



HAL
open science

Contribution “ K ” à l’effet biologique des rayonnements ionisants

Arnaud Boissière

► **To cite this version:**

Arnaud Boissière. Contribution “ K ” à l’effet biologique des rayonnements ionisants. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2004. Français. NNT: . tel-00006928v3

HAL Id: tel-00006928

<https://theses.hal.science/tel-00006928v3>

Submitted on 26 Jul 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PIERRE & MARIE CURIE

spécialité

Physique

présentée par

Mr Arnaud BOISSIÈRE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

Sujet de la thèse :

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

soutenue le 08 septembre 2004

devant le jury composé de :

Mme Miglena ANGELOVA
Mme Monique GARDÈS-ALBERT
Mme Evelyne SAGE
Mme Laure SABATIER
Mme Annie CHETIOUI

Présidente du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Directrice de thèse

À mon Papa,

Remerciements

En espérant n'oublier personne, je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin m'ont entouré durant ces 3 dernières années.

À Annie CHETIOUI, pour son attention et sa disponibilité, et pour m'avoir entraîné avec persévérance au-delà de ce que je me croyais capable.

À Laure SABATIER, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et avoir presque réussi à convertir un physicien... Je suis en tout cas totalement hybridé *in vivo* d'un bout à l'autre de mes télomères ;))

Je tiens à remercier ici tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir juger de la qualité de ce travail. Merci à Monique GARDÈS et à Evelyne SAGE d'avoir lu ce manuscrit avec attention et objectivité dans des délais *raccourcis*.

À Alope CHATTERJEE, pour ses conseils et nos très fructueuses discussions.

À Mark HILL, Terry JENNER et David STEVENS pour leur aide et leurs conseils.

À Luis MARTINS, de Paris à Marseille en passant par le Portugal, il n'y a qu'une seule « *voix* », merci pour tous ces échanges et ta présence.

À Belle-Maman, ton soutien et ton écoute m'ont été d'un grand recours, je me suis senti apprivoisé et j'ai pu trouver ma place dans cette *bio*-sphère. Ça fait un bout de chemin dis donc, merci pour tout et je te renvoie de mon mieux toute cette Attention.

À *Raggio del Sole*, à l'italienne ; tu m'as fait grandir et ton regard, ton soutien et ta présence ont été d'une grande importance. Bonne route Miss.

À 'ti Léopard, ah là là, entre nos tâches et nos 'ti têtes, on a presque tout dit. Merci d'avoir été là dans tous ces instants parfois déroutants, on a construit une belle marche, j'y tiens et j'en suis fier.

À Chantal DESMAZE, merci pour ta présence, ton écoute et tes grognements constructifs et objectifs (j'en redemanderais... ;)

À Alain TOUATI, Marie-Françoise POLITIS, pour votre écoute et temporisation, merci de m'avoir accompagné. Je n'oublie pas François ABEL, Marie-Anne H. d P., Nicole DAGENS, Jean-Michel GUIGNER, un intérimaire François-N G. ;) et les médecins de service (si si il y en a !) ; Krystof, Marquise Emily, Fabien, Dominique, Jean-Pierre, Charlotte (et j'en oublie sûrement), à tous ces Rires (y a largement une Majuscule...), sourires et instants partagés. Merci également à Jacques JUPILLE, '*parrain*' de thèse, pour nos quelques discussions à chaque fois éclairées et avisées.

À Annie VERNIQUE, pour m'avoir supporté, entre autre « dans ton dos », et avoir su apprécier mes feux d'artifices.

À Ladislav, pour ton acharnement à faire de magnifiques boiboîtes que je me suis évertué à détruire au scalpel !

À 'ti Sandrine, pour ta bonne humeur débordante -très appréciée de la Zoreille que je suis-, et pour ton sourire chaleureux qui m'ont toujours réconforté et dynamisé.

À Gégé, sans qui je ne '*cuisinerais*' pas *bio* aujourd'hui (même tout seul et elle n'en revient pas), et à toute l'équipe du labo de bio, Ludo, Olivier, Luc, Jozo, Hélène, Julien, Ken, Jean-Charles, Ali, Karine, Christophe, Renaud, Noëlle, M-AM, et sans les oublier (hé hé) Ga-L et LN pour leur relativisme, chaleur et sympathie qui ont été très appréciés et m'ont accompagné dans un petit bureau ZenVrac ;) toute cette année !

À Xander et Choupette, pour votre présence -de cœur-, à votre image tout paraît simple et lumineux. C'est une bouffée d'O₂ de vous avoir à mes côtés, merci beaucoup d'être là et d'être vous.

À Brother James, voici un autre « you've done it » ; oui ! Si j'ai toujours connu le chemin, vous l'avez éclairé bien des fois. Merci infiniment.

À Laurent, bien que loin ces derniers temps, ta petite famille et toi m'avez beaucoup apporté et j'ai réussi à avancer.

À Lisou, Oyf, Laure, Sandra, Enid (&David), Paupau, 'ti poison (même grand en fait !... ;), Pascalou&Carolyne, Yves, Roswitha, Roberto, Véro, Tistoon, Fredouille, Will, Dany, Daisy, Heidi, Isa, Mag, Hélène (*made in Belgium*), pour ces instants à vos côtés, chantés, criés, pleurés. Pour m'avoir supporté encouragé, engueulé, écouté et vice-versa. Vous avez contribué à ce que je suis aujourd'hui et un piti peu à ce qu'il y a dans ces 182 pages.

À M^{me} Lapin -origine de la Bo-nEr-, ton regard, ton soutien et ta présence ont été bien au-delà de toute attente et m'ont incroyablement fait rayonner. Voici un hymne-*abstract aux ondes Indochinoises qui ont inlassablement contribué à nos sourires !*

L'ADN, cible privilégiée des ondes Indochine !

L'action du rayonnement des ondes Indochine sur l'ADN, qu'il s'agisse de chansons qui datent un peu mais qu'on aime tant ou de nouvelles qu'on aime encore plus, n'est pas souvent mise en évidence. Pourtant, ce rayonnement est très connu de tous les savants chercheurs en Bo-nEr qui ont pu identifier, au cours de leurs différents travaux élaborés depuis le début des années 80, la molécule du même nom.

Cette molécule est générée par des ondes rayonnantes très positives et stockée sous forme de dépôts d'énergie localisés sur un des constituants de l'ADN. Une fois pénétrée dans l'organisme, la molécule se développe très vite si elle est exposée de façon fréquente à ses ondes génératrices nommées Indochine.

Ces ondes interagissent chimiquement avec l'ADN. Mais pourquoi l'ADN est-il leur cible ? Il est en fait clairement identifié comme la principale entité euphorisante et sensible d'un organisme irradié par les ondes Indochine. Toute irradiation des cellules par les ondes Indochine crée donc des lésions de Bo-nEr importantes sur l'ADN, qui incapables d'en oublier les effets, développe une Indodépendance aiguë.

Les récentes recherches de scientifiques malveillants ont cherché à supprimer ces effets ou à en irradier la source c'est à dire leur support. Celui-ci s'est par chance développé sur un support matériel très prolifique le CD. Ainsi l'effusion d'ondes Indochine et de lésions Bo-nEr n'a pas fini de se développer... Pourquoi le mot chance a-t-il été employé ? Parce que les tous derniers travaux réalisés ont permis de conclure aux bienfaits indéniables de ces ondes. Les individus porteurs sont souriants et sains ; ils développent une énergie considérable pour répandre les ondes Indochine et créer partout de nouveaux foyers de lésions Bo-nEr.

Conclusion : Le mécanisme de ses ondes et leurs bienfaits ayant été identifiés, les recherches vont dorénavant s'orienter vers l'amplification des ondes Indochine.

Merci miss, je me suis senti vivant et heureux d'être à mon tour un foyer Bo-nEr plein de frisouilles.

À Coucounette, dans tous les sens, nos « entre-chat » ont faits bien plus que des étincelles, les pôv' t... et les 'tit' têtes n'ont qu'à bien se tenir (histoire d'avoir le dernier mot...). J'dirais presque continue à m'bousculer, mais pas trop quand même je suis ton aîné... Ces trois dernières années ne sont rien à côté des cavalcades prévues entre Titi&Co. pour toutes celles à venir.

À Mamounette, pour avoir toujours cru en moi et pour m'avoir toujours encouragé. Pour m'avoir supporté, écouté. Pour m'avoir donné tant et faire que je suis Moi aujourd'hui (assis sur un bon petit pavé en passant ;)

Papa, tout idem bien évidemment, pour avoir été si fier de moi. Pour avoir inondé ma chambre de couchers de soleil depuis tout bébé. Je n'ai eu qu'une envie, presque inconsciemment, c'est de comprendre pourquoi le ciel est bleu et les couchers de soleil rougeoyants. Ceci fait, tu t'es mis à les dessiner et à les peindre. À mon tour je m'y mettrais peut être un jour. Pour être mon Papa au-delà du temps et du soleil, Merci. Qui sait ce qu'il y a sur Véga ? Ton petit bonhomme te laisse à ta lecture, et promis on ne te changera pas ta page ;p



Sommaire

Introduction :	15
Chapitre I :	19
A - Interaction des rayonnements avec la matière biologique	20
I – <u>Interaction des rayonnements ionisants avec la matière</u>	22
I.1 – <i>Interaction des ions avec la matière</i>	22
– Ionisation	23
– Excitation	23
– Capture électronique	23
I.2 – <i>Interaction des électrons avec la matière</i>	25
I.3 – <i>Interaction des rayonnements électromagnétiques avec la matière</i>	26
– Effet photoélectrique :	26
– Effet Compton :	26
– Création de paires ou matérialisation	27
II – <u>L'ADN, cible privilégiée des rayonnements</u>	28
III – <u>Les dommages d'ADN radio-induits</u>	30
IV – <u>Quantification des effets biologiques des rayonnements : EBR et section efficace</u>	31
B - Cassures double brin d'ADN & Stabilité chromosomique	33
Recombinaison homologue	35
Religation non-homologue	36
cdb et instabilité chromosomique	37
C - Aberrations chromosomiques radio induites	39
Une diversité panachée de types d'aberrations	40
Les voies de formation des aberrations	42
Localisation des chromosomes et effets de voisinage	44
Modélisation quantitative des mécanismes de formation des aberrations	45
Aberrations très complexes	46
Prédictions des modèles sur la dépendance par rapport à la dose et au débit de dose	47
Aspects médicaux et de santé publique	50
Conclusion et perspectives	53

Chapitre II : Modèles physiques d'effets biologiques des rayonnements ionisants 54

I –	<u>Modèles de trace amorphe</u>	56
	<i>Modèle de Kraft - Local Effect Model</i>	56
II –	<u>Modèles de trace stochastique</u>	58
II.1 –	<i>Modèle des clusters de fin de trace</i>	58
II.2 –	<i>Modèle d'ionisation de cœur</i>	64
	– Evénements d'ionisation en couche interne	64
	– Modèle d'événement de cœur	66
	– Schéma proposé pour l'induction de lésions complexes sur l'ADN par ICI	68
	– Efficacité biologique des ionisations K du phosphore	70
II.3 –	<i>Test de l'efficacité biologique des événements « K »</i>	71

Chapitre III : Méthodes physiques et biologiques 73

A - Méthodes physiques 74

I –	<u>Irradiation en rayons X ultra mous</u>	75
I.1 –	<i>Rayonnement Synchrotron</i>	75
I.2 –	<i>LURE - Ligne SU7</i>	76
I.3 –	<i>Extraction du faisceau</i>	78
I.4 –	<i>Dispositif d'irradiation</i>	80
I.5 –	<i>Energies stratégiques – iso-atténuation</i>	80
I.6 –	<i>Les détecteurs</i>	81
	– La photodiode	81
	– La chambre d'ionisation	82
	– Comparaison des détecteurs	83
I.7 –	<i>Détermination des épaisseurs des échantillons de matière interposés sur le trajet du faisceau</i>	85
	– Méthodes de mesure des épaisseurs	85
	– Résultats de mesure des épaisseurs des matériaux interposés sur le trajet du faisceau	87

I.8 –	<i>Détermination des épaisseurs des composants cellulaires</i>	88
I.9 –	<i>Calcul des doses moyennes dans le noyau cellulaire</i>	90
I.10 –	<i>Harmoniques</i>	91
II –	<u>Irradiation en ions lourds</u>	94
II.1 –	<i>Le GANIL</i>	94
II.2 –	<i>Dispositif expérimental</i>	97
II.3 –	<i>Conditions d'irradiation</i>	97
II.4 –	<i>Contrôle du faisceau et mesure de la fluence</i>	98
II.5 –	<i>TEL des ions à l'entrée des échantillons</i>	99
II.6 –	<i>Détermination de la dose dans la cellule</i>	100
III –	<u>Irradiation par des rayonnements γ</u>	102
B -	Méthodes biologiques	103
I –	<u>Culture et caractérisation des cellules</u>	104
I.1 –	<i>Culture en monocouches sur des feuilles de mylar minces</i>	104
I.2 –	<i>Synchronisation et cycle cellulaire</i>	106
I.3 –	<i>Durée du cycle cellulaire et proportions de cellules en générations successives</i>	107
I.4 –	<i>Indice mitotique</i>	110
II –	<u>Irradiation</u>	110
III –	<u>Traitement post-irradiation</u>	111
IV –	<u>Caryotype à 24^h</u>	113
V –	<u>Visualisation des aberrations chromosomiques :</u>	113
V.1 –	<i>Fluorescence par Hybridation in Situ (FISH)</i>	114
V.2 –	<i>Microscopie par fluorescence</i>	116
V.3 –	<i>Exemple de visualisation de caryotype par mFISH</i>	118

Chapitre IV : Résultats	121
A - Mort cellulaire	122
I – <u>Survie cellulaire en rayons γ</u>	122
I.1 – <i>Courbes de survie</i>	122
I.2 – <i>Radiosensibilité</i>	123
II – <u>Survie cellulaire en rayons X ultra-mous à 250 eV et 350 eV</u>	124
II.1 – <i>Courbes de survie</i>	124
II.2 – <i>Rapports des EBR à 250 eV et 350 eV</i>	126
III – <u>Survie cellulaire pour des irradiations en ions lourds</u>	128
III.1 – <i>Ions de Haute Energie (HE)</i>	128
III.2 – <i>Ions de Moyenne Energie (SME)</i>	129
III.3 – <i>Incertitudes</i>	131
III.4 – <i>Extraction des sections efficaces d'inactivation cellulaire</i>	131
B - Aberrations chromosomiques induites par rayonnement X ultra-mous aux énergies 250 eV et 350 eV	133
I – <u>Résultats généraux</u>	133
<i>Aberrations d'échange totales</i>	133
<i>Aberrations d'échange simples</i>	136
<i>Caryotype témoin</i>	136
II – <u>Aberrations d'échange complexes :</u>	139
<i>Aberrations complexes standard</i>	139
<i>Aberrations complexes impliquant plus de 3 chromosomes</i>	141
<i>Variation de la complexité des aberrations</i>	144
III – <u>Discussion</u>	146

Chapitre V : Contribution « K » à l'inactivation cellulaire induite par rayonnements de bas TEL	148
I – <u>Principe du calcul de la contribution des événements « K » à la létalité des rayonnements de bas TEL</u>	150
II – <u>Calcul des nombres d'événements « K » sur l'ADN par gray</u>	151
II.1 – <i>Principe du calcul</i>	151
II.2 – <i>Caractéristiques du calcul Monte Carlo utilisé pour évaluer le nombre d'ionisations en couche interne créés par un électron de 100 keV tout le long de sa trajectoire</i>	152
II.3 – <i>Principe du calcul du nombre d'événements «K» sur l'ADN produits dans des cellules soumises à une irradiation de 1Gy en électrons de 100 keV</i>	152
II.4 – <i>Valeurs du nombre, N_K, d'événements «K» créés lors du ralentissement d'un électron de 100 keV dans l'eau, et du rendement η_K sur l'ADN</i>	154
III – <u>Calcul des efficacités létales moyennes des événements de cœur créés par des électrons de 100 keV le long de leur trajectoire</u>	155
IV – <u>Contribution des événements de cœur à l'inactivation cellulaire</u>	158
Conclusion :	159
Annexe :	162
A - <u>Protocole PNA</u>	164
B - <u>Protocole mFISH</u>	167
C - <u>Protocole de fixation des cellules pour l'analyse au microscope confocal</u>	172
Bibliographie :	173

Introduction

Introduction

Le monde dans lequel nous vivons est un monde « rayonnant » : il comprend radioactivité terrestre, rayonnement solaire et cosmique, ainsi que tous les rayonnements que nous produisons.

A l'heure actuelle par exemple, les rayonnements X sont utilisés dans l'imagerie médicale, dans la continuité des premières radiographies du début du XX^{ème} siècle après la découverte par Röntgen du rayonnement X en 1895. La radioactivité, également découverte au début du XX^{ème} siècle par Marie Curie, trouve plusieurs applications médicales (scintigraphie, produit de contraste pour les IRM). L'irradiation d'une manière générale est également utilisée aujourd'hui comme outil de traitement thérapeutique de nombreuses tumeurs. Nous sommes de plus aujourd'hui confrontés à l'émergence de cancers radio-induits, liés aux accidents nucléaires ou à la conquête spatiale.

Les mécanismes initiateurs de la mort cellulaire et des cancers induits par ces rayonnements ionisants demeurent encore méconnus. La radiobiologie est née de cette volonté de comprendre les modes d'action d'un rayonnement ionisant sur l'ADN, une cellule ou un tissu. L'ADN est le site sensible de la cellule et la cible privilégiée des radiations ; cassures double-brin d'ADN et aberrations chromosomiques jouent un rôle clef dans le déclenchement de l'inactivation cellulaire et des aberrations chromosomiques. Une meilleure compréhension des processus physiques à l'origine de l'effet létal des rayonnements devrait pouvoir améliorer la maîtrise de ces derniers en tant qu'outil thérapeutique. De même, la connaissance des événements physiques responsables de l'initiation de cancers devrait permettre une meilleure prévention des cancers radio-induits, ainsi qu'une meilleure estimation des risques liés aux radiations.

Les premières approches théoriques ont tenté d'expliquer les effets biologiques des rayonnements ionisants à l'aide du concept macroscopique de dose et de l'énergie moyenne déposée le long de la trajectoire d'une particule ionisante (TEL). Ces modèles à l'échelle du micron, émergents dans la seconde moitié du XX^{ème} siècle (Butts, Katz et al.) étaient en assez bon accord avec les résultats de l'époque et sont encore largement utilisés dans les domaines appliqués pour paramétrer les effets des rayonnements ionisants. Dans les années 80, il s'est avéré qu'une telle approche était insuffisante pour rendre réellement compte des mécanismes mis en jeu (Goodhead, Thacker et al.). Ainsi tout en tenant compte de la quantité d'énergie déposée dans la cible, il est important de prendre en considération la manière dont cette énergie est déposée à l'échelle du nanomètre.

Le modèle pionnier dans cette nouvelle approche est celui des micro-dépôts (Goodhead et al.) dans lequel l'efficacité létale des rayonnements est attribuée à des dépôts d'énergie intenses et localisés sur des dimensions typiques de l'ADN (~nm). Ce modèle s'appuie sur la corrélation entre la fréquence d'induction de clusters d'ionisations de fin de trace d'électrons (micro-dépôts) et le nombre d'événements létaux créés par rayonnement X ultra-mou.

A la fin du XX^{ème} siècle, un autre modèle a suggéré que les événements critiques pourraient être à l'échelle atomique-même. Ce modèle, dit modèle « K » ou d'événements « K » (Chetoui et al.) attribue un rôle primordial aux ionisations en couche interne de la matière biologique pour l'induction des effets biologiques. L'hypothèse d'une ionisation de cœur des atomes de l'ADN, comme événement physique primaire responsable de la mort cellulaire, est le point de départ de nombreuses investigations depuis 10 ans. Une première corrélation a été observée entre les sections efficaces d'ionisation « K » des atomes de l'ADN et les sections efficaces d'inactivation cellulaire par des ions de types et d'énergies variés [1]. Une prédiction du modèle concernant l'accroissement de l'efficacité biologique relative des rayonnements X au franchissement du seuil énergétique d'ionisation K du carbone, a été vérifiée à l'issue de plusieurs campagnes d'expériences. Ce phénomène a été observé pour la survie cellulaire [2-4] et pour l'induction d'aberrations chromosomiques (dicentriques + anneaux) [2]. Dans la poursuite de l'investigation du rôle des événements de cœur dans les effets biologiques des rayonnements ionisants, on se demande aujourd'hui si ces événements jouent aussi un rôle dans la transformation maligne de la cellule, en raison de leur capacité à induire des aberrations chromosomiques. En particulier l'étude de leur propension à créer des aberrations d'échange, comme les translocations qui sont considérées comme précurseur de certains cancers radio-induits, représente un des buts de ce travail de recherche.

L'objectif de ce travail est aussi de regarder si les effets initialement observés avec des cellules V79 sont reproduits pour des cellules humaines dans le cas de la mort cellulaire induite par ions, rayons X et γ . Dans le cas de l'induction d'aberrations chromosomiques, on se propose également d'élargir l'étude du rôle des effets « K » à des cellules humaines ainsi qu'à d'autres types d'aberrations chromosomiques comme les translocations. Enfin on étudiera quantitativement la contribution « K » à l'inactivation cellulaire induite par les rayonnements de bas TEL en cellules V79, pour laquelle on a de nombreuses données.

Ce mémoire de thèse s'articulera de la façon suivante :

- Le premier chapitre introduit les notions et concepts relatifs à l'interaction rayonnement-matière utilisés en radiobiologie, et fait un état des lieux sur la compréhension actuelle des effets biologiques des rayonnements ionisants, à travers une section relative aux cassures double-brin d'ADN et une autre relative aux aberrations chromosomiques.
- Le chapitre II expose les différents modèles d'effets biologiques, et présente de façon plus spécifique l'état des connaissances sur les événements physiques considérés comme critiques.
- Le chapitre III présente les méthodes physiques et biologiques nécessaires à cette étude et les dispositifs expérimentaux utilisés.
- Le chapitre IV présente les résultats obtenus dans le cas de l'irradiation de cellules humaines. Une première partie porte sur l'inactivation cellulaire induite par ions, rayonnements γ et X ultra-mou. Une deuxième partie porte sur l'induction d'aberrations d'échange par rayonnement X ultra-mou. Le rôle des événements « K » sera ainsi précisé et discuté.
- Le chapitre V présente le calcul de la contribution des événements de cœur à la létalité des rayonnements usuels (de bas TEL), électrons rapides, rayonnements γ , pour les cellules V79.

Chapitre I

A - Interaction des rayonnements avec la matière biologique

Comprendre le comportement de la matière biologique soumise à irradiation demeure un problème majeur pour la communauté scientifique des physiciens et des biologistes. Qu'il soit de nature électromagnétique, électronique ou ionique, un rayonnement induit dans la matière des dépôts d'énergie parfois très importants et extrêmement localisés. Dans le cadre des applications thérapeutiques et de la prévention, les conséquences biologiques de ces dépôts doivent être maîtrisées. L'interaction physique initiale constitue l'événement initiateur d'une longue séquence d'événements chimiques puis biologiques qui peuvent entraîner une modification du patrimoine génétique ou encore la mort de la cellule. Entre cette interaction primaire et l'apparition des effets biologiques, on relève 5 grandes étapes de durées inégales :

- Une première étape « physique » très courte ($t < 10^{-15}$ s), qui correspond aux tous premiers instants après l'irradiation. Elle entraîne la création d'espèces excitées dans le plasma cellulaire et l'ADN. Elle engendre ainsi une première altération des biomolécules par « effet direct ».

- Une étape « physico-chimique » (10^{-15} s $< t < 10^{-12}$ s) au cours de laquelle les différents produits de l'interaction des rayonnements avec le plasma cellulaire atteignent la température du milieu : c'est le processus de thermalisation qui conduit à la formation de produits radicalaires tels que OH^\bullet , H^\bullet , ainsi que d'électrons thermalisés puis hydratés e_{aq}^- .

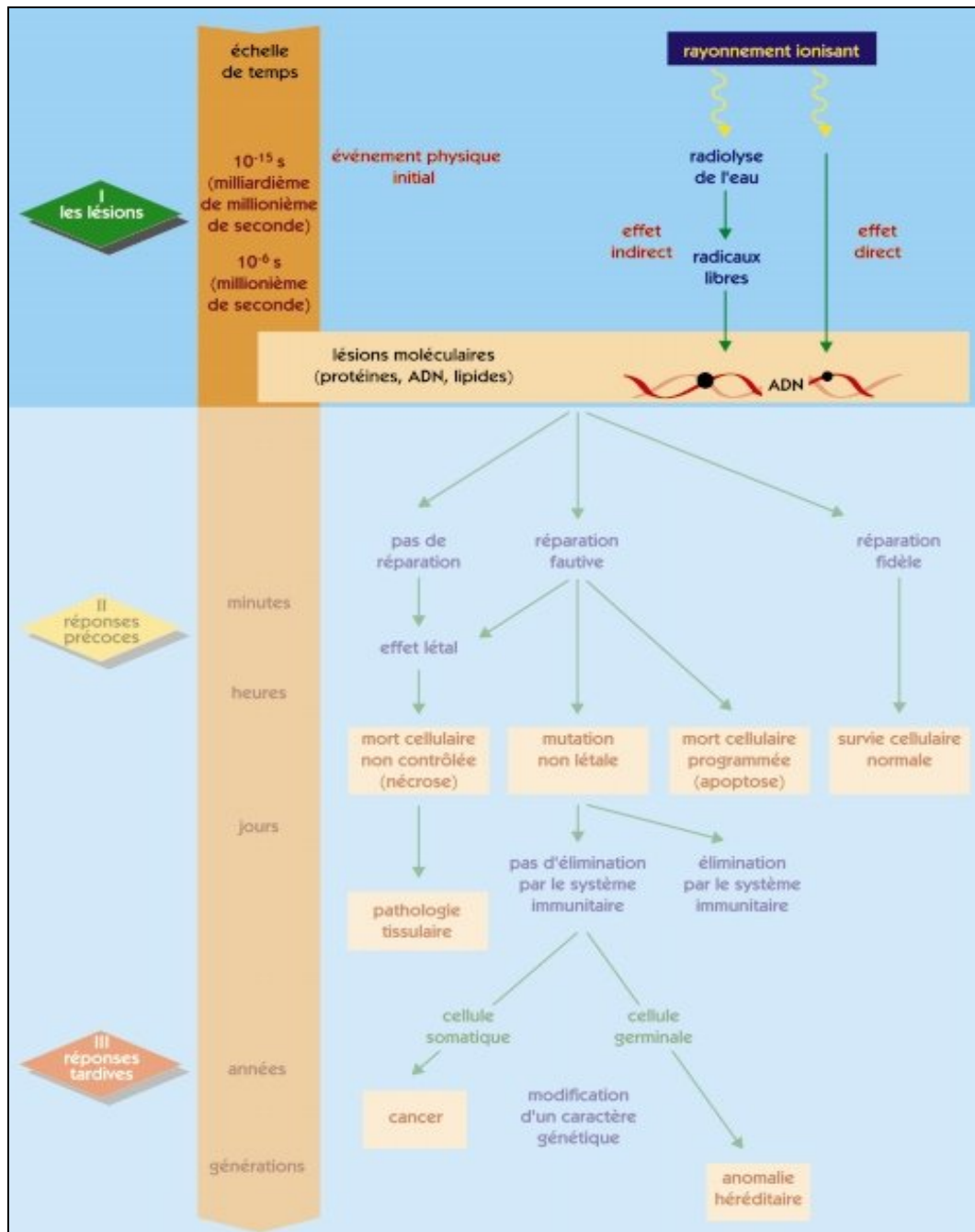
- Une étape « chimique » (10^{-12} s $< t < 10^{-6}$ s), au cours de laquelle les différentes espèces créées diffusent et réagissent entre elles. À la microseconde qui suit l'interaction, la distribution des espèces présentes a ainsi atteint un état stationnaire au sein du milieu.

- Une étape « biochimique », qui débute lorsque les espèces radicalaires produites altèrent chimiquement les biomolécules présentes dans le milieu environnant (effet indirect) et entraînent leur dégradation.

- Une étape « biologique » suivant les altérations des biomolécules et qui correspond à la prise en charge des dommages par les systèmes de réparation cellulaire. Cette réparation (plus ou moins fidèle) peut durer plusieurs heures et se traduit par l'apparition ou non de lésions moléculaires graves.

La figure I-1 résume les différentes étapes suivant une irradiation.

Figure I-1 : chronologie des événements (selon [5] et [101]). Tous les événements indiqués n'ont pas la même probabilité de se produire, la survie cellulaire par exemple est le cas le plus fréquent.



Dans ce qui suit, nous décrirons les processus d'interaction des divers types de rayonnements ionisants avec la matière biologique. Nous présenterons ensuite sommairement les effets biologiques des irradiations.

I – Interaction des rayonnements ionisants avec la matière :

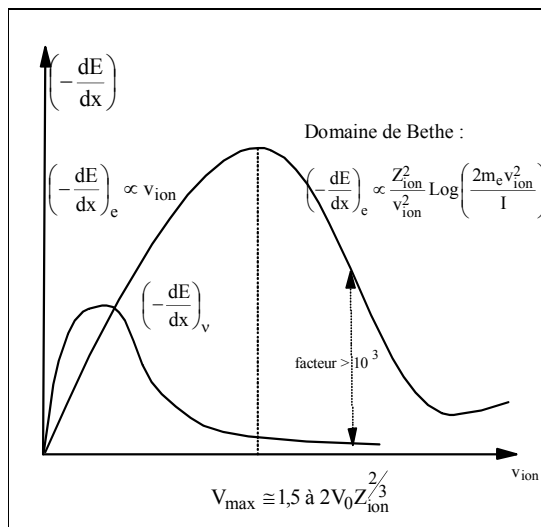
Les rayonnements ionisants comportent les particules chargées (électrons, ions, protons) ou neutres (neutrons), et les photons (rayons X et γ). Ces rayonnements ont en commun la propriété de provoquer des ionisations et excitations atomiques dans les milieux matériels où ils pénètrent.

I.1 – Interaction des ions avec la matière :

Une particule chargée pénétrant dans un milieu interagit avec les atomes du milieu et se ralentit. Les trajectoires des ions peuvent être considérées comme rectilignes.

Une manière de quantifier le transfert d'énergie d'une particule consiste à définir son TEL (Transfert d'Énergie Linéique ou pouvoir d'arrêt lorsqu'il s'agit d'ions) : cette notion représente l'énergie moyenne transférée à la matière par unité de longueur de trajectoire de la particule et s'exprime par exemple en keV/ μm . Le TEL est donc égal à $-dE/dx$, et dépend d'une part des caractéristiques de la particule (son énergie, son nombre de masse A_{ion} et son numéro atomique Z_{ion}) et d'autre part de la nature du milieu traversé. La figure I-2 représente les variations du TEL en fonction de la vitesse de l'ion (V_{ion}).

Figure I-2 : Variation du TEL = $-dE/dx$ en fonction de la vitesse de l'ion incident. On a représenté la contribution élastique (pouvoir d'arrêt nucléaire $(-dE/dx)_v$) et la contribution inélastique (pouvoir d'arrêt électronique $(-dE/dx)_e$) [6].



On constate que suivant le régime de vitesse considéré, le TEL s'exprime différemment :

- Pour des vitesses grandes devant la vitesse des électrons (électrons cibles et électrons de l'ion), c'est-à-dire pour $V_{\text{ion}} \gg V_0 \times Z_{\text{ion}}^{2/3}$ (où V_0 est la vitesse de Bohr), le TEL est donné par la formule de Bethe (figure I-2).
- Pour des vitesses intermédiaires ($V_{\text{ion}} \cong V_0 \times Z_{\text{ion}}^{2/3}$), le TEL passe par un maximum.
- Pour des vitesses faibles ($V_{\text{ion}} \ll V_0 \times Z_{\text{ion}}^{2/3}$), la vitesse de l'ion est très faible devant la vitesse de tous les électrons : il y a réarrangement des niveaux électroniques au cours de l'interaction et formation d'une quasi-molécule. Des électrons passent de l'ion vers l'atome cible et réciproquement : il y a échange de quantités de mouvement d'électrons proportionnel à V_{ion} ; il en résulte un TEL proportionnel à V_{ion} .

La figure I-2 distingue la contribution des pertes élastiques au pouvoir d'arrêt de l'ion, notée $(-dE/dx)_v$, et la contribution des pertes inélastiques, notée $(-dE/dx)_e$. On constate que les pertes d'énergie par collisions élastiques dominent le ralentissement de l'ion uniquement dans le régime des très faibles vitesses ($V_{\text{ion}} \ll V_0 \times Z_{\text{ion}}^{2/3}$) et deviennent négligeables au-delà. Aux vitesses des ions utilisés en radiobiologie l'interaction dominante est donc celle qui s'exerce avec les électrons atomiques. On distingue alors trois processus d'interaction majoritaires :

- Ionisation : si l'interaction est assez intense, le transfert d'énergie peut être suffisant pour arracher un électron de l'atome cible : c'est le phénomène d'*ionisation*. Il y a création d'une paire d'ions (ion positif et électron) dans le milieu.
- Excitation : si l'interaction est insuffisante pour créer une ionisation, il y a seulement *excitation* : l'électron change d'état quantique, l'excitation le fait passer d'un état initial à un état final moins lié. Pour les cibles radiobiologiques ce processus est peu probable
- Capture électronique : Un troisième type de processus consiste en la capture d'un électron de l'atome cible par le projectile. Ce processus intervient surtout lors d'irradiation en ions lourds [1].

La théorie des collisions distingue trois régimes différents selon la valeur du paramètre κ [7]

défini comme : $\kappa = \frac{Z_{ion}}{Z_c} \times \frac{V_e}{V_{ion}}$, où V_e est la vitesse de l'électron sur une couche atomique (ou moléculaire) cible, V_{ion} la vitesse de l'ion incident, et Z_{ion} et Z_c les numéros atomiques du projectile et de la cible.

On distingue :

– la région perturbative, pour $\kappa \ll 1$; ce régime, aussi appelé régime coulombien, est atteint pour des grandes vitesses de collisions et/ou pour des asymétries importantes ($\frac{Z_{ion}}{Z_c} \ll 1$).

Dans ce domaine, la transition électronique est attribuée à la perturbation créée par le projectile. Dans ce cas, une théorie perturbative (qui suppose que l'interaction coulombienne couple directement l'état initial de l'électron à son état final d'excitation) est applicable.

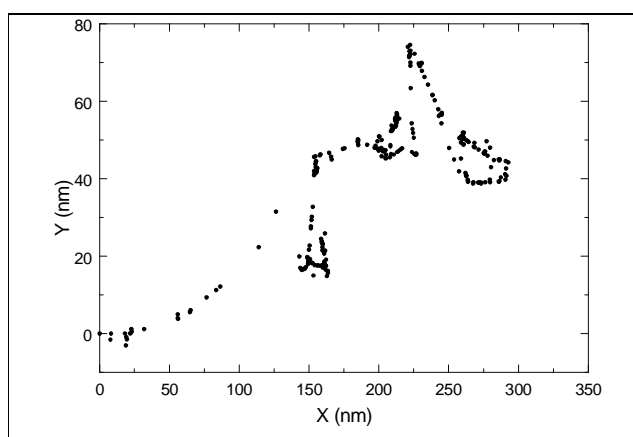
– la région de forte interaction, pour $\kappa \gg 1$; ce régime, aussi appelé quasi moléculaire, est atteint pour des vitesses de collisions inférieures à celle de l'électron actif, entre partenaires de charges nucléaires comparables ou non. La théorie correspondante est basée sur une description adiabatique des états électroniques s'ajustant au mouvement des noyaux. Il y a en fait formation d'une quasi molécule transitoire et la probabilité pour que l'état final d'un électron soit centré sur l'atome cible ou le projectile est approximativement du même ordre de grandeur.

– la région dite « intermédiaire », pour $\kappa \cong 1$. Ce domaine est celui dans lequel s'opère le passage de processus à une diffusion à des processus à plusieurs diffusions de l'électron. Ce dernier, pour atteindre son état final peut passer par des états intermédiaires centrés sur la cible ou le projectile. Dans ce domaine de κ , la description théorique est généralement basée sur un formalisme d'ondes distordues.

I – 2. Interaction des électrons avec la matière :

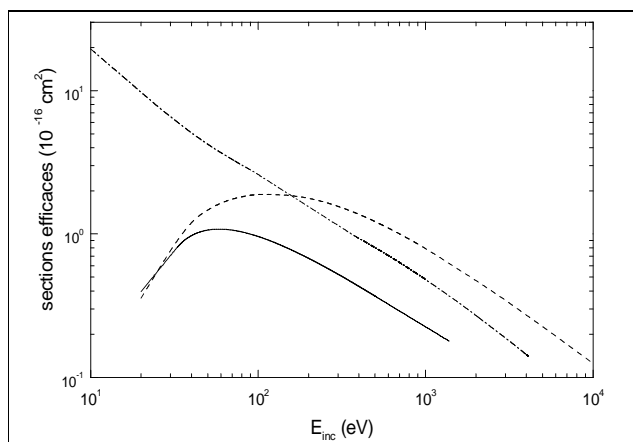
La masse de l'électron est 1836 fois inférieure à celle du proton. Ceci entraîne que les électrons subissent des diffusions importantes (de probabilité non négligeable devant celle des processus d'ionisation ou d'excitation - voir figure I-4) et leurs parcours sont très sinueux. La figure I-3 illustre la trace d'un électron de 5keV dans l'eau : chaque point représente une interaction avec une molécule d'eau.

Figure I-3 : Projection bidimensionnelle de la trace d'un électron de 5keV dans l'eau [6].



Les sections efficaces d'excitation, d'ionisation et de diffusion par des molécules d'eau sont bien connues [8] et sont représentées figure I-4 pour des énergies d'électrons inférieures à 10 keV.

Figure I-4 : Sections efficaces totales calculées pour les interactions électron - molécule d'eau [6] : - diffusion élastique (trait discontinu) - excitation électronique (trait plein) - ionisation (pointillé)



Pour des énergies élevées le phénomène de rayonnement de freinage ou *bremßstrahlung* doit être pris en compte. Il correspond à l'émission d'un rayonnement électromagnétique lors des accélérations subies par les électrons dans le champ des noyaux atomiques.

La contribution relative du *bremßstrahlung* au ralentissement est de l'ordre de 0,3 % pour des énergies de 1MeV et atteint 3 % pour des énergies de 10 MeV. Dans le cadre de cette étude, nous n'avons pas à tenir compte de ce phénomène.

I – 3. Interaction des rayonnements électromagnétiques avec la matière :

Les modes d'interaction des rayonnements électromagnétiques avec la matière sont les suivants :

- Effet photoélectrique :

L'effet photoélectrique résulte du transfert de la totalité de l'énergie du photon incident sur un électron de l'un des atomes de la cible qui est éjecté, créant ainsi un trou. Cet effet ne se produit que si l'énergie $E_v = h\nu$ du photon est supérieure à l'énergie de liaison B de l'électron. Ce dernier, appelé photoélectron, est alors éjecté du cortège électronique de l'atome avec une énergie cinétique résiduelle ($E_c = h\nu - B$) qu'il cède au cours d'ionisations et d'excitations des atomes de la matière. La place vacante va être comblée par un électron de couche plus externe ou par un électron extérieur à l'atome. Ce remplacement s'accompagne d'une libération d'énergie qui peut être :

- soit émise sous la forme d'un photon dit *photon de fluorescence*,
- soit communiquée à un électron appelé *électron Auger*.

L'effet Auger entre en compétition avec la fluorescence, il prédomine largement (contribution ~90%) pour les éléments légers des milieux biologiques (voir chapitre II). La section efficace

photoélectrique varie en $\frac{Z^5}{E^{3,5}}$.

- Effet Compton :

L'effet Compton résulte de l'interaction entre un photon incident d'énergie E_v et un électron libre ou faiblement lié de la cible, dont l'énergie de liaison et l'énergie cinétique sont

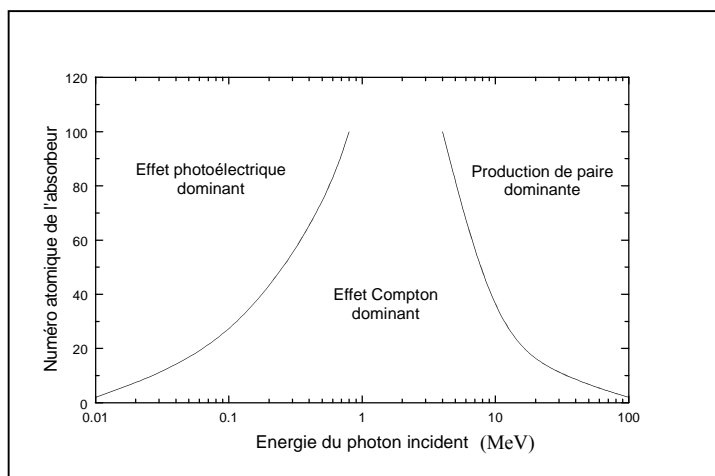
négligeables devant E_ν . Au cours de cette interaction qui peut être décrite comme une collision, l'électron -dit *électron Compton*- acquiert une énergie cinétique E_e et un photon diffusé -dit *photon de recul*- est émis avec l'énergie $h\nu'$ dans une direction faisant un angle θ avec la direction du photon incident. La conservation de l'énergie entraîne : $h\nu = E_e + h\nu'$. Les valeurs respectives de E_e et $h\nu'$ sont liées à θ par *les formules de Compton*, obtenues en écrivant la conservation de la quantité de mouvement et de l'énergie totale au cours de la collision. La section efficace Compton varie en $\frac{Z}{E}$.

- Création de paires ou matérialisation :

Ce processus se produit pour des photons très énergétiques passant à proximité d'un noyau : le photon incident se matérialise sous la forme d'un électron et d'un positon, de mêmes masses m_0 et de mêmes énergies cinétiques. Il existe une valeur seuil pour l'énergie du photon incident ($E_\nu > 2m_0c^2$) pour la création de paires et ce phénomène ne devient important que pour des valeurs très élevées de E_ν .

On présente dans la figure I-5 les importances relatives de ces 3 interactions élémentaires en fonction de l'énergie du photon incident et du numéro atomique du milieu cible.

Figure I-5 : Importance relative des trois modes d'interactions électromagnétiques en fonction de l'énergie du photon incident et du numéro atomique du milieu cible [6].



Pour des cibles d'ADN ou d'eau, l'effet photoélectrique domine pour des photons d'énergies inférieures à ~50 keV. Au-delà de cette énergie c'est l'effet Compton qui est prépondérant.

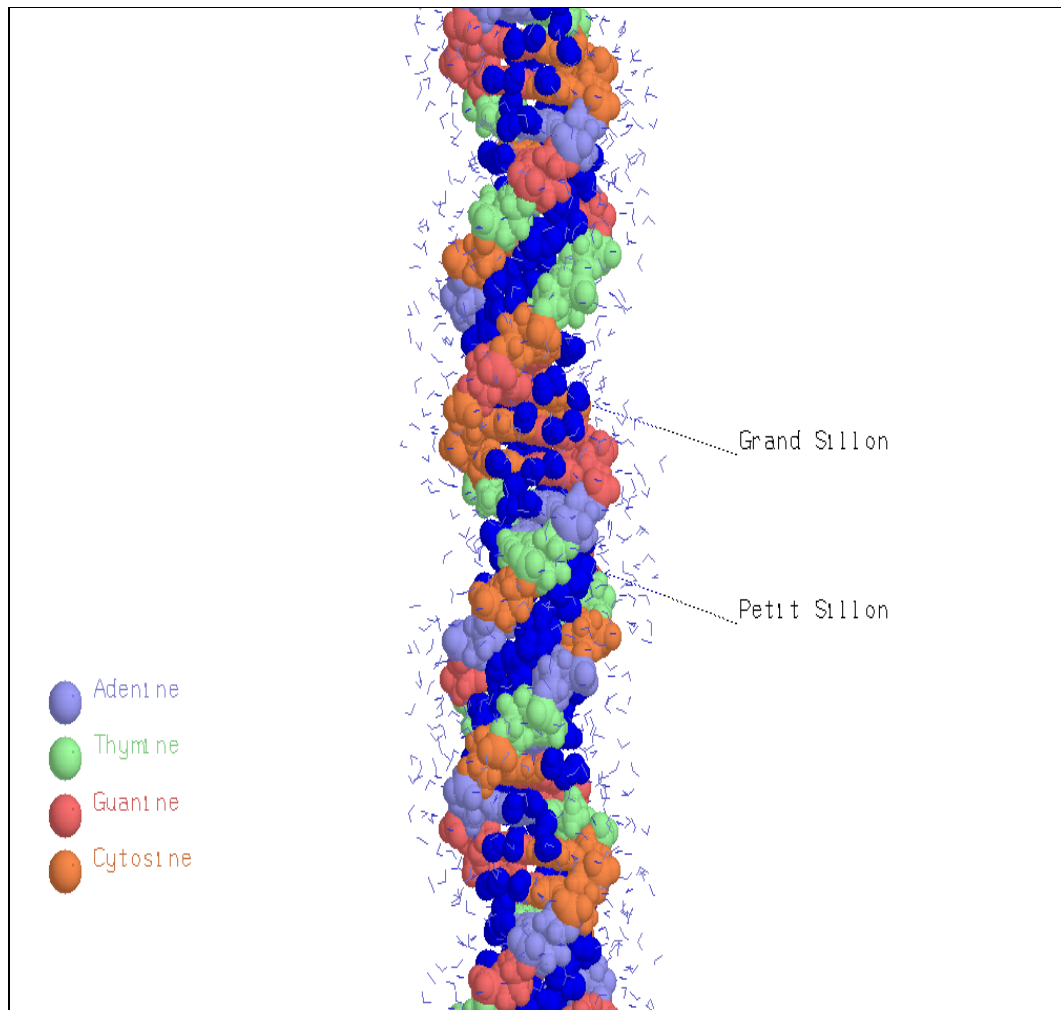
II – L'ADN, cible privilégiée des rayonnements :

De nombreuses expériences ont clairement mis en évidence que l'ADN situé à l'intérieur du noyau cellulaire est la cible privilégiée des irradiations et que les dommages subis par cette macromolécule sont corrélés aux effets biologiques (voir section B).

L'ADN est un polymère extrêmement complexe, tant du point de vue morphologique que physiologique, il comprend plusieurs centaines de molécules interagissant les unes avec les autres et l'existence d'un processus unique de réaction cellulaire à une irradiation n'est pas concevable.

L'ADN est une double hélice dont chacune des chaînes est formée d'une alternance de sucres et de groupes phosphate. À chaque sucre est attachée l'une des quatre bases suivantes : adénine, guanine (l'une et l'autre faites de deux cycles : ce sont des *purines*), thymine, cytosine (l'une et l'autre sont des *pyrimidines* qui n'ont qu'un cycle). Des liaisons hydrogène assurent la stabilité de l'hélice et maintiennent unies les deux chaînes qui la constituent. Ces liaisons hydrogène unissent et relient une purine d'une chaîne à une pyrimidine de l'autre chaîne. C'est ainsi que l'adénine est reliée à la thymine, et que la guanine est reliée à la cytosine (voir figure I-6). L'ADN présente une structure en double hélice d'un diamètre de 2 nm, d'un pas de 3,4 nm comprenant 10 paires de bases azotées. La composition en bases de l'ADN est caractéristique de chaque espèce et toutes les cellules somatiques d'un organisme ont un ADN de même composition : la cellule humaine contient par exemple $5,5 \cdot 10^9$ paires de bases, ou paires de nucléotides, réparties en $2n = 46$ chromosomes. L'ADN peut se structurer en spirale et il apparaît sous une forme plus ou moins condensée suivant la phase cellulaire dans laquelle il se trouve. (*On peut noter que le contenu total en ADN des chromosomes humains représente 174cm d'ADN alors que la longueur totale de ces chromosomes mis bout à bout n'est que de 220 μ m*).

Figure I-6 : représentation de l'ADN ; les molécules d'eau de la première couche d'hydratation sont indiquées en bleu ; les petits traits bleus représentent l'hydratation plus externe (Thèse M. Demonchy (1997), page 53).



III – Les dommages d'ADN radio-induits :

Il est maintenant communément admis que les dommages essentiels de la molécule d'ADN peuvent se répartir en deux groupes :

- Les lésions qui concernent le squelette proprement dit de la macromolécule : ce sont des ruptures de la chaîne sucre-phosphate liant les bases de l'ADN entre elles. On distingue les *cassures simple brin (csb)* correspondant à une unique lésion localisée sur un des brins de l'ADN et les *cassures double-brin (cdb)* correspondant à deux cassures simples situées en vis-à-vis et séparées d'une distance inférieure ou égale à une dizaine de paires de bases.
- Les dommages localisés sur les bases de l'ADN qui peuvent être altérées ou partiellement détruites lors de l'irradiation.

Les conséquences de l'irradiation dépendent de la gravité des dommages incidents :

- Pour une atteinte mineure, les enzymes réparatrices de la cellule peuvent agir et réparer la lésion.
- Pour une lésion majeure non réparable, l'irradiation conduit à une mort cellulaire qui peut être immédiate ou bien différée : on parle de *nécrose* ou d'*apoptose* (mort programmée).

Si la réparation se produit mais n'est pas fidèle, la séquence de gènes du brin d'ADN lésé va être altérée et il y aura apparition de *lésions géniques* créant dans la cellule des *mutations géniques*. Si la lésion est plus grave et qu'elle induit une modification morphologique et non génique du chromosome, on parle d'*aberration chromosomique* (voir [5 ;9] et figure I-1).

Les mécanismes de réparation des dommages induits par les radiations ne sont pas parfaitement connus : on pense cependant que les lésions n'impliquant qu'un seul brin d'ADN ainsi que les dommages de bases sont réparés par excision de base (BER) [6]. Par contre, il semble que les cassures double-brin soient les événements critiques au niveau moléculaire. Une réparation incorrecte de ce type de lésion est déterminante pour le devenir cellulaire, aussi bien à court terme (mort cellulaire) qu'à long terme (induction de mutations et/ou d'aberrations chromosomiques). Cet aspect sera développé en sections B et C de ce chapitre.

IV – Quantification des effets biologiques des rayonnements : EBR et section efficace :

➤ Pour quantifier les effets biologiques induits par les ions, on peut :

– Soit raisonner en termes de probabilité par particule de produire un effet : on parle alors de section efficace. Dans notre étude ce concept sera utilisé pour les irradiations de cellules par des ions.

La section efficace est tirée de la partie linéaire à haute fluence des courbes de survie cellulaire (on parle de sections efficaces extraites des pentes finales). En effet, dans ce cas on peut considérer les actions des particules comme indépendantes les unes des autres. Le nombre dN de réactions induites (ou de cellules inactivées) parmi une population initiale de N cellules (vivantes), pour un rayonnement de fluence $d\Phi$, s'écrit alors :

$$dN = -N \times \sigma_{inac} \times d\Phi$$

où σ_{inac} représente la section efficace d'inactivation cellulaire. On en déduit que la probabilité de survie P_{survie} s'écrit :

$$P_{survie} = \frac{N}{N_o} = e^{-\sigma_{inac} \times \Phi}$$

Cette relation conduit à $\sigma_{inac} = -\frac{\ln(P_{survie})}{\Phi}$.

Dans notre étude, on considère l'effet à 37% de survie, c'est à dire à $1/e$ où l'on a donc

$$P_{survie\ 37\%} = \frac{1}{e}, \text{ soit } \ln(P_{survie\ 37\%}) = -1, \text{ soit } \sigma_{inac} = \frac{1}{\Phi_{37\%}}.$$

– Soit raisonner en termes d'efficacité relative d'un rayonnement –par rapport à un rayonnement de référence– pour induire un effet biologique donné : on parle alors d'efficacité biologique relative (EBR).

L'EBR est définie comme le rapport des doses d'un rayonnement de référence vis-à-vis d'un rayonnement considéré produisant le même effet :

$$EBR = \left[\frac{D_{référence}}{D} \right]_{\text{même effet}}$$

Le rayonnement de référence est généralement le rayonnement émis par le ^{60}Co , d'énergie $E_{\gamma} \cong 1.2 \text{ MeV}$, ou encore les rayons X de 250 kVp.

La dose D déposée par une fluence Φ de particules de TEL T est donnée par :

$$D(\text{Gy}) = \frac{T(\text{keV} / \mu\text{m}) \times \Phi(\text{nb part} / \text{cm}^2) \times 1,6.10^{-9}}{\rho(\text{g.cm}^{-3})}$$

où ρ est la masse volumique du milieu traversé. Cette dernière relation entraîne que pour les ions de haut TEL, l'EBR et la section efficace d'inactivation cellulaire (σ_{inac}) sont reliées par la relation suivante :

$$\sigma_{\text{inac}} \propto \text{EBR} \times T \quad \text{ou encore :} \quad \text{EBR} \propto \frac{\sigma_{\text{inac}}}{T}.$$

➤ Pour quantifier les effets biologiques d'une irradiation par photons, on n'utilise plus que les concepts de dose et d'EBR (voir chapitre III).

B - Cassures double-brin d'ADN & Stabilité chromosomique

La stabilité génomique est d'importance primordiale pour la survie et le fonctionnement correct de tout organisme. L'accumulation de dommages de l'ADN peut induire des changements irréversibles et permanents pouvant conduire au cancer ou à un dysfonctionnement entraînant par exemple l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire.

Notre étude se focalise sur les conséquences des rayonnements sur la matière biologique et essaie de caractériser les événements physiques primaires initiateurs de dommages nuisibles pour le génome, mais un des enjeux reste la compréhension et l'identification des mécanismes impliqués lors de l'apparition de dommages sur l'ADN au-delà de ceux induits par les radiations ionisantes. Certes ces dernières peuvent impliquer des réponses spécifiques mais elles sont aussi, avant tout, un moyen d'étude largement répandu qui permet d'obtenir des renseignements fondamentaux sur le fonctionnement cellulaire.

Il existe une multitude de dommages de l'ADN –on peut d'ailleurs noter qu'il existe des cassures double-brin (cdb) « naturelles » constamment produites dans notre organisme et réparées continuellement, voire même nécessaires à une bonne réplication [10].

Une cdb est un dommage d'ADN particulièrement génotoxique et diffère de beaucoup d'autres lésions d'ADN car les deux brins de la double hélice sont endommagés, ce qui empêche l'utilisation du brin complémentaire comme matrice pour la réparation. Les cdb apparaissent de plus comme inducteurs potentiels, sans être les seuls, d'aberrations chromosomiques [11]. Enfin les cassures double-brin de l'ADN sont de graves menaces pour l'intégrité du génome parce qu'elles peuvent conduire à une instabilité chromosomique qui peut affecter simultanément plusieurs gènes et altérer le fonctionnement cellulaire.

Les cassures double-brin sont particulièrement dangereuses si elles surviennent pendant la réplication du génome et durant la séparation des chromosomes dupliqués au sein des cellules filles. La duplication propre du génome est entravée par les cdb et si des chromosomes se cassent pendant la mitose, les fragments acentriques ne seront pas équitablement divisés entre les cellules filles. Les cellules eucaryotes ont donc développé plusieurs points de contrôle pour empêcher l'éventuelle amorce d'une réplication si elles contiennent de l'ADN endommagé [12].

De nombreuses protéines sont impliquées dans ces processus de contrôle, par exemple la délétion du gène codant pour l'action de la protéine p53 entraîne que la cellule est déficiente pour son point de contrôle G₁/S : il apparaît une réduction de l'apoptose sous irradiation [13]. On peut noter aussi que la phosphorylation de l'histone H2AX par ATM semble être cruciale pour une réponse cellulaire aux cassures double-brin au vu de la co-localisation de l'H2AX phosphorylé et des protéines de réparation des cdb [14].

Les conséquences nuisibles des cdb sont neutralisées par deux voies mécanistiques distinctes de réparation : recombinaison homologue (HR) et religation non-homologue (NHEJ). Récemment des liens inattendus entre ces deux systèmes de réparation, plusieurs instabilités du génome humain et des prédispositions au cancer, ont émergé. L'interaction entre les différentes voies de réparation et les autres processus cellulaires (régulation du cycle, réplication, formation d'aberrations chromosomiques) est actuellement l'objet de recherche.

L'existence de plusieurs mécanismes pour prendre en charge les cdb illustre la grande complexité des systèmes de réparation cellulaire. Les deux voies principales : HR et NHEJ, diffèrent dans leurs exigences quant à la présence d'un ADN homologue et dans la fidélité de la réparation des cdb. L'HR garantit ainsi une réparation minutieuse au contraire de la NHEJ. Le mode opératoire dépend aussi de la phase du cycle cellulaire impliqué [15]. Ceci dit il n'est pas exclusif et des événements de réparation impliquant les deux voies de réparation ont été détectés [16]. On peut toutefois avancer que l'HR semble plus compétente dans la phase S et G₂ du cycle [17], et que la phase G₁ semble plus propice à la voie NHEJ.

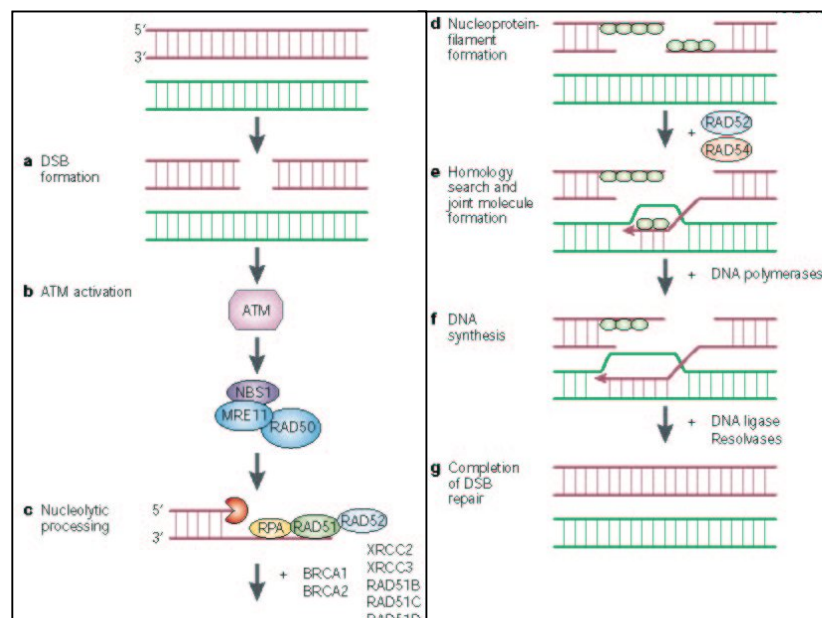
On se propose ici de décrire de manière succincte les deux principaux mécanismes de réparation mis en jeu lors de la production de cassures double-brin, bien qu'il existe d'autres types de lésions et d'autres mécanismes propres de réparation tels que la 'Nucleotide Excision Repair' (NER), la 'Base Excision Repair' (BER) ou la 'Mismatch Repair' (MMR) qui utilisent la complémentarité des brins d'ADN. Ce choix se justifie en grande partie par les différentes et récentes connexions mises en avant entre les cdb et les effets biologiques comme mort cellulaire et aberrations chromosomiques [18].

Recombinaison homologue : (Homologous Recombination)

La recombinaison homologue peut réparer les cdb en utilisant la chromatide sœur non endommagée comme matrice de l'ADN à réparer. La HR aboutit généralement à une réparation exacte des cdb.

L'HR met en jeu diverses protéines telles celles du groupe RAD52. La figure I-7 illustre le processus de réparation d'une cdb. On peut noter les étapes principales telles que la reconnaissance de la cdb, la recherche d'une matrice d'ADN homologue, un échange de brins entre ADN endommagé et ADN homologue non-endommagé, la polymérisation, la résolution de l'intermédiaire de recombinaison et la ligation qui assurent la restauration d'un ADN intact. De nombreux sous-aspects ne sont pas encore parfaitement compris, par exemple le rôle de certaines co-localisations de protéines nouvellement mises à jour [19].

Figure I-7 : *Recombinaison homologue. Pour la réparation de cdb par HR il y a réaction entre 3 molécules de l'ADN : les deux extrémités de l'ADN endommagé et l'ADN tampon. Les deux brins vert et rose hachurés représentent deux séquences homologues (chromatides sœurs)*

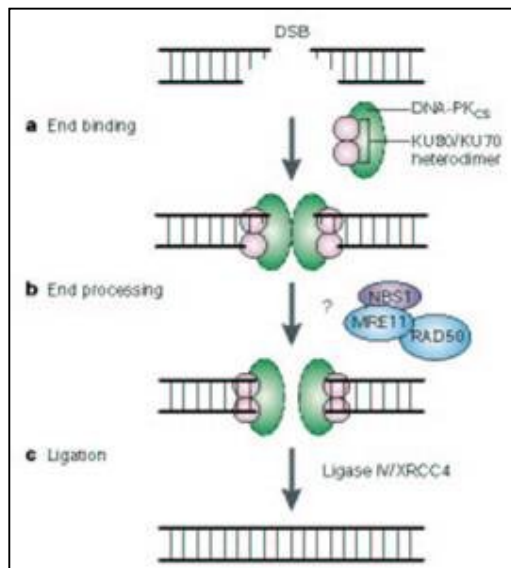


–a : formation de la cdb. –b : déclenchement après un point de contrôle du cycle cellulaire du processus de réparation ; activation de la kinase ATM. –c&d : reconnaissance puis façonnage des extrémités et formation du nucléofilament. –e : recherche d'une portion homologue et formation d'un molécule jointe. –f : synthèse d'ADN. –g : ligature et résolution de l'intermédiaire de recombinaison. [18].

Religation non-homologue : (Non-Homologous End-Joining)

Par opposition à la HR, la NHEJ utilise peu ou pas d'homologie pour coupler les extrémités d'ADN. Le fait de ne pas utiliser de matrice tampon pour la réparation entraîne intrinsèquement une prédisposition aux erreurs. Cette voie est uniquement utilisée pour réparer les cdb générées par des agents exogènes nuisibles à l'ADN comme les radiations ionisantes. Plusieurs protéines impliquées dans NHEJ ont été identifiées. En particulier l'hétérodimère/polypeptide KU, qui a une affinité pour les extrémités de l'ADN, indiquant un rôle précoce dans le processus NHEJ. KU se lie aux extrémités de l'ADN et attire une protéine kinase catalytique (DNA-PK_{CS}). Cette dernière va ensuite phosphoryler plusieurs protéines cellulaires cibles telles que p53, KU et elle-même. Un complexe de ligases assure l'étape de ligature finale. Ici encore le processus exact n'est pas parfaitement déterminé. La figure I-8 résume les principales étapes.

Figure I-8 : *Non-homologous end-joining.*



–a : « end binding » après la formation d'une cdb : le complexe DNA-PK_{CS} est probablement impliqué dans la reconnaissance initiale de la cassure et dans la juxtaposition de deux extrémités de l'ADN. –b : « end processing » les deux extrémités peuvent agir, par ajout ou suppression de quelques paires de bases. –c : étape de ligature entre les deux extrémités. [18].

cdb et instabilité chromosomique :

Les deux mécanismes décrits précédemment sont fortement impliqués dans la prévention et/ou la formation de jonctions aberrantes. Bien que l'importance relative (parfois méconnue) des gènes, donc des protéines, et des voies de réparation diffère suivant les organismes et les types cellulaires, ces deux chemins principaux peuvent contribuer à la résistance aux radiations ionisantes ainsi qu'à la stabilité chromosomique. Le lien entre cdb, leur réparation, et la génération d'aberrations chromosomiques, semble réellement établi. On peut par exemple évoquer concernant le rôle de la réparation des cdb -indépendamment des radiations ionisantes, des syndromes de prédisposition aux cancers tels que 'Bloom syndrome' pour la voie HR [20] et 'Werner syndrome' pour la voie NHEJ [21].

Il existe maintenant des modèles d'études sur les animaux assurant une déficience dans telle ou telle voie de réparation, permettant d'étendre et de caractériser plus précisément les mécanismes mis en jeu. Il reste beaucoup d'études à faire pour comprendre le rôle pivot de la réparation des cdb dans le maintien de la stabilité chromosomique. La contribution des voies de réparation dépend du type cellulaire, de l'étape de développement et du type spécifique de dommage.

Après cet état des lieux sur la réparation et les enjeux sous-jacents, on se propose de regarder les conséquences d'une mauvaise réparation enzymatique des dommages de l'ADN induits par radiations ionisantes. Il peut s'agir de réarrangements du génome de grande envergure, tels que les translocations et les dicentriques. Ceux-ci et d'autres aberrations d'échange chromosomiques peuvent entraîner des altérations phénotypiques importantes telles que mort cellulaire, mutation et néoplasie.

La formation d'échange nécessite que deux loci (ou plus) géniques se réunissent spatialement. Les techniques récemment développées combinées à des simulations numériques biophysiques, aident à caractériser la grande envergure de l'architecture chromatinienne dans les noyaux interphasiques. La plupart des résultats sont consistants avec une image où les chromosomes seraient principalement confinés dans des domaines. Le mouvement de la chromatine serait limité et les interactions inter-chromosomiques impliqueraient principalement les surfaces de ces territoires.

Le spectre des aberrations et la modélisation aident à caractériser les mécanismes de réparation fidèle/infidèle de l'ADN. Les résultats quantitatifs pour les cellules de mammifères sont majoritairement décrits par un modèle de « breakage-and-reunion » (BR) suggérant que le mécanisme dominant durant la phase G_0/G_1 du cycle cellulaire est le Non-Homologous end-joining (NHEJ) des cassures double-brin de l'ADN. Une meilleure compréhension mécanistique et quantitative de la formation d'aberrations fournirait une nouvelle approche pour les applications thérapeutiques.

Ce sont ces différents aspects que nous allons aborder dans la section suivante.

C- -Aberrations chromosomiques radio-induites :

Les radiations ionisantes produisent des réarrangements dans le génome. Lorsque l'irradiation survient durant la phase G_0/G_1 du cycle cellulaire, des réarrangements de grande envergure apparaissent à la première mitose suivant l'irradiation comme par exemple les aberrations chromosomiques de type échange.

De telles aberrations peuvent altérer le phénotype cellulaire et sont importantes dans divers domaines en biologie et en santé publique :

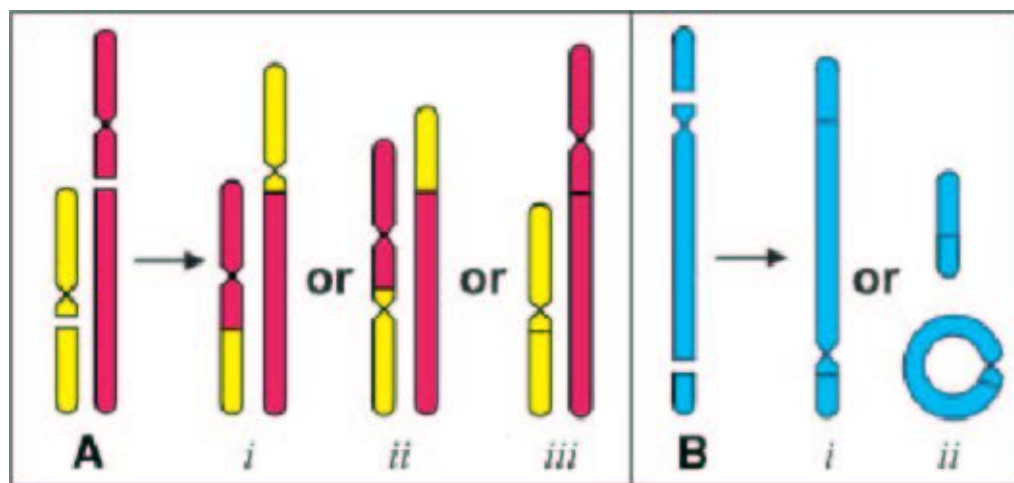
- Les diagnostics prénataux [22], la caractérisation de cancers spécifiques et l'estimation du risque carcinogène sont basés sur cet aspect. La dosimétrie biologique [23-24] utilise également les aberrations (e.g. les dicentriques) comme marqueurs pertinents d'effets biologiques. On peut noter dans ce domaine de dosimétrie biologique que des aberrations spécifiques sont utilisées pour décrire l'hétérogénéité d'une irradiation : les aberrations complexes sont prises en particulier comme révélateur d'irradiation à hautes doses.
- L'analyse d'aberrations chromosomiques aide également à caractériser les voies de réparation impliquées dans les processus des dommages de l'ADN. Les radiations ionisantes ont des caractéristiques uniques permettant d'identifier tel ou tel chemin. Comparées à d'autres agents génotoxiques, elles produisent une quantité abondante de cdb et leur intervention peut être contrôlée plus facilement. En outre les dommages initiaux des radiations ont une nature stochastique, qui peut être modulée en utilisant différents types de radiations possédant des densités d'ionisations très différentes (par exemple des particules α et des rayons X) [25].
- Le spectre des différentes aberrations chromosomiques radio-induites fournit des renseignements sur la géométrie des chromosomes durant l'interphase et vice-versa [26].
- L'instabilité chromosomique caractérisée par l'apparition de nouvelles aberrations anarchiques survenant plusieurs générations après l'irradiation [27], représente une forme d'instabilité génomique notable durant la prolifération cancéreuse.

On se propose de décrire ici quelques résultats d'analyses cytogénétiques et de modélisations biophysiques, visant à élucider les mécanismes de formation des aberrations chromosomiques.

Une diversité panachée de types d'aberrations :

Jusqu'à récemment il était traditionnellement admis que toutes les aberrations d'échange étaient simples, c'est à dire impliquaient seulement deux cassures chromosomiques (figure I-9).

Figure I-9 : *Aberrations chromosomiques simples c'est à dire impliquant 2 cassures* [28].



A : 2 chromosomes, contenant chacun une cassure, peuvent donner lieu à une translocation réciproque simple (i), à un dicentrique et un fragment acentrique (ii), ou encore à une double restitution (iii).

B : 1 chromosome avec 2 cassures peut aboutir à une inversion (i) ou à un anneau centrique avec un fragment acentrique (ii).

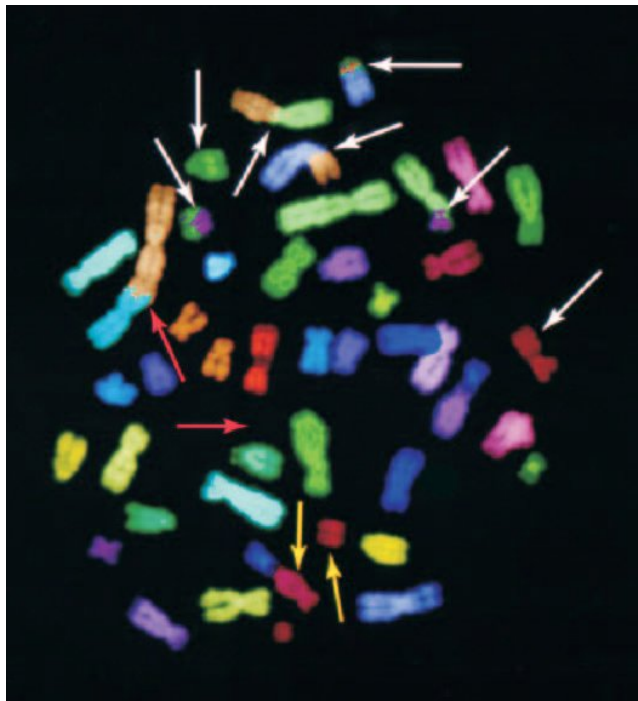
On peut rappeler quelques faits concernant les remaniements associés aux chromosomes de la figure I-9. Dans le cas A par exemple, une cellule avec une aberration type translocation réciproque reste clonogéniquement viable. Le réarrangement à grande échelle résultant peut donner lieu à des altérations phénotypiques incluant mutation et transformation oncologique.

Les dicentriques sont clonogéniquement létaux en raison de la séparation au niveau des centromères durant l'anaphase de la mitose (les deux centromères empêchent la cellule de se diviser correctement). La restitution est définie comme la réunion dans la configuration avant cassure. Il peut exister alors des altérations locales du génome au niveau de certains nucléotides qui pourraient être à l'origine d'une mutation ponctuelle. Pour le cas B, les conséquences des grandes inversions et des translocations sont supposées être similaires, de même les anneaux avec un centromère sont supposés semblables aux dicentriques.

Les inversions sont difficiles à détecter et parmi les moins bien connues des aberrations simples, mais sont très courantes. Il existe d'autres types d'aberrations simples comme les anneaux acentriques et les inversions paracentriques qui sont tout aussi courantes mais difficiles à mettre en évidence.

Les techniques de peinture chromosomique cependant, ont montré que les aberrations complexes impliquant plus de deux cassures sont courantes [29]. La figure I-10 en donne une illustration. Beaucoup de techniques peignant l'ensemble des chromosomes sont basées sur la méthode FISH (voir chapitre III section B). Des techniques de peintures plus récentes et sophistiquées comme celles de mFISH ou de caryotype spectral emploient un stratagème d'hybridation combinatoire permettant la reconnaissance plus fine d'échanges entre des chromosomes hétérologues [30]. Des extensions de ces approches permettent également la reconnaissance d'échanges entre chromosomes homologues et une meilleure localisation des points de cassures à l'intérieur d'un chromosome [31]. Le spectre des aberrations complexes découvert par les peintures chromosomiques donne des informations supplémentaires sur les mécanismes et l'aspect géométrique des dommages dus aux radiations.

Figure I-10 : Image mFISH d'un étalement chromosomique contenant des échanges simples et complexes de lymphocytes humains irradiés avec 4 Gy de rayons γ . [28].



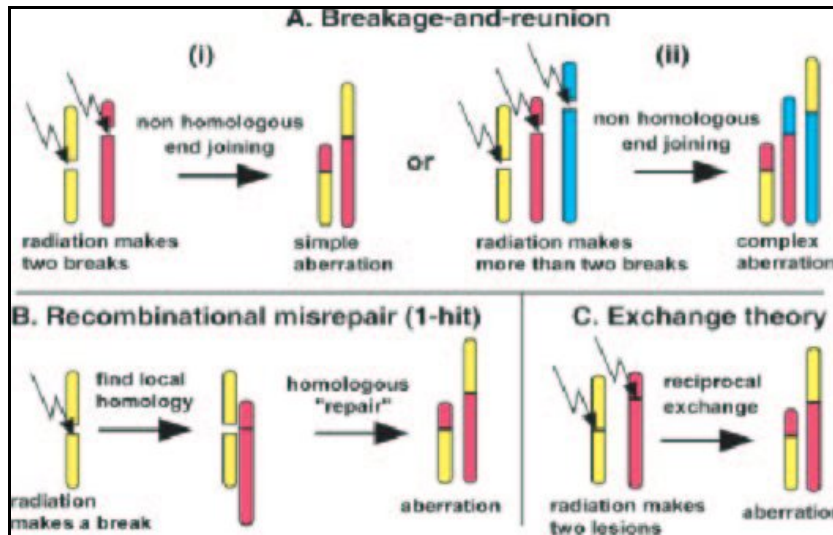
Les flèches blanches mettent en évidence un réarrangement complexe impliquant les chromosomes 1, 2, 3, 9, 11 et 20. Les flèches rouges montrent une aberration simple : un dicentrique (chromosomes 1 et X) et son acentrique associé. Les flèches jaunes montrent également une translocation impliquant les chromosomes 12 et 21.

Les voies de formation des aberrations :

Durant près d'un demi-siècle les voies de réparation impliquées dans la formation des aberrations chromosomiques ont été étudiées [32]. Le problème des mécanismes impliqués a suscité de nombreuses controverses. Les modèles proposés diffèrent substantiellement dans leurs prédictions quant à la dépendance de la fréquence d'aberrations en fonction de la dose ou du débit de dose. Ils diffèrent également par rapport au spectre d'aberrations prédit.

Pour la formation d'échanges, il existe trois voies majoritaires pouvant agir en parallèle qui sont résumées sur la figure I-11.

Figure I-11 : Modèles standards de la formation d'échanges. La figure représente l'induction de cdb et leur non-réunion par « Breakage-and-Reunion » (BR), « Exchange Theory » (ET) et « Recombinational Misrepair » (RM) [28].



La voie « breakage-and-reunion » (figure I-11-A) correspond au niveau moléculaire à la réparation NHEJ des dommages de l'ADN. Un scénario alternatif comprend un modèle à « 1-hit » (figure I-11-B), dans lequel une seule cdb radio-induite est suffisante pour initier un échange avec une autre portion non endommagée du génome –en interagissant avec une deuxième cdb induite par les enzymes de réparation. Ce scénario correspond à la réparation homologue de l'ADN. Cette voie d'action a été appelée « recombinational misrepair » (*on peut noter qu'au sens propre du terme, les trois voies impliquent en fait des événements de recombinaisons*). La troisième voie (figure I-11-C) représente le concept d'échange selon la théorie de Rewell [32-33]. Dans ce cas les lésions initiales ne sont pas des cassures mais celles-ci sont une conséquence d'un processus enzymatique de réunion ou non-réunion.

Bien que les méthodes d'analyse FISH permettent de caractériser certaines voies de réparation, dans la pratique de petits fragments de chromatine issus de réarrangements sont invisibles et ceci empêche de déterminer l'origine exacte de l'aberration. De plus les deux voies A et B (figure I-11) peuvent tout à fait agir en parallèle ce qui rend difficile l'attribution d'un chemin bien défini. Ainsi la question reste très controversée et les prédictions des modèles quantitatifs, comme par exemple sur le rapport entre aberrations complexes et simples, suscitent une attention croissante.

Localisation des chromosomes et effets de voisinage :

Pour les différentes voies énoncées ci-dessus, la formation d'échanges chromosomiques implique d'avoir au moins deux loci génomiques différents dans un voisinage rapproché. En conséquence la géométrie des chromosomes et l'architecture de la chromatine dans le noyau interphasique influencent le spectre d'aberrations. Inversement ce dernier peut être utilisé comme sonde de localisation des chromosomes et aide à estimer la portée d'interaction des cdb, dépendante du mouvement des chromosomes [25].

Plusieurs analyses quantitatives de la géométrie des chromosomes en interphase sont basées sur les aberrations radio-induites [34], mais jusqu'à récemment peu d'informations directes étaient disponibles. La structure compliquée, en boucle, des chromosomes en interphase rend difficile les essais de visualisation de l'architecture de la chromatine sur de grandes échelles (>1 Mb) impliquées dans l'étude des aberrations. Des progrès importants réalisés ces dix dernières années ont montré qu'à chaque instant, chaque chromosome est localisé de façon prédominante dans un domaine dont le volume est seulement quelques pour cent du volume du noyau pour une cellule humaine [35].

Il existe des preuves directes de petits recouvrements des domaines chromosomiques. De même des résultats récents sur la fréquence des aberrations comparée au contenu d'ADN laissent supposer que les interactions inter chromosomiques surviennent principalement près de la surface de ces domaines. Cependant la formation d'aberrations multi-chromosomiques suggère au contraire de très larges recouvrements de ces territoires. Une explication possible de cette disparité est l'induction préférentielle d'aberrations dans des emplacements particuliers où les boucles de différents chromosomes seraient proches [29]. Il pourrait y avoir aussi transport de l'ADN endommagé vers des « usines » de réparation où l'ADN de différents chromosomes est simultanément employé. Le mouvement à l'échelle d'un chromosome entier (~1µm) semble être assez lent et arbitraire [35], bien que le mouvement orienté pour une petite portion de chromosome ne soit pas totalement exclu [36].

La nécessité pour les loci d'être proches spatialement, ajoutée à la localisation chromosomique, conduit à des « effets de proximité » qui peuvent être quantifiés par des modélisations numériques.

Modélisation des mécanismes de formation des aberrations :

La modélisation de la formation d'aberrations vise à quantifier les effets de proximité, et à expliquer les différentes observations. Des modèles modernes de la structure de la chromatine peuvent être intégrés avec de simples représentations du mouvement des cdb et de la non-réunion des cassures aussi bien qu'avec des codes sophistiqués sur la trace des radiations décrivant les aspects physiques et radiochimiques des rayonnements [33, 37-39].

Ces modélisations sont probabilistes et mises en œuvre au moyen de techniques Monte Carlo où la machine effectue des « tirs au hasard » pour donner des résultats extrêmement détaillés. Le cheminement de la formation d'aberrations est simulé pour chaque cellule.

Par exemple pour une cellule humaine, supposons qu'en moyenne 1,5 cdb est produite dans chaque chromosome homologue 1 pour une expérience donnée. L'ordinateur sélectionne en premier le nombre (0, 1, 2 etc.) de cdb par chromosome 1 dans la première cellule. Il utilise soit un générateur de nombres aléatoires couplé avec une distribution probabiliste appropriée, soit un code de trace des radiations couplé avec un modèle géométrique du chromosome. La localisation spécifique des cdb simulées est ensuite trouvée. Les 46 autres chromosomes sont traités similairement en prenant en compte leur géométrie et le contenu de leur ADN. La réparation est ensuite simulée via un processus de Markov, par un algorithme probabiliste favorisant la non-réunion des cdb aux extrémités libres qui sont proches spatialement les unes des autres. Le résultat est une configuration simulée de chromosomes réarrangés dans la première cellule. En simulant le système de recensement (par exemple la méthode mFISH) utilisé dans les expériences, on obtient le type d'aberrations observables pour la cellule simulée. Puis, par itération, des centaines de millions de cellules individuelles sont simulées une par une, chacune avec son motif propre d'aberrations. Les résultats sont ensuite comparés aux spectres d'aberrations observés expérimentalement ainsi qu'à la dépendance vis-à-vis de la dose pour la fréquence des aberrations.

Cette approche quantitative probabiliste nécessite de faire explicitement des hypothèses de base sur les voies de formation des aberrations et sur la géométrie des chromosomes. La méthode privilégie systématiquement les processus dominants, réduisant sans les ignorer complètement les voies minoritaires, et donc un grand nombre de types d'aberrations possibles mais hautement improbables. L'approche utilise des distributions aléatoires des cdb dans le génome et des hypothèses sur la non-réunion assurant un nombre minimum de paramètres ajustables. Cette méthode basée sur des choix aléatoires des positions des cassures

fournit des estimations raisonnables, bien qu'il existe d'éventuels 'points chauds' (tels que les télomères [40]) ou d'autres écarts à une distribution aléatoire [41-42].

Sur la base de modélisations de la relation dose-effet et à partir de l'évidence de certains mécanismes moléculaires, il est généralement admis que le « breakage-and-reunion » est la voie dominante pour les aberrations produites dans les cellules des mammifères après une irradiation ionisante durant la phase G_0/G_1 du cycle [12]. Une des raisons principales est que les simulations basées sur les autres mécanismes (figure I-11) sont incapables de reproduire la richesse du spectre d'aberrations observées expérimentalement et tout spécialement la fréquence et l'étendue des aberrations complexes. Cependant les modélisations n'excluent pas une participation des autres voies et la situation reste l'objet de controverses.

Aberrations très complexes :

Si l'on accepte le modèle « breakage-and-reunion » et que l'on suppose que toutes les réactions sont complètes (c'est à dire qu'il ne reste aucune cdb aux extrémités libres à la fin du processus), on peut démontrer que toute réaction produisant des aberrations peut être décomposée de façon unique en réactions irréductibles également appelées cycles [43]. L'ordre d'un cycle quantifie la complexité de l'aberration. *Par exemple, si l'on reprend la figure I-9 (A.i) il s'agit d'un cycle d'ordre 2, la figure I-11 (A.ii) montre un cycle d'ordre 3 et l'analyse de la figure I-10 met en évidence une cycle d'ordre 6.* Les données mFISH montrent des cycles d'un ordre important, inattendu, dans lesquels un grand nombre de chromosomes prennent part aux aberrations [44]. Les modélisations suggèrent qu'un mécanisme additionnel pourrait opérer pour générer la plupart des aberrations complexes recensées.

Prédictions des modèles sur la dépendance par rapport à la dose et au débit de dose :

La compréhension des mécanismes de formation des aberrations est utile dans de multiples domaines de la radiobiologie et pas seulement pour l'identification des voies de réparation et la connaissance de l'architecture de l'ADN. Presque toujours les questions clés dans les applications sont comment les effets des radiations dépendent de la dose et/ou du débit de dose. Comprendre la formation des aberrations aide à répondre à ces deux questions.

Les expériences et les modèles utilisant des équations ordinaires et/ou des théories de processus stochastiques, ont fait émerger au cours des années quelques règles générales sur la dépendance en dose et en débit de dose pour les différents mécanismes [45].

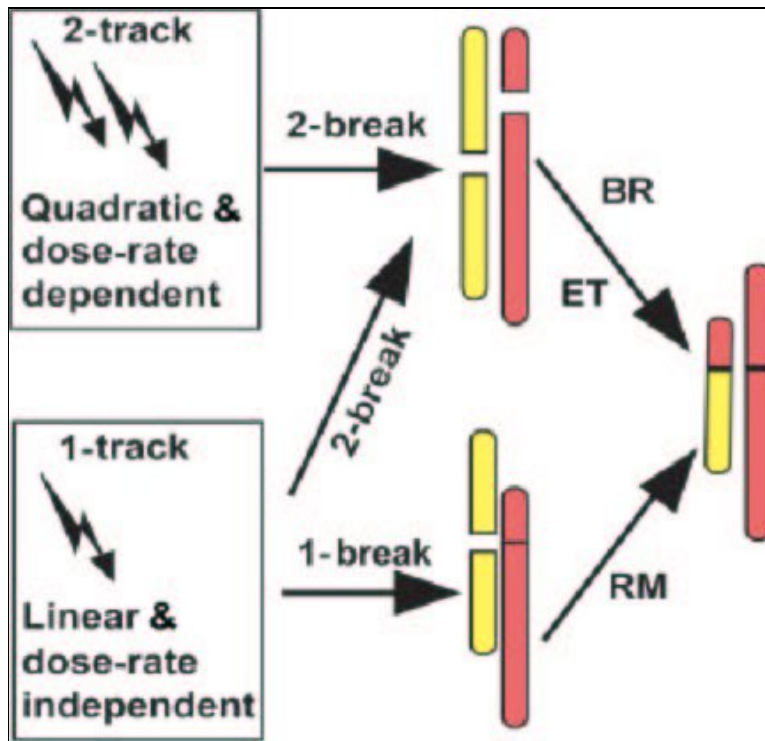
Les règles sont basées essentiellement sur la distinction entre l'action à « 1 trace » et l'action à « 2 traces » (figure I-12). Cette dernière implique l'interaction de dommages non corrélés de deux traces primaires (telles que deux photons différents d'un faisceau de rayons X), et les dépendances associées en dose/débit de dose sont plus compliquées que pour une action à « 1 trace ». Malgré quelques exceptions et le fait qu'il s'agisse d'approximations plus que d'affirmations exactes, ces règles recouvrent une grande variété de cas. Elles mènent souvent à de bonnes approximations, pas seulement pour les aberrations simples comme illustré dans la figure I-12, mais également pour d'autres types de dommages radio-induits.

Les règles sont les suivantes :

- L'action à « 2 traces » produit en général un rendement approximativement quadratique (proportionnel à la dose au carré). La raison est que le nombre de traces est proportionnel à la dose, donc le nombre de paires de traces est approximativement proportionnel à la dose au carré (combinaison 2 à 2 de n objets). De plus l'action à « 2 traces » produit en général de plus petits effets lorsque la dose est étalée, c'est-à-dire un débit de dose décroissant fait décroître le rendement. Ceci peut s'expliquer par le fait que si la dose est étalée dans le temps, la réparation peut avoir lieu entre l'instant lié à la première trace et celui de la seconde.

- L'action à « 1 trace », au contraire produit généralement un rendement qui est proportionnel à la dose et indépendant du débit de dose.

Figure I-12 : Dépendance en dose et en débit de dose pour la formation d'aberrations chromosomiques (ici aberrations simples) [28].



La figure résume les différentes voies amenant à la formation de l'aberration à droite, en se basant sur les règles fondamentales dans lesquelles le rendement d'aberration simple dépend de la dose et du débit de dose. On rappelle BR : « Breakage-and-Reunion », ET : « Exchange Theory », RM : « Recombinational Misrepair ».

En appliquant ces idées aux différentes voies de formation des aberrations chromosomiques, on constate (figure I-12) que les mécanismes de « breakage-and-reunion » et de la théorie d'échange de Rewell –nécessitant tous les deux, deux cassures radio-induites pour initier un échange– conduisent à un mélange de dépendance en dose linéaire et quadratique. La composante linéaire survient parce qu'une simple trace peut parfois produire deux cdb ou plus (figure I-12) Dans cette réponse quadratique linéaire, le terme linéaire domine à faible dose et le terme quadratique domine à plus haute dose [33]. On voit également que le mécanisme de « recombinational misrepair » mène généralement à une dépendance linéaire en dose qui est indépendante du débit de dose.

Il existe en réalité d'autres modes d'action et de dépendance vis-à-vis de la dose et du débit de dose. Des mécanismes spécifiques de cinétique chimique impliquant la saturation d'enzymes de réparation et la compétition entre plusieurs voies de réparation se traduisent par des modèles dans lesquels l'action à « 1 trace » présente une dépendance en dose non linéaire et un effet de débit de dose [46].

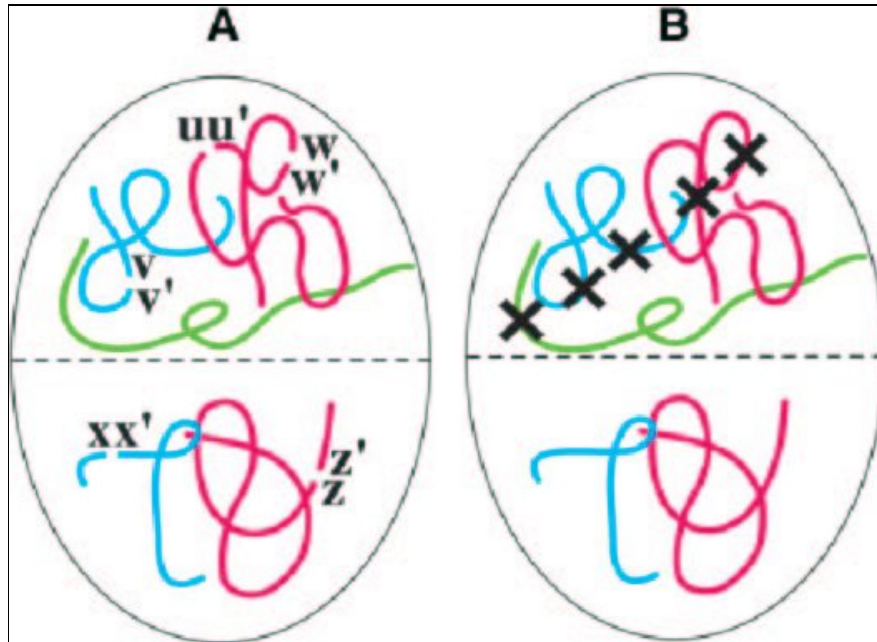
Un accroissement ou une décroissance des effets lors de l'étalement d'une dose donnée peut également résulter d'une variété de processus biologiques pas forcément liés à l'aspect une trace ou deux traces [45, 47].

Enfin pour une haute dose de radiation faiblement ionisante (~5 Gy), l'action à « 2 traces » ne produit pas nécessairement de réponse quadratique [41, 48-49]. Il y a deux raisons à cela :

- (i) une augmentation de dose, peut convertir des aberrations d'un type particulier en aberrations plus complexes, conduisant à une croissance moins rapide du rendement de ces aberrations particulières.
- (ii) la saturation : lorsqu'il y a par exemple compétition entre les processus de restitution et de non-réunion et que la dose est si élevée que la non-réunion commence à dominer, la non-réunion ne peut pas progresser plus vite que linéairement avec la dose.

Finalement la figure I-13 présente le rôle de la trace en comparant la répartition des cassures et aberrations induites par deux types de radiations différentes : les ionisantes et faiblement ionisantes.

Figure I-13 : Relation entre spectre d'aberrations et structure de trace des radiations. La figure montre 5 chromosomes localisés territorialement en phase G₁ dans un noyau interphasique avec 5 cdb pour deux types de radiation [28].



A : rayonnements faiblement ionisants (rayons γ par exemple). Les 5 cdb viennent généralement (mais pas toujours) de traces différentes et sont réparties aléatoirement dans le noyau. Les effets de proximité et de domaines conditionnent les processus de réparation. De même le spectre des aberrations dépend des règles traduites par les différents modèles. Il peut exister un certain biais statistique sur le spectre d'aberration modélisé par rapport à celui observé.

B : rayonnements fortement ionisants (ions par exemple). Les 5 cdb seront typiquement proches de la trace de la particule. Cette différence de motif spatial entraîne un spectre d'aberrations différent.

Aspects médicaux et de santé publique :

Malgré les difficultés évoquées, les règles fondamentales énumérées ont d'importantes implications en dosimétrie biologique, pour l'estimation des risques, et dans le planning des traitements radio-thérapeutiques.

– La dosimétrie biologique se propose de déduire la dose reçue du niveau d'aberrations chromosomiques recensées dans les lymphocytes périphériques du sang d'un individu. Cette procédure nécessite de connaître la relation dose-effet pour le type de rayonnement et les conditions d'expositions impliquées. Avec le scénario « breakage-and-reunion » la fréquence de translocations ou de dicentriques radio-induits est censée avoir, pour un rayonnement faiblement ionisant et dans une gamme de dose pertinente, une dépendance linéaire quadratique avec la dose. C'est ce qui est observé *in vitro*. Une radiation ionisante à trace dense au contraire, opère presque exclusivement via l'action à « 1 trace » et dans la gamme de dose pertinente, une quasi-linéarité avec la dose est attendue et observée [28].

De plus, à cause de l'effet combiné de la géométrie de la chromatine et de la structure de trace des radiations (figure I-13), des spectres d'aberrations différents sont prévus pour des radiations à traces denses et éparses [50]. Un spectre différent est en effet observé *in vitro* : pour les ions il y a une plus grande fréquence d'aberrations impliquant des échanges entre points de cassures à l'intérieur d'un même bras de chromosome que d'aberrations résultant d'interactions inter-chromosomiques. A faibles doses il y a aussi une plus grande fréquence d'aberrations complexes comparées aux simples [51-52]. Ainsi, la dosimétrie biologique pourrait être capable d'identifier le type de radiation aussi bien que la dose reçue.

– Une autre application potentielle est l'estimation du risque de cancer lié à l'exposition aux radiations. On a longtemps pensé que les faibles doses ne pouvaient produire d'effets biologiques quantifiables voire même détectables, que ce soit expérimentalement ou même épidémiologiquement. A présent il semble important de cerner ces effets lorsque de grandes populations sont concernées. A l'heure actuelle, l'estimation des risques –extrapolée des hautes doses, en tenant compte des effets de débit de dose–, est basée sur un modèle linéaire quadratique, motivé en partie par les résultats en aberrations [53]. Les modèles mécanistiques de dommages des radiations constituent probablement la seule voie pour une meilleure connaissance des risques. Cette approche est valable dans la limite où la dépendance en dose et en débit de dose des cancers radio-induits est analogue à celle de la formation d'aberrations. D'un côté il y a de grandes évidences pour un lien de cause à effet entre les translocations et certains cancers (particulièrement les leucémies), et d'un autre point de vue la radiogénèse de certaines tumeurs solides semble plus reliée à d'autres dommages de radiation qui ont leurs propres dépendances en dose et en débit de dose [54].

– Une troisième application concerne les traitements des tumeurs avec les rayonnements ionisants. Une grande partie des effets entraînant la mort des cellules tumorales vient probablement de la production de dicentriques et d’anneaux centriques [55]. Une dépendance linéaire quadratique en dose ainsi qu’une dépendance vis-à-vis du débit de dose, suggérée par les résultats en aberrations chromosomiques et les modélisations, sont confirmées par des données cliniques plus directes et forment la base des traitements des tumeurs par radiothérapie moderne [56]. En complément les essais sur la sensibilité des tissus entourant une tumeur permettent d’envisager des traitements individualisés.

Conclusion et perspectives :

Les progrès technologiques récents, tels que les méthodes mFISH, ont abouti à un accroissement considérable des données cytogénétiques. Celles-ci, combinées aux modélisations numériques, fournissent une base pour comprendre la formation d'aberrations chromosomiques radio-induites.

Pour les cellules de mammifères l'ensemble des observations sur la complexité des aberrations, sur les mécanismes moléculaires et sur les dépendances en dose et en débit de dose, semble favoriser un mécanisme de « breakage-and-reunion » durant la phase G_0/G_1 impliquant le NHEJ comme mode de réparation.

La complexité des cassures mises en jeu ainsi que les événements physiques primaires pouvant les engendrer est un grand axe de recherche dans lequel s'inscrit cette thèse. Notre étude suit la démarche usuelle et décrite dans le paragraphe précédent, visant à inférer les mécanismes à partir d'observations expérimentales sur les aberrations.

La configuration même de la cassure semble jouer un rôle non négligeable dans la capacité de la cellule à la réparer. Ainsi en considérant la structure microscopique de dépôt d'énergie, on peut aborder la compréhension des événements physiques critiques pour la cellule.

Chapitre II

MODELES PHYSIQUES
D'EFFETS BIOLOGIQUES
DES RAYONNEMENTS IONISANTS

Les mécanismes de l'effet biologique des radiations sont recherchés depuis plus de 30 ans et tout particulièrement leurs premières étapes, physico-chimiques, biochimiques, et les lésions biomoléculaires en résultant. Successivement, les paramètres physiques déterminants ont d'abord été macroscopiques (modèles basés sur la dose intégrée au noyau cellulaire) puis semi-macroscopiques (théories micro-dosimétriques basées sur une description différentielle de la dose). Cette notion de dose au sens large s'est avérée insuffisante pour rendre compte correctement de l'interaction des rayonnements ionisants avec la matière biologique. Une structure plus fine de l'étude du dépôt d'énergie s'est alors développée à l'échelle du nanomètre ; modèle de D.T. Goodhead des micro-dépôts d'énergie intense sur l'ADN [57]. Cette dernière théorie, qui a évolué vers des formes plus raffinées et développées par Nikjoo et al. [58], substituant au concept de clusters d'ionisation celui de clusters de dommages, a été progressivement admise.

De nouvelles approches et données ont ainsi permis d'évoluer dans la réflexion. On présente ici les modèles qui ont permis d'améliorer la compréhension des processus physiques intervenant lors de l'interaction des rayonnements avec la matière biologique, d'un point de vue théorique et/ou en vue d'applications thérapeutiques. Bien que les modèles aient vocation à décrire l'ensemble des conséquences biologiques d'une irradiation, ils ont été plus spécialement développés pour l'inactivation cellulaire en raison du nombre important de données sur ce sujet.

I – Modèles de trace amorphe :

Modèle de Kraft - Local Effect Model (Sholtz et Kraft [59]) :

Le modèle est développé pour les particules chargées. L'événement létal est supposé être une modification locale d'une cible sensible (ADN) dans un sous-volume de la cible cellulaire critique (c'est à dire le noyau cellulaire). On suppose qu'aucune interaction de dommages sublétaux accumulés, n'est nécessaire pour produire des événements létaux. Cette approche est appelée modèle d'effet local (LEM).

La variable fondamentale pour ce calcul est la valeur de la dose locale et la densité locale d'événements létaux qui lui est associée.

Comme nous allons le détailler ci-après, la trace de la particule chargée est décomposée en volumes isodoses et une conversion est faite entre la dose locale et le nombre local d'événements létaux en se basant sur la courbe de probabilité de survie (relation de dose-effet) bien connue en rayonnement γ .

Pour les doses considérées en Radiobiologie, le nombre moyen d'événements létaux est faible et la distribution de probabilité correspondante est de type Poisson.

Le nombre moyen d'événements létaux $N_{lét}$ et la survie S sont donc reliés par une formule du type :

$$N_{lét} = -\log S .$$

On peut en déduire une « densité d'événement *locale* » v dépendant de la dose locale :

$$v(D) = \frac{-\log S}{V_{noyau}}$$

où V_{noyau} est le volume du noyau.

Pour les photons, la distribution spatiale de la dose locale est supposée homogène, même dans des nano-volumes, bien que le dépôt d'énergie soit assuré par les électrons secondaires stochastiques. Pour les particules, la distribution est caractérisée par une extrême hétérogénéité due à la distribution en $1/r^2$ de la dose locale d autour de la trace des particules (r étant la distance radiale à la trajectoire). On obtient le nombre moyen total d'événements létaux créés par une particule, par intégration des nombres moyens locaux de ces événements.

L'hypothèse fondamentale du LEM est que l'effet biologique est déterminé par la dose locale mais est indépendant du type de radiation et de la structure nanométrique du dépôt d'énergie à l'origine de cette dose locale : à dose locale donnée la densité d'événements létaux pour des particules est considérée comme égale à celle bien connue des photons:

$$v_{\text{ions}}(\mathbf{d}) = v_x(\mathbf{d})$$

Le nombre d'événements létaux pour un ion traversant le noyau cellulaire est donc :

$$N_{\text{lét}}^{\text{ion}} = \int v_x(d(x,y,z)) dV_{\text{noyau}} = \int \frac{-\log(S_x(d(x,y,z)))}{V_{\text{noyau}}} dV_{\text{noyau}}$$

Dans cette expression l'intégrale porte sur l'intersection noyau cellulaire–trace d'ion. Le modèle repose ainsi sur un lien entre effet biologique des photons et des ions, gouverné par la dose locale : l'intégrale est complètement déterminée par la réponse à bas TEL (photons γ) de la cellule examinée.

Une paramétrisation classique de type linéaire quadratique pour la courbe de survie, est utilisée pour décrire l'effet des rayonnements γ , mais aucune des hypothèses mécanistiques du modèle linéaire quadratique n'est nécessaire. Ces dernières –comme l'accumulation de lésions sublétales pour expliquer la variation quadratique de l'effet en fonction de la dose– sont de plus remises en cause par les nouvelles techniques d'analyse (voir chapitre III).

D'autres modèles de trace amorphe (*Katz et al.* [60]) considèrent arbitrairement deux modes d'action des particules : ion-kill et γ -kill, pour reproduire les efficacités biologiques. Ces deux modes décrivent respectivement les effets du cœur de la trace de l'ion et de sa pénombre dans laquelle la faible densité d'ionisation est similaire à celle des rayons γ .

La propriété clé du modèle LEM est de pouvoir prédire les EBR des particules chargées indépendamment d'hypothèses sur leur mode d'action. Le LEM fournit une explication à la transition des courbes de survie épaulées à bas TEL vers des courbes purement exponentielles lorsque le TEL croît [59 ;61]. Surtout il prédit une décroissance des sections efficaces d'inactivation par ions à haut TEL, liée au rétrécissement concomitant de la trace de l'ion et à la diminution du volume d'intersection noyau cellulaire–trace de la particule. Le défaut majeur du modèle LEM de Kraft est l'hypothèse de base même : l'indépendance de l'effet par rapport à la manière dont l'énergie est déposée. Le modèle garde toute sa valeur en tant qu'approche phénoménologique et il est pour l'instant un outil irremplaçable dans la thérapie des tumeurs par ions.

II – Modèles de trace stochastique :

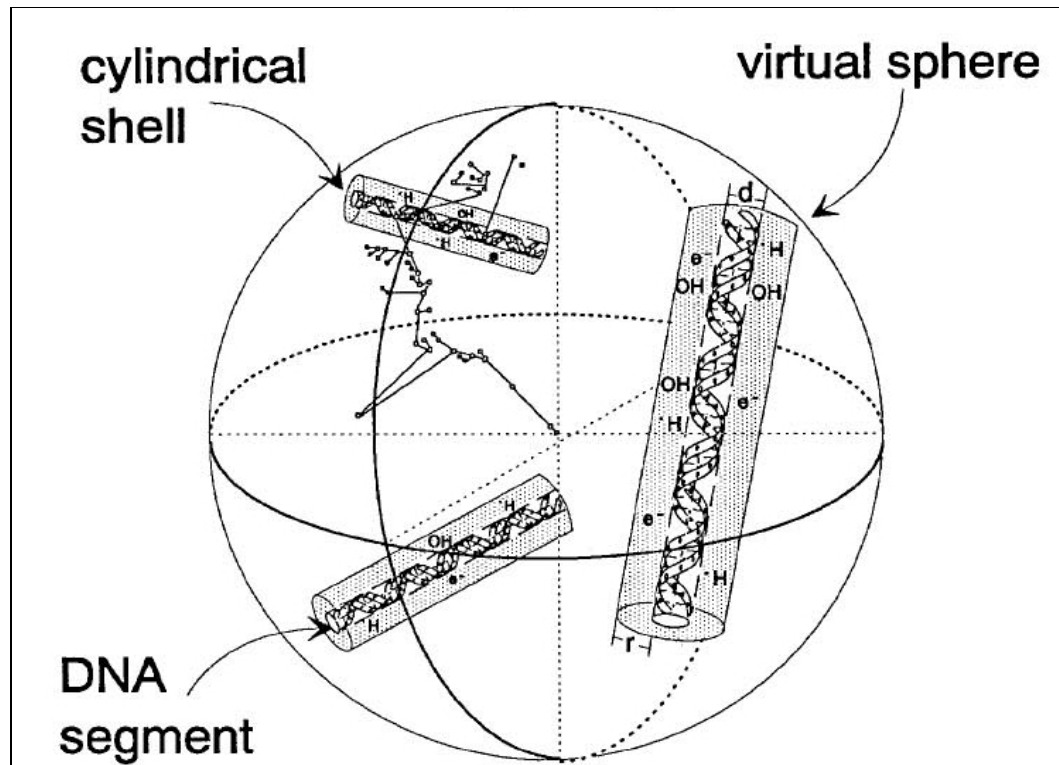
II.1 – Modèle des clusters de fin de trace (Goodhead et al. [57]) :

Le modèle des clusters de fin de trace a proposé une explication pour les variations du nombre d'événements létaux $N_{\text{lét}}$ induits par gray de rayonnements électromagnétiques et de particules α . On présente ici ses bases et ses limites.

Selon ce modèle, l'inactivation cellulaire résulte de micro-dépôts d'énergie intenses (clusters d'ionisations) sur l'ADN, créés en fin de parcours des électrons secondaires. Le schéma II-1 présente la simulation du dépôt d'énergie utilisé dans le modèle de D.T Goodhead.

Schéma et principe des clusters critiques :

Figure II-1 : Diagramme illustrant la sphère virtuelle encerclant la trace simulée d'un électron interceptée par les cylindres cibles positionnés au hasard, dans le cadre du modèle des clusters (Nikjoo et al. [62]) :



- Simulation Monte Carlo du transport des électrons dans l'eau :

. La cellule est modélisée par de l'eau en phase gazeuse car les sections efficaces d'interaction électrons/molécules d'eau sont très bien connues et elle représente 70% à 80% du milieu biologique.

. Les cibles biologiques (portions d'ADN) sont définies par une distribution aléatoire de cibles cylindriques.

. On génère 1 Gy d'irradiation par des électrons et on recense les interactions et dépôts d'énergie correspondant au parcours de ces électrons.

. Les cylindres cibles sont de tailles ajustables, on accède ainsi aux fréquences de dépôts d'énergie supérieure à une énergie seuil dans des volumes de taille donnée.

- L'idée de Goodhead est que les électrons de quelques centaines d'eV issus de l'irradiation déposeraient leur énergie sous forme de micro-dépôts denses et localisés. Le TEL de ces électrons est relativement important et leur parcours est de quelques nanomètres. Aux basses énergies d'électrons ($E \sim 100$ eV) les processus de diffusions élastiques sont aussi importants que les processus inélastiques et bien qu'ils ne participent pas au dépôt d'énergie ils en déterminent sa structure spatiale par la distribution angulaire due aux nombreuses collisions élastiques. Lorsque l'énergie de l'électron augmente, les processus d'interactions inélastiques deviennent prédominants, on retrouve alors la trace rectiligne semblable à celle des ions, sauf en fin de parcours lorsque l'énergie des électrons est à nouveau faible.

Les lésions létales sont localisées spatialement. Les événements critiques (entraînant la mort de la cellule) sont supposés être associés au dépôt d'une énergie seuil critique E_c dans un volume critique V_c (segment d'ADN ou nucléosome). Ce volume a une dimension critique R_c , de quelques nm. Les valeurs de R_c et E_c sont déterminées à partir des résultats expérimentaux. L'énergie déposée dans V_c est la somme d'un grand nombre de petits dépôts d'énergie (10-20 eV) : un volume critique avec une énergie déposée $E > E_c$ est appelé un cluster critique de dépôts d'énergie.

Le nombre $N_{\text{lét}}$ d'événements létaux par unité de dose est supposé être proportionnel au nombre N_{cluster} de clusters critiques :

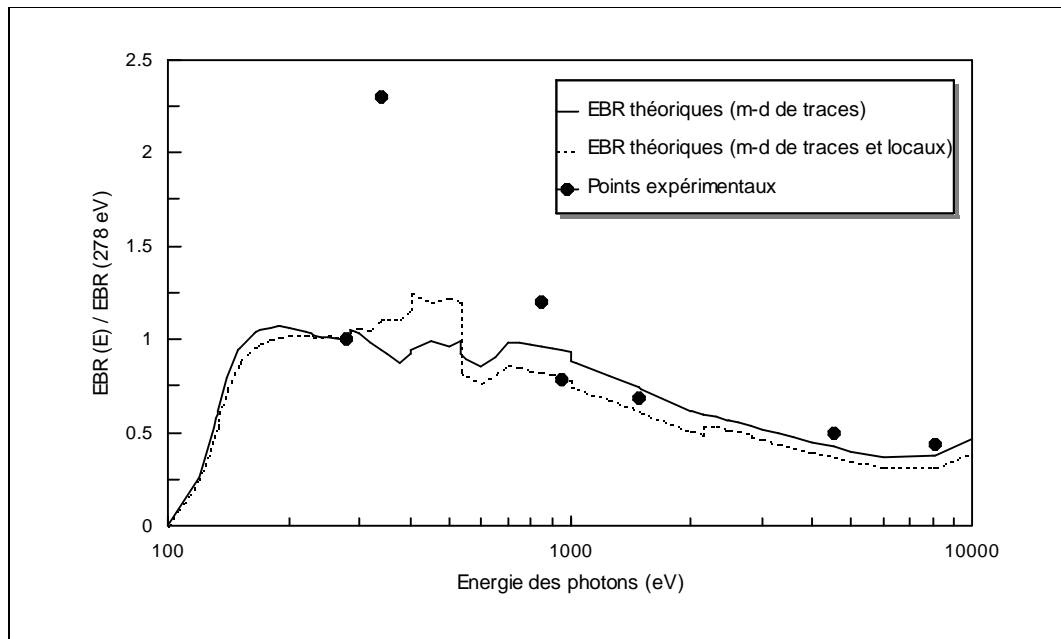
$$N_{\text{lét}} = \varepsilon \times N_{\text{cluster}}$$

Dans cette expression ε est l'efficacité létale attribuée aux clusters, c'est-à-dire leur probabilité d'entraîner l'inactivation cellulaire. La valeur de ε est obtenue par ajustement des valeurs calculées aux résultats expérimentaux.

On discute ci-dessous de la capacité du modèle à reproduire l'ensemble des efficacités biologiques des rayonnements ionisants.

i) Historiquement le modèle de clusters de fin de trace a été développé pour les rayonnements électromagnétiques. La figure II-2 représente les EBR d'inactivation de cellules V79, théoriques et expérimentaux, pour diverses énergies de photons, normalisées à L'EBR des photons de 278eV.

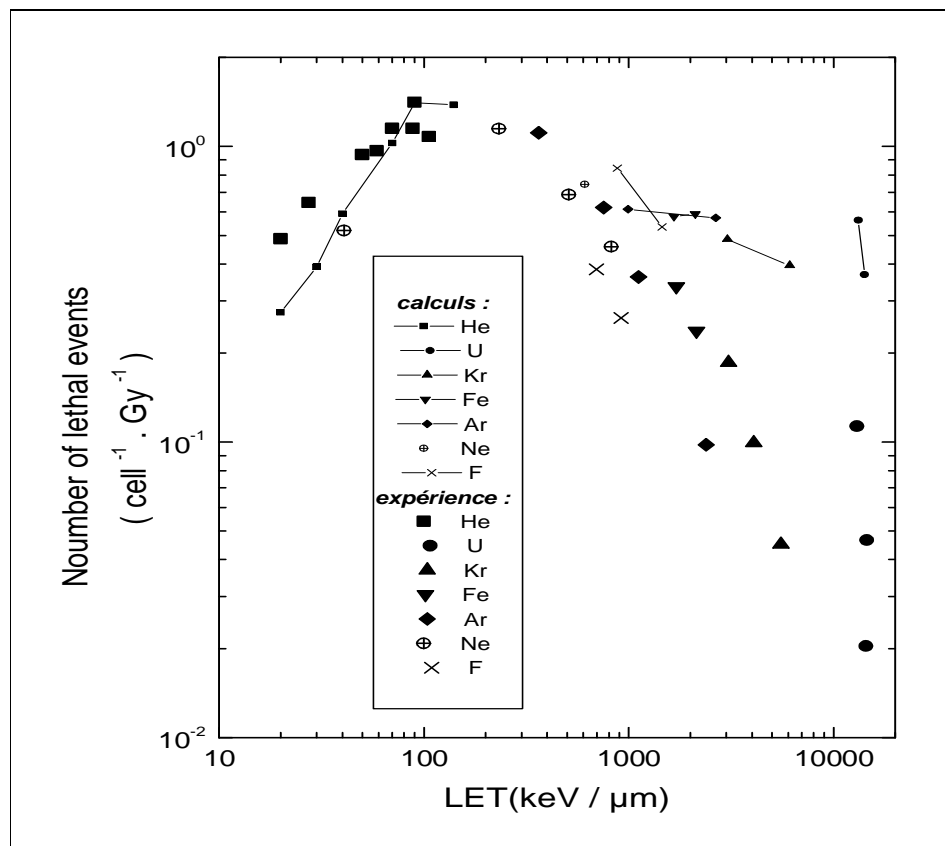
Figure II-2 : EBR d'inactivation cellulaire calculées par le modèle de fin de trace et EBR expérimentales [63].



On s'aperçoit que le modèle de clusters de fins de trace est incapable de reproduire l'accroissement abrupt d'EBR au passage du seuil K du carbone, mis en évidence par l'équipe. Le modèle prévoit au contraire des EBR variant continûment en fonction de l'énergie des rayons X.

ii) L'équipe a testé la généralité de la corrélation établie pour les particules α , entre événements létaux et clusters d'énergie supérieure à 340 eV dans des nucléosomes [64]. La figure II-3 présente une comparaison des nombres d'événements létaux induits par gray, expérimentaux et calculés dans l'hypothèse de D.T. Goodhead : un événement critique correspond à une énergie cédée > 340 eV dans un nucléosome, et possède une efficacité létale de 4%, pour des ions de divers TEL.

Figure II-3 : Comparaison des nombres d'événement létaux induits par gray expérimentaux et calculés selon le modèle des clusters [64].



Les désaccords entre les résultats du modèle de clusters de fin de trace et les résultats expérimentaux sont flagrants. En particulier, le modèle ne permet pas de reproduire la valeur paradoxalement basse des efficacités d'inactivation des ions de très hauts TEL : des facteurs de désaccord de l'ordre de 20 sur le nombre d'événements létaux apparaissent entre expérience et théorie [63, 64].

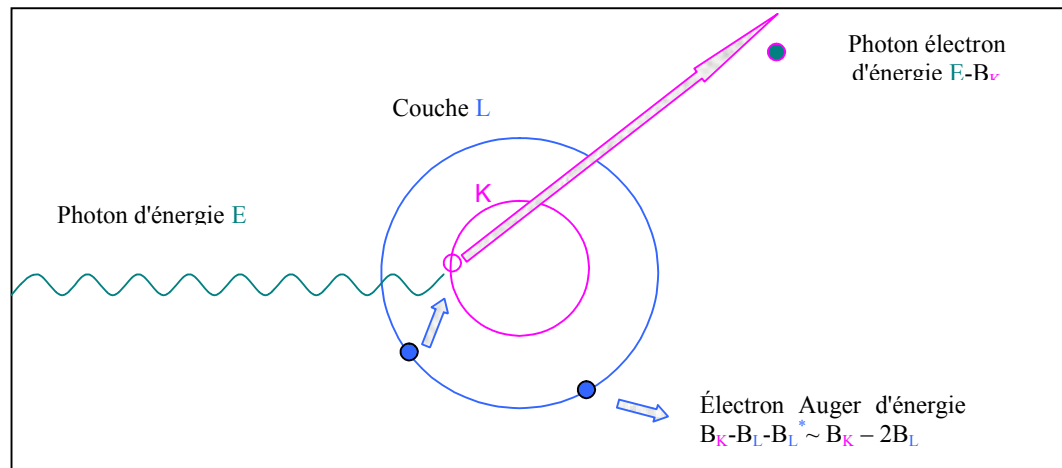
Ainsi le modèle de clusters de fins de trace ne peut pas décrire l'ensemble des EBR des rayons X et des ions. Il semble donc clair que les clusters de fin de trace ne peuvent être retenus comme événements critiques, ce qui ne remet pas en cause la notion elle-même de clusters critiques.

Une autre catégorie de clusters critiques, celle résultant de l'ionisation en couche interne des atomes de l'ADN, a été explorée par l'équipe, comme détaillée dans la suite de ce chapitre. C'est dans cette voie que s'inscrit ce travail de thèse. Les événements d'ionisation en couche interne dits aussi événements de cœur, sont très rares (quelques ‰ de toutes les interactions par les ions, électrons et γ et quelque 10% du TEL) et ils ont souvent été oubliés. De plus l'observation de D.T. Goodhead d'une absence de corrélation entre mort cellulaire et taux d'ionisations total des atomes de l'ADN (couches internes + externes) a contribué à occulter le rôle spécifique des ionisations « K » de l'ADN [57].

II.2 - Modèle d'ionisation de cœur :

Événements d'ionisation en couche interne :

Figure II-4 : Réarrangement électronique suivant une ionisation en couche interne K. Emission d'un électron Auger et d'un photo électron K.



- Pour les rayonnements X ultra-mous l'effet photoélectrique est le processus prépondérant d'interaction avec la matière. *Ce processus a lieu de manière prédominante en couche interne des atomes.* Un photon $h\nu$ est absorbé par l'atome cible. En réponse celui-ci éjecte un électron d'une de ses couches d'énergie de liaison B_c . Il s'agit d'un processus à seuil, il faut $h\nu > B_c$ et l'énergie cinétique du photoélectron est $E_{e_c} = h\nu - B_c$. Plus l'énergie du photon est proche de l'énergie de liaison plus la probabilité d'interaction est grande.

Lorsque l'électron est éjecté d'une couche interne d'un atome, la lacune de cœur créée entraîne un réarrangement du cortège électronique par cascades successives des électrons moins liés des couches plus externes vers les couches plus liées.

L'atome cible a deux voies concurrentielles de désexcitation pour dissiper l'énergie d'une telle ionisation, soit émettre un photon –fluorescence– soit éjecter un électron –c'est l'émission Auger.

Pour les atomes légers le rendement de fluorescence est petit, les atomes de la matière biologique ionisés en couches internes se désexcitent donc de façon prépondérante par émission Auger.

L'énergie cinétique de l'électron Auger est égale à la différence entre l'énergie E libérée par la transition de l'électron vers la couche la plus liée et l'énergie de liaison de l'électron éjecté.

L'énergie cinétique d'un électron éjecté de la couche L au cours de la transition L→K d'un autre électron est ainsi :

$$E_{e^-}^{\text{Auger}} = E - B_L^* = B_K - B_L - B_L^*$$

B_L^* est l'énergie de liaison de la couche L de l'atome ionisé, en fait $B_L^* \sim B_L$ donc :

$$E_{e^-}^{\text{Auger}} \approx B_K - 2B_L.$$

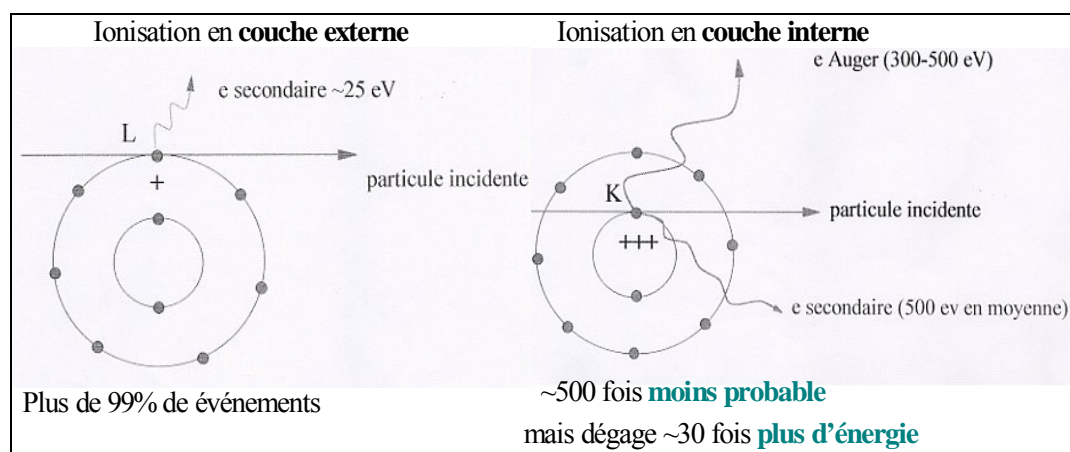
Plus l'atome est lourd plus il y a d'émissions Auger successives –toujours en concurrence avec la fluorescence– jusqu'à la désexcitation complète de l'atome.

Une ionisation en couche interne par rayons X ultra-mous laisse l'atome cible au moins doublement ionisé et coïncide avec l'éjection d'électrons de basses énergies ($10^2 - 10^3$ eV), caractéristiques des énergies de liaison de la cible.

- Pour les rayonnements usuels (e^- , ions) les ionisations en couches internes ne sont pas les interactions majoritaires. Elles ne représentent que quelques pour mille de l'ensemble des événements. La probabilité d'éjecter un électron d'une couche interne (ou la section efficace d'ionisation, σ , de cette couche) est maximale lorsque la vitesse de l'électron incident est proche de celle de l'électron à éjecter. L'énergie des électrons internes éjectés est de l'ordre de l'énergie de liaison, soit de plusieurs centaines d'eV.

Pour les électrons rapides et les ions, les énergies moyennes des électrons émis dépendent assez faiblement de la vitesse de la particule incidente et sont assez voisines des énergies de liaison de la couche interne K [65].

Figure II-5 : schéma des ionisations en couche externe et interne par une particule chargée incidente.



D'une façon générale les électrons émis lors des événements d'ionisation en couche interne ont de très grands pouvoirs d'ionisation (jusqu'à 30 keV/ μm). De plus au site même de l'interaction primaire il reste un trou multichargé dû aux ionisations multiples créées par les relaxations Auger simples ou multiples.

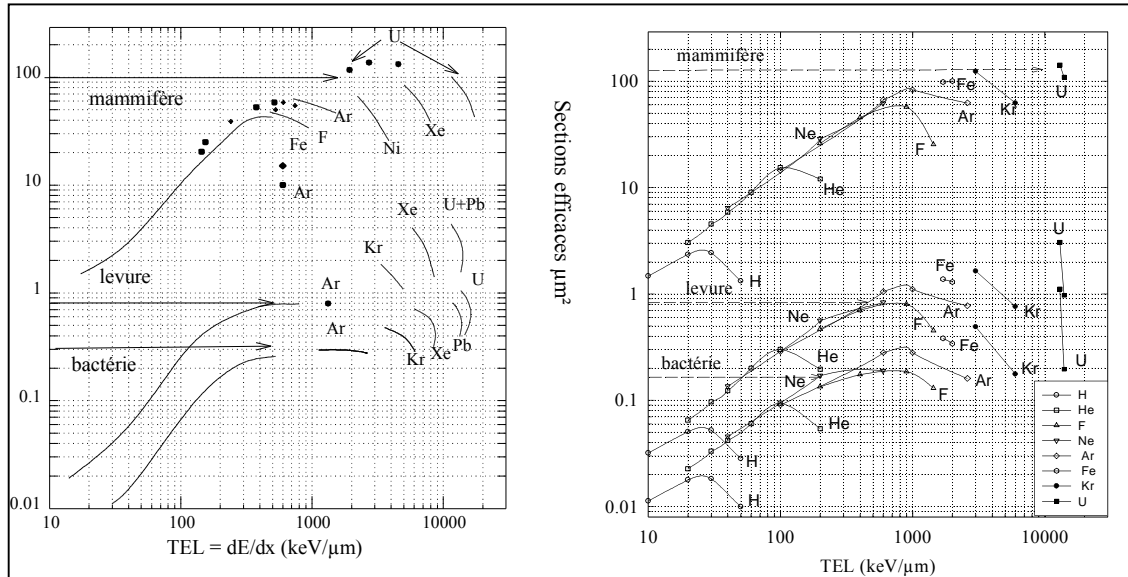
Lorsque ces événements ont lieu sur les atomes de l'ADN, ils conjuguent interaction la plus forte et site le plus stratégique de la cellule. C'est pourquoi ils ont été proposés comme possibles vecteurs des effets biologiques et font l'objet de recherches actives depuis 1994. Par la suite on parlera d'événement de cœur ou « K », pour les événements d'ionisation en couche interne (également noté I.C.I) : couches K des atomes de carbone, oxygène, azote, K et L des atomes de phosphore.

Modèle d'événements de cœur :

- Une première corrélation a été mise en évidence en 1994 entre sections efficaces expérimentales d'inactivation cellulaire pour plusieurs types d'ions de divers TEL et sections efficaces d'ionisations en couche interne de l'ensemble des atomes de l'ADN (Chetioui et al. [1]). Cette observation a conduit à tester la possibilité d'une contribution importante des événements « K » sur l'ADN à l'effet léthal des rayonnements ionisants (figure II-6).

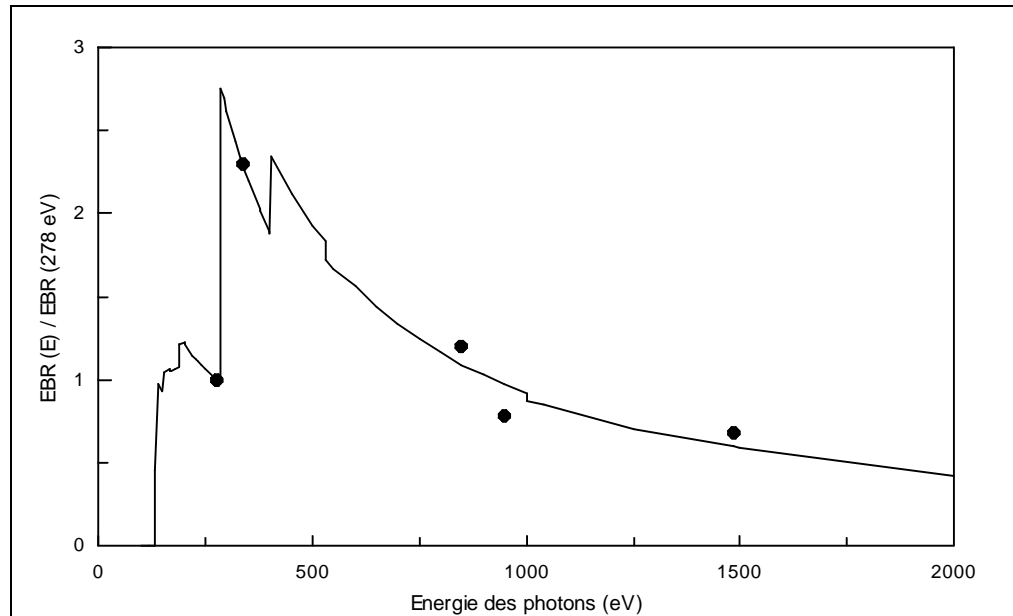
Le point frappant (figure II-6) est que les sections efficaces augmentent puis décroissent bien que le TEL croisse continûment. Ces propriétés sont en fait inhérentes aux sections efficaces d'ionisation « K ». Ces dernières sont maximales pour des vitesses d'impact d'ions proches des vitesses des électrons des couches internes et décroissent lorsque la vitesse de ces ions diminue et/ou lorsque leur charge augmente (c'est à dire lorsque leur TEL augmente), comme l'illustrent les courbes de la figure II-6. La décroissance de l'inactivation pour les ions à haut TEL est particulièrement bien corrélée aux sections efficaces. Il a été montré ultérieurement que les I.C.I pourraient expliquer 50 à 100% de l'effet léthal des ions [2].

Figure II-6 : Sections efficaces expérimentales d'inactivation de cellules de mammifères, levures et spores de bactéries pour divers types d'ions (à gauche) et sections efficaces d'ionisations « K » de l'ensemble des atomes de l'ADN pour ces mêmes ions [1]. Pour expliquer la corrélation on introduit une efficacité létale des événements «K» sur l'ADN d'environ 6 %.



- Il a enfin été prédit, puis vérifié expérimentalement, que l'EBR des rayons X ultra-mous est aussi corrélée aux événements d'ionisations en couche interne [4] : l'accroissement abrupt de l'EBR au passage du seuil K du carbone observé expérimentalement pour des cellules V79 [2-4] correspond à l'augmentation d'un facteur ~ 2 du nombre d'ionisations en couche interne des atomes de l'ADN. Ce dernier accroissement est dû à la forte abondance du carbone dans l'ADN (37%) par rapport au milieu cellulaire (11%). La figure II-7 présente les EBR théoriques dans le cadre du modèle d'événement de cœur attribuant la létalité aux seules ionisations en couches internes, ainsi que les EBR expérimentales pour les rayons X ultra-mous.

Figure II-7 : EBR des rayonnements X ultra-mous prédites par le modèle « K » (trait plein) et expérimentales (points noirs). Les EBR sont données sous la forme des rapports des EBR aux différentes énergies des photons par rapport à l'EBR de 278 eV pris comme référence [63].



Le modèle de fin de trace de Goodhead ne peut prévoir une telle discontinuité au passage du seuil K du carbone de l'ADN car l'efficacité biologique est attribuée aux fins de traces des électrons. La délocalisation des effets par rapport au site d'ionisation initiale implique que les ionisations-mêmes de l'ADN ne jouent pas de rôle préférentiel.

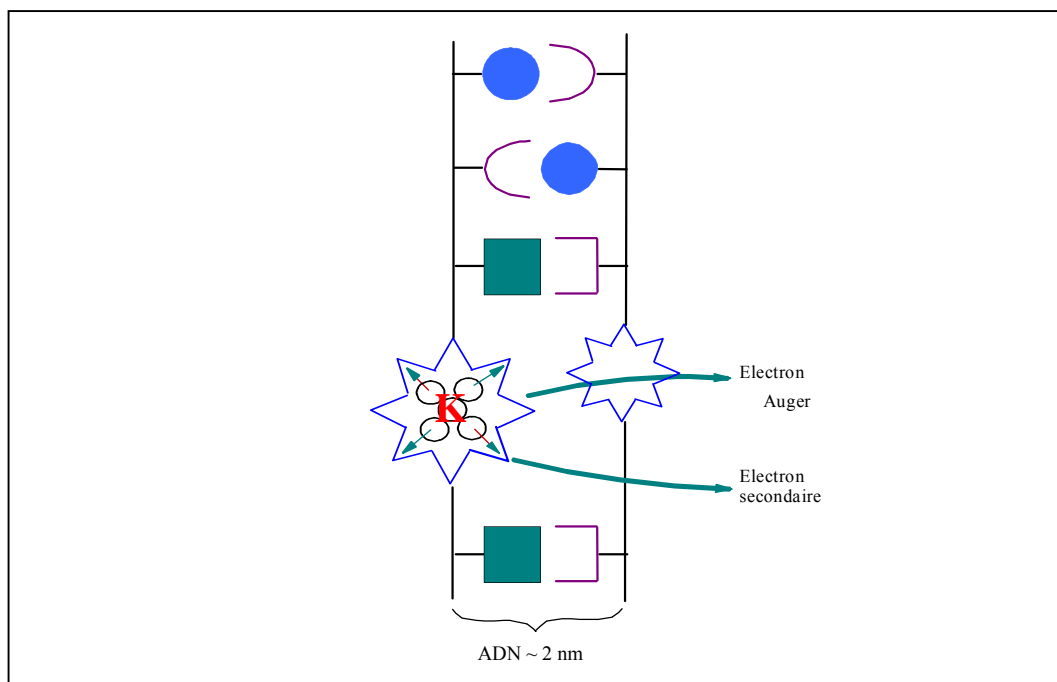
L'événement de cœur peut être lui aussi vu comme un cluster d'ionisations dont l'origine est au sein même de l'ADN avec une concentration d'énergie intense au site même d'interaction.

Schéma proposé pour l'induction de lésions complexes sur l'ADN par ICI :

La relaxation du trou multichargé au site même d'ionisation entraîne vraisemblablement la fragmentation de la chaîne moléculaire [66]. Les énergies des électrons émis font qu'ils peuvent recouvrir l'ADN (parcours $R \sim$ quelques nm) et induire d'autres dommages le long de leur parcours.

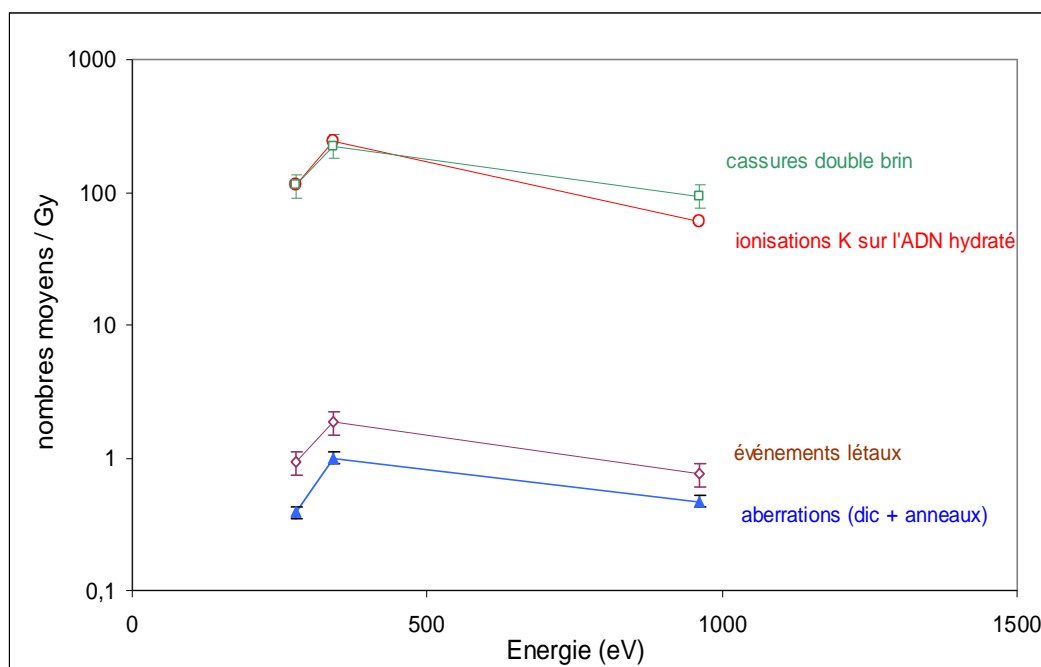
Les ionisations en couche interne lorsqu'elles surviennent sur l'ADN vont donc conduire à des lésions hautement complexes (en particulier lorsque les deux électrons sont émis vers l'intérieur de l'ADN). Le schéma de la figure II-8 est proposé pour l'induction d'une catégorie de dommages qui seraient difficiles à réparer par la cellule.

Figure II-8 : catégorie de dommages induits par un événement «K», qui seraient difficiles à réparer par les mécanismes de réparation de la cellule (clusters de dommages particuliers, 'dirty damage').



On peut également préciser qu'une série d'expériences sur les cdb [67] et les aberrations chromosomiques [3] induites par les rayons X ultra-mous a aussi montré une corrélation entre les efficacités d'induction de cdb et d'aberrations dicentriques avec celles de production des événements d'ionisations en couche interne de l'ADN. La figure II-9 présente les résultats correspondants.

Figure II-9 : Cassures double-brin, événement létal, aberrations 'dicentriques + anneaux' et événements d'ionisations en couche interne sur l'ADN induits par des rayons X ultra-mous en cellules V79 [67].



Efficacité biologique des ionisations K du phosphore :

Les travaux des équipes japonaise (Saigusa et al. [68]) et française (Le Sech et al. [69]) avaient mis en évidence une efficacité biologique importante des ionisations K du phosphore de l'ADN. Les résultats corroborent totalement l'idée d'un rôle majeur de la létalité des événements «K», mais compte tenu de la très faible abondance du phosphore dans l'ADN et des faibles sections efficaces d'ionisations de coeur de cet élément par les particules chargées par rapport à celles des autres atomes constitutifs de l'ADN, une faible contribution globale aux effets des radiations est attendue pour les ionisations de coeur des atomes P, contrairement aux autres atomes C, N, O de l'ADN.

II.3 – Test de l'efficacité biologique des événements « K » :


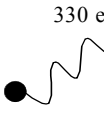

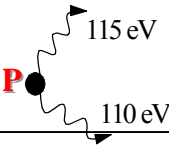
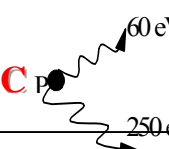
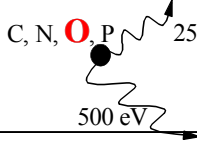
Nous avons montré que grâce aux rayons X ultra-mous on dispose d'un test décisif de l'effet des ionisations en couche interne sur l'ADN. Les rayons X mous possèdent en effet la propriété unique d'interagir de façon prépondérante via les I.C.I. De plus il est possible en ajustant l'énergie X de fixer l'énergie des électrons émis et « d'imiter » les I.C.I créées par ions ou électrons.

En sélectionnant le seuil K d'un atome C, N, O (c'est à dire en irradiant au-dessus du seuil d'ionisation en couche interne de l'atome considéré) on peut cibler préférentiellement une espèce atomique donnée et faire varier le nombre d'I.C.I par gray sur l'ADN. Ainsi en raison de la richesse de l'ADN en carbone, en utilisant des rayons X juste au-dessus du seuil K du carbone C (290 eV) et en dessous du seuil de l'oxygène O (540 eV) il est possible d'exciter préférentiellement l'ADN.

Dans la fenêtre d'énergie 290eV-540eV le nombre d'événements «K» sur l'ADN pour une dose donnée dans la cellule est alors deux fois plus important que juste à l'extérieur de cette zone. En particulier pour une même dose dans la cellule, [le nombre d'événements de cœur sur l'ADN est environ deux fois plus grand à 350 eV qu'à 250 eV \[2 ;4\].](#)

Le tableau II-10 présente pour les rayons X ultra-mous, les nombres d'événements de cœur sur l'ADN par gray dans la cellule et indique les proportions d'ionisations en couches interne et externe aux énergies de rayons X isoatténués dans la cellule (voir chapitre III section A paragraphe I.5).

Tableau II-10 : ionisations sur l'ADN induites par rayons X ultra-mous. % des I.C.I et I.C.E et nombres d'événements «K» sur l'ADN hydraté (12 molécules d'H₂O par nucléotide) par gray dans la cellule.

Energies des X	250 eV	350 eV	810 eV
Ionisations en couche externe I.C.E			
	70%	26%	6%
Ionisations « K » (I.C.I)			
	30%	74%	94%
Nombre d'événements «K»	114	245	74

Si les événements « K » sur l'ADN sont vecteurs d'un effet biologique donné, la signature de ce phénomène sera l'apparition d'un accroissement abrupt d'EBR pour cet effet au passage du seuil K du carbone. On dispose ainsi d'un test décisif de l'efficacité biologique des événements «K».

Chapitre III

METHODES

PHYSIQUES

&

BIOLOGIQUES

A - METHODES PHYSIQUES

I – Irradiation en rayons X ultra-mous :

I.1 – Rayonnement Synchrotron :

Toutes les particules chargées se déplaçant de façon non uniforme c'est-à-dire subissant une accélération, émettent un champ électromagnétique. Selon la direction respective de l'accélération et la vitesse de la particule, il peut y avoir émission ou absorption d'ondes électromagnétiques. Lors de l'émission il y a décélération de la particule chargée. Ainsi si on veut maintenir la même énergie fixe dans un anneau de stockage par exemple, il est nécessaire d'accélérer la particule. Il s'agit alors de l'absorption ; l'énergie utile est généralement transmise par une cavité Radio-Fréquence (RF).

Le rayonnement émis dans un anneau de stockage est inversement proportionnel à la masse de la particule et plus efficace pour les électrons que pour les protons. En effet pour ces derniers ils ne contribuent pratiquement pas à l'amortissement des oscillations des particules par rapport à la position d'équilibre, mais il est en revanche dominant pour des anneaux à électrons/positons. La perte d'énergie par tour due aux différents amortissements est égale à celle injectée par la cavité RF pour de tels anneaux.

Le rayonnement synchrotron est d'autant plus intense que les particules sont légères, et maximal lorsque l'accélération est perpendiculaire à la vitesse (ce qui est le cas dans les éléments magnétiques de courbure des accélérateurs circulaires).

La puissance est émise tangentiellement à la trajectoire de l'électron à l'intérieur d'un cône de demi-angle d'ouverture horizontale $\theta_{1/2} \sim 1/\gamma$. Pour les grandes énergies l'émission est très directive.

Outre leur brillance les sources de rayonnement synchrotron ont un spectre de fréquence extrêmement large pouvant couvrir l'infrarouge (IR), le visible, l'ultraviolet (UV) et les rayons X. En effet lorsque la vitesse des particules approche celle de la lumière, la fréquence est déplacée vers les courtes longueurs d'ondes (effet Doppler relativiste vers le bleu) et lorsque l'énergie cinétique est très grande devant son énergie de masse, on atteint de très courtes longueur d'ondes telles celles des rayons X.

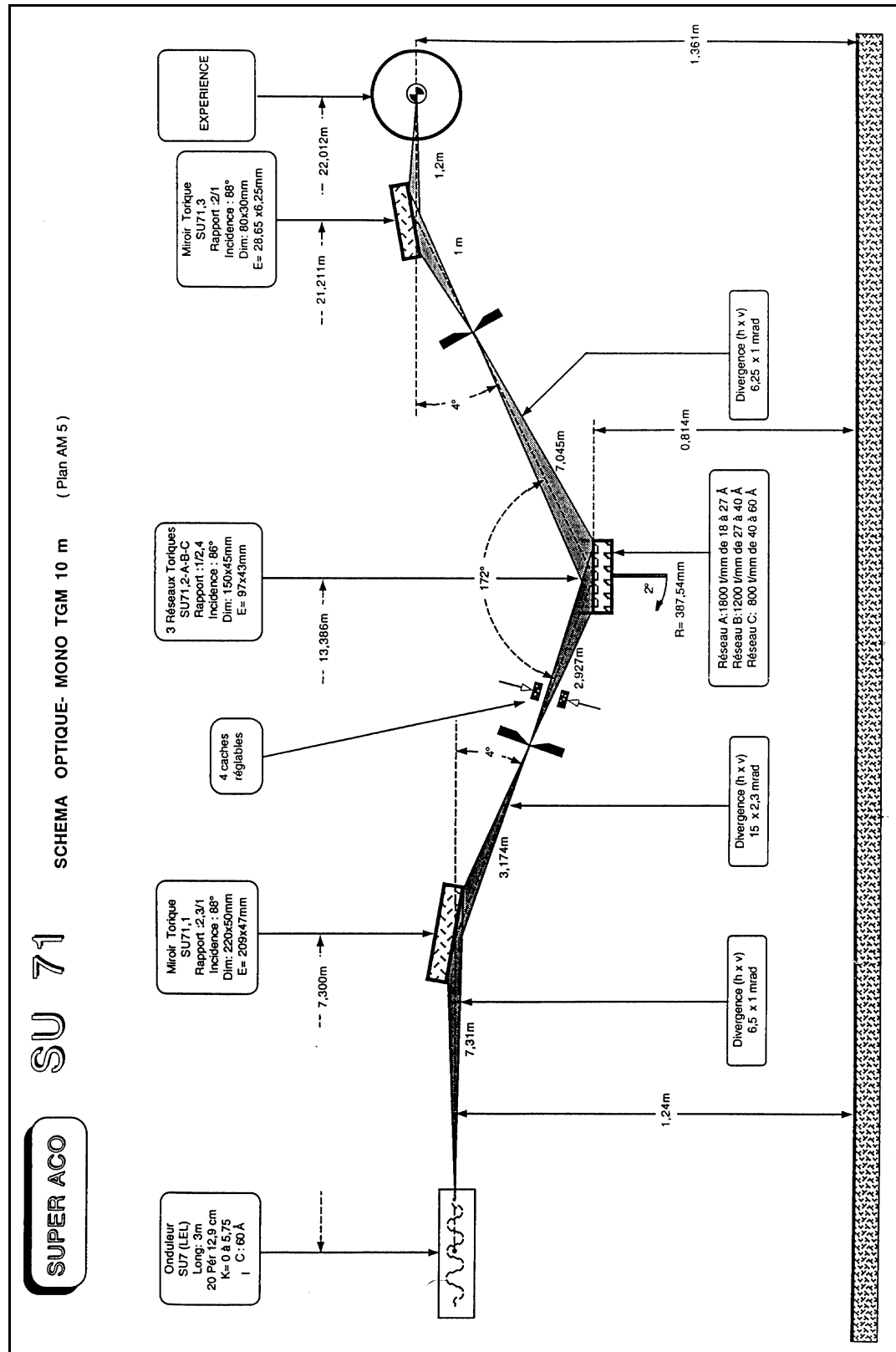
Historiquement on a d'abord considéré le rayonnement synchrotron émis sur une orbite circulaire d'un synchrotron, puis en imprimant à la particule un mouvement transverse périodique (sinusoïdal) par des structures magnétiques comme des wigglers ou onduleurs, l'intensité a été considérablement augmentée [70-72].

1.2 – LURE - Ligne SU7 :

Nos expériences d'irradiation en rayonnement X mous nécessitent l'utilisation du rayonnement synchrotron puisqu'elles mettent en œuvre des énergies de quelques centaines d'eV (200-1000eV). Le LURE d'Orsay (Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique) et l'anneau Super ACO produisent justement cette gamme d'énergie. De plus la sélection de façon (quasi) monochromatique de la longueur d'onde est un atout considérable que ne permettent pas les traditionnels tubes X.

Comme tout synchrotron de haute énergie, celui du LURE requiert une cascade de pré-accelérateurs –dont un LINAC de 2,3 GeV comme injecteur–, permettant par l'impact d'électrons sur une cible de tungstène la production de positons de 800 MeV pour l'anneau Super ACO. L'utilisation des positons permet une stabilité et une durée de vie τ plus grandes qu'avec des électrons. Il existe deux régimes : 24 paquets (400mA, $\tau \sim 5h$) et 4 paquets (200mA, $\tau \sim 3h$). Nous utilisons la ligne SU7-A1 à haut flux qui provient d'un onduleur SU7. La figure III-1 présente le schéma optique de la ligne utilisée au LURE ; un système optique composé de miroirs, caches, fentes et réseaux toriques permet d'affiner la résolution du faisceau pour chaque énergie et d'optimiser l'intensité de la lumière extraite.

Figure III-1 : schéma optique de la ligne SU7A1 du LURE :



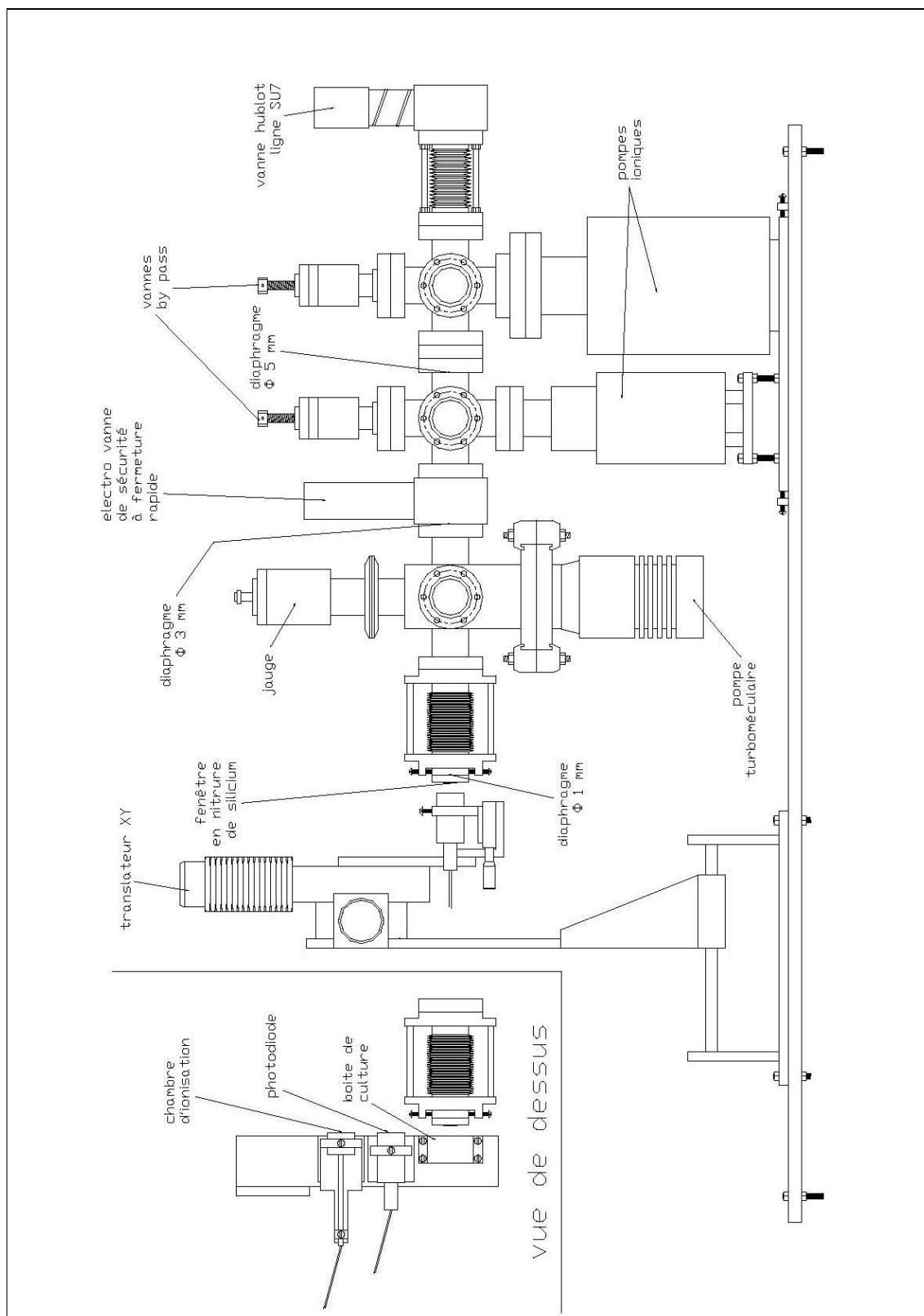
I.3 – Extraction du faisceau :

Notre dispositif d'irradiation répond à deux impératifs :

- Un de type biologique, à savoir la nécessité d'irradier les cellules à l'air et à pression atmosphérique. Il convient donc d'extraire le faisceau de rayons X ultra-mous en gardant la proportion d'harmoniques supérieures aussi petite que possible. Ces dernières s'accroissent après transmission de la feuille de sortie et modifient la dose effectivement délivrée. Une fenêtre très fine, néanmoins résistante et étanche est utilisée. Il s'agit d'une feuille de nitrure de silicium de 150 nm. Un système de pompage différentiel permet de passer de la pression 10^{-10} Torr de l'ultravide des lignes, à celle 10^{-7} Torr au niveau de cette fenêtre poreuse de N_4Si_3 .
- Un impératif physique à savoir la nécessité de réduire au maximum la très grande absorption des rayons X ultra-mous dans la matière interposée avant l'échantillon biologique. Il faut réduire au minimum l'épaisseur de tous les supports de cellules, fenêtres de détecteurs etc. Ceci est particulièrement vrai au seuil K du carbone car cet élément est abondant dans les matériaux inorganiques comme le milieu cellulaire, le mylar support des cellules etc.

Le schéma du dispositif d'extraction utilisé pour nos expériences sur la ligne SU7 du LURE est présenté figure III-2.

Figure III-2 : Schéma du dispositif d'extraction utilisé au LURE sur la ligne SU7 :



I.4 – Dispositif d'irradiation :

La taille du faisceau est de quelques mm² alors que celle de l'échantillon est environ 1cm². Afin d'assurer une irradiation homogène on utilise un système de translation XY des échantillons qui permet de délivrer une dose uniforme sur 1 cm². La commande automatique de la platine supportant ce système a été améliorée par rapport aux campagnes d'irradiation précédentes. On dispose maintenant d'une interface plus conviviale et performante sous l'application PIPI (Programme d'Irradiation pour la Platine ITL) développé par JPG Microsystems[®]. Cette dernière reprend de façon plus moderne tous les paramètres des programmes initiaux en Turbo-Pascal et permet sans ambiguïté de réaliser et de planifier les irradiations et expériences de dosimétrie avec les paramètres de balayages, de détection pour les détecteurs etc.

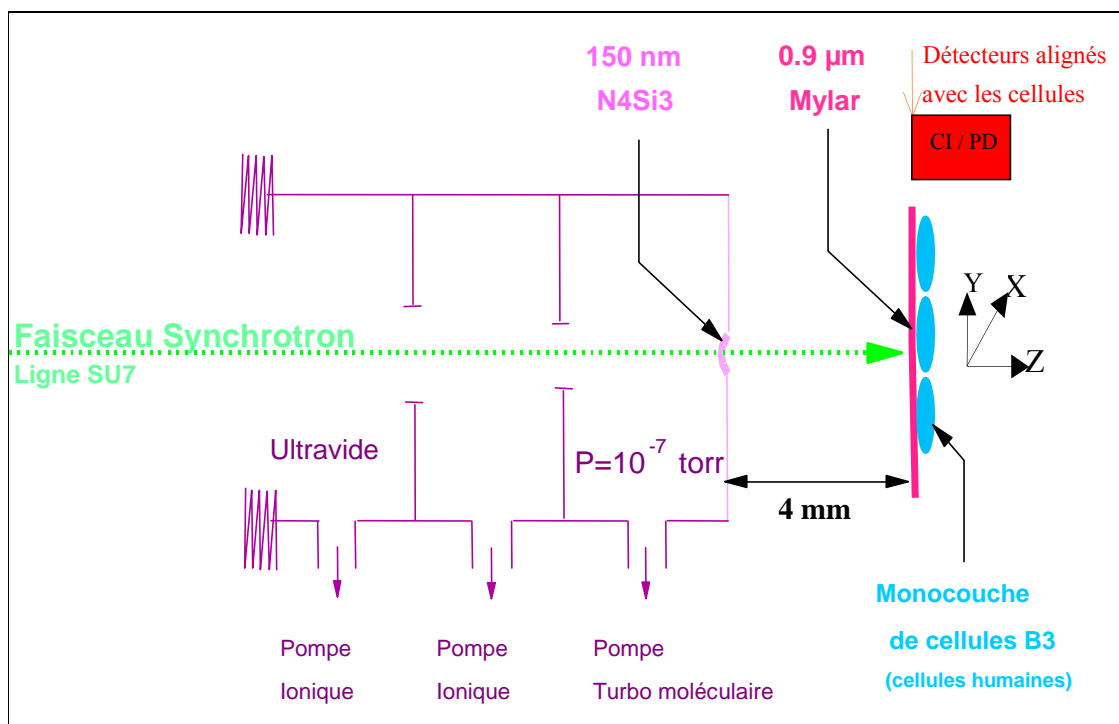
Afin de réaliser une dosimétrie aussi précise que possible, deux détecteurs sont montés en parallèle (une photodiode et une chambre d'ionisation) sur la platine d'irradiation et sont parfaitement alignés avec la cible (un détecteur pour monitorer l'intensité, l'autre pour étalonner le premier).

Compte tenu de la forte absorption des rayons X ultra-mous, la nécessité de cette dosimétrie absolue est impérative. Les épaisseurs des fenêtres d'entrées protectrices des deux détecteurs (Ti+C pour la photodiode et mylar aluminisé pour la chambre d'ionisation) sont mesurées très précisément. Il en est de même pour toutes les épaisseurs des matériaux tels que les supports des échantillons biologiques en mylar et les épaisseurs d'air avant la cible et le détecteur (voir section I.7). La figure III-3 présente le dispositif d'irradiation.

I.5 - Energies stratégiques – iso-atténuation :

Comme les rayonnements X ultra-mous sont très atténués dans les échantillons biologiques, il est important, pour que les comparaisons soient significatives, que les rayons X aux différentes énergies soient iso-atténués dans les échantillons, c'est à dire qu'il y ait le même profil de dose dans les cellules. On a ainsi choisi deux énergies, 250eV et 350eV, autour du seuil K du carbone qui ont le même coefficient d'atténuation dans le milieu cellulaire.

Figure III-3 : schéma du dispositif d'irradiation. Les deux détecteurs et les échantillons biologiques sont parfaitement alignés. Les cellules sont sur un film de mylar. La distance entre la fenêtre de nitrure de silicium et la feuille de mylar est déterminée au 1/10 de mm.



I.6 – Les détecteurs :

La dose à l'entrée des cellules a été calculée à partir de l'intensité du rayonnement X mesurée régulièrement après chaque cycle d'irradiation (~100s) à l'aide d'une photodiode (PD). Cette dernière a été étalonnée à l'aide d'une chambre d'ionisation (CI) servant de détecteur absolu. Pour les comparaisons des détecteurs (PD vs. CI), les deux détecteurs étaient montés en parallèle et parfaitement alignés sur la platine d'irradiation, comme illustré sur la figure III-3. Il en est de même pour la PD et les échantillons lors de l'irradiation.

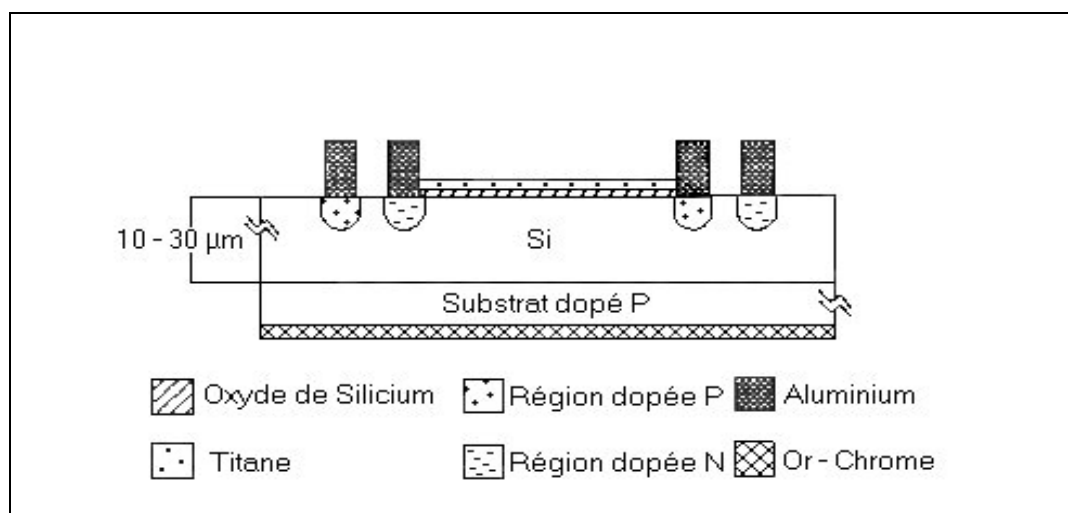
– La photodiode :

Nous avons utilisé une PD en silicium à jonction p-n (AXUV 100G Ti/C) fabriquée par IRD (International Radiation Detector). Ce type de détecteur est plus rapide et plus simple d'utilisation que la CI.

La PD a été conçue pour des photons d'énergies de 7 eV à 6 keV (région spectrale des rayons UV et des rayons X mous). Quand elle est exposée à des photons d'énergie supérieure à 1,12 eV, des paires électrons/trous sont créées par effet photoélectrique et séparées par le champ électrique intrinsèque de la jonction p-n. Ces porteurs génèrent un courant proportionnel au nombre de paires électrons/trous créées, donc au nombre de photons arrivant sur la PD. Le rendement quantique (énergie nécessaire pour créer une paire électron/trou) est de l'ordre de 3,7 eV pour la majorité des photons X et UV.

Pour les photons ultra-mous l'absorption se fait dans le premier micron de silicium. Pour la PD utilisée (10-30 μm de silicium) la collection est totale. De plus le détecteur possède une grande efficacité du fait qu'il n'a pas de zone morte. Les seules corrections à apporter au courant détecté sont celles liées à l'absorption de la fenêtre d'entrée –couche extrêmement mince de dioxyde de silicium (SiO_2) conférant une grande résistance aux irradiations de particules, et un film mince de titane+carbone (Ti+C) protégeant le détecteur de la lumière visible (équation 1). La figure III-4 présente le schéma d'une PD type AXUV utilisée.

Figure III-4 : Schéma de la photodiode (PD AXUV 100G Ti/C) :



– La chambre d'ionisation :

La détermination de l'intensité du faisceau est basée sur la mesure de la charge produite dans le gaz de la CI par photoionisation des atomes ou molécules du gaz. Les photons absorbés génèrent des photoélectrons, des électrons Auger, et des photons de fluorescence, qui créent des paires électrons/ions.

Les ions et les électrons sont collectés par deux électrodes, planes et parallèles écartées de 2,15 mm et soumises à une différence de potentiel pouvant aller de 100 à 500 V.

L'efficacité de la CI dépend du volume, de la pression et de la température du gaz dans la CI.

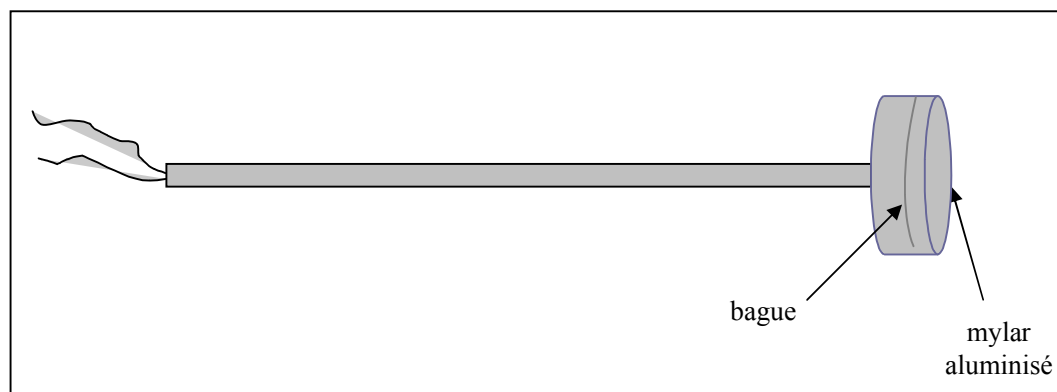
La CI utilisée (EG&G EIC1) est constituée d'un volume d'air cylindrique à pression atmosphérique, variable et ajustable par simple vissage et dévissage du capot sur lequel est fixé la fenêtre d'entrée. Les deux électrodes sont sur la face d'entrée et au fond de l'enceinte cylindrique. Le rendement quantique de la CI est $\sim 34,5$ eV (il est à peu près constant aux énergies X utilisées).

Afin de minimiser l'absorption dans la fenêtre d'entrée nous avons réalisé cette dernière en mylar très mince ($\sim 0,60 \pm 0,03 \mu\text{m}$). Ce dernier est recouvert d'un faible dépôt d'aluminium ($15\text{-}25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) sur sa face interne, pour assurer la conductance électrique.

Les épaisseurs de mylar et d'aluminium ont été mesurées comme détaillé dans le paragraphe I.7. Les intensités de courant détectées par la CI ($\sim \text{nA}$) sont mesurées à l'aide d'un électromètre Keithley 616. On corrige l'intensité détectée par la CI de l'absorption de la fenêtre d'entrée (équation 2).

La figure III-5 présente le schéma d'une chambre d'ionisation.

Figure III-5 : Schéma de la CI (EG&G EIC1), la bague permet d'augmenter le volume d'air de collecte de charge de la CI.



– Comparaison des détecteurs :

Les intensités de photons extraites des courants mesurés dans la PD (I_{PD}) et CI (I_{CI}) ont été comparées régulièrement aux deux énergies d'irradiation. La calibration de la PD par rapport

à la CI est effectuée pour chaque énergie, à partir des rapports I_{PD}/I_{CI} moyennés sur l'ensemble de la campagne d'irradiation LURE 2002.

La méthode utilisée est la même que celle des précédentes campagnes d'irradiation LURE 1997-2000-2001 (voir [2-4]).

L'intensité de rayonnement (I_{PD}) extraite du courant électrique (i_{PD}) mesuré par la PD est déduite de la relation :

$$i_{PD} = I_{PD} \frac{EeT_{Ti} T_{SiO_2} T_C}{W} \quad \text{équation (1)}$$

où e est la charge de l'électron, E l'énergie du photon, T_{Ti} , T_{SiO_2} , T_C , les transmissions des couches de titane, dioxyde de silicium et de carbone et W le rendement quantique de la PD ($W = 3,70 \pm 0,07$ eV).

De même, l'intensité du rayonnement à l'entrée de la CI (I_{CI}) peut être déterminée à partir du courant mesuré (i_{CI}) grâce à la relation :

$$i_{CI} = I_{CI} \frac{EeT_{mylar} T_{Al}}{W'} (1 - e^{-\frac{\mu}{\rho} \rho x}) \quad \text{équation (2)}$$

où μ/ρ est le coefficient d'atténuation massique de l'air de la CI, ρ sa masse volumique, x son épaisseur, W' l'énergie moyenne nécessaire à la création d'une paire électron/trou dans l'air ($W' = 34,5$ eV à 250 eV et varie peu avec l'énergie des photons).

Les rapports I_{PD}/I_{CI} pour les expériences 2002 sont présentés dans le tableau III-6.

Tableau III-6 : Rapport I_{PD}/I_{CI} pour les expériences au LURE en 2002.

Energie	250	350
Moyenne 2002	0,85 ± 0,13	0,86 ± 0,13

L'incertitude sur ces rapports proviennent de celles sur les ordres, sur le rendement quantique de la PD, les masses volumiques, les coefficients d'atténuation massiques, les épaisseurs de titane, de dioxyde de silicium, de carbone, de mylar, d'aluminium et d'air et enfin sur la lecture des courants et sur l'alignement entre la PD et la CI.

A 250 eV, les contributions à l'incertitude sur I_{PD}/I_{CI} sont, par ordre décroissant, celle liée à l'épaisseur de titane de la PD, puis à l'alignement de la PD et de la CI puis celle liée au pourcentage d'ordre trois. Le rapport I_{PD}/I_{CI} vaut :

$$I_{PD}/I_{CI} (250 \text{ eV}) = 0,85 \pm 0,13$$

A 350 eV, les contributions prépondérantes à l'incertitude sont celle liée à l'épaisseur du mylar de la CI puis celle venant de l'épaisseur de titane. Le rapport I_{PD}/I_{CI} vaut :

$$I_{PD}/I_{CI} (350 \text{ eV}) = 0,86 \pm 0,13$$

I.7 – Détermination des épaisseurs des échantillons de matière interposés sur le trajet du faisceau :

Comme évoqué précédemment les épaisseurs des divers échantillons de matière sur le trajet du faisceau (mylar, air) ainsi que celles des matériaux intervenant dans la dosimétrie (fenêtre d'entrée des détecteurs, absorbants), doivent être mesurées précisément. Une erreur de 5% sur l'épaisseur du mylar à 350 eV entraîne une incertitude de 15% sur la dose. Nous résumons ci-dessous les techniques utilisées et les résultats obtenus.

– Méthodes de mesure des épaisseurs :

Rétrodiffusion élastique de particules α : (Rutherford Backscattering Spectrometry : RBS)

Cette technique de mesure absolue a été mise œuvre sur SAFIR (Système d'Analyse par Faisceaux d'Ions Rapides) du GPS (CNRS - Universités Paris 7 et Paris 6).

Elle consiste à irradier la cible à analyser avec un faisceau de particules α monocinétiques d'une énergie de l'ordre du MeV et à enregistrer le spectre en énergie des particules rétrodiffusées élastiquement. On utilise pour la détection un détecteur à barrière de surface. La résolution expérimentale est de l'ordre de 15 keV.

Dans le cadre d'un modèle classique de collision élastique entre deux particules chargées, le rapport k entre l'énergie des particules rétrodiffusées –à un angle donné θ – et l'énergie E_0 des particules incidentes, ne dépend que des masses du projectile et de l'atome cible. Le spectre enregistré pour des cibles minces est donc une succession de pics caractéristiques des atomes constitutifs de la cible. Pour une cible suffisamment mince, on peut négliger la variation de section efficace due à la perte d'énergie des particules incidentes, l'aire de chacun d'eux est alors proportionnelle au nombre d'atomes cibles correspondants, donc à l'épaisseur de l'échantillon. Si la cible à analyser ne peut être assimilée à une cible mince, on peut également extraire du spectre la composition et l'épaisseur, et même l'éventuelle variation de composition en fonction de la profondeur dans la cible. Pour cela on se sert d'un programme d'ajustement qui tient compte des pertes d'énergie des particules et des sections efficaces de rétrodiffusion élastique.

Absorbance infrarouge :

Cette technique a été mise en oeuvre au CIRIL à Caen. Elle consiste simplement à mesurer l'atténuation d'un faisceau de rayonnement infrarouge par la cible.

Ces mesures d'absorbance IR ont été faites à la longueur d'onde : 1400 cm^{-1} .

Perte d'énergie :

Cette méthode consiste à mesurer la perte d'énergie de particules α lors de la traversée de la cible, la perte d'énergie étant directement liée à l'épaisseur de celle-ci. Elle est utilisée ici spécifiquement pour les mesures des épaisseurs des feuilles de mylar.

Le faisceau issu de l'accélérateur étant trop intense, pour ne pas endommager les feuilles de mylar et le détecteur, on utilise les particules α rétrodiffusées par une cible mince d'or dans la direction $\theta_{\text{lab}} = 165^\circ$. La feuille de mylar à analyser peut être placée devant le détecteur. On compare alors l'énergie des particules rétrodiffusées ayant, ou non, traversé la cible.

Pour optimiser la mesure, on choisit l'énergie des particules α pour se placer dans une région où les pertes d'énergies des α dans le mylar sont élevées et bien connues (1,13 MeV) [73].

Ces expériences sont effectuées sur l'équipement utilisé pour les mesures par RBS.

– Résultats de mesure des épaisseurs des matériaux interposés sur le trajet du faisceau :

Feuilles de mylar utilisées pour l'ensemencement des cellules :

Pour les irradiations à 250 eV la précision donnée par le constructeur sur la valeur nominale de l'épaisseur du mylar est suffisante. Pour les irradiations à 350 eV pour lesquelles l'absorption dans le mylar est très élevée (car cette énergie est située juste au dessus du seuil K du carbone), on a dû mesurer très précisément les épaisseurs des mylars utilisés

Pour les jours J_{1, 2 et 3}, les mesures ont été faites en perte d'énergie α . La valeur moyenne de l'épaisseur est : $\langle e_{\text{mylar}} \rangle_{J_{1,2,3}} = (0,88 \pm 0,09) \mu\text{m}$.

Pour le jour J₄ les mesures ont été faites en absorbance IR et perte d'énergie α . La méthode de perte d'énergie permet de déterminer des valeurs absolues des épaisseurs et la mesure en absorbance IR qui est plus rapide permet la détermination des valeurs relatives. Pour 4 mylars dits de 'référence' on a mesuré les épaisseurs par absorbance IR et aussi en perte d'énergie pour étalonner les mesures en IR. La valeur moyenne de l'épaisseur est : $\langle e_{\text{mylar}} \rangle_{J_4} = (0,87 \pm 0,09) \mu\text{m}$.

L'incertitude sur les épaisseurs provient de celle sur le TEL des particules α et celle sur l'angle θ de diffusion. Des mesures ont été effectuées en 4 points de plusieurs échantillons afin d'estimer les fluctuations d'épaisseur au sein d'un même échantillon.

Fenêtre d'entrée de la CI :

La fenêtre d'entrée de la CI est constituée d'une feuille de mylar aluminisé. Par technique RBS on a déterminé l'épaisseur de l'aluminium, puis par perte d'énergie on a obtenu (après soustraction de la contribution de l'Al) l'épaisseur du mylar. Ces mesures étant en partie destructives elles sont effectuées après la campagne d'irradiation.

On trouve :

$$e_{\text{mylar}} = (0,60 \pm 0,03) \mu\text{m} \quad \text{et} \quad e_{\text{Al}} = (0,071 \pm 0,002) \mu\text{m}$$

Fenêtre d'entrée de la PD :

Les épaisseurs nominales de titane, carbone et SiO₂ données par le constructeur sont respectivement :

$$e_{Ti} = (190 \pm 19) \text{ nm} ; e_C = (50 \pm 5) \text{ nm} \text{ et } e_{SiO_2} = (7 \pm 1) \text{ nm}$$

On rappelle que la transmission de l'ensemble est déterminée à chaque énergie à partir de la comparaison PD/CI

Absorbants :

Pour déterminer les ordres à 250 eV et à 350 eV on a respectivement utilisé des absorbants d'aluminium et de carbone qui coupent sélectivement l'ordre 1 de ces énergies. Les épaisseurs de chacun de ces absorbants ont été déterminées par technique RBS.

On trouve pour les valeurs d'épaisseurs des absorbants de carbone (C) et d'aluminium (Al) :

C ₅₀₀ :	(437 ± 24) μg/cm ²	= (2,0 μm ± 0,1)
C ₂₃₀ :	(233 ± 17) μg/cm ²	= (1,06 μm ± 0,07)
Al _{0,8} :	(221 ± 12) μg/cm ²	= (0,82 μm ± 0,04)
Al ₂ n°1 :	(656 ± 27) μg/cm ²	= (2,43 μm ± 0,08)
Al ₂ n°2 :	(608 ± 25) μg/cm ²	= (2,25 μm ± 0,08)

I.8 – Détermination des épaisseurs des composants cellulaires :

Nous avons besoin de déterminer la structure géométrique des cellules, en particulier de connaître leurs épaisseurs nucléaire et cytoplasmique pour calculer le profil de dose délivrée. Nous avons utilisé un microscope confocal inversé pour mesurer les épaisseurs de 334 cellules et leurs morphologies ont été étudiées au microscope électronique. Les mesures ont été effectuées au MRC d'Harwell en Grande Bretagne.

Afin d'être dans les mêmes conditions que lors de l'irradiation, les mesures ont été faites sur des cellules étalées sur du mylar et dans les mêmes conditions de culture (voir section B).

Deux protocoles de fixation pour les cellules ont été utilisés, l'un à base d'alcool, l'autre à base de glutaraldéhyde. La glutaraldéhyde a donné un meilleur contraste pour l'évaluation de l'épaisseur cytoplasmique. Pour les mesures au microscope confocal on a utilisé comme colorant l'iodine de propidium (PI) qui s'intercale sur l'ADN et permet la visualisation du noyau [74-75]. Les épaisseurs sont déduites des coupes horizontales successives des cellules (le pas de mesure au confocal est de 1 μm).

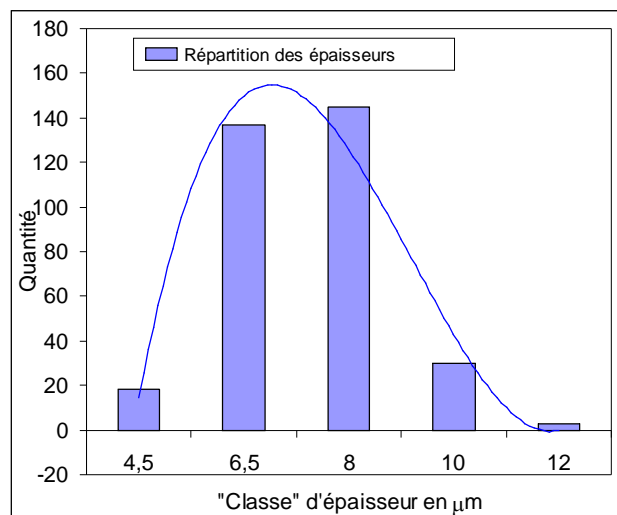
L'analyse des photos prises en microscopie électronique révèle un profil cellulaire grossièrement ellipsoïdal. Les mesures au confocal de l'épaisseur du noyau e_{noyau} , correspondent ainsi à l'évaluation du petit axe de l'ellipse. La technique de préparation des cellules utilisée en microscopie électronique entraîne un léger rétrécissement de la membrane cellulaire.

D'une manière générale nous avons observé que l'organisation en monocouche était bien réalisée et que la proportion des cellules en double couche ne pouvait excéder 5%. Par ailleurs les épaisseurs des cellules étaient relativement uniformes ce qui reflète leur situation prépondérante en phase G_0/G_1 . En moyenne sur les 334 cellules, on trouve pour les épaisseurs moyennes du noyau et du cytoplasme :

$$e_{\text{noyau}} = (7,2 \pm 1,5) \mu\text{m} \quad \text{et} \quad e_{\text{cyto}} = (0,8 \pm 1,0) \mu\text{m}$$

La figure III-7 présente la répartition des épaisseurs du noyau cellulaire des cellules B3 établie sur les 334 métaphases analysées en microscopie confocale.

Figure III-7 : Répartition des épaisseurs de noyau dans les classes $<4-5\mu\text{m}$; $6-7\mu\text{m}$; $8-9\mu\text{m}$; $10-11\mu\text{m}$ et $>12\mu\text{m}$.



I.9 – Calcul des doses moyennes dans le noyau cellulaire :

Le calcul de la dose délivrée à la cellule s'effectue en deux étapes. La première consiste à déterminer la dose d'entrée dans la cellule $D_{\text{entrée}}$. Elle est calculée à partir de l'intensité de photons lue par la PD (corrigée du rapport PD/CI) et à partir de la transmission du mylar sur lequel reposent les cellules. Le débit de dose par balayage d_D , à l'entrée des cellules est ainsi :

$$d_D = \frac{\mu}{\rho} E \times I \times \tau \times T_{\text{mylar}}$$

où T_{mylar} est la transmission du mylar, I l'intensité de photons incidents, τ la durée d'un balayage (51s/cm^2) et μ/ρ le coefficient d'atténuation du milieu cellulaire. Donc :

$$d_D(\text{Gy}) = 16.10^{-16} \frac{\mu}{\rho} (\text{cm}^2 / \text{g}) \times i_{\text{PD}} \times \tau \times W \times \frac{T_{\text{mylar}}}{T_{\text{Ti}} T_{\text{SiO}_2} T_{\text{C}}}$$

On ne peut réaliser que des nombres entiers de balayages, les doses d'entrée possibles sont donc $n \times d_D$ ($n \in \mathbb{N}$).

La deuxième étape consiste à déterminer la dose moyenne au noyau, $D_{\text{moyenne.noyau}}$. Dans le cas d'un profil ellipsoïde, on utilise la méthode développée par B. Fayard [63] qui consiste à intégrer la transmission du flux de photon sur toute l'épaisseur moyenne du cytoplasme et l'absorption du faisceau sur tout le volume moyen du noyau. Les valeurs moyennes des épaisseurs utilisées pour le noyau et le cytoplasme sont : $e_{\text{noyau}}^* = 0.8 \times e_{\text{noyau}}$ et $e_{\text{cyto}}^* = 2 \times e_{\text{cyto}}$. On a ainsi :

$$D_{\text{moyenne.noyau}} = D_{\text{entrée}} \times e^{-\mu e_{\text{cyto}}^*} \frac{1 - e^{-\mu e_{\text{noyau}}^*}}{\mu e_{\text{noyau}}^*}$$

Dans cette expression μ est le coefficient d'atténuation du milieu assimilé à de la rate, il est constant pour les énergies stratégiques utilisées : $\mu/\rho \approx (6700 \pm 100) \text{ cm}^2.\text{g}^{-1}$, (ρ masse volumique de la rate = $1,08 \text{ g.cm}^3$),

On trouve comme rapport entre dose d'entrée et dose moyenne au noyau :

$$\frac{Dose_{\text{moyenne.noyau}}}{D_{\text{entrée}}} = 0,08 \pm 0,03$$

I.10 – Harmoniques :

En même temps que l'énergie nominale E, le monochromateur transmet également les énergies $n \times E$ (avec $n=1..5$ pour 250 eV et $n=1..3$ pour 350 eV, la gamme d'énergie de Super ACO étant 100-1000 eV).

La proportion d'harmoniques supérieures dans le faisceau du LURE est faible. Néanmoins elle doit être déterminée avec précision car leur absorption dans les différents milieux traversés est différente de celle de l'ordre 1. Comme leur énergie est plus élevée ces photons sont moins atténués et leur proportion croît dans le faisceau après la traversée de quelques centimètres d'air ou micromètres de cellule. La contribution des harmoniques à la dose peut ne pas être négligeable. On doit ainsi calculer la dose délivrée pour chaque ordre et évaluer la contribution des ordres supérieurs à l'effet biologique du rayonnement.

La méthode utilisée pour mesurer la proportion d'ordres dans le faisceau incident est celle des précédentes campagnes [3] :

- mesure de l'atténuation du faisceau de rayons X ultra-mous sur toute une gamme d'épaisseur d'air.
- mesure de l'atténuation du faisceau après interposition d'absorbants en aluminium (à 250 eV) et en carbone (à 350 eV). Ces absorbants coupent respectivement l'ordre 1 de ces deux énergies.

La transmission du faisceau est donnée par la relation : $T = \sum_i O_E^i e^{-(\frac{\mu}{\rho})_i \rho x} e^{-(\frac{\mu}{\rho})_i \rho d_{\text{air}}}$ où O_E^i représente le pourcentage du courant dans la photodiode dû à l'ordre i à l'énergie E , $(\mu/\rho)_i$ le coefficient d'atténuation massique de l'air ou de l'absorbant à l'ordre i , x l'épaisseur de l'absorbant traversé et d_{air} l'épaisseur d'air.

Ordres à 250 eV :

On doit tenir compte de l'existence de 5 harmoniques (250, 500, 750, 1000 et 1250 eV). Les photons de 500 eV (ordre 2) sont absorbés très rapidement sur quelques millimètres par l'air. En effet ce dernier est majoritairement composé d'azote, dont le seuil K (402 eV) est peu éloigné de cette énergie. Nous plaçons ainsi les échantillons à une distance de 4 mm de la fenêtre de sortie de ligne pour atténuer l'ordre 2. Deux absorbants en aluminium d'épaisseurs différentes ($Al_{0,8}$ et Al_2 n°1 et n°2) sont utilisés. Nous connaissons la transmission pour chaque ordre (T_{250eV}^i) puisque l'épaisseur de chaque absorbant est connue. Les incertitudes proviennent de celles sur les épaisseurs des absorbants et sur les coefficients d'atténuation massique de chaque ordre. Nous trouvons :

$$O_{250eV}^2 = (0,43 \pm 0,14)\% ; O_{250eV}^3 = (6,26 \pm 1,02)\% ; O_{250eV}^4 = (7,31 \pm 1,21)\% ; O_{250eV}^5 = (1,46 \pm 0,47)\%$$

Ordres à 350 eV :

On doit tenir compte de l'existence de 3 harmoniques supérieurs (350, 700 et 1050 eV). Nous utilisons la même méthode que celle citée au paragraphe précédent, mais remplaçons les absorbants d'aluminium par deux absorbants de carbone (C 230 et C 500). Nous déterminons ainsi :

$$O_{350eV}^2 = (0,58 \pm 0,26)\% \text{ et } O_{350eV}^3 = (1,17 \pm 0,24)\%$$

On peut résumer l'ensemble des résultats sur les ordres dans le tableau III-8 suivant :

Tableau III-8 : Contribution des harmoniques supérieurs au courant lu sur la photodiode à 4 mm de la fenêtre de N_4Si_3 .

E (eV)	250	350
O ¹ (%)	84,5	98,2
O ² (%)	0,4	0,6
O ³ (%)	6,3	1,2
O ⁴ (%)	7,3	
O ⁵ (%)	1,5	

Les proportions des différents ordres en doses d'entrée dans la cellule sont présentées dans le tableau III-9 :

Tableau III-9 : Contribution des harmoniques supérieurs aux doses d'entrée des cellules.

E (eV)	250	350
D ¹ (%)	91,3	90,2
D ² (%)	0,4	5,5
D ³ (%)	6	3,3
D ⁴ (%)	3	
D ⁵ (%)	0,3	

Ces données nous permettront de soustraire la contribution des harmoniques supérieurs dans les résultats de survie et aberrations. En comparant les Oⁱ et les Dⁱ, on remarque que la très faible contribution à l'intensité du courant des photons d'ordre 2 des rayons X ultra-mous de 350 eV (0,6 %) n'est pas négligeable quand on considère cette contribution en terme de dose à l'entrée des cellules (5,5%).

II – Irradiation en ions lourds :

Les expériences d'irradiation en ions ont été réalisées au GANIL (Grand Accélérateur National d'Ions Lourds) à Caen et la partie biologique assurée grâce à la structure d'accueil sur place, le LARIA (Laboratoire d'Accueil pour la Radiobiologie avec les Ions Accélérés), consacré aux expériences à l'interface Physique–Biologie.

II.1 – Le GANIL :

Le GANIL utilise une source à résonance électronique (ECR Electron Cyclotron Resonance) pour produire le faisceau d'ions primaires. Un champ magnétique confine les ions dans un volume délimité et une onde haute fréquence injectée à l'intérieur chauffe les électrons qui ionisent le gaz dans la source. Un petit orifice permet aux ions de s'échapper du plasma chaud (formé d'électrons/ions).

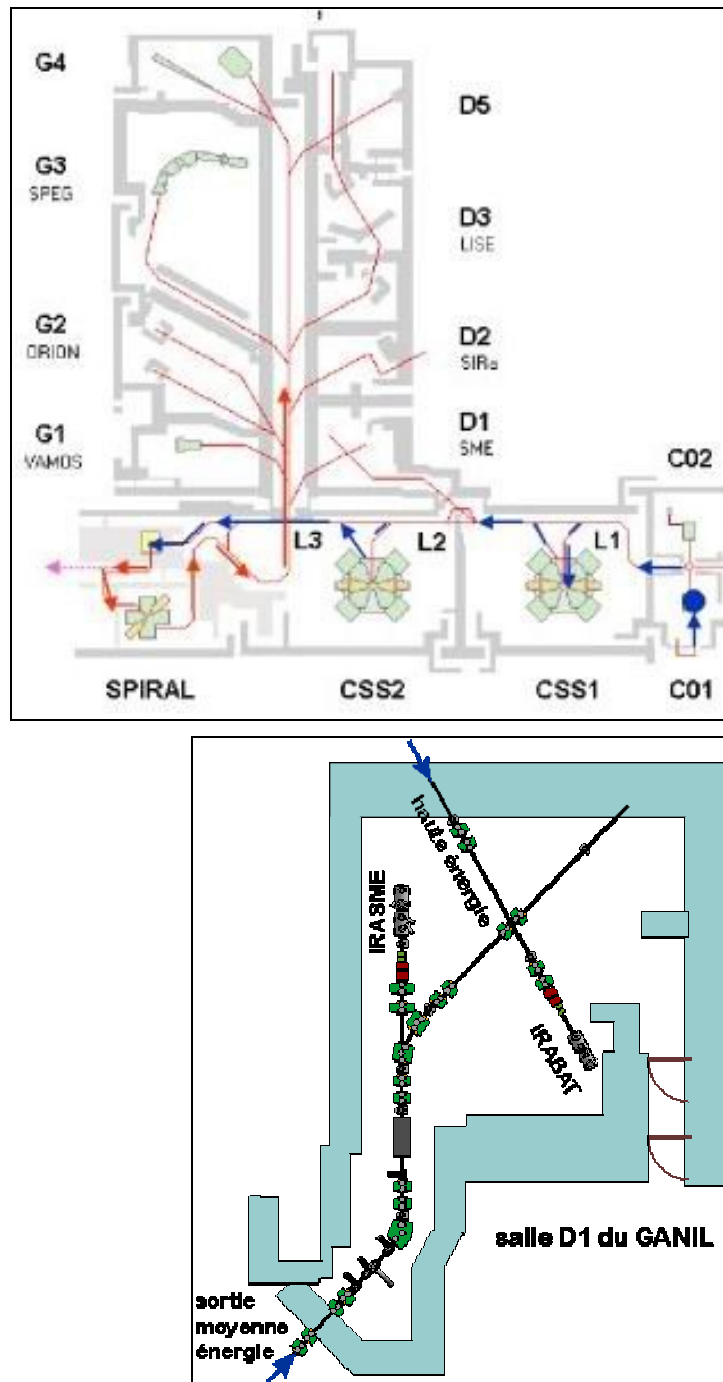
A ce stade les ions sont modérément chargés. Ce faisceau primaire est alors injecté dans un petit synchrotron compact (CO1 ou CO2) qui sert d'injecteur pour un cyclotron à secteurs séparés (CSS 1). Ce cyclotron accélère les ions jusqu'à des énergies comprises entre 4 et 13 MeV/A. En sortie de CSS1 le passage à travers un éplucheur permet d'arracher des électrons et donc d'augmenter le rapport charge sur masse. Il devient alors plus facile d'accélérer et de dévier la trajectoire des ions.

Les ions ainsi produits sont injectés dans un second CSS (CSS2) identique au premier. L'énergie des ions peut alors être multipliée par un facteur environ 7 avant qu'ils soient acheminés vers les aires expérimentales. Une série de dipôles sélectionnent précisément une vitesse. Les ions légers ($\leq \text{Ar}$) sont complètement épluchés (au travers un éplucheur α) et leur énergie maximale correspond à l'énergie du GANIL (*95 MeV/A en haute énergie (HE) et 13,6 MeV/A en moyenne énergie (SME)*).

Le GANIL se divise donc en deux grands ensembles : {source-CO1-CSS1} et {CSS2- α }, de part et d'autre de l'éplucheur. On a ainsi en plus des lignes HE après l' α , une sortie SME disponible pour des faisceaux d'énergies intermédiaires produits par le premier CSS. On peut ainsi mener en parallèle des expériences à HE et en SME [102].

Nos expériences ont eu lieu dans la salle D1 (salle spécifique de la SME qui a de plus une ligne HE). La figure III-10 présente les différents accélérateurs du GANIL ainsi que la salle d'expérience D1. La figure III-11 schématise les éléments de guidage du faisceau vers les lignes HE et SME

Figure III-10: schémas du GANIL et de la salle D1 [102].



Pour les deux sorties, la conduite du faisceau est assurée par des dipôles et quadrupôles de focalisation. Des cages de Faraday et différentes sondes permettent de déterminer le profil et de contrôler l'intensité du faisceau. Un vide secondaire est assuré tout le long de la trajectoire du faisceau par des pompes turbo-moléculaires et cryogéniques, pour éviter les collisions sur des molécules du vide résiduel (vide $\sim 10^{-10}$ P_{atm.}) qui pourraient induire des changements dans l'état de charge des ions (figure III-11).

II.2 – Dispositif expérimental :

On utilise des ions Ar¹⁷⁺ de 13,6 MeV/u fournis par la ligne SME et des ions Ar¹⁸⁺ de 95 MeV/u fournis par la ligne HE, comme résumé dans le tableau III-12.

Tableau III-12 : Energies et charges des ions utilisés

Elément	Haute Energie		Moyenne Energie	
	Energie MeV/A	Charge	Energie MeV/A	Charge
³⁶ Ar	95	18	13,7	17

Au point de focalisation le faisceau est doublement achromatique pour la HE avec une émittance nominale de 15π mm.rad. Pour la SME l'émittance nominale de $3-4\pi$ mm.rad

II.3 – Conditions d'irradiation :

Les flacons servant à l'irradiation ont été modifiés par rapport aux expériences aux LURE (voir section B.I de ce chapitre). L'irradiation se fait à l'air mais les contraintes sont moindres comparées à celles du LURE. A la différence des photons, l'interaction du faisceau de particules chargées avec la matière va entraîner une diminution de leur énergie et non de leur intensité.

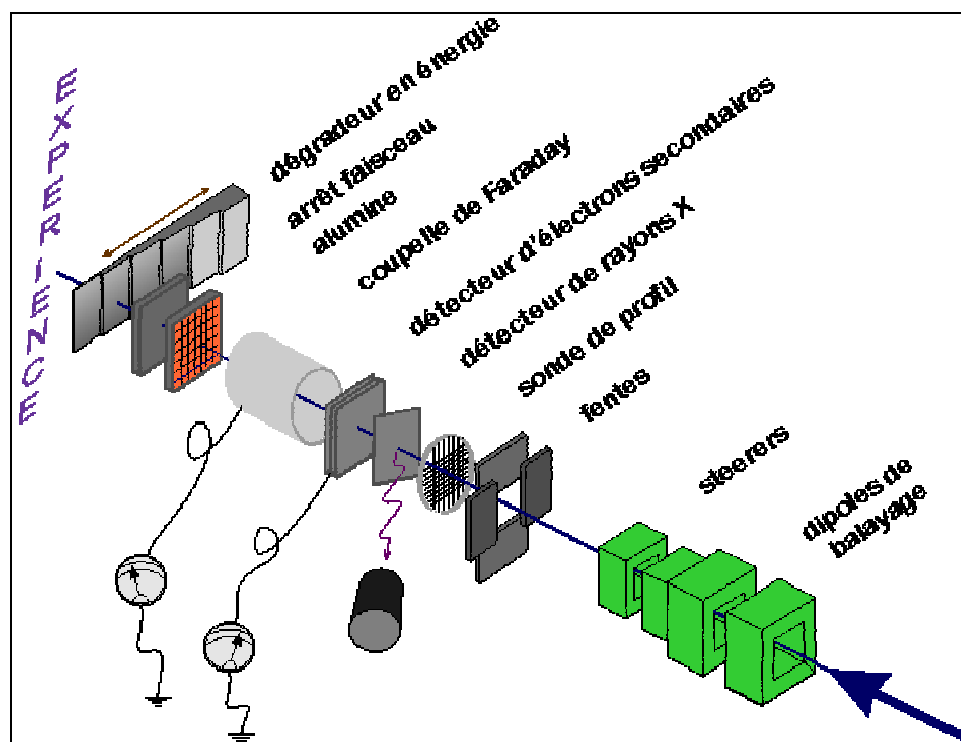
Les lignes SME et HE sont respectivement équipées des dispositifs d'irradiation IRASME et IRABAT (figure III-11) : un passeur d'échantillon permet notamment pour ce dernier la manipulation de 24 échantillons simultanément. Les dispositifs d'irradiation sont conçus pour irradier les échantillons de façon contrôlée, homogène et reproductible. Le faisceau balaie ces échantillons grâce à un système d'aimants en sortie de ligne, la fréquence de balayage verticale est \sim quelques Hz, l'horizontale est \sim 100Hz.

L'intensité au GANIL est très élevée, on la réduit donc par des plaques trouées « peper pot » et un jeu de fentes en amont du balayage. En conséquence on obtient un petit faisceau parallèle.

II.4 – Contrôle du faisceau et mesure de la fluence :

L'équipe de physiciens du CIRIL a effectué le réglage du faisceau et la mesure de son intensité. Le nombre d'ions par seconde est suivi en continu grâce à un détecteur de rayons X (émis par l'impact du faisceau sur une feuille de zirconium en HE et de titane en SME) et un détecteur d'électrons secondaires (détecteur plein) mis en permanence dans le faisceau. Une coupelle de Faraday mesurant l'intensité permet d'étalonner ces détecteurs. Pour visualiser le faisceau, on observe la luminescence d'une plaque d'alumine dopée au chrome. On détermine ainsi le flux disponible d'ions et le temps d'irradiation nécessaire pour la dose voulue. La figure III-13 présente ces différents éléments décrits ci-dessous pour le dispositif d'irradiation IRABAT.

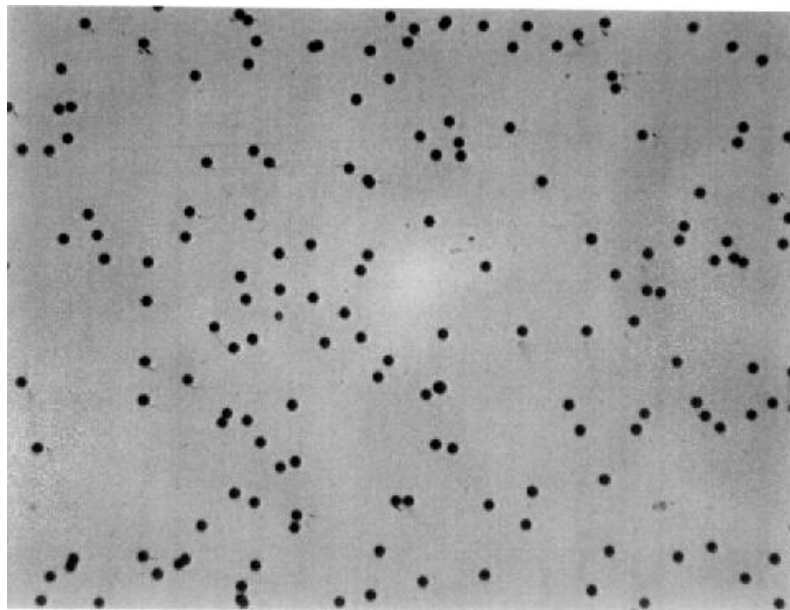
Figure III-13 : schéma du dispositif IRABAT en HE.



Pour mesurer la fluence et vérifier l'homogénéité du faisceau, on utilise un détecteur de traces CR39.

Après irradiation et traitement par du KOH 12N à 80°C, les pores créés par la révélation des traces des ions apparaissent comme représenté sur la figure III-14 :

Figure III-14 : Photo de CR39 révélé - $^{36}\text{Ar}^{18+}$ 95 MeV/u, $1,5 \cdot 10^5$ particules/cm² (x20)



Les échantillons sont irradiés dans les mêmes conditions que le détecteur de trace. On peut ainsi estimer précisément le nombre moyen d'impacts par cellule.

II.5 – TEL des ions à l'entrée des échantillons :

Pour déterminer la dose reçue par les cellules, il faut déterminer le TEL à l'entrée de celles-ci. On connaît l'énergie des particules fournies par l'accélérateur, ainsi en calculant les différentes pertes d'énergie dans les matériaux et milieux interposés jusqu'à la cible on peut déterminer le TEL à l'entrée des cellules. Deux programmes permettant de calculer le TEL d'un ion ont été utilisés : « SRIM2000 » et « IONS », leurs résultats sont en accord à 1% près. Le tableau ci-après récapitule les différents milieux traversés par le faisceau sur les deux lignes HE et SME.

Tableau III-15 : Différents milieux et matériaux rencontrés par les faisceaux de HE et SME avant d'atteindre le noyau des cibles biologiques.

Haute Energie	Moyenne Energie
Détecteur Plein : 0,6 µm Aluminium 1 µm Titane 0,6 µm Aluminium	Détecteur Plein : 0,6 µm Aluminium 1 µm Titane 0,6 µm Aluminium
Détecteur de rayons X : 26 µm Zirconium (faisant un angle de 45° avec le faisceau)	Détecteur de rayons X : 10 µm Titane
Inox : 15 µm	Inox : 15 µm
Extraction	
Air : 1 cm	Air : 1 cm
Plastique : 1,65 mm	Mylar : 12 µm
Milieu cellulaire + cytoplasme : modélisés par de l'eau 25 µm	Milieu cellulaire + cytoplasme : modélisés par de l'eau 25 µm
Cellule : modélisée par le dE/dx massique de la rate (80 % d'eau)	

II.6 - Détermination de la dose dans la cellule : énergie déposée dans une sphère de rate

La dose délivrée à la cellule par impact est :

$$D_{1 \text{ impact}} = \frac{TEL \times \bar{r}}{\text{Volume}}$$

où $\bar{r} = \frac{r}{3}$ est la distance moyenne parcourue par l'ion dans une cellule supposée sphérique.

On a donc :

$$D_{1 \text{ impact}}(\text{Gy}) \cong 7,6 \cdot 10^{-2} \times \frac{TEL(\text{keV} / \mu\text{m})}{r^2(\text{cm}^2)}.$$

La dose moyenne délivrée par l'ensemble des particules pour une fluence Φ :

$$D = \frac{dE}{dx_{\text{rate}}} \times \frac{\Phi(\text{cm}^{-2})}{\rho(\text{g.cm}^3)}$$

où dE/dx_{rate} est la perte d'énergie massique de la rate, et ρ la masse volumique de la rate, soit :

$$\overline{D}(\text{Gy}) = 1,6 \cdot 10^{-9} \times \text{TEL}(\text{keV}/\mu\text{m}) \times \Phi(\text{cm}^{-2})$$

(ρ a été pris égale à 1 comme de l'eau [76]).

La plus grande source d'incertitude sur la dose provient de celle sur la fluence, $\sigma_{\Phi} \approx 15\%$. Celles sur les pertes d'énergies dans les différents matériaux et sur la composition de la cellule ne jouent que très peu.

Le tableau III-16 récapitule pour la HE et SME, les doses moyennes par impact et les doses moyennes pour une fluence minimale $\Phi_0 = 6,4 \cdot 10^5$ particules/cm² (correspondant à un impact par cellule en moyenne).

Tableau III-16 : TEL à l'entrée des cellules en HE et SME. Doses pour un impact par cellule et doses moyennes délivrées par les faisceaux de HE et SME à $\Phi = \Phi_0$.

Energie	Haute Energie	Moyenne Energie
TEL (entrée des cellules)	253 keV/ μm	1325 keV/ μm
$D_{1 \text{ impact}}$ (pour Φ_0)	$1,27 \pm 0,13$ Gy	$0,23 \pm 0,02$ Gy
\overline{D} (pour Φ_0)	$1,49 \pm 0,15$ Gy	$0,27 \pm 0,03$ Gy

Les doses choisies pour l'irradiation sont des nombres entiers d'impacts par cellule, soit des multiples de la fluence Φ_0 . On a choisi en général 8 doses échelonnées de : $2^0\Phi_0$ à $2^7\Phi_0$ (soit 2^0 à 2^7 impacts).

III - Irradiation par des rayonnements γ :

L'irradiateur utilisé est un IBL 637. Trois sources de ^{137}Cs , délivrant des rayons γ de 0,66 MeV, sont positionnées dans un tiroir mobile. Un système de crémaillère permet le déplacement du tiroir entre les positions *stockage* et *irradiation*. La mise en place et la rentrée des sources entraînent la délivrance d'une dose 'tiroir' qui doit être prise en compte lors du calcul de la dose totale. Les surfaces isodoses à 95% ont été déterminées par l'IRSN.

On dispose de trois débits de dose correspondant à trois niveaux d'irradiation, à différentes distances de la source. La mesure des débits de dose a été effectuée à l'aide de dosimètres étalonnés avec une source de cobalt de référence. Les zones isodoses sont repérées par des cercles dans l'irradiateur.

Le tableau III-17 présente les débits de dose et doses tiroirs de l' IBL 637 en février 2002.

Tableau III-17 : Doses 'tiroirs' et débits de doses pour l'irradiation en rayons γ de février 2002 :

N°	Débit de dose ($\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$)	Dose tiroir (Gy)
1	1,93	0,25
2	0,67	0,08
3	0,10	0,01

Le temps d'irradiation pour une dose prescrite est ainsi :

$$\Delta t = \frac{D_{\text{prescrite}} - D_{\text{tiroir}}}{\text{Débit.de.dose}}$$

Il existe une incertitude de l'ordre de 20% sur la dose délivrée. Elle est liée à l'étalonnage par rapport à la source de ^{60}Co .

Les échantillons sont en contact avec la plaque métallique interne de l'irradiateur afin que l'irradiation ait lieu à l'équilibre électronique des particules secondaires.

B – METHODES BIOLOGIQUES

I – Culture et caractérisation des cellules :

I.1 – Culture en monocouches sur feuilles de mylar minces

La lignée cellulaire utilisée pour cette étude est une lignée tumorale qui provient de sous-clônes de cellules du carcinome de la vessie (E.J bladder) ayant intégré un plasmide contenant entre autres une séquence télomérique et différents gènes. La culture sous l'antibiotique Généticine (G418) permet d'assurer la sélection des clones cellulaires –EnctB3 ou B3– ayant tout ou partie de ce plasmide, préférentiellement intégré en position terminale du bras q du chromosome 16. La lignée immortelle B3 est ainsi cultivée dans du MEM- α *with* Glutamax [77], avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 400 $\mu\text{g/mL}$ de G418.

On utilise pour la culture des flacons T25 ou T75 ventilés pour cellules adhérentes. L'ensemble est placé dans un incubateur régulé à 37°C contenant 5% de CO₂.

Les premières souches de cellules B3 ont été décongelées 6 à 8 mois avant l'expérience d'irradiation au synchrotron afin d'effectuer plusieurs études préliminaires et de mettre au point un protocole d'irradiation.

Une surveillance quotidienne permet de maintenir les cellules en conditions optimales et de leur éviter un quelconque stress pendant la période de culture. Le milieu est donc changé régulièrement pour éviter toute carence nutritive et/ou effet toxique par accumulation de déchets éliminés par les cellules. Les cellules se divisent et vont progressivement recouvrir le fond des flacons de culture jusqu'à confluence. On les *divise* alors en réitérant de façon continue cette procédure (voir [5] pour une revue détaillée).

Bien que les cellules B3 soient moins prolifératives que d'autres lignées, l'inhibition de contact lors de la confluence n'est pas vraiment respectée. Il faut donc les diviser régulièrement pour éviter l'apparition d'une double couche cellulaire. L'absorption des rayonnements X ultra-mous est telle que cette deuxième couche ne serait pas irradiée (voir chapitre IV).

On a ainsi déterminé une concentration initiale maximale de cellules permettant d'obtenir une monocouche en 48h, à savoir 40000 cellules/cm². Après ce temps les cellules sont prêtes à être irradiées ou à être divisées.

Flacons de culture servant à l'irradiation :

Compte tenu de la très grande absorption des rayons X ultra-mous par un quelconque matériel, il n'est pas envisageable d'irradier des cellules à travers le plastique des flacons. On a donc équipé (comme décrit précédemment par Penhoat (1997) [4] et Fayard (1999) [2]) des flacons T25 d'une fenêtre de mylar très mince ($\sim 0,9 \mu\text{m}$) et de surface $\sim 1\text{cm}^2$ sur laquelle sont déposées et cultivées les cellules.

Afin de permettre aux cellules de croître correctement en monocouche, le mylar est recouvert de sérum avant ensemencement. 150-250 μL de SVF sont déposés sur la face interne de la fenêtre de mylar (à l'aide de pipette pasteur). Après 10 minutes on retire délicatement le sérum du T25 sans endommager le mylar.

Les cellulesensemencées ensuite se déposent facilement et de façon homogène, sans paquets. Cet attachement catalysé [78] permet l'obtention de belles monocouches.

Afin de prévenir au mieux –malgré cette préparation– la formation éventuelle de paquet ou une répartition inhomogène, la solution cellulaire est homogénéisée en suspension (par des '*up and down*' successifs à l'aide d'une pipette).

Après 3h dans un incubateur (réservé pour la culture sur mylar), pendant lesquelles les cellules terminent d'adhérer sur leur support, on complète les T25 à 5mL avec du milieu MEM- α + G418. Tout comme la culture classique sur flacons de culture traditionnels, le milieu est changé 24h après ensemencement. D'un point de vue pratique, les T25 équipés de fenêtres de mylar reposent par groupes de 3 sur des puits '6-well' pour prévenir toute fuite et éviter le contact du mylar avec l'intérieur de l'incubateur.

Pour l'expérience en rayons γ , il n'est pas nécessaire de cultiver les cellules sur des feuilles de mylar minces puisque ces radiations ne sont pratiquement pas absorbées par les parois des flacons. Des T25 classiques ont donc été utilisés. Toutefois pour assurer des conditions expérimentales identiques, les irradiations γ ont été également réalisées avec des T25 équipés de mylar.

Pour les ions de SME, afin d'éviter une perte d'énergie importante des particules dans le plastique des flacons, des T75 avec une fenêtre de 4cm^2 portant un film de mylar de

quelques 12 μ m d'épaisseur ont été utilisés. Pour la HE, on a utilisé des T25 en plastique ordinaires (pour lesquels les cellules sont cultivées au centre d'un cercle d'irradiation).

Stérilisation des flacons de culture équipés de feuille de mylar :

Les T25 (ou T75) transformés avec une fenêtre de mylar doivent être stérilisés pour ensuite servir à la culture cellulaire.

Une fois le mylar collé sur la fenêtre des flacons, l'étanchéité de ces derniers est testée. Rincées et séchées, les boîtes sont ensuite stérilisées.

Des tests ont été faits pour déterminer la meilleure méthode de stérilisation. Les paramètres pertinents sont : temps, dose, intégrité du mylar, prévention du risque de contamination. La stérilisation en UV s'est avérée insuffisante, elle altérerait de plus la qualité du mylar. Une stérilisation à l'étuve ne pouvait être supportée par le plastique des flacons. On a donc retenu l'irradiation γ , à relativement haute dose (~ 300 Gy). Les boîtes sont emballées dans des mouchoirs en papier puis empilées et emballées par 10 (9 boîtes avec mylar +1 normale qui termine la pile pour éviter d'avoir une fenêtre de mylar « à nu » risquant d'être endommagée). Le tout est enveloppé dans un sachet en plastique fermé hermétiquement. On dispose un ou deux paquets à la fois dans l'irradiateur, sur la zone d'isodose et on délivre la dose nécessaire à faible débit (0,67 Gy/min ; voir section A-III de ce chapitre). Les boîtes sont ensuite stockées en pièce de culture, dans un compartiment réservé, jusqu'à leur utilisation.

1.2 – Synchronisation et cycle cellulaire :

Les conditions de culture ont été optimisées pour obtenir des cellules en monocouche en phase G₀/G₁ 48h après ensemencement. Une étude en cytométrie de flux a montré que les cultures avec du milieu nutritif et 10% de sérum présentaient une majorité de cellules en phase G₀/G₁ comparées aux autres phases de synthèse (S) et de mitose (M). Afin d'éviter toutefois une quelconque dérégulation, et reprenant le principe utilisé pour les cellules V79 lors des précédentes études, on appauvrit le milieu nutritif en sérum pour contrôler la prolifération, tout en veillant à ce que les cellules soient toujours dans de bonnes conditions de viabilité.

Des tests préliminaires ont ainsi été effectués, montrant que les cellules B3 après ensemencement classique peuvent survivre correctement pendant 4 à 5 jours avec 0,5 à 1% de sérum. La croissance des cellules est directement liée au pourcentage de sérum. En dessous de 0,1% les cellules se détachent, se nécrosent et ne peuvent reprendre un rythme cellulaire normal.

Le protocole adopté est donc que au plus 12-14^h avant irradiation, les cellules sont remises dans 1 ou 2% de sérum.

Pour chacune des conditions d'appauvrissement du milieu cellulaire, les tests en cytométrie de flux ont confirmé la grande proportion de cellules en G₀/G₁. Cette dernière est légèrement plus forte en conditions d'appauvrissement (90% avec 1-2% de sérum) qu'en culture classique (85%).

I.3 – Durée du cycle cellulaire et proportions de cellules en générations successives

Afin de caractériser au mieux la lignée cellulaire on a déterminé la durée d'un cycle cellulaire. Cette donnée nous permet d'optimiser le temps après irradiation au bout duquel les caryotypes doivent être faits pour observer les cellules en première division.

Le test BrdU consiste en l'incorporation de BrdU [5-Bromodésoxyuridine] pendant la culture cellulaire [79]. Au cours de la réplication (lors de la synthèse programmée S) les thymidines vont être remplacées par le BrdU. Ce dernier n'est incorporé qu'en substitution de la thymidine et non dans celle synthétisée par la cellule (taux de substitution < 20%). La culture avec 10µg/mL de BrdU assure un bon marquage non toxique pour la cellule. Un caryotype aux instants voulus est réalisé après arrêt du cycle cellulaire.

Le brin répliqué va avoir des bases mutées, tandis que l'autre gardera son intégrité. Les bases uridines ont la propriété après traitement par un fluorochrome type « Hoechst » + rayons ultra-violets (méthode *Fluorescence plus Giemsa FpG* : voir [80], et [79]), de s'altérer et de ne pas retenir la coloration au Giemsa qui suit. La solution de « Hoechst » fixe les fluorochromes sur les bases ayant intégré le BrdU. L'exposition UV détruit partiellement ces brins néo-synthétisés. On peut ainsi différencier les brins néo-synthétisés à chaque cycle cellulaire : une chromatide avec deux brins néo-synthétisés par exemple apparaît claire au

Giemsa (voir figure III-18). L'observation des métaphases permet ainsi le recensement des cellules en génération I, II, III et plus.

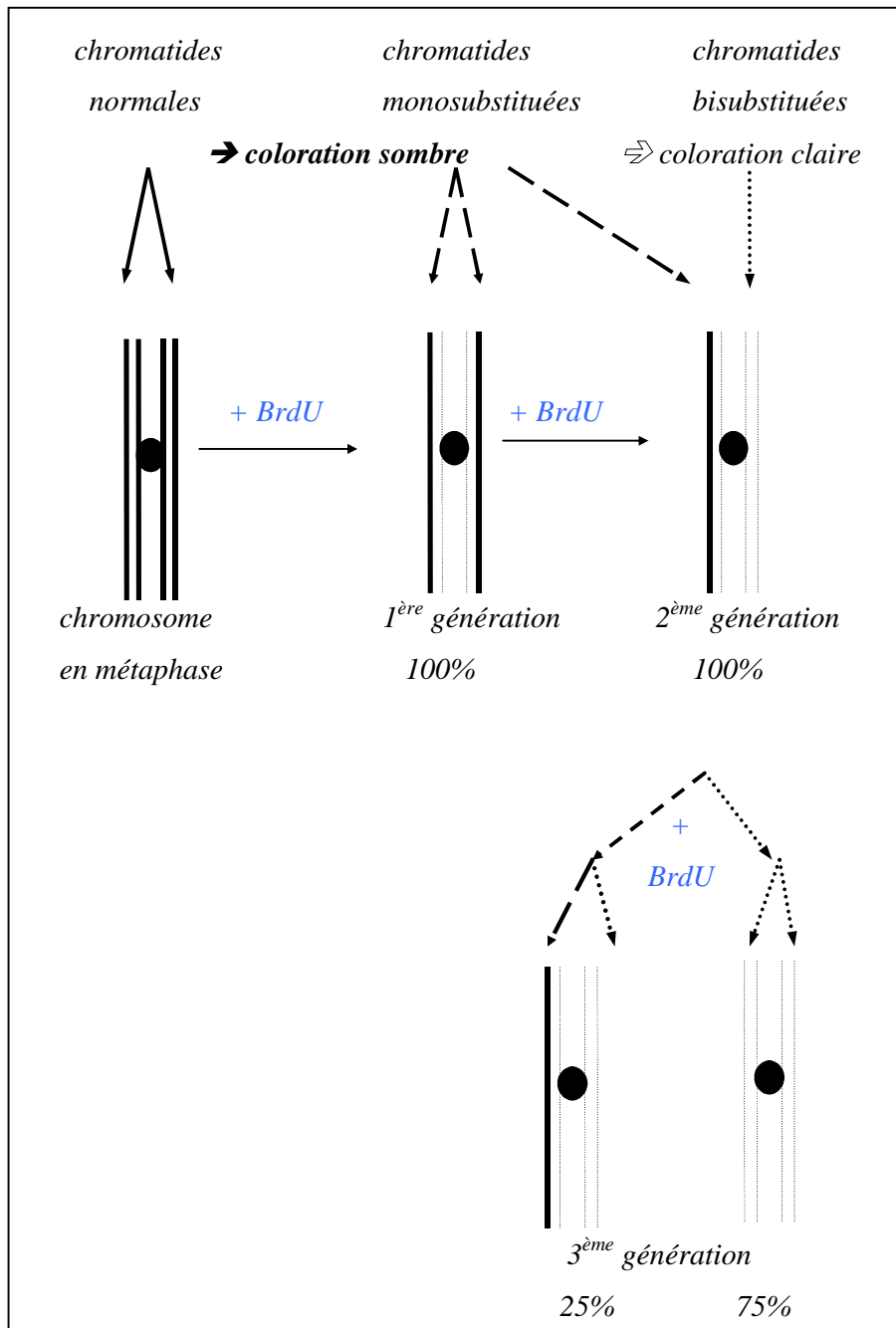
– Pour la 1^{ère} génération, bien que l'échange $U \leftrightarrow T$ ait eu lieu lors de la synthèse, un brin clair et un autre foncé constituent chacune des deux chromatides. Il apparaît après FpG deux chromatides sombres.

– Pour la 2^{ème} génération chacune des deux chromatides monosubstituées précédentes va donner lieu à la formation d'un chromosome avec une chromatide monosubstituée et une chromatide bi-substituée. Ainsi en deuxième génération il apparaît une chromatide claire et une foncée.

– Pour la 3^{ème} génération il y a aura $\frac{3}{4}$ de la population avec deux chromatides claires et $\frac{1}{4}$ avec 'une claire + une foncée' comme pour la 2^{ème} génération.

Au delà de ce stade il devient difficile d'évaluer correctement la proportion précise de chaque génération. De plus, pour la 1^{ère} génération il n'est pas possible de différencier les cellules réellement en 1^{ère} génération de celles n'ayant pas encore franchi cette étape du cycle (2 chromatides sombres même s'il y a un brin néo-synthétisé).

Figure III-18 : schéma du marquage des chromatides par incorporation de 5-Bromodeoxyridine sur 3 générations de culture.



Ces considérations montrent l'intérêt de faire le test BrdU à des intervalles réguliers pour évaluer correctement la proportion des diverses générations. Des tests au BrdU sur des témoins effectués à 20^h, 24^h, 28^h et 48^h ont montré une parfaite régulation de la lignée : 99% de cellules en première génération à 24h, 95% en deuxième génération à 48h.

Ces résultats permettent d'affirmer avec certitude qu'à 24h les cellules sont bien toutes en génération I (*sauf dérégulation extrême et irrégularité anormale des cellules dans leur cycle, ce qui est peu probable*).

Il a ainsi été décidé que l'étude des chromosomes après irradiation s'effectuerait au bout de 24h, ce qui correspond à un cycle cellulaire (1^{ère} division) pour des cellules normales.

I.4 – Indice mitotique

On a déterminé sur une lame témoin homogène le pourcentage de cellules en mitose (métaphases) par rapport au nombre total de cellules (noyaux + métaphases).

Cet indice mitotique a été obtenu dans les conditions retenues pour les caryotypes. Une brève étude avait mis en évidence que l'augmentation de la durée d'action de la colchicine augmente légèrement le pourcentage de mitoses mais que la qualité des chromosomes en pâtit : ils deviennent trop condensés et trop petits. On a donc pris un temps d'action de la colchicine de ~1h pour lequel on obtient un indice mitotique de $\cong 4\%$.

L'irradiation modifie amplement cet indice (valeur estimée pour les γ à 1 Gy $\cong 1,2\%$) (voir paragraphe II). Ceci explique en partie le peu de mitoses obtenues après irradiation.

II – Irradiation :

L'ensemble des tests pour la culture cellulaire des B3 et le protocole d'irradiation ont été préalablement définis sur des flacons de culture sur T25 classiques. Les paramètres ont ensuite été affinés et ajustés sur des T25 modifiés avec du mylar.

Pour toutes les expériences au LURE, les cellules ont été irradiées entre 10h du matin et 20h. En appauvrissant le milieu vers 6h le jour de l'irradiation les cellules sont maintenues en monocouche et en bonne santé, dans des conditions optimales pour l'irradiation.

L'ensemencement initial a donc lieu 48h avant irradiation. L'irradiation a été reproduite quatre fois (4 jours différents). On prévoyait donc lors de l'irradiation du jour J_i l'ensemencement des jours suivants J_{i+1} etc.

Le synchrotron LURE d'Orsay est à 20km du laboratoire LRO du CEA où sont traitées les cellules. Pour le transport les T25 modifiés sont remplis entièrement de milieu nutritif. Les bouchons sont entourés de cellophane pour fermer hermétiquement l'ensemble afin de prévenir une contamination extérieure et d'empêcher un déversement. Les flacons sont placés dans des boîtes en polystyrène confinées le plus stérilement possible. Durant le transport la boîte en polystyrène assure aux cellules une température relativement homogène. A leur arrivée au LURE les cellules sont placées dans un incubateur portatif (37°C + 5% CO₂) en attendant d'être irradiées verticalement. Le retour au LRO s'effectue dans les mêmes conditions. Les flacons sont remis dans l'incubateur avant d'être traités. La planification des manipulations a été faite pour que les boites irradiées attendent moins d'une heure après irradiation (transport + traitements biologiques).

Pour les expériences au GANIL, le même protocole a été utilisé, le LARIA était à proximité des salles d'irradiation.

III – Traitement post-irradiation :

Dans le cas des irradiations en rayons X ultra-mous la récupération des cellules sur le mylar après l'irradiation est une étape cruciale et délicate. Elle consiste à découper à l'aide d'un scalpel la fenêtre de mylar, tout en la maintenant grâce à une pince pour éviter qu'elle s'enroule sur elle-même et ceci sans percer le mylar. Il faut ensuite faire tremper le film contenant les cellules dans 1mL de trypsine pendant 30 secondes afin de décoller ces dernières de leur support. En ajoutant 1mL de sérum qui va inhiber l'action de la trypsine, on obtient 2mL d'une suspension cellules+trypsine_{inhibée}+sérum. Tout ceci s'effectue dans une ambiance stérile sous une hotte de culture à flux laminaire. Scalpels et pinces sont stérilisés et leurs extrémités trempent dans un récipient d'alcool entre deux *découpages* de mylar. La face externe du mylar est rincée à l'alcool puis séchée avant toute découpe pour prévenir toute contamination.

Les cellules ainsi récoltées sont comptées puisensemencées soit pour des études de survie soit pour effectuer les caryotypes à 24h. On utilise pour le comptage, un Coulter[®] qui nous donne également une ébauche du profil morphologique des cellules prélevées. On peut ainsi voir si le mélange est bien homogène et s'il n'est pas constitué uniquement de débris cellulaires par exemple.

La campagne d'irradiation γ a permis de déterminer le nombre de jours nécessaires pour étudier la survie, ainsi que d'estimer le pourcentage de cellules survivantes pour une dose déterminée. L'objectif pour la survie est d'avoir au maximum 150 colonies survivantes à compter par point d'irradiation. Au delà l'incertitude devient trop importante et il est souvent difficile de distinguer deux colonies. Pour chaque irradiation, 18 boîtes sontensemencées en conditions différentes afin de s'assurer de la constance de la survie mesurée. Par exemple pour le témoin onensemence 6 flacons avec 50 cellules + 6 flacons à 100 cellules et 6 flacons à 150 cellules. Pour les irradiées le nombre de cellulesensemencées est pondéré du facteur estimé de survie de telle manière que 150 colonies survivent au final. Une colonie avec plus de 50 cellules est considérée comme survivante. La survie a été étudiée 11 jours aprèsensemencement.

Le reste des cellules est mis en culture pour le caryotype à 24h. Le nombre total de cellules, même non-amputé des quelques centaines prélevées pour la survie, est relativement faible. L'attachement des cellules sur le mylar après irradiation est problématique probablement en raison du transport de l'ordre de 20 minutes. De plus une surface de 1cm² de mylar permet difficilement de récolter plus de 150000 cellules même dans une expérience idéale. L'ensemencement pour les caryotypes se fait en réalité dans des flacons plus petits (T12,5) afin de stimuler les cellules restantes.

Pour l'irradiation γ , la survie a été faite en parallèle sur des boîtes avec mylar et des T25 classiques. Pour les caryotypes, les échantillons irradiés avec une même dose ont été regroupés pour récolter plus de cellules.

Pour les irradiations en ions lourds, on ne disposait que d'une nuit d'irradiation pour chacun des deux types d'ions. Le protocole utilisé a été le même que pour les rayons X ultra-mous.

IV – Caryotype à 24^h :

L'ajout de colchicine, (durée *du traitement optimisé à 1h*), à des cellules en culture va détruire le fuseau mitotique de ces dernières, permettant ainsi de les bloquer en partie en phase M. La concentration de colchicine utilisée est [_{colchicine}] $\sim 0,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Par éclatement de la membrane cellulaire (choc hypotonique : solution KCl 0,075M 20' à 37°C) puis fixation des échantillons cellulaires, on obtient un mélange appelé culot cellulaire (noyaux + métaphases) prêt à être étalé. Bien que l'utilisation de la solution hypotonique avec du sérum humain donne a priori des métaphases de plus belle qualité, pour des raisons techniques et financières nous avons principalement utilisé le KCl seul. L'étalement correct de ces prélèvements sur des lames prétraitées permet l'obtention d'un frottis homogène (noyaux + métaphases) représentatif de l'état des cellules à un instant donné de la culture, soit pour notre étude 24h après l'irradiation.

On dispose au plus de 1 à 2 % de métaphases par lame (soit environ une centaine).

En attendant l'analyse, les lames d'étalement, après un séchage de 24h à l'air, sont répertoriées puis congelées à -20°C .

V – Visualisation des aberrations chromosomiques

L'analyse des remaniements induits par rayons X ultra-mous a été entreprise. Les caryotypes en γ et en ions n'ont pas entièrement été dépouillés pour cette étude et ne sont pas présentés ici. Nous avons à notre disposition des sondes spécifiques permettant de différencier chaque chromosome humain. Plutôt que de regarder, comme dans les travaux précédents sur cellules V79, les aberrations type dicentriques et anneaux par coloration Giemsa, nous avons entrepris une étude plus détaillée incluant en particulier les aberrations d'échange comme les translocations.

Nous avons donc utilisé des sondes cytogénétiques à 24 couleurs permettant d'associer une couleur à un chromosome, selon la méthode d'hybridation in situ : FISH (fluorescence in situ hybridization) présentée au prochain paragraphe.

L'expérience a montré qu'un paramètre crucial pour la réalisation d'une belle analyse cytogénétique est le nombre de cellules récoltées et donc le nombre de métaphases disponibles. D'une manière générale nous disposons de très peu de cellules, quel que soit le jour et le type d'irradiation. Le 4^{ème} jour d'irradiation au LURE a toutefois permis d'obtenir 4 à 6 lames par point d'irradiation avec une centaine de métaphases chacune. Il est à noter que pour les 100 métaphases totales, les 2/3 sont réellement non exploitables pour une analyse FISH. Un trop grand recouvrement de chromosomes rend en effet impossible une exploitation correcte.

Afin de pallier en partie à ce problème nous avons recouru à une hybridation *in situ* (HIS) préliminaire des télomères via une sonde PNA [81]. Ceci a permis d'une part de faire un état des lieux des lames exploitables et disponibles à moindre coût et d'autre part de faciliter l'exploitation mFISH 24 couleurs (beaucoup plus coûteuse) en identifiant plus facilement la morphologie des chromosomes (extrémités marquées, contre-coloration plus nette).

L'analyse des métaphases ainsi doublement hybridées PNA + mFISH a été très longue. Les cellules irradiées n'ont pas donné de métaphases aussi parfaitement éclatées et d'aussi bonne qualité que des métaphases témoins ou bien issues de caryotype de culture classique. Cependant le nombre de métaphases analysées est petit dans cette étude. On peut noter toutefois que leur nombre moyen (20-30 par irradiation) traduit une certaine homogénéité des échantillons.

V.1 – Fluorescence par hybridation *in situ* (FISH)

Cette technique est basée sur la réassociation de simples brins complémentaires d'ADN. Une sonde –FISH– constituée de petites parties d'ADN spécifiques dont les nucléotides sont marqués avec des molécules fluorescentes, va se fixer sur l'ADN cible, préalablement dénaturé, par complémentarité. La dénaturation des chromosomes consiste en l'ouverture de la double hélice d'ADN.

Le signal fluorescent correspondant à la partie spécifique du double brin d'ADN est ensuite détecté par microscopie fluorescente.

Il existe une multitude de sondes FISH dépendant de l'application souhaitée. Elles peuvent caractériser des régions spécifiques de chromosomes ou des chromosomes entiers. La figure III-19 résume la procédure d'hybridation *in situ*. On utilise ici deux hybridation *in situ* (HIS) :

- HIS – PNA :

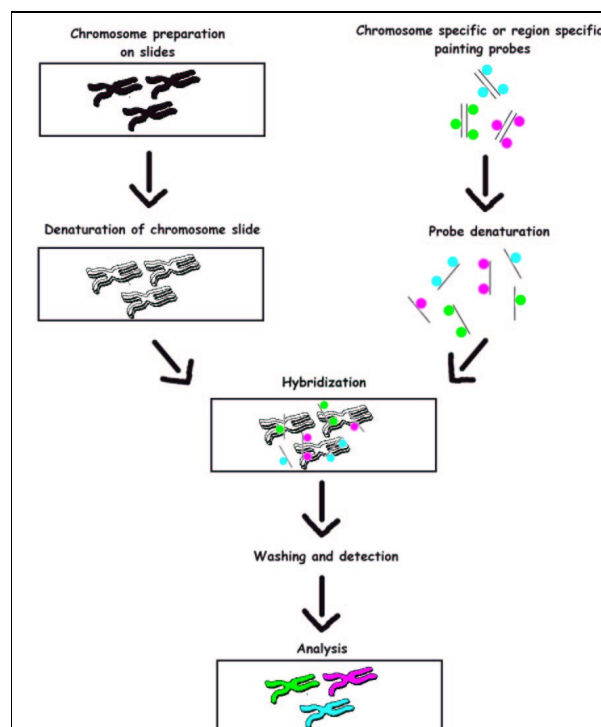
La sonde PNA FISH hybride et révèle les télomères. L'hybridation PNA est donc une HIS utilisant comme sonde une protéine spécifique des télomères [PNA : Peptide Nucleic Acid] marquée au Cyanine 3 (Cy₃) et contre-colorée au DAPI.

- HIS – mFISH :

La sonde mFISH permet de différencier et de référencer tous les chromosomes d'une métaphase. La fluorescence multicouleur par hybridation *in situ* (mFISH) utilise des colorants fluorescents variés pour détecter différentes peintures de sondes en même temps. Ceci permet la présentation simultanée des 24 différents chromosomes humains avec une seule hybridation [sonde mFISH : 24 Xcyte Metasystem[®]].

La détection des 24 sondes de chromosomes est accomplie avec 5 fluorochromes de différentes couleurs. Chaque peinture de chromosome est marquée avec un des cinq fluorochromes ou une unique combinaison d'entre eux. La séparation des différents spectres d'excitation et d'émission est garantie par un choix approprié de filtres.

Figure III-19 : étapes successives principales d'une hybridation *in situ* [103].



La méthode d'analyse comprend donc 4 grandes étapes, illustrées dans la figure III-19 et dont les aspects techniques sont détaillés ci-dessous :

- i) Dénaturation des doubles brins d'ADN de la sonde et de la cible : on peut soit combiner l'augmentation de la température et l'action de solvant organique (utilisé pour la sonde) soit modifier le pH des solutions utilisées pour les chromosomes (NaOH 0,07N à θ_{amb}).
- ii) Hybridation : l'association de la sonde et de la cible a lieu avec un tampon d'hybridation (50% formamide) et dure ~4 jours à 37°C en chambre humide.
- iii) Etape de lavage : elle est nécessaire pour enlever les restes de tampon d'hybridation et stopper les sondes aspécifiques. Les sondes indirectes sont détectées avec l'ajout d'un colorant fluorescent supplémentaire (voir Annexe).
- iv) Capture et analyse : le signal fluorescent est détecté par microscopie fluorescente. Les images doivent être capturées pour chaque colorant fluorochrome qui a une bande passante bien déterminée. Pour le mFISH on a donc 6 canaux de couleurs : 5 fluorochromes + le contre colorant DAPI, qui sont superposés à l'aide du logiciel ISIS[®] (Metasystem). Pour le PNA nous avons 1 fluorochrome et le contre colorant à capturer.

V.2 – Microscopie par fluorescence :

La fluorescence est un processus photochimique qui a lieu dans un certain type de molécules appelées fluorophores ou fluorochromes. Lorsqu'un fluorochrome absorbe de la lumière, il est porté dans un état excité. Une partie de l'énergie absorbée peut être perdue par changement interne de structure et l'interaction avec d'autres molécules.

En retombant dans son état fondamental le fluorochrome émet de la lumière. En raison de l'énergie perdue, la longueur d'onde $\lambda_{émise}$ est plus grande que la longueur d'onde $\lambda_{absorbée}$, cette différence de longueur d'onde est appelée *Stokes shift*. Chaque fluorochrome a son propre spectre caractéristique d'excitation et d'émission.

Le fluorochrome est excité continuellement pendant l'éclairement. Néanmoins, il s'agit de réactions photochimiques qui détruisent de façon irréversible le fluorochrome (il ne pourra plus être excité). La capture doit être réalisée au plus tôt après HIS et relativement rapidement, bien qu'un temps incompressible de capture soit nécessaire.

La caractéristique principale pour la sensibilité des techniques de fluorescence est le *Stokes shift*, il permet de différencier $\lambda_{\text{émission}}$ et $\lambda_{\text{absorbée}}$ grâce à un *séparateur de faisceau* (beam splitter).

En microscopie fluorescente la lame contenant les métaphases hybridées est éclairée à travers l'objectif. La lampe source est une lampe à vapeur de mercure qui émet dans l'UV, le visible et l'IR.

La longueur d'onde d'excitation appropriée pour un fluorochrome particulier est isolée en utilisant un filtre d'excitation propre au fluorochrome. La lumière traverse le filtre d'excitation et est focalisée à travers l'objectif sur la lame. La longueur d'onde d'émission traverse le filtre d'émission (qui transmet la lumière à l'intérieur d'une bande passante propre en corrélation avec le spectre d'émission du fluorochrome).

Le séparateur de faisceau dichromatique –inséré entre le filtre d'excitation et la lame objet– réfléchit la *courte* longueur d'onde ($\lambda_{\text{excitation}}$) sur la lame, et la *grande* longueur d'onde ($\lambda_{\text{émission}}$) du fluorochrome est presque toujours complètement transmise et atteint le filtre d'émission.

Chaque filtre dispose d'un séparateur, du filtre d'excitation et du filtre d'émission correspondant au fluorochrome donné.

Il est nécessaire de créer une ambiance sombre autour du microscope, pour minimiser le bruit de fond sur les signaux de fluorescence.

Les maxima et minima des $\lambda_{\text{excitation}}$ et $\lambda_{\text{émission}}$ des différents colorants fluorochromes utilisés pour le mFISH sont donnés dans le tableau III-20 ci dessous :

Tableau III-20 : maxima et minima des longueurs d'ondes d'émission et d'excitation des fluorochromes mFISH.

Fluorochrome	Emission/ excitation maximum	Color of fluorescence signal	Color of excitation light
DAPI	455nm/345nm	light-blue	violet
DEAC	480nm/426nm	blue/turquoise	blue
FITC	530nm/502nm	green	turquoise
Spectrum Orange™	588nm/559nm	yellow	green
Texas Red®	615nm/595nm	red	yellow/orange
Cy™5	670nm/649nm	near IR (not visible)	red

Pour le PNA le fluorochrome est la cyanine 3, Cy₃ (~605 nm/575 nm) et le contre-colorant est le DAPI.

L'analyse mFISH permet le classement des chromosomes sur la base de la combinaison spécifique de fluorochromes selon le tableau III-21 :

Tableau III-21 : Schéma du marquage par sondes 24Xcytes mFish. Dans la première colonne figurent les numéros des chromosomes identifiés par la ou les couleurs des différents fluorochromes. Par exemple le chromosome 16 est la combinaison du vert-bleu-jaune (FITC-DEAC-Cy₅), le chromosome 3 est uniquement lié au filtre rose Texas Red.

#	DEAC	FITC	Spectrum Orange™	texas Red®	Cy™5
	Ex 426nm/ Em 480nm	Ex 502nm/ Em 530nm	Ex 559nm/ Em 588nm	Ex 595nm/ Em 615nm	Ex 649nm/ Em 670nm
1					■
2	■				
3				■	
4		■			
5			■		
6		■			■
7	■				■
8				■	■
9			■		■
10	■	■			
11		■		■	
12		■	■		
13	■			■	
14	■		■		
15			■	■	
16	■	■		■	■
17		■		■	■
18		■	■		■
19	■			■	■
20	■		■		■
21			■	■	■
22	■	■		■	
X	■	■	■	■	
Y	■		■	■	

Le dispositif d'analyse mFISH est tout récent au LRO. Plusieurs détails techniques ont été améliorés sur le logiciel ISIS[®] en collaboration avec les développeurs de Metasystem afin de faciliter l'analyse. Toutefois pour chaque métaphase, compte tenu de la qualité et de la quantité des métaphases, il a fallu faire défiler manuellement les filtres afin d'identifier chaque chromosome et de recenser leurs différentes aberrations : translocations, multicentriques, délétions etc.

V.3 – Exemple de visualisation de caryotype par mFISH :

Caryotype B3 témoin :

Les photographies des figures III-22 présentent le caryotype d'une cellule B3 témoin en métaphase. Les caractéristiques d'un caryotype sont données sous forme d'une séquence de symboles : 46 (X; Y) t(15-18) t(10-22) t(11-20) définissant ici une cellule mâle (X; Y) de 46 chromosomes avec 3 translocations clonales entre les chromosomes 15 et 18, 10 et 22, 11 et 20.

Figure III-22-a : caryotype d'une cellule B3 témoin en métaphase, obtenu par hybridation mFISH.

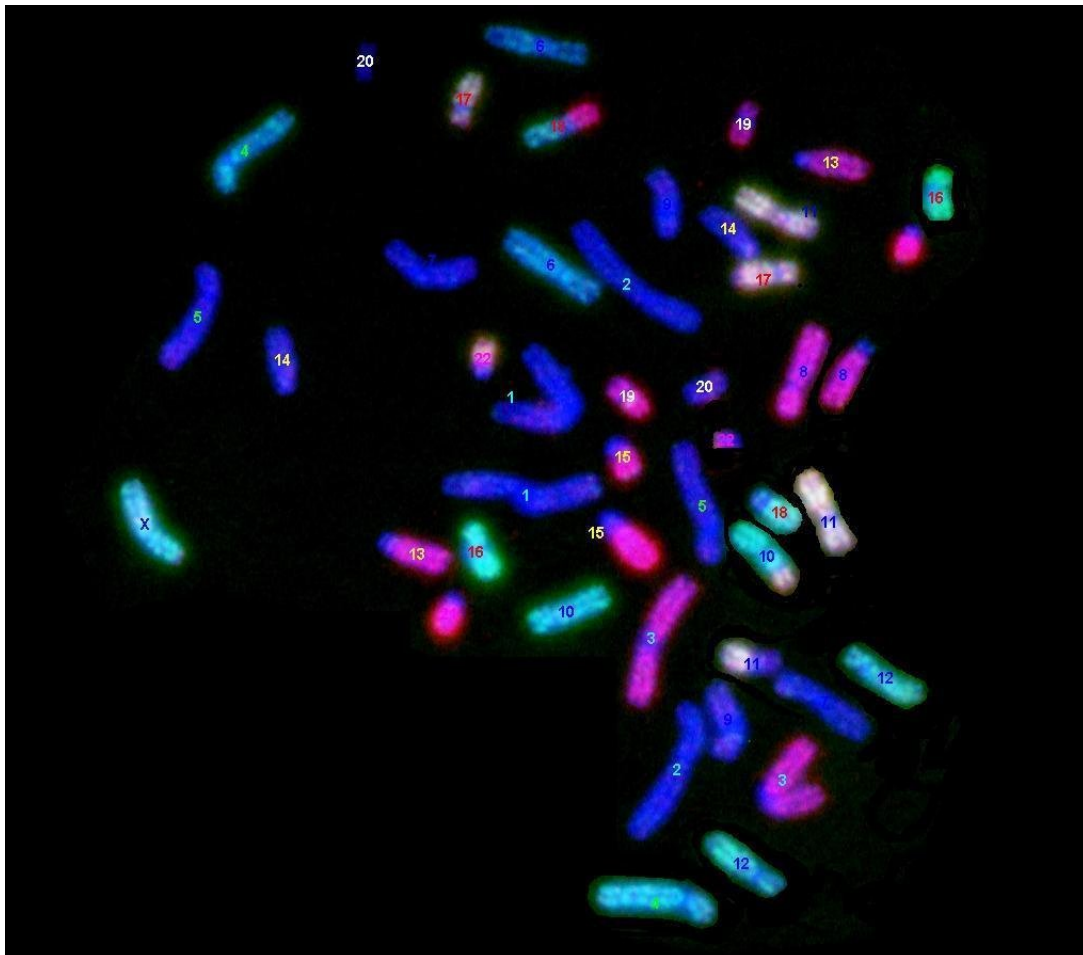
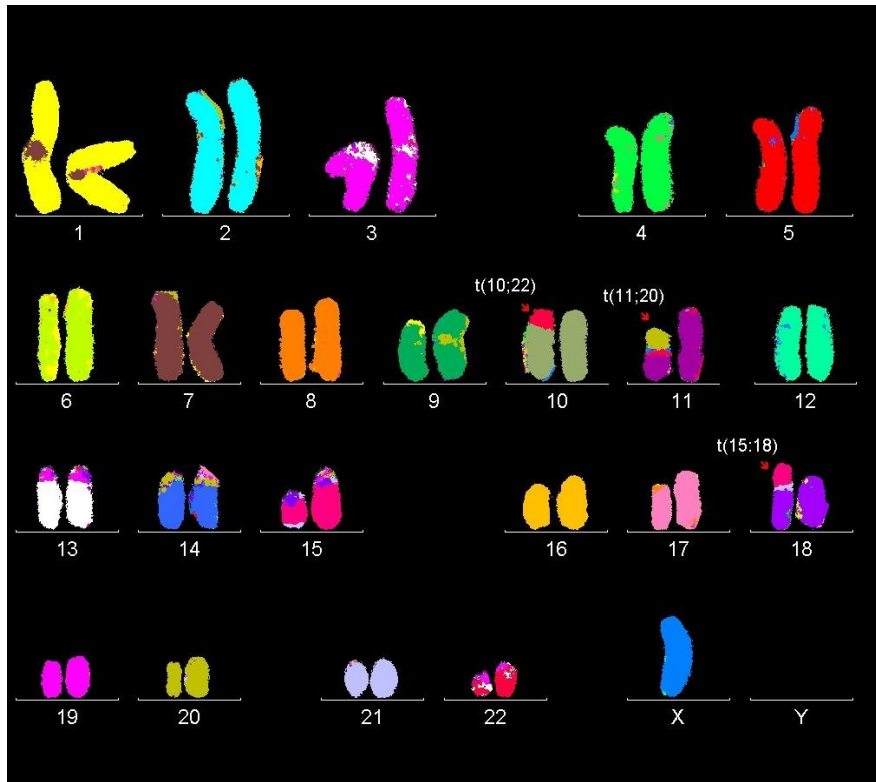


Figure III-22-b : Caryotype classé par le logiciel ISIS de la cellule B3 témoin III-21-a.



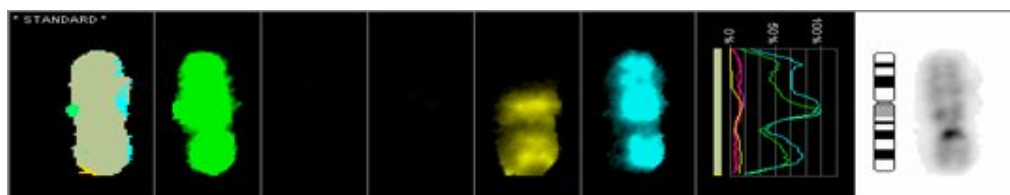
Mâle ; 3 translocations clonales :

- $t(15-18)$
- $t(10-22)$
- $t(11-20)$

Analyse d'un chromosome :

Pour déterminer le profil des différents fluorochromes d'un chromosome, le logiciel ISIS[®] superpose les différents filtres associés permettant de caractériser la composition d'un chromosome, comme illustré sur la figure III-23 pour une translocation $t(16 ; 10)$.

Figure III-23 : Translocation entre les chromosomes 16 et 10 : $t(16 ; 10)$. Le chromosome 10 est caractérisé par les filtres bleu et vert (DEAC, FITC) et le chromosome 16 est lui caractérisé par les filtres bleu, vert et jaune (DEAC FITC, Cy₅). Le profil des filtres montre nettement la présence au sein du chromosome 10 d'une portion de chromosome 16.



Chapitre IV

Résultats

Les résultats seront présentés en deux parties principales, relatives d'une part à la mort cellulaire et d'autre part à l'induction d'aberrations chromosomiques d'échange.

A – Mort cellulaire

I – Survie cellulaire en rayons γ :

I.1 – Courbes de survie :

Comme décrit dans la section B du chapitre III, les cellules B3 ont été irradiées par une source de rayonnement γ de ^{137}Cs , avec un protocole identique à celui des rayons X ultra-mous.

Le tableau IV-1 présente les résultats bruts obtenus pour des doses de 0 à 16 Gy.

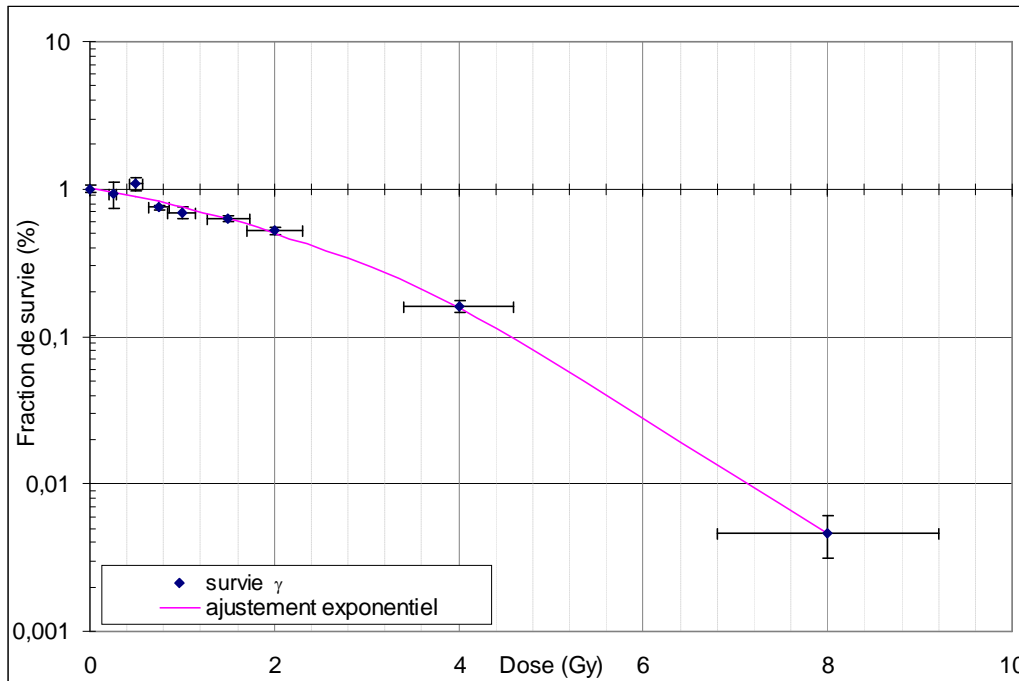
Tableau IV-1 : données brutes de la survie des cellules B3 après irradiation γ .

Dose (Gy)	<S> (%)	écart type (%)
1	1,00	0,06
0,25	0,93	0,19
0,5	1,09	0,11
0,75	0,75	0,02
1	0,69	0,07
1,5	0,63	0,03
2	0,52	0,03
4	0,16	0,01
8	0,004	0,001
16	0	0

Pour chaque dose, 9 flacons de culture ont servi à établir la survie des cellules à 11 jours, (correspondant à 3 boîtes de 3 concentrations cellulaires initiales différentes). Les résultats d'irradiation sur mylar ou sur flacons traditionnels sont rigoureusement identiques, l'erreur associée au comptage des colonies survivantes en est d'autant plus réduite.

La figure IV-2 illustre les résultats expérimentaux. La courbe représentative des données du tableau VI-1, tracée en coordonnées semi-logarithmiques, montre une dépendance linéaire quadratique, $S=e^{-(\alpha D+\beta D^2)}$, de la survie S en fonction de la dose D délivrée. Les paramètres α et β sont les paramètres du modèle quadratique établi depuis près de 40 ans [82]. Ces derniers ne tiennent pas compte des effets à faible dose qui n'entrent pas dans le cadre de nos études. On peut noter que α représente la pente de la tangente à l'origine des courbes de survie. Plusieurs explications possibles pour le paramètre β ont été avancées : saturation des voies de réparation et/ou interaction de 2 cdb donnant lieu à une aberration létale pour la cellule.

Figure IV-2: Courbe de survie cellulaire des cellules B3 après irradiation γ .



On trouve pour les paramètres du modèle linéaire quadratique :

$$\alpha \approx 0,23 \text{ Gy}^{-1}$$

$$\beta \approx 0.062 \text{ Gy}^{-2}$$

Ces valeurs sont en parfait accord avec les mesures effectuées sur différentes cellules tumorales humaines [83].

I.2 – Radiosensibilité :

Si l'on extrait de cette courbe de survie la dose correspondant à 10% de l'effet, que l'on appellera $D_{1/10}(\gamma)$, on obtient :

$$D_{1/10}(\gamma) = 4,6 \text{ Gy.}$$

On peut noter que comparativement à des cellules de mammifères, telles les cellules V79 de hamster chinois utilisées auparavant par le laboratoire, cette lignée tumorale humaine est nettement plus radiosensible. Il fallait environ 7 Gy pour obtenir 10% de survie pour des cellules V79.

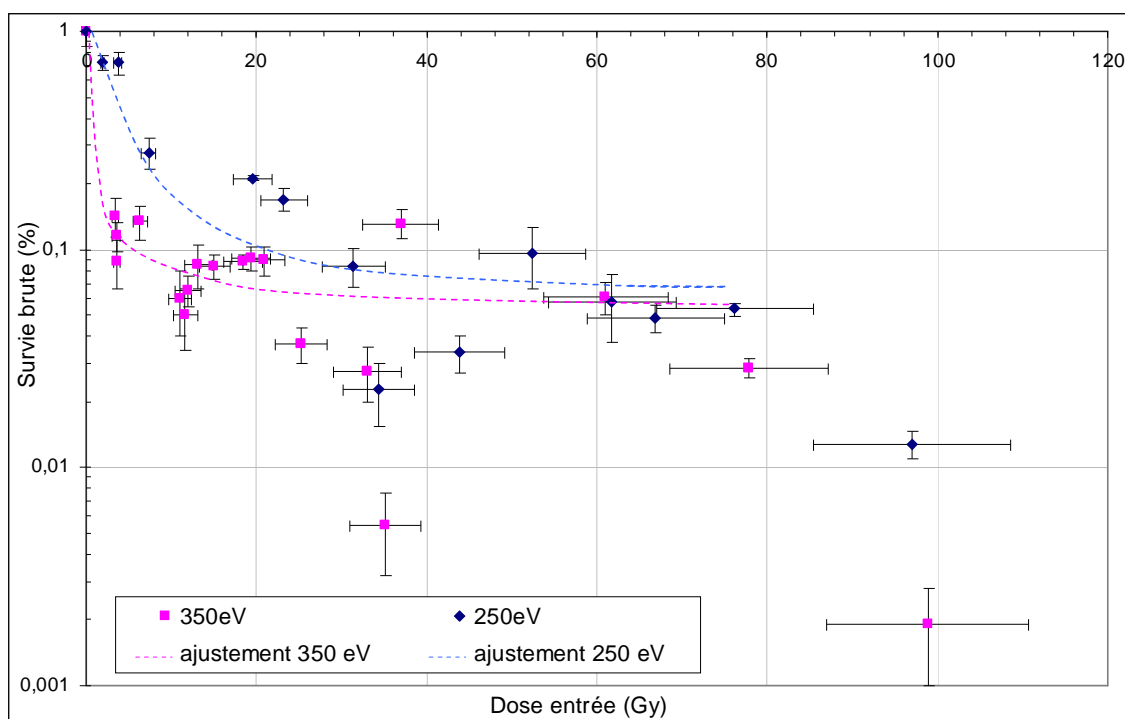
On tiendra compte de cette différence de sensibilité entre les deux lignées pour prédire correctement les doses nécessaires pour nos expériences en rayonnement X ultra-mou.

II – Survie cellulaire en rayons X ultra-mous à 250 eV et 350 eV :

II.1 – Courbes de survie :

Tout comme pour la survie en rayonnement γ , plusieurs ensemencements de concentrations différentes ont été effectués pour les rayons X ultra-mous. Il y a eu en tout 18 flacons pour chaque dose (6 boîtes pour 3 ensemencements différents). Les courbes de survies corrigées du témoin sont représentées figure IV-3 en fonction de la dose d'entrée au premier ordre dans la cellule. Elles sont obtenues par régression des survies brutes en fonction du nombre de cellules ensemencées.

Figure IV-3: Courbes de survies à 250 eV et 350 eV en fonction de la dose d'entrée au premier ordre dans la cellule, corrigées du témoin.



Les barres d'erreurs liées à la dose proviennent des incertitudes sur la calibration du détecteur (obtenue à partir du rapport I_{PD}/I_{CI}), sur les épaisseurs des mylars et sur le positionnement relatif de l'échantillon et du détecteur. Les incertitudes sur les survies sont estimées à partir des fluctuations observées sur les survies relatives aux 18 échantillons d'une même dose.

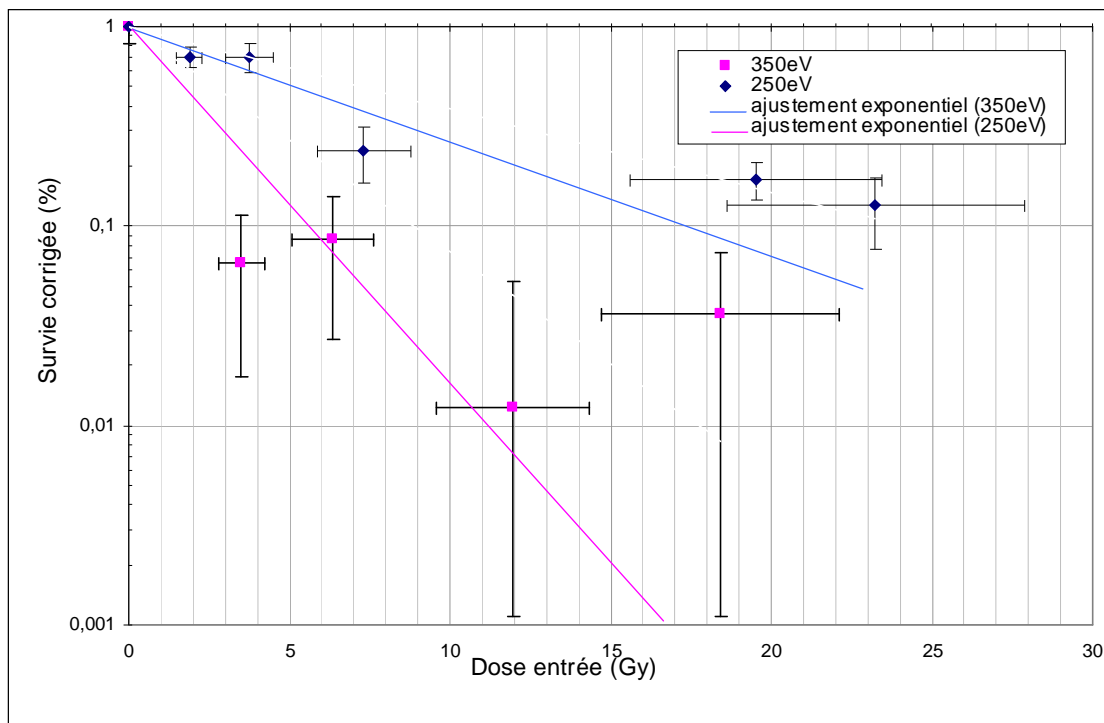
Les résultats sont présentés en fonction de la dose délivrée à l'entrée des cellules pour ne pas introduire d'incertitude supplémentaire liée aux épaisseurs cellulaires. Toutefois le critère d'iso-atténuation réalisé en irradiant à 250 eV et 350 eV permet de comparer sans ambiguïté l'efficacité des deux rayonnements.

Les témoins ont un taux de survie moyen de $0,45 \pm 0,06$. Ce faible taux est principalement dû au transport entre le lieu d'irradiation (LURE) et le laboratoire de biologie (LRO du CEA). Malgré des précautions supplémentaires et l'amélioration du protocole par rapport aux campagnes d'irradiation précédentes, nous n'avons pas pu obtenir un taux de survie témoin plus grand. La fluctuation observée sur le taux de survie des témoins se retrouve bien évidemment sur les cellules irradiées.

Pour des doses supérieures à 30 Gy il apparaît une « queue » de survie évaluée ici à $5\% \pm 4\%$. Cette survie résiduelle peut s'expliquer par l'existence de cellules en doubles couches, pratiquement non irradiées, comme l'avaient mis en évidence les campagnes précédentes. On peut souligner que le faible taux de cellule en doubles couches observé ici est le résultat de l'effort sur la culture de cellules. L'obtention d'une queue de survie de l'ordre de 5%, est une véritable prouesse, comparée au 25-30 % des campagnes précédentes.

La figure IV-4 présente la courbe de survie corrigée pour les cellules en double couches, pour les doses significatives correspondant à des survies non corrigées assez supérieures à 5%. Les survies correspondant à des doses proches ont été moyennées, l'erreur sur ces dernières est alors l'erreur pondérée. Les doses sont toujours les doses à l'entrée des cellules au premier ordre.

Figure IV-4 : Courbes de survie corrigées pour les cellules en double couche, à 250 eV et 350 eV, en fonction de la dose d'entrée au premier ordre dans la cellule.



On retrouve sur les cellules humaines B3 une efficacité létale accrue des photons de 350 eV par rapport à ceux de 250 eV, comme cela avait été observé sur les cellules de mammifères V79.

II.2 – Rapports des EBR à 250 eV et 350 eV :

Des courbes de survie précédentes on peut extraire les valeurs des EBR à 10 % de survie pour les photons d'énergie 250 eV et 350 eV.

Les doses à l'entrée correspondant à 10% de survie sont respectivement :

$$D_{1/10}(250\text{eV}) = 17 \text{ Gy} \quad \text{et} \quad D_{1/10}(350\text{eV}) = 5,5 \text{ Gy}$$

Pour passer aux doses moyennes au noyau cellulaire on corrige du rapport $D_{\text{moyenne.noyau}}/D_{\text{entrée}}$ établi au chapitre III section A, on a ainsi pour une cellule de type ellipsoïde :

$$D_{1/10}^{\text{noy}}(250\text{eV}) = 1,5 \text{ Gy} \quad \text{et} \quad D_{1/10}^{\text{noy}}(350\text{eV}) = 0,49 \text{ Gy}$$

Les EBR à 250 eV et 350 eV sont obtenues en considérant le rapport de $D_{1/10}(\gamma)$ avec ces valeurs. On a :

$$\text{EBR}(250\text{eV})_{\gamma} = \frac{4,6}{1,5} \approx 3 \quad \text{et} \quad \text{EBR}(350\text{eV})_{\gamma} = \frac{4,6}{0,49} \approx 9$$

La moyenne des EBR mesurées pour les rayons X ultra-mous de 278 eV est égale à $3 \pm 1,5$ dans le cas de cellules V79 [58 ; 84-85].

L'erreur sur chaque dose d'entrée absolue est de l'ordre de 20%, celle sur le rapport dose moyenne/dose d'entrée est de l'ordre de 40 %. Cette grande barre d'erreur résulte de l'incertitude sur les dimensions du cytoplasme et du noyau cellulaire. L'erreur sur l'EBR est donc de l'ordre de $\sqrt{0,4^2 + 0,2^2} \sim 45\%$. On notera que nos expériences n'ont pas pour but la détermination des EBR absolues mais celle du rapport $\text{EBR}(350\text{eV}) / \text{EBR}(250\text{eV})$

Le rapport des EBR entre les énergies 250 eV et 350 eV est lui beaucoup plus précis puisqu'il s'affranchit des incertitudes sur la taille des cellules et d'une partie des incertitudes sur les doses absolues. Le rapport des doses est connu à $\sim 20\%$ près et le rapport des pentes est connu à 22 % près, donc le rapport des EBR est connu à $\sqrt{0,20^2 + 0,22^2}$ soit à 30% près.

On a :

$$\frac{\text{EBR}_{\gamma}(350\text{eV})}{\text{EBR}_{\gamma}(250\text{eV})} = \frac{9,5}{3,1} = 3,1 \pm 0,9$$

On rappelle que pour les cellules V79 on avait mesuré ([2-4]) un rapport d'EBR de $2,3 \pm 0,5$. A l'intérieur des barres d'erreur, les deux rapports n'apparaissent pas différents. La sur-efficacité d'un facteur 2 des photons de 350 eV par rapport à 250 eV est bien corrélée à l'accroissement du nombre d'ionisations en couche interne entre ces deux énergies. De nouveau, pour des cellules humaines cette fois, les événements de cœur apparaissent comme jouant un rôle prépondérant dans l'induction de l'inactivation cellulaire par les rayons X ultra-mous.

III – Survie cellulaire pour des irradiations en ions lourds :

Une des motivations de l'irradiation des cellules B3 à deux énergies d'ions argon, est que les TEL correspondants se situent de part et d'autre des crochets caractéristiques des courbes de sections efficaces d'inactivation cellulaire en fonction du TEL des ions (*Kraft et al.* [76] et voir chapitre II).

III.1 – Ions de Haute Energie (HE) :

On présente ici les résultats obtenus en irradiation par des ions lourds d'argon à haute énergie : Ar^{18+} à 95 MeV/u. Le TEL de ces particules à l'entrée des cellules est de 253 keV/ μm . Le même principe d'ensemencement multiple a été réalisé pour les irradiations. Ainsi, 18 flacons par points (6 x3 ensemencements différents) ont permis d'obtenir les résultats présentés dans tableau IV-5. Pour chaque fluence de particules la dose moyenne par cellule et le nombre d'impacts moyen calculés sont indiqués.

Tableau IV-5: *Survies brutes moyennes obtenues après irradiation en ions Ar de 95 MeV/u.*

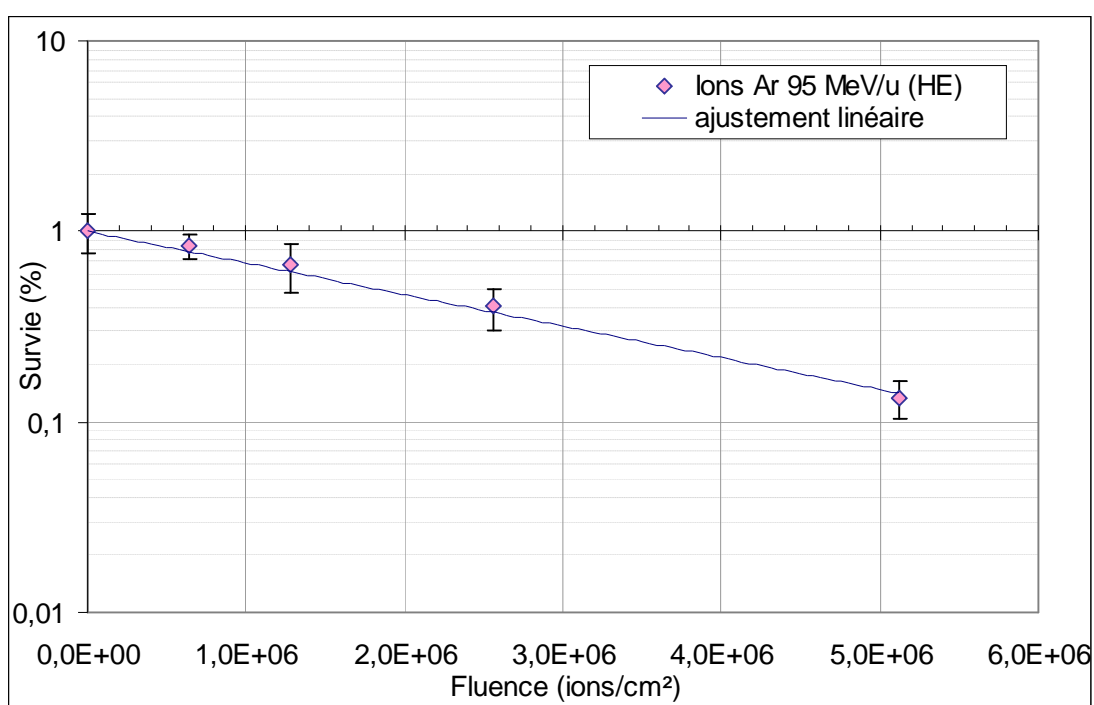
Fluence (part/cm²)	<Dose> (Gy)	<Impact>	<S> (%)	écart type (%)
0	0	0	1	0,22
$6,4 \cdot 10^5$	0,27	1	0,84	0,12
$1,28 \cdot 10^6$	0,54	2	0,67	0,19
$2,56 \cdot 10^6$	1,09	4	0,4	0,1
$5,12 \cdot 10^6$	2,18	8	0,13	0,03
$2,048 \cdot 10^7$	8,74	32	0,056	0,014
$4,096 \cdot 10^7$	17,5	64	0,004	0,004
$8,192 \cdot 10^7$	34,9	128	0,046	0,007

La figure IV-6 ci-dessous présente la courbe de survie en échelle semi-logarithmique. On a choisi de se restreindre à une échelle de dose (fluence) pertinente permettant un ajustement exponentiel correct pour extraire les paramètres de section efficace d'inactivation cellulaire. En effet les points à très haute fluence ($> 4 \cdot 10^7$ particules/cm²) n'ont pas de réelle signification et sont de plus très fluctuants –les barres d'erreurs sont de l'ordre de grandeur des survies. La « queue » de survie ne peut s'expliquer par d'éventuelles doubles couches, le parcours des ions étant supérieur à quelques μm . En revanche elle peut provenir de cellules

non irradiées malgré le balayage homogène des échantillons, ou bien situées en dehors de la zone d'irradiation mais récoltées et remises en culture avec les cellules irradiées. Cette allure des courbes à haute dose est très récurrente dans la littérature. Les points à haute fluence nous ont pour le moins permis de nous assurer que la survie est alors négligeable.

On s'est donc concentré sur un intervalle de 0 à 8 impacts moyens par cellule qui permet de représenter la décroissance jusqu'à ~10% de survie.

Figure IV-6 : Courbes de survie cellulaire en fonction de la fluence à l'entrée des cellules.



III.2 – Ions de Moyenne Energie (SME) :

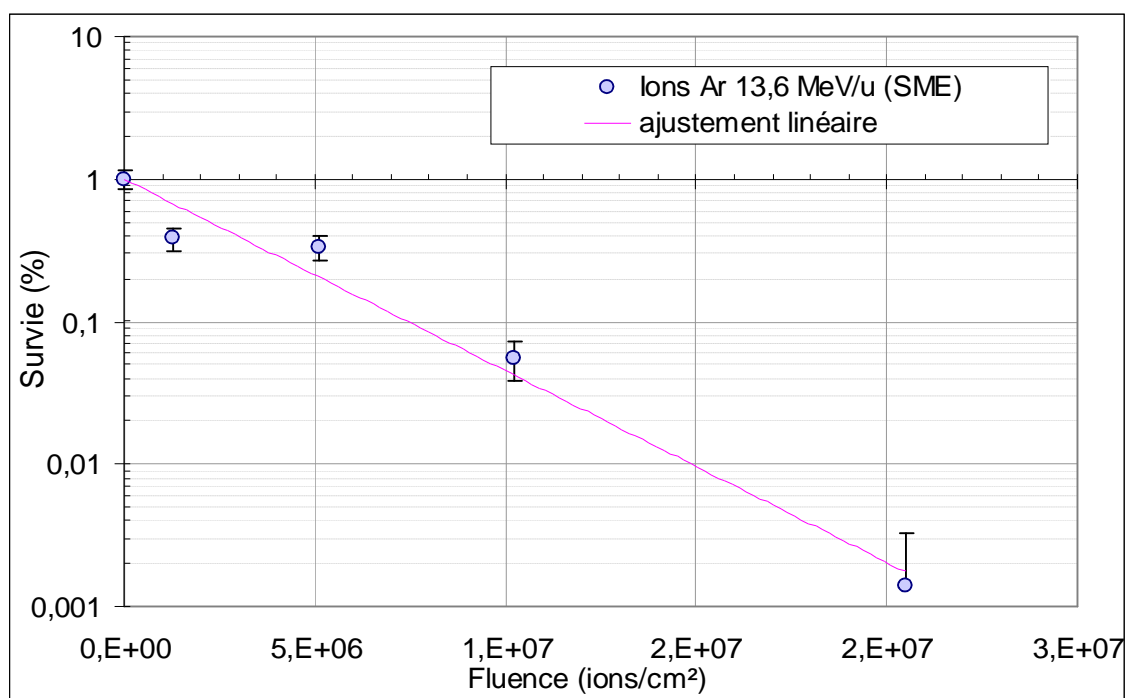
La deuxième irradiation en ions Ar, a été réalisée à moyenne énergie : Ar¹⁷⁺ 13,6 MeV/u. Cette dernière correspond à un TEL relativement élevé de 1325 keV/ μ m à l'entrée des cellules. De même qu'en HE, 18 flacons de 3 ensemencements différents par fluence ont été utilisés pour déterminer les survies moyennes. Le tableau IV-7 résume les survies obtenues en fonction des fluences, doses et nombres d'impacts moyens par cellule.

Tableau IV-7 : *Survies brutes moyennes obtenues après irradiation en ions Ar à moyenne énergie.*

Fluence (part/cm ²)	<Dose> (Gy)	<Impact>	<S> (%)	écart type (%)
0	0	0	1,00	0,14
1,28.10 ⁶	0,74	0,5	0,38	0,07
5,12.10 ⁶	1,49	1	0,33	0,07
1,024.10 ⁷	2,98	2	0,056	0,017
2,048.10 ⁷	23,8	16	0,0012	0,0018
4,096.10 ⁷	47,7	32	0	0
8,192.10 ⁷	95,4	64	0	0

Pour la SME, on a dû utiliser comme pour les rayons X ultra-mous, des supports de cellules en mylar (~12µm). Le nombre de cellules récoltées est donc un peu faible et la statistique n'est pas excellente. Toutes les irradiations n'ont pas donné lieu à des résultats présentables. Dans une gamme de dose (fluence) entraînant jusqu'à 10% de survie, la figure IV-8 illustre la décroissance de la survie cellulaire en fonction de la fluence.

Figure IV-8 : *Courbes de survie cellulaire en fonction de la fluence à l'entrée des cellules.*



III.3 – Incertitudes :

L'incertitude sur les survies par comptage est extraite des fluctuations observées sur les nombres de colonies survivantes pour les 18 flacons et les 3 ensemencements différents.

Pour la HE il n'y avait pas de grande dispersion des résultats (excepté à très haute fluence).

Pour la SME la dispersion observée est plus forte et s'explique par la difficulté de récolter les cellules sur des mylars.

L'incertitude sur les doses et fluences en abscisses (chapitre III section A), est estimée à ~15%.

III.4 – Extraction des sections efficaces d'inactivation cellulaire :

A partir des courbes de survie représentées en fonction de la fluence des particules, on peut extraire les sections efficaces d'inactivation cellulaire. Le terme de section efficace est traditionnellement utilisé pour caractériser l'inactivation cellulaire par des particules chargées [59]. Lorsque les courbes de décroissance sont purement exponentielles la section efficace est la pente de la droite représentative en échelle semi-logarithmique. Comme expliqué au chapitre I, la survie peut s'exprimer par $S = e^{-\sigma \cdot \Phi}$, où σ est la section efficace d'inactivation et Φ la fluence des particules. Pour $S = 1/e$ soit 37%, la section efficace est l'inverse de la fluence assurant une survie de 37%, $\Phi_{37\%}$ ou $\Phi_{1/e}$. Pour des ions de faibles TEL (< 100 keV/ μm) les courbes présentent un épaulement et la 'pente' augmente avec la fluence. On peut alors extraire différentes sections efficaces qui sont déduites soit de la pente initiale soit de la pente finale. Ce problème ne nous concerne pas ici. Les sections efficaces seront exprimées en μm^2 .

Pour les ions de 253 keV/ μm , $\Phi_{37\%}^{\text{HE}} = 2,8 \cdot 10^6$ part/cm² et la section efficace est :

$$\sigma_{\text{HE}} = 36 \mu\text{m}^2 \pm 5 \mu\text{m}^2.$$

Pour les ions de 1325 keV/ μm , $\Phi_{37\%}^{\text{SME}} = 3,6 \cdot 10^6$ part/cm² et la section efficace est :

$$\sigma_{\text{HE}} = 27 \mu\text{m}^2 \pm 4 \mu\text{m}^2.$$

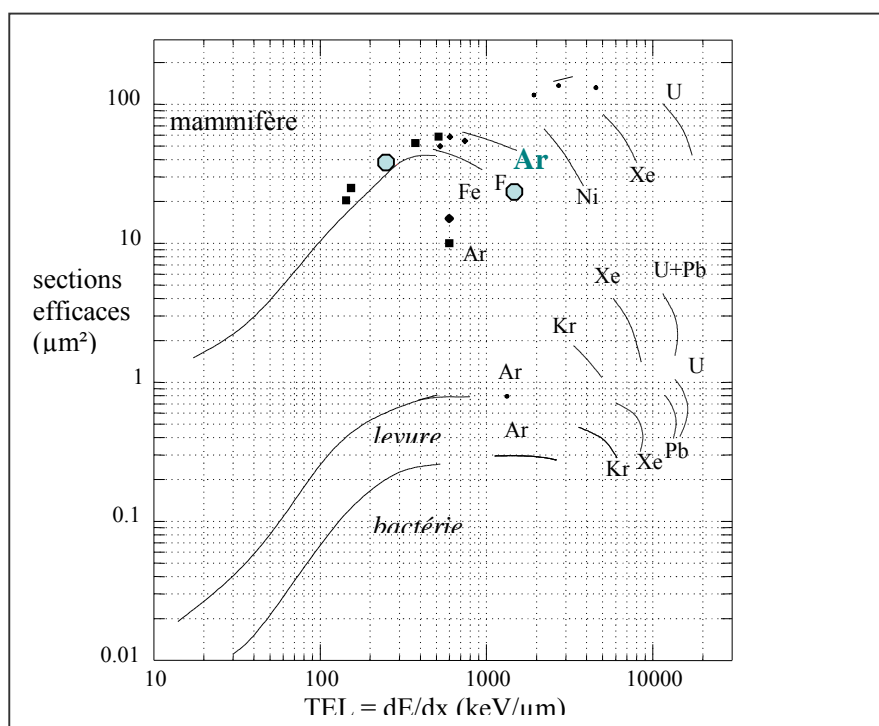
On remarque que ces sections efficaces sont très proches de celles obtenues pour des cellules V79 [76] (voir figure IV-9).

L'aspect le plus intéressant de ces résultats est qu'ils sont en accord avec l'existence de « crochets » observés pour les cellules V79, levures et spores de bactéries (Kraft et al. [71]). On voit ainsi que le point en HE est dans la partie montante du crochet relatif aux ions Ar et que le point en SME est dans la partie descendante du crochet.

Il aurait été intéressant d'avoir une troisième énergie aux alentours de 600 keV/μm pour préciser ce comportement en crochet, mais nous n'avons pas eu l'opportunité d'irradier au GANIL à cette énergie.

Pour les cellules V79 rappelons qu'il a été montré ([1] et voir chapitre II) que les crochets observés expérimentalement apparaissent aux maxima d'ionisations en couche interne des atomes C, N, O de l'ADN et que la contribution de ces événements à l'inactivation cellulaire pourrait être de 50 à 10 %. Pour les deux mesures effectuées ici, nous retrouvons le fait paradoxal que les ions de TEL 1325 keV/ μm, 5 fois supérieur à celui des ions de 253 keV/μm, sont moins efficaces que ces derniers pour engendrer la mort cellulaire. Cette propriété est caractéristique des phénomènes d'ionisation en couche interne des atomes de C, N, O de la matière biologique.

Figure IV-9: Sections efficaces d'inactivation des cellules B3 en SME et HE \odot comparées aux valeurs compilées par Kraft [76] pour des cellules V79, de levures *Saccharomyces Cerevisiae* et de spores de bactéries *Bacillus Subtilis*.



B - Aberrations chromosomiques induites par rayonnement

X ultra-mous aux énergies 250 eV et 350 eV

I – Résultats généraux :

Aberrations d'échange totales :

Le tableau IV-10 présente les résultats bruts d'induction d'aberrations obtenus pour les énergies 250 eV et 350 eV. Les doses reportées sont celles à l'entrée des cellules au premier ordre.

Tableau IV-10 : *Fréquence et type d'aberrations induites en cellules B3 par rayons X ultra-mous d'énergies 250 eV et 350 eV.*

énergie (eV)	250		350		
dose d'entrée (Gy)	12,5	18,7	5,5	12,4	19,6
nombre de métaphases	20	20	20	23	27
Aberrations totales	142	117	108	231	199
Translocations	138 *	113	105 *	220 *	189 *
<i>Dicentriques</i>	4 @	2	4 @	2 @	4
<i>Quadricentrique</i>	0	0	0	0	1
<i>Anneaux</i>	1	1	0	3	5
<i>Radians</i>	2 @	1	1 @	10 @	2 @

* *Translocations contenant des remaniements tels que des dicentriques et/ou radians.*

@ *Certains des ces remaniements, hautement complexes, contiennent des translocations.*

Les difficultés inhérentes aux conditions expérimentales ont rendu difficile la récolte d'un nombre abondant de cellules et de métaphases pour les caryotypes à 24h. De plus, la qualité d'étalement des métaphases n'est pas idéale pour une exploitation en hybridation *in situ*. Au vu des métaphases témoins et des caryotypes réalisés préalablement à la campagne d'irradiation sur les cellules B3, ce n'est pas le protocole lui-même qui est mis en cause, (il a au contraire été bien adapté), mais les conditions d'irradiations au LURE et le stress infligé

aux cellules. On peut noter qu'un nombre maximum de 300 métaphases récupérées par irradiation permet d'avoir environ 50 métaphases analysables. Les études précédentes en rayons X ultra-mous sur des cellules V79 portaient au moins sur une centaine de métaphases par dose, mais assuraient une réserve de plusieurs milliers de métaphases pour chacune des doses.

Dans le cadre de ce travail on a étudié au minimum 20 métaphases par dose comme le précise le tableau IV-10. Ces études bien que portant sur un faible échantillon, ont demandé plusieurs mois d'analyse pour quantifier correctement les aberrations visualisées par technique mFISH. On peut souligner que même les métaphases les plus exploitables présentaient de multiples chevauchements, rendant difficile cette analyse.

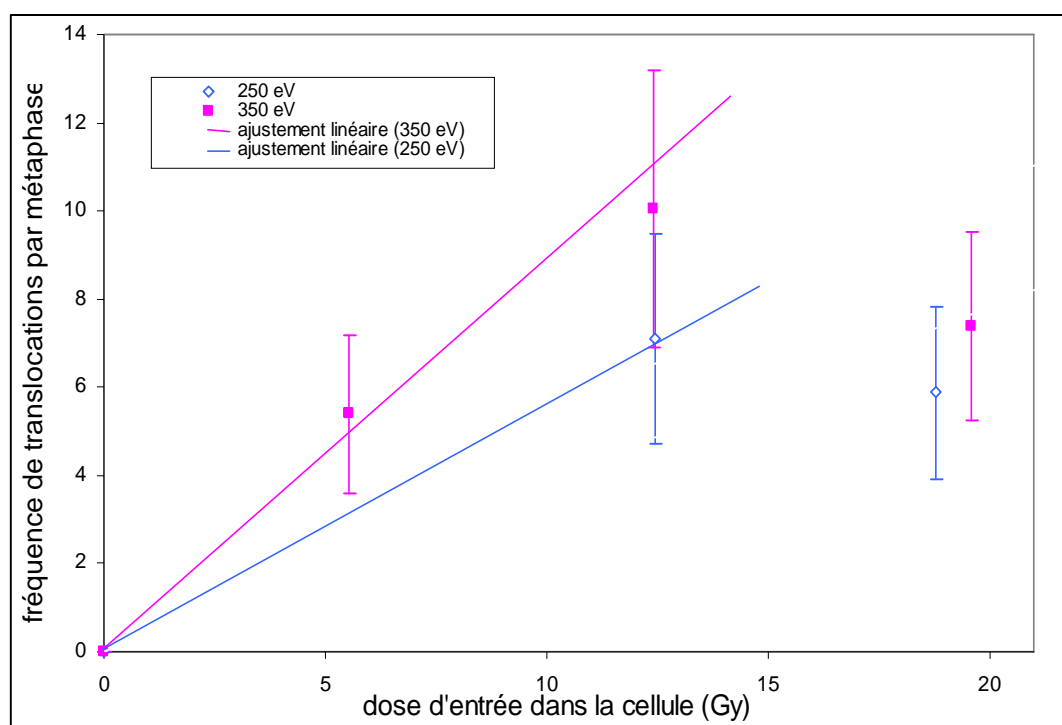
La figure IV-11 présente les fréquences par métaphase des aberrations d'échange en fonction de la dose à l'entrée des cellules et les ajustements linéaires des résultats à basse dose. Les rendements en aberrations sont généralement extraits des pentes à l'origine des courbes de fréquences, pour lesquelles nous avons ici très peu de points. Nous nous sommes limités aux doses < 20 Gy à 250 eV et ≤ 10 Gy à 350 eV. En effet il est connu qu'à haute dose, le rendement en aberrations peut décroître pour plusieurs raisons :

- transformation des aberrations simples en aberrations complexes entraînant éventuellement une mort cellulaire.

- avantage sélectif acquis par les cellules en deuxième couche, non irradiées [86].

Pour les cellules V79, Thacker [86] et nous-même avons observé cette décroissance pour des doses moyennes au noyau cellulaire supérieures à 2,5 Gy à 278 (250) eV. Compte tenu de la radiosensibilité 1,5 fois plus grande des cellules B3 et du rapport $D_{\text{moyenne.noyau}}/D_{\text{entrée}} = 0,08$, cette limite correspond à environ 20 Gy en dose d'entrée pour les cellule B3 irradiée à 250 eV et ~ 10 Gy en dose d'entrée pour les cellules irradiées à 350 eV.

Figure IV-11 : Fréquences des aberrations d'échange par métaphase corrigées du témoin, en fonction de la dose d'entrée dans la cellule



Il apparaît une possible sur-efficacité quant à l'induction d'aberrations pour le rayonnement à 350 eV par rapport à celui à 250 eV mais les barres d'erreur (correspondant à un intervalle de confiance de 64%) sont très importantes. En moyenne il apparaît un taux moyen d'aberration par gray 1,8 fois plus grand à 350 eV qu'à 250 eV.

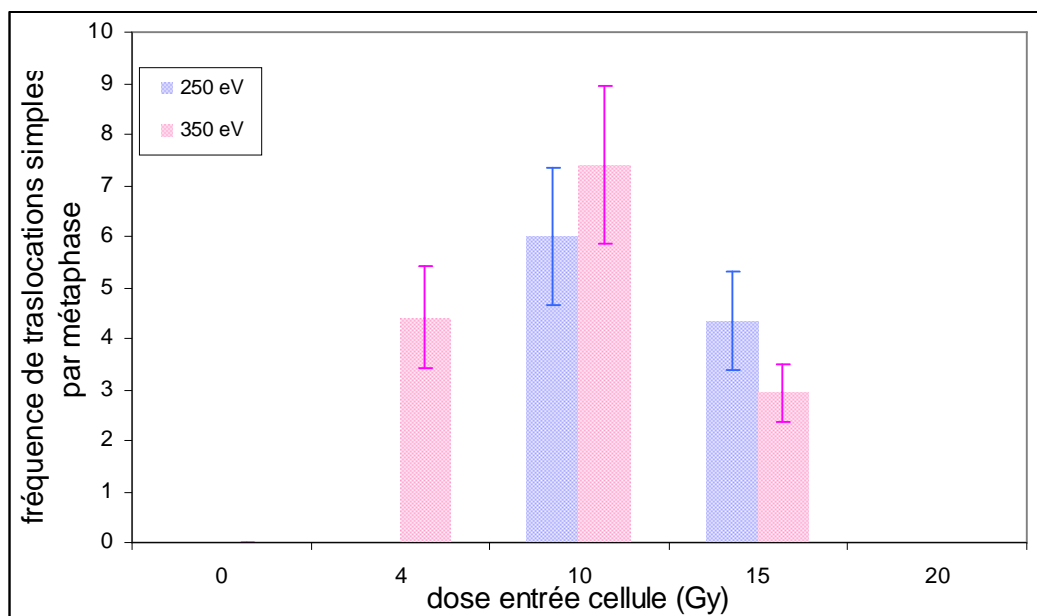
Rappelons que pour les cellules V79, pour lesquelles nous avons une meilleure statistique, le rapport d'induction à 350 eV par rapport à 250 eV à été trouvé égal à $2,8 \pm 1,0$.

Un aspect intéressant de l'étude serait la possibilité de comparer les fréquences de production de dicentriques et de translocations. Le peu de dicentriques recensés serait en accord avec plusieurs études mentionnant que la fréquence des translocations est de façon significative plus grande que la fréquence des dicentriques [87]. Néanmoins il est possible qu'en raison de la qualité des métaphases et de la difficulté à identifier certaines zones centromériques nous ayons confondu certains dicentriques avec des translocations. Une hybridation avec une sonde pancentromérique serait nécessaire pour une meilleure caractérisation des aberrations.

Aberrations d'échange simples :

La figure IV-12 présente les fréquences d'aberrations d'échange cataloguées comme simples. Ces dernières représentent en moyenne 70-80 % de l'ensemble des aberrations d'échange.

Figure IV-12 : Fréquences d'aberrations d'échange simples, induites en cellules B3 par rayons X ultra-mous d'énergies 250 eV et 350 eV en fonction de la dose d'entrée dans la cellule.



Le comportement en fonction de la dose des aberrations simples est similaire à celui des aberrations totales. On retrouve le comportement à haute dose qui semble paradoxal et plus accentué que pour l'ensemble des aberrations.

Caryotype témoin :

Les fréquences d'aberrations reportées dans les deux paragraphes précédents, ont été corrigées du taux d'aberrations des témoins. Il existe en effet des remaniements naturels. Le caryotype témoin d'une cellule B3 (voir chapitre III section B), possède 3 translocations clonales : t(15 ;18), t(11 ;20) et t(10 ;22). La lignée cellulaire qui est de plus relativement instable, peut présenter des translocations spontanées (figure III-21).

Sur la quarantaine de caryotypes témoins analysés, un taux de 1,1 translocation spontanée par métaphase a été trouvé. Ces aberrations ne sont pas clonales mais on retrouve pour 30% des cas la translocation t(13 ;14), pour 30% également la t(8 ;7), et pour environ 10% la t(9 ;16). Ceci signe peut-être une instabilité clonale naissante. Les 30% restants sont répartis sur des translocations impliquant les chromosomes 17, 20 et 22 combinés entre eux ou avec les chromosomes des translocations précédentes. Ceci souligne la fragilité éventuelle de certains chromosomes ou la tendance préférentielle à certains remaniements.

On peut souligner à ce sujet qu'un sous-clone des cellules B3 (G71, support d'étude dans le laboratoire du CEA) présente le caryotype stable : 46(X ;Y) – t(15 ;18) t(11 ;20) t(10 ;22) et t(8 ;7). Cette dernière translocation a été trouvée dans les translocations spontanées des cellules B3.

Le taux de translocations spontanées a été soustrait systématiquement des fréquences mesurées pour les échantillons irradiés.

Il aurait été intéressant de regarder si des translocations particulières apparaissent préférentiellement après irradiation, ce qui pourrait suggérer l'amorce de points de mutation ou d'une instabilité chromosomique. Malheureusement, une multitude de combinaisons de translocations a été rencontrée et aucune n'émerge en particulier de manière fiable statistiquement. On peut toutefois souligner les points suivants :

- Dans plus de 90 % des cas le chromosome 8 est impliqué dans un remaniement au sein d'une métaphase. Les chromosomes 13 et 14 interviennent également à hauteur de 50 %.
- Les translocations t(13 ;14) et t(8 ;7) sont présentes dans les ¾ des métaphases. Cette fréquence d'apparition semble importante mais il faut remarquer que si l'irradiation favorise ou accroît leur apparition, elles sont déjà présentes spontanément dans le témoin.
- On peut également souligner que les translocations clonales de la lignée B3 ont une grande propension à se recombiner avec d'autres chromosomes dans les translocations recensées.

Des conclusions plus poussées nécessiteraient des échantillons de métaphases plus grands.

Aucune différence significative en ce qui concerne le type de remaniements ou l'existence de points de cassures préférentiels, n'a pu être mis en évidence pour les rayons X ultra-mous aux deux énergies. Cela n'exclut pas des cassures préférentiellement liées aux événements «K» mais il faudrait également pouvoir augmenter la statistique.

En revanche si l'on s'attache à des classes particulièrement complexes d'aberrations d'échange, les effets à 350 eV et à 250 eV ne sont pas identiques. La description de cette étude est l'objet du paragraphe suivant.

II – Aberrations d'échange complexes :

Aberrations complexes standards :

On s'appuie sur la définition standard des aberrations d'échange complexes (voir chapitre I section C). Une aberration est considérée comme simple s'il y a jusqu'à 2 cassures double-brin dans 2 chromosomes au plus. Une aberration est considérée comme complexe s'il y a plus de 2 cassures dans plus de 2 chromosomes.

Les fréquences d'apparition de cette sous-classe d'aberrations, lors de l'irradiation en rayons X ultra-mous, sont présentées dans le tableau IV-13. On parlera maintenant de translocations complexes en général pour les aberrations d'échange dites complexes. Par exemple, même s'il existe quelques rares cas, hautement complexes, comme un chromosome dicentrique contenant une ou plusieurs translocations ou un multi-radian contenant plusieurs translocations, ces aberrations sont ici classées comme translocations complexes.

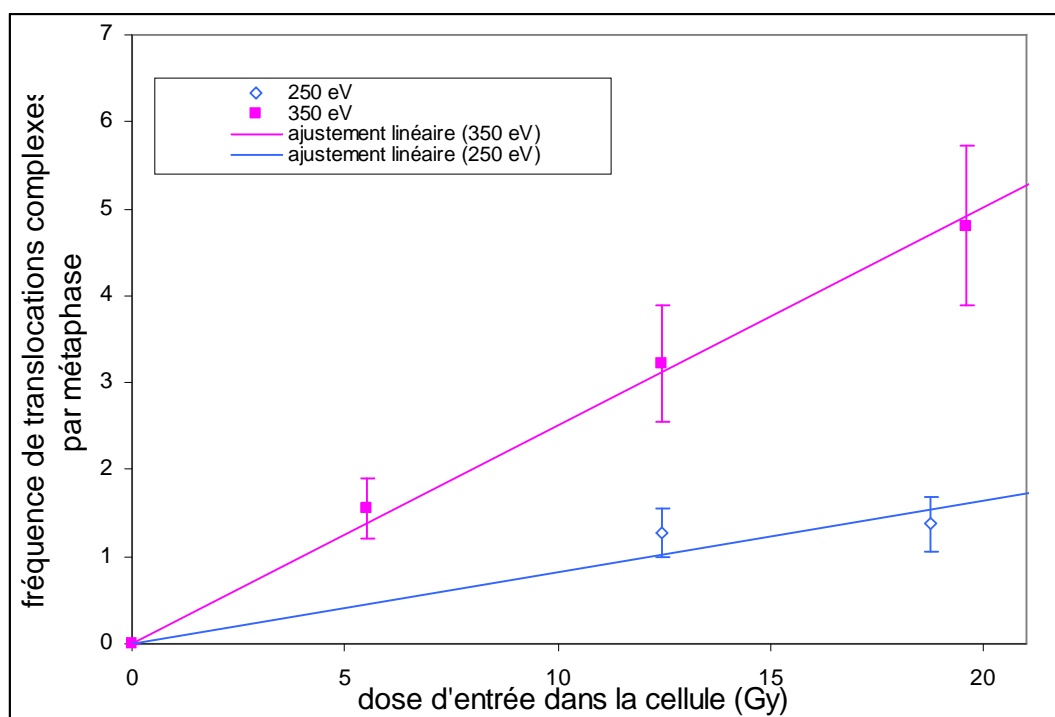
Tableau IV-13 : Fréquences d'aberrations complexes induites en cellule B3 par rayons X ultra-mous d'énergies 250 eV et 350 eV.

énergie (eV)	250		350		
dose d'entrée (Gy)	12,5	18,7	5,5	12,4	19,6
nombre de translocations complexes par métaphase	1,3	1,4	1,5	3,3	4,8

On peut noter qu'aucune métaphase témoin ne présente d'aberrations complexes. Ce type de remaniement semble parfaitement spécifique des effets de l'irradiation.

La figure IV-14 ci-dessous présente les fréquences d'aberrations complexes en fonction de la dose d'entrée aux cellules.

Figure IV-14 : Fréquences d'aberrations complexes induites en cellules B3 par rayons X ultra-mous d'énergies 250 eV et 350 eV en fonction de la dose à l'entrée des cellules.



On a effectué un ajustement linéaire pour les deux énergies. Les efficacités biologiques d'induction de translocations sont déterminées sur cette gamme de dose qui correspondrait par rapport aux résultats en inactivation cellulaire à des survies supérieures à 10 %.

La comparaison des fréquences de production de translocations complexes à 350 eV par rapport à 250 eV montre qu'à dose (d'entrée) égale les rayons X ultra-mous d'énergie juste après le seuil K du carbone induisent 3,3 fois plus de translocations complexes que ceux aux énergies juste en dessous du seuil. Le rapport des EBR à 350 eV par rapport à 250 eV pour l'induction de translocations complexes (t.c), est : $EBR_{250}^{t.c}(350 \text{ eV}) = 3,3$.

Ces résultats relatifs aux aberrations complexes d'échange sont tout à fait nouveaux. Ils vont dans le même sens que ceux obtenus pour les dicentriques et anneaux produits en cellules V79 [88, 89].

D'une manière générale Griffin et al. [90-91] avaient déjà montré que les rayons X mous étaient capables de produire des aberrations complexes. En revanche une discontinuité d'EBR au sein même d'un type de radiation donné n'avait jamais été mise en évidence.

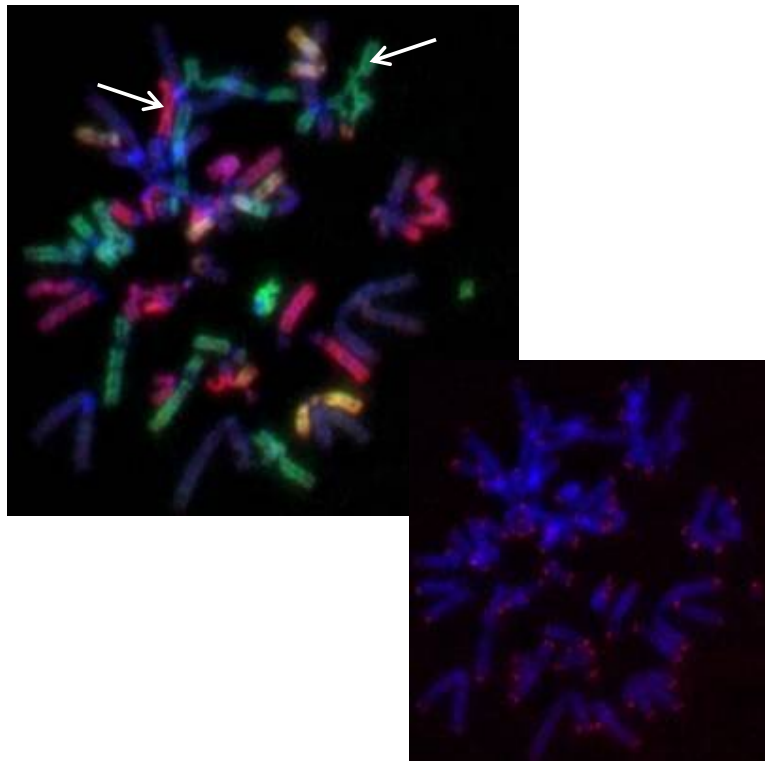
Aberrations complexes impliquant plus de 3 chromosomes :

Comme l'illustrent les photographies présentées dans la figure IV-15 de nombreuses aberrations complexes impliquant plus de 3 chromosomes ont été recensées. Au vu de la complexité parfois surprenante –allure en « petit train » impliquant des chromosomes avec de multiples translocations (figure IV-15-a) ou des chromosomes « se tenant pieds et mains en farandole » pour des multi radians transloqués (figure IV-15-b)– il nous est apparu important de regarder plus en détail cette classe particulière d'aberrations complexes.

Figure IV-15 : illustration de la complexité des remaniements induits par les rayons X ultra-mous observés en mFISH et PNA.

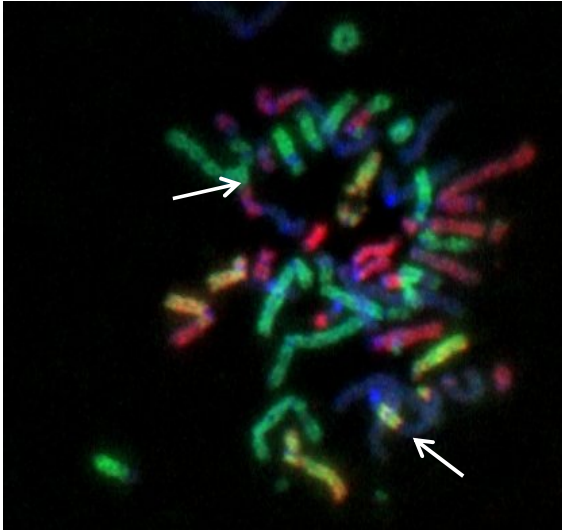
L'hybridation préalable en PNA (télomères à droite) a permis de distinguer correctement les extrémités des chromosomes hybridés en mFish et de recenser de façon fiable les translocations dans les chevauchements et proximités des chromosomes des métaphases.

Photo IV-15-a : « farandole ».



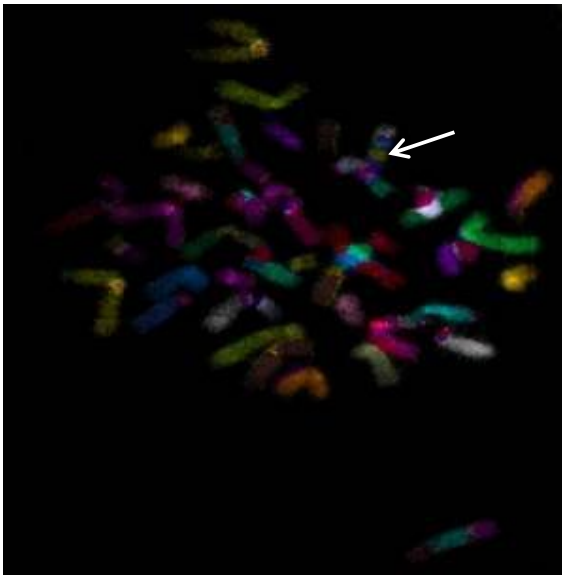
La photo IV-15-a présente une métaphase irradiée à 350 eV à 19,6 Gy en dose d'entrée (~1,6Gy en dose moyenne au noyau). La farandole en haut illustre la complexité observée : il s'agit d'un multi-radian impliquant les chromosomes 1, 5, 4, 14, t(10-22) avec de petites translocations (insertions) entre les chromosomes 1 et 4 ainsi que 22 et 5.

Photo IV-15-a (bis) :



La photo IV-15-a(bis) (350 eV - 19,6 Gy en dose d'entrée soit ~1,6 Gy en dose moyenne au noyau) montre un radian impliquant les chromosome 1 et X avec une translocation $t(1;X;1)$. Il y a également un multi-radian impliquant les chromosomes 17, 7, 20 et (10 ;22).

Photo b : « petit train » :



La photo IV-15-b (350 eV - 19,6 Gy en dose d'entrée soit ~1,6 Gy en dose moyenne au noyau) montre une translocation impliquant 5 chromosomes, il s'agit de la translocation $t(13;14;4;9;17)$. On peut noter la présence de la translocation (13 ;14) au sein de cette longue chaîne.

Le tableau IV-16 présente les fréquences d'aberrations complexes impliquant plus de trois chromosomes pour les deux énergies de rayonnements X ultra-mous en fonction de la dose d'entrée dans les cellules.

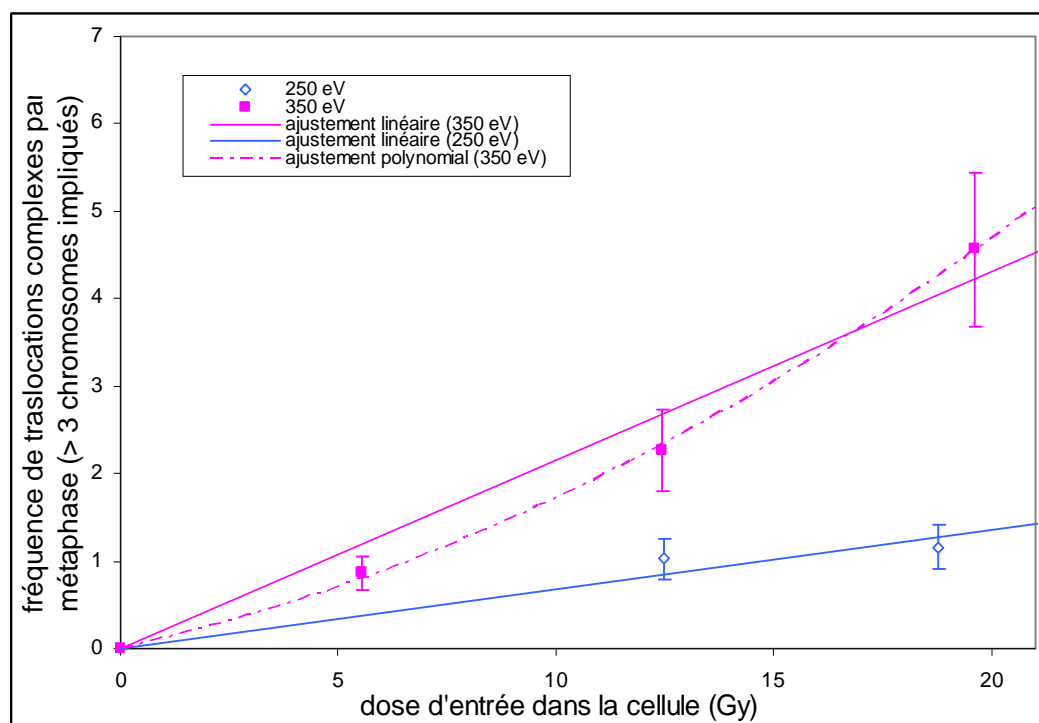
Tableau IV-16 : Fréquences d'aberrations complexes*, avec plus de 3 chromosomes impliqués, induites en cellules B3 par rayons X ultra-mous d'énergies 250 eV et 350 eV.

énergie (eV)	250		350		
dose d'entrée (Gy)	12,5	18,7	5,5	12,4	19,6
nombre de translocations complexes* par métaphase	1,0	1,2	0,9	2,3	4,5

La figure IV-17 présente les fréquences d'aberrations impliquant plus de 3 chromosomes en fonction de la dose d'entrée dans les cellules.

Les rapports des EBR ont été déterminés via une régression linéaire des translocations en fonction de la dose, cependant on peut également réaliser un ajustement linéaire-quadratique à 350 eV.

Figure IV-17 : Fréquences d'aberrations complexes*, avec plus de 3 chromosomes impliqués, induites en cellules B3 par rayons X ultra-mous d'énergies 250 eV et 350 eV en fonction de la dose d'entrée dans les cellules.



De nouveau le rayonnement à 350 eV est nettement plus efficace pour induire ce type de translocations, son EBR par rapport au rayonnement de 250 eV est de l'ordre de 4,1.

D'une façon générale, quelle que soit la régression utilisée dans cette gamme de doses, il apparaît un rapport > 4 entre les EBR des rayons X aux deux énergies.

Les aberrations complexes représentent entre 20-25 % et 30-65 % de toutes les aberrations d'échange aux deux énergies de rayons X ultra-mous (250 eV et 350 eV respectivement). On discutera de la dépendance de la complexité en fonction de la dose dans le paragraphe suivant.

Variation de la complexité des aberrations :

En contraste avec les résultats présentés dans les figures IV-11 et IV-12, les aberrations complexes augmentent nettement avec la dose. De plus leur complexité elle-même varie en fonction de la dose.

À 250 eV, pour ~12 Gy il y a 13% d'aberrations complexes impliquant 3 chromosomes et 2% impliquant 4 chromosomes alors qu'à ~19 Gy les taux d'aberrations impliquant 3 et 4 chromosomes sont semblables (12% impliquant 3 chromosomes, 2,3% impliquant 4 chromosomes). Il apparaît surtout à cette dernière dose ~2% d'aberrations impliquant plus de 4 chromosomes.

À 350 eV on constate la même augmentation de complexité en fonction de la dose. Pour ~19 Gy on atteint plus de 35% d'aberrations complexes impliquant plus de 3 chromosomes contre 15-20 % aux doses inférieures. On peut noter également qu'à 19 Gy ces aberrations représentent près de 95 % des aberrations complexes (contre ~70 % aux doses inférieures).

Plus la dose augmente plus le nombre de chromosomes impliqués augmente. Le tableau IV-18 ci- dessous résume ces données.

Tableau IV-18 : Complexité des aberrations d'échanges induites en cellules B3 aux énergies 250 eV et 350 eV, en fonction du nombre de chromosomes impliqués (on rappelle que le témoin ne présente que des translocations simples spontanées à 2 chromosomes).

énergie (eV)	250		350			
	dose d'entrée (Gy)	12,5	18,7	5,5	12,4	19,6
2 chromosomes impliqués (simples et complexes)		85%	84%	86%	79%	65%
3 chromosomes impliqués (uniquement complexes)		13%	12%	12%	17%	22%
4 chromosomes impliqués (uniquement complexes)		2%	2,3%	1,5	3,5%	7%
> à 4 chromosomes impliqués (uniquement complexes)		0	1,7%	0	0,5%	6%

Complexité et nombre de chromosome impliqués dans les aberrations d'échange augmentant avec la dose, on peut mettre en parallèle la fréquence peu élevée des aberrations simples trouvée à ~19 Gy (figure IV-12). Ces observations corroborent l'idée qu'à haute dose les aberrations simples se transforment en aberrations très complexes, lors de recombinaisons avec d'autres chromosomes.

Cette idée a été avancée pour expliquer les données relatives à la complexité des aberrations d'échange observées en rayonnements γ [44] et en rayons X ultra-mous [91].

Enfin la complexité diffère grandement en fonction de l'énergie du rayonnement X. Si en moyenne on a 15% d'aberrations complexes impliquant plus de 3 chromosomes à 250 eV, on en observe entre 15% et 35% à 350 eV. De plus comme l'illustre le tableau IV-18 la proportion d'aberrations pour chaque classe de complexité est 2 à 3 fois plus grande à 350 eV qu'à 250 eV.

On se propose dans le paragraphe suivant d'évoquer le rôle potentiel des événements de cœur dans l'induction d'aberration et d'en déduire quelques conséquences sur les mécanismes impliqués.

III – Discussion :

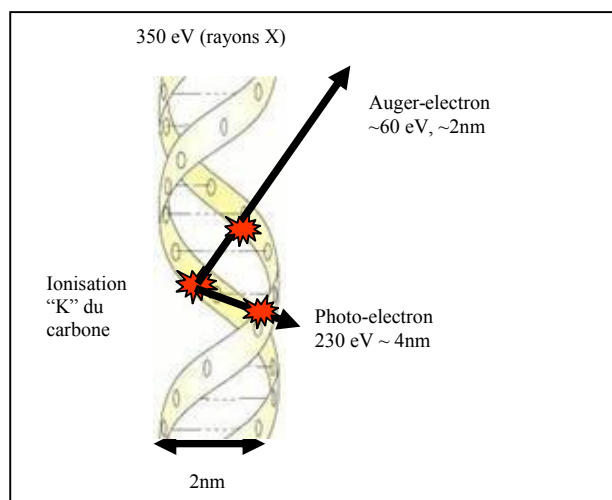
- *Rôle des événements K dans l'induction des aberrations d'échange et mécanismes possibles :*

La grande incertitude sur les pentes initiales des rendements de production des aberrations simples fait que nos résultats pourraient être en accord avec la sur-efficacité 350 eV/250 eV observée pour des cellules V79 mais ils ne permettent pas de la confirmer. Cependant nos résultats en aberrations d'échange montrent clairement une efficacité accrue à 350 eV par rapport à 250 eV pour induire des aberrations d'échange complexes. Ce résultat n'avait jamais été observé jusque là.

Rappelons que les événements K sur l'ADN sont les seuls événements dont la production croît fortement (~ 2) lorsque l'énergie du rayonnement passe de 250 eV à 350 eV. Par ailleurs la linéarité des courbes de production d'aberrations complexes à basse dose pourrait laisser penser qu'un seul événement K serait capable d'engendrer une aberration complexe.

Les événements K ont la capacité d'induire des dommages complexes (figure IV-19) et éventuellement plusieurs cdb. Cependant, au vu de la trace courte des électrons associés, la probabilité que 2 cdb ou plus soient produites dans des chromosomes différents est probablement très faible. On peut donc se demander si la corrélation observée entre ionisation « K » et production d'aberrations complexes implique que des cdb sur un seul chromosome mais très complexes sont capables d'engendrer des aberrations très complexes.

Figure IV-19: Schéma d'induction de plusieurs cassures et dommages par des rayons X ultra-mous de 350 eV.



- *Sur-complexité des aberrations produites à 350 eV par rapport à celles produites à 250 eV :*

Bien que nous ne soyons pas en mesure pour l'instant de proposer une explication à la sur-complexité des aberrations produites à 350 eV par rapport à celles produites à 250 eV, nous pouvons rapprocher ce phénomène de l'observation récente que nous avons faite sur la réparabilité des cdb créées à ces deux énergies. Il apparaît en effet que les cdb produites à 350 eV sont beaucoup moins réparables que celles créées à 250 eV [67]. En effet si ~7% des cdb créées à 250 eV ne sont pas réparées à 2h, cette proportion monte à ~20% pour des cdb créées à 350 eV.

Chapitre V

Contribution

« K »

à l'inactivation cellulaire

induite par rayonnements de bas TEL

Contribution « K » à l'inactivation cellulaire induite par rayonnements de bas TEL (γ , électrons rapides)

L'équipe a mis en évidence une très forte corrélation entre les sections efficaces d'inactivation cellulaire par des ions de divers TEL et les sections efficaces d'ionisation en couche interne des atomes constitutifs de l'ADN. En outre, les expériences d'irradiation par des X ultra-mous décrites précédemment (voir chapitre II), ont montré la possibilité d'un rôle biologique majeur des événements d'ionisation en couche interne de l'ADN.

Si la contribution des événements de cœur sur l'ADN à l'inactivation cellulaire semble dénuée de toute ambiguïté pour les rayons X ultra-mous, le rôle de ces mêmes événements pour les rayonnements traditionnels (ions, γ , électrons rapides) est beaucoup plus délicat à mettre en évidence de par la rareté même de ces événements, quelques ‰ de l'ensemble des interactions. Pour estimer la contribution des événements «K» sur l'ADN à l'effet létal des rayonnements de bas TEL, nous avons utilisé les résultats d'une simulation Monte Carlo des interactions rayonnement-matière, effectuée en collaboration avec le laboratoire de Physique Moléculaire et des Collisions de Metz. Ce calcul et les étapes successives de son utilisation sont présentés ci après.

I – Principe du calcul de la contribution des événements « K » à la létalité des rayonnements de bas TEL

Le rayonnement de bas TEL considéré est celui d'électrons incidents de 100 keV. L'étude est ensuite étendue aux rayons γ . On utilise les données obtenues pour les cellules V79.

La contribution « K » à la létalité des électrons de 100 keV (C_K) est définie comme le rapport du nombre d'événements létaux par gray provenant des événements « K » sur l'ADN au nombre total d'événement létaux par gray expérimental.

Le nombre d'événements létaux expérimental par gray, $\eta_{\text{létal.exp}}$, est extrait de la dose correspondant à 1/10 de survie, $D_{1/10}$.

On rappelle que la probabilité de survie P_{survie} pour une population de cellules est donnée par une statistique de Poisson : $P_{\text{survie}} = e^{-\eta_{\text{létal}} \times D}$ où D est la dose, $\eta_{\text{létal}}$ le nombre d'événements létaux par cellule et par unité de dose.

$$\text{On a donc } \eta_{\text{létal}}(D) = -\frac{\ln(P_{\text{survie}})}{D}.$$

Si l'on prend l'EBR d'un rayonnement, $EBR_{\text{Ray.}}$, par rapport au rayonnement du ^{60}Co comme référence, celui-ci est défini comme suit :

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

Une valeur moyenne de $D_{1/10}({}^{60}\text{Co}) = 7,2$ Gy est généralement adoptée, on a donc :

$$D_{1/10} = \frac{7,2}{EBR}.$$

Le nombre d'événement létal /Gy expérimental devient :

$$\eta_{\text{létal.exp}} = \frac{\ln(1/10)}{D_{1/10}} = \frac{2,3 \times EBR_{\text{Ray.}}}{7,2}.$$

Pour les électrons de 100 keV, l'EBR est $\sim 0,9$ [92], donc :

$$\eta_{\text{létal.exp}}^{100\text{keV}} \approx 0,28$$

Le nombre moyen d'événements létaux par gray provenant d'événements « K » sur l'ADN peut s'exprimer pour sa part par :

$$\eta_{\text{létal.K}} = \sum_i \eta_{K_i} \times \langle \varepsilon_{\text{lét}}^i(E) \rangle \quad \text{équation (3)}$$

où η_{K_i} est le nombre d'événements de coeur par gray pour l'espèce i considérée, et $\langle \varepsilon_{\text{lét}}^i(E) \rangle$ l'efficacité létale moyenne relative aux événements de coeur de l'espèce i . (On appelle efficacité létale d'un événement sa probabilité d'entraîner la mort de la cellule).

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

$$C_K = \frac{\sum_i \eta_{K_i} \times \langle \varepsilon_{\text{lét}}^i(E) \rangle}{0,28}$$

Le calcul des η_{K_i} est détaillé en section II et celui des $\langle \varepsilon_{\text{lét}}^i(E) \rangle$ en section III.

II – Calcul des nombres d'événements « K » sur l'ADN par gray :

II.1 – Principe du calcul :

On peut simuler relativement facilement par technique Monte-Carlo les interactions produites par la trace d'un rayonnement en milieu homogène.

Notre calcul consiste donc à évaluer le nombre moyen d'événements « K » créés par 1 Gy d'électron de 100 keV dans une masse d'eau donnée et à en déduire le nombre d'événements « K » sur l'ADN par l'application d'un facteur de proportionnalité reflétant les nombres d'atomes en présence et leurs capacités relatives à être ionisés en couche interne.

Remarquons tout d'abord que pour un noyau de cellule V79 (avec un masse $M_{\text{noyau}}=289$ pg [93]) 1 gray d'électron de 100 keV correspond à un nombre d'électrons absorbés égal à :

$$N_e = \frac{1 / 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ (eV / kg)} \times 289 \cdot 10^{-15} \text{ (kg)}}{100 \cdot 10^3 \text{ (eV)}} = 18.1$$

II.2 – Caractéristiques du calcul Monte Carlo utilisé pour évaluer le nombre d'ionisations en couche interne créées par un électron de 100 keV tout le long de sa trajectoire :

Le caractère aléatoire de la propagation d'une particule qui traverse un matériau biologique ne peut être décrit de manière déterministe.

- L'interaction entre la particule ionisante et le milieu biologique est décrite en termes de collisions binaires avec des molécules d'eau : les distributions angulaires et énergétiques des électrons éjectés sont évaluées à partir des sections efficaces différentielles correspondantes.

- L'eau est supposée se présenter sous sa phase vapeur, les sections efficaces triplement, voire quintuplement différentielles étant très bien connues dans cette phase. Une correction de densité est toutefois apportée en imposant une masse volumique : $\rho_{\text{eau}}=1\text{g.cm}^{-3}$, caractéristique de la phase liquide.

- Les trajectoires des électrons (primaires et secondaires) sont suivies jusqu'à ce qu'ils aient une énergie cinétique inférieure au premier potentiel d'ionisation de l'eau (12,63 eV en phase gazeuse). Ici toutefois ce sont les énergies des orbitales électroniques connues pour l'eau liquide qui ont été utilisées.

II.3 – Principe du calcul du nombre d'événements «K» sur l'ADN produits dans des cellules soumises à une irradiation de 1Gy en électrons de 100 keV :

Soit N_K le nombre total d'événements «K» produits le long de la trace d'un électron de 100 keV dans de l'eau. Le rendement η_K d'événements «K» sur l'ADN par gray d'électrons de 100 keV absorbé dans le noyau est extrait du nombre $N_e \times N_K$ d'événements «K» –produit par les électrons de 100 keV dans le volume d'eau équivalent au noyau cellulaire–, corrigé des abondances relatives des atomes dans l'ADN et dans le noyau, pondérées des sections efficaces d'ionisation «K» respectives.

En appelant n_C , n_N , n_O , n_P , n_{Na} les nombres d'atomes des différentes espèces dans l'ADN et N_{H_2O} le nombre de molécules d'eau dans le volume équivalent au noyau (voir tableau V-1), le rendement d'événements «K» par gray absorbé dans la cellule est :

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

où σ_K^C , σ_K^N , σ_K^O , σ_K^P , σ_K^{Na} sont les sections efficaces d'ionisation en couche interne des atomes de carbone, azote, oxygène, phosphore et sodium par des électrons primaires et secondaires à l'énergie E. La moyenne de la formule ci-dessus est faite sur toutes les énergies au cours du ralentissement des particules primaires et des particules des générations suivantes. Le calcul ci-dessus est effectué pour une cible d'ADN sec sans la première couche d'hydratation. Bien que des ionisations dans cette couche participent aux effets directs [94] ils ont en effet une faible probabilité d'induire des cassures double-brin [95].

On peut définir $\eta_{\kappa i}$, le nombre d'événements «K» pour l'espèce atomique i :

$$\eta_{\kappa i} = N_e \times N_K \times \frac{n_i}{N_{H_2O}} \times \left\langle \frac{\sigma_K^i(E)}{\sigma_K^O(E)} \right\rangle$$

Tableau V-1 : Nombres d'atomes des différents éléments constituant l'ADN et d'un volume d'H₂O de masse égale à celle du noyau, n_i avec $i = C, N, O, P, Na$ ($m_{H_2O}=18g$).

type d'élément	nombre d'atomes
eau	$N_{H_2O} = \frac{M_{noyau}}{m_{H_2O}} \times 6,02.10^{23} = 9,6.10^{12}$
carbone	$n_C = 7,82.10^{10}$
oxygène	$n_O = 1,12.10^{11}$
azote	$n_N = 3,88.10^{10}$
phosphore	$n_P = 1,04.10^{10}$
sodium	$n_{Na} = 0,57.10^{10}$

Les rapports de sections efficaces de l'équation (4) ont été déterminés dans la partie linéaire décroissante des courbes de sections efficaces en fonction de l'énergie, qui correspond à la gamme d'énergie moyenne des électrons mis en jeu lors de l'interaction d'électrons de 100 keV sur des molécules d'eau (voir chapitre I). On a utilisé la théorie de Kim relativiste [97] dont les prédictions reproduisent les résultats expérimentaux à mieux que 5% près. Les différents rapports $\left\langle \frac{\sigma_K^i}{\sigma_K^O} \right\rangle$ sont présentés dans le tableau V-2. Les rapports sont donnés par électron et par couche. Pour le phosphore il s'agit de la couche L avec 8 électrons ce qui explique le facteur 4 dans l'équation (4).

Tableau V-2 : Rapports moyens des sections efficaces d'ionisation en couche j (K ou L) des atomes i de l'ADN : σ_j^i , par rapport à celle en couche K de l'oxygène : σ_K^O .

$\langle \frac{\sigma_K^C}{\sigma_K^O} \rangle$	$\langle \frac{\sigma_K^N}{\sigma_K^O} \rangle$	$\langle \frac{\sigma_L^P}{\sigma_K^O} \rangle$	$\langle \frac{\sigma_K^O}{\sigma_K^O} \rangle$
1,97	1,34	4,15	1

II.4 – Valeurs du nombre, N_K , d'événements «K» créés lors du ralentissement d'un électron de 100 keV dans l'eau, et du rendement η_K sur l'ADN :

Les valeurs de N_K ont été calculées par deux codes différents : TILDA pour l'eau gazeuse et TRACELE pour l'eau liquide.

Le code TILDA a été développé dans notre équipe et dans le laboratoire de Metz [64]. Pour des énergies cinétiques d'électrons en dessous de 10 keV, il est maintenant pourvu de sections efficaces d'ionisations théoriques sophistiquées [96] tenant compte des interactions électron–projectile et électron–cible dans les voies respectives d'entrée et de sortie. Les sections efficaces simples et doublement différentielles calculées sont en bon accord avec les données expérimentales. Pour des électrons de haute énergie, les sections efficaces de Kim relativistes [97] ont été utilisées.

Le code TRACELE est relatif à l'eau liquide et est décrit en détail dans [98]. Les sections efficaces d'ionisations sont celles de Rudd [99] adaptées pour la phase liquide et sont valables pour des électrons jusqu'à 150 keV.

Le tableau V-3 présente les prédictions des deux codes en ce qui concerne le nombre d'événements de cœur créés par un électron de 100 keV le long de son parcours dans l'eau.

Tableau V-3 : nombre d'événements «K» créés dans l'eau par un électron de 100 keV.

code	N_K	$N_{K \text{ primaires}}$	$N_{K \text{ secondaires}}$
TILDA	8	7,6	0,4
TRACELE	9,4	8,5	0,9

Ces codes permettent également de calculer le potentiel moyen de création de paire d'ions (W_{ip}) pour différentes énergies. Les résultats obtenus en particulier pour un électron de 100 keV sont en bon accord avec les données de la littérature, ce qui confirme la fiabilité de ces codes.

Le tableau V-4 présente les différents rendements d'événements «K» sur l'ADN par gray d'électrons de 100 keV calculés comme indiqué en II.3 (équation 4) à partir des prédictions des codes TILDA et TRACELE.

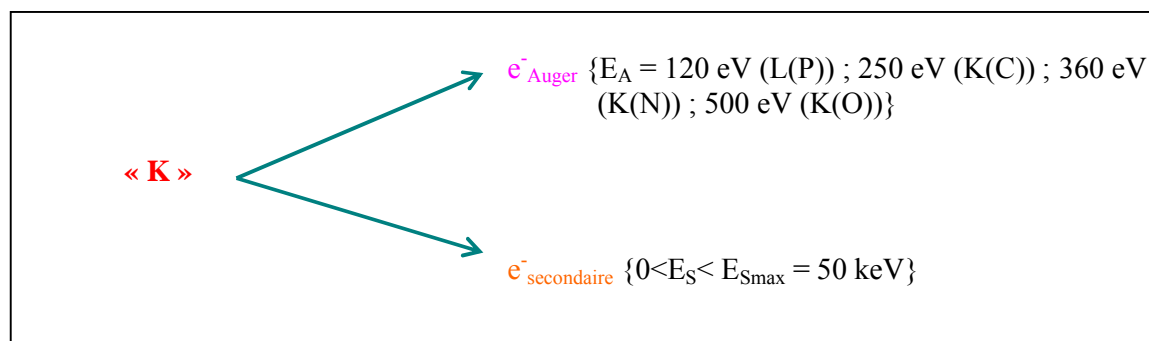
Tableau V-4 : rendements d'événements «K» sur l'ADN par gray d'électrons de 100 keV calculés à partir des codes TILDA et TRACELE et de l'équation (4).

code	η_K^C	η_K^N	η_K^O	η_L^P	η_K^P	η_K^{Na}	η_K
TILDA	3,4	0,9	1,2	2,6	0,05	0,10	8,1
TRACELE	4,0	1,1	1,4	3,0	~0	~0	9,5

III – Calcul des efficacités létales moyennes des événements de cœur créés par des électrons de 100 keV le long de leur trajectoire :

La structure des événements « K » produits par des électrons rapides est représentée par le schéma de la figure V-5 :

Figure V-5 : schéma de la structure des événements « K » produits par des électrons rapides.
 E_A : énergie des électrons Auger. E_S : énergie des électrons secondaires.



Alors que les électrons Auger ont des énergies bien définies (voir figure V-5) les électrons secondaires ont une distribution de probabilité continue proche d'une loi en $\frac{1}{E_s^2}$, donnée par la théorie de Kim [97].

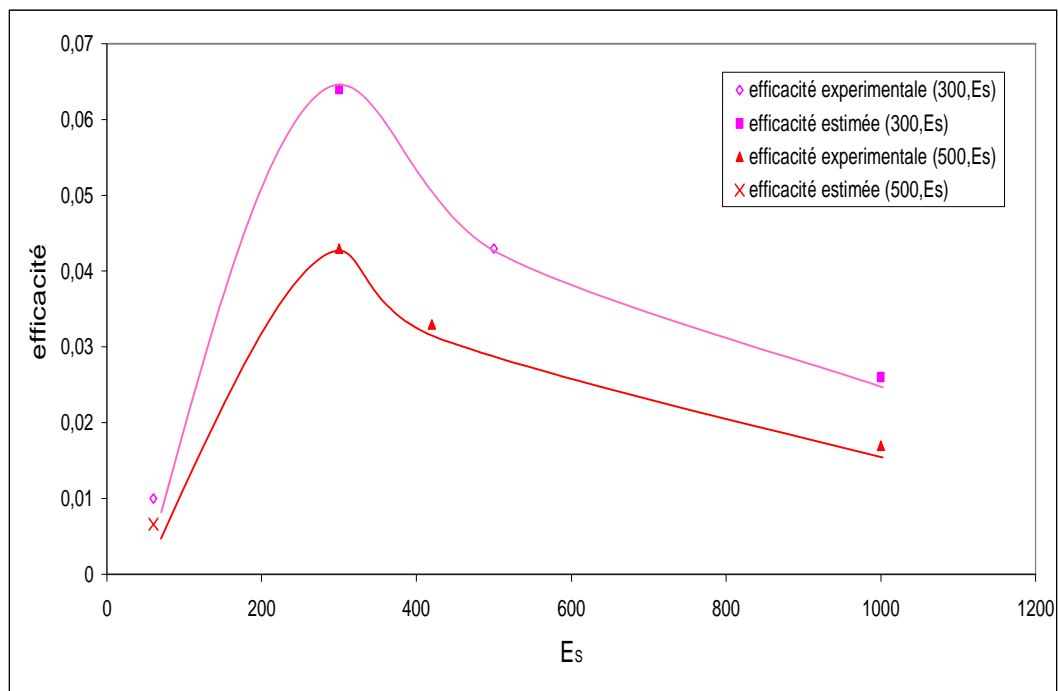
L'efficacité létale moyenne pour une ionisation de cœur dans l'espèce i est aussi définie par

$$\langle \varepsilon_{lét}^i \rangle = \frac{\int \varepsilon(E_A, E_s) \frac{d\sigma}{dE_s} dE_s}{\int \frac{d\sigma}{dE_s} dE_s}$$

où les $\frac{d\sigma}{dE_s}$ sont les sections efficaces différentielles de Kim pour l'énergie initiale moyenne de l'électron.

Dans cette formule les efficacités $\varepsilon(E_A ; E_s)$ adoptées sont celles représentées sur la figure V-6.

Figure V-6 : efficacités $\varepsilon(E_A ; E_s)$. Les deux courbes correspondent respectivement aux ionisations « K » du carbone ($E_A \sim 300$ eV) et de l'Oxygène ($E_A \sim 500$ eV).



Les points expérimentaux de la figure V-5 représentent les efficacités létales mesurées pour des événements « K » types créés par les rayons X ultra-mous. Ces dernières sont extraites des EBR expérimentales et des nombres d'événements « K » sur l'ADN selon un procédure détaillée en [2 ;4], leurs valeurs sont reportées dans le tableau V-7

Tableau V-7 : Efficacités létales expérimentales d'événements « K » types par rayons X. Nous avons indiqué entre parenthèses pour chaque énergie le couple (E_A ; $E_{photo\text{-}électron}$) correspondant à l'énergie de l'électron Auger émis et à l'énergie du photoélectron éjecté.

E	références	ε (E)
~278 eV (145 ; 115)	M. R. Raju et al. <i>Radiat. Res.</i> 110 ,369-412 (1987) K.M.S. Townsend et al. <i>Int. J. Radiat. Biol.</i> 58 499-508 (1990) D. T. Goodhead et al. <i>Radiat. Prot. Dosim.</i> 31 343-350 (1990) C.M. de Lara et al. <i>Radiat. Res.</i> 155 , 440-448 (2001)	1,1%
350 eV (250 ; 60)	B. Fayard et al. <i>Radiat. Res.</i> 157 ,128-40 (2002).	1,0%
~850 eV (500 ; 310)	P. O'Neill et al. <i>Photo-Opt. Instrum. Eng.</i> 1140 232-236 (1989) C.K. Hill et al. <i>Radiat. Res</i> 150 513-520 (1998) F. Gobert, Thèse Paris (2003)	4,3%
960 eV (500 ; 420)	S.W. Botchway et al. <i>Radiat. Res.</i> 148 317-324 (1997)	3,2%
1490 keV (500 ; 960)	R. Cox et al. <i>Int. J. Radiat. Biol.</i> 31 , 561-576 (1977) M. R. Raju et al. <i>Radiat. Res.</i> 110 ,369-412 (1987) S.W. Botchway et al. <i>Radiat. Res.</i> 148 317-324 (1997)	2,9% (1,7% après les corrections indiquées p 158)

Le tableau V-8 résume les différentes efficacités létales moyennes des événements de cœur dans les différents atomes de l'ADN.

Tableau V-8 : Efficacités létales moyennes des I.C.I dans les atomes i de l'ADN.

Type d'ionisation (i)	E_A : Energie des électrons Auger (eV)	Energie médiane des électrons secondaires (eV)	$\langle \varepsilon_{lét}^i(E) \rangle$
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%

On notera qu'une fraction des événements « K », créés en fin de trace des électrons secondaires (évaluée à ~3% d'après la simulation Monte-Carlo) est plus complexe en raison

du grand pouvoir ionisant qu'a alors lui-même l'électron secondaire. Le cas rappelle celui des ions pour lesquels on avait évalué [2] que l'efficacité létale des événements « K » pouvait être multipliée par un facteur compris entre 2 et 5 (donc 3,5 en moyenne). Ce phénomène accroît en moyenne de 7% les $\langle \varepsilon_i \rangle$ présentées en V-6.

IV – Contribution des événements de cœur à l'inactivation cellulaire :

Le tableau V-9 présente pour des électrons de 100 keV et des photons d'environ 1 MeV les nombres calculés d'événements létaux provenant d'événements « K » sur l'ADN, ainsi que les nombres d'événements létaux expérimentaux.

Dans le cas des photons on a utilisé le nombre d'événement « K » sur l'ADN par gray publié dans [100] (code PARTRACK).

Tableau V-9 : nombres calculés d'événements létaux provenant d'événements et nombres expérimentaux d'événements létaux pour les rayonnements de bas TEL.

code	$\eta_{\text{létal.K}}$	$\eta_{\text{létal.exp}}$
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 de cœur aux effets biologiques des rayonnements de bas

TEL, est donnée par le rapport $C_K = \frac{\eta_{\text{létal.K}}}{\eta_{\text{létal.exp}}}$

Pour la lignée cellulaire considérée (cellules V79 de hamster chinois) on voit que la contribution « K » à l'inactivation cellulaire est donc ~ 75%.

Conclusion

Conclusion

Dans ce travail nous avons exclusivement utilisé un support cellulaire humain. Nous avons reproduit avec les cellules B3, les résultats établis auparavant en cellules de mammifère.

Pour l'irradiation en ions lourds, on retrouve en particulier le comportement paradoxal des sections efficaces d'inactivation cellulaire qui décroissent alors que le TEL des ions, lui, continue de croître.

L'irradiation en rayonnement X ultra-mou a, quant à elle, de nouveau mis en évidence la forte sur-efficacité biologique pour l'inactivation cellulaire et pour la production d'aberrations chromosomiques particulières, à 350 eV par rapport à 250 eV. On rappelle que les ionisations en couche interne de l'ADN sont les seuls événements subissant un fort accroissement de production au passage du seuil K du carbone.

Ces résultats confortent l'hypothèse du modèle de cœur dans lequel les ionisations en couche interne des atomes de la matière biologique sont considérées comme les événements physiques critiques à l'origine des effets biologiques des rayonnements ionisants.

L'importance des événements « K » en radiobiologie, déjà montrée par Penhoat (1997), Fayard (1999) et Gobert (2003) est ainsi confirmée.

Enfin nous avons montré la capacité des événements « K » à induire des aberrations d'échange complexes et tout particulièrement pour ceux produits à l'énergie 350 eV. Il apparaît qu'un seul événement « K », d'extension quelques nanomètres, est capable d'engendrer des aberrations impliquant au moins 4 chromosomes. La complexité des événements de cœur semble être responsable de cette capacité à engendrer des aberrations elles-mêmes complexes.

Il serait fortement intéressant de comparer les efficacités des rayons X mous et des rayonnements γ pour induire ces aberrations complexes.

Enfin l'étude de la contribution des événements « K » à l'inactivation cellulaire induite par les rayonnements usuels de bas TEL (électrons rapides, γ), montre que ces événements pourraient être responsables à hauteur de 75% de l'inactivation cellulaire. Ainsi la forte contribution « K » à l'inactivation cellulaire induite par rayonnements ionisants semble désormais acquise, quel que soit le type de rayonnement.

Dans l'avenir il serait intéressant d'étudier le rôle éventuel des événements de cœur dans l'induction d'aberrations dites 'retardées'. En effet ces événements, de par leur capacité à produire des dommages étendus et peut-être même des clusters de cdb, pourraient bien induire des cassures de télomères, supposées être responsables de l'instabilité génomique.

Enfin l'étude de la complexité des cassures double-brin d'ADN induites par événements « K » et celle de leur réparabilité apportera des renseignements précieux sur les mécanismes en jeu.

Des études physiques sur la fragmentation moléculaire de l'ADN induite par ionisation en couche interne sont elles aussi nécessaires. Il faudra en effet investiguer en détail le mode d'action des événements « K » pour comprendre leur spécificité à induire des effets biologiques.

Les rayons X ultra-mous constituent une sonde incontournable des événements de cœur et ils apparaissent maintenant comme une voie majeure d'étude des effets biologiques des rayonnements ionisants, bien que l'utilisation d'autres types de rayonnements comme les ions lourds puisse apporter des renseignements complémentaires importants.

A plus long terme, une application thérapeutique est envisageable. La thérapie par incorporation dans l'ADN d'atomes lourds photo-ionisés au seuil K entre en effet dans le champ des applications possibles. Mais il reste à identifier et caractériser pleinement les mécanismes d'action des événements « K ».

Annexe

ANNEXE

Cette annexe présente sous forme de fiches, les protocoles et techniques biologiques spécifiques utilisés lors de cette étude.

Les protocoles d'hybridation des télomères (PNA) et de tous les chromosomes (mFISH) ont été adaptés pour le support cellulaire humain B3.

Les autres techniques auxquelles on a eu recours pour ce travail sont couramment utilisées dans le laboratoire LRO du CEA. On ne reviendra donc pas en détail sur les protocoles correspondants.

A - Protocole PNA :

Pour procéder à l'hybridation des télomères par méthode PNA, on sort les lames – éventuellement congelées– la veille de la manipulation. On délimite la zone à hybrider après repérage de la localisation des métaphases.

– On commence par un rinçage des préparations chromosomiques sur lames, de 5 minutes dans un bain de PBS 1x à température ambiante.

– Une étape de fixation de l'ADN a ensuite lieu dans un bain de formaldéhyde à 4% à température ambiante pendant 2 minutes, (on utilise de la formaldéhyde à 37% diluée dans du PBS).

– On rince ensuite successivement les lames des préparations chromosomiques dans trois bains de PBS 1x pendant 5 minutes chacun à température ambiante.

– L'étape de digestion des protéines s'effectue par l'action de la pepsine pendant 8 minutes à 37°C en chambre humide. On utilise la pepsine à 0,5 mg/mL diluée dans du HCl 0,1N (pH~2). On dispose environ 200µL de pepsine par lame, cette dernière est recouverte d'une lamelle en verre.

L'action de la pepsine est très délicate puisqu'elle 'mange' littéralement les chromosomes. Afin d'éviter d'avoir une mauvaise préparation, en plus de l'ajustement de la concentration et du temps d'action de cette dernière, on préchauffe la boîte où sont déposées les lames pendant le traitement à 37°C, permettant ainsi d'obtenir un compromis entre un temps d'action limité de la pepsine et une correcte digestion des protéines.

– On lave ensuite les lames de façon brève et délicate dans du PBS 1x à température ambiante pour retirer la lamelle.

– On réitère l'étape de fixation dans le bain de formaldéhyde à 4 % (2 minutes à température ambiante), ainsi que le rinçage dans trois bains de PBS 1x (3 minutes à température ambiante).

– On déshydrate ensuite l'ADN des chromosomes en plaçant les lames dans des bains successifs de 5 minutes d'éthanol à 50-75 et 100%, placés dans la glace.

– Les lames sèchent ensuite pendant au moins 10 minutes.

Il convient ensuite de travailler à l'obscurité.

– Pour le marquage de l'ADN par la sonde PNA (labellée au Cy3) on dépose ~30µL de sonde PNA à 0,3 µg/mL sur chaque lame à hybrider et on recouvre le tout d'une lamelle plastique. La dilution de la sonde s'effectue dans un tampon (formamide 70% + Blocking Reagent 1%).

– La **dénaturation de la sonde et des chromosomes** s'effectue en même temps, par élévation de la température en disposant les lames sur une plaque chauffante à 80°C pendant 3 minutes (à l'obscurité).

– L'**hybridation** a lieu pendant 2 h à température ambiante dans une boîte en plastique à l'abri de la lumière.

– On retire ensuite le film plastique et l'on effectue deux **premiers bains de rinçage** d'un mélange de formamide 70%, Tris 10mM (pH 7,2) dilué dans de l'eau. Ces rinçages durent ~15 minutes à température ambiante.

– On rince de nouveau les lames dans trois bains d'un mélange de Tris 50mM (pH 7,2), NaCl 0,15M et de Tween20 à 0,05% dilué dans de l'eau. Ces rinçages durent 5 minutes chacun à température ambiante.

– Pour terminer on rince les lames dans un bain de PBS 1x à température ambiante pendant 5 minutes.

– La **coloration au DAPI** s'effectue par trempage des lames dans un bain de DAPI de concentration initiale 1mg/mL dilué au 1/1000^{ème} dans de l'eau ou du PBS, pendant environ 3 minutes.

– On rince les lames dans un bain de PBS 1x et l'on ajoute une goutte d'une solution visqueuse d'antifading (PPD) sur la zone hybridée. On applique ensuite par dessus une lamelle en verre en éliminant les éventuelles bulles d'air. Les lames hybridées sont prêtes à être analysées. Il est d'usage de laisser les lames à l'obscurité au réfrigérateur pendant 30 minutes avant la capture des fluorochromes au microscope.

B - Protocole mFISH :

On présente ici le protocole lié à l'hybridation mFISH. On considère qu'il y a déjà eu une hybridation PNA. L'étape de prétraitement de l'ADN chromosomique pour la digestion des protéines par la pepsine est ainsi déjà effectuée. L'hybridation mFISH commence donc pour notre étude par la dénaturation de l'ADN et de la sonde.

La capture des métaphases avec leurs télomères étant effectuée, on peut repérer la meilleure zone à hybrider.

Jour 1

Après avoir sélectionné les lames et repéré une éventuelle zone préférentielle à hybrider, on met les lames dans un Coplin Jar de PBS 1x afin de les débarrasser des huiles et du PPD résiduels et pour pouvoir retirer délicatement la lamelle en verre utilisée lors des précédentes hybridations.

1. Dénaturation de l'ADN chromosomique

- L'étape de dénaturation commence par un rinçage à température ambiante dans un bain de SSC 0,1x pendant 1 minute.
- On incube ensuite les lames dans un bac de SSC 2x à 70°C au bain-marie pendant 30 minutes.
- On sort le bac du bain-marie et on laisse refroidir à 37°C pendant environ 30 minutes.
- On effectue ensuite une étape de lavage dans un bain de SSC 0,1x à température ambiante pendant 1 minute.
- La dénaturation des chromosomes s'effectue dans un bain de 0,07N NaOH à température ambiante pendant 1 minute.

- On réalise ensuite deux bains de SSC, à 4°C , pendant 1 minute chacun ; l'un de 0,1x et l'autre de 2x.
- On déshydrate ensuite l'ADN des lames dans 4 bains d'éthanol successivement à 30-50-70 et 100% pendant 1 minute chacun à température ambiante.
- On laisse ensuite sécher les lames pendant au moins 10 minutes.

1bis. Dénaturation de la sonde et hybridation

La dénaturation de la sonde démarre en même temps que celles des chromosomes –de telle sorte que la sonde dénaturée soit prête pour l'hybridation lorsque les lames avec l'ADN dénaturé seront sèches (soit environ ¼ h après le bain à 70°C de SSC 2x). On dispose du 'cocktail-sonde' dans un petit tube prévu à cet effet (on en prévoit ~10µL par lame à hybrider).

- La sonde est dénaturée pendant 5 minutes dans un bain-marie à 75°C.
- On incube ensuite la sonde à 37°C pendant 30 minutes.
- Afin de récupérer tout le 'cocktail-sonde' homogène, on agite légèrement le tube.
- On étale par petite goutte ~10µL de sonde dénaturée et préhybridée sur les lames dénaturées sèches.
- On recouvre le frottis d'un lamelle en plastique en s'assurant de ne pas avoir de bulle d'air résiduelle.
- L'incubation des lames se fait en chambre humide à 37°C pendant 3 jours (3 nuits). Les lames sont disposées sur du polystyrène dans une boîte étanche humidifiée avec un tampon de formamide à 50%.

Jour 4

2. Lavage post-hybridation des lames

Après la période d'hybridation, on procède à une série de lavage des préparations chromosomiques hybridées.

– On retire très délicatement la lamelle en plastique recouvrant les lames, puis on effectue un rinçage des lames dans un bac de 1xSSC dans un bain-marie à 75°C pendant 5 minutes.

– Les lames sont ensuite incubées pendant 5 minutes dans un bain de SSCT 4x à température ambiante (le SSCT est du SSC avec 0,05% de Tween20).

3. Détection de la sonde labellée avec la biotine (Cy5) - (AVD\Cy5) -

Une fois l'étape de rinçage effectuée, tous résidus de sonde et fragments aspécifiques étant éliminés, il reste à révéler le cinquième colorant de la sonde mFISH labellée avec la biotine et le fluorochrome Cyanine 5 (Cy5).

– On fait agir du Blocking Reagent (BR) pendant 15 minutes à 37°C. On utilise 50µL de BR par lame, cette dernière est recouverte d'une lamelle en plastique.

– On rince ensuite brièvement les lames dans un bain de SSCT 4x après avoir retiré la lamelle en plastique.

La détection qui suit est réalisée en 3 étapes indiquées ci-dessous.

Etape 1 :

– Sur chaque lame, on dépose un mélange de 50µL contenant 49µL de BR et 1µL du cocktail n°1. Les lames recouvertes d'une lamelle en plastique sont ensuite placées pendant 30 minutes à 37°C.

– On lave ensuite les lames par deux bains successifs de SSCT 4x pendant 3 minutes chacun à température ambiante, en remuant.

Etape 2 :

– Sur chaque lame, on dépose un mélange de 50 μ L contenant 48 μ L de BR et 2 μ L du cocktail n°2. Les lames recouvertes d'une lamelle en plastique sont ensuite placées pendant 30 minutes à 37°C.

– On lave ensuite les lames par deux bains successifs de SSCT 4x pendant 3 minutes chacun à température ambiante, en remuant doucement.

Etape 3 :

Cette étape est identique à l'étape 1.

Le cocktail n°1 est composé de molécules AVD affines à la biotine, couplées aux fluorochromes Cy5 (AVD\Cy5) qui se fixent à la partie de la sonde mFISH contenant la biotine. Le cocktail n°2 amplifie le marquage précédent à l'aide d'un anti-AVD (contenant de la biotine) qui se fixe de façon spécifique sur le couple AVD\Cy5. Les étapes 2 et 3 permettent d'obtenir une quantité plus importante de fluorochrome Cy5, ce qui facilite sa détection.

4. Contre-coloration

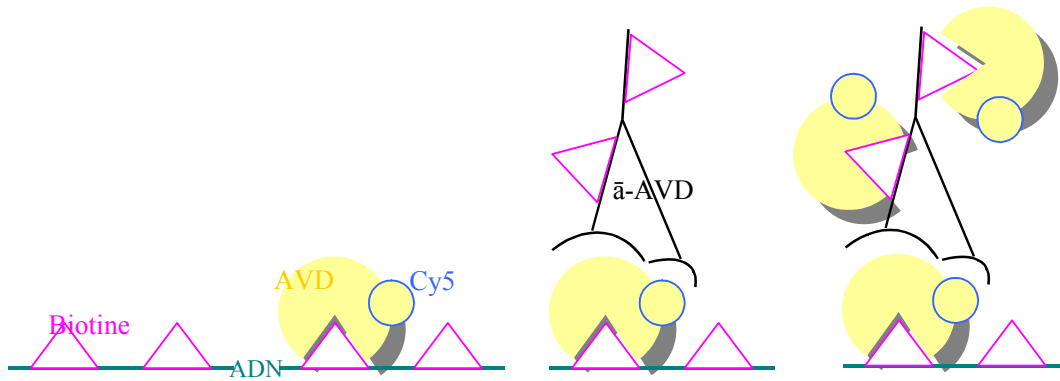
Une fois la sonde labellée avec la biotine (et le Cy5) détectée, on procède à une étape de rinçage des lames dans un bain de 1xPBS pendant 3 minutes à température ambiante.

On évacue ensuite un maximum d'eau des lames sans les sécher complètement, puis on contre-colore ces lames avec ~20 μ L de DAPI (en fait un mélange de DAPI\PPD pour éviter la détérioration des fluorochromes). On recouvre chaque lame d'une lamelle en verre.

Les lames sont ainsi prêtes pour la capture des fluorochromes. Si celle-ci n'est pas effectuée immédiatement on les stocke à -20°C.

On présente dans le schéma ci-dessous les étapes de la détection de la sonde labellée par la biotine et la Cy5.

Figure A-1 : Illustration de la détection du fluorochrome Cy5 par couplage du complexe AVD\Cy5 sur les molécules de biotine et amplification du signal.



Biotine déposée sur l'ADN après hybridation.

Etape 1 :
La molécule AVD couplée avec le fluorochrome Cy5 se fixe sur les molécules de biotine.

Etape 2 :
La molécule anti-AVD couplée avec la biotine se fixe sur le complexe AVD\Cy5.

Etape 3 :
Identique à l'étape 1

C - Protocole de fixation des cellules pour l'analyse au microscope confocal :

Les cellules doivent être confluentes et en monocouches. On utilise de la glutaraldéhyde à 2,5% (diluée dans du PBS 1x) pour la fixation.

Les cellules sont en culture dans les boîtes équipées d'une fenêtre de mylar.

- On enlève le milieu nutritif des boîtes de culture.
- On lave deux fois de suite les cellules avec du PBS 1x ;
- On ajoute la glutaraldéhyde et on laisse agir pendant ~1/2 heure.
- On retire ensuite la glutaraldéhyde et on lave deux fois de suite avec du PBS 1x.

Pour la conservation et l'hydratation des cellules fixées, on ajoute 5mL de PBS dans les boîtes de culture.

Bibliographie

Références bibliographiques

1. A. Chetioui, I. Despiney, L. Guiraud, L. Adoui, L. Sabatier and B. Dutrillaux; Possible role of inner shell ionization phenomena in cell inactivation by heavy ions, *International Journal of Radiation Biology* **65**(5) 511-522 (1994).
2. B. Fayard, A. Touati, F. Abel, M. A. Hervé du Penhoat, I. Despiney-Bailly, F. Gobert, M. Ricoul, A. L'Hoir, M. F. Politis, M. A. Hill, D. L. Stevens, L. Sabatier, E. Sage, D. T. Goodhead and A. Chetioui; Cell Inactivation and double-strand Breaks: The role of core ionizations, as probed by ultrasoft X rays, *Radiation Research* **157**(2) 128-140 (2002).
3. F-N. Gobert, M. Lamoureux, M.-A. Hervé du Penhoat, M. Ricoul, A. Boissière, A. Touati, F. Abel, M.-F. Politis, B. Fayard, J. M. Guigner, L. Martins, I. Testard, L. Sabatier and A. Chetioui; Chromosome aberrations and cell inactivation induced in mammalian cells by ultrasoft X-rays: correlation with the core ionizations in DNA, *International Journal of Radiation Biology*, **80**(2) 135-145 (2004).
4. Hervé du Penhoat MA, Fayard B, Abel F, Touati A, Gobert F, Despiney-Bailly I, Ricoul M, Sabatier L, Stevens DL, Hill MA, Goodhead DT, Chetioui A; Lethal effect of carbon K-shell photoionizations in Chinese hamster V79 cell nuclei: experimental method and theoretical analysis, *Radiation Research* **151**(6) 649-658 (1999).
5. Les Clefs du CEA ; Les rayonnements, l'ADN et la cellule, *Commissariat à l'Énergie Atomique*, n°**43** (2000).
6. C. Champion : Structure des dépôts d'énergie des ions rapides dans l'eau. Application à l'étude par Monte Carlo de l'inactivation cellulaire ; Doctorat en Sciences, *Université Denis Diderot*, Paris (1999).
7. M.R.C Mc Dowell and J.P. Coleman; Introduction to the theory of ion collision, *North Holland* (1970).
8. S. Uehara, H. Nikjoo and D.T. Goodhead; Comparison and assessment of electron cross sections Monte Carlo track structure codes, *Radiation Research* **152** 202-213 (1999).
9. R.K. Sachs, A.M. Chen, D.J. Brenner; Review: Proximity effects in the production of chromosome aberrations by ionizing radiation, *International Journal of Radiation Biology* **71**(1) 1-19 (1997).
10. Michael E. Dresser; Review: Meiotic chromosome behavior in *Saccharomyces cerevisiae* and (mostly) mammals, *Mutation Research (Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis)* **451**(1-2) 107-127 (2000).
11. G.J. Vanasse, P. Concannon, DM Willerford; Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage, *Blood* **94**(12) 3997-4010 (1999).
12. C. Richardson and M. Jasin; Frequent chromosomal translocation induced by DNA double-strand breaks, *Nature* **405** 697-700 (2000).

13. G.K. Dasika et al., DNA damage-induced cell cycle check points and DNA strand break repair in development and tumorigenesis ; *Oncogene* **18** 7883-7899 (1999).
14. T.T. Paull et al., A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage, *Curr. Biol.* **10** 886-895 (2000).
15. M. Takata et al., Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double strand breaks repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells, *EMBO J.* **17** 5497-5508 (1998).
16. C. Richardson and M. Jasin; Coupled homologous and non-homologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells, *Mol. Cell. Biol.* **20** 9068-9075 (2000).
17. R.D. Johnson and M. Jasin; Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells, *EMBO J.* **19** 3398-3407 (2000).
18. D.C. van Gent, J.H.J. Hoeijmakers, R. Kanaar; Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection, *Nature Review Genetics* **2** 196-206 (2001).
19. Y. Liu and N. Maizel; Coordinated response of mammalian Rad51 and Rad52 to DNA damage, *EMBO J.* **1** 85-90 (2000).
20. W. Wang et al., Possible association of BLM in decreasing DNA double strand breaks during DNA replication, *EMBO J.* **19** 3428-3435 (2000).
21. M.P. Cooper et al., Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein, *Genes Dev.* **14** 907-912 (2000)
22. S. Uhrig, S. Schuffenhauer, C. Fauth, A. Wirtz, C. Daumer-Haas, C. Apacik, M. Cohen, J. Mueller-Navia, T. Cremer, J. Murken, M.R. Speicher ; Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications, *Am. J. Hum. Gen.* **65** 448-462 (1999).
23. A.A. Edwards; The use of chromosomal aberrations in human lymphocytes for biological dosimetry, *Radiation Research* **148** S39-S44 (1997).
24. J.M. Coco Martin, E. Mooren, C. Ottenheim, W. Burrill, M.I. Nunez, D. Sprong, H. Bartelink, A.C. Begg; Potential of radiation-induced chromosome aberrations to predict radiosensitivity in human tumour cells, *International Journal of Radiation Biology* **75** 1161-1168 (1999).
25. D. Brenner; Track structure, lesion development, and cell survival, *Radiation Research* **124** S29-S37 (1990).
26. R.K. Sachs, D. Levy, A.M. Chen, P.J. Simpson, M.N. Cornforth, E.A. Ingerman, P. Hahnfeldt, L.R. Hlatky; Random breakage and reunion chromosome aberration formation model; an interaction-distance version based on chromatin geometry, *International Journal of Radiation Biology* **76** 1579-1588 (2000).

27. G.E. Watson, S.A. Lorimore, D.A. Macdonald, E.G. Wright; Chromosomal instability in unirradiated cells induced in vivo by a bystander effect of ionizing radiation, *Cancer Res.* **60** 5608–5611 (2000).
28. L. Hlatky, R.K. Sachs, M. Vazquez, and M.N. Cornforth; Review: Radiation-induced chromosome aberrations: insight gained from biophysical modelling, *BioEssays* **24**(8) 714-723 (2002).
29. J.R.K. Savage; Enhanced perspective: proximity matters, *Science* **290** 62-63 (2000).
30. M.N. Cornforth; Review: Analyzing radiation-induced complex rearrangement by combinatorial painting, *Radiation Research* **155** 643-659 (2001).
31. R. Karthu et al., Chromosome arm-specific multicolour FISH, *Genes Chrom. Cancer.* **30** 105-109 (2001).
32. J.R.K. Savage; A brief survey of aberration origin theories, *Mutation Research (Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis)* **404** 139-147 (1998).
33. A.A. Edwards; Modelling radiation-induced chromosome aberrations, *International Journal of Radiation Biology* **78**(7) 551-558 (2002).
34. J.R.K. Savage and D. Papworth; The relationship of radiation-induced dicentric yield to chromosome arm number, *Mutation Research (Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis)* **19** 139-143 (1973).
35. T. Cremer and C. Cremer; Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells, *Nature review Genetics* **2** 292-301 (2001).
36. P. Edelmann, H. Bornfleth, D. Zink, T. Cremer and C. Cremer; Morphology and dynamics of chromosome territories in living cells, *Biochimica et Biophysica Acta* **1551** M29-M40 (2001).
37. W. Friedland, P. Jacob, H.G. Paretzke, M. Merzagora, A. Ottolenghi; Simulation of DNA fragment distributions after irradiation with photons, *Radiation Environ. Biophys.* **38** 39-47 (1999).
38. A. Chatterjee, W. Holley, B. Rydberg, S. Mian, R.D. Alexander; Theoretical modelling of DNA damages and cellular responses, *Physica Medica* **XVII**(S1) 59-61 (2001).
39. W.R. Holley, I.S. Mian, S.J. Park, B. Rydberg, and A. Chatterjee; A model for interphase chromosomes and evaluation of radiation-induced aberrations, *Radiation Research* **158** 568-580 (2002).
40. J.P. Day, C.L. Limoli, W.F. Morgan; Recombination involving interstitial telomere repeat-like sequences promotes chromosomal instability in Chinese hamster cells, *Carcinogenesis* **19** 259-266 (1998).

41. S. Knehr et al., Chromosome analysis by fluorescence in situ hybridization : further indications for a non-DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations, *International Journal of Radiation Biology* **70** 385-392 (1996).
42. S. Cigarrán et al., Relationship between the DNA content of human chromosomes and their involvement in radiation-induced structural aberrations, analysed by painting, *International Journal of Radiation Biology* **74** 449-455 (1998).
43. R.K. Sachs, A.M. Chen, P.J. Simpson, L. Hlatky, P. Hahnfeld, J.R.K. Savage; Clustering of radiation-produced breaks along chromosomes : modelling the effects on chromosome aberrations, *International Journal of Radiation Biology* **75** 657-672 (1999).
44. B.D. Loucas and M.N. Cornforth; Complex chromosome exchange induced by gamma rays in human lymphocytes: an mFISH study, *Radiation Research* **155** 660-671 (2001).
45. R.K. Sachs; P. Hahnfeld; D.J. Brenner; Review: The link between low-LET dose-response relations and the underlying kinetics of damage production/repair/misrepair, *International Journal of Radiation Biology* **72** 351-374 (1997).
46. F.A. Cucinotta, H. Nikjoo, P. O'Neill, D.T. Goodhead; Kinetics of DSB rejoining and formation of simple chromosome exchange aberrations, *International Journal of Radiation Biology* **76**(11) 1463-1467 (1999).
47. J.D. Chapman; Single-hit mechanism of tumour cell killing by radiation, *International Journal of Radiation Biology* **79**(2) 71-81 (2003).
48. J.J.W.A. Boei, S. Vermeulen, A.T. Natarajan; Analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using telomeric and centromeric PNA probes, *International Journal of Radiation Biology* **76** 163-167 (2000).
49. T. Radivoyevitch, D.G. Hoel, A.M. Chen, R.K. Sachs; Misrejoining of double-strand breaks after X irradiation: relating moderate to very high doses by a Markov Model, *Radiation Research* **149** 59-67 (1998).
50. D. Brenner, J. Ward, R. Sachs; Track structure, chromosome geometry and chromosome aberrations, *Basic Life Sciences* **63** 93-113 (1994).
51. J.J.W.A. Boei, S. Vermeulen, L.H.F. Mullenders, A.T. Natarajan; Impact of radiation quality on the spectrum of induced chromosome exchange aberrations, *International Journal of Radiation Biology* **77** 847-857 (2001).
52. L. Sabatier, W. Al Achkar, F. Hoffschir, C. Luccioni, B. Dutrillaux; Qualitative study of chromosomal lesions induced by neutrons and neon ions in human lymphocytes at G₀ phase, *Mutation Research* **178** 91-97 (1987).
53. R.J. Fry et al., The impact of biology on risk assessment-workshop of the National Research Council's board on radiation effects, *Radiation Research* **150** 695-705 (1998).

54. M.P. Little; A comparison of the degree of curvature in the cancer incidence dose-response in Japanese atomic bomb survivors with that in chromosome aberrations measured in vitro, *International Journal of Radiation Biology* **76** 1365-1375 (2000).
55. N.A.P. Franken et al., Correlation between cell reproductive death and chromosome aberrations assessed by FISH for low and high doses of radiation and sensibilization by iodo-deoxyuridine in human SW-1573 cells, *International Journal of Radiation Biology* **75** 293-299 (1999).
56. M. Baumann et al., The translational research chain: Is it delivering the goods? *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Physics* **49** 345-351 (2001).
57. D.T. Goodhead, J. Thacker and R. Cox; Is selective absorption of ultrasoft X-rays biologically important in mammalian cells? *Phys. Med. Biol.* **26**(6) 1115-1127 (1981).
58. D. T. Goodhead, and H. Nikjoo; Current status of ultrasoft X rays and track structure analysis as tools for testing and developing biophysical models of radiation action, *Radiat. Prot. Dosim.* **31** 343-350 (1990).
59. M. Scholz and G. Kraft; The physical and radiobiological basis of the Local Effect Model (L.E.M): A response to the commentary by R. Katz, *Radiation Research* **161** in press (2004).
60. R. Katz, R. Zacharia, F.A. Cucinotta, C. Zhang; Survey of cellular radiosensitivity parameters, *Radiation Research* **140** 316-365 (1994).
61. M. Scholz and G. Kraft; A parameter-free track structure model for heavy ion active cross sections, *Biophysical modelling of radiation effects* 185-192 (1992).
62. H. Nikjoo, P. O'Neill, D. T. Goodhead, and M. Terrissol; Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events. *International Journal of Radiation Biology* **71** 467-483 (1997).
63. Barbara Fayard : Cassures d'ADN induites par ionisation en couche interne et leurs conséquences biologiques ; Doctorat en Sciences, *Université Pierre et Marie Curie*, Paris (1999).
64. C. Champion, A. L'Hoir, M.F. Politis, A. Chetioui, B. Fayard, A. Touati; Monte-Carlo simulation of ion track structure in water: ionization clusters and biological effectiveness, *Nuclear Instrument sand Methods in Physics Research B* **146** 533-540 (1998).
65. Y. K. Kim and M. E. Rudd; Binary-encounter-dipole model for electron impact ionization, *Phys. Rev. A* **50** 3954-3967 (1994).
66. T. Tito, M. Saito and K. Kobayashi; Dissociation of a model DNA compound dApdA by monochromatic soft X-rays in solids and comments on the high selectivity for 3' breakage in the phosphoester bond, *International Journal of Radiation Biology* **62** (2) 129-136 (1992).

67. M.A. Hill et al., Double-strand break induction and repair in V79-4 hamster cells: the role of core ionizations, as probed by ultrasoft x-r, *51st Annual Meeting of the Radiation Research Society*, April 24 - 27, St. Louis, Missouri (2004).
68. S. Saigusa, Y. Ejima, K. Kobayashi and M.S. Sasaki; Induction of chromosome aberrations by monochromatic X-rays with resonance energy of phosphorus K-shell absorption edge, *International Journal of Radiation Biology* **61** 785-790 (1992).
69. C. Le Sech, H. Frohlich, C. Saint-Marc, and M. Charlier; DNA breakage upon K-shell excitation of phosphorus as model for direct effects in radiation biology, *Radiation Research* **145** 632-635 (1996).
70. H Bruch, Accélérateurs circulaires de particules, *PUF* (1966).
71. Pierre Germain (D Dekkens), Introduction aux accélérateurs de particules, *ULB - Bruxelles*, Genève (1989).
72. J.M. Ortéga, Rayonnement Synchrotron, *LURE* (2001).
73. E. Rauhala and J. Räsänen; Energy loss of 1.3 - 2.6 MeV 4He ions in Havar, nickel, Kapton and Mylar foils. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, **24-25** 362-365 (1987).
74. H. Wulf, W. Kraft-Weyrather, H.G. Miltenburger, E.A. Blakely, C.A. Tobias and G. Kraft; Heavy-ions effects on mammalian cells: inactivation measurements with different cell lines, *Radiation Research* **104** S122-S134 (1985).
75. D. M Shotton; Review: confocal scanning optical microscopy and its application for biological specimens, *Journal of Cell Science* **94** 175-206 (1989).
76. P. Greenspan, E.P. Mayer and S.D. Fowler; Nile Red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets, *The Journal of Cell Biology* **100** 965-973 (1985).
77. B. Fouladi et al., The relationship between spontaneous telomere loss and chromosome instability in a human tumor cell line, *Neoplasia* **2**(6) 540-554 (2000).
78. D.T. Goodhead and J. Thacker ; Inactivation and mutation of cultured cells by aluminium characteristic X ray. Properties of aluminium X rays and preliminary experiments with Chinese hamster cells, *International Journal of Radiation Biology* **31** 541-559 (1977).
79. B Dutrillaux et J. Couturier ; Pratique de l'analyse chromosomique ; *Masson - Paris* (1981).
80. P. Perry and S. Wolf; New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid, *Nature* **251** 156-158 (1974).
81. J.G. Harcia et al., Design of modified oligodeoxyribonucleotide probes to detect telomeres repeat sequences in FISH assays; *Nucleic Acids Research* **27**(20) 4034-4039 (1999).

82. G.J. Neary; Chromosome Aberrations and the Theory of RBE, *International Journal of Radiation Biology* **9** 477-502 (1968).
83. L.D. Skarsgard, M.W. Skwarchuk, B.G. Wouters and R.E. Durand; Substructure in the radiation survival response at low dose in cells of human tumour cell lines, *Radiation Research* **146** 388-398 (1996).
84. M. R. Raju et al., *Radiation Research*. **110** 369-412 (1987)
85. C.M. de Lara et al., Dependence of the Yield of DNA Double-Strand Breaks in Chinese Hamster V79-4 Cells on the Photon Energy of Ultrasoft X Rays, *Radiation Research* **155** 440-448 (2001)
86. John Thacker, R.E. Wilkinson, Goodhead; The Induction of Chromosome Exchange Aberrations by Carbon Ultrasoft X-rays in V79 Hamster Cells, *International Journal of Radiation Biology* **49** (4) 645-656 (1986).
87. AT Natarajan, AS Balajee, JJ Boei, F Darroudi, I Dominguez, MP Hande, M Meijers, P Slijepcevic, S Vermeulen, Y Xiao; Mechanisms of induction of chromosomal aberrations and their detection by fluorescence in situ hybridization, *Mutation Research* **372** 247-258 (1996).
88. F.N. Gobert : Aberrations chromosomiques induites par rayonnement X ultra mou en cellules de mammifères : rôle et mode d'action des événements d'ionisation en couche interne des atomes de l'ADN ; Doctorat en Sciences, *Université Denis Diderot*, Paris (2003).
89. A. Boissière, A. Eschenbrenner, F. Gobert, M-A. Hervé du Penhoat, F. Abel, L. Martins, M-F. Politis, M. Ricoul, A. Touati, E. Sage, L. Sabatier, A. Chetioui; Cellular inactivation and chromosomal aberrations: initial damage, *Journal of Environmental Pathology and Oncology*, **23**(2) in press (2004).
90. CS. Griffin, D L. Stevens and John R. K. Savage; Ultrasoft 1.5 keV aluminium K X rays are efficient producers of complex chromosome exchange aberrations as revealed by fluorescence in situ hybridization, *Radiation Research* **146** 144-150 (1996).
91. C.S. Griffin, M.A. Hill, D.G. Papworth, K.M.S. Townsend, J.R.K. Savage, D.T. Goodhead; Effectiveness of 0.28 keV carbon K ultrasoft X-rays at producing simple and complex chromosome exchanges in human fibroblasts in vitro detected using FISH, *International Journal of Radiation Biology* **73**(6)591-598 (1998).
92. S. Iwanami, N. Oda; Theory of relative biological effectiveness (RBE) of tritium beta rays: bacteria killing effects of tritiated water, *Phys. Med. Biol.* **32** 1469-1479 (1987).
93. Kassis, *Radiation. Research* **111**, 313-318 (1987)
94. S. G. Swarts, M.D. Sevilla, D. Becker, C.J. Tokar and K.T. Wheeler; Radiation-induced damage as a function of hydration. I. Release of unaltered bases, *Radiat. Res.* **129**, 333-344 (1992).

95. A. Yokoya, S.M. T. Cuniffe and P. O'Neill; Effect of hydration on the induction of strand breaks and base lesions in plasmid DNA films by γ - radiation, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8859-8866 (2002).
96. C. Champion, J. Hanssen, and P. A. Hervieux; Theoretical differential cross sections of water-molecule ionization by electron impact; *Phys. Rev. A*, **65**, 022710-1-022710-9 (2002).
97. Y.K. Kim, J. P. Santos, F. Parente; Extension of the binary-encounter-dipole model to relativistic incident electrons, *Phys. Rev. A* **62**, 05271001-05271013 (2000).
98. V. Cobut, Y. Frongillo, J. P. Patau, T. Goulet, M.J. Fraser and J.P. Gerin; Monte Carlo simulation of fast electron and proton track in liquid water. I. Physical and physicochemical aspects, *Radiat. Phys. Chem.* **51**, 229-243 (1998).
99. M. E. Rudd; Cross sections for production of secondary electrons by charged particles, *Radiat. Protect. Dosim.* **31**, 17- (1990).
100. P. Bernhardt, W. Friedland and H.G. Paretzke; The role of atomic inner shell relaxation for photon induced DNA damage, *Radiat. Environ. Biophys.* in press (2004).

Liste des publications

M. A. Hervé du Penhoat, F. Abel, A. Boissière, C. Champion, A. Eschenbrenner, B. Fayard, M. Lamoureux, A. L'Hoir, M. F. Politis, A. Touati and A. Chetioui; Track structure and biological effect, *Institute of Physics Series*, **172** pp. 119-130 (2003).

M. A. Hervé du Penhoat, A. Boissière, A. Eschenbrenner, F. Abel, M. Lamoureux, M. F. Politis, L. Sabatier, E. Sage, A. Touati, A. Chetioui; DNA breaks, chromosomal aberrations and cell inactivation induced by K ionization events in DNA, *American Institute of Physics*, **680**(1) pp. 52-55 (2003).

A. Boissière, A. Eschenbrenner, M-A. Hervé du Penhoat, F. Abel, M. Lamoureux, M-F. Politis, A. Touati, E. Sage, L. Sabatier, A. Chetioui ; Cassures double brin induites par événements K sur l'ADN ; lésions critiques *Publication SFRP* (2003).

F. N. Gobert, M. Lamoureux, M. A. Hervé du Penhoat, M. Ricoul, A. Boissière, A. Touati, F. Abel, M. F. Politis, B. Fayard, J. M. Guigner, L. Martins, I. Testard, L. Sabatier, A. Chetioui; Chromosome aberrations and inactivation in cultured cells in correlation with the core ionisation events in DNA, *International Journal of Radiation and Biology*, **80**(2) pp. 135-145 (2004).

A. Boissière, A. Eschenbrenner, F. Gobert, M. A. Hervé du Penhoat, F. Abel, L. Martins, M. F. Politis, M. Ricoul, A. Touati , E. Sage, L. Sabatier, A. Chetioui ; Cellular inactivation and chromosome aberrations : initial damage *Journal of Environmental Pathology and Oncology*, **23**(2) (2004).

A. Boissière, C. Champion, A. Touati, M. A. Hervé du Penhoat, L. Sabatier, A. Chatterjee and A. Chetioui; DNA core-ionization and cell inactivation. *Radiat. Res.* **167**(4) pp.493-500.

Références sites Web :

101. <http://www.cea.fr>
102. <http://www.ganil.fr/ciril>
103. <http://www.metasystem.com>

Autres liens :

- <http://www.bitplane.com/support/tables.02.shtml>
- <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
- <http://www.tokyo-med.ac.jp/genet/index-e.htm>
- http://www.cbs.dtu.dk/staff/nikob/science/nuc_table.html
- <http://www.genomesize.com/>
- <http://www.nature.com/nrg/>
- http://www-cxro.lbl.gov/optical_constants/
- [http://www.nelanetpinpinland.org/bo-ner;-*\)](http://www.nelanetpinpinland.org/bo-ner;-*))

Contact : arnaud.boissiere@gmail.com

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

Le but de ce travail est de déterminer l'importance des ionisations « K » sur l'ADN en tant qu'événements physiques critiques à l'origine des effets biologiques des rayonnements ionisants en particulier dans les cellules humaines. Les rayons X ultra-mous sont utilisés comme sonde des événements d'ionisations de cœur. Un test décisif consiste à comparer les effets biologiques à 250eV et 350eV (avant et après le seuil K du carbone). Les résultats montrent un fort accroissement de l'efficacité biologique pour l'inactivation cellulaire et la production d'aberrations chromosomiques d'échange au passage du seuil K du carbone, corrélé avec celui des événements de cœur produits dans les atomes de l'ADN. L'irradiation en ions lourds a permis de retrouver le comportement paradoxal des sections efficaces d'inactivation cellulaire en fonction du TEL. La contribution des événements « K » à l'inactivation cellulaire des rayonnements usuels de bas TEL est estimée à ~75%.

« K » contribution to the biological effect of ionizing radiations

The aim of this work is to determine the importance of « K » ionizations on DNA as critical physical events initiating the biological effects of ionizing radiation, in particular in human cells. Ultra-soft X-rays are used as a probe of core ionization events. A decisive test consists in comparing the biological effects at 250eV and 350eV (before and after the carbon K-threshold). The results show a sharp increase of the biological efficiency for both cellular inactivation and chromosomal exchange aberration above the carbon K-threshold, correlated with the one of core events occurring in DNA atoms. The heavy ion irradiation displays again the paradoxical behaviour of cellular inactivation cross sections as a function of LET. Finally, the « K » event contribution to cellular inactivation of usual low LET radiation is estimated to be ~75%.

Mots-clefs : ADN, inactivation cellulaire, aberrations chromosomiques, aberrations complexes, rayons X ultra-mous, ions, rayonnement synchrotron.

Key words : DNA, cellular inactivation, chromosomal aberrations, complexes aberrations, ultra soft X-rays, ions, synchrotron radiation.

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PIERRE & MARIE CURIE

spécialité

Physique

présentée par

Mr Arnaud BOISSIÈRE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

Sujet de la thèse :

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

soutenue le 08 septembre 2004

devant le jury composé de :

Mme Miglena ANGELOVA
Mme Monique GARDÈS-ALBERT
Mme Evelyne SAGE
Mme Laure SABATIER
Mme Annie CHETIOUI

Présidente du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Directrice de thèse

Source d'inspiration :

Tu seras un Homme [If]...

Si tu peux voir détruit l'ouvrage de ta vie
Et sans dire un seul mot te mettre à rebâti
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 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 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 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: