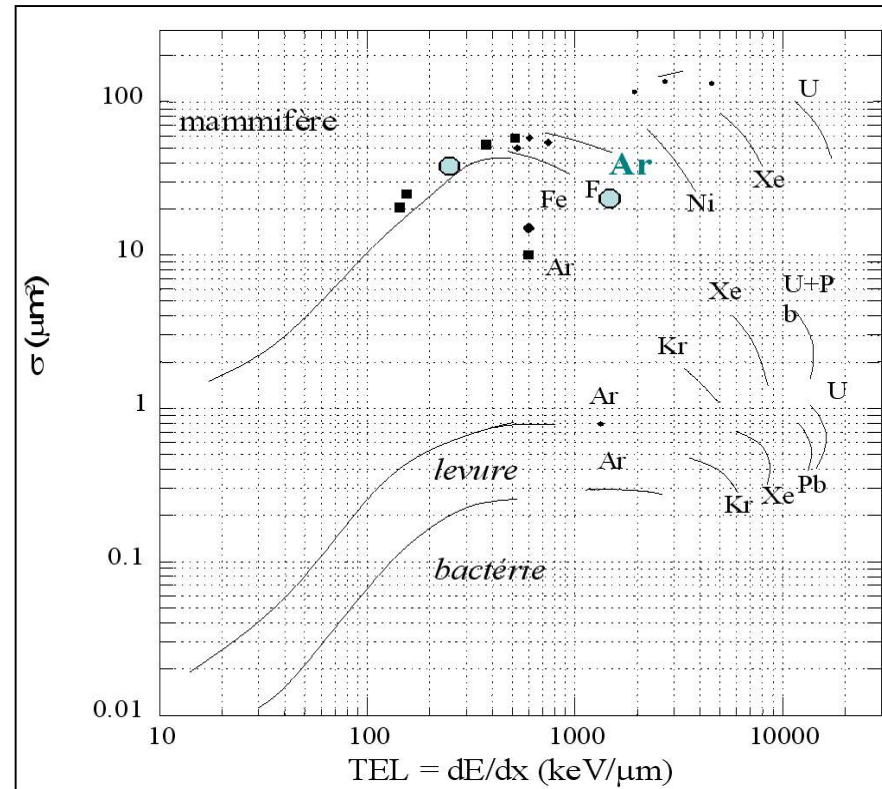


→ $\sigma_{253\text{keV}/\mu\text{m}} = 36\mu\text{m}^2$



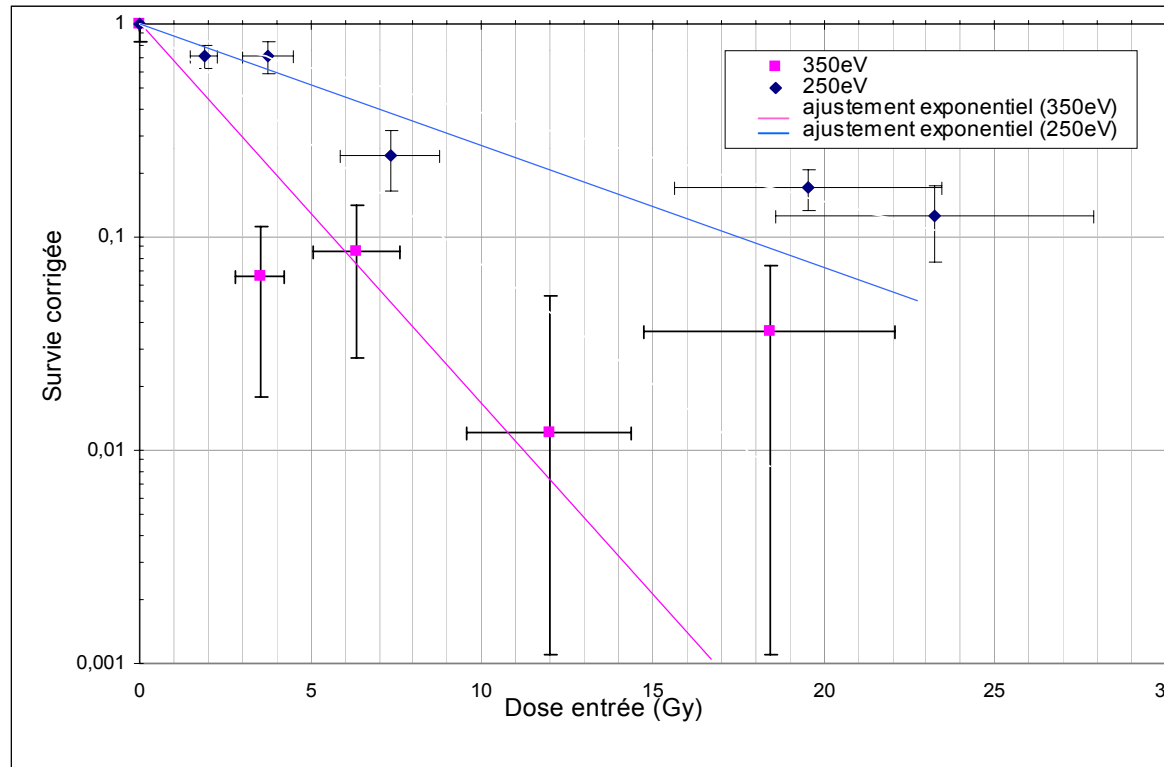
→ $\sigma_{1325\text{keV}/\mu\text{m}} = 27\mu\text{m}^2$

Cellules V79 (rappel)



- $\sigma(B3) \sim \sigma(V79)$
- $\sigma(B3)$ en accord avec le comportement en crochet des V79

Survie cellulaire en rayonnement X ultra-mous (250eV et 350eV)



barres d'erreur importantes :

- transport des cellules

- double couche

$$\text{EBR}(250\text{eV})\gamma \sim 3 \text{ et } \text{EBR}(350\text{eV})\gamma \sim 9$$

$$\text{EBR}(350/250) = 3 \pm 0,9$$

→ On retrouve pour des cellules humaines la corrélation événement « K » - événement létal mise en évidence pour les V79

→ Cette corrélation traduit très vraisemblablement une relation de causalité

- Introduction

- Contexte & Objectifs

- Méthodes expérimentales

- Résultats

1. Survie cellulaire

2. **Aberrations chromosomiques**

3. Contribution « K » à la létalité des rayonnements γ

- Conclusions et perspectives

Translocations induites par rayons X ultra-mous à 250 eV et 350 eV

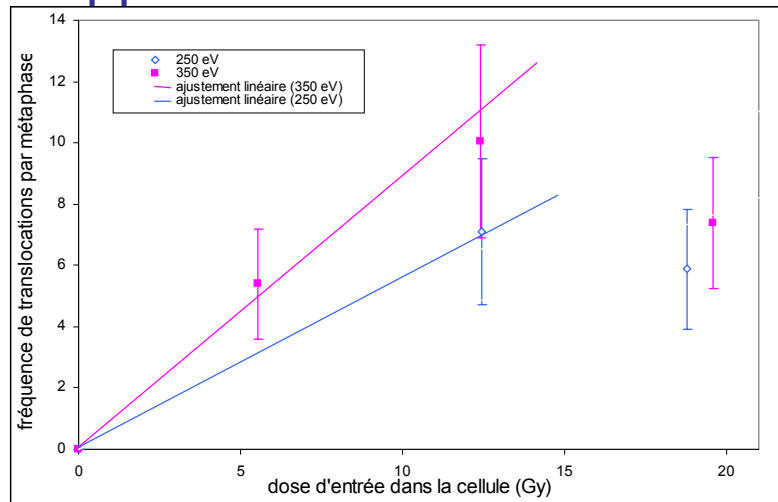
Rapport d'EBR d'induction de translocations entre ces deux énergies :

$$\text{EBR}(350/250) \sim 1,8$$

grandes barres d'erreur liées

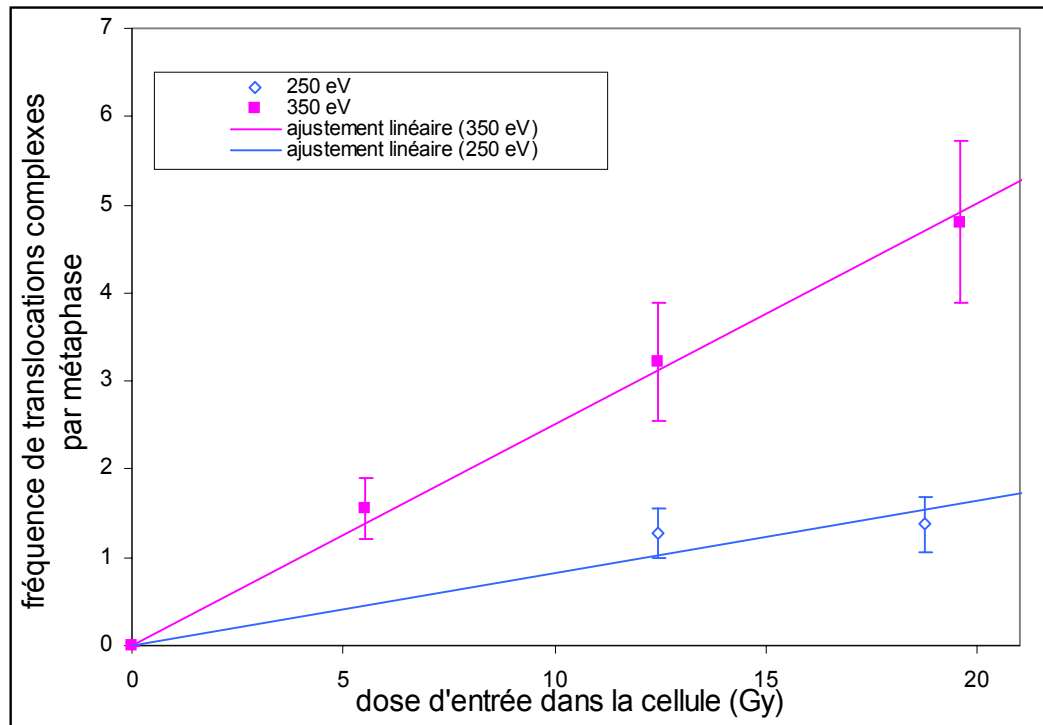
- témoin instable

- statistique très faible



- Possible efficacité accrue d'induction de translocations pour le rayonnement à 350 eV ($\sim \times 1,8$) malgré des barres d'erreur importantes.
- Le rapport d'induction 350/250 pour les V79 était de $2,8 \pm 1$

Aberrations d'échange complexes (*plus de 2 cassures dans plus de 2 chromosomes*) induites par rayons X ultra-mous à 250 eV et 350 eV

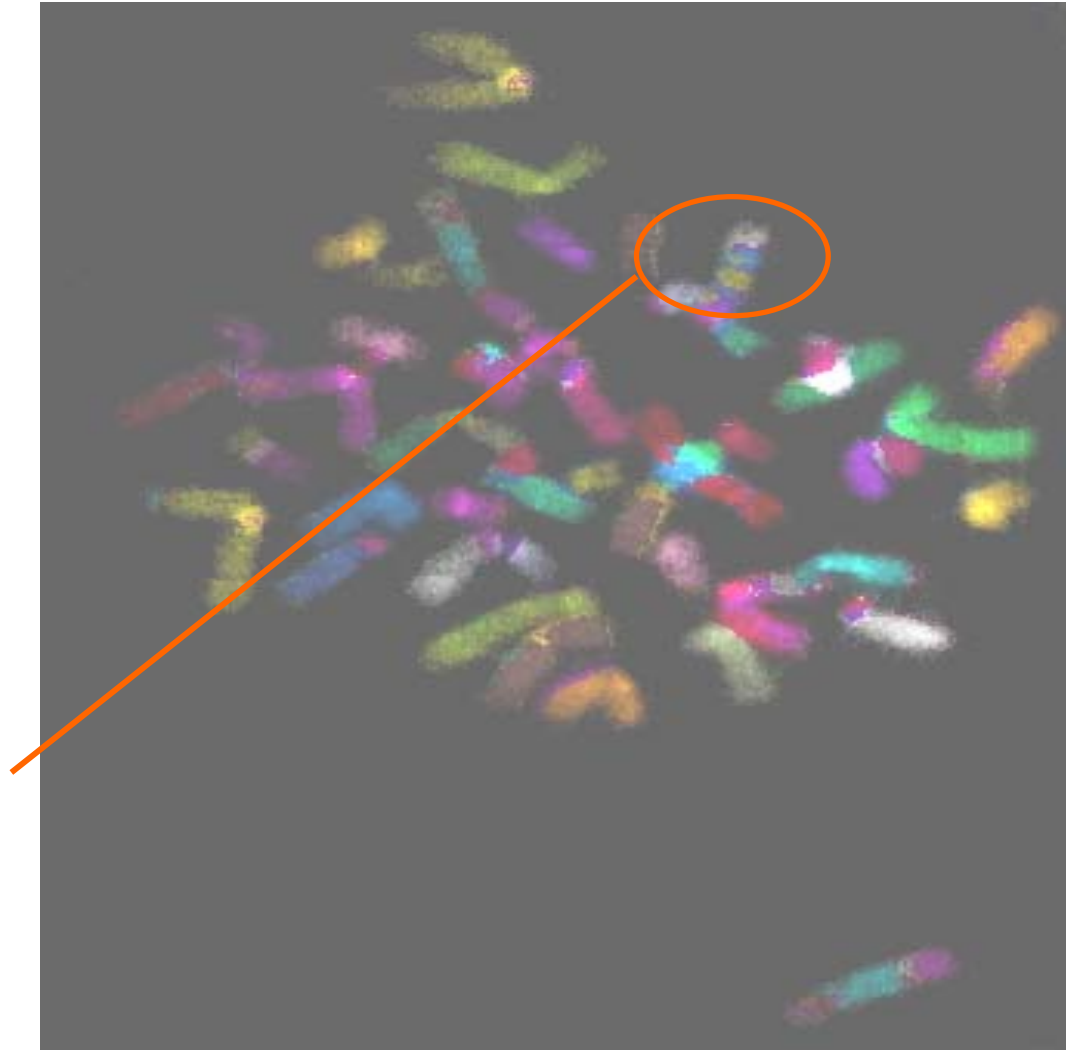


Aucun échange complexe dans les témoins non irradiés

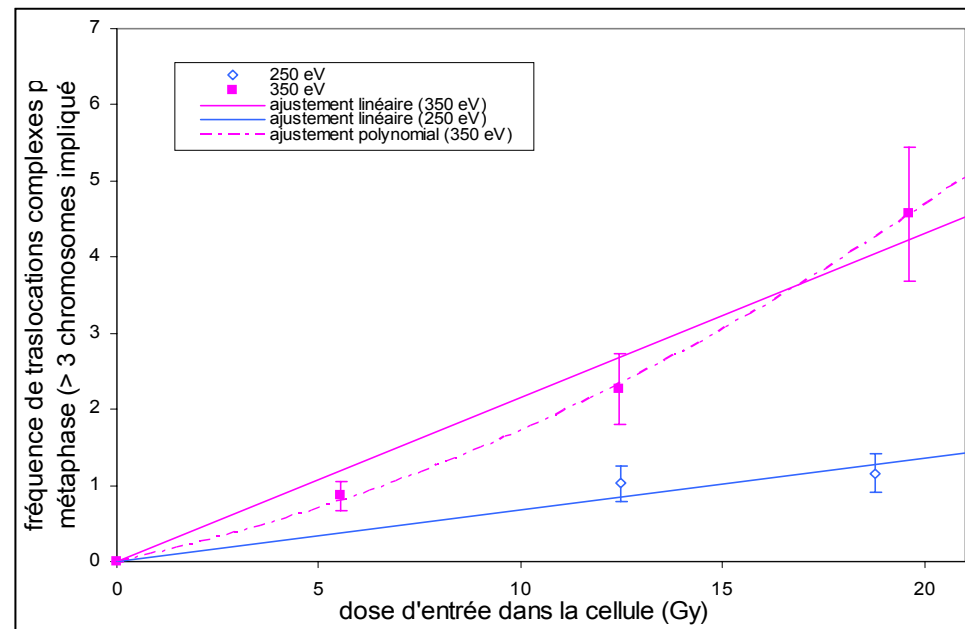
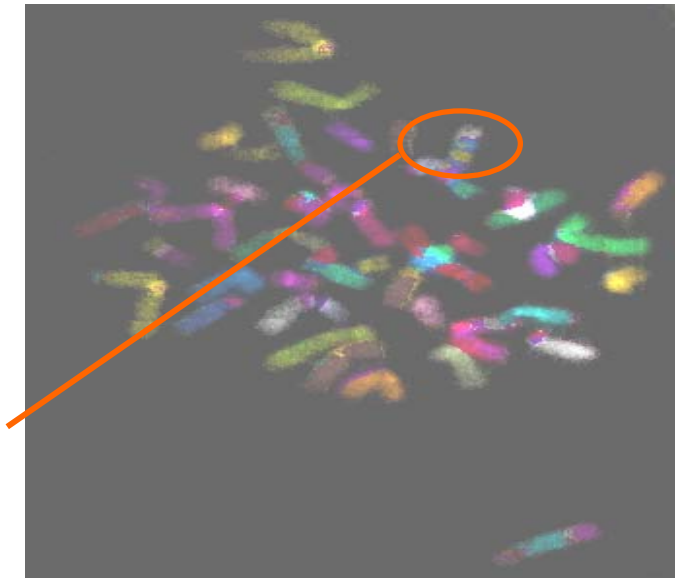
EBR(350/250eV) ~ 3,3

- Capacité des X ultra-mous à induire des échanges complexes déjà observée par Griffin et al. (2003).
- Mise en évidence d'une sur-efficacité du rayonnement à 350 eV / 250 eV tout à fait nouvelle pour ce type d'aberrations.

Aberrations chromosomiques complexes impliquant plus de 3 chromosomes induites par rayons X ultra-mous à 250 eV et 350 eV



Aberrations chromosomiques complexes impliquant plus de 3 chromosomes induites par rayons X ultra-mous à 250 eV et 350 eV



- $EBR(350eV/250eV) \sim 4$: grande sur-efficacité du rayonnement à 350 eV
- Accroissement de la complexité avec la dose.
- Complexité plus importante à 350 eV / 250 eV

Discussion

- Une aberration complexe peut-elle être engendrée par 1 événement « K » unique ?
 - . possible au vu de la quasi-linéarité à basse dose
- Sur-efficacité d'induction à 350eV/250eV :
 - . corrélation avec les événements « K » sur l'ADN,
- Complexité des aberrations accrue à 350 eV / 250 eV :
 - . lésions plus complexes ? → réparation plus difficile → aberrations plus complexes ?

- Introduction

- Contexte & Objectifs

- Méthodes expérimentales

- Résultats

1. Survie cellulaire

2. Aberrations chromosomiques

3. Contribution « K » à la létalité des rayonnements γ

- Conclusions et perspectives

Contribution des événements « K » à l'inactivation cellulaire pour les rayonnements usuels de bas TEL (*cas des cellules V79*).

Étapes du calcul :

- Simulation Monte Carlo des événements dans la trace de rayonnements de bas TEL (*e^- rapides de 100 keV*)
- Détermination du rendement d'événements de cœur créés par ce rayonnement-type sur l'ADN (*cellules V79*) –en partant de l'interaction e^-_{100keV} / molécule H_2O .
- Extraction du rendement en événements létaux théorique ($\eta_{\text{lét.K}}$), et comparaison avec le rendement en événements létaux expérimental ($\eta_{\text{lét.exp}}$).
 - Le rapport de ces 2 $\eta_{\text{lét}}$ correspond à la **contribution « K »**

Principe du calcul

- $\eta_{\text{létal.exp}}$ est extrait de la dose correspondant à 1/10 de survie, $D_{1/10}$

$$\rightarrow \eta_{\text{létal.exp}} = \frac{\ln(P_{\text{survie}=1/10}) \times EBR_{e^{-100\text{keV}}}}{D_{1/10}({}^{60}\text{Co})} \approx 0,28$$

$$S = e^{-\eta_{\text{lét}} \times D}$$

$$EBR_{\text{Ray.}} = \frac{D_{1/10}({}^{60}\text{Co})}{D_{1/10}(\text{Ray.})}$$

- Le nombre moyen d'événements létaux par gray provenant d'événements « K » sur l'ADN est :

$$\eta_{\text{létal.K}} = \sum_i \eta_{K_i} \times \langle \varepsilon_{\text{lét}}^i(E) \rangle$$

η_{K_i}

: nombre d'événements de coeur par gray pour l'espèce i considérée

$\langle \varepsilon_{\text{lét}}^i(E) \rangle$

: efficacité létale moyenne relative aux événements de coeur de l'espèce i

→ On aura donc pour la contribution « K » à la létalité :

$$C_K = \frac{\sum_i \eta_{K_i} \times \langle \varepsilon_{\text{lét}}^i(E) \rangle}{0,29}$$

Calcul du nombre d'événements « K » sur l'ADN

- Évaluation du nombre moyen N_K d'événements « K » créés par 1Gy d' e^-_{100keV} / l'eau.

→ déduction de η_K , nombre d'événements « K » sur l'ADN par Gy absorbé, en corrigeant des nombres d'atomes en présence et de leurs capacités relatives à être ionisés en couche interne.

- Pour un noyau de cellule V79 (M=289pg), 1Gy d' $e^-_{100keV} \equiv N_e$ électrons de 100keV absorbé par le noyau ($N_e=18,1$).

$$\rightarrow \eta_K = N_e \times N_K \times \left\langle \frac{[n_C \times \sigma_K^C(E) + n_O \times \sigma_K^O(E) + n_P \times 4 \times \sigma_L^P(E) + n_N \times \sigma_K^N(E) + n_{Na} \times \sigma_K^{Na}(E)]}{N_{H_2O} \times \sigma_K^O} \right\rangle$$

- Deux codes Monte Carlo TILDA et TRACELE ont été utilisé :

code	N_K
TILDA	8
TRACELE	9,4



code	η_K
TILDA	8,1
TRACELE	9,5

Efficacité moyenne attribuée à un événement de cœur ε_K^i

→ ε_K^i calculée en s'appuyant sur les valeurs expérimentales en rayons X mous et moyennée sur l'ensemble des valeurs possibles des énergies des e⁻ secondaires.

Type d'ionisation (i)	E_A : Energie des électrons Auger (eV)	Energie médiane des électrons secondaires (eV)	$\langle \varepsilon_{\text{let}}^i(E) \rangle$
couche K de C	250	147	3,0%
couche K de N	360	205	2,4%
couche K de O	500	273	1,7%
couche L de P	110	77	1,1%

Contribution « K » à la létalité des rayonnements de bas TEL

code	$\eta_{\text{létal.K}}$	$\eta_{\text{létal.exp (V79)}}$
TILDA (e ⁻ rapides 100 keV)	0,18	0,28
TRACELE (e ⁻ rapides 100 keV)	0,21	0,28
PARTRACK (photons de 1 MeV)	0,24	0,33

La contribution des événements « K » à l'inactivation cellulaire des rayonnements de bas TEL (e⁻ rapides et γ) pour la lignée cellulaire V79 est donc :

→ $\langle C_K \rangle = 75\% \pm 25\%$

- Introduction

- Contexte & Objectifs

- Méthodes expérimentales

- Résultats

1. Survie cellulaire

2. Aberrations chromosomiques

3. Contribution « K » à la létalité des rayonnements γ

- Conclusions et perspectives

Conclusions

- Reproduction des résultats établis auparavant en cellules de mammifères avec des cellules humaines B3 en X mous et en ions.

- sections efficaces d'inactivation cellulaire en ions lourds en accord avec les «crochets» des sections efficaces d'ionisation « K ».

- forte « sur-efficacité » biologique pour l'inactivation cellulaire et la production d'aberrations d'échanges à 350 eV par rapport à 250 eV en rayonnement X ultra-mous, reproduisant l'accroissement d'événements « K » sur l'ADN.

- Les événements de cœur sur l'ADN apparaissent comme responsables des effets biologiques des X ultra-mous.









- Contribution des événements « K » à l'inactivation cellulaire induite par les rayonnements utilisés en radiothérapie et impliqués dans les risques radiologiques (e⁻ rapides et γ)

→ 75±25%

Perspectives

- Étude de la contribution des événements « K » à l'induction d'aberrations chromosomiques d'échange par rayonnement γ et e^- rapides
- Recherche d'un rôle éventuel des événements de cœur dans l'induction des aberrations 'retardées'.
- Détermination des mécanismes mis en jeu :
 - *étude de la complexité des cassures doubles brin induites par les événements « K » ainsi que leur réparabilité.*
 - *étude de la fragmentation moléculaire de l'ADN induite par les ionisations en couche interne.*
- Contribution à l'élaboration de protocoles thérapeutiques :
 - *calcul des EBR des ions lourds*
 - *prédiction des effets d'atomes lourds photo-ionisés au seuil K incorporés dans les cellules tumorales.*
 - *prédiction des effets d'émetteurs Auger incorporés dans les cellules tumorales.*

Plan de l'exposé

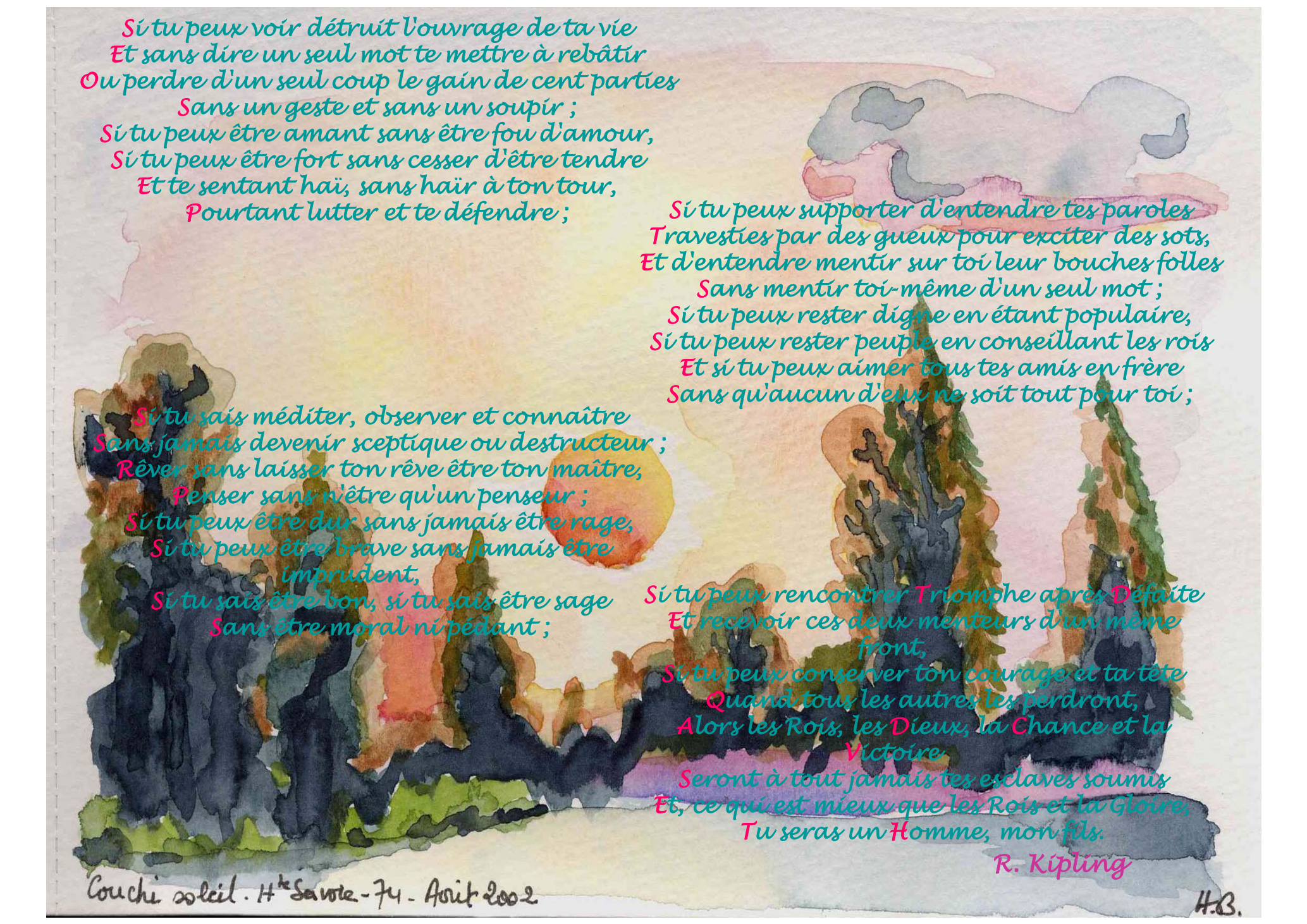
- Introduction 
- Problématique & Objectifs  
- Méthodes expérimentales 
- Résultats
 1. Survie cellulaire 
 2. Aberrations chromosomiques 
 3. Contribution « K » à la létalité des rayonnements γ 
- Conclusions et perspectives 

À mon Papa

Merci ;-)

Coucher soleil. H^{te} Savoie - 74 - Août 2002

H.B.

A watercolor illustration of a landscape. In the foreground, there are dark, silhouetted trees and bushes. In the middle ground, a large, bright orange sun is setting or rising, casting a warm glow over the scene. The background is a soft, hazy sky with light pink and blue tones. The overall style is soft and painterly.

*Si tu peux voir détruit l'ouvrage de ta vie
Et sans dire un seul mot te mettre à rebâtir
Ou perdre d'un seul coup le gain de cent parties
Sans un geste et sans un soupir ;
Si tu peux être amant sans être fou d'amour,
Si tu peux être fort sans cesser d'être tendre
Et te sentant haï, sans haïr à ton tour,
Pourtant lutter et te défendre ;*

*Si tu sais méditer, observer et connaître
Sans jamais devenir sceptique ou destructeur ;
Rêver sans laisser ton rêve être ton maître,
Penser sans n'être qu'un penseur ;
Si tu peux être dur sans jamais être rage,
Si tu peux être brave sans jamais être
imprudent,
Si tu sais être bon, si tu sais être sage
Sans être moral ni pédant ;*

*Si tu peux supporter d'entendre tes paroles
Travesties par des gueux pour exciter des sots,
Et d'entendre mentir sur toi leur bouches folles
Sans mentir toi-même d'un seul mot ;
Si tu peux rester digne en étant populaire,
Si tu peux rester peuple en conseillant les rois
Et si tu peux aimer tous tes amis en frère
Sans qu'aucun d'eux ne soit tout pour toi ;*

*Si tu peux rencontrer Triomphe après Défaite
Et recevoir ces deux menteurs d'un même
front,
Si tu peux conserver ton courage et ta tête
Quand tous les autres les perdront,
Alors les Rois, les Dieux, la Chance et la
Victoire
Seront à tout jamais tes esclaves soumis
Et, ce qui est mieux que les Rois et la Gloire,
Tu seras un Homme, mon fils.*

R. Kipling

Couché soleil. H^{te} Savote - 74 - Août 2002

H.B.