

Effets des rayonnements ionisants

LES CONSÉQUENCES MESURABLES AU NIVEAU CELLULAIRE

L'exposition d'un organisme aux rayonnements ionisants a des conséquences mesurables au niveau de l'ADN, mais aussi d'autres structures de la cellule. Après la mise en évidence d'indicateurs de la dose reçue basés sur l'observation des chromosomes atteints, l'évolution des techniques de biologie moléculaire et de leur sensibilité ont permis de développer des indicateurs biologiques d'effet cellulaire. Sans avoir la spécificité des précédents, ceux-ci conduiront à mieux comprendre les effets radio-induits pour aboutir à des facteurs diagnostiques et pronostiques de l'irradiation.



Vue de l'appareillage d'une chromatographie liquide haute pression (HPLC). Ce système d'analyse est utilisé pour séparer des macromolécules organiques complexes (lipides, protéines) qui constituent, par exemple, les membranes cellulaires. Une HPLC peut fournir une indication aidant à mieux comprendre les modifications des propriétés physiques de la membrane cytoplasmique dues aux rayonnements ionisants.



C. Cieutat/IPSN

La nécessité d'indicateurs biologiques d'effet cellulaire

L'exposition des **cellules** aux **rayonnements ionisants** peut avoir des conséquences dommageables au niveau de l'**ADN** et des autres structures cellulaires (encadré D, **La cellule, le maillon essentiel**), des conséquences susceptibles de se répercuter non seulement sur le comportement des cellules voisines mais sur le tissu tout entier, affectant le fonctionnement de l'organisme à plus ou moins long terme. La probabilité des dommages et la rapidité de leurs **effets** dépendent de nombreux facteurs, parmi lesquels la **dose** reçue, le type de rayonnement, le **débit de dose**, la nature et le volume des tissus exposés.

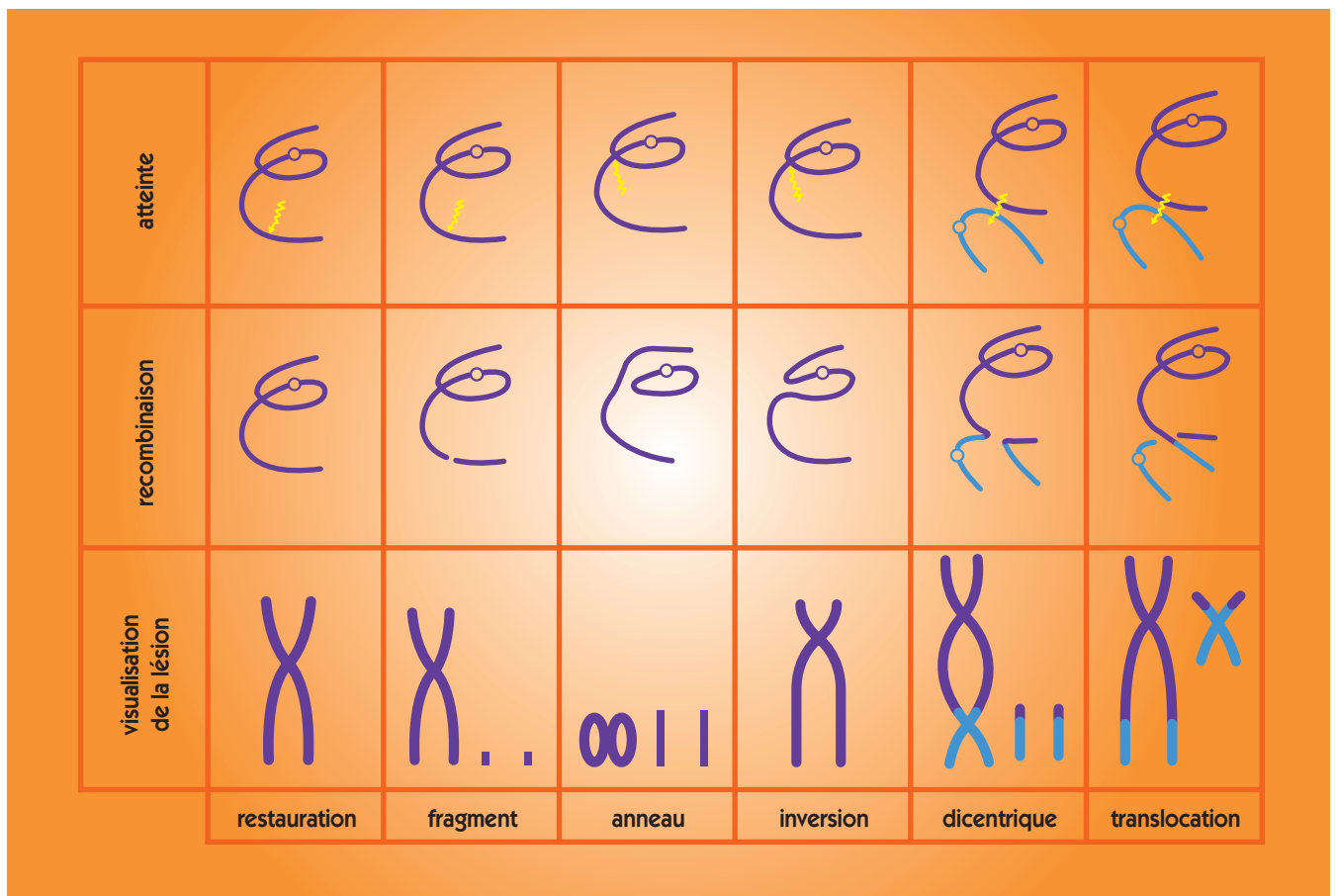
Il est apparu très tôt nécessaire de trouver des paramètres biologiques capables d'évaluer, sinon de quantifier, les atteintes des différentes composantes de l'organisme. L'intérêt de ces paramètres diffère substantiellement en fonction des besoins : risques de dommages génétiques causés par les rayonnements naturels, estimation de la dose reçue en cas de surexposition

accidentelle, effets sur les tissus sains et les **tumeurs** lors de thérapies...

Ces indicateurs sont tenus de posséder certaines qualités intrinsèques : **spécificité**, **facilité** d'obtention et de dosage, **reproductibilité**, **sensibilité** et **stabilité** dans le temps, **effet mémoire** pour la reconstruction *a posteriori* de l'exposition. En outre, la mise en évidence d'une relation entre la dose et l'effet permet de différencier *indicateurs* et *dosimètres* biologiques.

Aucun bio-indicateur actuel ne répond à tous ces critères. Les plus largement développés sont des bio-marqueurs **cytogénétiques** de dose. Les effets des rayonnements ionisants sur l'ADN et leurs conséquences sur la survie cellulaire sont effectivement connus depuis longtemps. L'éventail des dommages **chromosomiques** observés a donné les moyens d'établir différents tests allant jusqu'à la reconstitution *a posteriori* de l'exposition et l'estimation de l'hétérogénéité de la dose. Les dommages physiques provoqués par l'ionisation étant censés se distribuer équitablement dans toutes les structures cellulaires, les effets biologiques correspondants devaient être

● ● ● ● ●
Figure 1. Nature et formation des aberrations chromosomiques radio-induites. Selon la position et le nombre de lésions de l'ADN et en fonction de la qualité de la réparation ou de la recombinaison du chromosome sur lui-même ou avec un autre, soit des chromosomes normaux, soit différents types d'aberrations chromosomiques seront observés.



mesurables ailleurs que sur l'ADN. L'amélioration récente des connaissances, notamment dans le domaine moléculaire, a permis d'identifier des bio-marqueurs de ces effets au niveau de la **membrane cytoplasmique**, des **mitochondries** ou même dans leurs conséquences sur la mort cellulaire (**apoptose**) radio-induite.

Les conséquences mesurables sur l'ADN

Le large spectre des dommages de l'ADN dus aux rayonnements ionisants est la conséquence finale de phénomènes décrits précédemment. Malgré des processus de correction extrêmement efficaces, un nombre réduit d'erreurs peut subsister : les plus importantes s'observent lors de la **métaphase** (encadré E, **Le cycle cellulaire : duplication sous contrôle**). Ces aberrations chromosomiques (figure 1) résultent d'une cassure non réparée (fragment, **délétion**), d'une réparation incomplète du chromosome sur lui-même (**inversion**, anneau centrique) ou d'un échange de matériel entre au moins deux chromosomes (**translocation, dicentrique**).

Avec leurs formes atypiques, les dicentriques et les anneaux centriques sont facilement observables au microscope après coloration simple de l'ADN. Ces aberrations chromosomiques favorisent l'élimination de la cellule concernée. Elles sont dites *instables*. Par opposition, les inversions et les translocations, dont la forme ne diffère pas *a priori* de celle d'un chromosome normal, sont capables de "passer" la division cellulaire et sont dites *stables*. Leur visualisation nécessite une coloration spécifique. Les fragments, résultant aussi de **mutagènes** chimiques, ne sont pas caractéristiques des rayonnements ionisants. Ils sont susceptibles d'être éliminés directement sous forme de micronoyaux intra-cytoplasmiques, dont la fréquence constitue un précieux indicateur d'effet mutagène. Enfin, un artifice expérimental permet d'observer l'apparition des aberrations chromosomiques radio-induites dans les heures voire les jours qui suivent l'irradiation, sans culture cellulaire préalable. Plus qu'un moyen de mesure des effets, l'observa-

Un système d'analyse d'images performant

Que ce soit pour l'établissement de courbes de référence par des expérimentations *in vitro* ou l'estimation de doses en cas d'irradiation accidentelle ou pour la recherche, l'observation des dicentriques ou des translocations s'effectue sur des centaines de cellules. Pour s'aider dans cette tâche fastidieuse, le LDBM se sert d'un système d'analyse d'images, adapté à la dosimétrie biologique en collaboration avec la société française qui l'a développé. Dans une station de travail type, les lames à observer sont placées sur une platine motorisée qui permet de trouver (ou retrouver) les lymphocytes en état de métaphase, à

l'aide d'une caméra à mise au point automatique. Le positionnement des chromosomes en métaphase est assuré par un contrôleur raccordé à un ordinateur. Des tests de validation ont montré que l'automate trouvait au moins 80 % des stades de métaphase utilisables pour la cytogénétique conventionnelle ou la fluorescence. Une assistance logicielle aide au dénombrement, semi-automatique, des aberrations chromosomiques. Le gain en vitesse apporté par le système est de 2 à 4 par rapport au dénombrement manuel, compte tenu de la qualité des préparations et de la dose d'irradiation.



C. Cleutat/IPSN

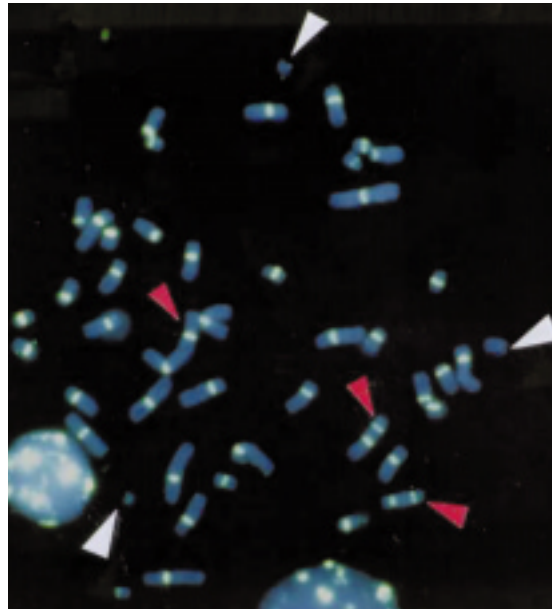
tion de ces chromosomes prématurément condensés (PCC) reste une méthode sophistiquée de compréhension des mécanismes de réparation.

Seuls certains aspects de ces techniques développées au Laboratoire de dosimétrie biologique multiparamétrique de l'Institut de protection et de sûreté nucléaire (LDBM/IPSN) seront ici abordés (encadré).

Le dicentrique, indicateur spécifique de l'irradiation cellulaire

Lors d'une irradiation accidentelle, la dose reçue est évaluée par le dénombrement des anomalies chromosomiques instables dans les **lymphocytes**, à partir d'un simple prélèvement de sang. Une

Microphotographie du noyau d'un lymphocyte fortement irradié, mis en culture dans un milieu approprié et bloqué au stade de la métaphase (grossissement x 1 000). Des aberrations chromosomiques, dicentriques (flèches roses) et fragments (flèches blanches), sont observées.



IPSN

courbe dose-effet (figure 2) fait correspondre à la fréquence d'aberration enregistrée une dose d'irradiation à la moelle osseuse. Ces courbes sont établies par l'irradiation *in vitro* de prélèvements sanguins et différent selon le type de rayonnement. Le débit de dose importe aussi, notamment pour les rayonnements de faible énergie (gamma, X). La précision de l'estimation est fonction du nombre de métaphases observées. Trente ans de recherches ont montré qu'en dehors de quelques produits chimiques tels que la bléomycine (un antibiotique), les rayonnements ionisants étaient seuls responsables de l'apparition des dicentriques. Leur fréquence de formation spontanée dans la population française

est de l'ordre de 1 pour 1 500 cellules et ne varie pas significativement avec l'âge, le sexe et le tabagisme.

Après une irradiation globale *homogène*, la fréquence des anomalies chromosomiques dans les lymphocytes sanguins se maintient sans grand changement pendant plusieurs mois. En revanche, suite à une irradiation *hétérogène*, lymphocytes irradiés et non irradiés se mélangent rapidement. D'où une sous-estimation des dommages locaux radio-induits par l'effet de la dilution, partiellement corrigible par des modèles mathématiques basés sur la cinétique de disparition des aberrations avec le temps.

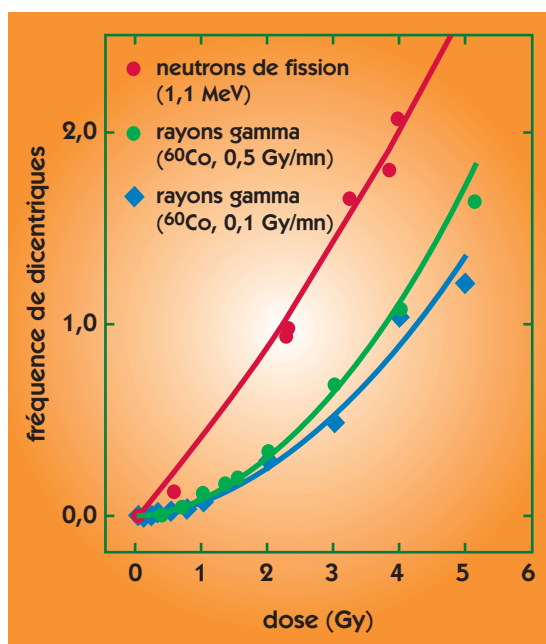
Les cas de suspicion d'exposition aux rayonnements auxquels cette méthode est appliquée restent rares, en France comme ailleurs : moins de 200 cas ont été analysés par l'IPSN ces huit dernières années, que ce soit chez les travailleurs, directement ou indirectement exposés dans l'industrie, la recherche et la santé, ou dans le public. Pour la majorité des cas, cette expertise a permis de rassurer les sujets sur l'absence d'irradiation significative.

La translocation, indicateur spécifique des irradiations anciennes ?

L'irradiation accidentelle doit parfois être évaluée après des années, en particulier chez les survivants d'Hiroshima et Nagasaki (Japon, 1945) et les "liquideurs" de Tchernobyl (Ukraine, 1986). Une analyse des aberrations chromosomiques stables telles que les translocations n'était, jusqu'à présent, pratiquée qu'avec une technique de marquage lourde et difficile. Une méthode récente née de la biologie moléculaire et adaptée à la dosimétrie biologique, l'hybridation *in situ* fluorescente (*Fluorescent In Situ Hybridation*, FISH), a grandement simplifié leur détection et s'applique systématiquement aux irradiations anciennes. Elle permet de révéler des zones particulières sur les chromosomes ou de les marquer sélectivement dans leur totalité (*painting*). Les techniques FISH sont d'ailleurs utilisées en clinique pour détecter des anomalies héréditaires ou acquises. Elles visent à réaliser une association moléculaire



Figure 2. Relations dose-effet établies au LDBM en dénombrant les dicentriques induits dans les lymphocytes du sang périphérique, après irradiation *in vitro* de sang normal par des rayonnements ionisants de divers types, à différents débits de dose. Pour une même dose d'irradiation, le nombre d'aberrations produit par les rayonnements de forte énergie (neutrons) est plus important que pour ceux de faible énergie (gamma, X). En outre, l'effet du débit de dose s'atténue considérablement lorsque le rayonnement est de forte énergie (neutrons, ions lourds).

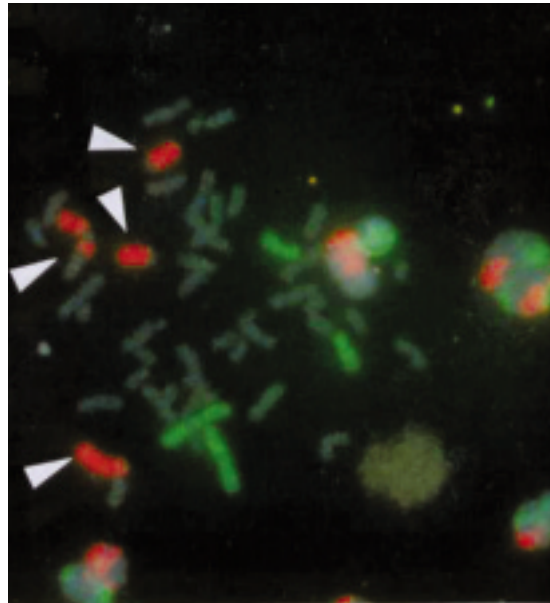


(hybridation) entre des **séquences** artificielles d'ADN simple **brin**, spécifiques des zones chromosomiques que l'expérimentateur désire mettre en évidence, et les chromosomes de métaphase étalés sur une lame de microscope. La visualisation du signal fluorescent se fait au niveau des zones hybridées. Compte tenu des marqueurs disponibles, seules deux ou trois des 23 paires de chromosomes humains sont généralement marquées.

Des courbes reliant la fréquence de translocations avec la dose d'irradiation ont été établies *in vitro* comme pour les dicentriques. Globalement, les résultats obtenus en fonction de la **qualité de rayonnement** et du débit de dose sont très proches. Quoique dans son principe l'évaluation des translocations ne soit pas récente, leur facilité de détection par FISH a soulevé de nouvelles questions. Quelle est leur spécificité par rapport aux rayonnements ionisants ? Le taux basal de translocation augmente-t-il avec l'âge et avec des facteurs tels l'alcoolisme ? Quelle est, surtout, la stabilité effective des translocations dans le temps ? L'IPSN réalise des études systématiques, notamment sur les accidents anciens, afin de connaître la réelle validité de cette approche.

Les chromosomes prématurément condensés

La technique des PCC repose sur la possibilité de visualiser les chromosomes sans culture préalable, par fusion cellulaire. À partir d'un prélèvement sanguin, des lymphocytes sont fusionnés avec des cellules en division d'une **lignée** d'ovaire de hamster chinois : les substances qu'elles libèrent induisent une dissolution de la membrane du **noyau** et une condensation prématurée des chromosomes lymphocytaires sous forme d'un simple brin individuel, la **duplication** de l'ADN n'ayant pas encore eu lieu. Les aberrations chromosomiques prennent la forme de fragments excédentaires, d'où un nombre d'objets supérieur aux 46 chromosomes d'une cellule humaine normale. Une relation linéaire est établie entre ce nombre et la dose d'irradiation. Contrairement à la cytogénétique conventionnelle qui n'auto-



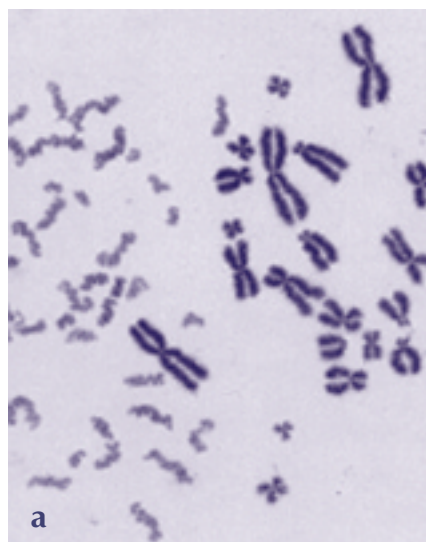
IPSN

rise l'observation que des lymphocytes ayant atteint la métaphase, cette technique s'adresse à un échantillonnage aléatoire de cellules. Cette méthode, plus rapide que le dénombrement des dicentriques, permet en outre d'étudier la cinétique et le rendement de réparation de l'ADN, en choisissant précisément le laps de temps entre l'irradiation et la fusion cellulaire. Des courbes dose-effet réalisées pour le rayonnement gamma montrent que, pour une même dose, le nombre de fragments excédentaires radio-induits diminue très rapidement durant les premières 24 heures, puis de plus en plus lentement durant les 48 heures suivantes. D'autres expériences ont mis en évidence que la variation de température de l'échantillon de sang entre le prélèvement et l'analyse

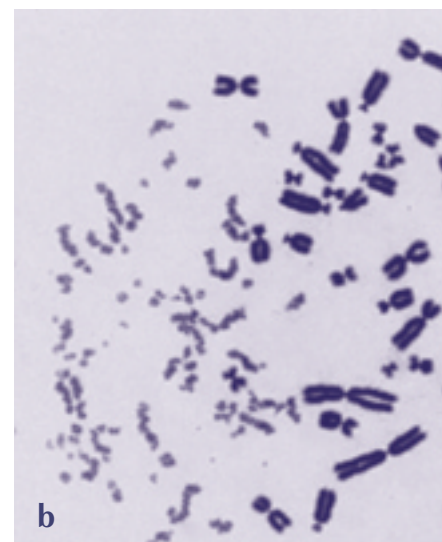
Microphotographie en fluorescence d'une métaphase de lymphocyte irradié dans laquelle trois paires de chromosomes ont été colorées par des sondes d'ADN spécifiques, à l'aide de la technique FISH triple peinture. Les paires de chromosomes 2 et 12 sont en vert et la paire de chromosomes 4 en orange. Les autres chromosomes ont été rendus visibles par la fixation d'un colorant fluorescent non spécifique. Les flèches indiquent les portions de chromosome 4 qui ont été coupées sur les parties peintes et insérées sur un chromosome non peint (grossissement x 1 500).



La fusion entre une cellule d'ovaire de hamster chinois entretenue en lignée et bloquée au stade de la métaphase (à droite de chaque microphotographie) et un lymphocyte au repos, un non irradié en a et un irradié (rayons gamma ^{60}Co , 4 Gy, 0,5 Gy/mn) en b, provoque la condensation prématurée des chromosomes sous forme de brins simples d'ADN (à gauche de chaque microphotographie). L'irradiation se traduit par des cassures de l'ADN conduisant à des fragments surnuméraires aux 46 brins d'ADN que comporte une cellule humaine normale.



IPSN



n'a pas d'influence sur les résultats. La technique des PCC est appliquée aux irradiations accidentelles expertisées par l'IPSN, parallèlement à la cytogénétique conventionnelle, afin d'en connaître la faisabilité et les limites.

Les conséquences sur d'autres constituants

Des travaux récents ont confirmé le rôle essentiel de la membrane et d'autres constituants cellulaires dans l'apoptose radio-induite. La composition chimique de la membrane en fait une cible privilégiée des radicaux libres produits par l'énergie déposée, conduisant à des perturbations précoces, plus ou moins durables, de sa structure et de ses fonctions. Or, la membrane joue un rôle au niveau de l'interface sur le transfert des signaux vers le noyau et donc sur les fonctions cellulaires. Ses dommages radio-induits peuvent avoir des conséquences susceptibles d'aboutir au stade ultime de l'apoptose.

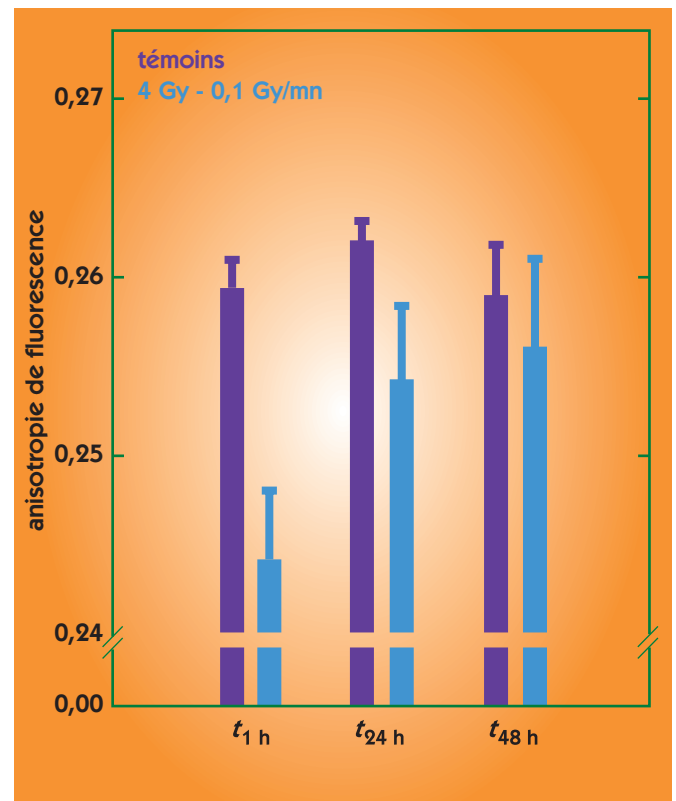
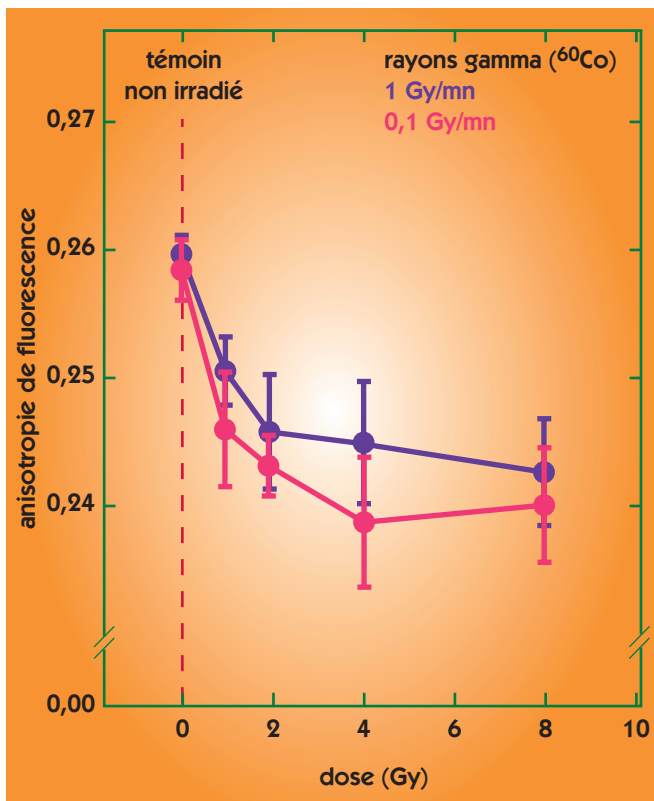
Dans cette cascade d'événements, trois mécanismes semblent appropriés pour devenir des indicateurs de l'effet cellulaire des rayonnements ionisants : les modifications des propriétés physiques de la membrane ; la libération, précé-

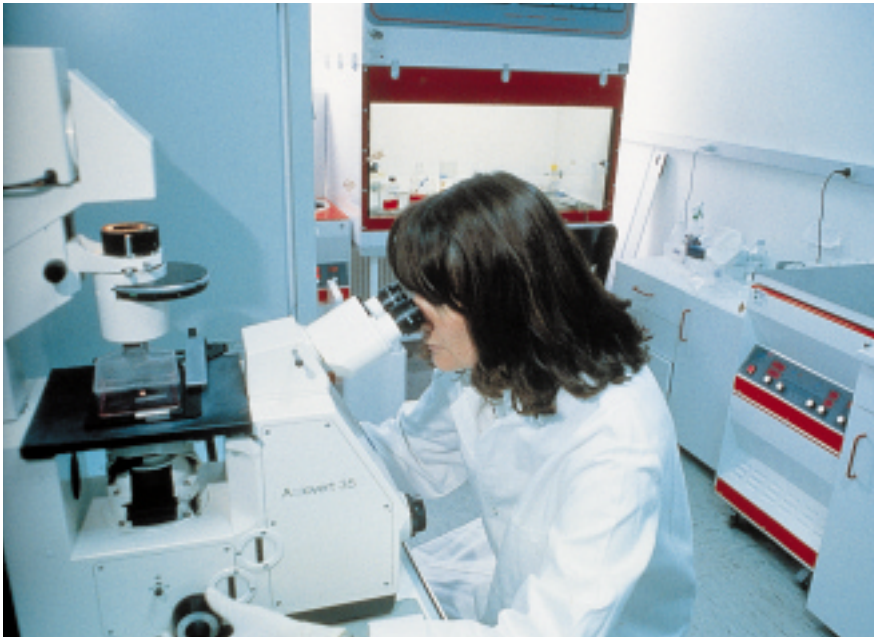
dant l'apoptose, de certains composés dans le milieu extracellulaire, suite à la perte d'intégrité de la membrane, et l'apoptose elle-même.

La fluidité membranaire

Les molécules qui composent la membrane se déplacent, séparent ou en groupe, selon des mouvements latéraux, transversaux et de rotation. Cette fluidité est en fait étroitement contrôlée, les propriétés fonctionnelles de la cellule dépendant pour partie de la faculté de la membrane à rester thermodynamiquement stable. Pour apprécier les modifications biophysiques de la membrane, le LDBM a retenu une technique fondée sur l'incorporation spécifique de molécules fluorescentes, soit dans le compartiment lipidique, soit à l'interface lipide-protéine. Éclairées avec une lumière polarisée, ces sondes renvoient une lumière fluorescente, en fonction de leur capacité de mouvement, dans une direction plus ou moins différente de celle de la lumière incidente. La comparaison de l'intensité de la fluorescence de la lumière polarisée incidente avec celle de la lumière dépolarisée réémise traduit le mouvement des sondes et permet d'évaluer un para-

● ● ● ● ●
 Figure 3. À gauche, évolution du paramètre caractérisant la fluidité de la membrane en fonction de la dose reçue par des lymphocytes sanguins pour divers débits de dose, après incorporation d'une sonde fluorescente dans la partie lipidique de la membrane. Les relations dose-effet montrent que la fluidité membranaire augmente avec la dose, puisque l'anisotropie de fluorescence diminue, traduisant une dégradation de l'environnement lipidique de la sonde. Cette dégradation apparaît d'autant plus importante que le débit de dose est plus faible. À droite, les altérations membranaires persistent jusqu'à 48 heures après l'irradiation.





C. Cieutat/IPSN



Observation d'une préparation à l'aide d'un microscope inversé. Dans ce cas, l'éclairage se fait par dessus la préparation, alors que les objectifs se trouvent au-dessous de la platine. Ce système est particulièrement adapté pour examiner les boîtes où sont réalisées les cultures de cellules.

mètre caractérisant la fluidité de la membrane : l'anisotropie de fluorescence.

Le laboratoire a d'ores et déjà démontré, sur des cellules vivantes, la possibilité d'apprécier des modifications biophysiques de la membrane après irradiation à des doses relativement faibles, de 0 à 8 Gy (figure 3). La fluidité membranaire varie proportionnellement à la dose reçue et inversement au débit de dose, quelle que soit la sonde. La membrane s'organise en micro-domaines réagissant différemment. Le compartiment lipidique de la membrane deviendrait plus fluide, cette fluidité variant en fonction de la profondeur considérée dans la membrane, alors que l'interface lipide-protéine deviendrait plus rigide. L'effet peut persister jusqu'à 48 heures après l'irradiation. Cette technique est applicable à plusieurs types cellulaires : lymphocytes, **hématies**, **fibroblastes** ou même cellules intestinales. Cependant, les expérimentations n'ont pour le moment porté que sur des modèles *in vitro* provenant de sang humain ou de cultures de cellules irradiées. Leurs résultats restent à confirmer sur divers modèles *in vivo*.

L'apoptose radio-induite

Trois techniques ont été appliquées simultanément sur les mêmes échantillons biologiques pour estimer l'apoptose radio-induite à différents stades de

l'évolution de la cellule vers sa mort programmée :

- le **marquage fluorescent à l'annexine V** permet d'apprécier le passage, par diffusion transversale, de la phosphatidylsérine, de la face interne de la membrane qu'elle occupe normalement à la face externe en situation d'apoptose ;
- le **marquage au DiOC₆**, molécule fluorescente pénétrant spécifiquement dans la mitochondrie et dont la variation d'intensité conduit à déterminer la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial se manifestant au cours de l'apoptose ;
- le **test du FADU (Fluorescence Analysis of DNA Unwinding)**, méthode de spectrofluorimétrie, donne la possibilité d'évaluer la dégradation des propriétés de l'ADN directement liée au nombre de cassures de brins radio-induites.

Des études *in vitro* sur du sang humain irradié mis en culture ont montré, sur la population lymphocytaire, des relations dose-effet persistant au moins jusqu'à 7 jours après l'irradiation. Les deux premières techniques fournissent des résultats reproductibles et comparables. Une deuxième étude *in vivo*, portant sur des rats pour lesquels des prélèvements sanguins ont été effectués à différents moments après l'irradiation, a mis en évidence que la détection de l'apoptose radio-induite est possible jusqu'à 48 heures après en utilisant le marquage mitochon-

drial. Les deux autres méthodes ne sont applicables que dans les heures qui suivent l'irradiation.

La différence entre les résultats *in vitro* et *in vivo* s'explique à la lumière de la cascade d'événements à l'origine de l'apoptose. Les expériences indiquent que l'exposition de la phosphatidylsérine à l'extérieur de la membrane, signal d'élimination des cellules apoptotiques par les **macrophages**, se produit *in vivo* dans les 48 heures suivant l'irradiation. Par contre, l'élimination des cellules apoptotiques *in vitro* n'a pas lieu, en l'absence de macrophages dans la suspension cellulaire. C'est pourquoi le même phénomène est observé beaucoup plus longtemps.

À terme, l'ensemble de ces méthodes d'investigation doit permettre de dresser un tableau complet et multiparamétrique des effets des rayonnements ionisants sur la cellule et l'organisme. Une adaptation de certaines de ces techniques à des cellules autres que les cellules sanguines est envisagée pour répondre plus spécifiquement au problème de l'irradiation localisée. ●

Philippe Voisin

Département de protection de la santé de l'homme et de dosimétrie
Institut de protection et de sûreté nucléaire
Fontenay-aux-Roses