



La susceptibilité individuelle aux rayonnements ionisants

Pr. Michel Bourguignon

Commissaire ASN

michel.bourguignon@asn.fr & www.asn.fr

GT CIPR – 15 Mai 2014





Susceptibilité individuelle aux RI

Nous ne sommes pas égaux face
aux rayonnements ionisants



asn Susceptibilité individuelle aux RI

Deux concepts différents et
deux types de populations différentes

- Susceptibilité déterministe particulière aux fortes doses de RI = Effets secondaires/ complications de la radiothérapie sans erreur de dose ni de délivrance de la dose = radiosensibilité individuelle = un vieux concept
- Susceptibilité stochastique particulière aux fortes doses comme aux faibles doses = Cancer = radioesthésie individuelle = un concept récent





Susceptibilité individuelle aux RI

Deux phénomènes différents

- **Radiosensibilité individuelle** est liée à des morts cellulaires en trop grand nombre avec perte de l'homéostasie tissulaire
- **Radioesthésie individuelle** est liée à la survie de cellules lésées, l'une d'entre elles devenant cancéreuse avec un environnement tissulaire permissif et des facteurs d'environnement favorables (hormones, cytokines, inflammation...)





Susceptibilité individuelle aux RI

Deux phénomènes différents

- Radiosensibilité individuelle : morts cellulaires
- Radioesthésie individuelle : survie de cellules lésées

Phénomènes miroirs l'un de l'autre ?

Pourraient concerner les mêmes personnes ?

Cancers secondaires de la radiothérapie ?





Susceptibilité individuelle aux RI

Fréquence 5 à 15 % pour les 2 phénomènes de radiosensibilité et de radioesthésie (CIPR, littérature internationale)

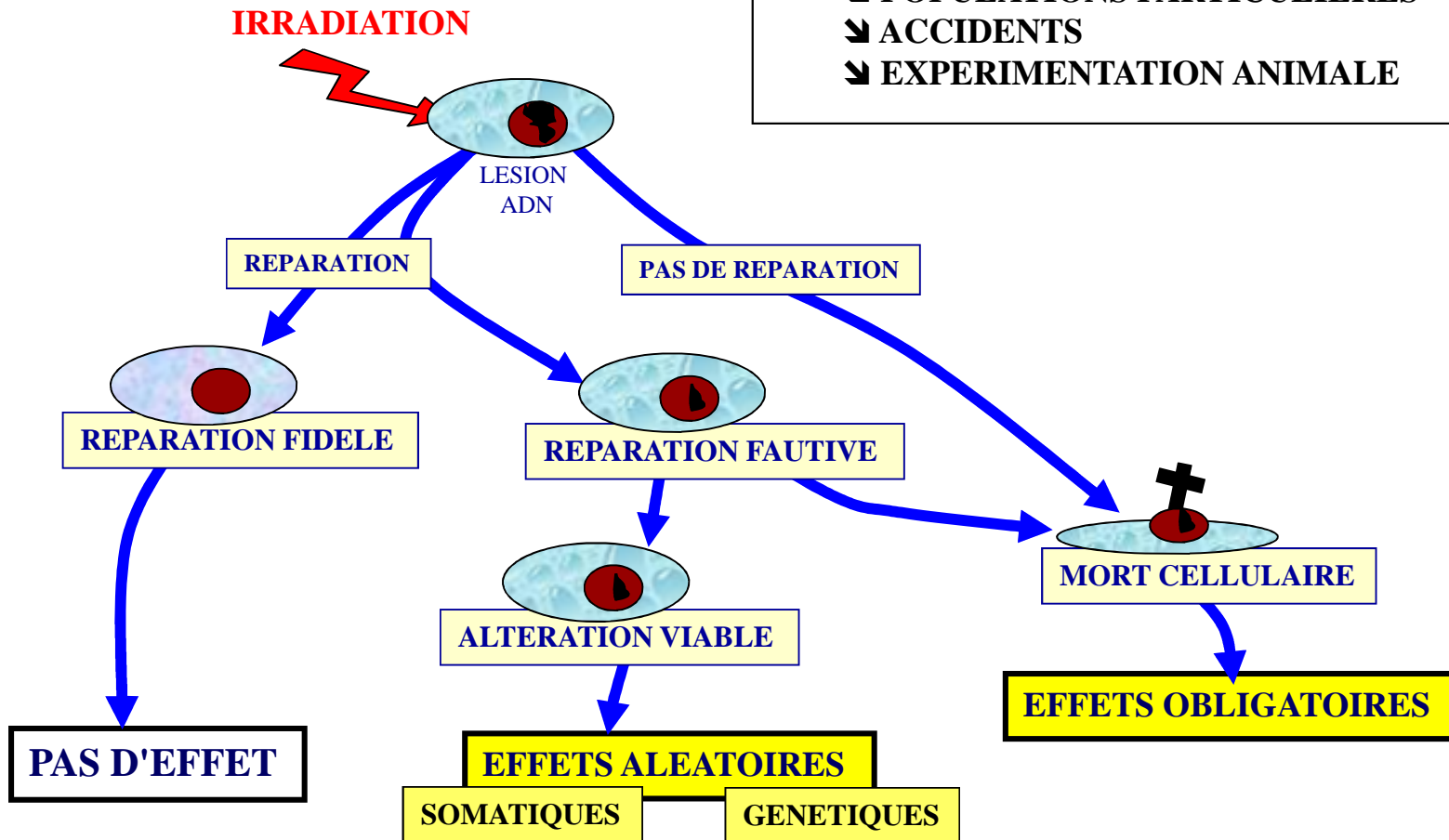
- Incertitudes sur ces valeurs mais recoupements d'indices
- Seuils de significativité
 - Subjectivité d'effets déterministes ?
 - Part des RI dans la genèse d'un cancer ?
- Anomalies génétiques homozygotes identifiées + hétérozygotes (ATM 1%)



Les mécanismes de la susceptibilité individuelle aux RI

4 GRANDS TYPES D'OBSERVATIONS EN RADIOPATHOLOGIE

- HIROSHIMA, NAGASAKI
- POPULATIONS PARTICULIERES
- ACCIDENTS
- EXPERIMENTATION ANIMALE





Comprendre

Le plus simple est de retourner voir ce qui se passe au niveau de l'ADN puisque les rayonnements ionisants sont susceptibles :

- d'induire la mort cellulaire du fait de lésions majeures de l'ADN
- de créer des mutations, des aberrations chromosomiques et une instabilité génomique impliquées apparemment dans la pathogénie des cancers !

Retour à la cancérogenèse
et à la radiobiologie



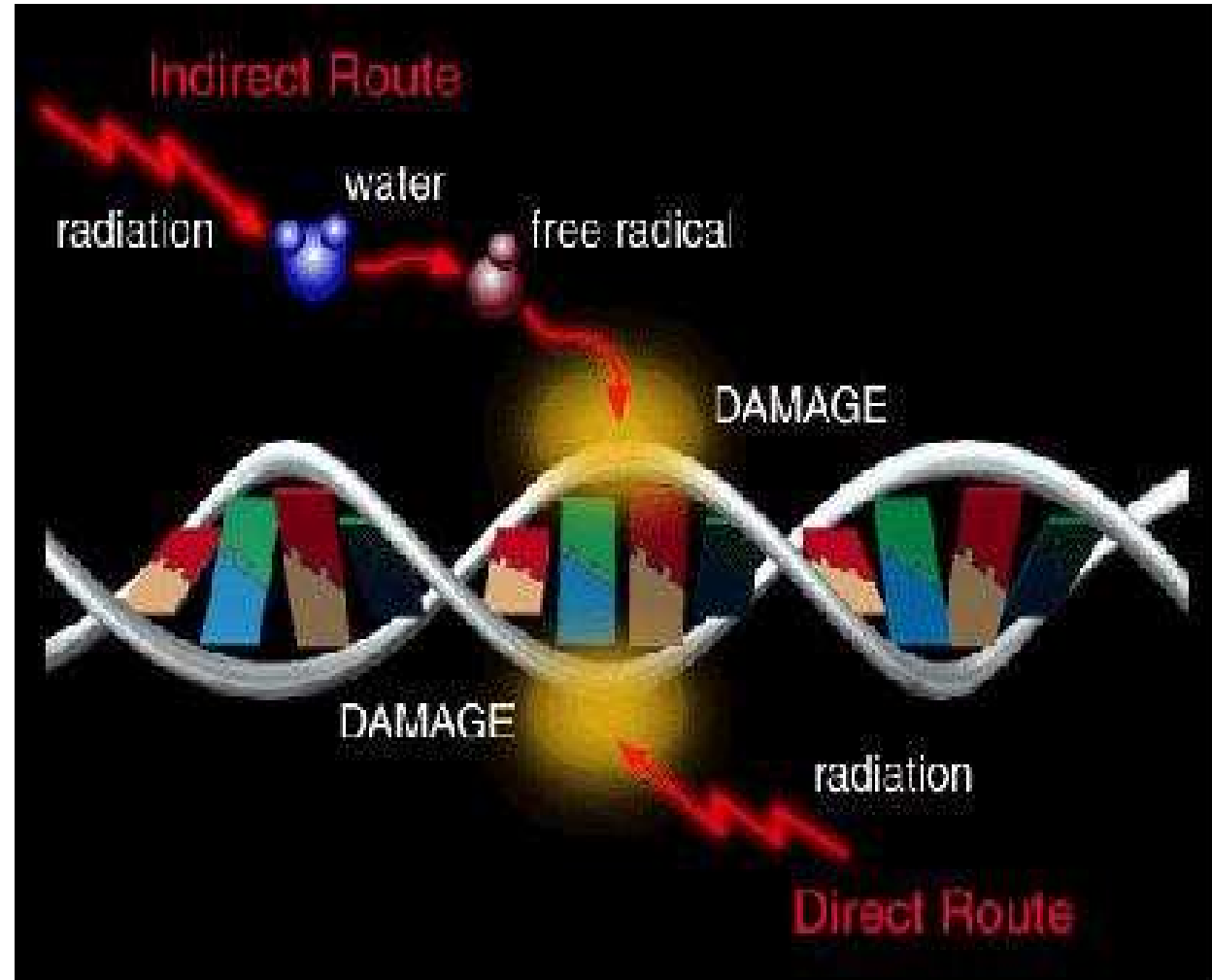


Les effets moléculaires des radiations ionisantes (1)

Deux
molécules
Critiques:
H₂O et ADN

Espèces
Radicalaire

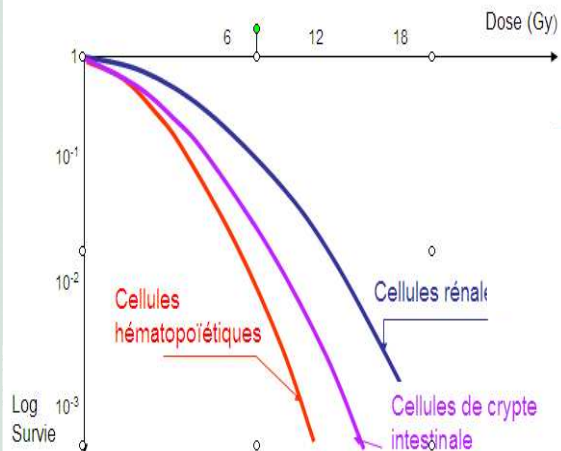
H[•] et OH[•]



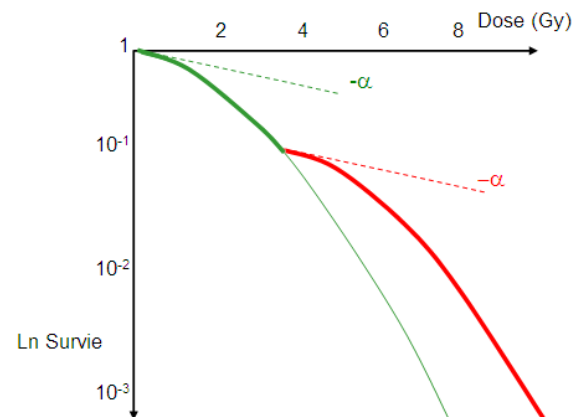


Facteurs of radiosensibilité

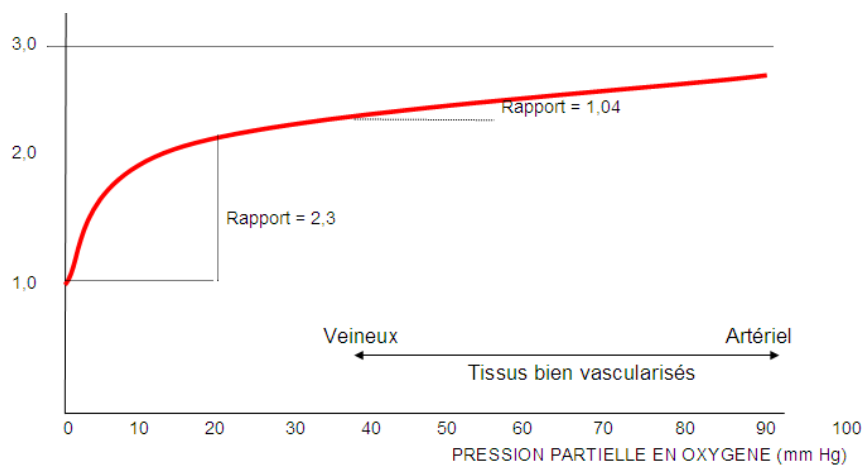
Cellules jeunes



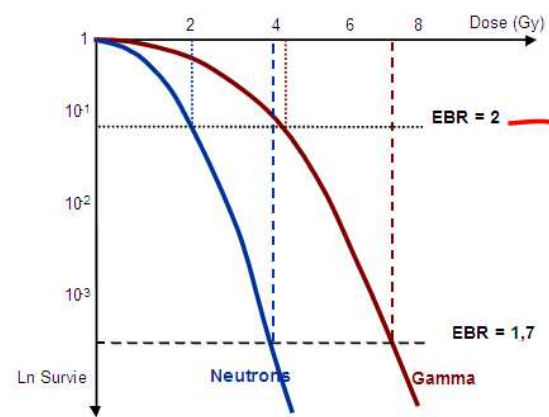
Type Cellulaire



Fractionnement de Dose



pression O₂

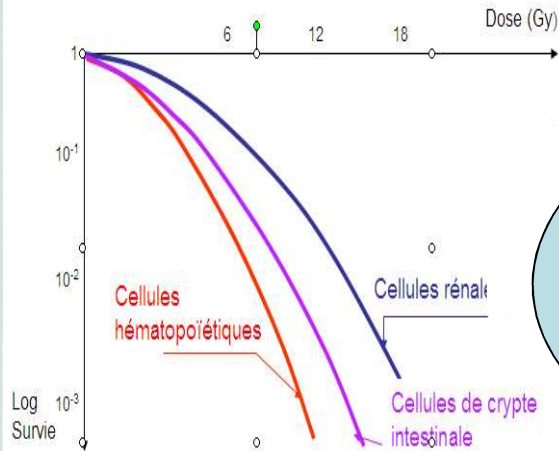


Type de radiations



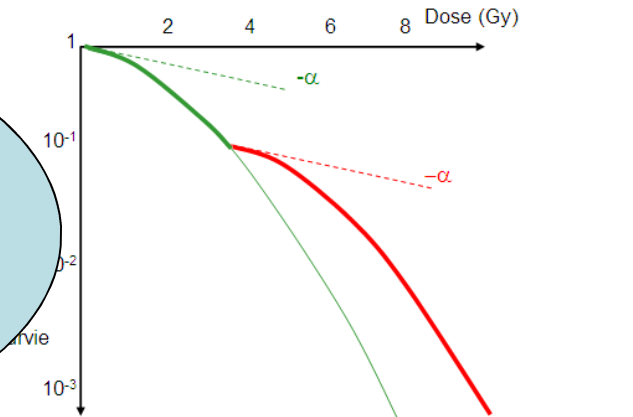
Facteurs of radiosensibilité

Cellules jeunes

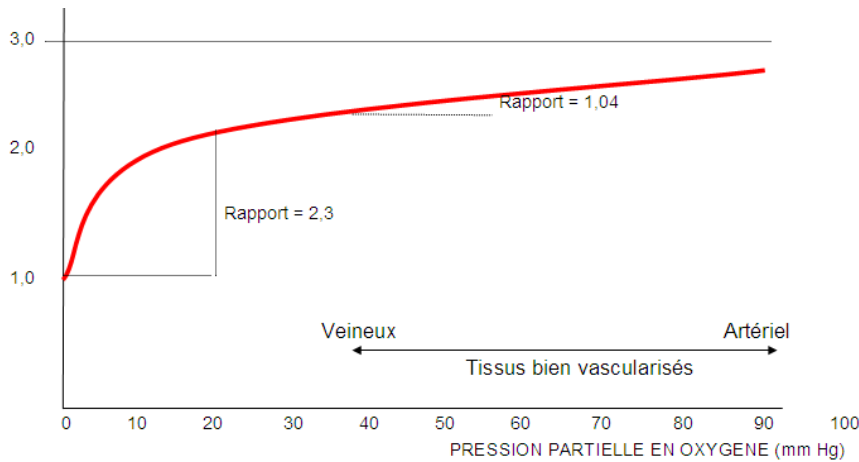


Type Cellulaire

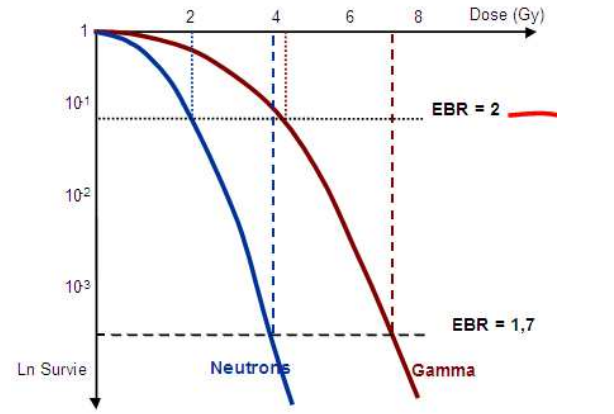
Les susceptibilités individuelles



Fractionnement de Dose



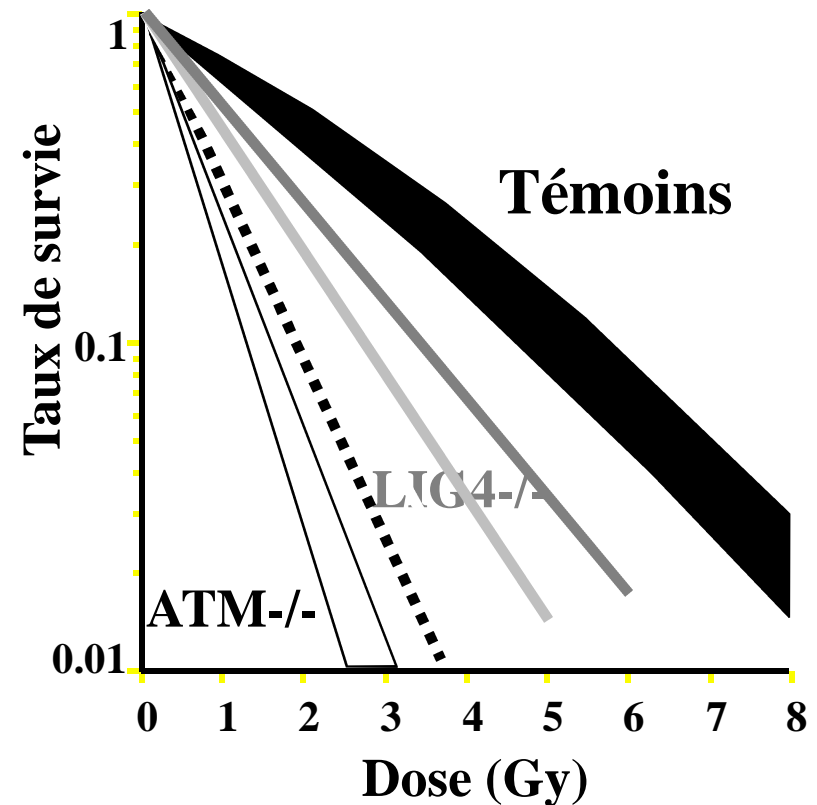
pression O₂



Type de radiations



- Ataxia telangiectasia (ATM)
- Syndrome LIG4 (LIG4)
- Syndrome de Nimègue (NBS1)
- Syndrome ATLD (MRE11)
- Syndromes de Cockayne (CS)
- Xeroderma Pigmentosum (XP)
- Hypogammaglobulinémie (LIG1)
- Anémie de Fanconi
- Syndrome de Bloom, ...



Deschavanne et fertil, 1996





SYNDROMES GENETIQUES	GENE IMPLIQUE	ROLE DU GENE DANS LA REPARATION	SF2 (%)
Ataxie telangiectasie	ATM	Signalisation, contrôle NHEJ et MRE11	1-5
Syndrome Ligase IV	LIG4	NHEJ	2-6
Syndrome de Nimègue	NBS1	Voie MRE11	5-9
Progeria (Hutchinson-Gilford)	Lamin A	transport d'ATM	8-19
Ataxie telangiectasie (mutations homozygotes variantes)	ATM	Signalisation, contrôle NHEJ et MRE11	10-15
Syndrome d'Usher	Gènes USH	?	15-20
Syndrome de Cockayne	Gènes CS	Hélicases, nucléases NER	15-30
Xeroderma Pigmentosum	Gènes XP	Hélicases, nucléases NER	15-30
Syndrome ATLD	MRE11	Endonucléase, Voie MRE11	15-40?
Chorée de Huntington	IT15	?	18-30
Syndrome de Gardner	APC ?	MMR?	20-30
Syndrome de Turcot	hMSH2 ?	MMR?	20-30
Anémie de Fanconi et BRCA2	Gènes FANC	Protéine support	20-40
Syndrome BRCA1	BRCA1	Protéine support	20-40
Syndrome Artémis	Artémis	NHEJ	20-40
Syndrome Cernunnos	XLFI/Cernunnos	NHEJ	20-40
Syndrome d'Omenn	RAG1, RAG2	NHEJ ?	30-50 ?
Syndrome Rothmund-Thomson	RecQ4	Hélicase	30-50
Syndrome de Werner	WRN	Hélicase	30-50
Syndrome de Bloom	BLM	Hélicase	30-50
Syndrome de Seckel	ATR	Signalisation	60-80
Témoins radorésistants		60-80	60-80

% survie à 2 Gy





Un nouvelle radiobiologie

« DNA damage response »





Radiobiologie (1)

Le défi de l'intégrité du génome : prévenir les mutations et aberrations chromosomiques

- Des milliers de lésions quotidiennes en majorité liées au métabolisme cellulaire normal
- Et aux génotoxiques de l'environnement (tabac, alcool, agents infectieux, radiations ionisantes, toxiques chimiques...)
- Cassures programmées du réarrangement génomique (lymphocytes, cellules souches...)
- Un système de signalisation et de réparation +++

Lindahl & Barnes 2000 – Jackson & Bartek 2009





Radiobiologie (2)

Les CDB de l'ADN et leur réparation

- facilement dues aux RI (dépôts d'énergie en grappe en fin de parcours)
- les plus graves car pas de brin complémentaire de réparation
 - pas de réparation fidèle par recombinaison homologue
 - réparation non homologue (NHEJ)
- influence du cycle cellulaire
- mort cellulaire pas inéluctable

Hartlerode & Scully 2009 – Pardo & al 2009



Radiobiologie (3)

Le risque n'est pas le même pour tous !

- La même dose absorbée produit les mêmes lésions initiales de l'ADN (40 CDB /Gy + les autres lésions 50 à 100 fois plus nombreuses)
- C'est la persistance des lésions qui compte : la signalisation et la réparation des lésions de l'ADN fait la différence entre individus
- Les foci γ H2AX d'immunofluorescence montrent des CDB à 1 mGy. Il existe de vraies lésions résiduelles mal réparées aux faibles doses



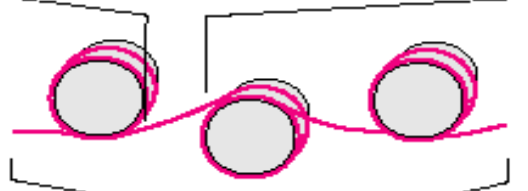
La cible est l'ADN? Mais quel ADN?

Double-hélice



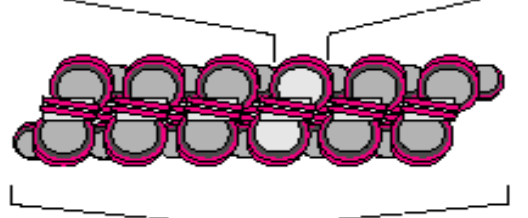
2 nm Compaction 1 (phase S)

Modèle solénoïdal



11 nm Compaction 2 (phase G1)

Modèle super-solénoïdal



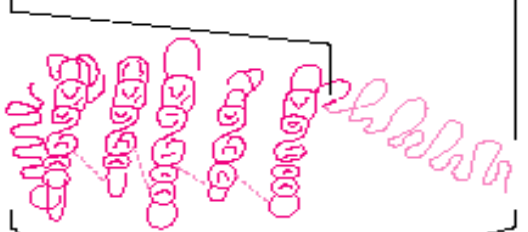
30 nm Compaction 3 (phase G1)

Boucle=loop



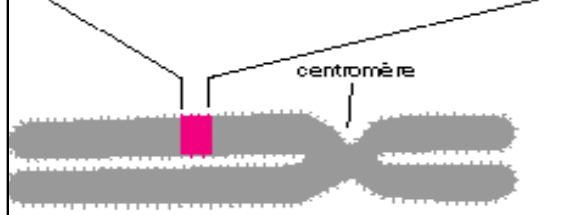
300 nm Compaction 4 (phase G1)

Chromosome



700 nm Compaction 5 (phase G2)

Chromosome



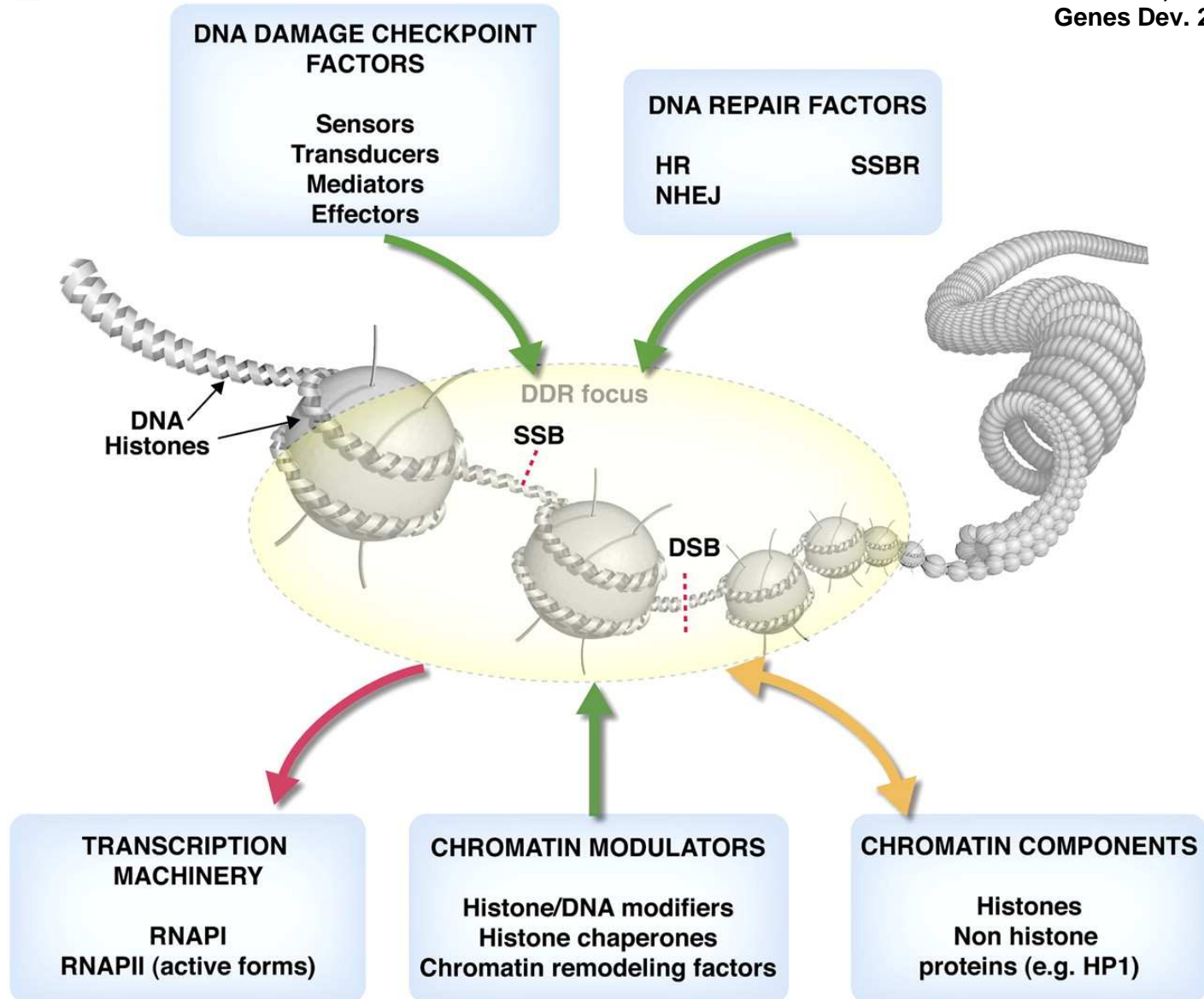
1400 nm Compaction 6 (phase M)





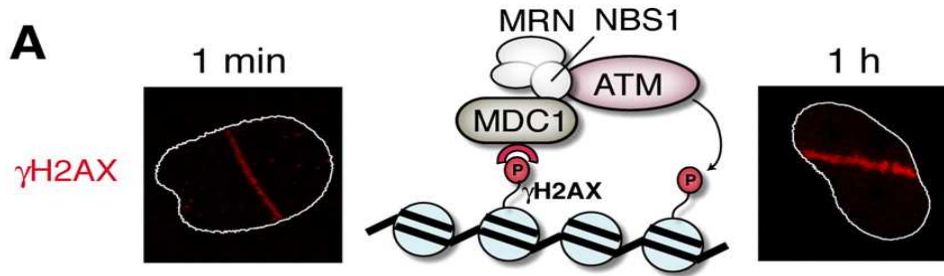
Protein dynamics to and from sites of DNA breaks.

Polo S E , Jackson S P
Genes Dev. 2011;25:409-433

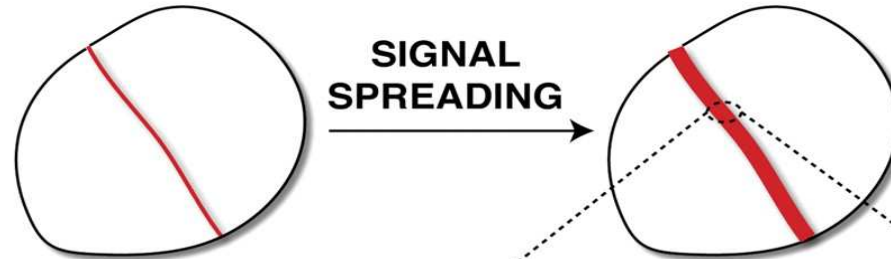


Spatial organization of DDR protein accumulation at DNA DSBs. (A) DDR signal spreading.

A

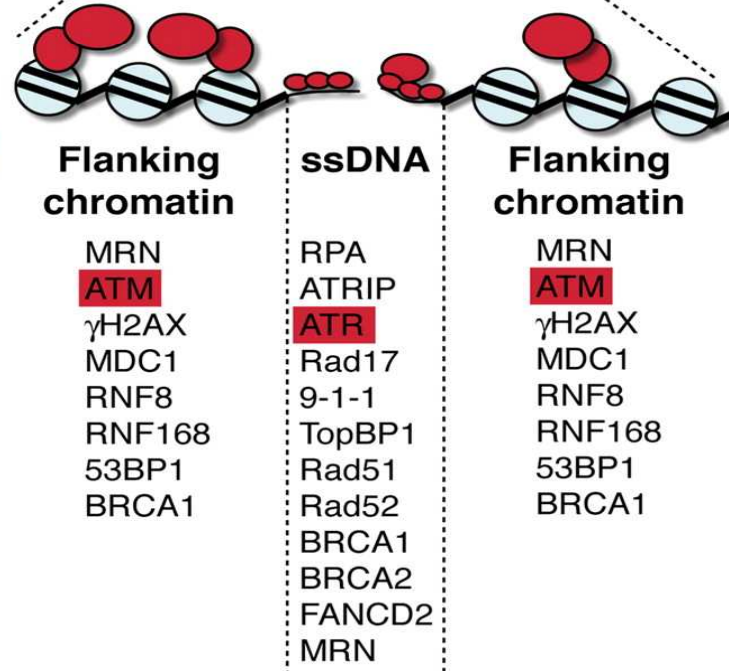
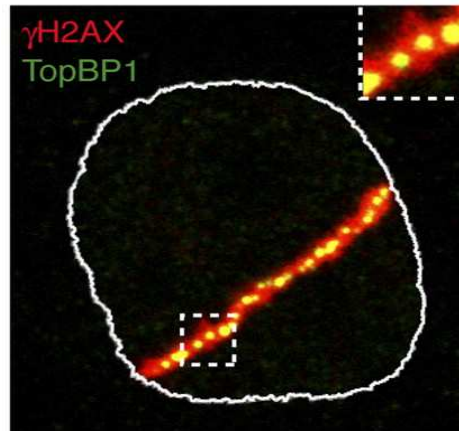


Polo S E , Jackson S P
Genes Dev. 2011;25:409-433

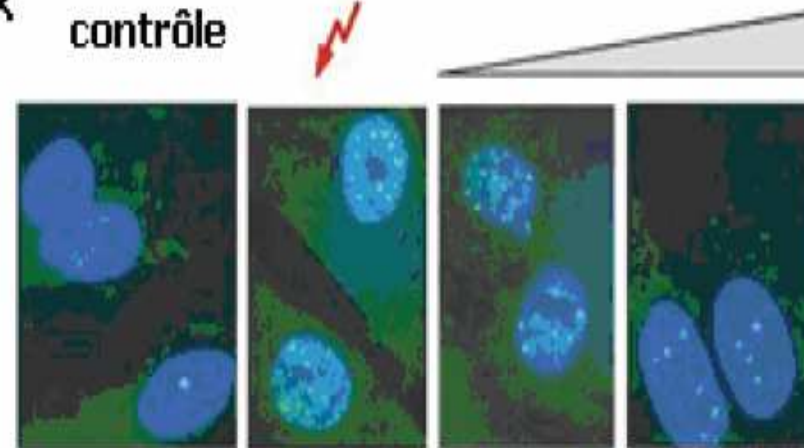
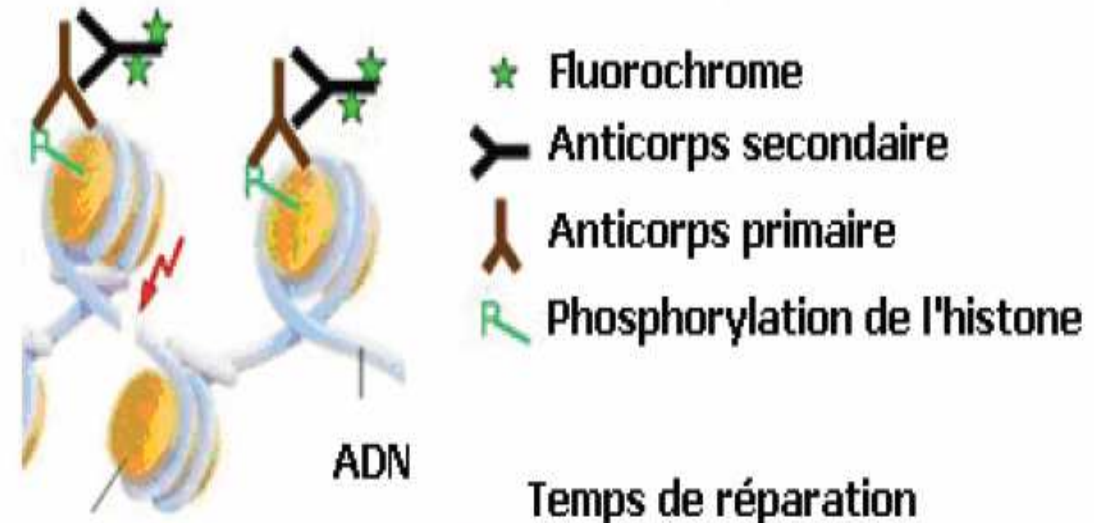
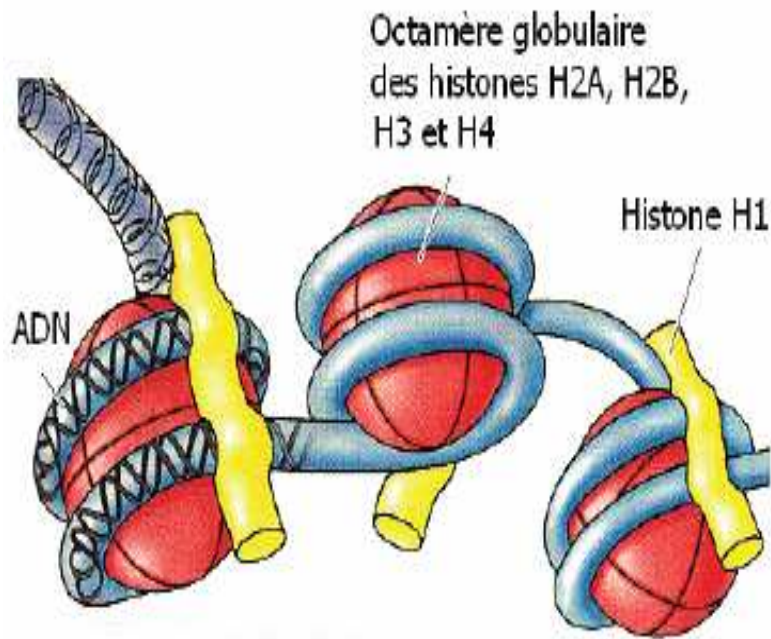


B

REGIONAL DISTRIBUTION



Une nouvelle technique d'investigation



Coloration bleue de la chromatine au DAPI

Visualisation des dommages radioinduits par l'analyse des foci γ H2AX immunofluorescents



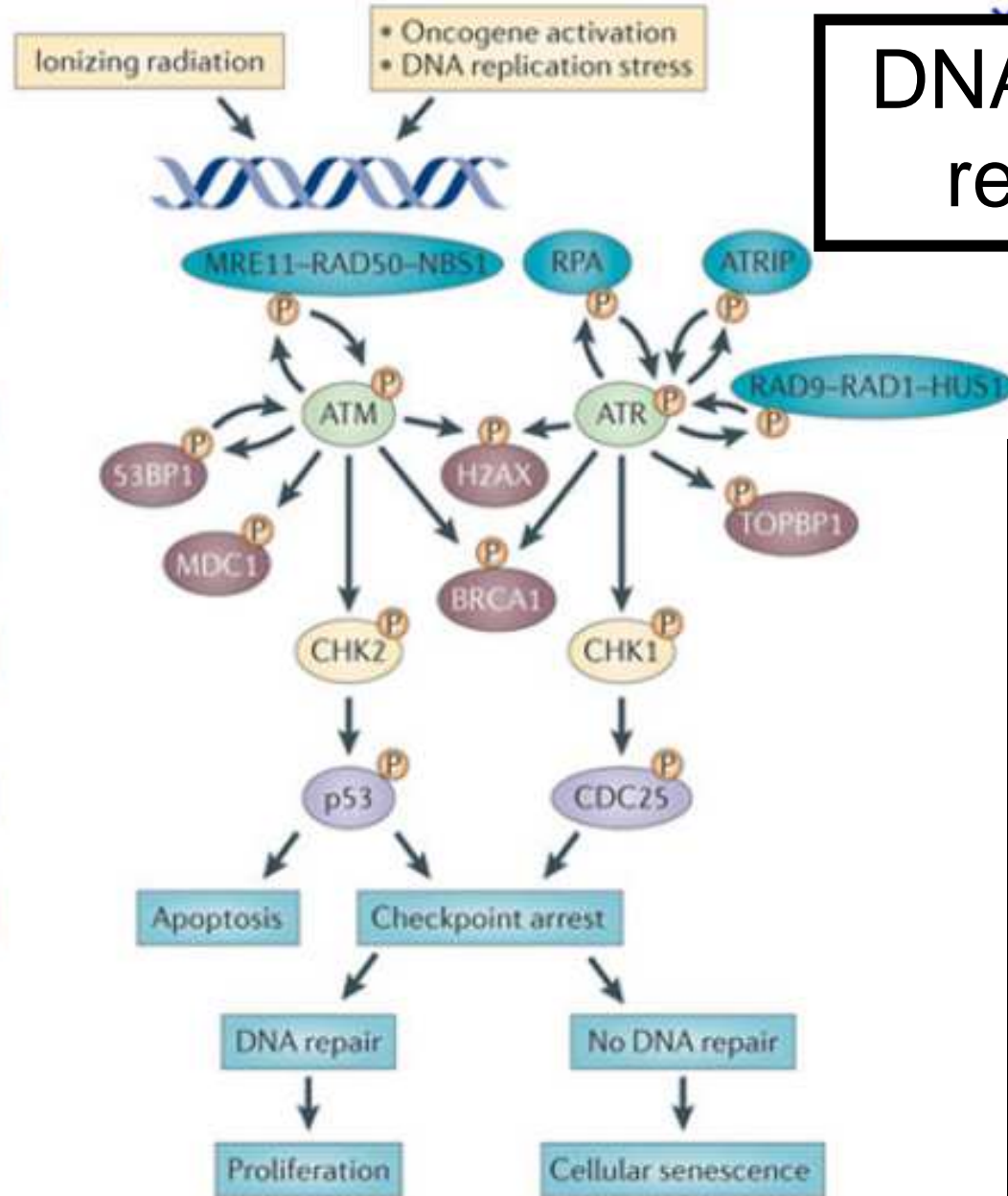


De nouvelles techniques d'investigation

- Mise en évidence de cassures double brins (CDB) de l'ADN à la dose de 1 mGy par la technique des anticorps fluorescents anti-histones γ H2-AX (*Rothkamm & Löbrich 2003*) :
 - gain de sensibilité d'un facteur 100 : seuil de 1 mGy
 - les effets d'un seul examen radiologique peuvent être visualisés et quantifiés !
- Mise en évidence des CDB mal réparées par immunofluorescence MRE11
- Autres marqueurs de la chaîne de signalisation et de la réparation des lésions de l'ADN (ATM, 53BP1, ...), autant de cibles potentielles à visualiser par immunofluorescence



DNA damage response



DNA damage sensors

Apical kinases

DNA damage mediators

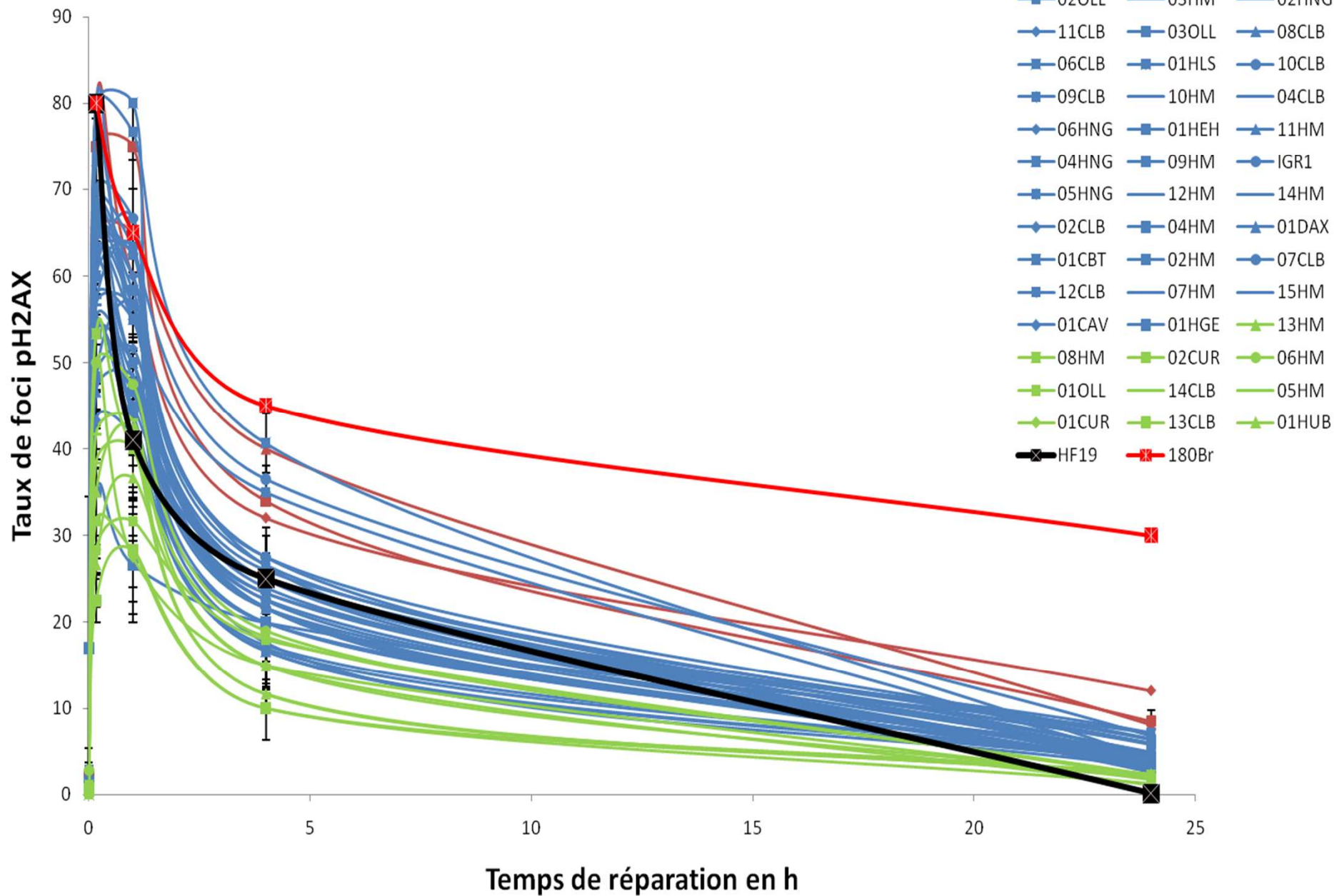
Downstream kinases

Effectors

Outcomes

Cascade de signalisation après dommages de l'ADN...
 autant de cibles potentielles à visualiser par immuno fluorescence

Cinétique foci pH2AX





La nouvelle radiobiologie
permet d'explorer
la radiosensibilité cellulaire





Un regard neuf sur des phénomènes anciens et des phénomènes nouveaux !

- La radiosensibilité individuelle aux fortes doses (1911)
- La radiosensibilité aux faibles doses
- La radiosusceptibilité individuelle aux faibles doses





La radiosensibilité individuelle

- Connue des radiothérapeutes depuis longtemps
- Responsable des effets secondaires « normaux » & complications de la radiothérapie (effets déterministes) sans erreur de dose ou de centrage
- Est due à un défaut (des défauts) génétiques dans la signalisation et le réparation de l'ADN : Ataxie télangiectasie, syndrome de Nijmegen... plus de 20 marqueurs identifiés
- Effet significatif (probablement de 1 à 10). Chez les patients homozygotes, hypersensibilité aux RI : danger de mort en radiothérapie
- Concerne 5 à 15 % de la population (hétérozygote pour ces gènes : 1% de la population est ATM hétérozygote)





SYNDROMES GENETIQUES	GENE IMPLIQUE	ROLE DU GENE DANS LA REPARATION	SF2 (%)
Ataxie telangiectasie	ATM	Signalisation, contrôle NHEJ et MRE11	1-5
Syndrome Ligase IV	LIG4	NHEJ	2-6
Syndrome de Nimègue	NBS1	Voie MRE11	5-9
Progeria (Hutchinson-Gilford)	Lamin A	transport d'ATM	8-19
Ataxie telangiectasie (mutations homozygotes variantes)	ATM	Signalisation, contrôle NHEJ et MRE11	10-15
Syndrome d'Usher	Gènes USH	?	15-20
Syndrome de Cockayne	Gènes CS	Hélicases, nucléases NER	15-30
Xeroderma Pigmentosum	Gènes XP	Hélicases, nucléases NER	15-30
Syndrome ATLD	MRE11	Endonucléase, Voie MRE11	15-40?
Chorée de Huntington	IT15	?	18-30
Syndrome de Gardner	APC ?	MMR?	20-30
Syndrome de Turcot	hMSH2 ?	MMR?	20-30
Anémie de Fanconi et BRCA2	Gènes FANC	Protéine support	20-40
Syndrome BRCA1	BRCA1	Protéine support	20-40
Syndrome Artémis	Artémis	NHEJ	20-40
Syndrome Cernunnos	XLFI/Cernunnos	NHEJ	20-40
Syndrome d'Omenn	RAG1, RAG2	NHEJ ?	30-50 ?
Syndrome Rothmund-Thomson	RecQ4	Hélicase	30-50
Syndrome de Werner	WRN	Hélicase	30-50
Syndrome de Bloom	BLM	Hélicase	30-50
Syndrome de Seckel	ATR	Signalisation	60-80
Témoins radiorésistants		60-80	60-80

% survie à 2 Gy





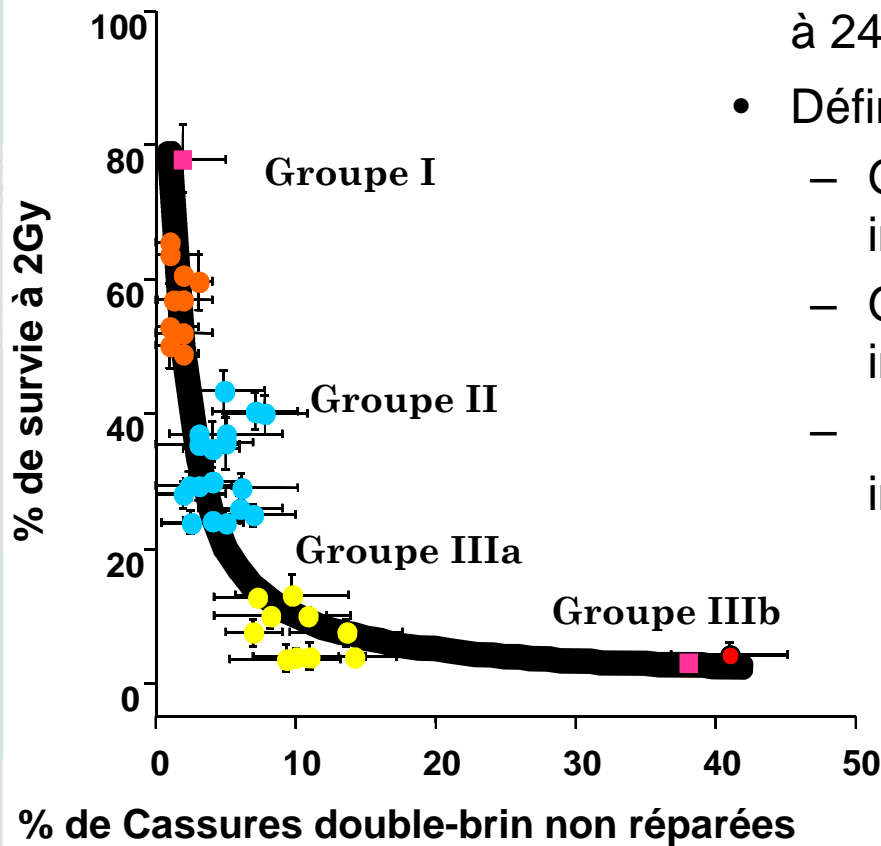
Prédiction de la radiosensibilité individuelle

Mise en évidence aux fortes doses *ex vivo*

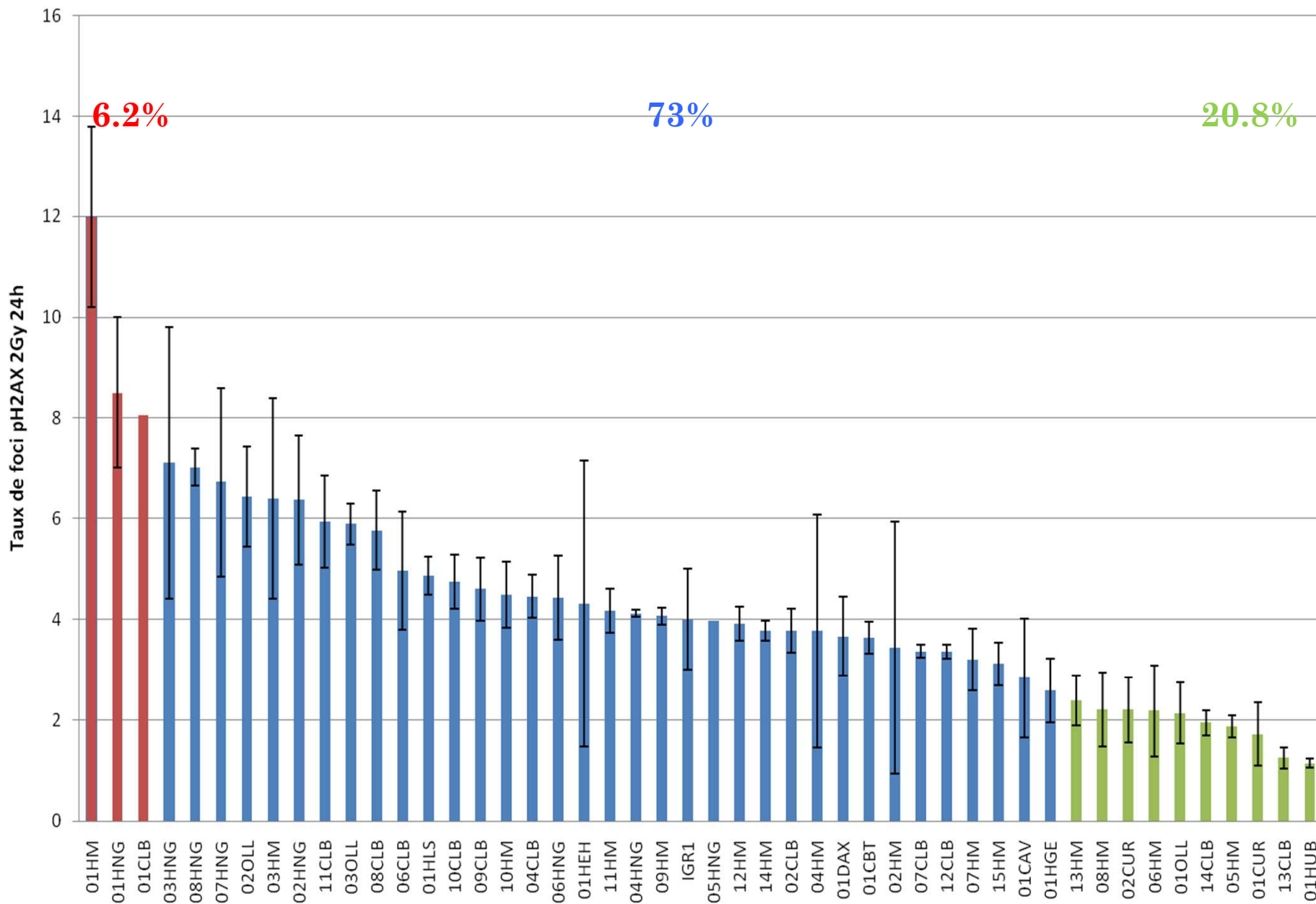
- Fibroblastes de peau (micro biopsie) mis en culture et exposés à 2 Gy (irradiateur médical)
- Immunofluorescence, 3 anticorps spécifiques
 - γ H2AX : reconnaissance des CDB ADN
 - ATM : signalisation du cytoplasme vers le noyau
 - MRE11 : suture « bête » des CDB ADN & instabilité génomique

Groupes de radiosensibilité

- Caractérisation de 40 lignes de fibroblastes de syndromes connus de radiosensibilité
- γ H2AX est un indicateur inverse de la survie à 24h
- Définition of 3 groupes de radiosensibilité
 - Groupe I: radorésistance et faible instabilité génomique
 - Groupe II: radiosensibilité intermédiaire et instabilité génomique
 - Groupe III: hyper-radiosensibilité et instabilité génomique



Gamme de radiosensibilité des patients



Groupe III

Groupe II

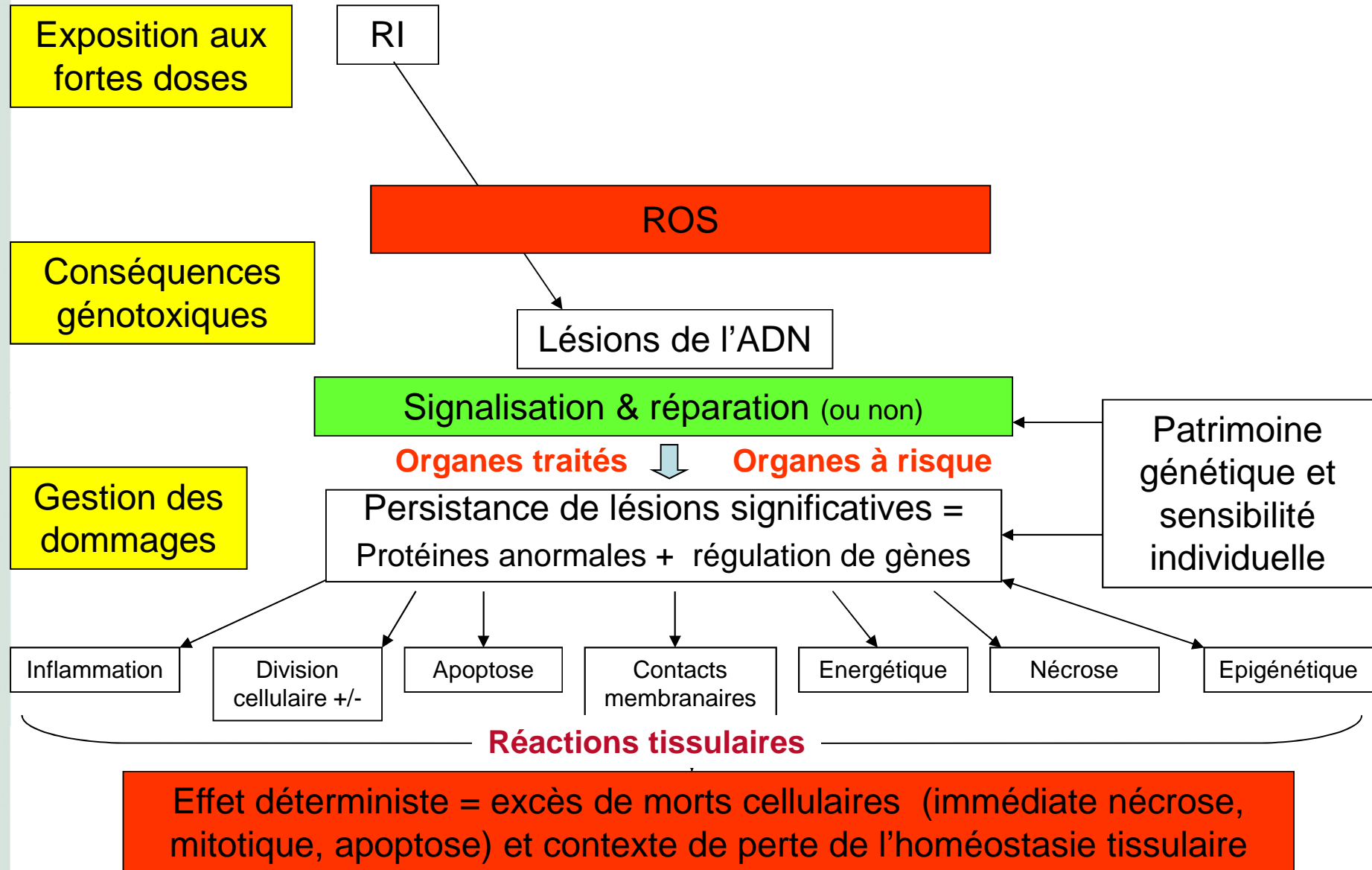
Groupe I?

6.2%

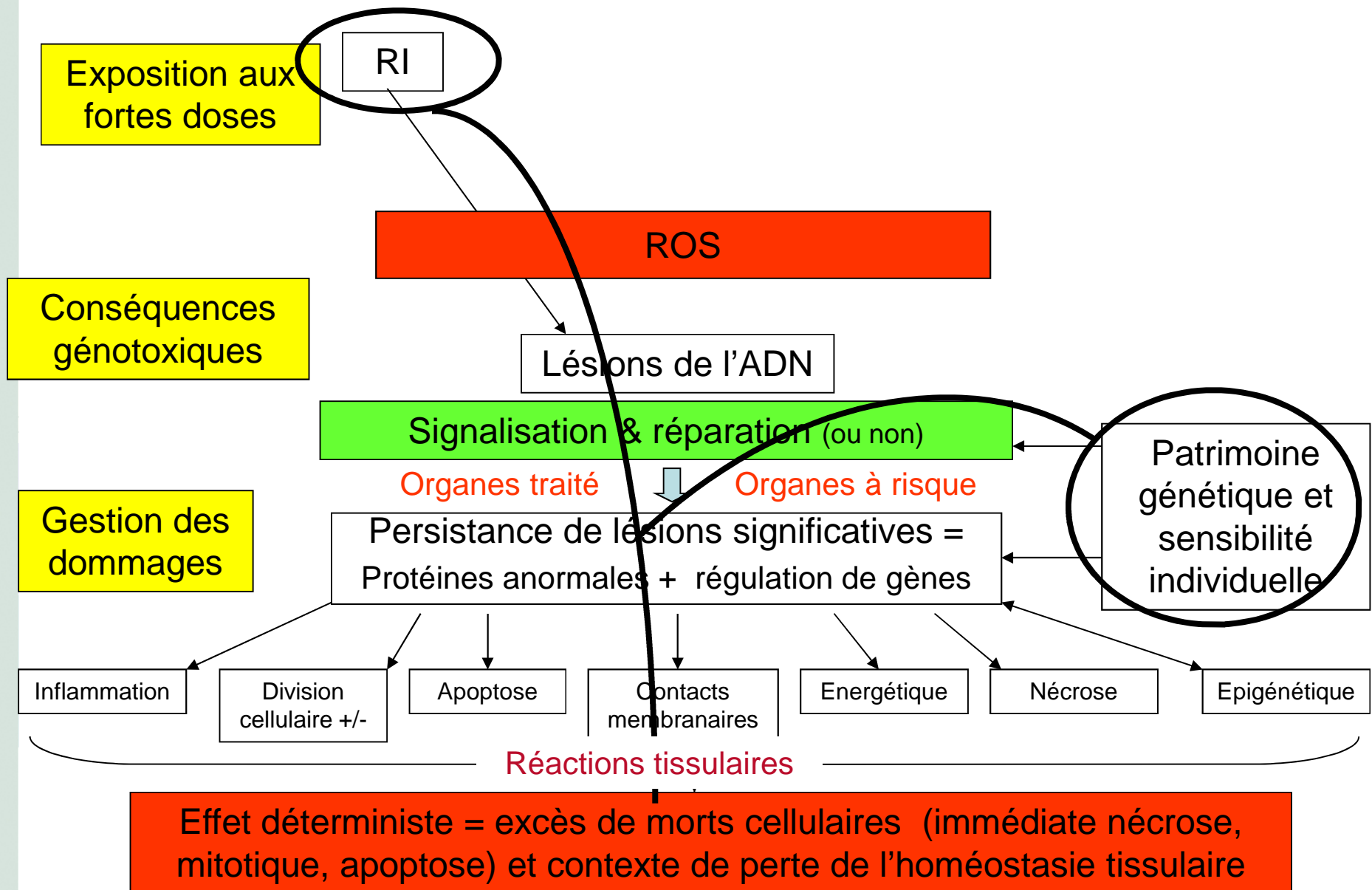
73%

20.8%

Complications RTH



Complications RTH et radiosensibilité individuelle





La radiosensibilité individuelle

De nombreuses techniques d'investigation

- Cellulaires : clonogénicité, MTT, apoptose
- Cytogénétiques : micronoyaux, test en G2
- Expression protéique et autres omiques
- Expression ARN : microarrays
- Variations de l'ADN : mutations, polymorphisme
- DNA damage : test des comètes, **foci d'immunofluorescence DDR**
- **Test d'apoptose lymphocytaire radioinduite**





La radiosensibilité individuelle

Le choix des cellules à tester ?

- Lymphocytes
- Fibroblastes cutanés
- Follicule pileux ...

La dose d'irradiation ?

Des facteurs d'influence à étudier

- Tabac
- Diabète
- Age
- Sexe ...



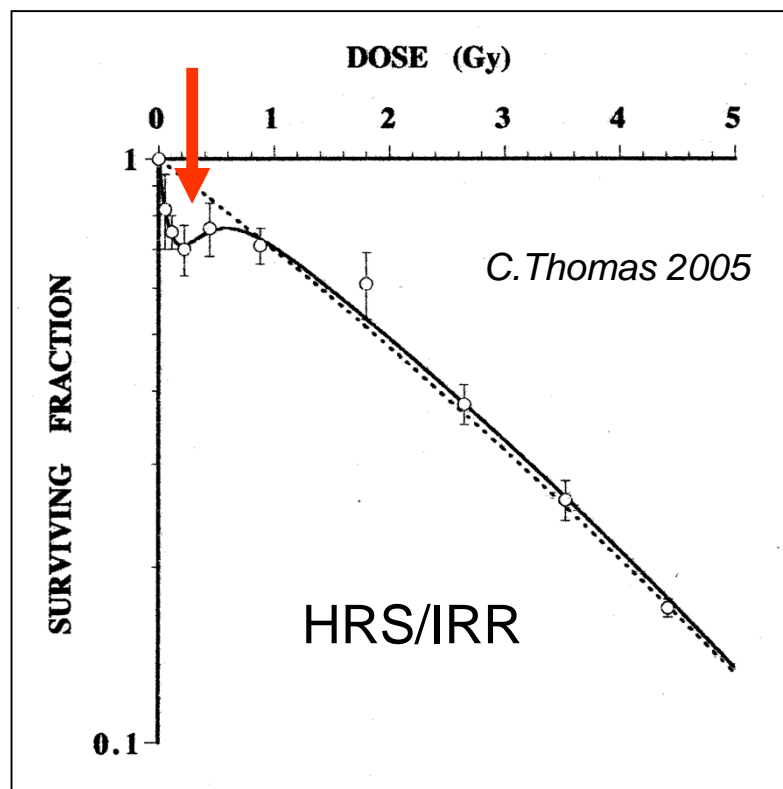


Et aux faibles doses ?



Radiobiologie

1. Le phénomène d'hyper-radiosensibilité faibles doses



Joiner et Marples, 2001

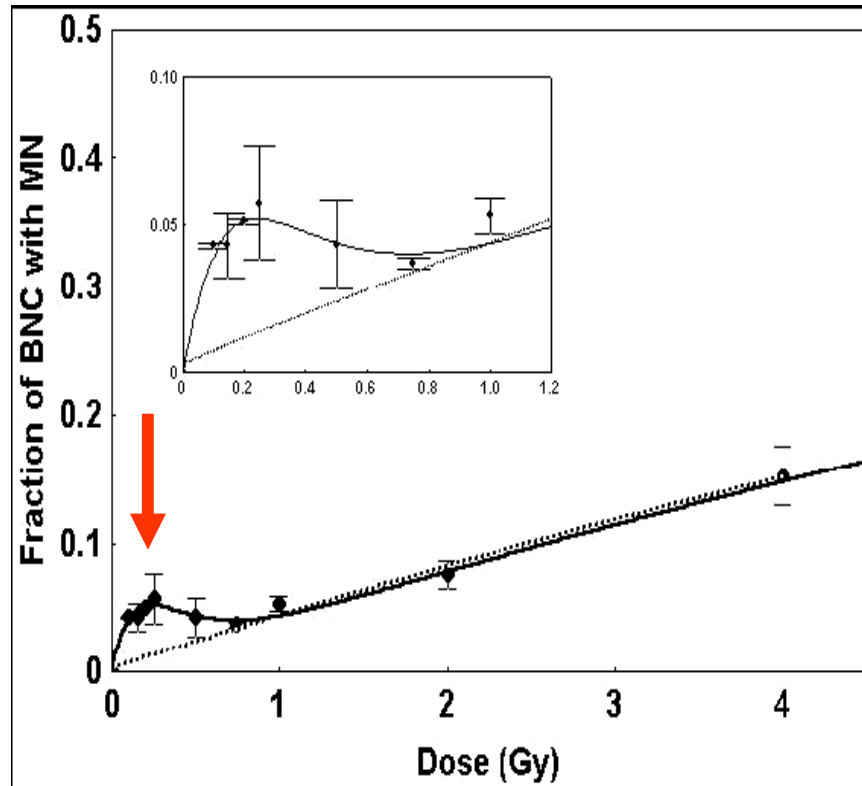
Survie cellulaire et hyper radiosensibilité

- Cellules de gliome humain T98G
- Rayons X 240 kV
- Entre 100 et 300 mGy ~ effet significatif



Radiobiologie

2. Le phénomène d'hyper-radiosensibilité faibles doses



Slonina, 2006, 2007

Micro noyaux et hyper radiosensibilité

- Fibroblastes et kératinocytes humains
- Rayons γ
- Entre 100 et 300 mGy
~ effet significatif



Radiobiologie

3. Le phénomène d'hyper-radiosensibilité faibles doses

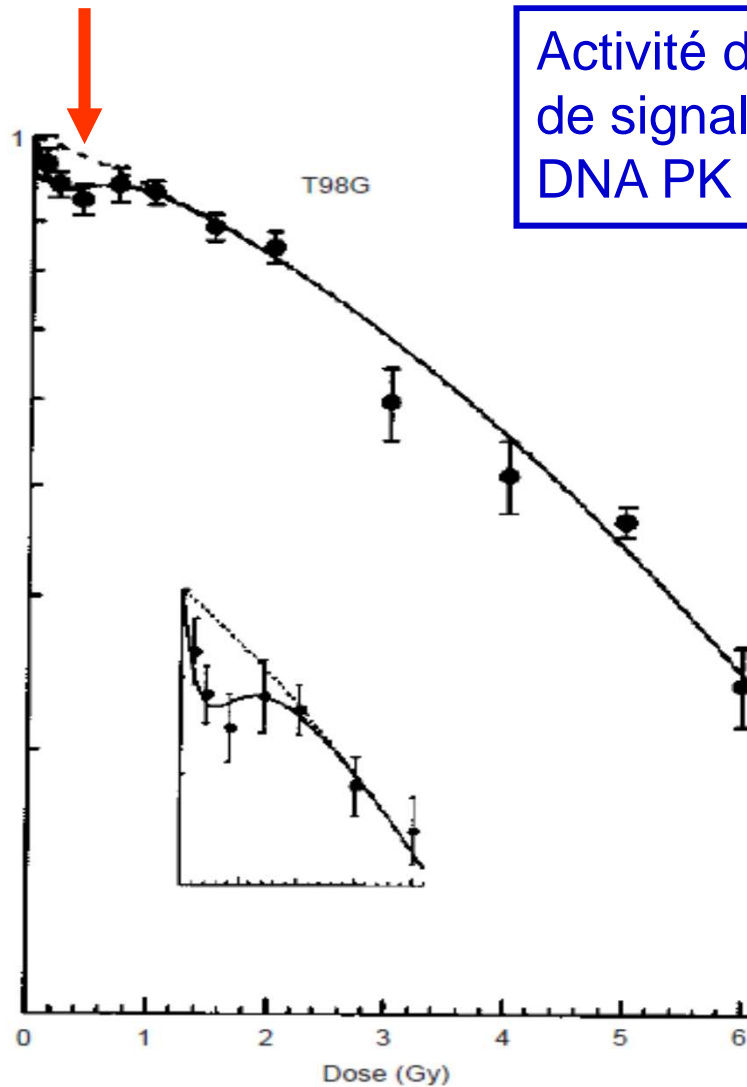
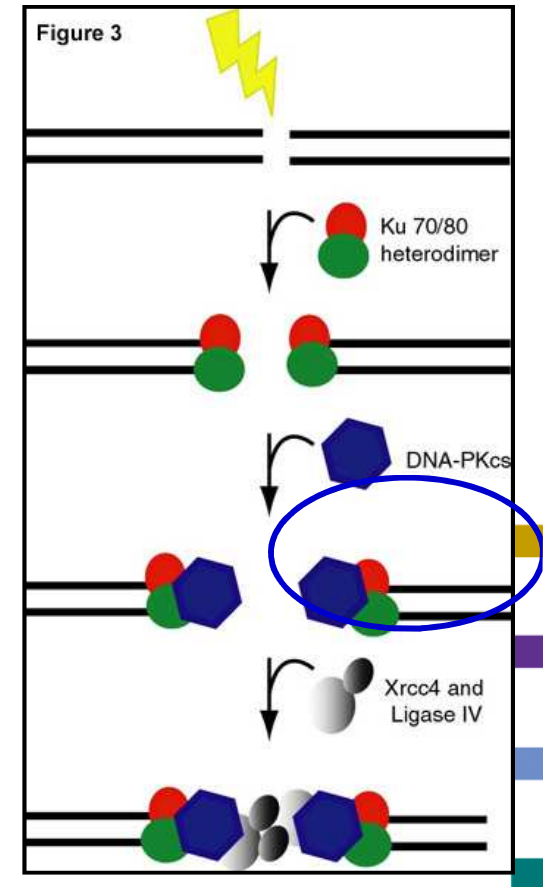


Figure 1 Dose response in T98G human glioblastoma cells in vitro showing low doses (< 0.5 Gy) hyper-radiosensitivity (Short et al, 1999)



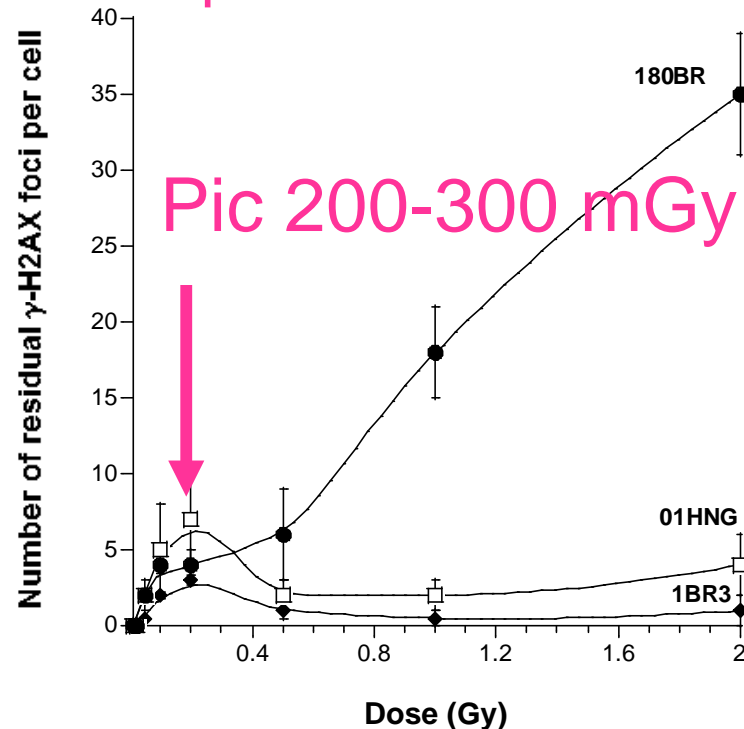
*Vaganay-Juéry, 2000
Decreased DNA-PK activity in
human cancer cells exhibiting
HRS to low-dose irradiation*



Radiobiologie

4. Le phénomène d'hyper-radiosensibilité faibles doses

Non réparés



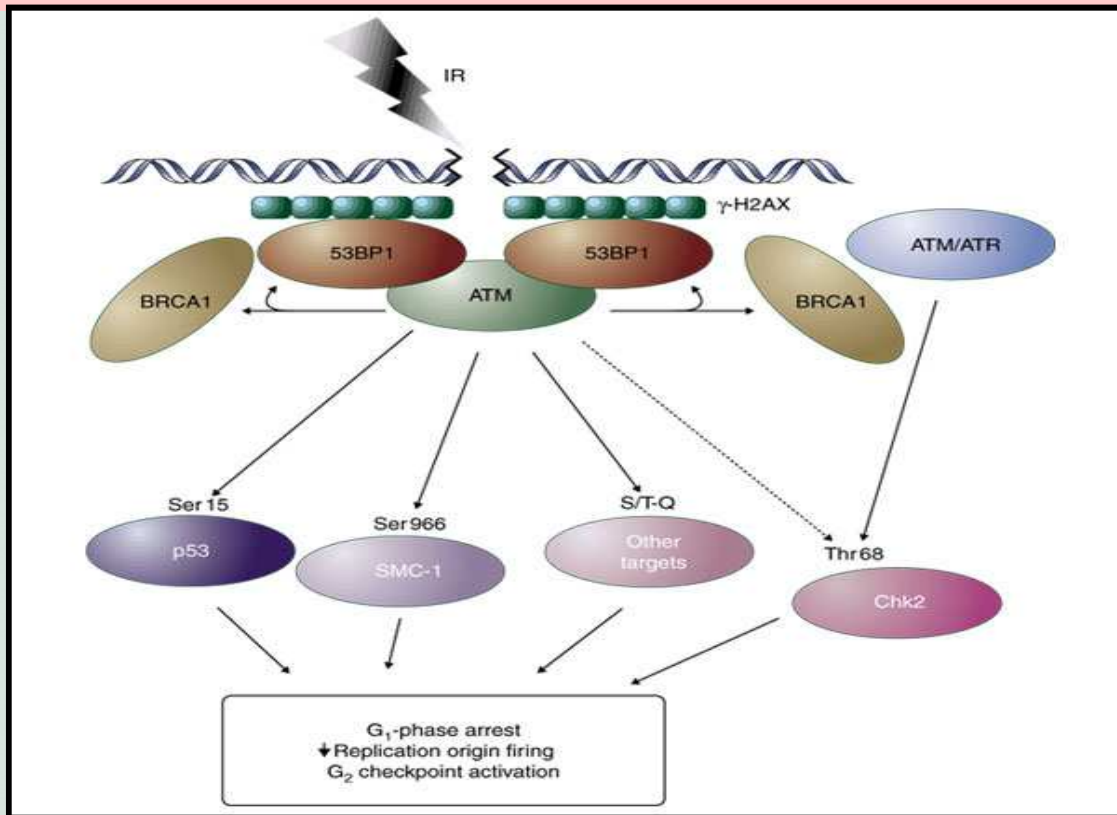
Etude de 3 lignées
de fibroblastes
humains

*MRE11 and H2AX biomarkers in the response to low-dose exposure:
Balance between individual susceptibility to radiosensitivity
and to genomic instability*

C. Colin & N. Foray et al., 2011, IJLR

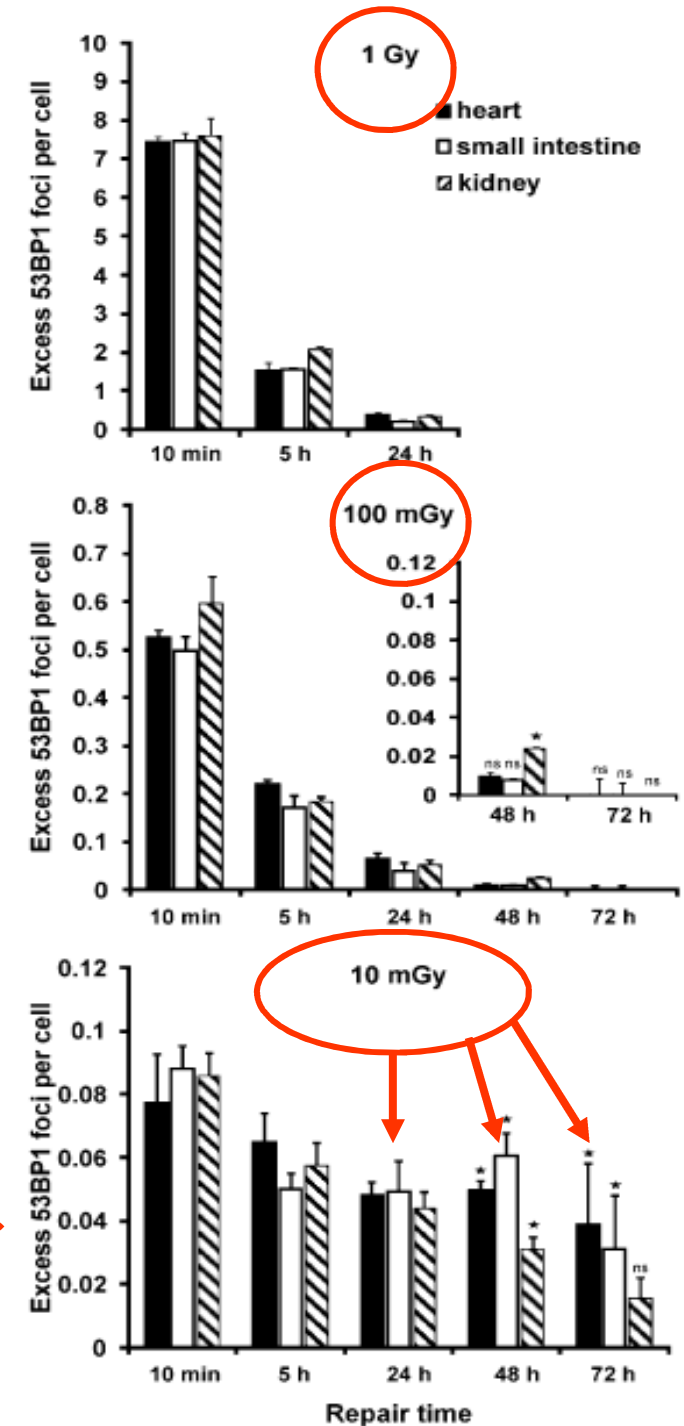
Radiobiologie

Diminution de la réparation aux faibles doses



Souris C57BL/6
 A 10 mGy : Défaut de réparation
 des dommages à 24h, 48h, 72h

Grudzenski, PNAS 2010





L'hyper-radiosensibilité faibles doses

Quels mécanismes ?

- En phase G2 seulement : *Joiner 2012*
- Supprimé par l'activation d'ATM et amplifié par la neutralisation d'ATM : *Joiner 2012*
- Diminution de DNA-PK (protéine de signalisation des dommages) : *Vaganay Juery 2000*
- Excès de foci 53BP1 = diminution de la réparation aux faibles doses (10mGy) par rapport à des doses plus fortes (100 et 1000 mGy) dans 3 lignées cellulaires (cœur, rein, intestin) à 12h, 24h et 36h: *Grudzenski 2010*





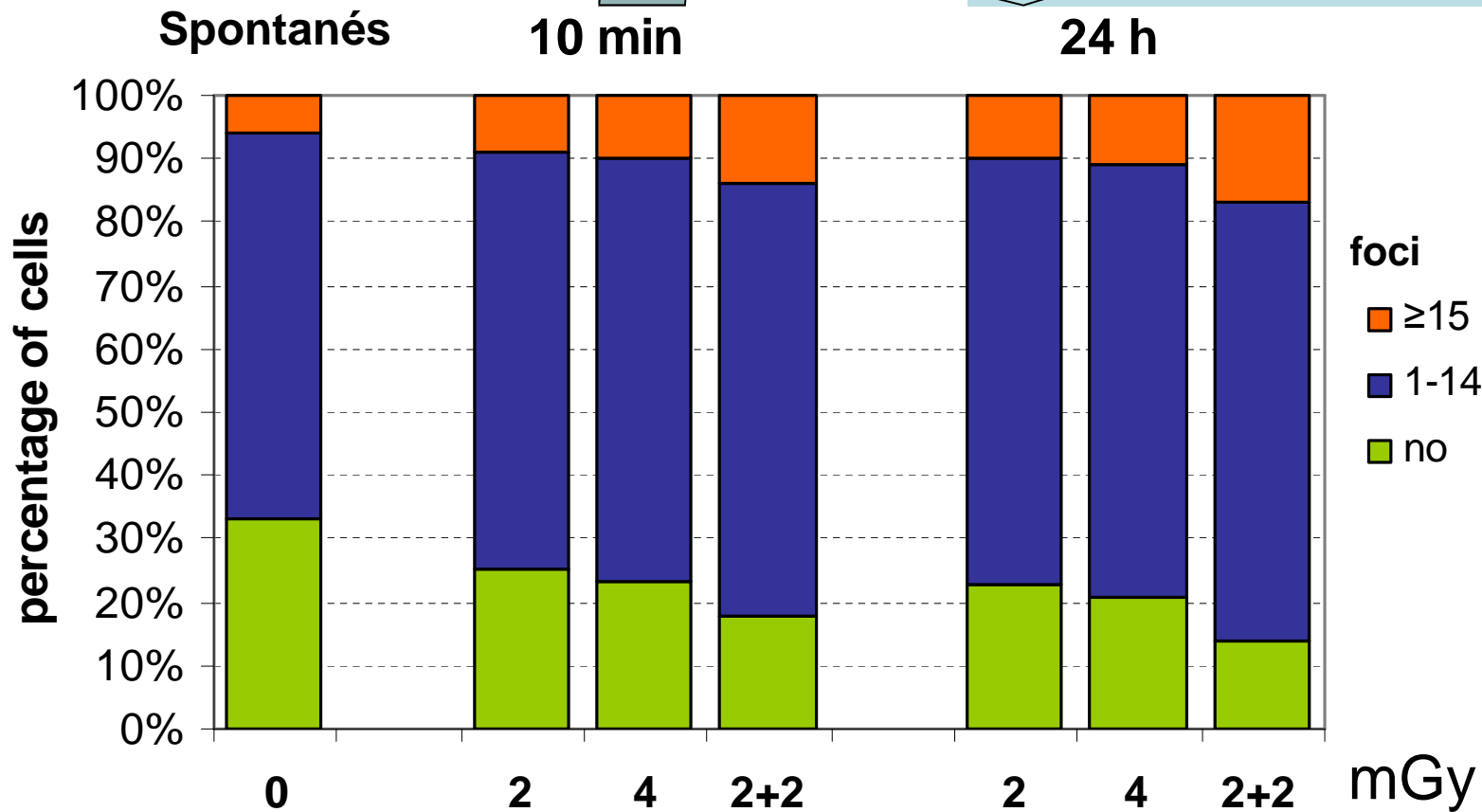
La radiosusceptibilité individuelle existe aussi aux faibles doses

Étude sur épithélium mammaire humain exposé ex vivo aux rayonnements ionisants dans les conditions de la mammographie. Comparaison de patients avec un faible risque de cancer / patients avec un haut risque familial (C.Colin 2011)



Résultats H2AX

Effet induction de CDB
entre 10 min et 24 h
effet L.A.D.I.

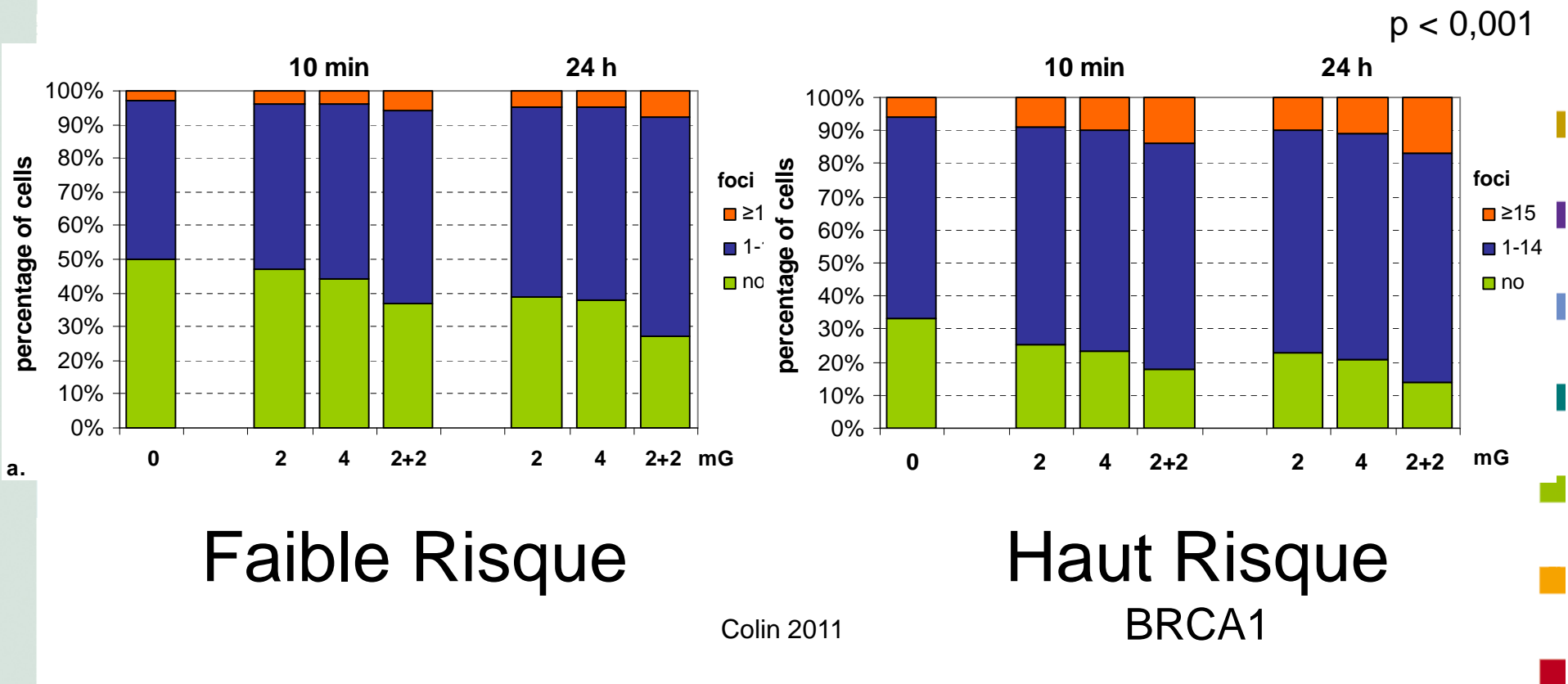
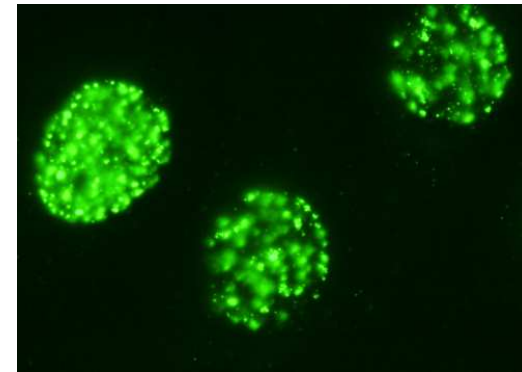


Effet dose

Effet répétition de doses
effet L.O.R.D.

Résultats H2AX

3 effets majeurs chez les femmes à haut risque familial de cancer du sein





La radiosusceptibilité individuelle aux faibles doses

Foci γ H2AX sur épithélium mammaire humain exposé ex vivo en condition mammographique

Colin 2011

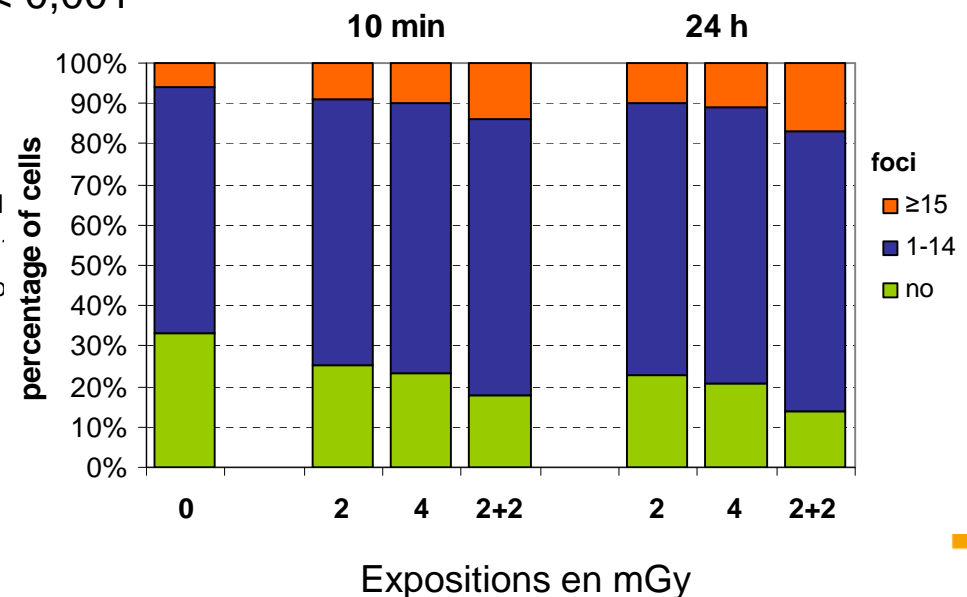
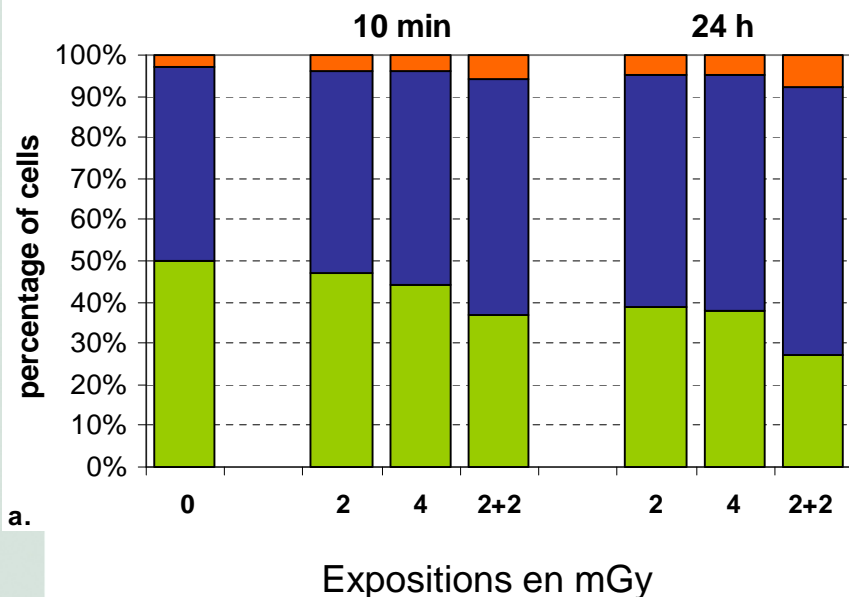
Effet dose, effet répétition de dose, effet d'induction de CDB entre 10 min et 24h

3 effets majeurs chez les femmes à haut risque familial de cancer du sein

Faible Risque de cancer du sein

Haut Risque de cancer du sein

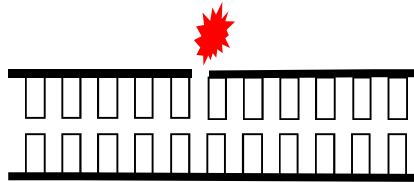
$p < 0,001$



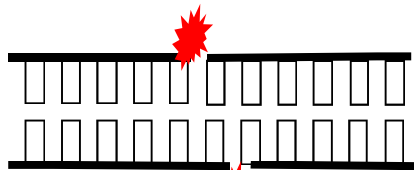
a.



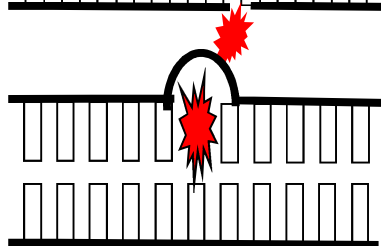
Les lésions de l'ADN



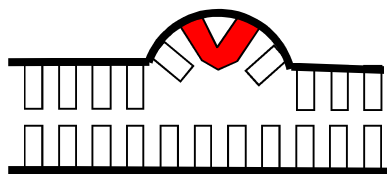
CASSURES SIMPLES



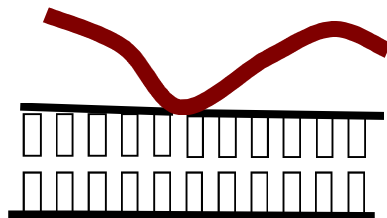
LESIONS
DOUBLE BRIN



ALTERATION
DES BASES



PONTAGES
(intrabrins,
interbrins)



LIAISONS AVEC
DES PROTEINES

Nombre de lésions de l'ADN
par Gy et par cellule

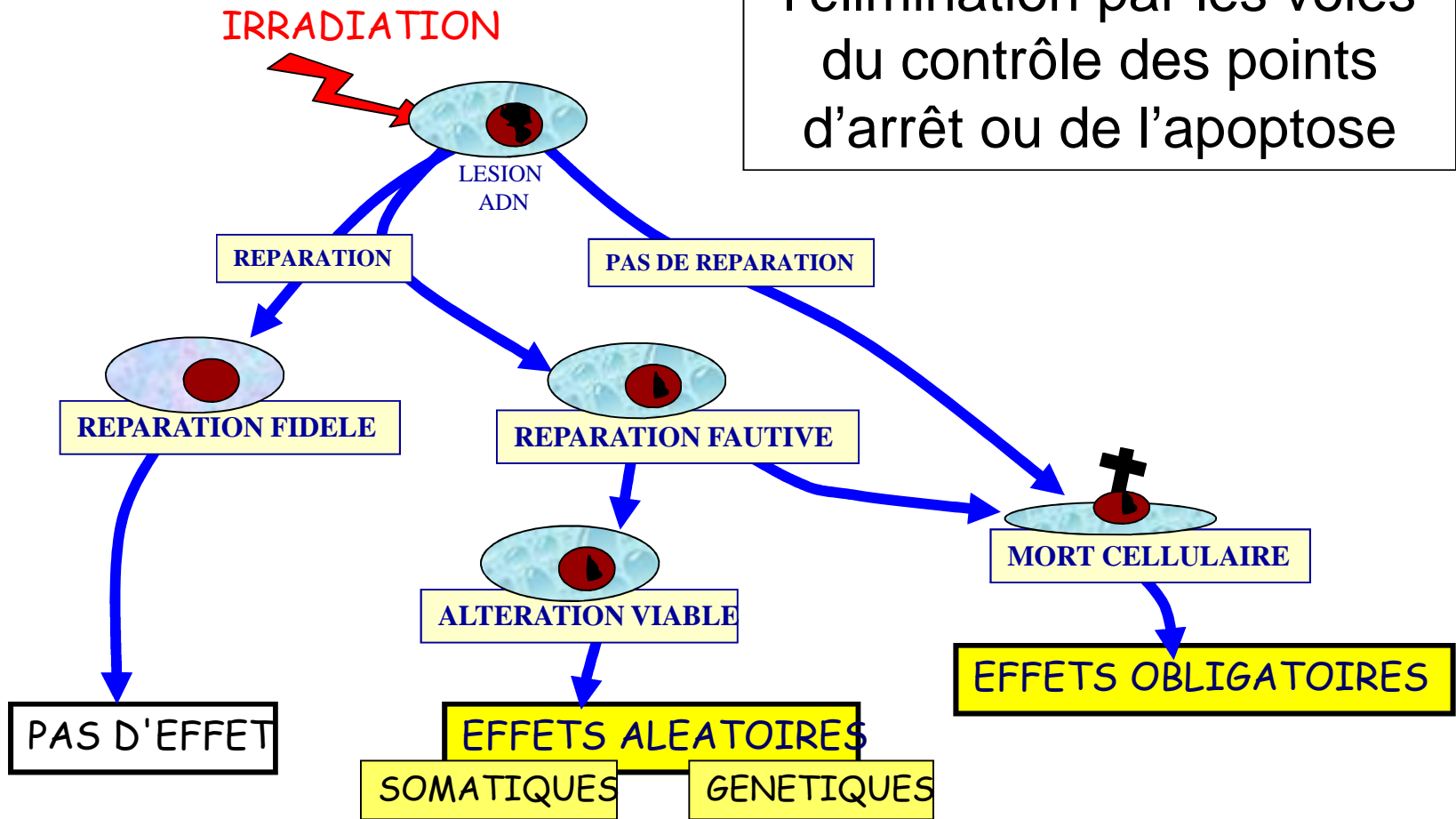
Lésions simple brin.....	500-1000
Lésions double brin.....	40
Dommmage aux bases...	800-2000
Dommmage aux sucres..	800-1600
Pontages ADN- ADN.....	30
Liaisons avec les protéines.....	15

La présence de CDBs
témoigne de toutes les
autres lésions de l'ADN



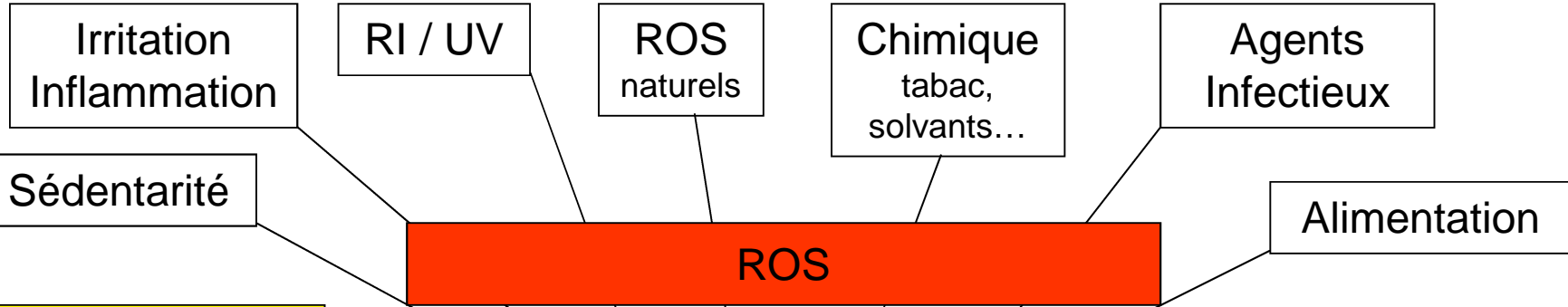
Devenir des cellules lésées ?

Des cellules lésées sont capables d'échapper à l'élimination par les voies du contrôle des points d'arrêt ou de l'apoptose



Cancérogenèse

Facteurs d'environnement et de mode de vie



Conséquences génotoxiques

Lésions de l'ADN

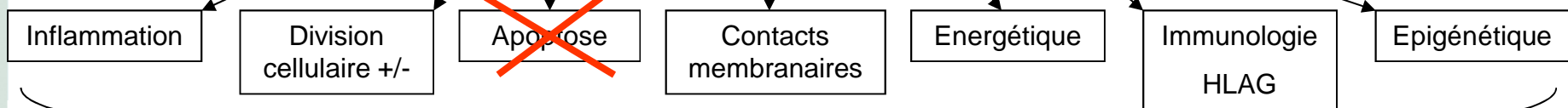
Signalisation (ou non) & réparation (ou non)

Type cellulaire ↓ Cellules souches

Gestion des dommages

Persistance de lésions significatives =
Protéines anormales + régulation de gènes

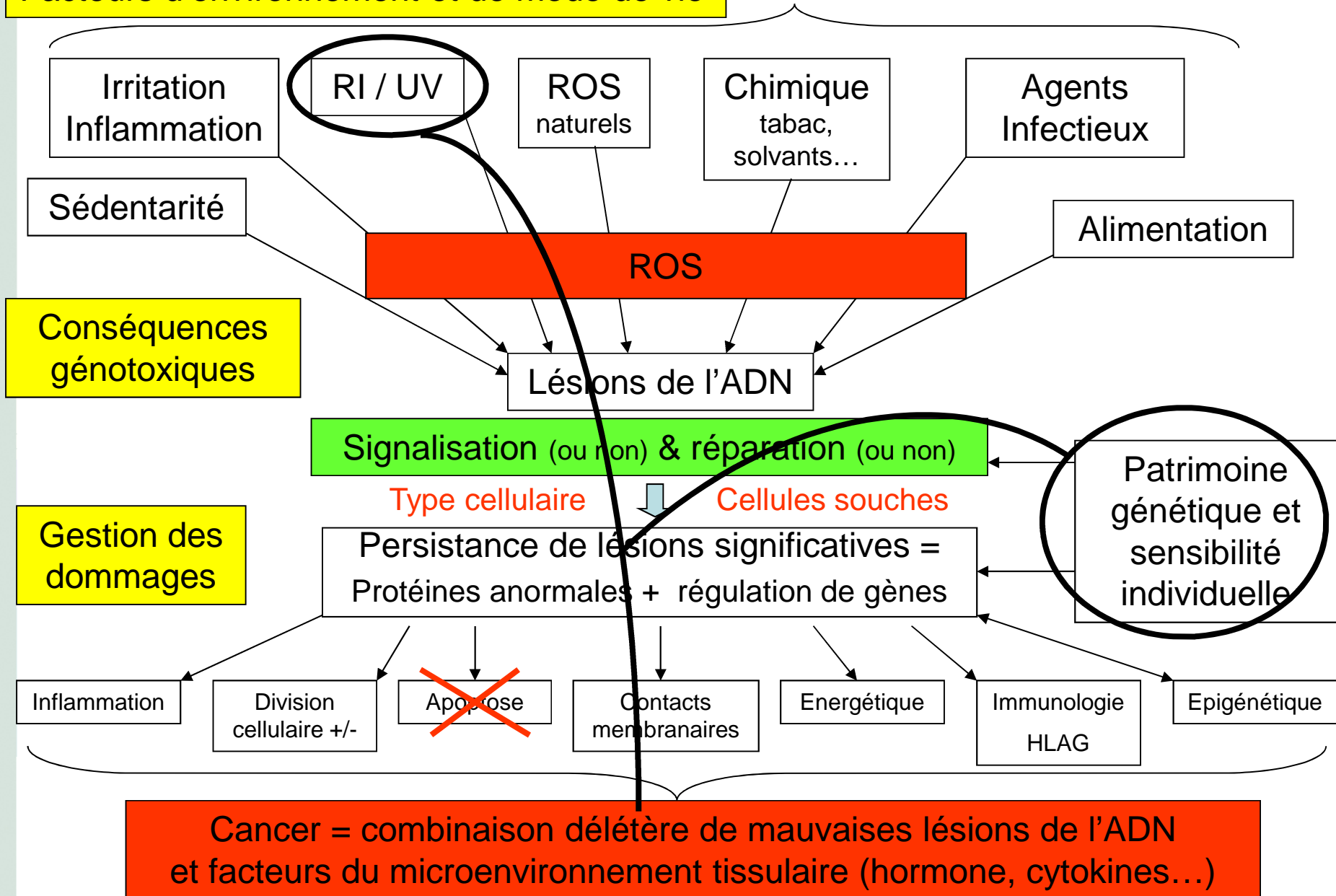
Patrimoine génétique et sensibilité individuelle



Cancer = combinaison délétère de mauvaises lésions de l'ADN et facteurs du microenvironnement tissulaire (hormone, cytokines...)

Cancérogénèse - Radioesthésie

Facteurs d'environnement et de mode de vie





Susceptibilité au cancer/ radioesthésie individuelle

- Les femmes à haut risque familial de cancer du sein : 15 % des cas, identification d'un gène (BRCA1, BRCA2, PTEN, ...) de la signalisation et la réparation de l'ADN.
- 40% des femmes porteuses d'un cancer du sein ont un test en G2 positif
- Les gènes de susceptibilité au cancer sont au carrefour de la signalisation et de la réparation des lésions de l'ADN comme ceux de la susceptibilité aux rayonnements ionisants
- Hyper-esthésie individuelle : les lésions de l'ADN sont les mêmes mais c'est la réparation qui fait la différence = plus grande susceptibilité au cancer ?
- Il y a encore beaucoup à apprendre !





Prudence (1)

Le cancer du sein (1)

- 34% des cancers de la femme (53000 nouveaux cas/an & 11000 décès), 1/8 après 50 ans = dépistage chez 7,5 millions de femmes
- Les causes du cancer du sein ? Nulliparité, âge tardif du premier enfant, alimentation, le haut risque familial de cancer du sein :
 - 20 à 30 % des cancers du sein
 - identification d'un gène (BRCA1, BRCA2,...) dans 15 % des cas seulement. D'autres mécanismes à découvrir.
- BRCA1 : gène suppresseur de tumeurs avec plus de 600 mutations identifiées dont la majorité est associée à une augmentation du risque de cancer du sein (40% de cancers à 50 ans et 70% de cancers à 70 ans), mais aussi de l'ovaire, de la prostate ...
- La protéine BRCA1 est au cœur des complexes formés pour réparer les CDB de l'ADN avec RAD51, MRN ...





Prudence (2)

Le cancer du sein (2)

- Les femmes à haut risque familial de cancer du sein sont donc à surveiller à un âge jeune du fait du risque plus élevé
- Dépistage mammographique alors qu'elles sont plus radiosensibles
- Dépistage mammographique plus précoce, avec de nombreux clichés et répété sur une durée plus grande
- Doses accrues car sein dense de la femme jeune
- Utilisation de l'angio-mammographie qui augmente les doses du fait du produit de contraste
- Le sein est un organe radiosensible : $W_T = 0.12$
- Les expositions aux RI favorisent-elles l'induction du cancer du sein = oui pour les épidémiologistes
- Besoin d'une autre stratégie chez les femmes à haut risque familial (un seul cliché mammographique, IRM et échographie)
- Nécessité d'un dépistage prudent chez les autres femmes





Prudence (3)

Expositions médicales

- Attention à l'accumulation des doses sur la vie
 - Attention aux enfants, adultes jeunes et aux femmes (sein, organe très radiosensible)
 - Attention à la répétition d'examens...inutiles. Un examen est utile si son résultat, positif ou négatif, conforte le diagnostic ou modifie la prise en charge du patient
 - Attention aux patients plus âgés dont l'espérance de vie est encore grande. L'imagerie médicale n'est pas utilisée que chez des patients en fin de vie (par exemple examens de cardiologie)
- Attention à la répétition immédiate de clichés
- Attention aux produits de contraste et à l'énergie des RX (30kV ≠ 120 kV)





Perspectives (1)

- Radiosusceptibilité individuelle : 2 situations phénomènes incontestables et 2 types de population
 - Radiosensibilité = Complications de la RTH
 - Radioesthésie = Susceptibilité au cancer
- Approfondir les connaissances sur la radiosusceptibilité individuelle, son support génétique et ses mécanismes intimes : DNA damage response (DDR)
- Développer des méthodes fiables de l'évaluation de la radiosusceptibilité individuelle, applicables en routine pour déceler les personnes à risque





Perspectives (2)

- Expliquer la radiosusceptibilité aux faibles doses / doses plus fortes, en particulier 30kV mammographie/ 120 kV scanner
- La radiosusceptibilité individuelle conduit à revisiter le dépistage du cancer du sein par la mammographie, en particulier pour les femmes à risque génétique ou familial ou radiosensibilité (une seule incidence)
- Envisager la prise en compte de la radiosensibilité et de la radioesthésie individuelle dans le système de radioprotection: conclusions du travail d'un WP CIPR créé en avril 2014





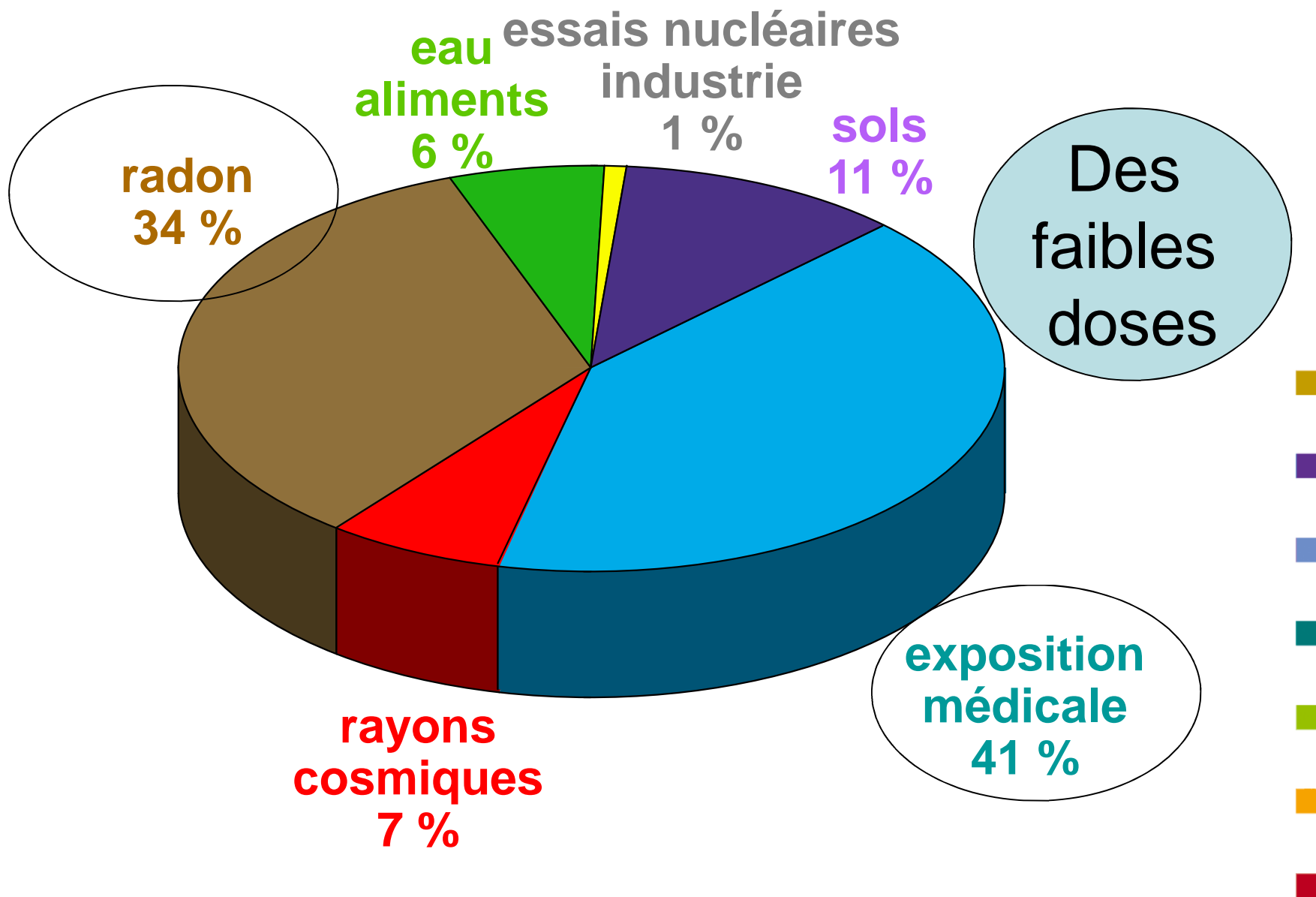
Perspectives (3)

Qui pourrait bénéficier du diagnostic de radiosensibilité et radioesthésie individuelle ?

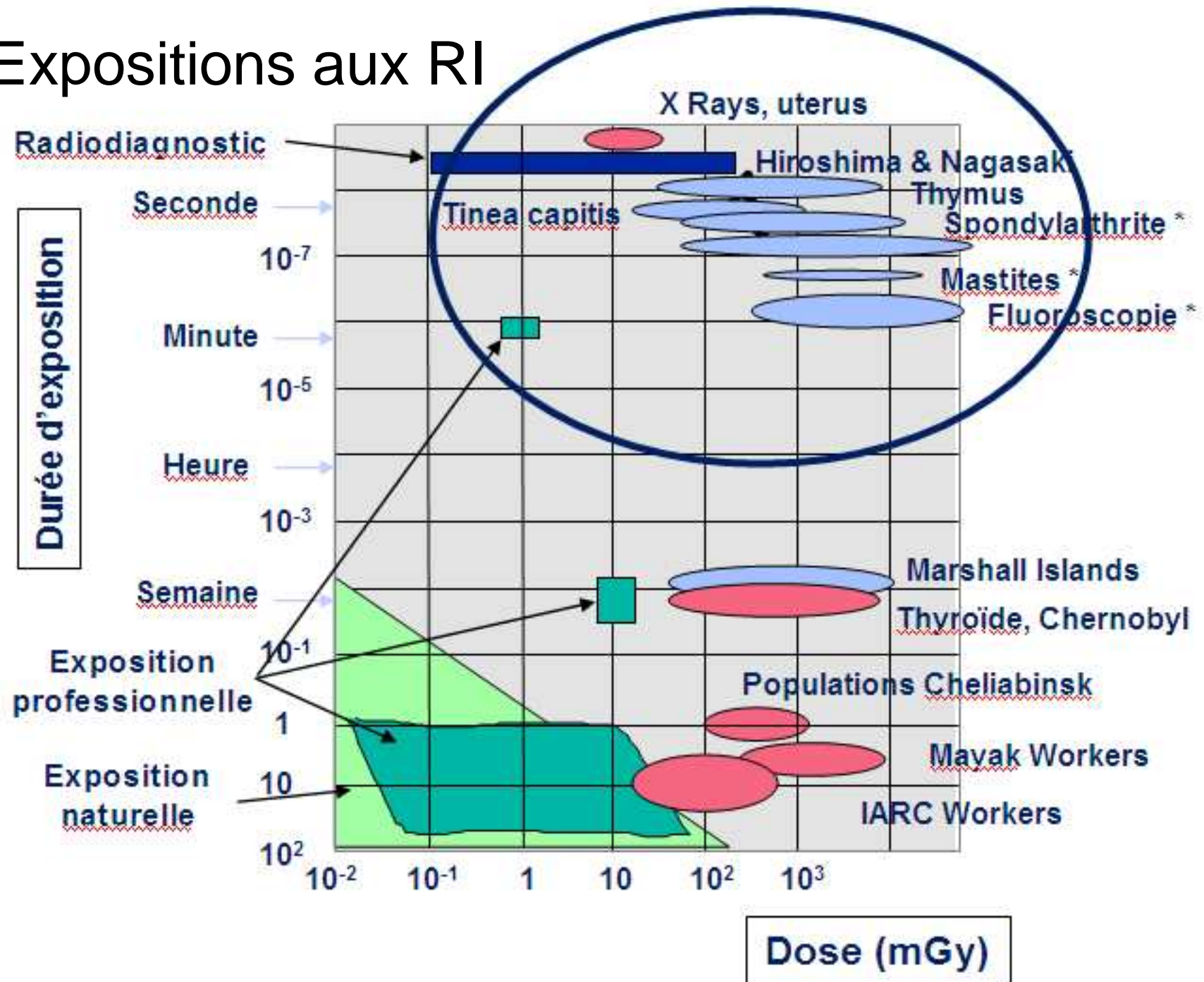
- Patients de radiothérapie, en particulier les enfants
- Les patientes (à risque de cancer du sein...)
- Les patients avec répétition d'examens (scoliose, mammographie, prémas...)
- Les travailleurs du nucléaire (les intervenants d'urgence, les pompiers...)
- ...
- Questions éthiques difficiles !



Exposition de la population



Expositions aux RI





Conclusion

- La radiobiologie montre des effets aux faibles doses que nous ne pouvons pas/plus ignorer : des faibles doses ont des effets aussi importants que des fortes doses
- Nous ne sommes pas égaux devant les rayonnements ionisants
- La signalisation et la réparation de l'ADN :
 - sont fortement impliquées dans ces phénomènes
 - ont des aspects cinétiques encore peu connus mais fondamentaux
- Des recherches à grande échelle s'imposent pour faire totalement la lumière à leur sujet, au carrefour de la radiosusceptibilité et de la cancérogenèse et leur superposition
- Envisager à terme les recommandations de radioprotection et une évolution de la réglementation





Remerciements

- Nicolas Foray – INSERM U1057 Centre Léon Bérard Lyon 1
- Catherine Colin – Radiologie Hospices civils de Lyon 1
- Jean Baptiste Fleutot - SPRA

