

TD N°2

RADIOBIOLOGIE

UE 3.8

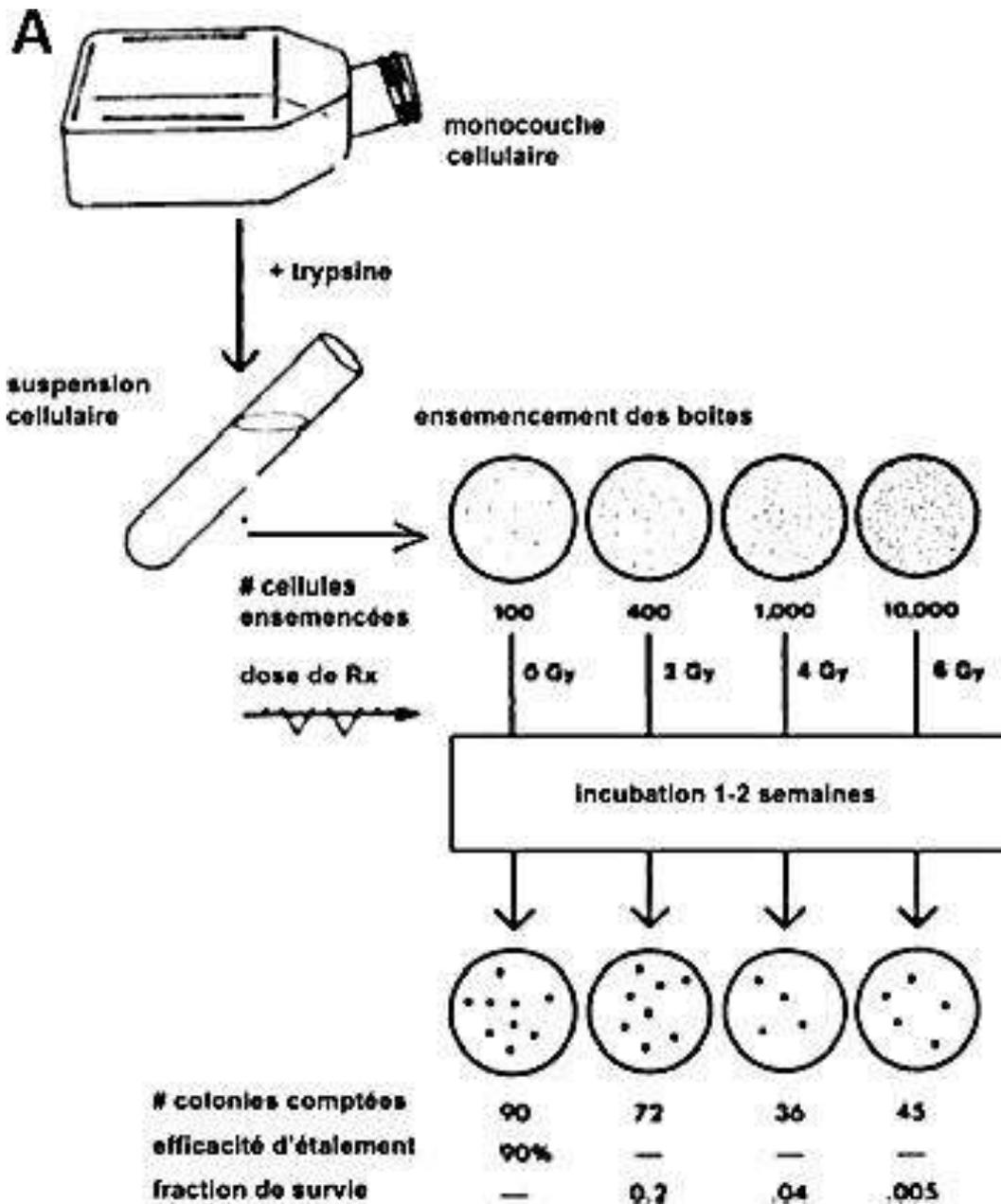
SURVIE CELLULAIRE

COURBES DE SURVIE

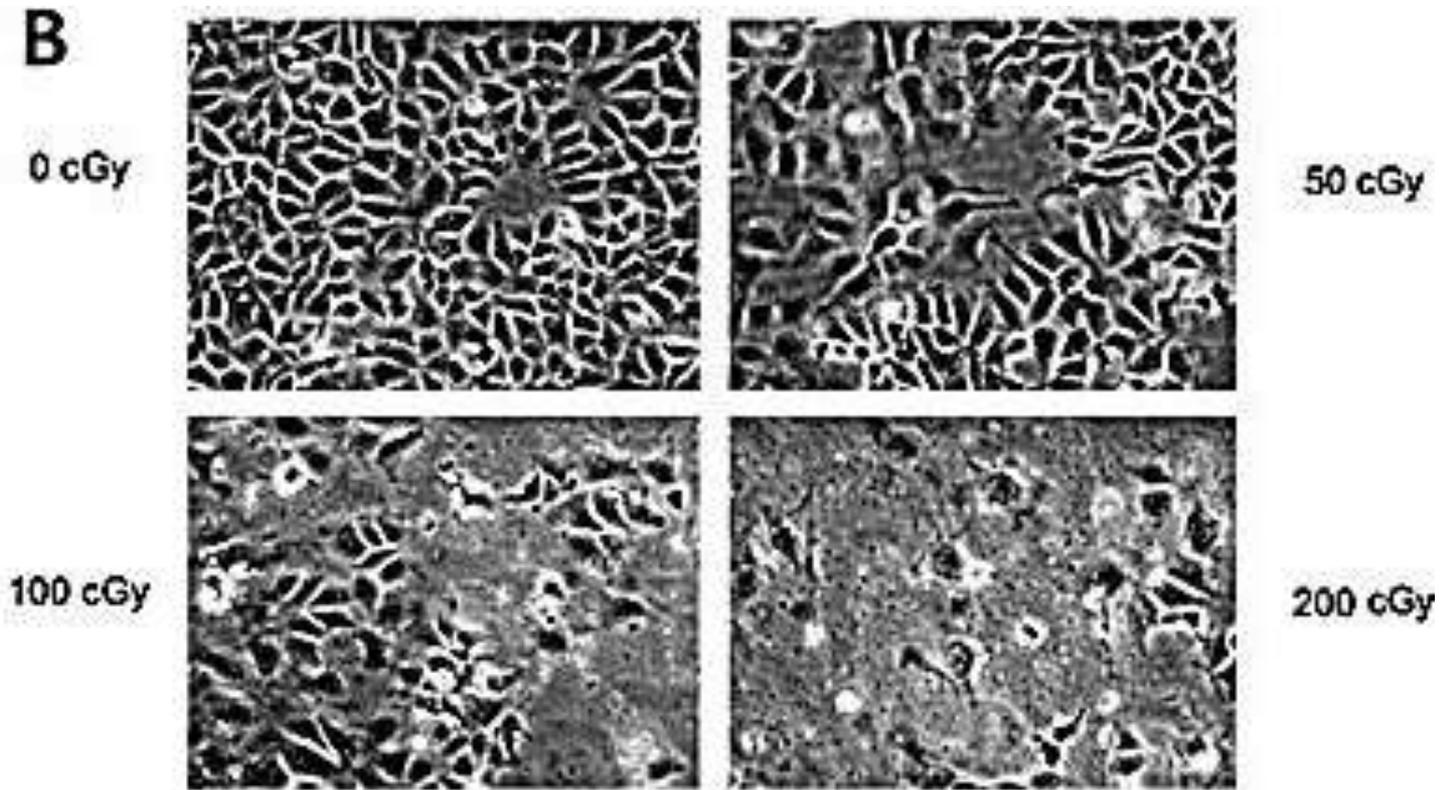
La radiosensibilité des cellules saines ou d'origine tumorale est déterminée par la réalisation de courbes de survie après irradiation, le plus souvent par la méthode de clonage *in vitro*.



La courbe obtenue permet de définir une équation mathématique (modèle) donnant la proportion de cellules survivantes après irradiation.

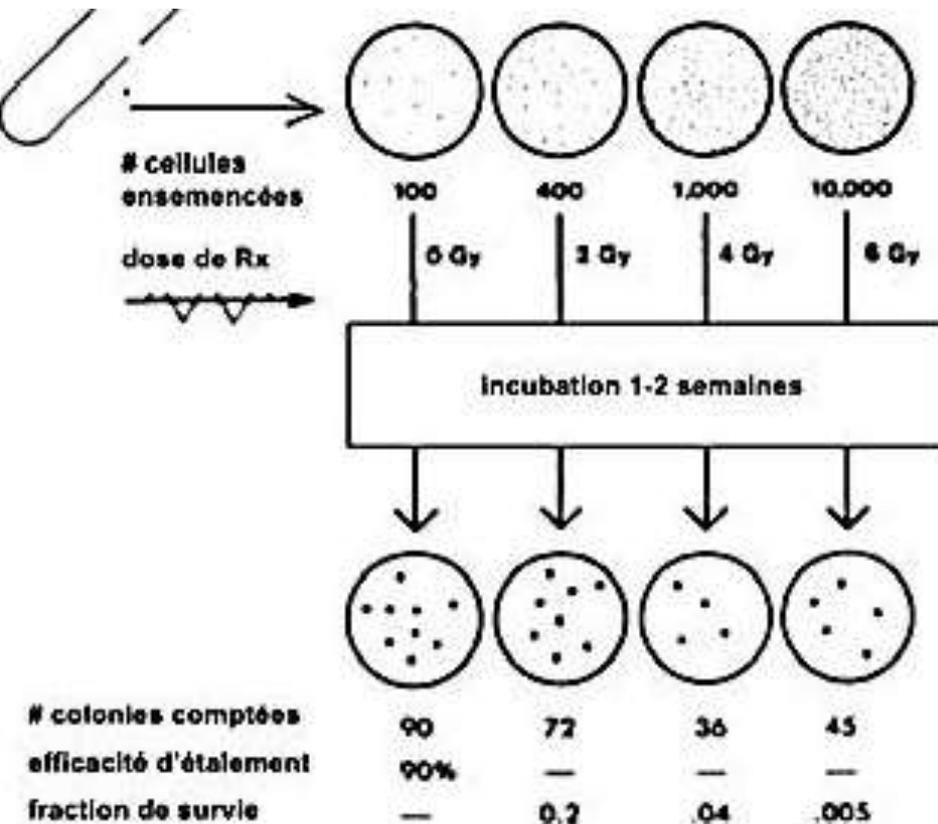


(A) méthodologie utilisée par Puck et Marcus pour tracer les courbes de survie;



(B) Illustration sur une lignée de cellules d'adénocarcinome colique lors de la NASA Space Radiation Summer School 2009 : observation des boîtes exposées à des doses croissantes d'ions fer, $E = 1 \text{ GeV/n}$, $\text{TEL} = 151 \text{ keV}/\mu\text{m}$;

RÉSULTATS



Efficacité de la mise en culture:

Puisque le premier milieu de culture n'a pas été irradié et que seulement 90 des 100 cellules semées ont donné naissance à une colonie, l'efficacité de la mise en culture (PE) est estimée à 90%. Chacun des essais subséquent sera étudié en fonction de cette donnée qui sert de donnée contrôle à l'expérience, afin de calculer la survie.

Survie fractionnelle:

Pour le calcul de la survie du deuxième milieu de culture, on multiplie le nombre de cellules semées (400) par le PE de 90%, soit 360. Sur les 360 colonies qu'on s'attendait de voir se former en l'absence de radiation, seulement 72 ont été obtenues:

Survie milieu n° 2 de $72/360 = 0,2$

Survie milieu n° 3 de

Survie milieu n° 4 de

ABSCISSE ET ORDONNÉE

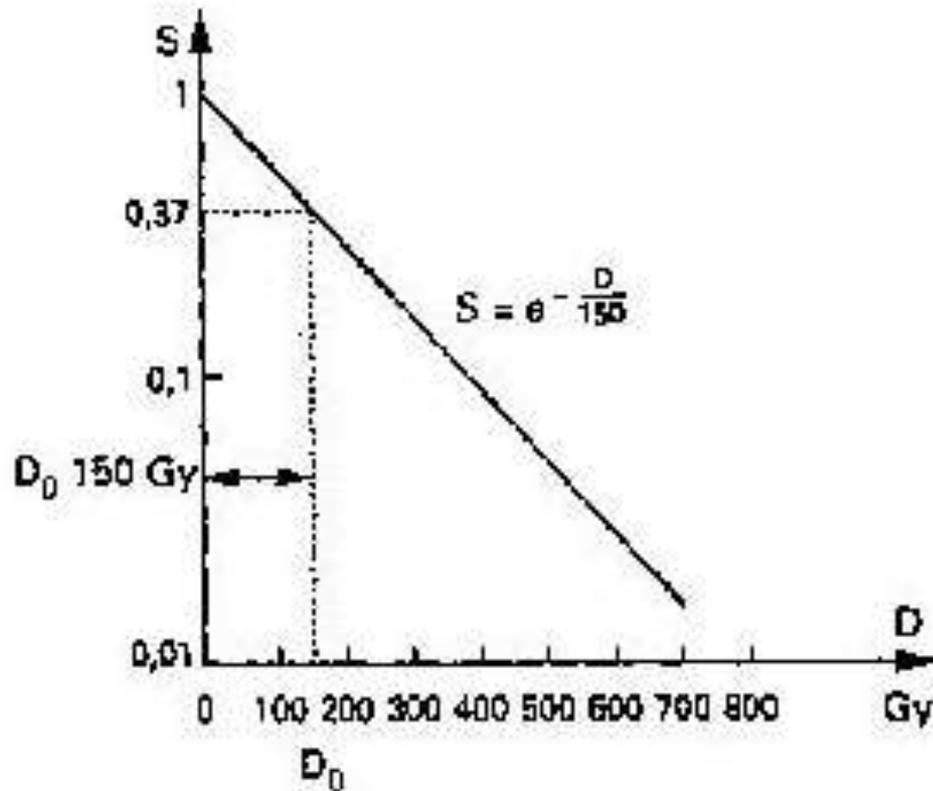
La proportion des cellules survivantes S , va diminuer au fur et à mesure que la dose D augmente. La courbe de survie est la représentation de ce phénomène sur un plan statistique.

La représentation semi-logarithmique est la plus commode. Une échelle logarithme en ordonnée (S) et une échelle linéaire en abscisse (D).

En plus de l'intérêt de cette représentation pour illustrer des relations exponentielles entre des variables, on peut représenter des phénomènes dont le domaine de variation de l'un des paramètres est très étendu.

ASPECT DES COURBES

Irradiation par rayonnement à TEL fort



- TEL faible: il existe un épaulement initial avec une pente initiale nulle ou non:

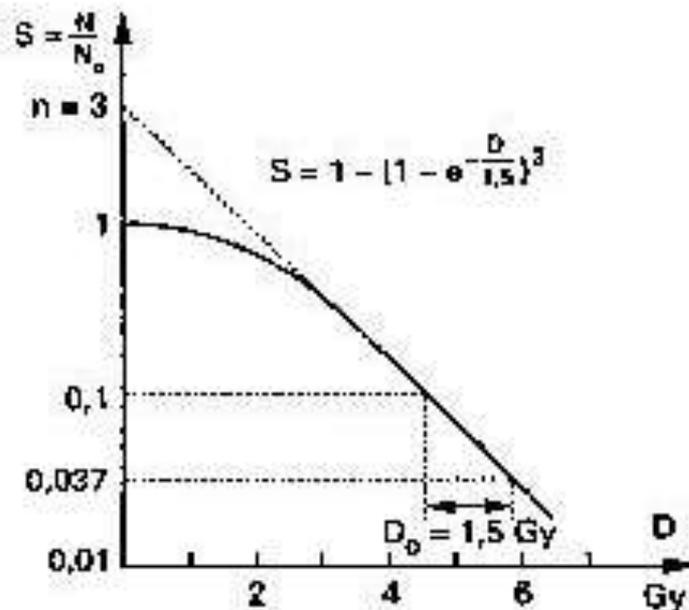


Figure 9 – Courbe de survie avec épaulement (mammifère)

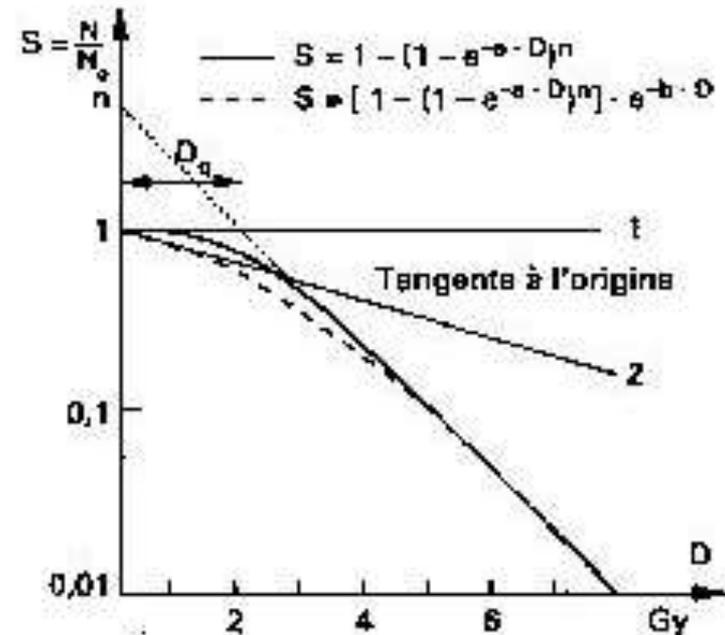


Figure 10 – Courbes de survie avec pente initiale nulle (1) et non nulle (2)

[animation](#)

Pour décrire la forme d'une courbe typique de survie cellulaire à l'irradiation, on utilise les expressions d'**épaulement** et de **décroissance exponentielle** pour décrire respectivement le début et la fin de la courbe..

L'épaulement de la courbe indique que, pour ce type de radiation et pour ce type de cellules, de faibles doses sont inefficaces ou peu efficaces. L'épaulement initial a une pente nulle ou négative (il s'agit de la pente tangente à l'origine).

La décroissance de la fin de la courbe peut être mono-exponentielle ou non mono-exponentielle.

TYPES DE COURBES DE SURVIE CELLULAIRE

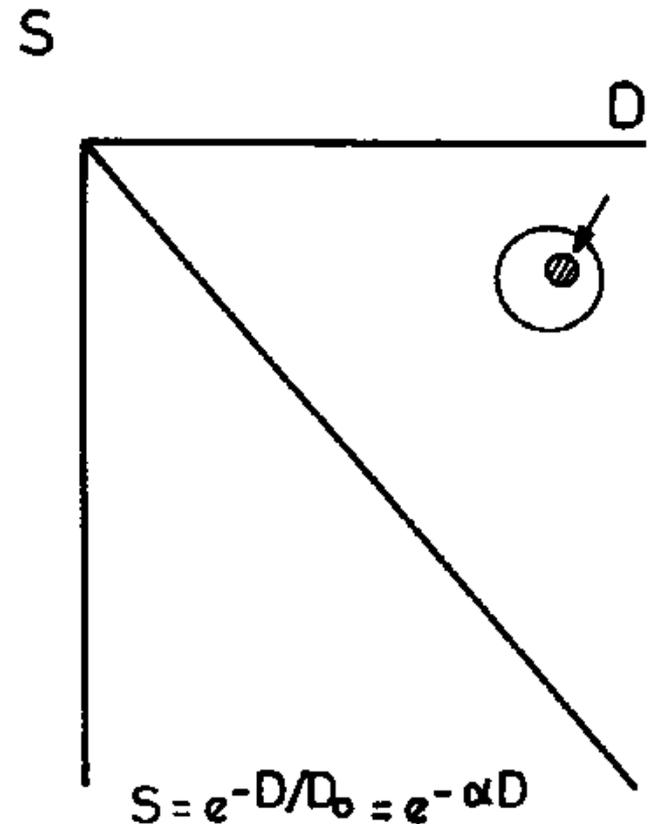
MODÈLE EXPONENTIEL PUR : 1 CIBLE LÉTALE D'EMBLÉE

Courbe monoexponentielle

Tout se passe comme si la cellule possédait une structure cible pour laquelle un coup au but cause la destruction de la cellule. Tout réside dans la probabilité de toucher la cible.

Les courbes de survie cellulaire exponentielles sans épaulement sont obtenues pour des virus, des bactéries, pour des cellules normales ou malignes très radiosensibles et pour différentes cellules traitées avec la radiation à haut LET.

D_0 représente la dose à laquelle 37% des cellules survivent



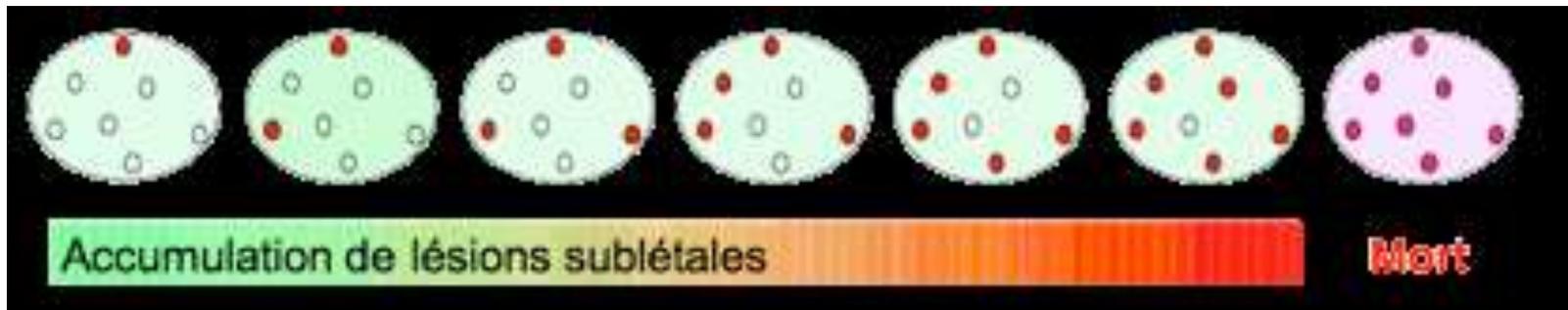
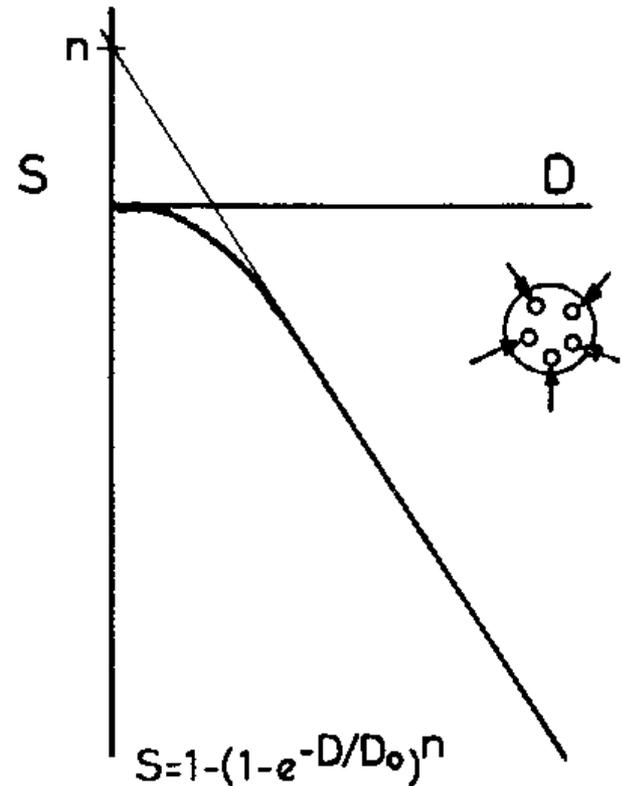
MODÈLE SIGMOÏDE : N CIBLES SUBLÉTALES D'EMBLÉE « N CIBLES À 1 COUP »

Pente initiale nulle, épaulement, fin de courbe monoexponentielle

Le modèle est interprété comme une cellule contenant n cibles (*structures vitales radiosensibles*) qu'il faut détruire dans leur ensemble. Chaque cible détruite est sublétales mais est détruite par un coup au but. La mort de la cellule survient lorsque les n cibles sont *inactivées*. Les cibles peuvent se *réactiver* tant que toutes ne sont pas atteintes (réparation des lésions sublétales)

L'extrapolation de l'exponentielle finale vers l'origine donne le nombre de cibles n (attention aux % sur les échelles).

Dans la partie monoexponentielle finale, il ne reste qu'une cible à détruire pour détruire la cellule.

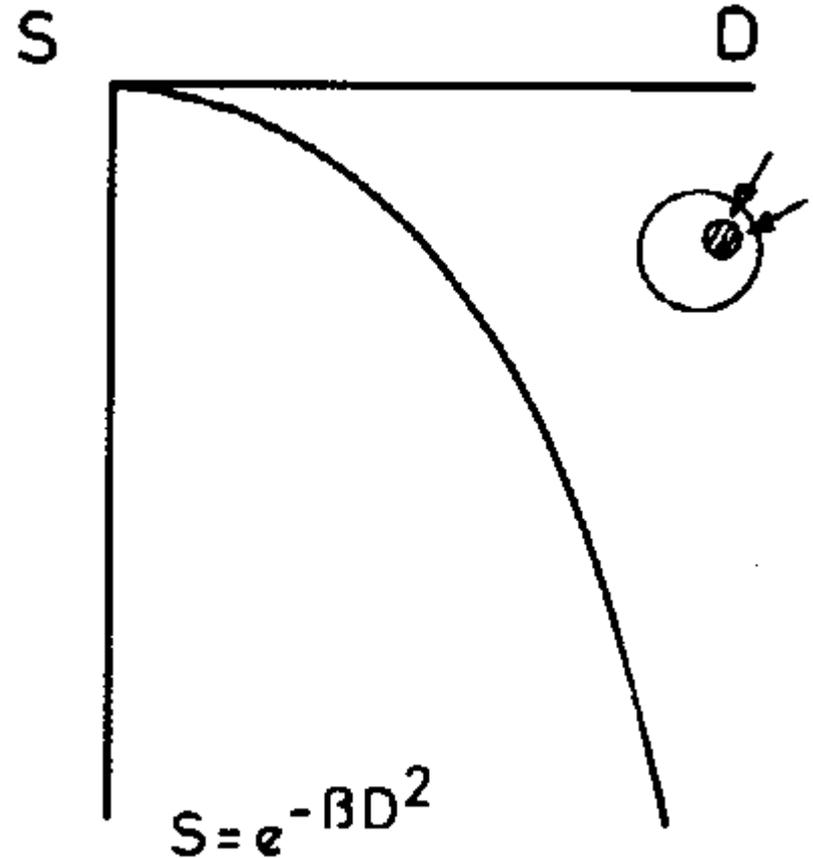


FIN DE COURBE NON MONOEXPONENTIELLE

Pente initiale nulle, épaulement, fin de courbe non monoexponentielle

Dans ce cas, l'évènement létal pour la cellule résulte de l'addition de 2 évènements sublétaux indépendants produits par le passage de 2 particules distinctes sur la même cible.

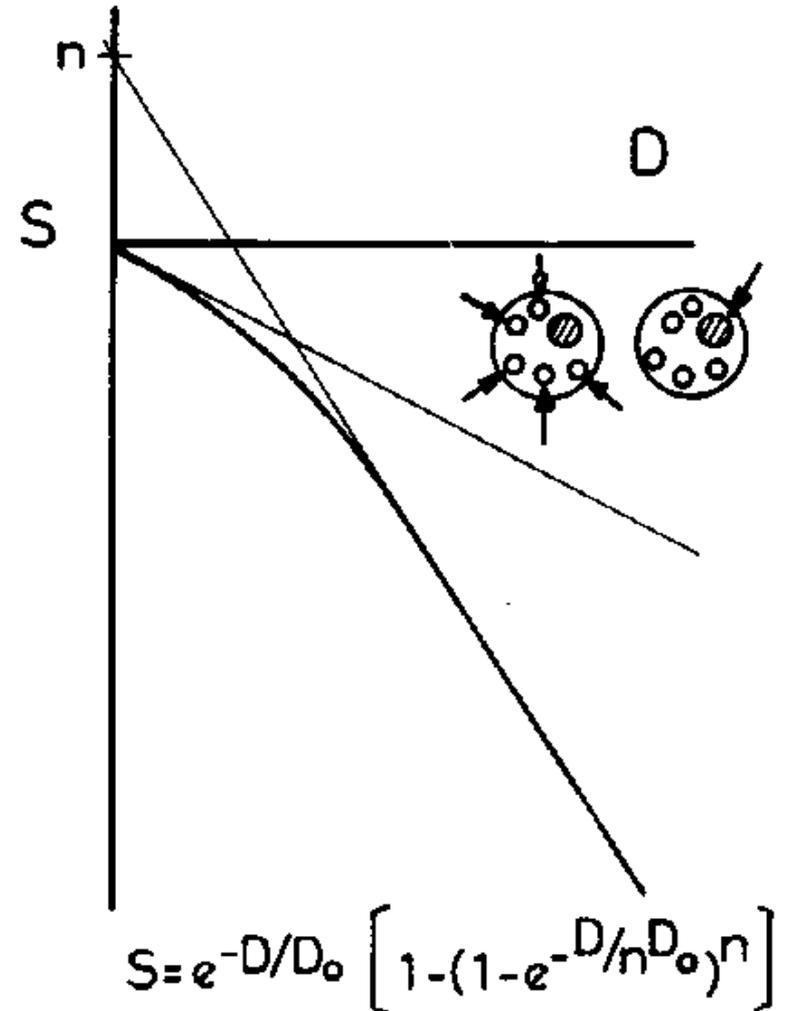
L'effet s'aggrave avec la dose.



MODÈLE MIXTE À 2 COMPOSANTES : 1 CIBLE LÉTALE ET N CIBLES SUBLÉTALES

Pente initiale négative et exponentielle distale,

la létalité cellulaire est décrite par un modèle comportant une cible létale à un coup et n cibles sublétales à un coup, un type ou l'autre pouvant être frappé.



MODÈLE LINEAIRE QUADRATIQUE

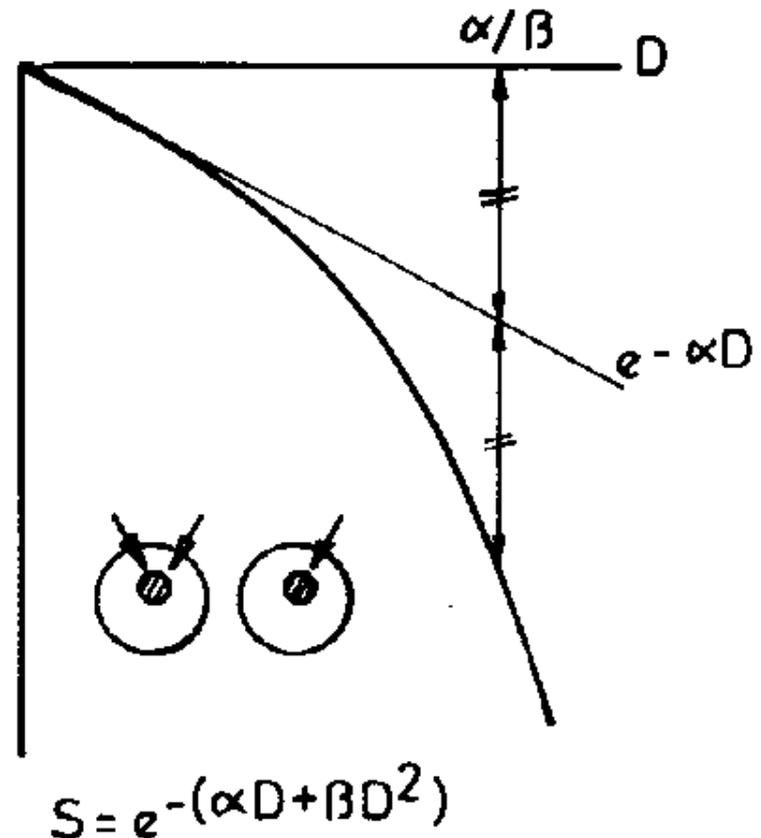
**Pente initiale négative,
épaulement, fin de courbe non
monoexponentielle**

le modèle linéaire quadratique qui
combine les deux premiers modèles.

Linéaire = 1 cible létale d'emblée

Quadratique : accumulation de 2
lésions sublétales provenant de 2
particules distinctes sur la même
cible

La létalité cellulaire résulte soit d'un
évènement létal, soit de l'addition de
2 évènements sublétaux
indépendants.



ALLURE DES COURBES ET RÉPARATION

L'aspect général des courbes suggère les interprétations suivantes vis-à-vis des processus de réparation :

Courbe mono-exponentielle: les lésions sont d'emblée létales et il ne peut pas y avoir de réparation. (TEL élevé)

Pente initiale nulle (début horizontal): au début, la dose est insuffisante et les cellules sont réparées dans tous les cas.

Épaulement : les lésions sont peu fréquemment létales et les processus de réparation limitent les effets de l'irradiation.

Fin mono-exponentielle: les réparations sont saturées et toute irradiation supplémentaire est létale car $n-1$ cibles sont déjà touchées.

Fin non mono-exponentielle: les dégâts déjà créés sont tels que le moindre supplément de dose est mortel et que ces suppléments sont de plus en plus petits pour tuer un nombre donné de cellules.

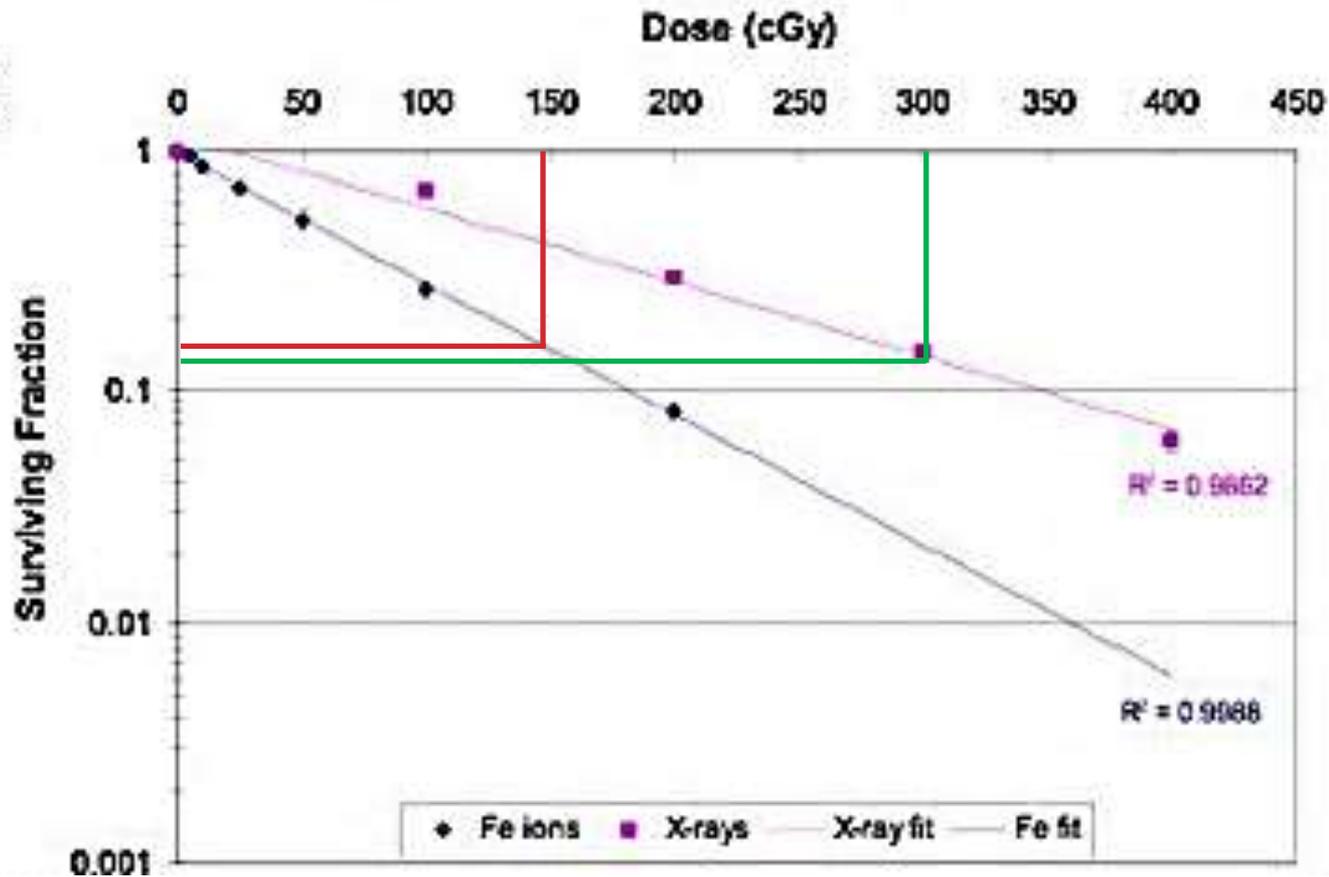
QUELQUES DÉFINITIONS

D_0 : **dose létale moyenne** ,correspond à la dose réduisant le taux de survie à 37% (pente)

EBR : L'Efficacité Biologique Relative (EBR) est une grandeur sans unité permettant de comparer l'importance de l'effet biologique d'un rayonnement étudié par rapport à celle d'un rayonnement de référence.

SF2 : fraction survivante à 2 Gy. Plus la SF2 est grande, moins la lignée cellulaire étudiée est radiosensible.

C



(C) courbes de survie comparant les ions fer aux rayons X de 250 kV et permettant de calculer graphiquement l'efficacité biologique relative.

Efficacité biologique relative (EBR) : rapport de la dose d'un rayonnement de référence à la dose physique du rayonnement étudié produisant un *même effet biologique* (=même fraction de survie),

Ici $EBR_x = 300/150 = 2$

TD EXERCICES :

RÉSULTATS

Efficacité de la mise en culture:

Puisque le premier milieu de culture n'a pas été irradié et que seulement 80 des 100 cellules semées ont donné naissance à une colonie, l'efficacité de la mise en culture (PE) est estimée à 80%. Chacun des essais subséquents sera étudié en fonction de cette donnée qui sert de donnée contrôle à l'expérience, afin de calculer la survie.

Survie fractionnelle:

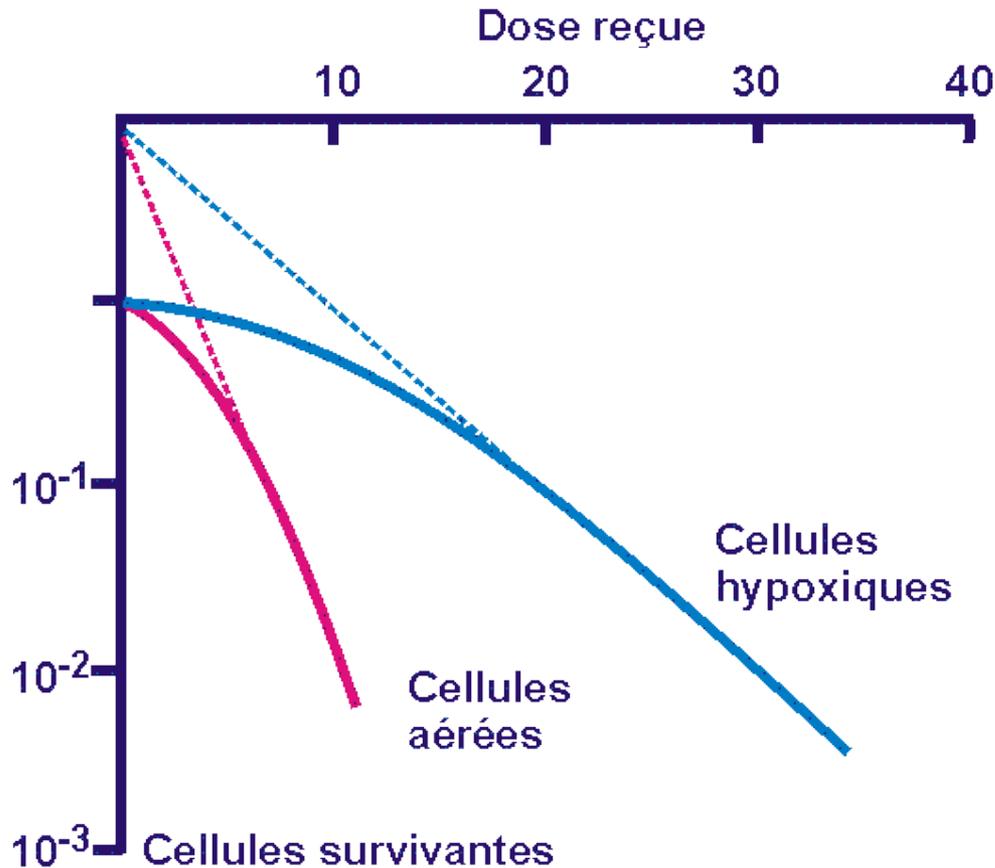
Pour le calcul de la survie du deuxième milieu de culture, on multiplie le # de cellules semées (1000) par le PE de 80%. Sur les 800 colonies qu'on s'attendait de voir se former en l'absence de radiation, seulement 90 ont été obtenues:

Survie milieu # 2 de $90/800 = 0.11$

Survie milieu # 3 de $45/1600 = 0.028$ (1600 = 2000x80%)

Survie milieu # 4 de $18/3200 = 0.0056$ (3200 = 4000x80%)

1 - COURBES DE SURVIE OBTENUES, IN VITRO, POUR DES CELLULES MAMMAIRES EMT6 DE SOURIS, APRÈS IRRADIATION PAR RAYONS GAMMA, EN HYPOXIE ET DANS DES CONDITIONS NORMALES D'OXYGÉNATION



La forme des courbes de survie est la même dans les deux cas, mais la dose nécessaire pour obtenir un taux de survie donné est environ 3 fois plus élevée en hypoxie. L'OER (Oxygen Enhancement Ratio) est égal à 3 et il ne varie pas en fonction du taux de survie considéré ; l'oxygène est donc un simple « facteur modificateur de dose ».

EXPLICATION DE L'EFFET OXYGÈNE : LES ERO OU DRO

Les dérivés réactifs de l'oxygène :

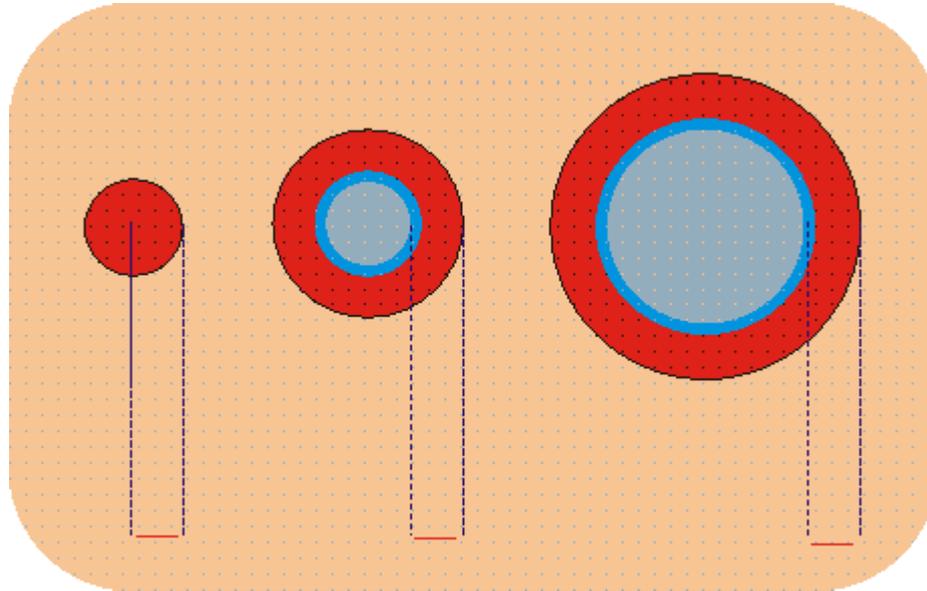
(DRO ; en anglais : ROS, pour *Reactive Oxygen Species*)

espèces chimiques oxygénées telles que des radicaux libres, des ions oxygénés et des peroxydes, rendus chimiquement très réactifs par la présence d'électrons de valence non appariés.

Exemples:

- l'anion superoxyde O_2^- ,
- l'oxygène singulet O_2^* ,
- peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ,
- l'ozone O_3 .

EFFET OXYGÈNE

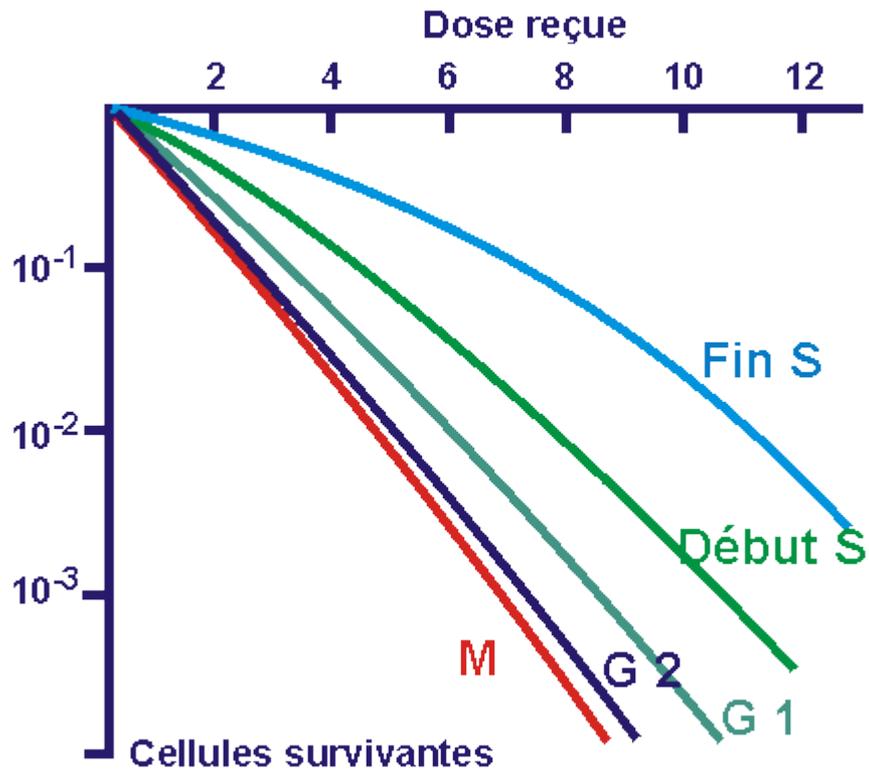


Le schéma montre le degré d'hypoxie qui apparaît après une épaisseur de la tumeur d'environ 2/10èmes de millimètre. La tumeur pousse dans le stroma avec ses capillaires (en saumon).

A gauche, il s'agit d'une tumeur bien oxygénée (en rouge).

Au-delà de cette distance de 0.2 mm environ, on observe une assise de cellules hypoxiques, encore vivantes, figurées par le cercle bleu. Au centre, on observe une nécrose (zone bleu clair).

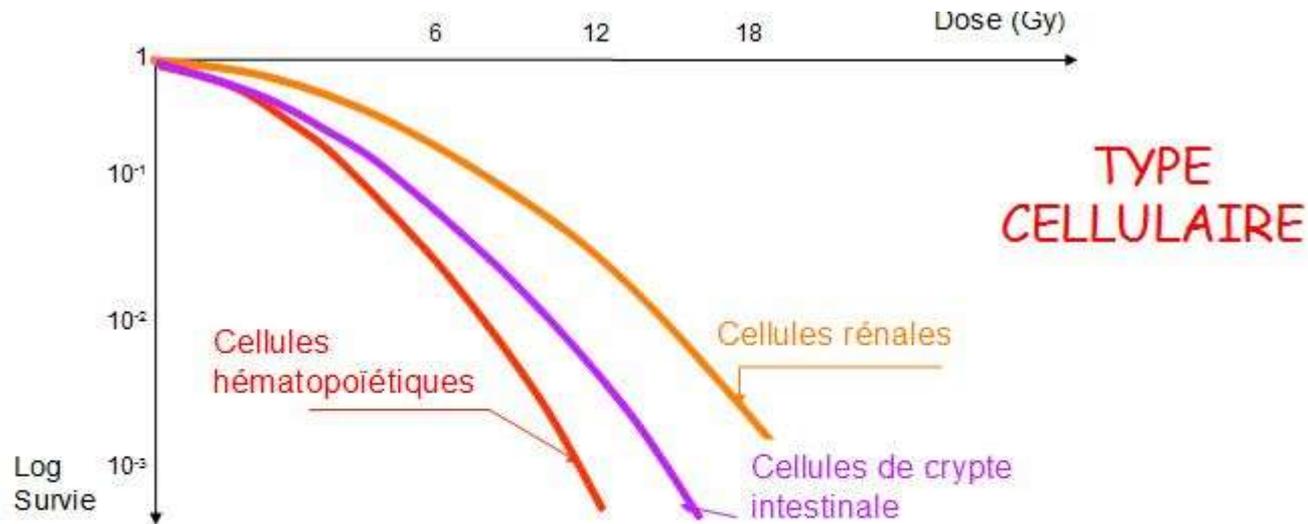
2- PHASES DU CYCLE



Courbe de survie des cellules de hamster chinois irradiées à diverses phases du cycle mitotique, après blocage et relargage du cycle cellulaire.

On remarque la sensibilité très importantes des phases M, G2 et G1 (là où existent des points de contrôle démontrés), et à l'inverse une sensibilité moindre pendant la phase S

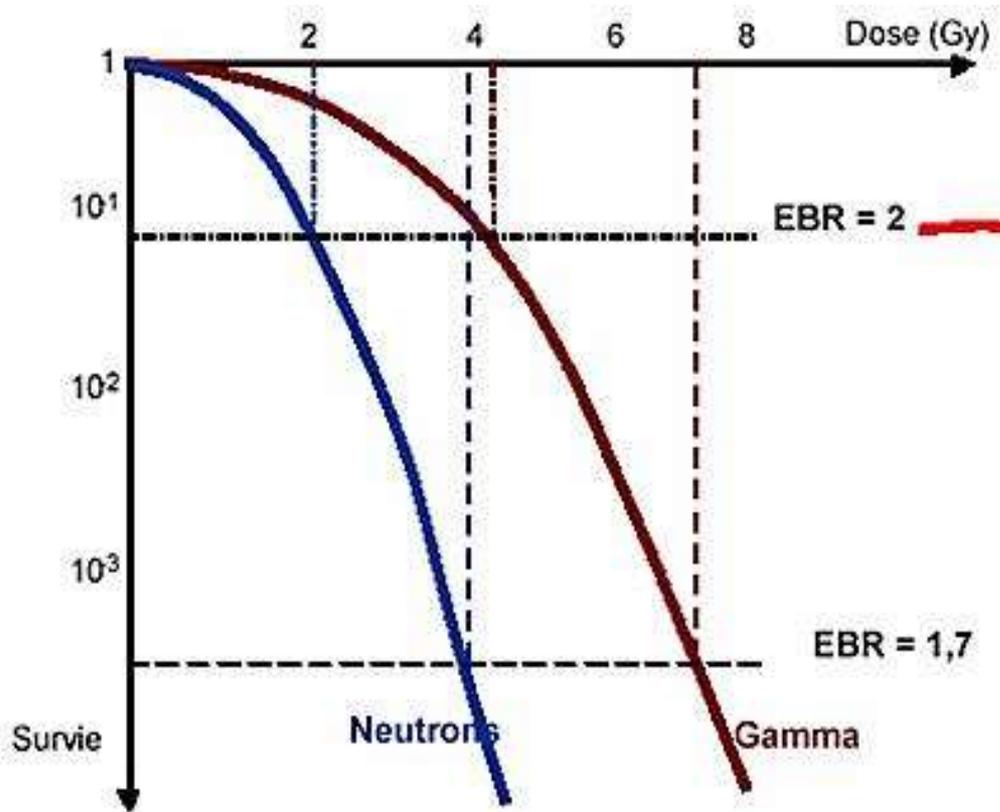
3- TYPE CELLULAIRE



Courbes de survie pour différentes souches cellulaires et pour un même rayonnement

La radiosensibilité est différente d'une lignée à l'autre ; les cellules souches hématopoiétiques et les cellules souches de la lignée germinale sont les plus radiosensibles. En général, moins une cellule est différenciée, plus elle est radiosensible.

4- NATURE DU RAYONNEMENT

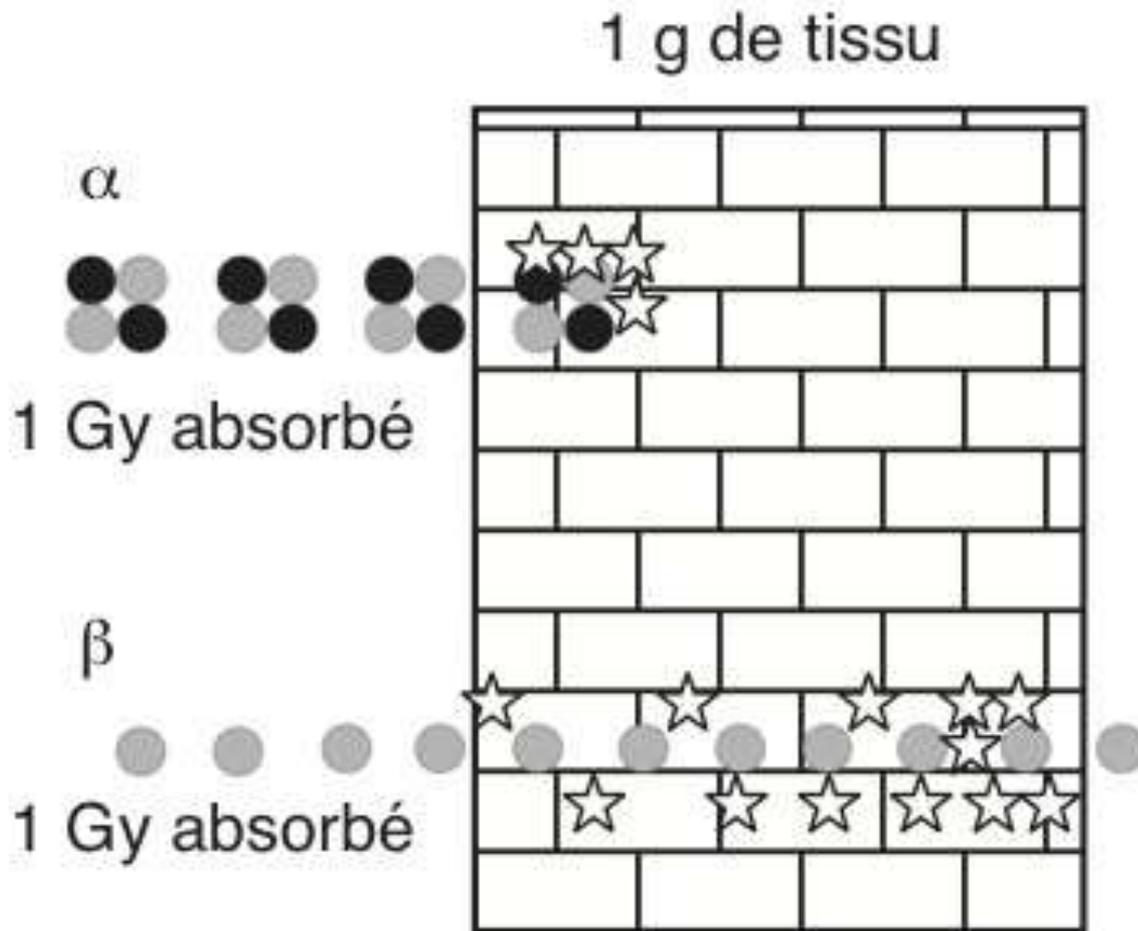


L'EBR_i, d'un rayonnement donné i , par rapport à un rayonnement de référence j , est égal au rapport des doses absorbées du rayonnement de référence j , et du rayonnement considéré, D_i , nécessaires à l'obtention d'un même effet biologique. $EBR_i = D_j/D_i$

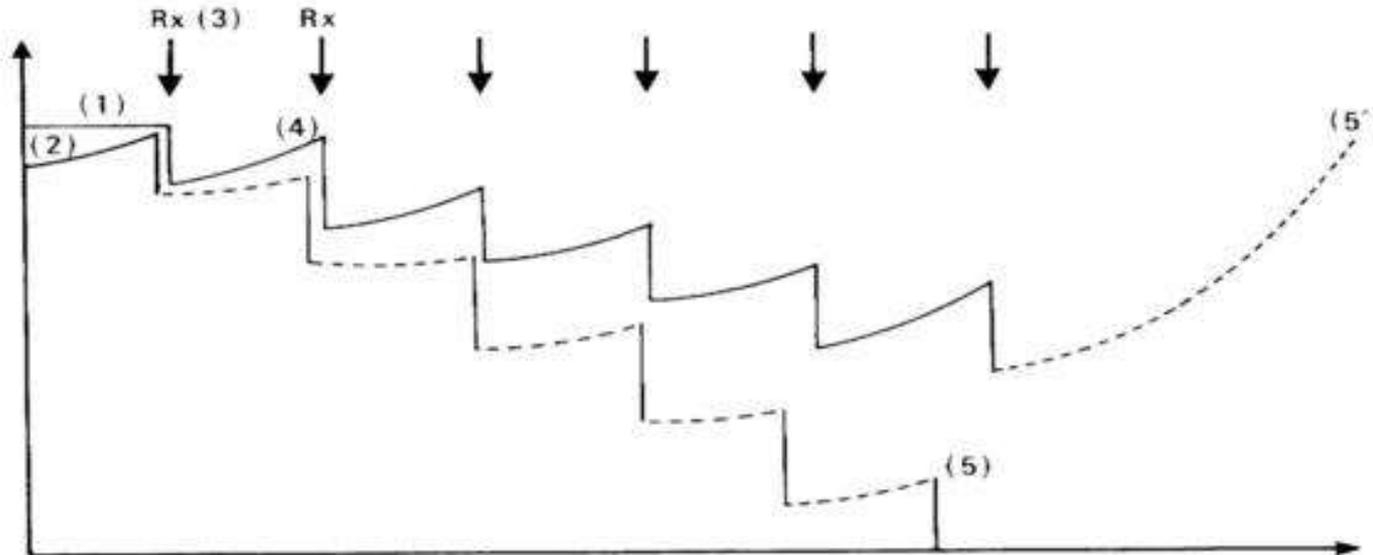
L'EBR varie avec le TEL et la dose absorbée

rôle du transfert linéique d'énergie. Cette grandeur physique caractérise la densité d'ionisations par unité de longueur de trajectoire. Plus le transfert linéique d'énergie est élevé, plus la létalité sera grande car la cellule aura plus de difficulté à réparer correctement les lésions induites.

TEL



5- RÉCUPÉRATION CELLULAIRE



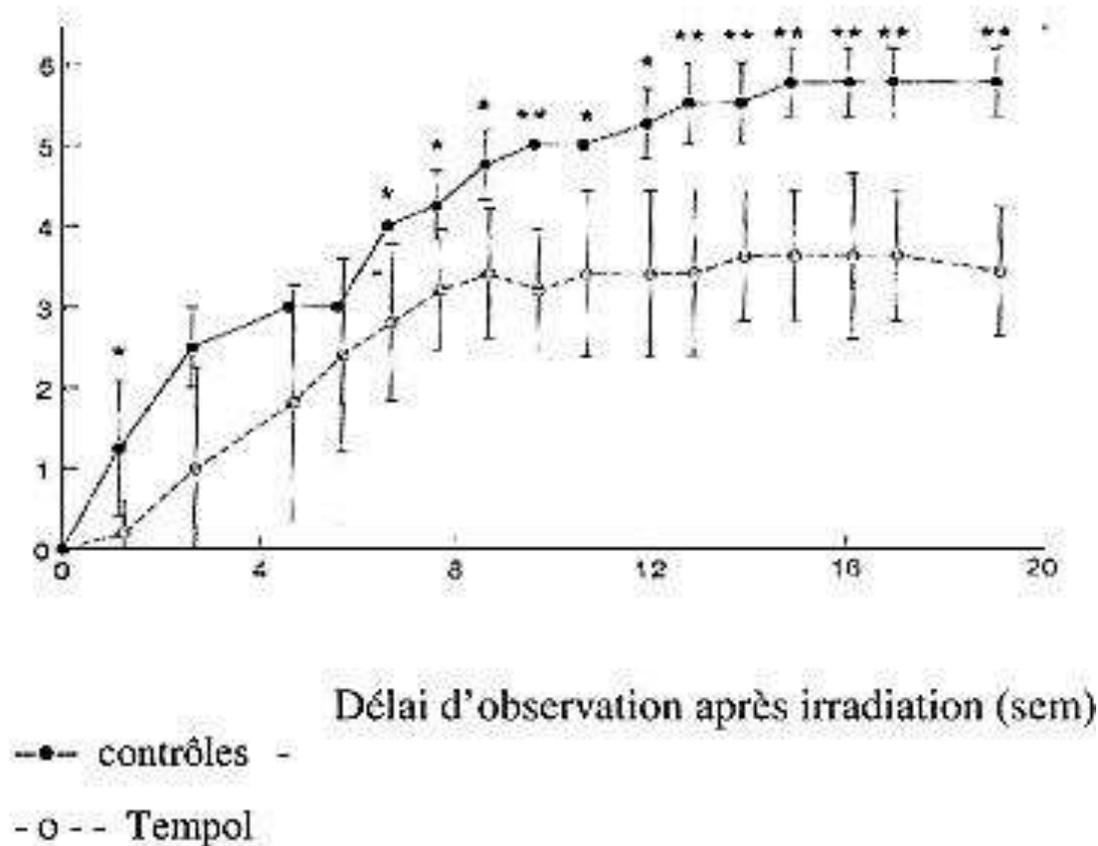
- (1) est la courbe de récupération cellulaire du tissu sain stable,
(2) est la même courbe, mais pour un tissu cancéreux en croissance,
(3) sont les séances d'irradiations, qui tuent le même pourcentage des deux sortes de cellules,

(4) montre qu'entre la 1^{re} et la 2^e séance, les cellules saines restaurent mieux les lésions infraléthales de leur ADN que les cellules cancéreuses, et (5) et (5'), destruction totale des cellules cancéreuses et restauration complète du tissu sain

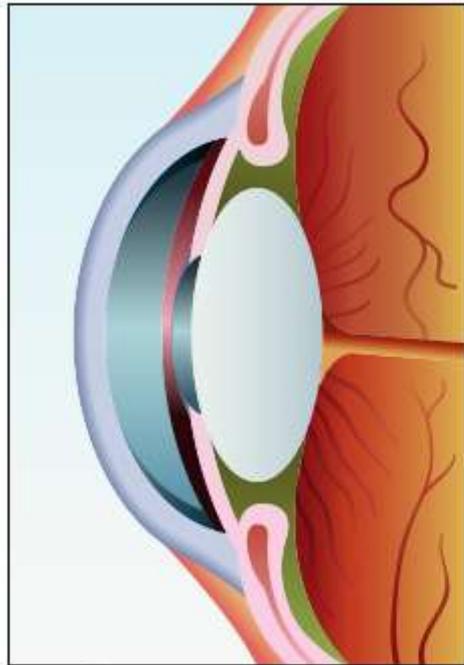
6- CATARACTE ET TEMPOL

Influence de l'administration in vivo du Tempol-H, substance ayant un effet *super-oxyde dismutase like*, sur la sévérité de la cataracte radio-induite chez le rat.

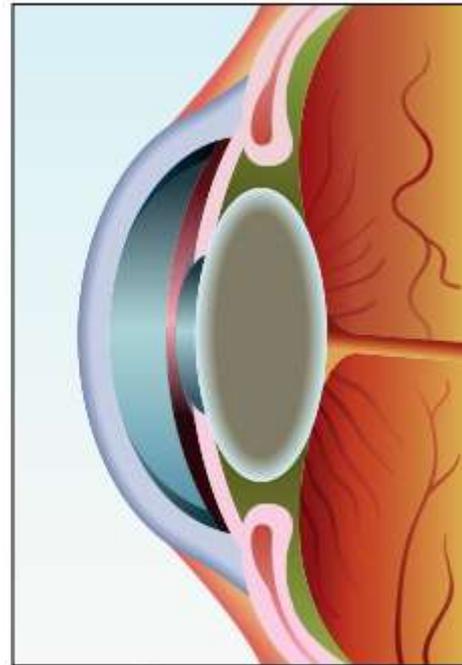
Stade de cataracte



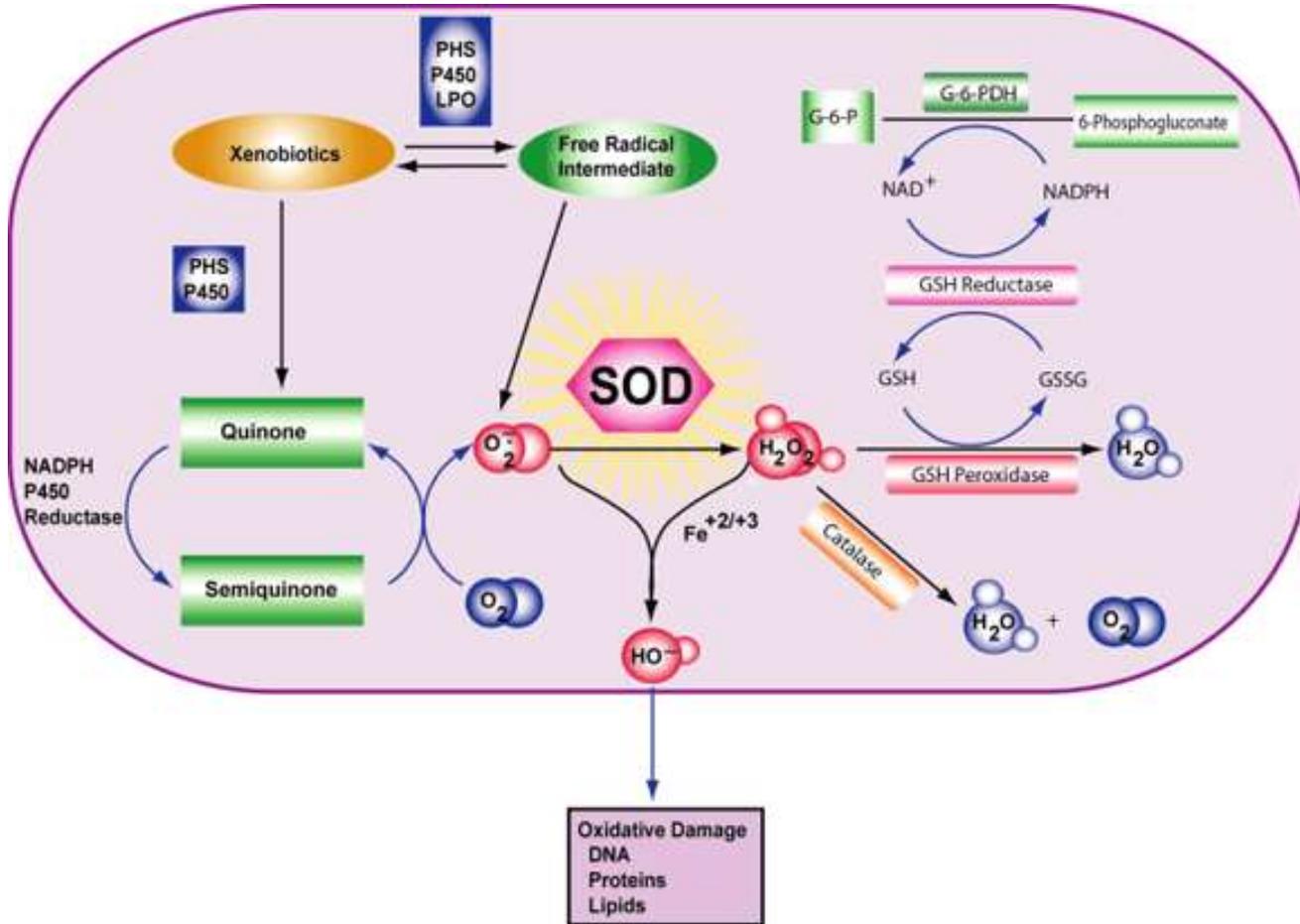
CATARACTE



Cristallin sain



Cataracte



CONCLUSION

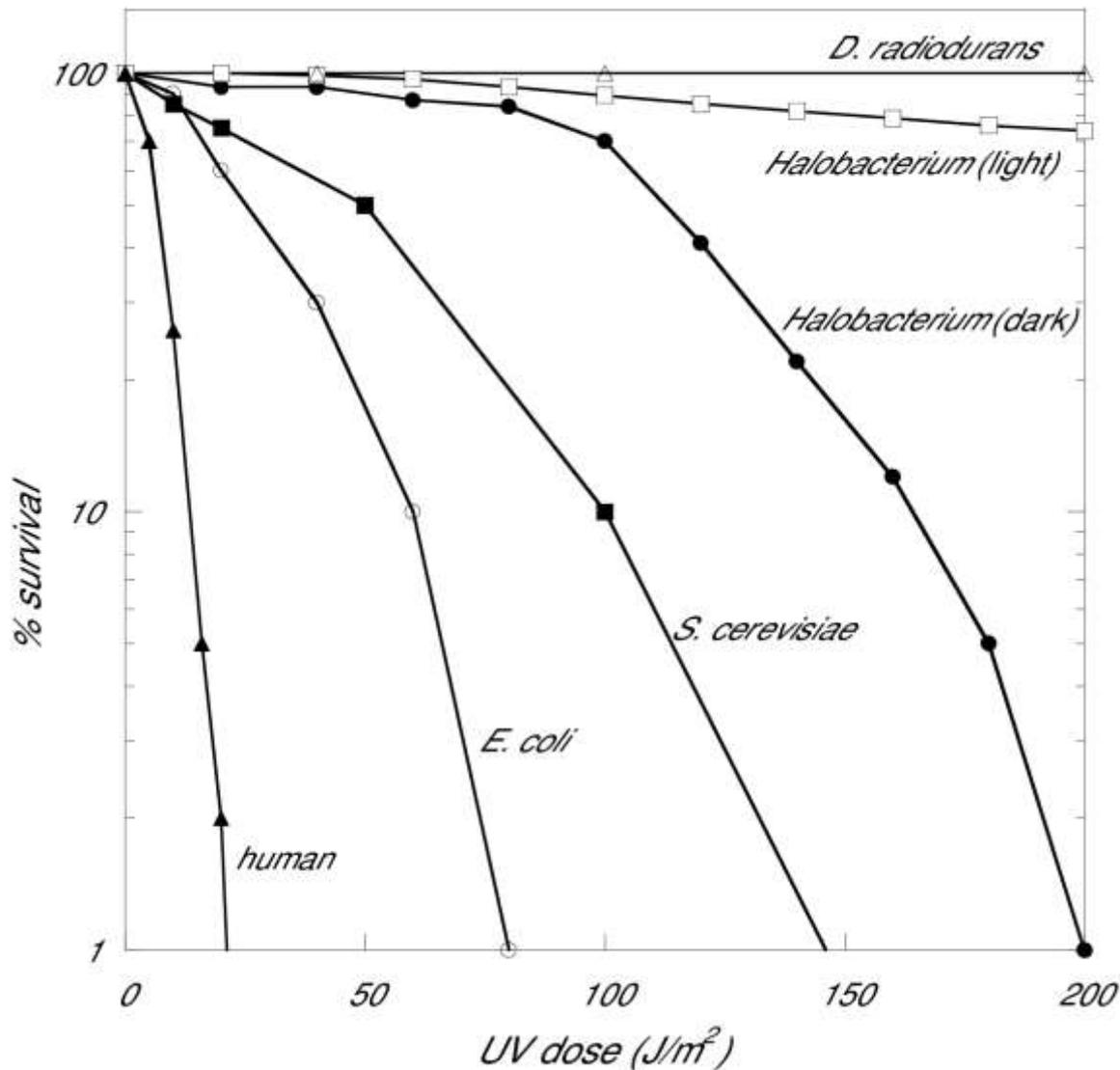
- **Effet oxygène : radiosensibilisateur**
- **phases cycle : M + sensible, S + résistante**
- **type cellulaire : cellules souches et tissus compartimentaux + sensibles, cellules différenciées + résistantes**
- **Débit de dose : + débit faible, mieux répare donc + résistante**
- **nature rayonnement : +TEL fort, + rayonnement efficace**
- **tissu cancéreux répare moins bien**
- **anti-radicaux libres radioprotecteurs**



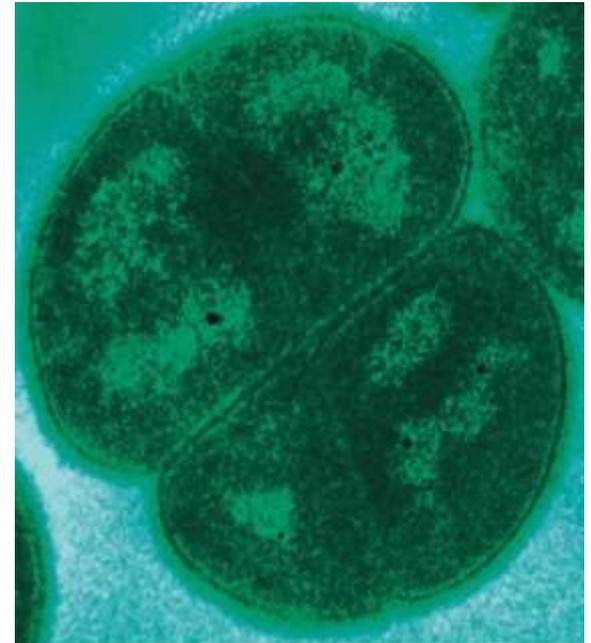
in vitro \neq in vivo

- La détermination **in vitro** de la SF2 ou de D0 ne permet pas de prédire de façon fiable la **radiosensibilité in vivo**, c'est-à-dire la **radiocurabilité** ; *en effet, la D0 de lignées tumorales est du même ordre que la D0 de fibroblastes normaux et la radiosensibilité des cellules tumorales prélevées à partir d'une tumeur non radiocurable est proche de celle des cellules saines ou des tumeurs radiosensibles.*
- Différentes hypothèses ont été émises concernant cette discordance entre **radiosensibilité** définie in vitro et **radiocurabilité** :
 - modification des propriétés des cellules par l'étape de culture in vitro (carence en facteurs de croissance, support de culture particulier, ...)
 - rôle du stroma, véritable tissu de soutien de la tumeur, dont les éléments figurés (cellules endothéliales, lymphocytes, macrophages, ...) ont la propriété de sécréter des cytokines à effet radiomodulateur, telles que le TNF α ou le β FGF.

CAS DE DEINOCOCCUS RADIODURANS



Bactérie extrêmophile



Elle supporte jusqu'à 150 cassures du double brin par chromosome sans effet mutagène alors qu'*Escherichia coli* n'en supporte que 2 ou 3 maximum et subit des mutations délétères.

EXPLICATION DE SA RÉSISTANCE

son extrême résistance était due à la conjugaison de stratégies variées :

- prévention - des dégâts cellulaires provoqués par les radicaux libres ;
- réparation - des cassures chromosomiques grâce à un arsenal très complet ;
- expulsion - des nombreux déchets produits lors de la réparation et dangereux pour sa survie.

La paroi ne pouvant stopper les rayons gamma – des photons de très haute énergie – et les empêcher d'abîmer les chromosomes, *Deinococcus radiodurans* ne prévient pas le morcellement de son génome mais le répare. Cependant pour permettre cette réparation, il faut que les enzymes de réparation soient fonctionnelles et soient donc protégées de l'oxydation qui découle de l'irradiation.

En effet, d'importants dégâts cellulaires sont provoqués par l'apparition de radicaux libres d'oxygène suite à la dessiccation ou à l'exposition aux rayons UV et gamma et la bactérie doit donc posséder des systèmes de protections de ces stress oxydants. *Deinococcus radiodurans* est doté de toute une série d'enzymes - catalases et superoxyde dismutases (SOD) - spécialisées dans l'élimination de ces radicaux libres ainsi que de molécules antioxydantes tels que la deinoxanthine, pigment responsable de la couleur des *Deinococcus*.

Questions diverses

1) L'UNITÉ DE LA DOSE ABSORBÉE EST LE GY (JOULE/KG). L'EFFET BIOLOGIQUE PRINCIPAL DES RAYONNEMENTS IONISANTS EST-IL DU À UNE AUGMENTATION SENSIBLE DE LA TEMPÉRATURE DES TISSUS ?

Réponse :

Non, l'effet biologique des rayonnement n'est pas du à une augmentation importante de la chaleur dans les tissus, mais aux dégâts provoqués au niveau des molécules sensibles : principalement l'ADN, mais aussi protéines et lipides.

2) UN TECHNICIEN DOIT INTERVENIR DANS UNE PIÈCE OÙ SE TROUVE UNE SOURCE ÉMETTANT DES RAYONNEMENTS Γ . UNE MESURE DU DÉBIT DE DOSE À 2 MÈTRES DE LA SOURCE INDIQUE UNE EXPOSITION DE 0.03 GY/MIN.

QUELLE PRÉCAUTION RÉDUIRAIT DE MANIÈRE PLUS EFFICACE, LA DOSE ?

- SE MAINTENIR À 6 MÈTRES DE LA SOURCE.**
- UTILISER UN ÉCRAN DE PLOMB QUI RÉDUIT D'UN FACTEUR 5 L'EXPOSITION.**

Réponse :

L'exposition décroît en fonction du carré de la distance, soit ici d'un facteur 9, donc l'éloignement dans ce cas est plus efficace que l'écran.

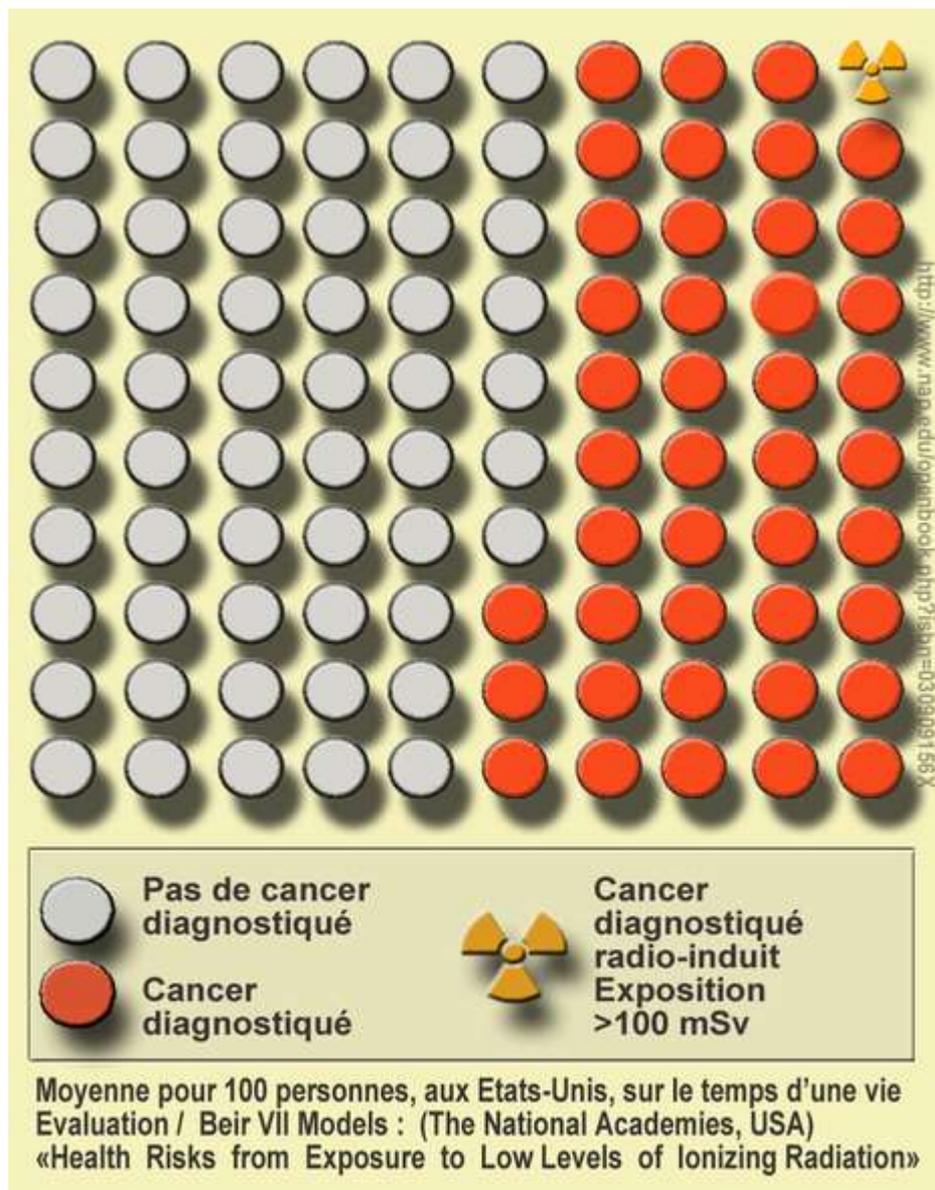
3) DISTINGUER EFFETS DÉTERMINISTES ET EFFETS STOCHASTIQUES

Effets déterministes	Effets stochastiques
cause: mort cellulaire	cause: lésions non réparées de l'ADN
obligatoires	aléatoires
pathologies diverses	cancers et effets génétiques
dose seuil d'apparition: 0,2 - 0,3 Gy	pas de dose seuil d'apparition
manifestation précoce	manifestation tardive
gravité dépendante de la dose	gravité indépendante de la dose
clairement décrits	non spécifiques

Effets déterministes

- Caractéristiques
 - précoces: qqes h à 1 mois
 - réversibles ou létales
 - existe un seuil
 - gravité proportionnelle à la dose >seuil
 - seuil
- | | H (Sv) | Débit (Sv/an) |
|---------------------|--------|---------------|
| testicule stérilité | 4 | 2 |
| ovaire stérilité | 3 | 0,2 |
| cataracte | 5 | 0,15 |
| moelle os | 0,5 | 0,4 |

EFFETS STOCHASTIQUES



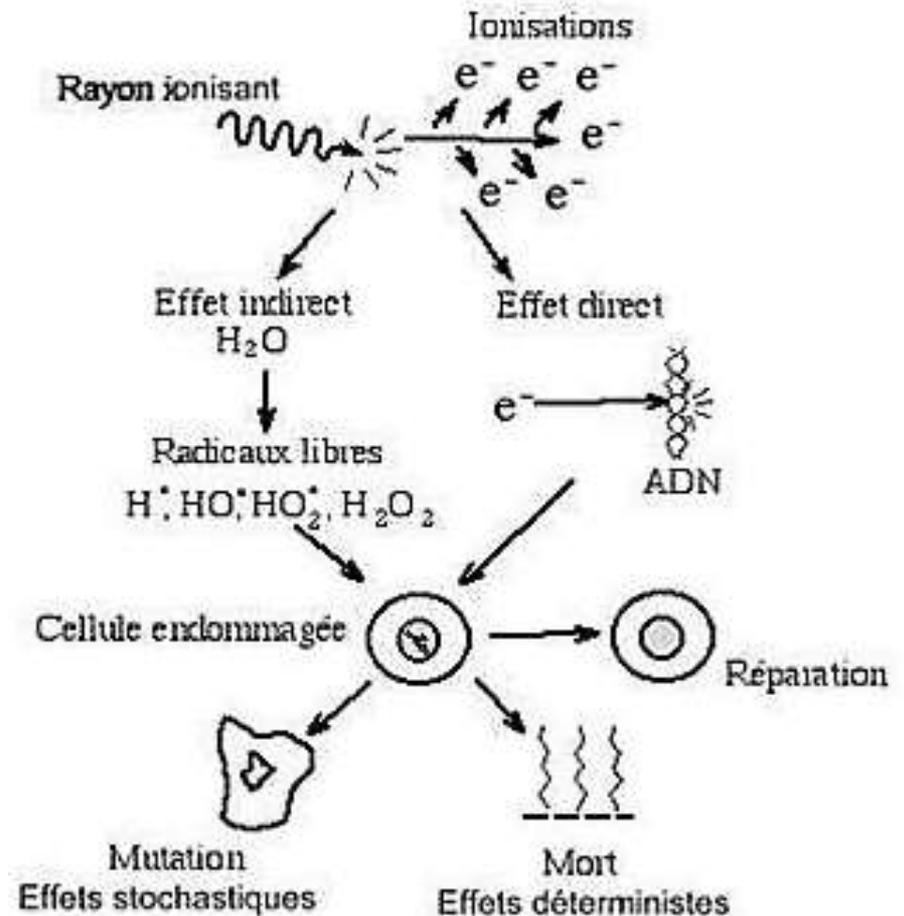
Selon les modèles disponibles en 2006, aux États-Unis, sur 100 personnes, 46 développeront un cancer durant leur vie. D'après le modèle linéaire sans seuil, si ces 100 personnes sont exposées à une dose de 100 mSv, il y aura parmi ces 100 personnes un cancer de plus.

4) QU'ENTEND-ON PAR « EFFET DIRECT » ET « EFFET INDIRECT » DES RAYONNEMENT IONISANTS ?

Réponse :

Effet direct = action directe du rayonnement sur la macromolécule.

Effet indirect = action qui passe par la radiolyse de l'eau, et formation de radicaux libres, qui causent les dommages aux macromolécules.



**5) À QUEL MOMENT DU CYCLE CELLULAIRE,
LES CELLULES SONT LE PLUS
RADIOSENSIBLE, EN PHASE S OU EN PHASE
M ?**

Réponse :

Les cellules sont plus sensibles aux rayonnements dans les phases G2 et M, que dans la phase S.

6) ON OBSERVE L'EFFET DE RAYONNEMENTS SUR DES CELLULES EN CULTURE. UN RAYONNEMENT GAMMA À LA DOSE DE 5 GY, PROVOQUE LA MORT DE 50% DES CELLULES. LE TAUX DE MORTALITÉ SERAIT-IL DIFFÉRENT SI CETTE DOSE DE 5 GY CORRESPONDAIT À UN RAYONNEMENT ALPHA ?

Réponse :

Le taux de mortalité sera plus élevé avec le rayonnement α : (TEL plus élevé et effet biologique relatif « EBR » plus grand).

LE TAUX DE MORTALITÉ SERAIT-IL SUPÉRIEUR OU INFÉRIEUR SI LA MÊME DOSE GAMMA DE 5 GY ÉTAIT DÉLIVRÉE EN UN TEMPS PLUS LONG (UNE SEMAINE AU LIEU DE 1 MINUTE) ?

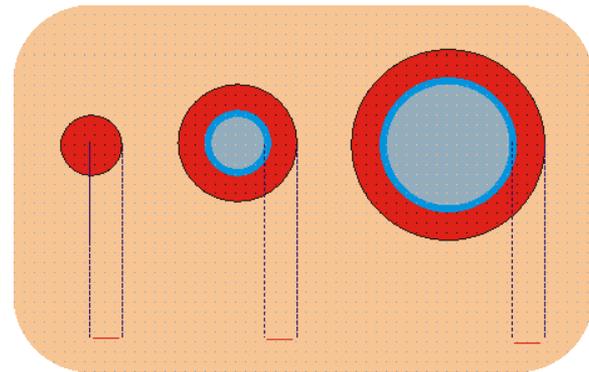
Réponse :

Le taux de mortalité devrait être inférieur si la dose γ de 5 Gy était délivrée en un temps plus long (effet du débit de dose).

7) POURQUOI LE CENTRE D'UNE TUMEUR EST SOUVENT PLUS RÉSISTANT À LA RADIOTHÉRAPIE QUE SA PÉRIPHÉRIE ?

Réponse :

Le centre d'une lésion cancéreuse est souvent plus résistant à la radiothérapie que sa périphérie en raison de l'hypoxie « Effet oxygène »



8) DÉFINIR LA DOSE ÉQUIVALENTE H

Facteurs de pondération

- Facteur de pondération radiologique W_R
 - photons, électrons 1
 - protons 5
 - neutrons 5 à 20
max pour $E=100\text{keV}$ à 2MeV
 - alpha et ions lourds 20

- Dose équivalente

$$H = W_R D \text{ (Sv)}$$

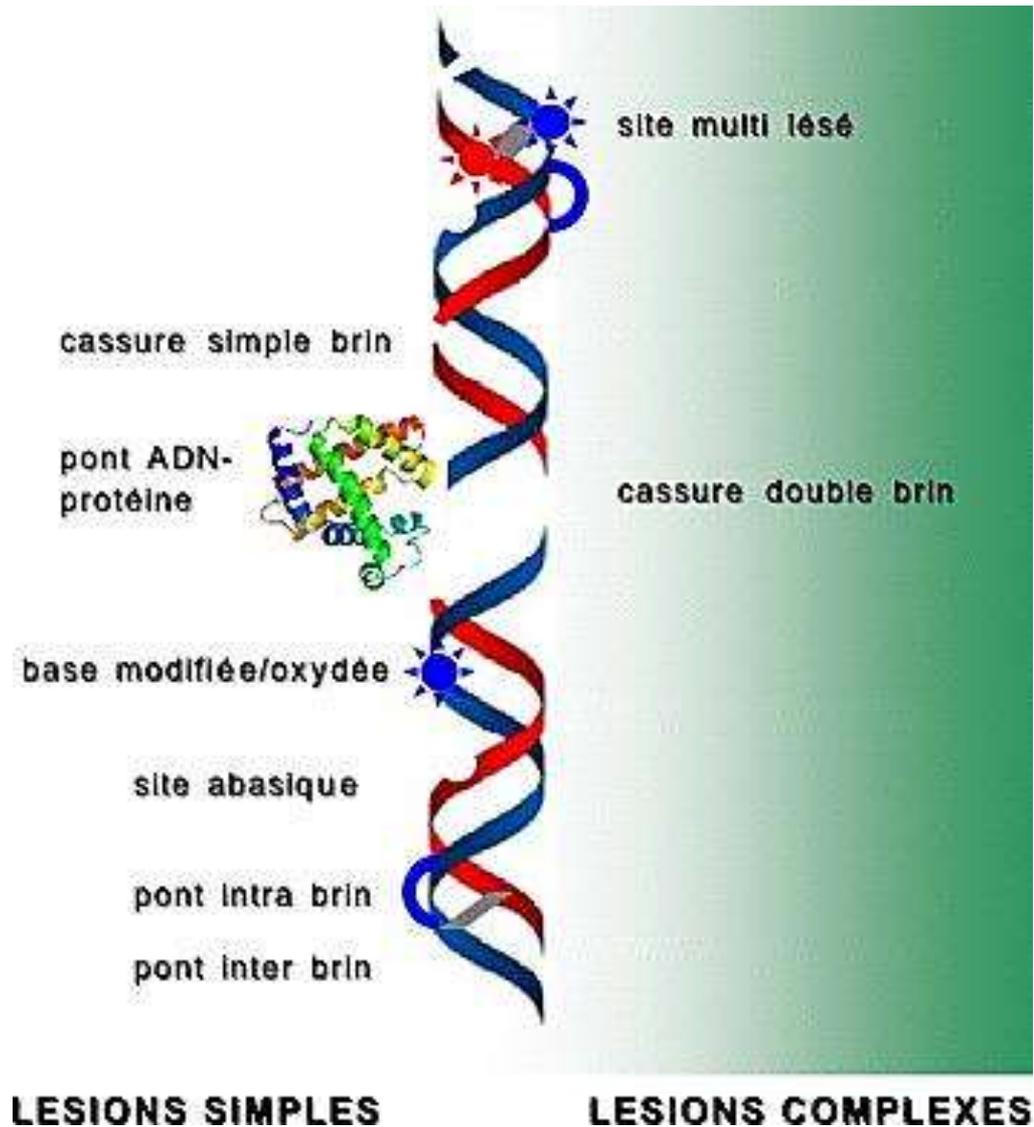
D = dose absorbée

9) DÉFINIR LA DOSE EFFICACE E

$$E = \omega_T \times H \text{ (Sv)}$$

tissu	ω_T
gonades	0,08
moelle osseuse	0,12
côlon	0,12
poumon	0,12
estomac	0,12
vessie	0,04
sein	0,12
foie	0,04
œsophage	0,04
thyroïde	0,04
peau	0,01
surface des os	0,01
glande salivaire	0,01
cerveau	0,01
ensemble des autres tissus	0,12

10) QUELLES ACTIONS ONT LES RI SUR L'ADN ?



11) QUELLES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES PEUT-ON REPÉRER SUR CE DOC ?



Anneau centrique

Dicentrique

Fragments

12) QUELLES SONT LES TROIS PHASES DU SYNDROME D'IRRADIATION GLOBALE AIGUE ?

1) Phase initiale: Prodromes d'ordre neurovégétatif de type:
Neurologique (asthénie, apathie, céphalées...)
Digestif (nausées, vomissement, diarrhées...)

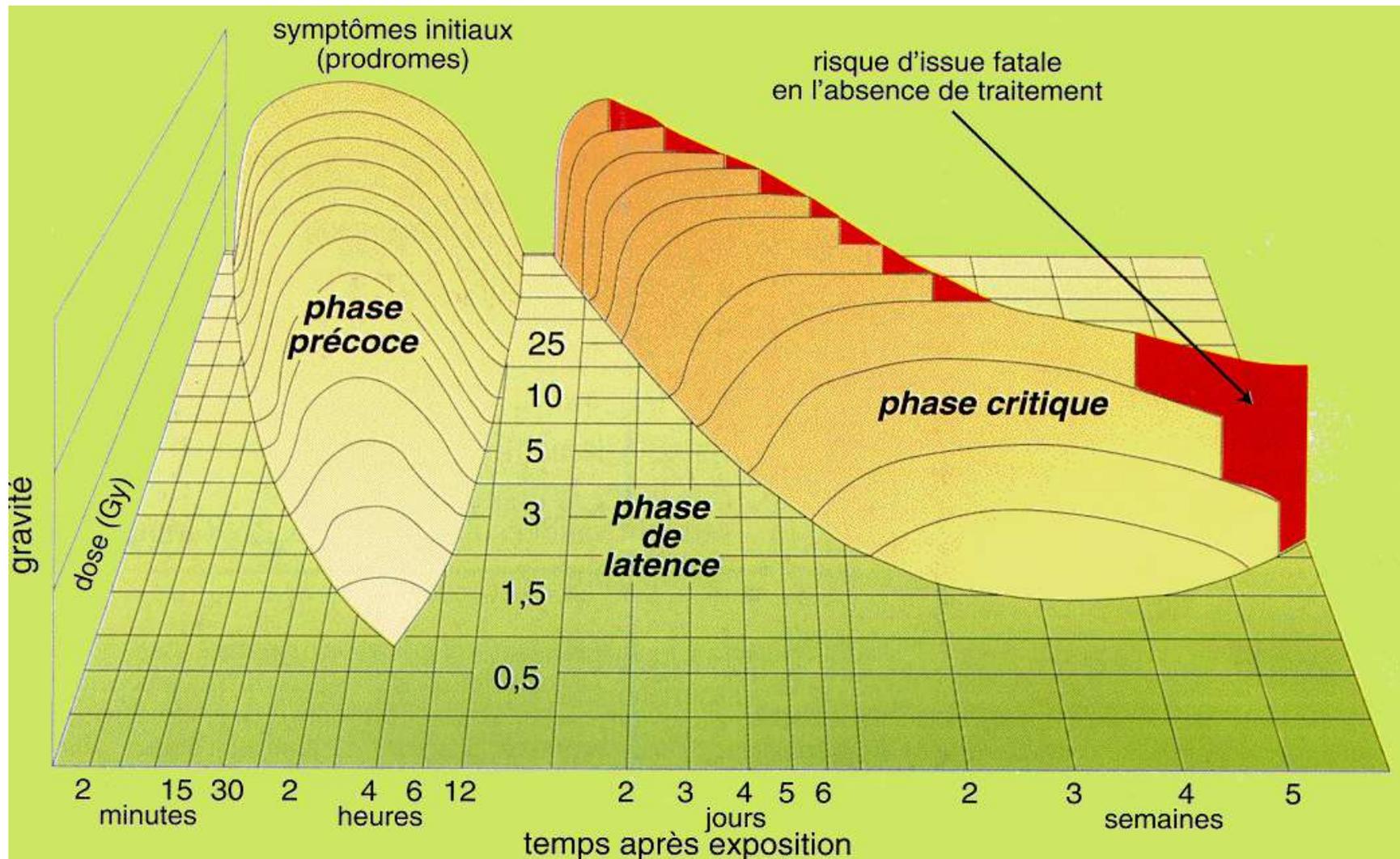
2) Phase de latence clinique

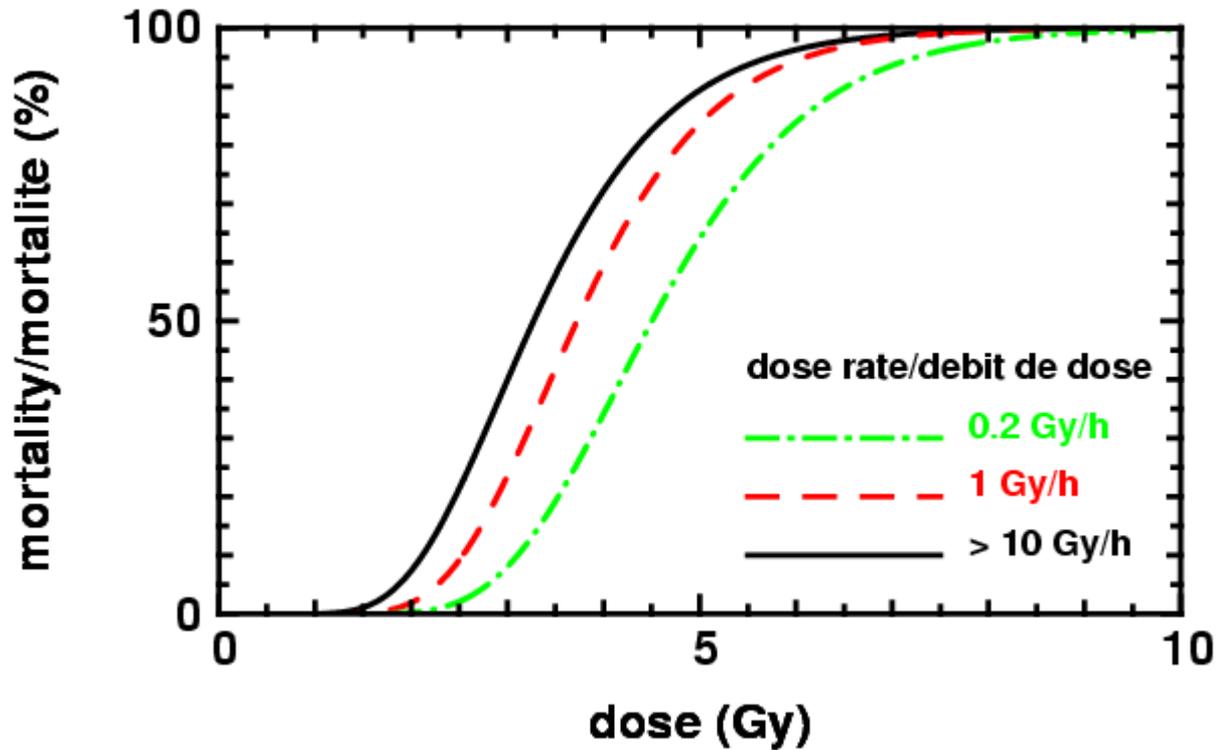
- Les lésions cellulaires sont constituées, mais le délai nécessaire à la manifestation clinique ne s'est pas encore écoulé.
- Phase d'autant plus courte et tardive que l'irradiation a été importante
- Pour des doses >10-15 Gy elle est absente

3) Phase d'état

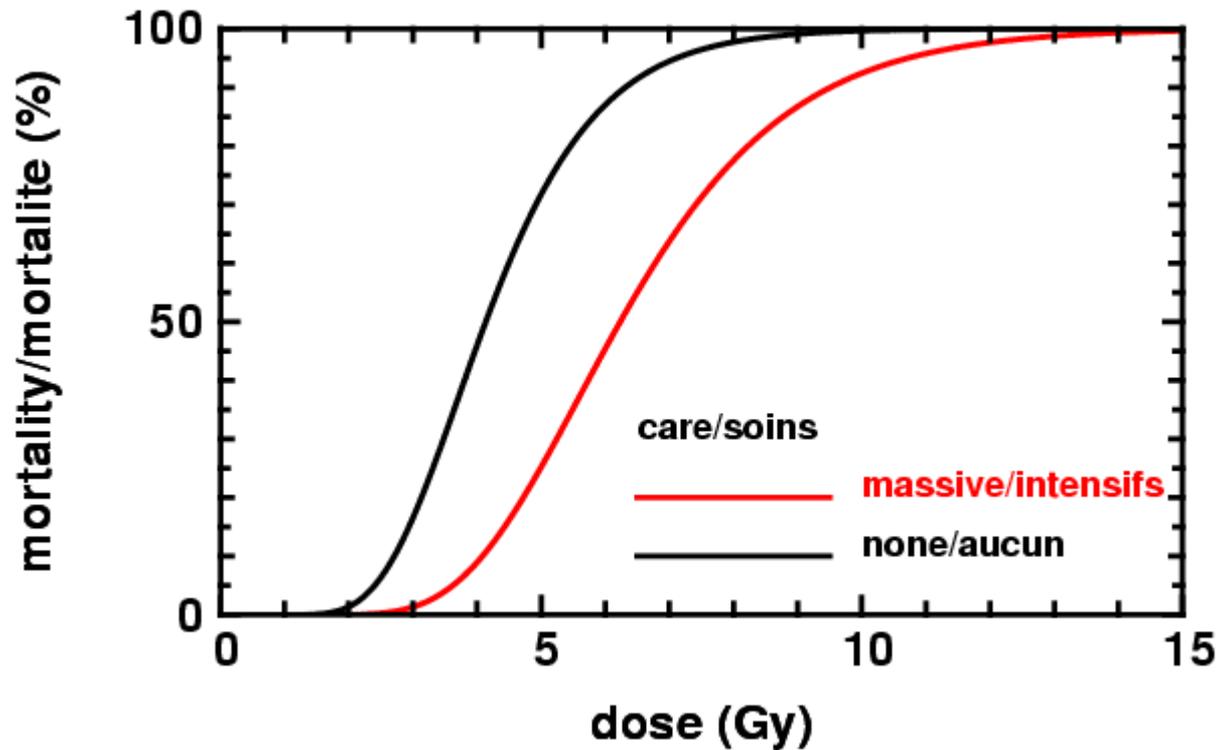
- On distingue 3 syndromes en fonction de la dose, lesquels ?
 - 1) Syndrome nerveux central (dose > 10-20 Gy)
 - 2) Syndrome intestinal (dose > 6 Gy)
 - 3) Syndrome hématologique (dose > 1 Gy)
- + brûlures cutanées

IGA





Influence du débit de dose sur la mortalité de la forme hématopoïétique en l'absence de soins médicaux¹



Influence des soins médicaux sur la mortalité de la forme hématopoïétique.

La courbe est une moyenne sur les débits de dose rencontrés



Syndromes gastro-intestinal et cérébro-vasculaire

Ces formes du syndrome d'irradiation aiguë conduisent à une mort certaine. Les patients nécessitent un traitement palliatif. Des soins symptomatiques peuvent prolonger la durée de vie

QUELLE EST LA DIFFÉRENCE ENTRE LES DEUX MOLÉCULES SUIVANTES : OH⁻ ET OH[•] ?

Réponse :

OH[•] , issu de la radiolyse de l'eau est un radical comportant un électron célibataire. Cette molécule très réactive agit comme agent « oxydant ».

OH⁻ est un ion (surplus d'e⁻ / protons), dans la réaction d'hydrolyse OH a pris les 2 électrons de la liaison.

En raison de leur grande réactivité chimique (OH[•] est accepteur d'électron), les radicaux OH[•] peuvent infliger des lésions importantes au niveau de l'ADN et des protéines.

<http://www.nanobiotix.com/fr/>