

IRSN

INSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

AKTIS

L'actualité de la recherche à l'IRSN

N° **20**
avril-juin 2015

FOCUS

DU PROGRÈS *dans la compréhension*
des EFFETS AUX TISSUS *sains*
après une RADIOTHÉRAPIE externe

AVANCÉES

La théorie DEB pour
comprendre les effets
des faibles doses
chroniques
sur le vivant

FORMATION

Mise en suspension
de particules
radioactives, filtres
THE et incendie

LORSQUE LA FINALITÉ APPELLE LA RECHERCHE FONDAMENTALE



© IRSN/Matthieu Schuler

Alors que toutes les portes de la compréhension des mécanismes biologiques après une exposition aux rayonnements sont loin d'être ouvertes, le focus de ce numéro illustre comment l'IRSN revisite l'un des paradigmes de la radioprotection qui est la construction de la dose (en Gray), indicateur issu de la physique à mettre en regard d'effets biologiques puis sanitaires éventuels. Le système international de radioprotection a d'ores et déjà pris en compte le fait que des rayonnements différents n'avaient pas le même effet biologique relatif en introduisant des facteurs correctifs qui permettent de gérer avec prudence le risque selon la nature du rayonnement. Mais cela ne remplace pas la compréhension des mécanismes, indispensable à terme pour appréhender avec justesse le lien entre exposition et risque.

Avec le projet Rosiris, physiciens, biologistes et mathématiciens œuvrent ensemble afin de progresser avec détermination vers une compréhension fine des mécanismes à l'œuvre, permettant seule de revisiter – dans un sens ou dans l'autre – les règles de gestion du risque radiologique.

Cette part de recherche fondamentale, appliquée, expérimentale ou comme on voudra bien la nommer ne se décrète pas, elle se constate au vu des questions scientifiques soulevées par les finalités qui peuvent se heurter à des verrous cognitifs qu'il faudra bien lever, seul ou le plus souvent par des projets mobilisant l'intelligence collective de plusieurs communautés scientifiques.

Parfois sommé de se situer entre deux feux opposant recherches fondamentale et appliquée – l'une étant censée être plus pure, plus efficace, plus novatrice, et l'autre applicative et ancrée dans, voire limitée par, les réalités de terrain –, l'IRSN ne veut pas s'en tenir à un choix entre les deux et se concentre actuellement sur la formulation des questionnements scientifiques qui se posent à lui. Ce sont eux les déterminants de sa stratégie scientifique.

Parfois sommé de se situer entre deux feux opposant recherches fondamentale et appliquée – l'une étant censée être plus pure, plus efficace, plus novatrice, et l'autre applicative et ancrée dans, voire limitée par, les réalités de terrain –, l'IRSN ne veut pas s'en tenir à un choix entre les deux et se concentre actuellement sur la formulation des questionnements scientifiques qui se posent à lui. Ce sont eux les déterminants de sa stratégie scientifique.

Matthieu Schuler,

Directeur de la stratégie, du développement et des partenariats

Aktis est la lettre d'information scientifique de l'IRSN. Elle présente les principaux résultats de recherches menées par l'Institut dans les domaines de la radioprotection, de la sûreté et de la sécurité nucléaire. Trimestrielle et gratuite, elle existe aussi en version électronique sur abonnement. Éditeur IRSN - standard : +33 (0)1 58 35 88 88 - www.irsn.fr - Directeur de la publication : Jacques Repussard - Directeur de la rédaction : Matthieu Schuler - Rédactrice en chef : Sandrine Marano - Comité de lecture : Giovanni Bruna, Matthieu Schuler - Comité éditorial : Gauzelin Barbier, Giovanni Bruna, Aleth Delattre, Jean-Michel Evrard, Christine Gouedranche, Pascale Monti, Audrey de Santis, Matthieu Schuler - Rédaction : Sandrine Marano, Isabelle Bellin/Technoscope - Réalisation : www.groupepougeville.fr - 51904 Impression : Idéale Prod, certifiée Imprim'Vert - ISSN : 2110-588X - Droits de reproduction sous réserve d'accord de notre part et de mention de la source. Conformément à la loi N° 2004-801 du 6 août 2004 relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements de données à caractère personnel et modifiant la loi N° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, tout utilisateur ayant déposé des informations directement ou indirectement nominatives, peut demander la communication de ces informations et les faire rectifier le cas échéant.



SOMMAIRE

ÉDITO

Matthieu Schuler

AVANCÉES DE LA RECHERCHE

PAGE 3

- La théorie DEB pour comprendre les effets des faibles doses chroniques sur le vivant

FOCUS

PAGE 6

Du progrès dans la compréhension des effets aux tissus sains après une radiothérapie externe

FORMATION PAR LA RECHERCHE

PAGE 12

- Mise en suspension de particules radioactives, filtres THE et incendie

VIE DE LA RECHERCHE

PAGE 14

- Projets
- Événement
- Recherche
- Soutenances

Glossaire ^{GL0}

PAGE 16

Photo de couverture - Visualisation de foci sur des noyaux de cellules HUVEC irradiées. Image reconstituée, voir image initiale p. 9. © IRSN/Géraldine Gonon

LA THÉORIE DEB *pour comprendre les effets des FAIBLES DOSES CHRONIQUES sur le vivant*

Les risques pour la santé et l'environnement résultant d'expositions à de faibles doses de stresseurs (radioéléments^{GLO}, radionucléides^{GLO}, polluants chimiques) ne sont pas encore suffisamment caractérisés, alors que la société montre des préoccupations à leur égard. L'IRSN s'est attaché, à travers plusieurs thèses, à paramétrer la théorie du budget énergétique dynamique (DEB) vis-à-vis d'espèces représentatives de la biodiversité environnementale, afin de tester l'existence d'une transmission de dommages au fil des générations et de mettre en évidence des biomarqueurs, signaux précurseurs des effets toxiques après une exposition chronique à de faibles doses.

Dans une première phase, cette théorie a été appliquée pour une exposition à de l'uranium, en vue de l'élargir à d'autres types d'expositions, notamment à de faibles doses de rayonnements externes.

L'uranium est un composé qui peut être rejeté dans les effluents des installations du cycle du combustible nucléaire ou autour des anciens sites miniers, ce qui a motivé un ensemble de travaux de l'IRSN sur sa toxicité et son écotoxicité. Les acquis mettent notamment en évidence la prédominance de la toxicité chimique – en tant que métal lourd – de ce radioélément, permettant de faciliter les travaux expérimentaux en utilisant de l'uranium appauvri⁽¹⁾. Afin de progresser dans la connaissance de l'effet des faibles doses en exposition chronique, l'IRSN a conduit trois thèses d'approfondissement des effets générationnels sur des espèces d'invertébrés (présentant un cycle de reproduction rapide). Il s'agissait de tester l'existence d'une transmission de dommages et d'une aggravation des effets au fil des générations et à mettre en évidence des biomarqueurs, signaux précurseurs des effets toxiques. Une des approches employées par les trois doctorants repose sur la théorie du Budget Énergétique Dynamique ou DEB^{GLO}, communément utilisée en écologie et en écotoxicologie des polluants non radioactifs (métaux, pesticides, etc.). Cette approche permet d'analyser le fonctionnement métabolique d'organismes de leur naissance à leur mort et permet *in fine* d'étudier l'effet de stresseurs sur la dynamique d'une population. Elle est fondée sur une description simple mais réaliste de la façon dont un organisme utilise l'énergie issue de la nourriture pour réaliser ses fonctions biologiques majeures. Sa version appliquée à l'écotoxicologie, le DEBtox,

permet de comprendre les effets d'un toxique sur les organismes en observant les perturbations sur la survie, la croissance et la reproduction et en identifiant les processus métaboliques affectés.

Concrètement, les différents processus biologiques ainsi que leurs interactions au sein des organismes, sont décrits dans un modèle informatique, paramétré à l'aide des données expérimentales (proportion de survivants, taille, ponte), acquises au fil de la vie d'organismes témoins (non exposés) ou exposés à différentes concentrations du polluant étudié. Comparativement aux approches statistiques communément utilisées, cette modélisation dite mécanistique ouvre la voie à des extrapolations robustes (vers d'autres temps d'exposition, d'autres concentrations d'exposition, d'autres espèces) sans avoir à multiplier les expériences. Les espèces étudiées par l'IRSN, le ver nématode *Caenorhabditis elegans* et le crustacé d'eau douce *Daphnia magna*, sont représentatives des écosystèmes terrestre et aquatique. Elles ont été choisies pour leurs cycles de vie courts (respectivement 3 et 10 jours) permettant de mener des études sur plusieurs générations dans un laps de temps de quelques semaines.

Déclin de la croissance et de la reproduction

Une première thèse, soutenue par Sandrine Massarin fin 2010, a mis en évidence que l'assimilation de la nourriture est inhibée pour les

 Ineris
UMR 7294
de l'université
de la Méditerranée;
UMR 5805
de l'université
de Bordeaux

CONTACTS

Frédéric Alonzo
frédéric.alonzo
@irsn.fr

Jean-Marc Bonzom
jean-marc.bonzom
@irsn.fr

Laboratoire
d'écotoxicologie des
radionucléides - Leco

⁽¹⁾ Pour leurs recherches, les scientifiques utilisent de l'uranium appauvri qui est produit lors de l'enrichissement et du retraitement de l'uranium, principal combustible des réacteurs nucléaires. Il est 40 % moins radioactif que l'uranium naturel et sa toxicité chimique en tant que métal lourd est comparable à celle de l'uranium naturel. La toxicité chimique de l'uranium appauvri est considérée comme plus dangereuse pour l'environnement que sa toxicité radiologique.



Après exposition à différentes concentrations en uranium appauvri, les vers sont stimulés tactilement pour vérifier s'ils sont vivants ou non. On peut apercevoir plusieurs puits remplis d'une gélose. Les *C. elegans* vivent à la surface de la gélose et se nourrissent de bactéries. Dans le cadre de nos travaux (thèse de B. Goussen), la gélose est contaminée ou non avec de l'uranium appauvri.

© IRSN/Jean-Marc Bonzom

daphnies exposées à l'uranium appauvri sur trois générations (pour une durée d'exposition totale d'environ 70 jours). Elle a montré, à l'aide d'un modèle DEBtox, que celle-ci expliquait le déclin observé de la croissance et la reproduction. Enfin, cette thèse a mis en lumière une aggravation progressive des effets toxiques au fil des générations.

Benoît Goussen a poursuivi ce travail en étudiant la dynamique évolutive de populations de *C. elegans*, exposées à l'uranium appauvri dans des milieux artificiels de type gélose. Une expérience sur seize générations a été réalisée sur deux populations de *C. elegans*, l'une de contrôle et l'autre exposée à 260 mg d'uranium par kilogramme de milieu. Ces niveaux d'expositions *via* un milieu artificiel tel que la gélose, dans lequel seul une partie de l'uranium est biodisponible, induisent de faibles quantités internalisées susceptibles d'être toxiques (de l'ordre de quelques microgrammes d'uranium par gramme d'organisme). Toutes les trois générations, des individus étaient extraits des populations et soumis à une gamme de concentrations en uranium (de 0 à 286 mg/kg). La croissance, la ponte et la survie ont été alors mesurées quotidiennement durant six jours. Une diminution significative de la taille et de la ponte maximale des individus a été

mise en évidence, en fonction de la concentration en uranium, quelle que soit la population d'origine (contrôle ou exposée). Par ailleurs, les individus issus de la population exposée à l'uranium pouvaient significativement moins que les individus issus de la population contrôle (toutes générations et concentrations confondues).

Fonctions liées à l'assimilation de nourriture

En apportant des améliorations au modèle DEBtox, il a été possible de confirmer que l'uranium impacte principalement les fonctions liées à l'assimilation de nourriture. Dans ces conditions expérimentales, la concentration sans effet déterminée pour *C. elegans* est de 100 mg d'uranium par kilogramme de milieu. Cette approche a permis de mieux appréhender, chez un organisme terrestre exposé au stress chimique de l'uranium appauvri, les mécanismes liant les perturbations de l'acquisition de l'énergie (*via* la nutrition) aux fluctuations de la croissance et de la reproduction. L'objet de la thèse de Delphine Plaire était de comprendre pourquoi la chimiotoxicité de l'uranium appauvri s'aggrave chez la daphnie *D. magna* au fil des générations. Puisqu'une concentration don-

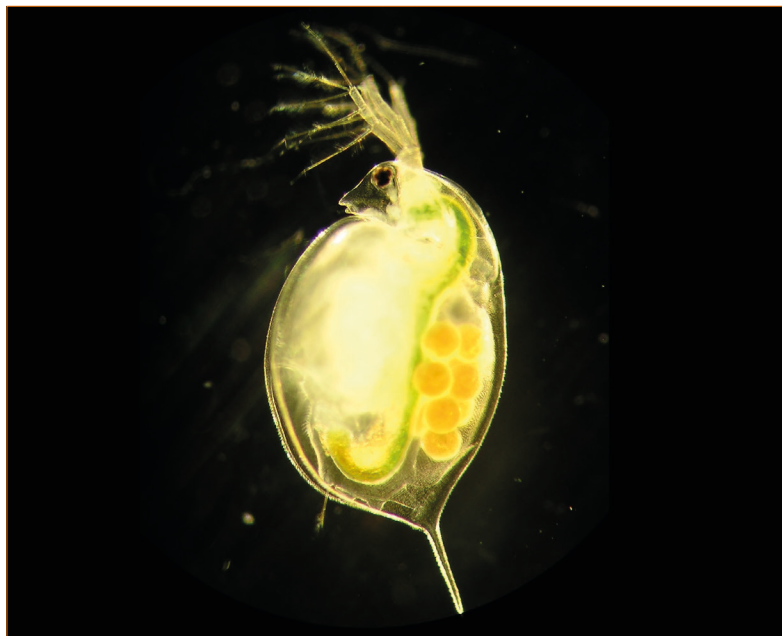
née d'uranium appauvri dans l'eau produit sur une daphnie un effet toxique plus sévère lorsque le parent est lui aussi exposé, l'aggravation des effets suggère la transmission d'une « information » d'une génération à l'autre, celle-ci s'opérant vraisemblablement à travers l'ADN, support du patrimoine génétique.

DEBtox transgénérationnel

À l'aide de la technique d'analyse RAPD-PCR^{GLO}, permettant de détecter la moindre altération de l'ADN sur un grand nombre d'échantillons, Delphine Plaire a montré que des altérations de l'ADN s'accumulent progressivement chez les daphnies lors d'une exposition et se transmettent à la génération suivante. Elles apparaissent dès la plus faible concentration testée (2 µg/L) et pourraient potentiellement servir d'indicateurs précoces d'effets sur la reproduction observés seulement dans les générations suivantes. En ajoutant un « compartiment de dommage » héritable d'une génération à la suivante, Delphine Plaire a construit un modèle DEBtox transgénérationnel qui tient compte des altérations de l'ADN

et permet de faire des projections sur les générations ultérieures. Cette version *a priori* inédite du modèle est basée sur deux facteurs de toxicité, la concentration d'uranium appauvri à laquelle les daphnies sont exposées et le niveau de dommage accumulé et transmis au fil des générations. L'analyse des données à l'aide de ce modèle a en outre révélé un deuxième mode d'action de l'uranium appauvri, qui s'ajoute à l'inhibition de l'assimilation de la nourriture : une dépense énergétique accrue entraînant le ralentissement de la croissance et de l'atteinte de la maturité chez les daphnies.

L'enjeu de ces modèles mathématiques est la compréhension des mécanismes moléculaires et métaboliques élémentaires de la toxicité qui devrait permettre d'extrapoler à d'autres cas, selon la substance radioactive considérée et les espèces exposées. Au vu de ces résultats, l'IRSN peut désormais étendre cette démarche pour étudier l'effet d'une irradiation chronique aux rayonnements gamma et de l'exposition à des mélanges de substances radioactives avec d'autres stresseurs dans le cadre de trois autres thèses.



Daphnie sur laquelle on visualise les œufs
© IRSN/Florence Zeman

PUBLICATIONS

• *Étude transgénérationnelle des altérations de l'ADN et de leurs conséquences sur les traits d'histoire de vie et le budget énergétique de Daphnia magna exposé à l'uranium appauvri*, thèse soutenue par Delphine Plaire, le 12 décembre 2013 à Cadarache.




• *Analyse par modélisation mécanistique des réponses micro-évolutives d'une population de Caenorhabditis elegans exposée à un stress métallique radioactif*, thèse soutenue par Benoit Goussen le 27 novembre 2013 à Cadarache.



• *Étude des effets de l'uranium sur le budget énergétique et la dynamique de population de Daphnia magna*, thèse soutenue par Sandrine Massarin le 15 décembre 2010 à Cadarache.

DU PROGRÈS dans la compréhension des EFFETS AUX TISSUS sains après une RADIOTHÉRAPIE externe

 Centre d'étude nucléaire de Bordeaux-Gradignan (CENBG-IN2P3).
Laboratoire de radiothérapie moléculaire - Inserm U1030, les partenaires du projet BioQuart

CONTACTS

Gaëtan Gruel
gaetan.gruel@irsn.fr
Laboratoire de dosimétrie biologique - LDB

Carmen Villagrasa
carmen.villagrasa@irsn.fr

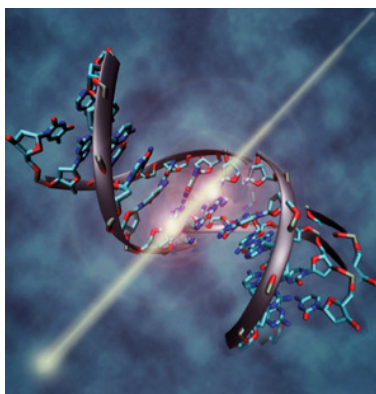
Laboratoire de dosimétrie des rayonnements ionisants - LDRI

Olivier Guipaud
olivier.guipaud@irsn.fr

Fabien Milliat
fabien.milliat@irsn.fr

Laboratoire de recherches en radiobiologie et radiopathologie - L3R

Avec 180 000 patients traités chaque année en France, la radiothérapie est l'une des principales techniques de traitement du cancer. Son objectif est de délivrer des doses importantes au volume tumoral tout en épargnant au mieux les tissus sains présents dans le champ de l'irradiation. Néanmoins, des complications peuvent apparaître à plus ou moins long terme chez ces patients et affecter de manière importante leur qualité de vie. Un des objectifs du troisième plan cancer 2014-2019 est de réduire les risques de séquelles du traitement du cancer dans sa globalité. L'IRSN a lancé dès 2009 le programme de recherche Rosiris dont l'objectif est d'acquiescer la capacité d'évaluer ce risque de complication. Il s'agit d'étudier et de modéliser les principaux mécanismes qui relient le dépôt initial d'énergie au niveau des structures cellulaires aux complications et lésions que peut développer le patient. Ce programme vise, *in fine*, à améliorer la maîtrise de la dose délivrée et à identifier des indicateurs diagnostiques et pronostiques dont la mesure permettra d'adapter le suivi clinique des patients.



Figuration d'une particule ionisante causant une cassure double brin dans l'ADN.

© www.nasa.gov/centers/ames/engineering/projects/biosentinel.html

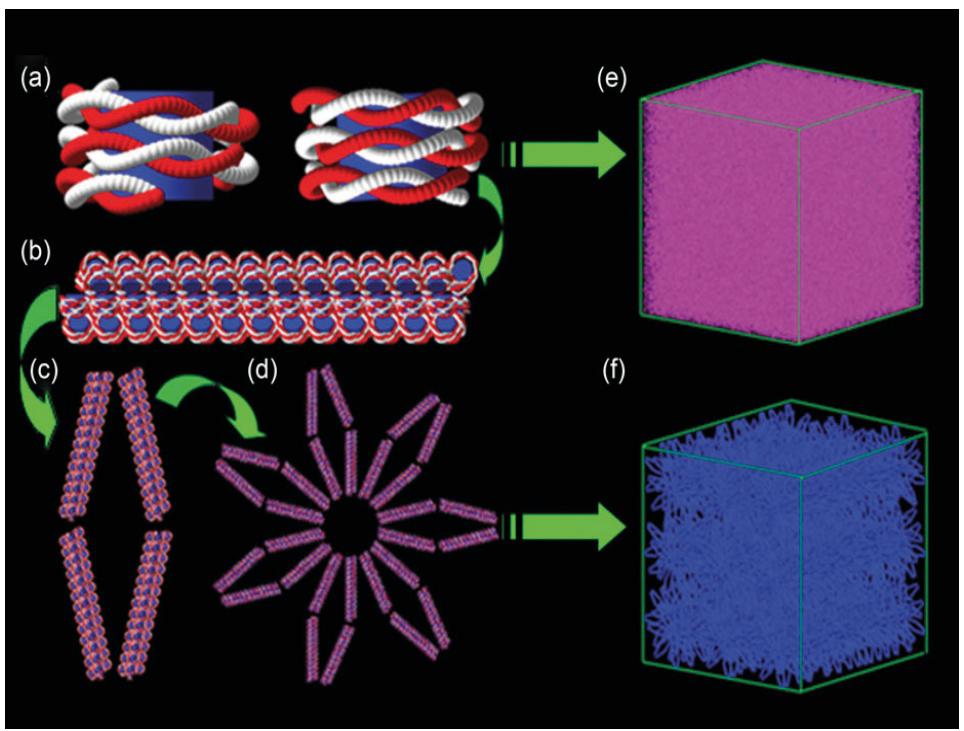
Le programme Rosiris cherche à identifier l'existence d'un lien entre les effets précoces et tardifs pour les organes à risque suite à une radiothérapie conventionnelle de la zone abdomino-pelvienne. Les travaux se concentrent sur le rôle du compartiment vasculaire, et notamment des micro-vaisseaux des tissus concernés. En effet, selon des travaux scientifiques de plus en plus nombreux, l'effet des rayonnements ionisants sur les micro-vaisseaux

jouerait un rôle central dans les toxicités précoces et tardives au niveau des tissus sains et en particulier pour le tube digestif.

Le programme s'intéresse aux trois étapes du développement d'une lésion tissulaire induite après une irradiation : la phase initiale où le rayonnement dépose de l'énergie dans les cellules et endommage les molécules qui les composent (eau, protéines, ADN, lipides, principalement) ; la phase des modifications précoces générées par les mécanismes de réactions physiologiques des tissus concernés ; et la phase de développement des lésions tardives, par exemple de type fibrose.

Cassures double brin

Pour la phase initiale, une équipe de physiciens et une équipe de biologistes travaillent ensemble pour modéliser la répartition des dépôts d'énergie à l'échelle nanométrique et la corréler à celle des événements biologiques initiaux qui se produisent dans la cellule. L'un des événements biologiques radio-induits qu'il a été retenu d'étudier, car suffisamment stable et techniquement observable, est la signalisation, par la cellule, des cassures double brin de son ADN. Ces cassures sont définies par un minimum de deux cassures simples, chacune située sur un brin de l'ADN et distante de moins de 10 bases d'ADN, soit moins de 3,4 nanomètres.



La simulation à l'échelle du nanomètre nécessite le développement de modèles complexes, et notamment d'ADN. Schéma du modèle d'ADN implémenté dans GEANT₄ représentant les différents niveaux de compaction de la molécule d'ADN (a) nucléosome (b) fibre de chromatine (c) boucle simple (d) boucle « en fleur » (e) espace du chromosome rempli de chromatine décondensée (f) espace du chromosome rempli de chromatine condensée.

© IRSN/Morgane Dos Santos

La tâche des physiciens est de définir la répartition des dépôts d'énergie à l'échelle du nanomètre ou structure de la trace. Ces dépôts correspondent à des collisions inélastiques entre les particules chargées générées par le rayonnement et les molécules cibles, provoquant leur ionisation ou, dans une moindre mesure, leur excitation. Chaque trace est unique car elle résulte d'un ensemble d'événements stochastiques. Le nombre et la répartition de ces dépôts variant selon le type d'irradiation, les physiciens simulent la structure de la trace pour un type d'irradiation donnée (particule/énergie) et en décrivent les dommages sur l'ADN désignés sous le terme d'interactions directes. Afin de corréliser cette structure de la trace aux cassures double brin, la simulation doit également prendre en compte d'autres phénomènes qui correspondent à la création de radicaux

chimiques à partir de l'ionisation ou l'excitation des molécules d'eau. Lorsque ceux-ci sont suffisamment proches de l'ADN, ils peuvent l'attaquer chimiquement : c'est l'interaction indirecte. Enfin, il faut également intégrer dans cette simulation des paramètres biologiques qui sont matérialisés par la répartition de la cible étudiée dans la cellule, dans notre cas la molécule d'ADN dans le noyau cellulaire. Pour l'instant, les chercheurs ont simulé les effets directs associés à une description géométrique de la cible d'ADN, suffisante pour le calcul de ces effets. Ils travaillent actuellement à l'intégration des effets indirects. Ces travaux sont réalisés dans le cadre coopératif du programme européen Bio-QuarT dédié à l'étude de l'efficacité biologique de l'hadronthérapie^{GL0} et dont les objectifs sont complémentaires à ceux du programme Rosiris.

PUBLICATIONS

• *Modélisation de la topologie des dépôts d'énergie créés par un rayonnement ionisant à l'échelle nanométrique dans les noyaux cellulaires et relation avec les événements précoces radio-induits*, thèse soutenue par Morgane Dos Santos le 2 octobre 2013

• *Bianco D. et al.*
« Multi-scale analysis of simulated proton and alpha irradiation » *Radiation Protection Dosimetry* (2014), pp. 1-5

• *Villagrasa C. et al.*
« RBE-LET relationship for proton and alpha irradiations studied with a nanodosimetric approach » *Radiation Protection Dosimetry* (2014), Vol. 161, No. 1-4, pp. 449-453

• *Dos Santos M. et al.*
« Influence of chromatin condensation on the number of direct DSB damages induced by ions studied using a Monte-Carlo code » *Radiation Protection Dosimetry* (2014), Vol. 161, No. 1-4, pp. 469-473

Électrons de très basse énergie

Les physiciens utilisent un code de calcul de type Monte Carlo, GEANT4-DNA, pour simuler le transport des particules dans la matière et ainsi définir la trace des particules incidentes du rayonnement et des électrons créés par leur passage. Ce type de simulation est basé sur la connaissance des sections efficaces qui représentent la probabilité d'interaction entre les particules et le milieu cible. Pour obtenir la précision nanométrique recherchée, les chercheurs ont participé à l'implémentation et à la validation dans le code des modèles physiques (basés sur des données expérimentales dans l'eau liquide) permettant de déterminer les sections efficaces pour des électrons de très basse énergie (énergies cinétiques inférieures au keV). Par ailleurs, pour simuler l'interaction avec l'ADN et prévoir les cassures, ils ont développé un modèle géométrique d'ADN adapté au logiciel. Pour évaluer le nombre et la localisation des cassures double brin de l'ADN, l'hypothèse retenue est que l'ionisation d'un sucre ou d'un phosphate sur la chaîne d'ADN (pas sur une base) donne lieu à une cassure simple brin (SSB). Un algorithme, dit de clusterisation, analyse ensuite les positions de chaque cassure simple brin dans l'ADN pour localiser les cassures double brin. Plusieurs évolutions sont en cours. D'une part, les chercheurs travaillent à l'implantation de sections efficaces correspondant à l'interaction de particules chargées avec des molécules d'ADN réelles, car GEANT4-DNA ne disposait jusque-là que des sections efficaces de l'eau liquide. Par ailleurs, une nouvelle description géométrique de l'ADN au niveau moléculaire, permettant une meilleure localisation des cassures ainsi que son utilisation dans la simulation des effets indirects est en cours d'achèvement.

Repérer l'histone H2AX

Pour faire le lien entre cette simulation des conséquences de l'irradiation au sein des cellules et les dommages observés à l'ADN, la tâche des biologistes consiste à caractériser et quantifier les dommages à l'ADN réellement générés par une irradiation donnée. Ces dommages sont repérés à l'aide des protéines cellulaires qui se modifient ou se relocalisent autour d'eux. Une des protéines utilisées par les

biologistes de l'IRSN est l'histone H2AX qui est phosphorylée (H2AX-pSER139) lorsqu'elle se situe à proximité d'une cassure double brin de l'ADN et dont la modification peut être visualisée par immunofluorescence sous forme de plusieurs focus ou *foci*. Chaque *foci* observé au sein d'un noyau cellulaire correspond alors à une ou à un groupe de cassure(s) double brin de l'ADN.

Les *foci* sont dénombrés par l'analyse des images des noyaux cellulaires acquises par microscopie. L'équipe de biologistes a multiplié les données expérimentales afin de les croiser avec les données obtenues par simulations. Ainsi, les mesures de dommages à l'ADN ont été effectuées sur plusieurs milliers de cellules endothéliales^{GL0} issues de cordon ombilical humain (HUVEC), un modèle de cellule commun à tout le programme Rosiris. Dans le cadre du programme BioQuarT, des groupes de 2 000 à 3 000 cellules HUVEC ont été cultivés en monocouches pour être irradiés à l'aide du microfaisceau de protons et d'alphas du PTB (Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Allemagne) à différentes énergies. Sur chaque noyau cellulaire, en forme de pièce ovale de 20 microns sur 10, pour 2 microns d'épaisseur, cinq particules sont tirées sur des points-cibles distincts. Les cellules ont ensuite été analysées pour en tirer la probabilité de dommages à l'ADN par particule. L'opération a été réalisée pour des protons et des alphas avec des TEL^{GL0} variant entre 18 KeV/µm et 160 keV/µm. Les scientifiques ont ainsi obtenu une probabilité de dommages en fonction de l'énergie déposée par micron (TEL). Afin de mener la confrontation, la simulation réalisée dans la première partie est « moyennée » pour travailler sur des échelles comparables (tout en tenant compte de la physique la plus fine) à celles des résultats biologiques observés. Cette confrontation permet de proposer des hypothèses sur les paramètres intervenant dans la formation des cassures double brin de l'ADN et ainsi enrichir et affiner la simulation. La prise en compte dans la simulation des interactions indirectes des radicaux avec l'ADN sera une étape ultérieure importante dans cette amélioration.

425 gènes et 600 protéines

Si l'on se place au niveau plus global de l'organe à risque, il est probable que la réaction à l'irradiation soit le résultat d'un réseau d'interactions entre différents acteurs moléculaires. Quelle est la

réaction précoce de l'organe à une irradiation ? Le programme Rosiris vise à identifier, au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins, les réseaux de médiateurs moléculaires impliqués dans les modifications radio-induites précoces de l'intestin, et qui conditionnent les réponses tardives des tissus. Pour les identifier, l'IRSN a choisi d'utiliser notamment la protéomique et la transcriptomique, techniques globales qui permettent de quantifier respectivement un grand nombre de protéines, de gènes dans un échantillon. Dans un premier temps, des cellules endothéliales ont été irradiées à 2 et à 20 Gy. Ces techniques ont permis d'identifier 425 gènes et environ 600 protéines impliqués dans la réponse de l'endothélium, à plusieurs temps entre 0,5 et 21 jours après l'irradiation. Une méthode mathématique spécifique a été développée (voir *Aktis n° 15*) qui permet de relier les points de mesure obtenus entre 0,5 et 21 jours pour chaque gène ou protéine mesuré (méthode Bayésienne). Une analyse statistique de la courbe obtenue permet d'identifier s'il existe des périodes, durant les 21 jours, où la concentration de ce gène ou de cette protéine a changé et peut être attribuée à l'irradiation.

Une liste de gènes ou protéines sous-exprimés ou surexprimés dans la cellule endothéliale après l'irradiation a pu ainsi être dressée.

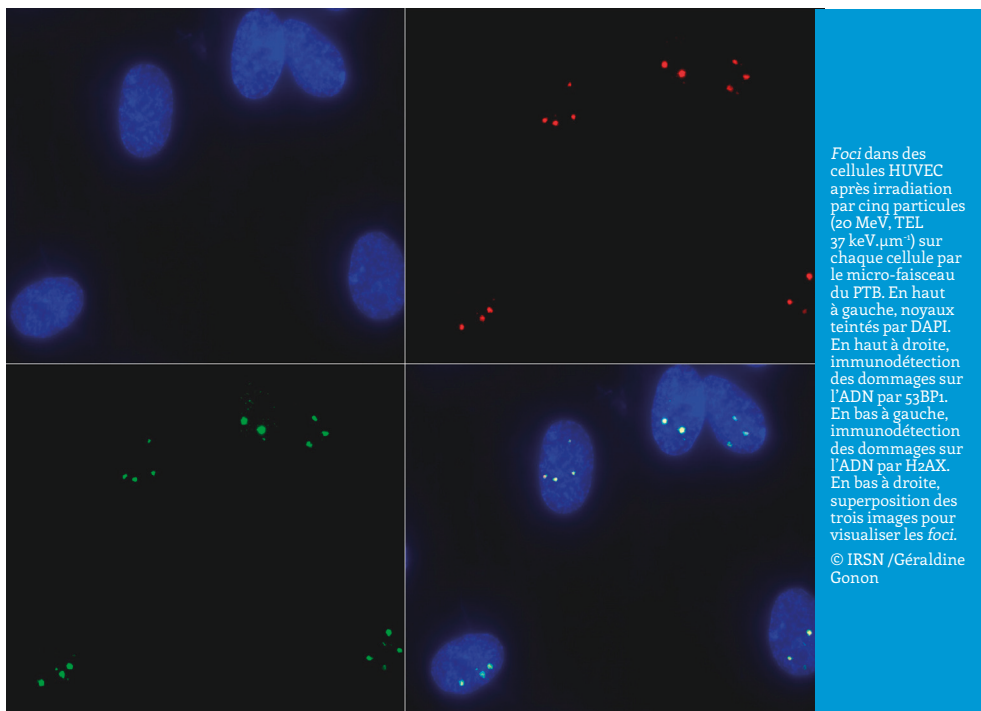
Régulateurs communs

Afin d'identifier des réseaux d'acteurs moléculaires impliqués dans les modifications des cellules endothéliales après l'irradiation, une autre méthode mathématique a été développée afin d'associer entre elles des entités (gènes, protéines, etc.) de la liste précédente qui présentent des profils d'expression similaires (méthodes de clusterisation et de bi-clusterisation). Cette étape de la recherche permet par ailleurs de singulariser des groupes de gènes ou de protéines régulés de la même façon, donc probablement par des régulateurs communs. En utilisant des logiciels de fouille de texte pour explorer la littérature scientifique, et des logiciels d'analyse des réseaux moléculaires, des liens entre les acteurs moléculaires identifiés sont en cours d'établissement. Ces travaux ont notamment confirmé le rôle important de la protéine P53 dans les processus post-irradiation.

En savoir plus sur le programme Rosiris



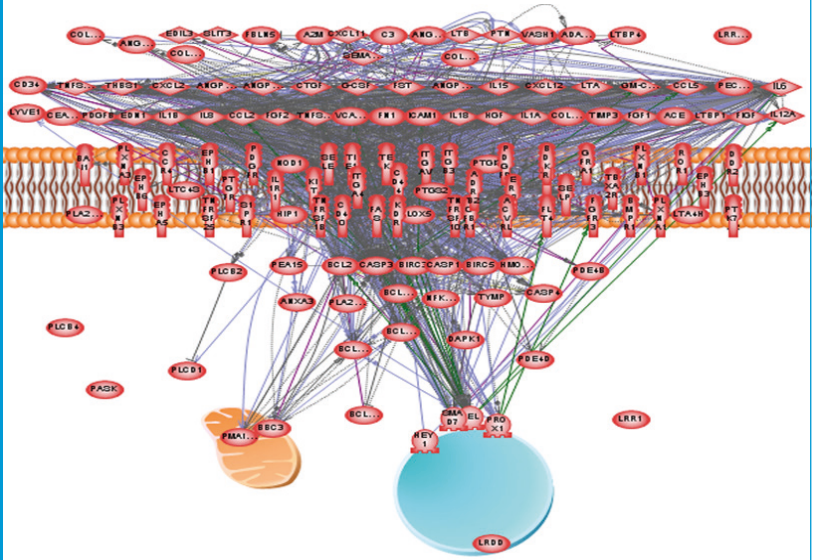
En savoir plus sur le programme BioQuart



Foci dans des cellules HUVEC après irradiation par cinq particules (20 MeV, TEL 37 keV, μm^{-2}) sur chaque cellule par le micro-faisceau du PTB. En haut à gauche, noyaux teintés par DAPI. En haut à droite, immunodétection des dommages sur l'ADN par 53BP1. En bas à gauche, immunodétection des dommages sur l'ADN par H2AX. En bas à droite, superposition des trois images pour visualiser les foci.

© IRSN /Géraldine Gonon

Visualisation des réseaux de protéines impliquées dans la réponse à l'irradiation d'une cellule HUVEC à 20 Gy.
© IRSN/Olivier Guipaud



Évolution vers la chronicité

Enfin, le programme Rosiris vise à mieux comprendre le développement des lésions tissulaires radio-induites, telles que les fibroses ou entérites. Celui-ci est aujourd'hui perçu comme la résultante d'une séquence de processus reliés entre eux, dans lesquels les vaisseaux sanguins, et plus particulièrement l'endothélium, semblent tenir une place centrale. Cependant, il existe peu d'éléments concrets qui étayent ce postulat. Les recherches menées dans le cadre de Rosiris visent à comprendre l'impact de ce compartiment et son rôle dans l'évolution des lésions radio-induites aux tissus sains. Parmi ces travaux, une thèse vient d'être soutenue dont l'objectif était de démontrer l'existence d'un lien, dépendant de l'endothélium, entre l'apparition des lésions intestinales dues aux rayonnements et leur évolution vers la chronicité. Pour ce faire, le parti pris était de modifier les caractéristiques de l'endothélium et d'étudier les conséquences de ce changement sur l'entérite radio-induite. Des résultats précédemment obtenus dans le laboratoire avaient montré que la protéine PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor – Type 1* ou en français inhibiteur des activateurs du plasmino-

gène de type 1) joue un rôle important dans le développement de ces lésions. Dans l'équilibre complexe des acteurs moléculaires impliqués dans un processus cicatriciel normal, son rôle est de limiter la dégradation de la fibrine. Mais son action semble avoir un rôle aggravant dans le cas des effets d'une radiothérapie.

PAI-1, cible thérapeutique potentielle

La doctorante a mis au point un modèle de souris transgénique, dont le gène codant la protéine PAI-1 a été inactivé spécifiquement dans l'endothélium (stratégie CreLox). Des souris n'exprimant plus la protéine PAI-1 dans l'endothélium et des souris témoins ont été irradiées à 19 Gy : 60 % des souris témoins meurent dans les deux semaines qui suivent l'irradiation, alors que 75 % des souris déficientes en PAI-1 survivent. De plus, ces dernières présentent des fibroses moins importantes que les souris témoins survivantes. La thèse a ainsi démontré que la délétion de PAI-1 protège les souris des lésions intestinales radio-induites. Ces résultats obtenus confirment que PAI-1 est une cible thérapeutique potentielle et démontrent *in vivo* que l'endothélium est un compartiment crucial dans l'évolution des dommages radio-induits aux tissus sains.

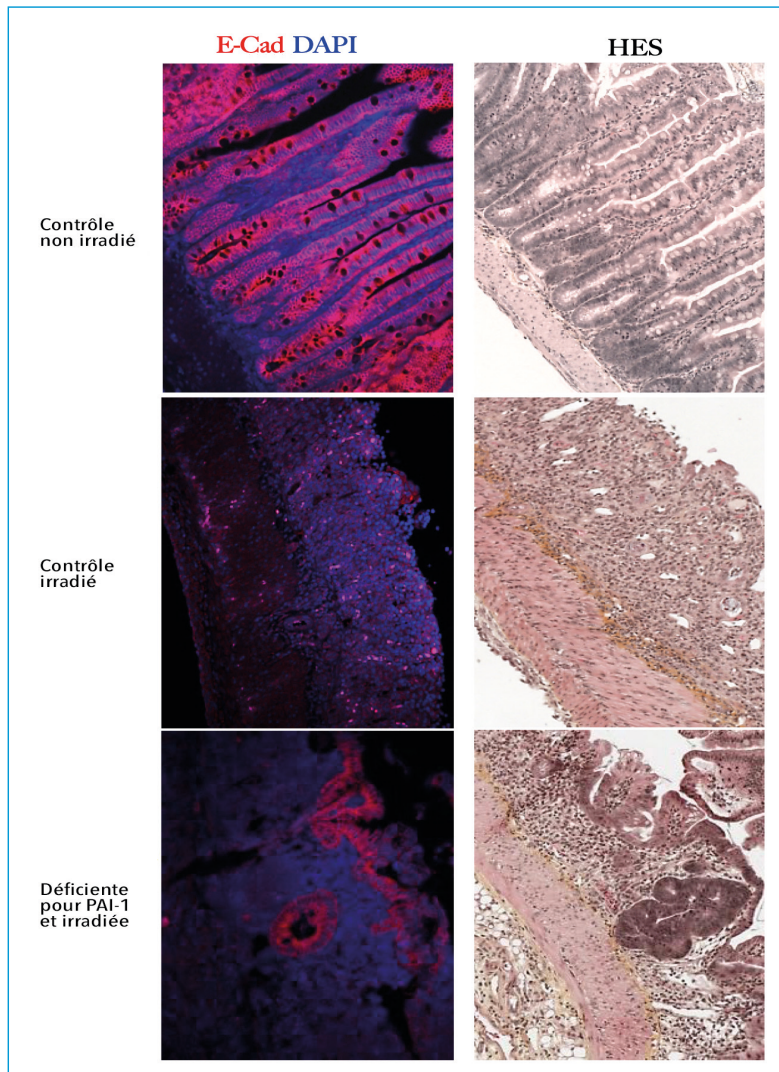
Ces différents travaux concourent à mieux comprendre les mécanismes fins des effets indésirables des radiothérapies, et à identifier des actions possibles pour développer des traitements. Ils montrent aussi que les progrès dans la connaissance des risques inhérents à l'utilisation des rayonnements ionisants dans le milieu médi-

cal ne peuvent être abordés qu'au travers d'une approche multidisciplinaire associant la radiobiologie, la radiopathologie et la dosimétrie. Une approche que l'IRSN développe depuis plusieurs années en s'appuyant sur ses propres plateformes expérimentales et *via* des collaborations fortes avec les cliniciens afin que cette recherche soit réaliste.

PUBLICATIONS

• Heinson M. et al. « Detecting time periods of differential gene expression using Gaussian processes: An application to endothelial cells exposed to radiotherapy dose fraction » *Bioinformatics*, (2015) vol 31, pp.728-735

• *Conséquence de la délétion spécifique de PAI-1 dans l'endothélium sur la réponse radio-induite de l'intestin*, thèse soutenue par Émilie Rannou le 17 mars 2015



Comparaison des cellules de l'endothélium respectivement pour une souris témoin (en haut), une souris irradiée à 19 Gy (centre) et une souris déficiente en PAI-1 irradiée à 19 Gy (en bas).

© IRSN/Émilie Rannou

MISE *en suspension* DE PARTICULES RADIOACTIVES, *filtres* THE *et* incendie

Un incendie dans une installation nucléaire peut conduire à des relâchements de produits radioactifs dans l'environnement. Afin d'en évaluer le risque et les conséquences, l'IRSN analyse les étapes clés d'un tel événement. Deux thèses ont récemment été consacrées à deux de ces étapes. L'une a concerné la mise en suspension des particules radioactives dans l'atmosphère des locaux, dans le cas spécifique d'un feu de boîte à gants. L'autre s'est intéressée au fonctionnement des dispositifs de confinement des produits radioactifs dans l'installation, en particulier aux filtres à très haute efficacité installés sur les circuits de ventilation.

CONTACTS

François-Xavier Ouf
francois-xavier.ouf
@irsrn.fr

Laboratoire de physique et de métrologie des aérosols - LPMA

Laurent Bouilloux
laurent.bouilloux
@irsrn.fr

Laboratoire d'expérimentations en confinement, épuration et ventilation - LECEV

PUBLICATIONS

• Delcour S. et al.
« Feasibility of particle imaging velocimetry in cone calorimeter experiments. »
Proceedings of the 11th International Symposium on Fire Safety Science, 2014.

• *Étude des mécanismes physico-chimiques de mise en suspension de contaminants particulaires lors de la dégradation thermique de matériaux représentatifs des installations nucléaires*, thèse soutenue par Simon Delcour le 20 novembre 2014 à l'École nationale supérieure des mines de Paris (Mines ParisTech).

• Ouf F.-X. et al.
« Contribution to the study of particle resuspension kinetics during thermal degradation of polymers. » *Journal of Hazardous Materials*, April 2013, 298-307.

Équipements courants dans les installations nucléaires, les boîtes à gants permettent de manipuler des matières radioactives. En cas d'incendie de ces enceintes, les particules radioactives (poussières ou poudres) qui se sont déposées sur les parois de la boîte lors des manipulations (transferts, découpes, etc.) sont mises en suspension dans l'atmosphère des locaux. Pour évaluer les conséquences radiologiques d'un tel événement, il est important de quantifier la fraction de ces matières radioactives mises en suspension.

C'est dans ce cadre que s'inscrit la thèse de Simon Delcour. Son objectif a été d'identifier et de modéliser les phénomènes à l'origine de la mise en suspension de particules radioactives lorsque des parois en PMMA (l'un des constituants habituels des boîtes à gants), contaminées par de la poudre de dioxyde de plutonium (PuO₂), se dégradent sous l'effet d'un incendie. Il a tout d'abord étudié, à l'échelle microscopique, la combustion d'échantillons de PMMA sur lesquels avaient été déposées des particules microniques d'alumine simulant les particules radioactives. Ces observations ont montré que les particules peuvent être piégées dans le PMMA lorsque celui-ci s'échauffe. Puis, des bulles se forment et éclatent, mettant ainsi en suspension la matière radioactive.

Taille des bulles jusqu'à l'éclatement

Les principales grandeurs caractérisant les phénomènes observés ont été mesurées : la taille des bulles jusqu'à leur éclatement, la vitesse initiale des particules mises en suspension (par ombroscopie à haute fréquence^{GL0}, 20 kHz),

ainsi que la vitesse de l'écoulement gazeux les entraînant (par vélocimétrie par imagerie de particule ou PIV^{GL0}). Ces mesures ont notamment permis de quantifier la capacité de chaque bulle à mettre en suspension les particules déposées initialement sur le PMMA. Les différents mécanismes mis en jeu ont ensuite été modélisés en utilisant, pour ce qui concerne la pyrolyse^{GL0} du PMMA, un modèle existant dans la littérature (modèle Thermakin).

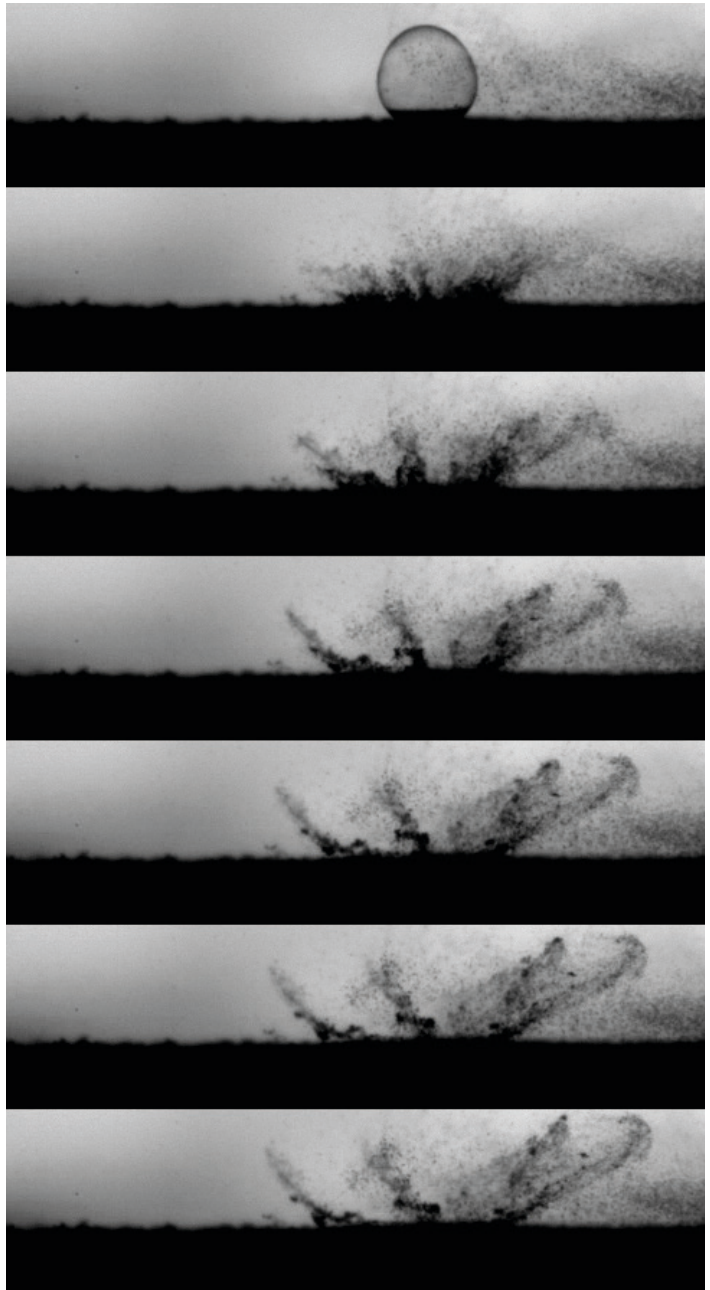
Pour valider son modèle, Simon Delcour a ensuite réalisé des expériences à échelle macroscopique dans une installation expérimentale (ARTEMIS) conçue à cette fin. Afin d'être plus représentatif de la masse volumique élevée du PuO₂, c'est du carbure de tungstène en poudre (et non plus de l'alumine) qui a cette fois-ci été utilisé pour simuler les particules radioactives. Les résultats obtenus ont notamment permis de valider avec succès la prise en compte par le modèle de l'effet de densité.

La validation du modèle se poursuit à présent avec des particules de caractéristiques différentes (granulométrie, surface spécifique...), représentatives du spectre des poudres et des poussières de PuO₂, pouvant se déposer dans les boîtes à gants des installations nucléaires françaises. Ce programme de recherche va être complété par l'étude de parois constituées cette fois de polycarbonate. La pyrolyse de ce matériau, faisant intervenir un phénomène d'intumescence^{GL0}, devrait conduire à des mécanismes et des cinétiques de mise en suspension différents de ceux observés avec le PMMA. Enfin, la base de données de validation des modèles sera enrichie par des essais de feu des boîtes à gants, à échelle réelle, réalisés dans la plateforme expérimentale GALAXIE de l'IRSN dédiée à l'étude des feux.

À l'autre extrémité de la chaîne d'événements qui pèsent sur l'évaluation du risque lors d'un incendie dans une installation nucléaire : l'obturation des filtres à très haute efficacité (THE) installés sur le circuit de ventilation. Ceux-ci contribuent de manière significative au confinement des produits radioactifs au sein de l'installation nucléaire en assurant le piégeage de particules radioactives entraînées dans la ventilation. Cependant, dans le cas d'un incendie, les filtres THE risquent d'être obturés par les suies, des aérosols qui possèdent un pouvoir colmatant important. Ce colmatage réduit l'écoulement de l'air dans la ventilation et induit sur les filtres, déjà fragilisés par la chaleur, des contraintes mécaniques qui peuvent conduire à leur rupture, et ainsi à une perte du confinement.

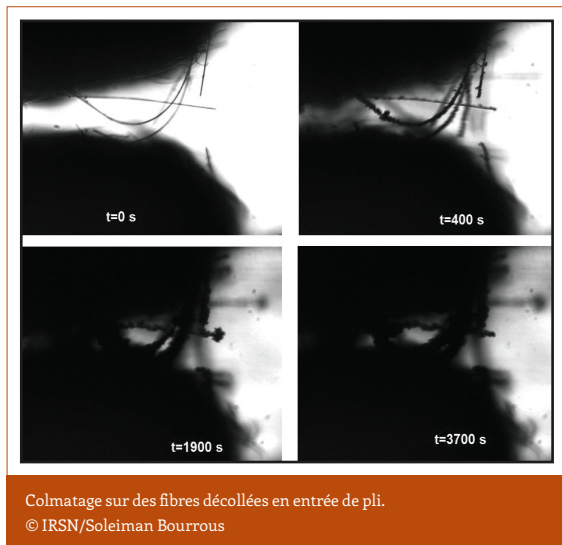
Trois dispositifs expérimentaux

Afin d'analyser ces phénomènes, Soleiman Bourrous a durant sa thèse conçu trois dispositifs d'essais, mettant en œuvre plusieurs techniques de mesures avancées. Un premier dispositif a permis de recréer avec des particules de différentes compositions (carbone, oxydes métalliques), sur des échantillons de filtres THE, le colmatage qui se produirait durant un incendie. Le système permet de les conditionner pour mesurer par microscopie électronique, la pénétration des particules à l'intérieur du médium dont sont constitués les filtres. En parallèle, un dispositif de triangulation laser a été développé pour mesu-



Éclatement d'une bulle de PMMA et libération des particules ; observation en ombroscopie, à 20 000 images par seconde.

© IRSN/Simon Delcour



PUBLICATION

• *Étude du colmatage de filtres THE plans et à petits plis par des agrégats de nanoparticules simulant un aérosol de combustion*, thèse soutenue par Soleiman Bourrous le 8 décembre 2014 à l'École nationale supérieure des industries chimiques (ENSIC) de Nancy.



rer en continu, au cours du colmatage, l'évolution de la porosité du dépôt de particules formé à la surface du médium. Enfin, l'emploi de diagnostics optiques sur un troisième dispositif conçu pour analyser le colmatage d'un pli unique, a permis d'identifier la contribution de la déformation du médium sous l'effet du colmatage et l'influence de fibres décollées de la surface du médium filtrant à l'entrée du pli.

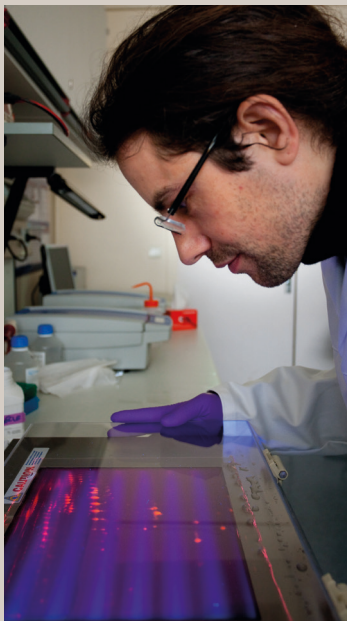
La perte de charge des filtres, c'est-à-dire la contrainte mécanique à laquelle ils sont soumis, a ainsi été mesurée pour différents taux de colmatage. Grâce à ces données, un modèle analytique, simple, a été élaboré pour prédire l'évolution de la perte de charge des filtres en fonction de la masse piégée, des caractéristiques des aérosols et des conditions aérodynamiques. Il est basé sur le même type d'approche que celle utilisée pour le calcul de pertes de charge dans des milieux capillaires.

Des travaux complémentaires sont prévus pour valider ce modèle pour les vitesses de filtration les plus faibles, qui conduisent au colmatage prématuré des filtres. Ce modèle sera implanté dans le logiciel SYLVIA qui est développé et utilisé à l'IRSN, en particulier pour prédire l'impact d'un incendie sur le confinement des produits radioactifs dans les installations nucléaires.

SOUTENANCES

HDR D'OLIVIER GUIPAUD

Olivier Guipaud a soutenu le 3 mars 2015 à Fontenay-aux-Roses, son HDR « Apports de la biologie des systèmes pour la recherche en radiobiologie, radiopathologie et radioprotection ».



THÈSES

Trois doctorants de l'IRSN ont récemment soutenu leur thèse.

- Clélia Le Gallic, le 21 avril 2015 à Fontenay-aux-Roses sur *les effets d'une exposition chronique à faibles doses sur la progression de l'athérosclérose* ;
- Émilie Rannou, le 17 mars 2015 à Fontenay-aux-Roses sur *les conséquences de la délétion spécifique de PAI-1 dans l'endothélium sur la réponse radio-induite de l'intestin* ; voir aussi sa vidéo « 3 minutes pour une thèse » sur la page du concours ;
- Sophie Grivès, le 17 mars 2015 à Châtenay-Malabry, sur *l'étude de la toxicité in vitro et de l'efficacité ex vivo et in vivo de formes galéniques de calixarène développées pour le traitement des contaminations cutanées dues à des composés d'uranium*.

RECHERCHE



© Audrey de Saint-IRSN

2^E PRIX DE LA CRÉATIVITÉ

Marc Barrachin, chercheur au Laboratoire d'études du corium et du transfert des radioéléments (LETR), a reçu le Prix IRSN de la créativité en recherche le 1^{er} avril 2015 pour le projet Bestair (*Beryllium Source Term due to an Accident in the ITER experimental reactor*), qu'il a réalisé avec un post-doctorant, François Viroc.

L'objectif du projet était d'établir une base de données thermodynamiques pour les formes gazeuses du système béryllium-oxygène-hydrogène-tritium. C'est la seconde fois que ce prix est décerné depuis sa création en 2012. Il vise à récompenser les porteurs de projets de recherche particulièrement innovants, et dont le succès est initialement incertain, désignés sous le terme de recherche exploratoire.

En savoir plus sur le premier concours « 3 minutes pour une thèse »



En savoir plus sur le 2^e prix de la créativité



ÉVÉNEMENT

PREMIER CONCOURS
« 3 MINUTES POUR UNE THÈSE »

Le premier concours « 3 minutes pour une thèse » de l'IRSN s'est déroulé le 31 mars pendant les Journées des thèses, séminaire dédié aux doctorants de l'Institut. Dix concurrents se sont mesurés pour présenter leurs trois années de thèse en trois minutes, de la façon la plus intéressante et la plus claire possible, dans le cadre prestigieux d'une salle de théâtre. Élodie Mintet a remporté l'épreuve, avec sa présentation « Les cellules endothéliales irradiées : un peuple migrateur ? », issue de sa thèse *Changements phénotypiques des cellules endothéliales irradiées : implication de la transition endothélium-mésenchyme dans le développement des complications des radiothérapies*.



© Nuno Macêdo/IRSN

PROJETS

RÉSULTATS DE L'APPEL H2020 :
UN SUCCÈS POUR L'IRSN
ET POUR LA RECHERCHE
EN SÛRETÉ ET EN RADIOPROTECTION

La Commission européenne a fait connaître le résultat du premier appel à projets du 8^e PCRD Euratom (H2020) pour les activités de recherche et de formation en matière de fission nucléaire et de radioprotection. L'IRSN participe à onze projets retenus, traduisant son dynamisme dans les propositions faites, et sa contribution aux actions collectives pour la recherche au niveau européen.

En savoir plus sur le HDR d'Olivier Guipaud



En savoir plus sur les thèses



CELLULES

ENDOTHÉLIALES : cellules constituant la couche la plus interne des vaisseaux sanguins (endothélium vasculaire) en contact direct avec le sang.

INTUMESCENCE :

augmentation du volume ou gonflement d'un matériau sous l'effet d'un stress thermique.

HADRONTHÉRAPIE :

méthode de radiothérapie pour le traitement du cancer qui utilise un faisceau de particules, les hadrons (notamment protons et ions carbone).

OMBRSCOPIE À HAUTE

FRÉQUENCE : technique d'acquisition à haute fréquence d'images d'ombres portées, permettant de visualiser des variations de l'indice de réfraction du milieu observé (variations ici induites par l'apparition de bulles).

RAPD-PCR : *Random*

Amplified Polymorphic DNA ou amplification aléatoire de l'ADN polymorphe couplée à la réaction en chaîne par polymérase. Test permettant de détecter les lésions primaires de l'ADN.

PYROLYSE : décomposition d'un composé organique par la chaleur; elle conduit généralement à la production de gaz combustibles.

RADIOÉLÉMENT : élément chimique dont tous les isotopes sont radioactifs.

RADIONUCLÉIDES :

isotopes radioactifs d'un élément chimique.

TEL : transfert d'énergie linéique, qui décrit l'énergie transférée par une particule ionisante traversant la matière, par unité de distance.

THÉORIE DEB :

elle a été imaginée à la fin des années 1970 par un biologiste et mathématicien néerlandais, Bas Kooijman, professeur à l'université libre d'Amsterdam. Adaptée à de nombreuses espèces animales, elle est de plus en plus utilisée en Europe depuis une dizaine d'années, entre autres en biologie marine.

VÉLOCIMÉTRIE PAR IMAGERIE DE PARTICULE

OU PIV : *Particule Image Velocimetry* - technique laser de mesures de champ de vitesse à l'aide de traceurs particuliers.

L'Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN) est un organisme public d'expertise et de recherche pour la sûreté et la sécurité nucléaires et la radioprotection. Il intervient comme expert en appui aux autorités publiques. Il exerce également des missions de service public qui lui sont confiées par la réglementation. Il contribue notamment à la surveillance radiologique du territoire national et des travailleurs, à la gestion des situations d'urgence et à l'information du public. Il met son expertise à la disposition de partenaires et de clients français ou étrangers.

Pour consulter la version numérique d'Aktis, accéder aux publications scientifiques et aux informations complémentaires en ligne, et pour s'abonner, rendez-vous sur le site Internet de l'IRSN : www.irsn.fr/aktis

**SIÈGE SOCIAL**

31 avenue de la Division Leclerc
92260 Fontenay-aux-Roses
France
RCS Nanterre B 440 546 018

TÉLÉPHONE

+33 (0)1 58 35 88 88

COURRIER

BP 17 - 92262 Fontenay-aux-Roses
Cedex - France

SITE INTERNET

www.irsn.fr