

- Note CEA-N-1946 -

7400652

Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay
Département de Biologie
Groupe d'Etudes des Effets des Rayonnements sur les Structures Moléculaires

Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble
Laboratoire de Biologie Végétale et
Service de Protection et des Etudes d'Environnement

**RECHERCHE D'UN MODELE DES EFFETS
DU RAYONNEMENT γ SUR LES CHLORELLES**

par

Jacques DELFORGE, Henri FABRE

- Janvier 1977 -

Note CEA-N-1946

DESCRIPTION-MATIERE (mots clefs extraits du thesaurus SIDON/INIS)

en français

CHLORELLA
RAYONNEMENT GAMMA
DEBITS DE DOSE
COURBES DE SURVIE
CELLULES CLONALES
EFFETS BIOLOGIQUES DES RAYONNEMENTS
MODELES MATHEMATIQUES

en anglais

CHLORELLA
GAMMA RADIATION
DOSE RATES
SURVIVAL CURVES
CLONE CELLS
BIOLOGICAL RADIATION EFFECTS
MATHEMATICAL MODELS

CEA-N-1946 - DELFORGE Jacques, FABRE Henri

RECHERCHE D'UN MODELE DES EFFETS DU RAYONNEMENT γ SUR LES CHLORELLES

Sommaire.- Les données expérimentales obtenues par irradiation aux rayons γ du ^{60}Co de chlorelles (~~algues unicellulaires~~) sont particulièrement intéressantes car nous observons, d'une part, un effet de débit de dose (modification de la courbe de survie tracée en fonction de la dose lorsque l'on modifie le débit de dose) et d'autre part une modification du taux de survie en fonction du temps τ séparant la fin de l'irradiation et la mise en culture. A notre connaissance, aucun des modèles de radiobiologie publiés jusqu'à présent ne permet de rendre compte de façon cohérente de l'ensemble de ces phénomènes expérimentaux. Dans ce rapport nous rechercherons un modèle en nous plaçant dans le cadre théorique constitué par la théorie des systèmes de transformation de P. DELATTRE. L'utilisation de ce cadre théorique précis nous a permis de proposer un protocole expérimental ne présentant aucune difficulté particulière dans sa réalisation mais devant conduire à une richesse d'informations bien supérieure aux protocoles classiques. Les données expérimentales ont été obtenues par H. FABRE au Laboratoire de Biologie Végétale. Le traitement de ces données et l'élaboration du modèle ont été effectués par J. DELFORGE. Le modèle obtenu permet de mettre en évidence l'existence d'au moins trois états différents parmi les chlorelles ayant

./.

CEA-N-1946 - DELFORGE Jacques, FABRE Henri

STUDY OF A MODEL FOR γ RADIATION EFFECTS ON CHLORELLA

Summary.- The experimental data obtained by ^{60}Co γ irradiation of chlorella (unicellular algae) are especially interesting because they show a dose rate effect on the one hand (change in the survival curve plotted against dose as the dose rate varies) and on the other a change in the survival fraction as a function of the time τ separating the end of irradiation and the starting of culture. To our knowledge none of the radiobiological models published so far can account coherently for all these experimental phenomena. An attempt is made here to find a model within the scope of P. DELATTRE's transformation systems theory. The use of this precise theoretical framework has enabled us to propose an experimental procedure which offers no special practical difficulty but should lead to much more abundant information than the standard procedures. The experimental data were obtained by H. FABRE at the Laboratoire de Biologie Végétale. These data were processed and the model was worked out by J. DELFORGE. The model obtained reveals the existence of at least three different states amongst chlorella still able to multiply, and only one state amongst those temporarily deprived of their multiplying capacity. It shows the possibility of internal restorations in the elements still capable of multiplying, but also confirms the existence of non-lethal

./.

conservé leur pouvoir de multiplication, et d'un seul état parmi les chlorelles ayant perdu temporairement leur pouvoir de multiplication. Il montre la possibilité de restaurations internes à l'ensemble des éléments ayant conservé leur pouvoir de multiplication mais confirme également l'existence de lésions non létales mais non réparables.

1977

50 p.

Commissariat à l'Energie Atomique - France

but irreparable lesions.

1977

50 p.

Commissariat à l'Energie Atomique - France

- Note CEA-N-1946 -

Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay
Département de Biologie
Groupe d'Etudes des Effets des Rayonnements sur les Structures Moléculaire*

Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble
Laboratoire de Biologie Végétale et
Service de Protection et des Etudes d'Environnement**

RECHERCHE D'UN MODELE DES EFFETS
DU RAYONNEMENT γ SUR LES CHLORELLES

par

Jacques DELFORGE*, Henri FABRE**

SOMMAIRE

- 1 - INTRODUCTION
- 2 - BASES THEORIQUES UTILISEES LORS DE LA RECHERCHE DU MODELE
 - 2.1 - Principes généraux
 - 2.2 - Définition des catégories d'identification expérimentale
 - 2.3 - Définition des classes d'équivalence
 - 2.4 - Etude des transformations entre classes
 - 2.5 - Equation d'évolution du système
 - 2.6 - Remarque.
- 3 - PRINCIPALES ETAPES DE LA PROCEDURE D'IDENTIFICATION
 - 3.1 - Définition du problème d'identification
 - 3.2 - Détermination de la matrice d'observation
 - 3.3 - Détermination des paramètres du modèle
 - 3.4 - Connaissance finale du modèle.
- 4 - DETERMINATION DU PROTOCCLE EXPERIMENTAL
 - 4.1 - Définition du problème d'identification
 - 4.2 - Définition des catégories d'identification expérimentale
 - 4.3 - Protocole expérimental.
- 5 - MATERIEL UTILISE ET METHODES EXPERIMENTALES
 - 5.1 - Matériel biologique
 - 5.2 - Modes de culture
 - 5.2.1 - Le milieu
 - 5.2.2 - Les tubes
 - 5.2.3 - Culture en masse
 - 5.2.4 - Culture en boîte de Pétri
 - 5.3 - Méthodes d'irradiation
 - 5.3.1 - La source radioactive
 - 5.3.2 - Dilution et ensemencement
 - 5.4 - Résultats.

6 - RECHERCHE DE LA MATRICE D'OBSERVATION

- 6.1 - Etude de la courbe de survie à fort débit de dose
- 6.2 - Etude des transitoires de fin d'irradiation
- 6.3 - Matrice d'observation.

7 - ETUDE DES TRANSFORMATIONS ENTRE CLASSES

- 7.1 - Mise en évidence des transformations nécessaires
 - 7.1.1 - Choix des conditions initiales
 - 7.1.2 - Etude des courbes d'évolution obtenues à 12 krad/mn
 - 7.1.3 - Etude des pentes initiales
 - 7.1.4 - Etude des phénomènes de restauration
- 7.2 - Recherche numérique des paramètres du modèle
- 7.3 - Utilisation du modèle.

8 - CONCLUSIONS.

1 - INTRODUCTION

Ce rapport est la conclusion d'une collaboration entreprise entre le Service de Protection et des Etudes d'Environnement (CEN GRENOBLE), le Laboratoire de Biologie Végétale (DRF-CEN GRENOBLE) et le Groupe d'Etudes des Effets des Rayonnements sur les Structures Moléculaires (DB-CEN SACLAY), afin de rechercher un modèle permettant de rendre compte des effets du rayonnement γ du ^{60}Co sur les chlorelles.

Depuis quelques années, nous assistons à une prolifération de modèles destinés à rendre compte des effets des rayonnements sur la survie des micro-organismes. On peut se demander si tous ces modèles, le plus souvent contradictoires entre eux, ont vraiment été utiles dans la recherche des mécanismes cellulaires en cause dans l'effet des rayonnements. La simplicité apparente des courbes de survie conduit à une multitude d'expressions analytiques tout aussi valables les unes que les autres, compte tenu des incertitudes au niveau des mesures. Le nombre de modèles proposés pour un même type de courbes, ainsi que les différences entre diverses interprétations possibles, montrent bien qu'il est nécessaire de faire preuve d'une certaine prudence vis-à-vis de ces modèles.

Certes, les auteurs avancent, pour la plupart, une explication théorique des expressions mathématiques proposées, mais ces explications restent le plus souvent douteuses parce que fondées sur des hypothèses difficilement vérifiables.

Or, un modèle ne doit pas se contenter d'être une formalisation algébrique des données expérimentales. Il doit surtout aider à la compréhension des phénomènes observés, permettre les prévisions, et enfin guider l'élaboration de nouvelles expériences susceptibles d'améliorer réellement nos connaissances. On ne peut arriver à un tel résultat que si la recherche des modèles est effectuée sur des bases théoriques solides et non plus à l'aide de tâtonnements plus ou moins hasardeux conduisant à des interprétations non justifiées.

Cherchant à définir un cadre théorique utilisable dans de très nombreuses situations, P. DELATTRE a proposé une théorie des

systèmes de transformations (DELATTRE 1971, 1974, 1976b). En se plaçant dans cette optique, il est possible d'aboutir à des modèles qui soient épistémologiquement bien justifiés, puisque leur élaboration repose sur des axiomes bien explicités qui s'appuient sur des connaissances acquises. Si l'on adjoint à cette théorie un principe d'économie des hypothèses, il est possible d'obtenir à l'aide d'une procédure appropriée (DELFORGE 1976b), et pour chaque ensemble de données expérimentales, un modèle minimal et unique.

C'est en employant une telle procédure que l'on recherchera un modèle permettant de rendre compte des données expérimentales obtenues au Laboratoire de Biologie Végétale après irradiation γ sur des chlorelles.

Ces données expérimentales sont particulièrement intéressantes car nous observons, d'une part, un effet de débit de dose (modification de la courbe de survie tracée en fonction de la dose lorsque l'on modifie le débit de dose) et d'autre part une modification du taux de survie en fonction du temps τ séparant la fin de l'irradiation et la mise en culture.

Ce dernier phénomène a été mis en évidence par GILET (1972) pour les chlorelles, mais il existe également pour d'autres organismes (cf. par exemple TREMEAU (1971), KAPPOS et POHLIT (1972)).

A notre connaissance, aucun des modèles publiés jusqu'à présent ne permet de rendre compte de façon globale et cohérente de l'ensemble de ces phénomènes expérimentaux.

2 - BASES THEORIQUES UTILISEES LORS DE LA RECHERCHE DU MODELE

2.1 - Principes généraux

P. DELATTRE a exposé les bases de son approche théorique à plusieurs reprises (DELATTRE 1971, 1974, 1976b). On ne rappellera donc ici que certaines notions indispensables à la compréhension de la procédure d'identification des modèles qui lui est associée, en renvoyant le lecteur intéressé par une véritable étude des systèmes de transformations aux publications de son auteur. Rappelons simplement que l'étude de P. DELATTRE constitue un cadre théorique axiomatisé, cohérent et applicable à tous les systèmes de transformations qui obéissent aux axiomes retenus. On remarquera

par ailleurs que les axiomes choisis, parce qu'ils restent très près des connaissances physiques et mathématiques solidement établies, perdent de ce fait tout caractère hypothétique et peuvent être considérés comme exprimant des vérités élémentaires.

La procédure d'identification qui est associée à cette théorie consiste, en partant des seules données expérimentales, et en tenant compte des contraintes théoriques, à rechercher un modèle justifié minimum et unique rendant compte de ces données. Il est surtout nécessaire d'éviter les interprétations gratuites qui introduisent des informations non issues de l'expérience, des hypothèses invérifiables, ou des simplifications abusives.

Cette base théorique peut sembler au premier abord difficile à assimiler. En réalité, les principes de cette approche sont très simples. Mais son originalité, liée surtout à une optique nouvelle quant aux rôles respectifs de l'expérience, de la théorie, et de la modélisation, ainsi que son vocabulaire nouveau, nécessitent un effort d'assimilation du lecteur. En particulier, une bonne compréhension des définitions, des catégories d'identification expérimentale et des classes d'équivalence, introduites dès les deux prochains paragraphes, est fondamentale pour bien assimiler les développements ultérieurs.

2.2 - Définition des catégories d'identification expérimentale

L'étude des données expérimentales est le point de départ de la procédure d'identification. Ces données sont l'aboutissement de protocoles plus ou moins complexes qui fixent les propriétés que l'on met en évidence. Par exemple, dans le cas de l'étude de micro-organismes irradiés, le protocole expérimental classique (Irradiation, dilution, mise en culture, comptage des clones, calcul du taux de survie) permet de mettre en évidence la courbe de survie des micro-organismes ; ceux-ci sont considérés comme survivants lorsqu'ils conservent et transmettent à leur descendance le pouvoir de se diviser pour donner naissance à de nouvelles cellules, ce qui au bout d'un certain nombre de générations conduit à la formation d'un clone visible à l'oeil nu.

D'une manière générale, on dira que l'ensemble des éléments du système ayant une propriété particulière qui permet de les compter par le protocole expérimental adopté, constitue une catégorie d'identification expérimentale.

On voit donc que toute modification du protocole expérimental portant sur un changement des propriétés mises en évidence conduit en principe à modifier la répartition des objets dans les différentes catégories d'identification expérimentale du système.

2.3 - Définition des classes d'équivalence

Les éléments mis en évidence par des protocoles expérimentaux dont la définition est surtout guidée par des considérations pratiques n'ont pas tous nécessairement un comportement identique dans le système sous irradiation que l'on étudie. Il est d'autre part évidemment impossible de s'intéresser individuellement à chacun des éléments présents dans le système. P. DELATTRE les regroupe donc en classes d'équivalence, chaque classe regroupant l'ensemble des éléments ayant un comportement identique dans le système dont on veut rendre compte, compte tenu de la nature et de la précision des observations que l'on fait.

Par exemple, lors de l'étude des effets du rayonnement sur une population de cellules, mise en évidence par l'étude de leur survie, deux cellules vivantes n'ayant pas la même sensibilité au rayonnement n'appartiendront pas à la même classe d'équivalence. Par contre, deux cellules qui ont un comportement identique vis-à-vis de l'action du rayonnement sur leur survie, doivent appartenir à la même classe d'équivalence, même si elles diffèrent pour d'autres caractéristiques physiques n'intervenant pas dans la probabilité de survie. Elles ne devront être mises dans deux classes d'équivalence distincte que si une autre action extérieure (par exemple une action chimique) modifie de manière différente leurs comportements respectifs ou si l'on modifie la procédure expérimentale de telle manière que leurs différences intrinsèques deviennent décelables au niveau des nouvelles données expérimentales.

2.4 - Etudes des transformations entre classes

Nous n'aborderons ici que les systèmes relevant du formalisme linéaire, c'est-à-dire que nous supposerons qu'il n'y a aucune interaction entre les divers éléments du système. Une telle hypothèse est justifiée lorsque les cellules ne sont pas constituées en tissus mais sont isolées (DELATTRE 1976b). Deux types de transformations élémentaires sont alors possibles :

- les transformations provoquées directement par le rayonnement. Supposons, par exemple, que le rayonnement puisse faire passer un élément du système (par exemple un micro-organisme) de l'état correspondant à la classe i à l'état correspondant à la classe j . Dans ce cas, la probabilité pour qu'un élément de la classe i passe dans la classe j par l'effet du rayonnement, et par unité de temps, peut s'écrire sous la forme $\sigma_{ji}\phi$, avec ϕ le débit de dose et σ_{ji} une constante ;

- les transformations spontanées, c'est-à-dire indépendantes du rayonnement, comme par exemple les phénomènes de restauration. Dans ce cas, la probabilité pour qu'un élément de la classe i passe spontanément dans la classe j est une constante qui sera notée η_{ji} . On retrouve là une expression classique applicable à des phénomènes indépendants qui se déroulent de manière aléatoire dans le temps.

2.5 - Equation d'évolution du système

Supposons que le système étudié comporte n classes d'équivalence, et notons $N_i(t)$ la courbe d'évolution du nombre d'éléments contenus dans la classe i et ceci quel que soit $i = 1, \dots, n$. En effectuant un bilan des entrées et des sorties dans chacune des n classes, on obtient que l'évolution du système $\vec{N}(t) = (N_1(t), N_2(t), \dots, N_n(t))$ est solution du système d'équations différentielles linéaires :

$$\frac{d\vec{N}(t)}{dt} = (\underline{\eta} + \underline{\sigma}\phi) \vec{N}(t) \quad (1)$$

$$\vec{N}(t_0) \text{ Connu}$$

avec $\underline{\eta}$ et $\underline{\sigma}$ deux matrices carrées d'ordre n où l'élément de la $j^{\text{ème}}$ ligne et la $i^{\text{ème}}$ colonne sont respectivement égaux à η_{ji} et σ_{ji} , constantes définies au § 2.4. L'élément η_{ii} correspond à la probabilité totale de sortie spontanée d'un élément de la classe i et peut s'écrire :

$$\eta_{ii} = -(\eta_{1i} + \eta_{2i} + \dots + \eta_{(i-1)i} + \eta_{(i+1)i} + \dots + \eta_{ni} + \eta_{ei}) \quad (2)$$

le terme η_{ei} étant associé à la sortie spontanée d'éléments de la classe i vers l'extérieur du système.

La définition de σ_{ii} est équivalente à celle de η_{ii} , mais en tenant compte cette fois-ci uniquement des sorties de la classe i dues à l'action du rayonnement.

2.6 - Remarque

Au système d'équations (1) se rattachent certains modèles proposés dans la littérature (par exemple DIENES 1966, KAPPOS et POHLIT 1972, VANDERLAAN et al. 1976). Mais ces auteurs n'abordent malheureusement que des modèles particuliers construits a priori, au lieu de traiter le problème sous sa forme générale qui seule permet d'élaborer une procédure justifiée de recherche des modèles. Dans la manière habituelle de procéder, la définition des classes d'équivalence, et l'existence ou la non existence des transformations entre ces classes, sont arbitraires, ce que l'on s'efforce précisément d'éviter dans la procédure générale dont il va maintenant être question.

3 - PRINCIPALES ETAPES DE LA PROCEDURE D'IDENTIFICATION

3.1 - Définition du problème d'identification

Le problème d'identification consiste donc, en partant des données expérimentales, et à l'aide d'une procédure adaptée au cadre théorique utilisé, à trouver un modèle qui soit entièrement justifié. Cette recherche de la justification, qui est à la base de la procédure, est déjà présente dès le stade de la définition du problème particulier que l'on étudie.

Celui-ci ne peut en effet être convenablement résolu que s'il est correctement posé. Bien que cette condition nécessaire semble évidente, beaucoup d'études sont encore à l'heure actuelle effectuées sans qu'aient été clairement définis le but recherché et les conséquences qui en découlent. Il est en particulier nécessaire que les variables et paramètres de référence soient choisis de manière cohérente et adaptés au problème étudié.

P. DELATTRE a montré, par exemple (DELATTRE 1974, 1972), que lors de l'étude des effets d'un rayonnement sur un système chimique ou biologique, la seule variable "dose d'énergie absorbée" (D) ne

permet pas de rendre compte de l'ensemble des effets observés lorsque des phénomènes indépendants du rayonnement interviennent dans le système (restaurations, par exemple) ; il est nécessaire, dans ce cas, de bien séparer la variable indépendante "Temps" (t) et le paramètre "Débit de dose" (ϕ).

Il est également important de savoir comment s'établit la correspondance entre les conditions expérimentales et les coefficients des modèles, afin de ne pas chercher à comparer ce qui n'est pas comparable. Ceci n'est possible que si l'on définit clairement le cadre théorique dans lequel on entend travailler, ce que fait précisément la théorie des systèmes de transformations. C'est ainsi que l'on peut constater, par exemple, que les variations d'intensité d'un rayonnement donné, sur un système donné, ne modifient pas les classes d'équivalence de ce système, mais seulement certaines possibilités de transformations d'éléments entre ces classes. On en conclut qu'un modèle en fonction de ϕ et de t peut être élaboré pour le système et le type de rayonnement considéré, permettant de rendre compte du comportement temporel de ce système dans une gamme plus ou moins large de variations de ϕ . En revanche, les variations du spectre par exemple, et a fortiori de nature du rayonnement, sont susceptibles de modifier profondément le nombre et la nature des classes d'équivalence du système.

3.2 - Détermination de la matrice d'observation

On a rappelé au § 2.1 qu'il ne fallait surtout pas confondre les catégories d'identification expérimentale, qui correspondent aux ensembles d'éléments comptés directement par les observations expérimentales mises en oeuvre, et les classes d'équivalence qui regroupent les éléments ayant un comportement identique dans le système étudié. Or le lien qui existe entre ces deux entités n'est pas évident et doit être défini à l'aide des données expérimentales pour chaque système étudié.

Nous connaissons, bien entendu, le nombre de catégories d'identification expérimentale, mais le nombre de classes d'équivalence est, par contre, a priori inconnu.

Le principe de la recherche d'un modèle minimum nous conduit à n'introduire dans le modèle que le nombre minimum de classes d'équivalence nécessaire à une interprétation correcte

des courbes expérimentales. Remarquons que c'est parce que nous sommes dans un cadre théorique précis que ce nombre n'est pas arbitraire au moins dans les problèmes linéaires. Sans rentrer dans les détails techniques, signalons que la détermination du nombre minimum de classes et leur répartition dans l'ensemble des catégories d'identification expérimentale reposent sur l'utilisation de critères morphologiques observables sur les courbes expérimentales (DELATTRE 1976a); de critères analytiques sur les résultats de l'identification numérique (DELATTRE 1975) et de critères numériques basés sur l'étude des différences entre les courbes calculées et les courbes expérimentales (DELFORGE 1976b). Généralement, le lien entre catégories d'identification et classes d'équivalence peut être représenté par une matrice appelée *matrice d'observation*, qui est définie comme étant la matrice rectangulaire notée C telle que :

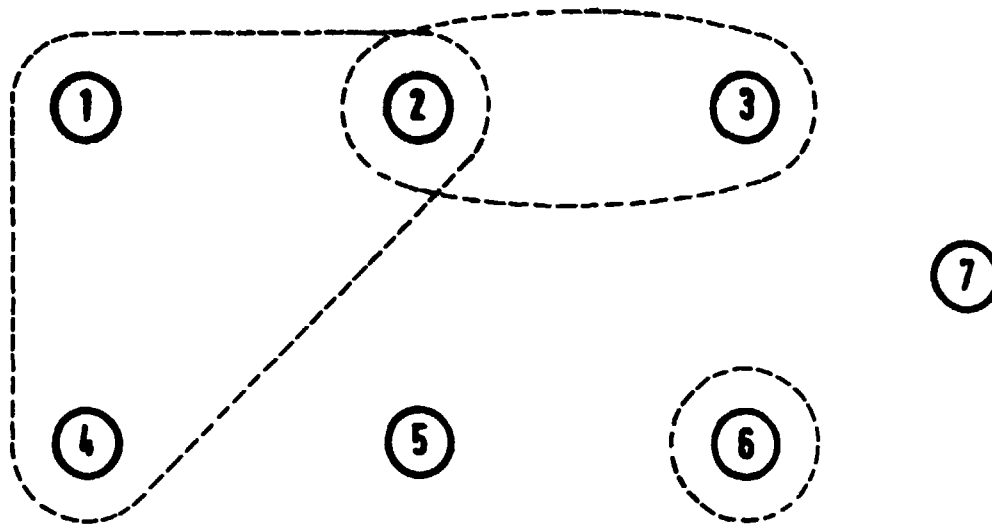
$$\begin{pmatrix} \mathcal{J}_1(t) \\ \mathcal{J}_2(t) \\ \vdots \\ \mathcal{J}_m(t) \end{pmatrix} = C \begin{pmatrix} N_1(t) \\ N_2(t) \\ \vdots \\ N_n(t) \end{pmatrix} \quad (2)$$

où $\mathcal{J}_i(t)$, $i = 1, \dots, m$ est l'évolution connue de la $i^{\text{ème}}$ catégorie d'identification expérimentale
et $N_i(t)$, $i = 1, \dots, n$, l'évolution inconnue de la $i^{\text{ème}}$ classe d'équivalence.

Soit, par exemple, un système comportant 3 catégories, et pour lequel l'étude des données expérimentales a permis de mettre en évidence l'existence de 7 classes, ainsi que la répartition (schématisée figure 1) de ces classes dans les 3 catégories.

CATEGORIE 1

CATEGORIE 2



CATEGORIE 3

Figure 1

La matrice d'observation correspondante se déduit alors immédiatement :

$$C = \begin{vmatrix} 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \end{vmatrix}$$

3.3 - Détermination des paramètres du modèle

Une fois connu le schéma d'observation, le modèle sera déterminé lorsque nous aurons mis en évidence les transformations existant entre les classes, ainsi que la valeur des fonctions qui leur sont associées. Nous distinguerons deux étapes : une étape qualitative (mise en évidence de l'existence d'une transformation), très importante d'un point de vue théorique, et une étape quantitative (calcul des coefficients η_{ij} et σ_{ij} correspondants, avec éventuellement des bandes d'erreurs). En ne retenant que les transformations strictement nécessaires à une interprétation correcte des courbes expérimentales, on aboutit à un modèle minimal (c'est-à-dire qu'il n'existe pas d'autres modèles rendant compte du même ensemble de données expérimentales et contenant moins de paramètres), et parfaitement justifié puisque à aucun moment nous n'avons introduit d'informations non issues de l'expérience.

3.4 - Connaissance finale du modèle

Le modèle sera alors entièrement déterminé puisque nous connaissons le nombre de classes d'équivalence, la matrice d'observation, et l'ensemble des transformations auxquelles participent les éléments présents dans le système. Remarquons bien que cette procédure met en évidence l'existence des classes d'équivalence sans pour autant en donner une définition précise, c'est-à-dire sans donner toutes les caractéristiques définissant les éléments qui la composent. C'est l'expérimentateur qui est le mieux placé pour tenter d'interpréter le modèle dans les termes de sa propre discipline, c'est-à-dire en particulier pour essayer de préciser la signification des classes et des transformations entre classes, révélées par la procédure d'identification. Eventuellement, des expériences complémentaires pourront alors être nécessaires pour vérifier les hypothèses formulées à ce propos par l'expérimentateur.

4 - DETERMINATION DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL

4.1 - Définition du problème d'identification

L'étude de l'évolution d'une population de chlorelles (algues vertes unicellulaires) soumise à un rayonnement γ est un problème qui relève bien de la partie linéaire de la théorie de P. DELATTRE, à condition d'une part de prendre certaines précautions expérimentales afin qu'il n'y ait pas d'interaction entre les micro-organismes (l'existence d'interactions entre micro-organismes conduirait à l'introduction de termes non linéaires), et d'autre part de définir clairement le problème. En effet, des études publiées (GILET 1970) ont montré l'influence de nombreux facteurs sur les courbes de survie des chlorelles (température, âge de la culture, oxygénation...). L'influence de ces variables sur le modèle se situe le plus souvent au seul niveau des valeurs numériques des coefficients, mais elle peut aussi jouer sur la structure même du modèle. Il est donc important de préciser quels sont les paramètres auxquels on s'intéresse, les autres restant fixes. Conformément à l'approche théorique utilisé, nous ne nous intéresserons dans ce qui suit qu'au paramètre débit de dose ϕ dont l'influence sur la survie a été mise en évidence par GILET (1970) ; une étude de l'influence des autres paramètres ne pourra être envisagée que dans un deuxième temps.

4.2 - Définition des catégories d'identification expérimentale

Comme nous l'avons vu au § 2.2, la procédure expérimentale conduisant aux courbes de survie est telle que la survie est définie comme la possibilité pour les micro-organismes de se multiplier, et donc de former des clones. L'ensemble des micro-organismes ayant conservé leur pouvoir de multiplication à la fin de l'irradiation constitue donc une première catégorie d'identification expérimentale.

Cependant, comme nous l'avons déjà souligné lors de l'introduction, certains micro-organismes perdent temporairement leur pouvoir de multiplication, c'est-à-dire qu'ils le retrouveront au bout d'un certain laps de temps s'ils ne sont pas à nouveau atteints par l'effet du rayonnement. Ils constituent une deuxième catégorie d'identification expérimentale puisque nous pouvons mesurer leur nombre en faisant la différence entre le taux de survie obtenu immédiatement après la fin de l'irradiation et le taux de survie obtenu après un certain laps de temps suffisant pour que ces micro-organismes aient retrouvé leur pouvoir de multiplication.

Le système comprend donc deux catégories. Les éléments quittent le système lorsqu'ils perdent définitivement leur pouvoir de multiplication.

4.3 - Protocole expérimental

Le paramètre de référence étant le débit de dose du rayonnement, l'identification du modèle nécessite une série d'expériences effectuées dans un éventail de débits de dose le plus large possible.

Pour chaque débit de dose utilisé, les mesures expérimentales souhaitables sont :

1 - Pour chaque durée d'irradiation (c'est-à-dire pour chaque dose), la mesure du taux de survie, la mise en culture se faisant immédiatement après la fin de l'irradiation. Cette mesure donne le nombre d'éléments de la catégorie 1.

2 - Pour chaque dose, la mesure du taux de survie obtenu en effectuant la mise en culture après un certain laps de temps

suffisant pour que l'ensemble des restaurations observables aient eu lieu (24 heures pour les chlorelles). Par différence avec la mesure correspondante effectuée en 1, on obtient le nombre d'éléments de la catégorie 2.

3 - Pour 2 ou 3 doses, la mesure de l'évolution du taux de survie en fonction du temps τ séparant la fin de l'irradiation et la mise en culture. Ces courbes appelées "transitoires de fin d'irradiation" dans (DELATTRE 1971) permettent d'obtenir de précieux renseignements sur la cinétique des restaurations.

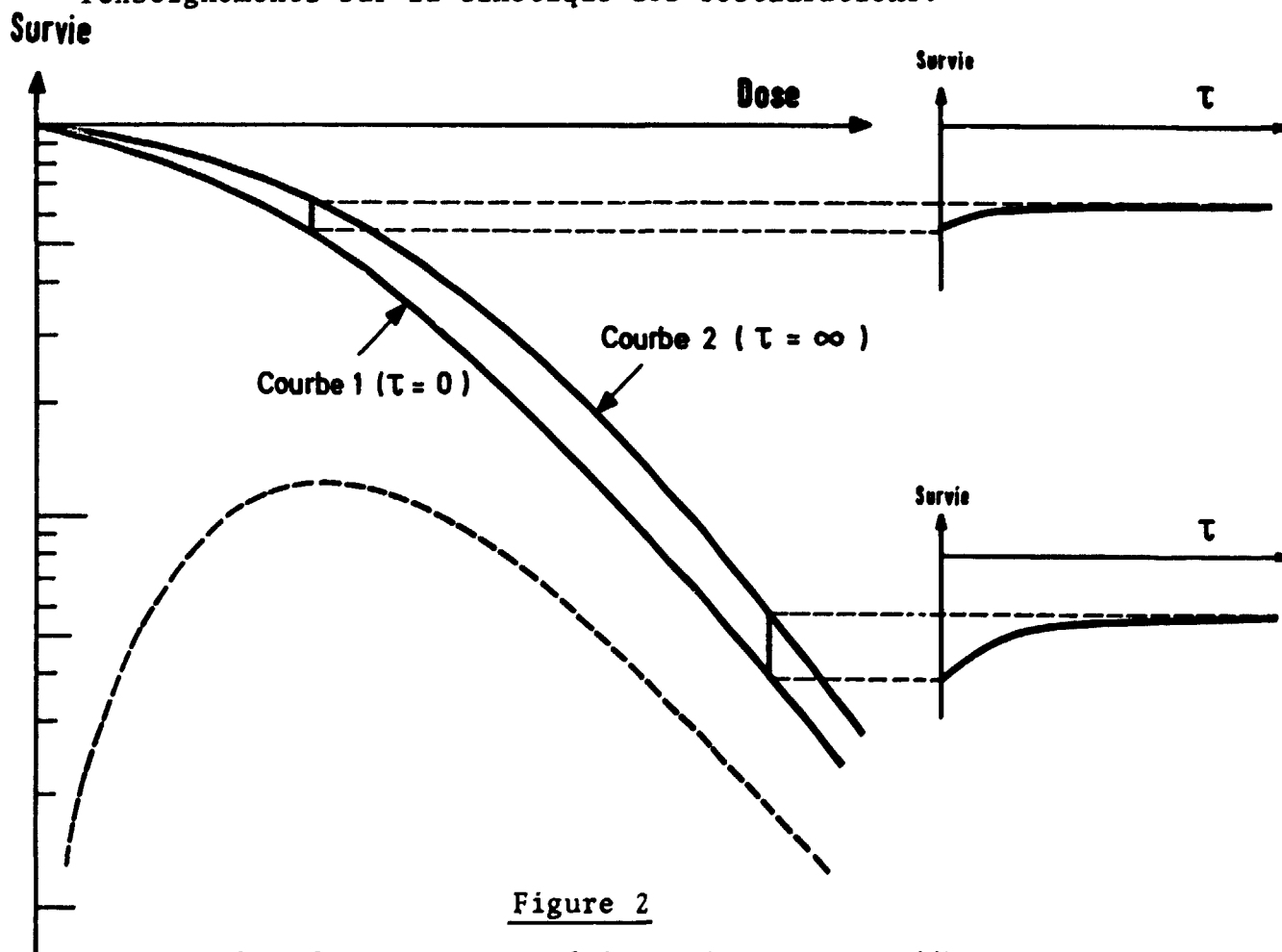


Figure 2

Ensemble des mesures expérimentales pour un débit de dose donné. La courbe (---) représente l'évolution de la catégorie 2 déduite par différence entre la courbe 1 (évolution de catégorie 1) et la courbe 2.

Le protocole expérimental que nous venons de décrire ne pose aucun problème supplémentaire par rapport à ce que font traditionnellement les microbiologistes. Cependant, nous n'avons

trouvé dans la littérature aucun article rassemblant l'ensemble de ces données expérimentales. Nous avons là une illustration de l'intérêt (et même de la nécessité) de partir d'un cadre théorique suffisamment général afin de guider la recherche des données expérimentales nécessaires à une identification correcte du modèle.

5 - MATERIEL UTILISE ET METHODES EXPERIMENTALES

5.1 - Matériel biologique

Les données expérimentales ont été obtenues à partir de chlorelles, algues vertes unicellulaires à noyau individualisé et de petite taille (diamètre 0,7 à 1 μm), et plus précisément de *Chlorella pyrenoidosa*, souche Emerson. Elles possèdent une coque qui leur confère une grande résistance aux traitements mécaniques. Lorsqu'elles sont placées dans de bonnes conditions de milieu, de température, d'éclairement, leur cycle cellulaire est voisin de 24 heures.

Ce sont des eucaryotes auxquels il est facile d'appliquer les techniques de la microbiologie.

En suspension ou sur milieu solidifié, la lumière est, dans nos conditions de culture, le facteur limitant la croissance. D'autre part, les chlorelles sont bien adaptées aux besoins de la radiobiologie ; immobiles et isolées, elles ne se fixent pas sur les parois des récipients et se divisent par autospores (Figures 3 et 4). Leur diamètre varie de 2 à 8 μm .

5.2 - Modes de culture

5.2.1 - Le milieu

Nous avons utilisé un milieu très proche de celui de TAMIYA modifié par MOYSE (1956) dont la composition est donnée dans le tableau 1.

Le pH du milieu est ajusté au départ à 7 par de la potasse.

Ce même milieu, gélifié par 20 g/l de bacto-agar Difco, est utilisé pour les cultures en boîtes de Pétri et dans les tubes destinés à conserver la souche cellulaire.

5.2.2 - Les tubes souches

Ce sont eux qui assurent la conservation de la souche qui

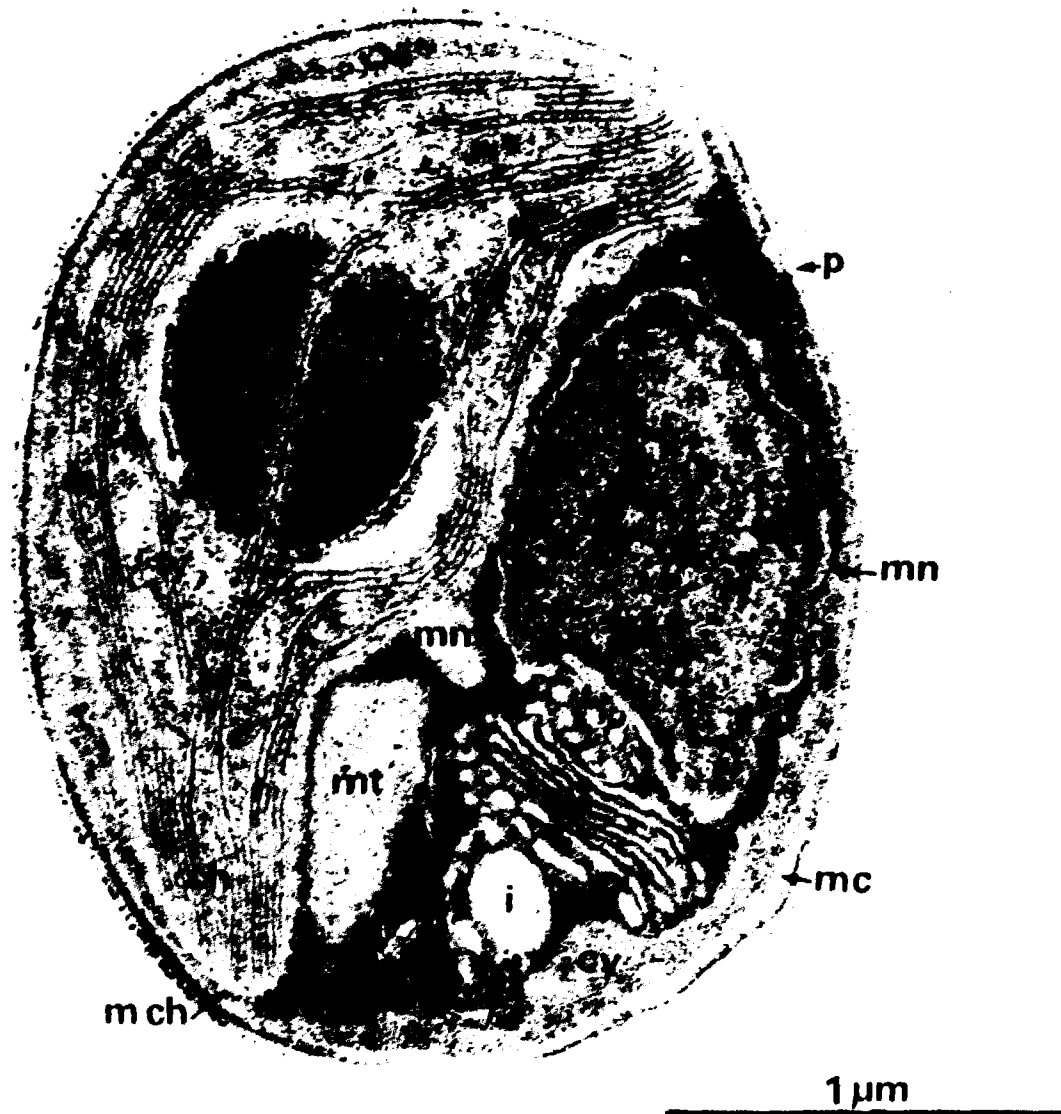


Figure 3 - Photographie d'une coupe d'autospore

Légende : aG = appareil de Golgi ; ch = chloroplaste ; cy = cytoplasme
i = inclusion : l = lame'lles ; mc = membrane cytoplasmique
mch = double membrane du chloroplaste ; mmt = double
membrane de la mitochondrie ; mn = double membrane du noyau
mt = mitochondrie ; n = noyau ; nu = nucléole ; p = paroi
py = pyrénolide ; ty = thylacoïde.

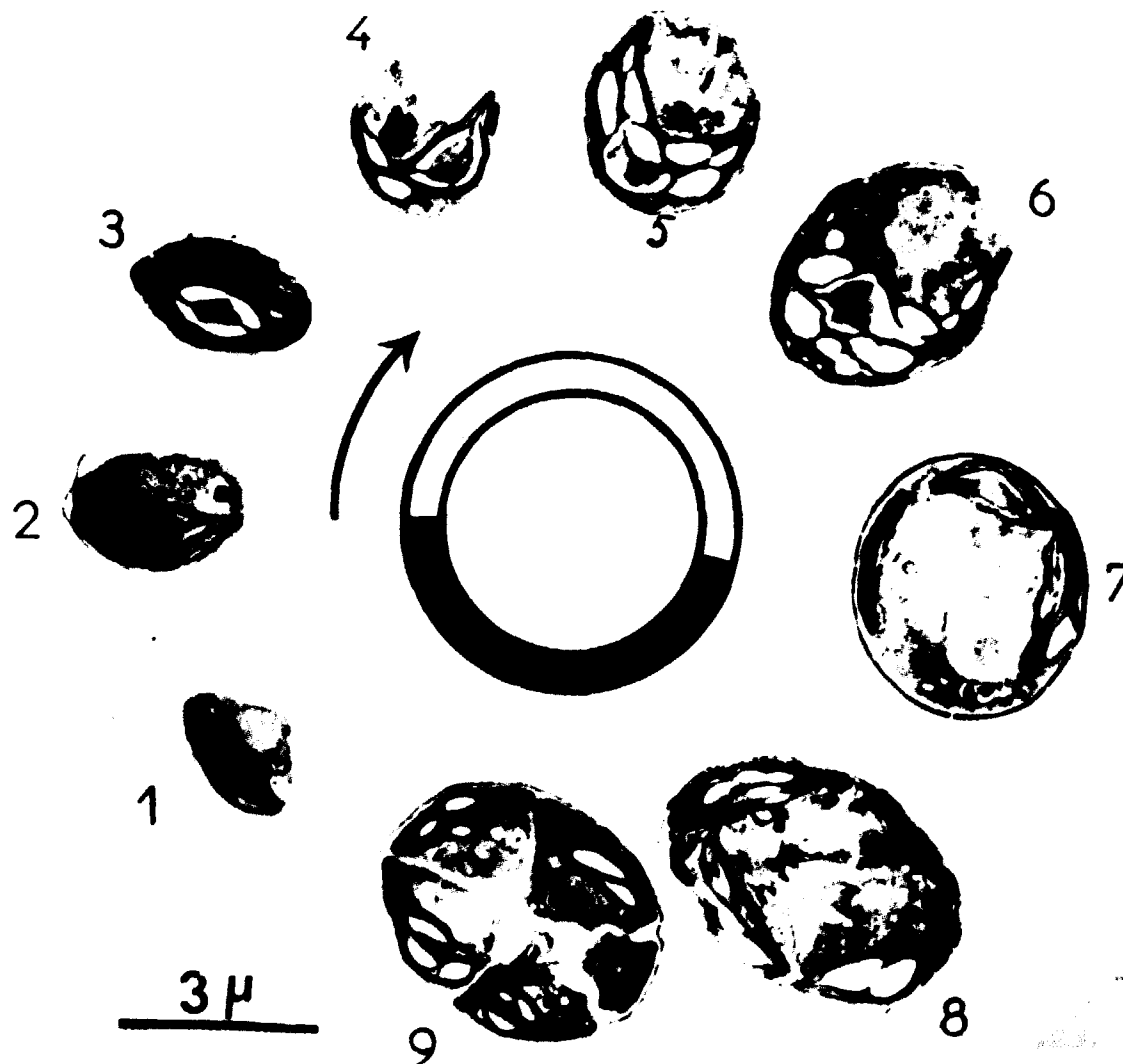


Figure 4 : Montage de photographies de coupes de chlorelles à différents stades du cycle cellulaire.

- 1 = autospore peu de temps après sa libération ;
- 2 à 6 = croissance d'une cellule à la lumière avec accumulation d'amidon ; d'abord autour du pyrénéoïde (3) puis dans tout le chloroplaste (6) ;
- 7, 8 = division des organites à l'intérieur de la cellule ;
- 9 = autospores individualisées dans la cellule-mère.

est repiquée régulièrement, en général mensuellement, sur gélose. Avec un éclairage de 12 heures chaque jour, les prélèvements peuvent se faire au bout d'un mois.

Il ne semble pas que la souche évolue au cours de ces repiquages successifs qui se font sans sélection.

Tableau 1 - Milieu "MOYSE"

	Sels utilisés	Concentration en g.l ⁻¹	Concentration en mole.l ⁻¹	Concentration en g.l ⁻¹ des solutions mères
Macro-éléments	KNO ₃	5	4,9.10 ⁻²	100
	MgSO ₄ , 7 H ₂ O	2,5	1,01.10 ⁻²	100
	KPO ₄ H ₂	1,25	9,2.10 ⁻³	50
	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₈ NaFe, 3H ₂ O = EDTA ferrique	0,0044	1,04.10 ⁻⁵	0,88
	Ca(NO ₃) ₂ , 4 H ₂ O	0,03	1,27.10 ⁻⁴	10
Oligo-éléments Solution A ₄ d'ARNON	H ₃ BO ₃	2,86.10 ⁻³	4,63.10 ⁻⁵	Solution concentrée 10 ³ fois
	MnSO ₄ , H ₂ O	1,55.10 ⁻³	9,17.10 ⁻⁶	
	ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,22.10 ⁻³	7,65.10 ⁻⁷	
	CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,079.10 ⁻³	3,16.10 ⁻⁷	
Oligo-éléments Solution B ₇ d'ARNON	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	1288.10 ⁻⁷	1,04.10 ⁻⁷	Solution concentrée 10 ³ fois
	NH ₄ VO ₃	229,6.10 ⁻⁷	1,96.10 ⁻⁷	
	CrK(SO ₄) ₂ , 12H ₂ O	960.10 ⁻⁷	1,9.10 ⁻⁷	
	NiSO ₄ , 7 H ₂ O	478,5.10 ⁻⁷	1,7.10 ⁻⁷	
	Co(NO ₃) ₂ , 6 H ₂ O	493,8.10 ⁻⁷	1,7.10 ⁻⁷	
	Na ₂ WO ₄ , 2 H ₂ O	179,4.10 ⁻⁷	5,4.10 ⁻⁸	
	TiOSO ₄ , 4 H ₂ O	241,64.10 ⁻⁷	1,04.10 ⁻⁷	

La solution B₇ est préparée dans une solution H₂SO₄ $\frac{N}{10}$

5.2.3 - Culture en "masse"

Elles sont faites en milieu liquide, dans un montage dont le schéma est donné dans la figure 5.

L'ensemencement se fait à partir des tubes souches. Après six jours les cultures sont au plateau de croissance avec une densité cellulaire d'environ $300.10^6/ml$ (Figure 6). Le facteur limitant est la lumière.

Au plateau, les cellules n'évoluent que très lentement, ne se divisent plus et sont dans un état quiescent que nous désignons par G_0 (GILET 1970). Des expériences de marquage montrent qu'entre le quatorzième et le dix-septième jours, il y a synthèse de 3,5 % des acides déoxyribonucléiques totaux ; au cours d'un cycle cellulaire en culture synchronisée, 80 % des ADN totaux de la culture se trouvent synthétisés. (GILET et SANTIER 1973).

La culture des chlorelles à pH constant (pH=7) a permis d'obtenir des améliorations sensibles par rapport à la méthode utilisée auparavant où le pH des cultures variait en fonction de la densité cellulaire pour passer de 4,3 à l'ensemencement à 7,2 lorsque le plateau était atteint (GILET 1970) ; En particulier, le temps de latence s'est révélé être plus court (moins de 1 jours au lieu de 2), la vitesse de croissance plus grande (obtention du plateau en 6 jours au lieu de 8 jours) et la concentration cellulaire plus élevée ($300.10^6/ml$ au lieu de $180.10^6/ml$, en moyenne).

La reproductibilité des cultures a été également améliorée ce qui est important pour la comparaison des résultats obtenus.

5.2.4 - Culture en boîte de Pétri

Dès la fin de l'irradiation, les échantillons subissent les dilutions convenables et sont ensemencés sur boîte de Pétri de 90 mm de diamètre. Le milieu gélosé est préparé dans un seul flacon (10 à 20 litres) et un distributeur permet de remplir rapidement et très régulièrement les boîtes.

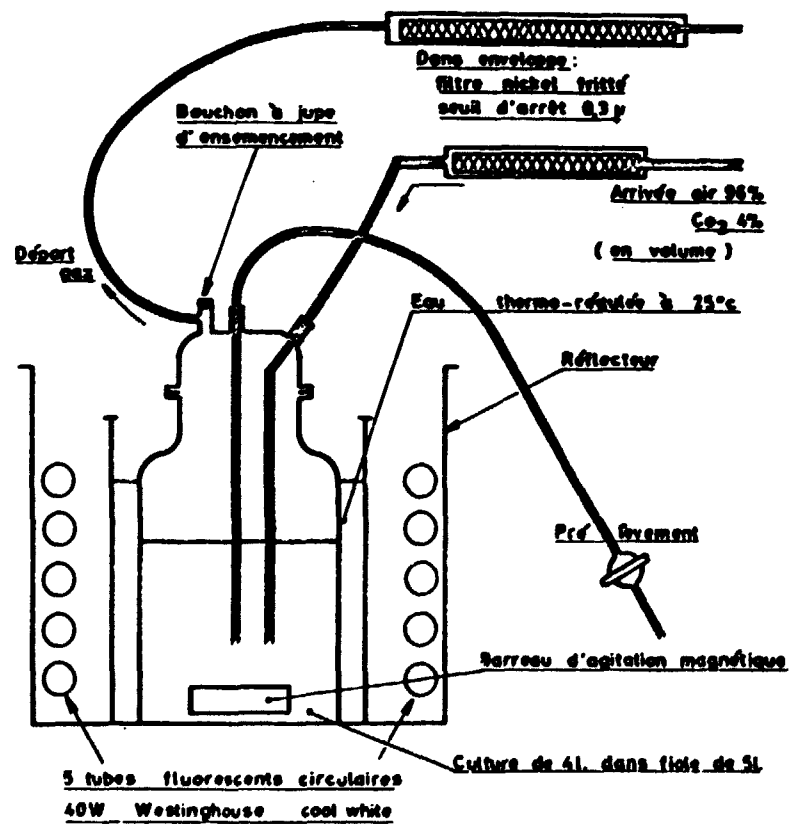


Figure 5 - Schéma du dispositif de culture en masse

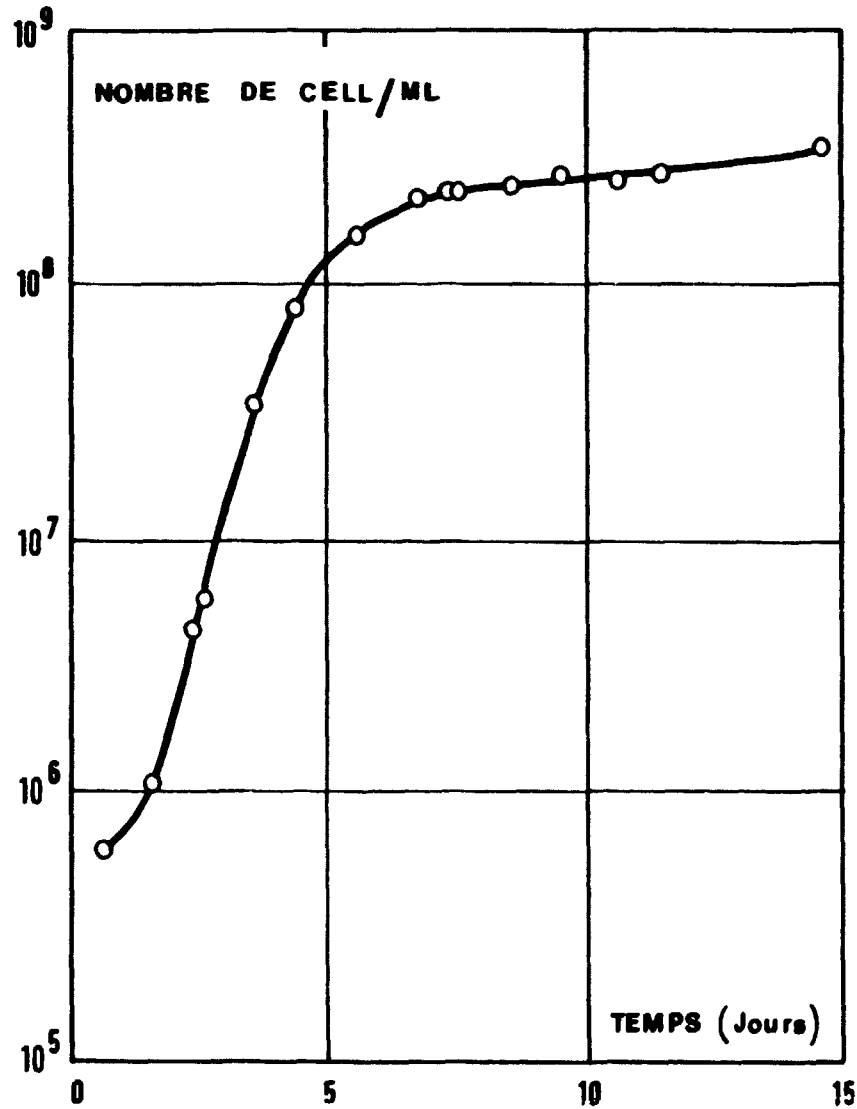


Figure 6 - Evolution de la densité dans une culture "en masse"

Afin d'éviter qu'au moment de l'évaporation les cellules se rassemblent au centre des gouttes, une membrane en nitrate de cellulose est disposée à la surface de la gélose : ses pores de 0,4 μm permettent une rapide adsorption de l'eau tandis que les algues restent à la surface ; les boîtes ont ainsi en plus l'avantage de pouvoir être manipulées rapidement, le liquideensemencé ne pouvant pas se déplacer.

Toute cellule qui a gardé son pouvoir de multiplication donnera naissance à une colonie ou clône qui deviendra visible à l'oeil nu au bout de 4 à 5 jours. En pratique, le dénombrement ne s'effectue qu'au bout de 15 jours, le nombre de clônes n'augmentant plus.

5.3 - Méthodes d'irradiation

5.3.1 - La source radioactive

L'irradiation a été effectuée avec des rayons γ provenant de la désintégration du cobalt 60 ; les sources sont placées au fond d'une piscine afin que l'épaisseur d'eau (3,2 m) protège l'expérimentateur de tout rayonnement ; l'échantillon à irradier contenu dans un récipient particulier (Figure 7b), est placé à l'intérieur d'une nacelle qui est descendue près des sources (Figure 7a). Un bain thermorégulé à 25°C maintient tous les échantillons à la même température, un barbotage gazeux (air 96 % - CO₂ 4 %) assure l'oxygénation et l'agitation de la suspension.

a) Obtention de différents débits de dose

Ils permettent de comparer les effets obtenus pour une même dose mais avec des temps d'irradiation variables.

De 5 à 500 rad/minute, les différents débits sont obtenus sur l'éprouvette en faisant varier la distance aux sources, un guide tubulaire pouvant prendre cinq positions bien définies. La technique d'irradiation est alors particulière, l'échantillon de 300 ml reste au fond de la piscine et on opère des prélèvements successifs correspondant aux doses recherchées.

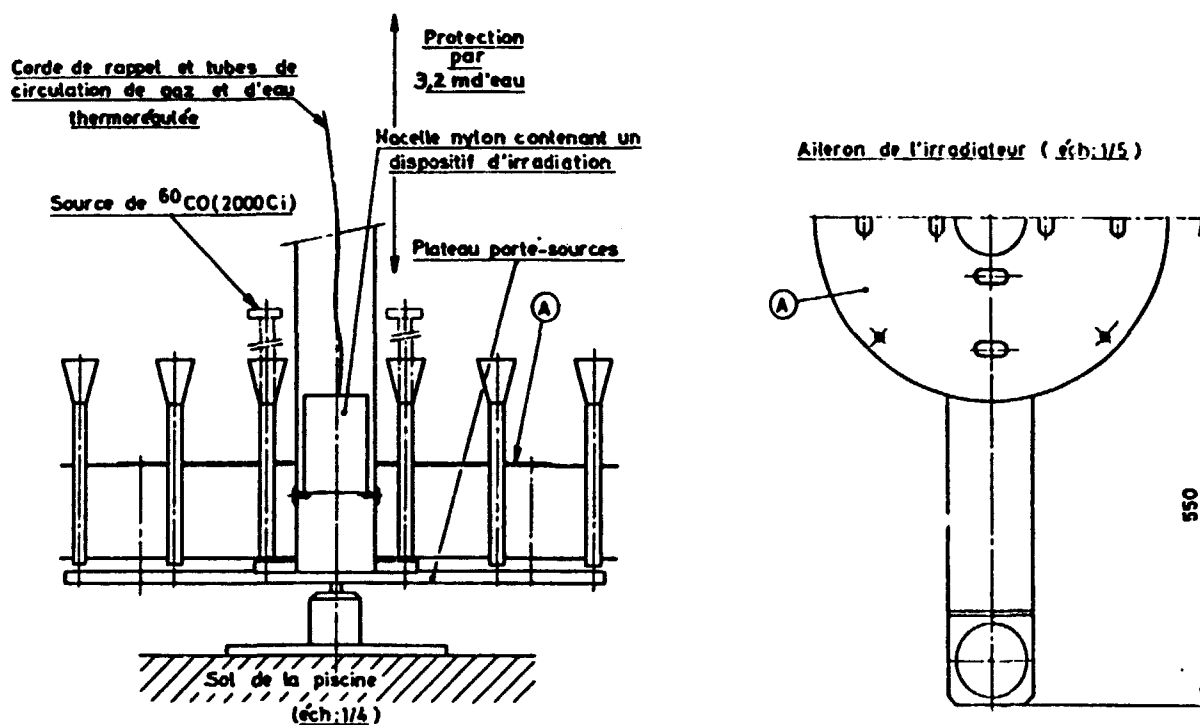


Figure 7a - Dispositif d'irradiation aux rayons γ

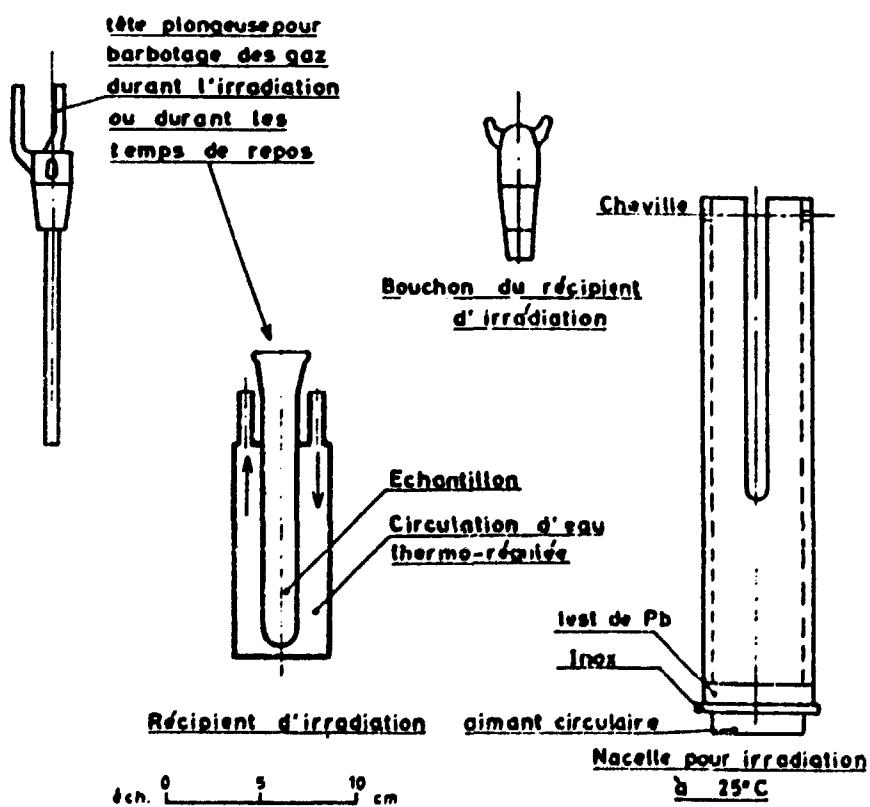


Figure 7b - Dispositif d'irradiation

En théorie les débits peuvent être très faibles, mais des difficultés d'ordre biologique apparaissent : les chlorelles n'étant pas soumises à une source lumineuse, la photosynthèse ne peut avoir lieu ; le métabolisme continuant, on observe un épuisement des réserves qui est particulièrement gênant après 24 heures d'obscurité car il modifie le taux de survie.

De 500 à 12 000 rad/minute, les débits différents sont obtenus en faisant varier le nombre et la position des sources ; l'échantillon (5 ml) est alors déposé dans une nacelle au centre de l'irradiateur pendant des temps croissants, fonction des doses recherchées. Chaque échantillon correspond à une seule dose.

b) Dosimétrie

La mesure de l'énergie absorbée par la suspension d'algue a été effectuée suivant la méthode de FRICKE ou dosimétrie au sulfate ferreux (rapport ASTM Committee 1959) : elle est basée sur l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique par les radicaux libres créés à partir des molécules d'eau sous l'influence des radiations ionisantes. Le sulfate ferreux est mis dans le récipient qui contiendra ultérieurement les algues. On utilise le même volume pour le sulfate ferreux et pour les suspensions d'algues. La détermination de la concentration en ions ferriques se fait par mesure de la densité optique pour une longueur d'onde de 305 nm, dans des cuves en quartz de 1 cm d'épaisseur.

5.3.2 - Dilution et ensemencement

Le taux de survie étant déterminé par dénombrement sur boîte de Pétri, une dilution de l'échantillon irradié est nécessaire pour obtenir 150 à 400 clones par boîte ; on utilise alors un milieu Moysc stérile pour les dilutions qui sont très variables : 1/400 000 à 4 krad, 1/100 à 50 krad, 1/1 à 75 krad (avec une culture ayant atteint $300 \cdot 10^6$ cellules/ml).

Plusieurs observations nous ont montré que les chlorelles modifiaient le milieu dans lequel elles vivaient (action sur le pH, rejet de matières organiques) et qu'en retour celui-ci influençait

leur multiplication. Pour une forte dose, peu d'algues vont se multiplier, donc beaucoup vont être ensemencées et on a pu mesurer que leur métabolisme restait actif plusieurs jours, même si elles ne se divisent pas. Une série d'expérimentations est en cours pour déterminer les inter-relations algues-milieu et leurs effets sur le taux de survie.

Les boîtes ensemencées sont ensuite mises à la lumière ou gardées un certain moment à l'obscurité. La source lumineuse utilisée est la même que pour les cultures en masse et son spectre est très proche de la lumière du jour (tubes fluorescents SYLVANIA nuance Day-Light) ; la température (25°C) et le degré hygrométrique (50 %) gardent constamment les mêmes valeurs.

5.4 - Résultats

Afin d'éviter les répétitions, les résultats expérimentaux seront décrits au fur et à mesure de leur utilisation dans la procédure de recherche du modèle. Nous utiliserons les résultats obtenus à 5 débits de dose : 14,6 rad/mn, 75 rad/mn, 175 rad/mn, 2600 rad/mn et 12 000 rad/mn.

6 - RECHERCHE DE LA MATRICE D'OBSERVATION

6.1 - Etude de la courbe de survie à fort débit de dose (12 krad/mn)

On a vu au § 2.5 que l'évolution du système étudié est la solution du système d'équations différentielles linéaires (1). Or, en prenant comme variable de référence la dose (proportionnelle au temps lorsque le débit de dose est conservé comme paramètre), le système d'équations différentielles (1) est équivalent au système d'équations différentielles (3) :

$$\frac{d\vec{N}(D)}{dD} = \left(\frac{\eta}{\phi} + \sigma \right) \vec{N}(D) \quad (3)$$

$N(0)$ connu

Nous observons avec les chlorelles irradiées par les rayons γ du ^{60}Co , une influence du débit de dose, ce qui implique l'existence de transformations spontanées, c'est-à-dire l'existence d'une matrice η non nulle. Cependant, lorsque le débit de dose ϕ

augmente, $\frac{\eta}{\phi}$ tend vers zéro, c'est-à-dire que les courbes de survie tracées en fonction de la dose tendent vers une courbe limite, atteinte lorsque le débit de dose est trop élevé pour que les transformations spontanées aient une influence décelable. L'étude de cette courbe limite est souvent intéressante. En effet elle doit pouvoir être interprétée en ne tenant compte que des transformations dépendant du rayonnement, c'est-à-dire à l'aide du système d'équations différentielles :

$$\frac{d\vec{N}(D)}{dD} = \sigma \vec{N}(D) \quad (4)$$

$N(0)$ connu

En particulier, il est logique de considérer que les retours d'éléments de la catégorie 2 vers la catégorie 1 (correspondant à des phénomènes de restaurations) sont indépendants du rayonnement. L'interprétation de la courbe de survie limite (correspondant à l'évolution de la catégorie 1), ne doit donc faire intervenir aucune influence des éléments de la catégorie 2.

D'après les résultats publiés par GILET(1970), il semble que cette courbe limite soit atteinte pour les chlorelles dès que le débit de dose est de l'ordre de 10 krad/mn. Nous supposons donc que la courbe de 12 krad/mn correspond approximativement à cette courbe limite.

A l'aide de l'étude de la concavité initiale à l'origine, nous pouvons déduire (DELATTRE 1976a) que la catégorie 1 contient au moins deux classes. Cependant, des études numériques (DELFORGE 1975) qu'il serait trop long de rappeler ici, ont montré que l'introduction de deux classes d'équivalence ne permet pas encore de rendre compte de la courbe expérimentale à 12 krad/mn. La courbe représentée figure 8, et qui correspond à la meilleure courbe obtenue avec deux classes, illustre la difficulté rencontrée, à savoir l'impossibilité de rendre compte à la fois de la durée de l'épaule et de la pente asymptotique.

Nous pouvons donc conclure à la nécessité d'introduire au moins trois classes dans la première catégorie. Il est facile de trouver des exemples (DELFORGE 1975) qui montrent que l'introduction de trois classes est suffisante pour une interprétation correcte de la courbe expérimentale à 12 krad/mn.

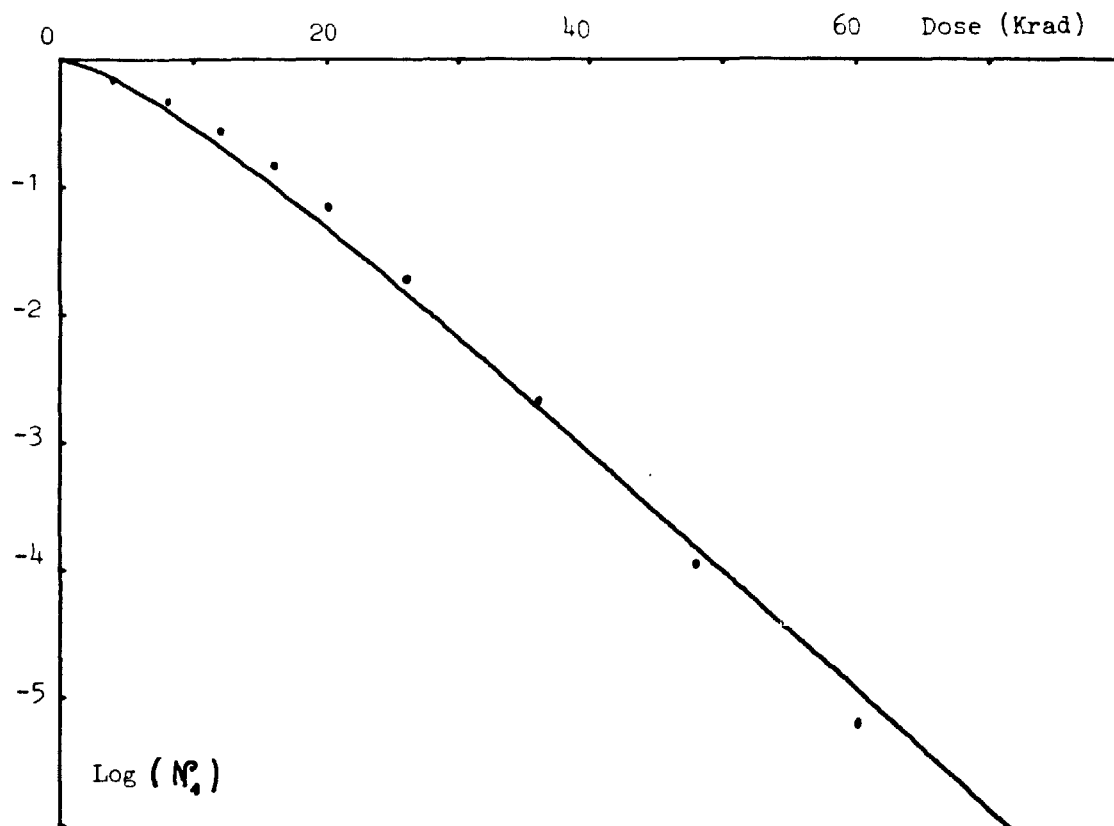


Figure 8 - Meilleur lissage de la courbe à 12 krad obtenu avec un modèle ne contenant que deux classes.

6.2 - Etudes des transitoires de fin d'irradiation

L'étude des transitoires de fin d'irradiation permet d'étudier la cinétique de retour des éléments de la catégorie 2 vers la catégorie 1. En particulier, elle apporte généralement de nombreux renseignements sur le nombre de classes nécessaires dans la deuxième catégorie.

Dans le cas de chlorelles, l'étude est particulièrement simple. Comme le montrent les figures 9 à 14, tous les transitoires de fin d'irradiation des cinq séries d'expériences effectuées à des débits de dose différents peuvent être interprétés par une courbe de la forme :

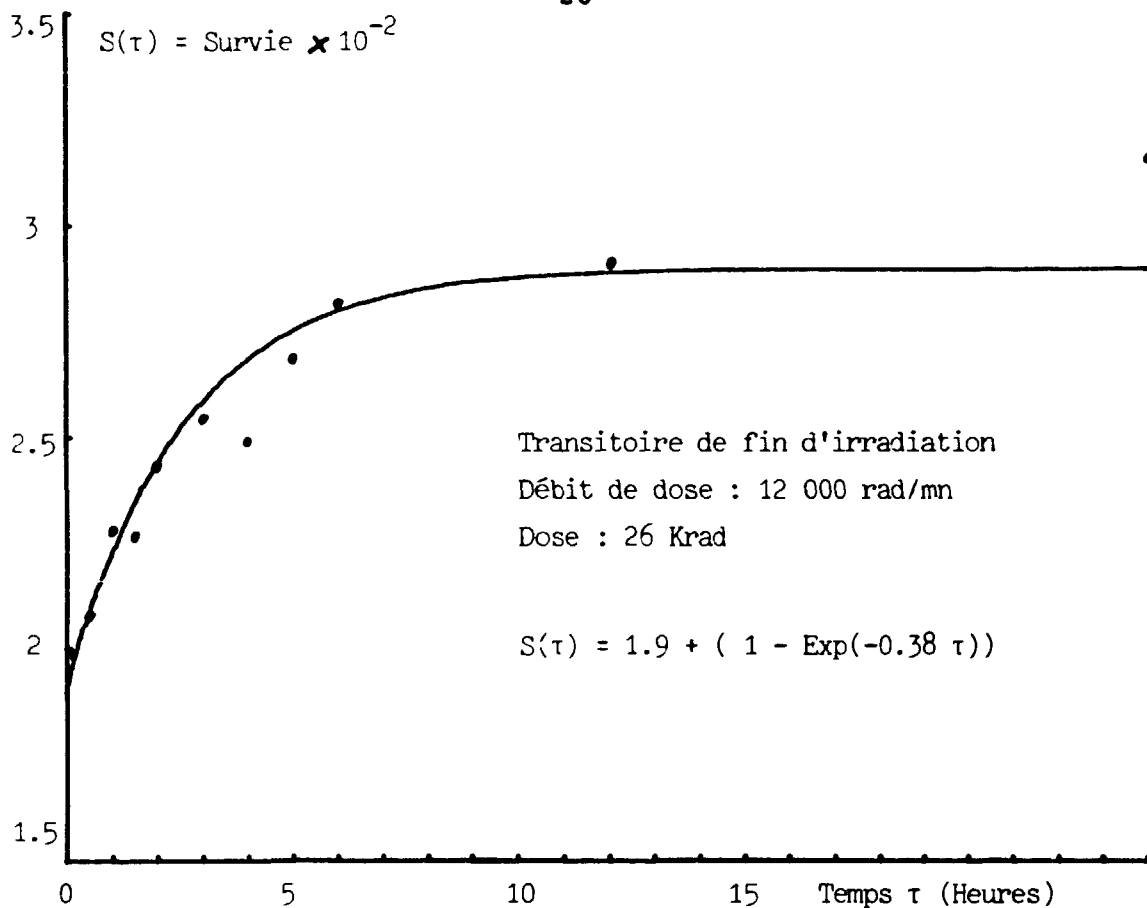


Figure 9

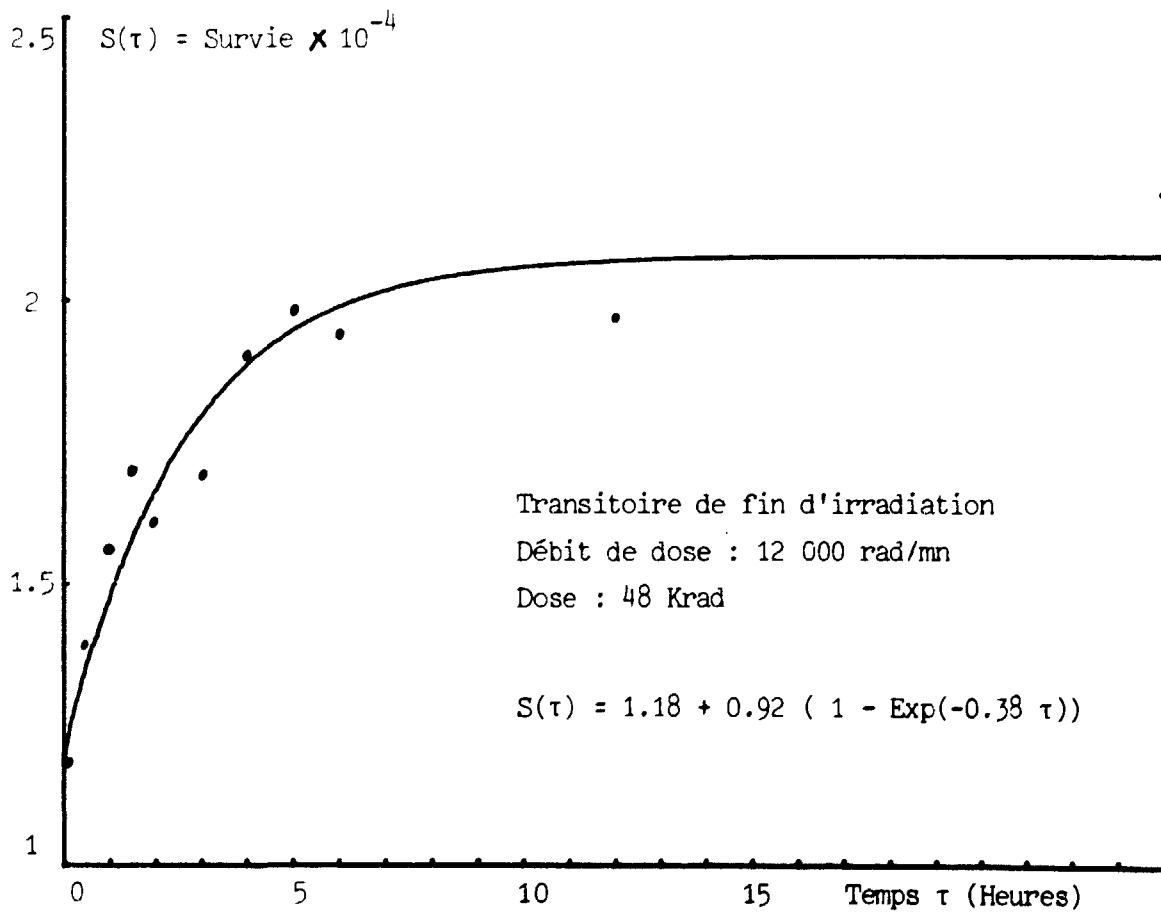


Figure 10

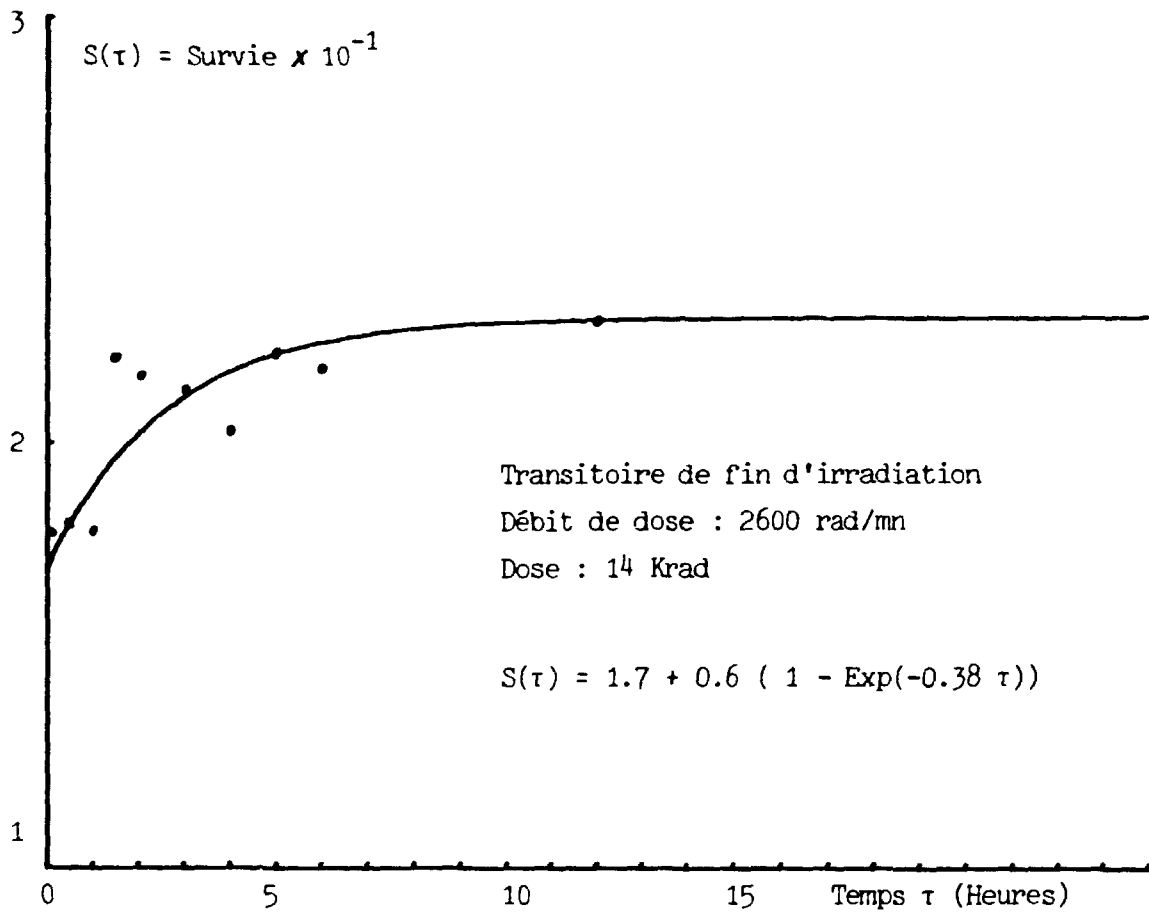


Figure 11

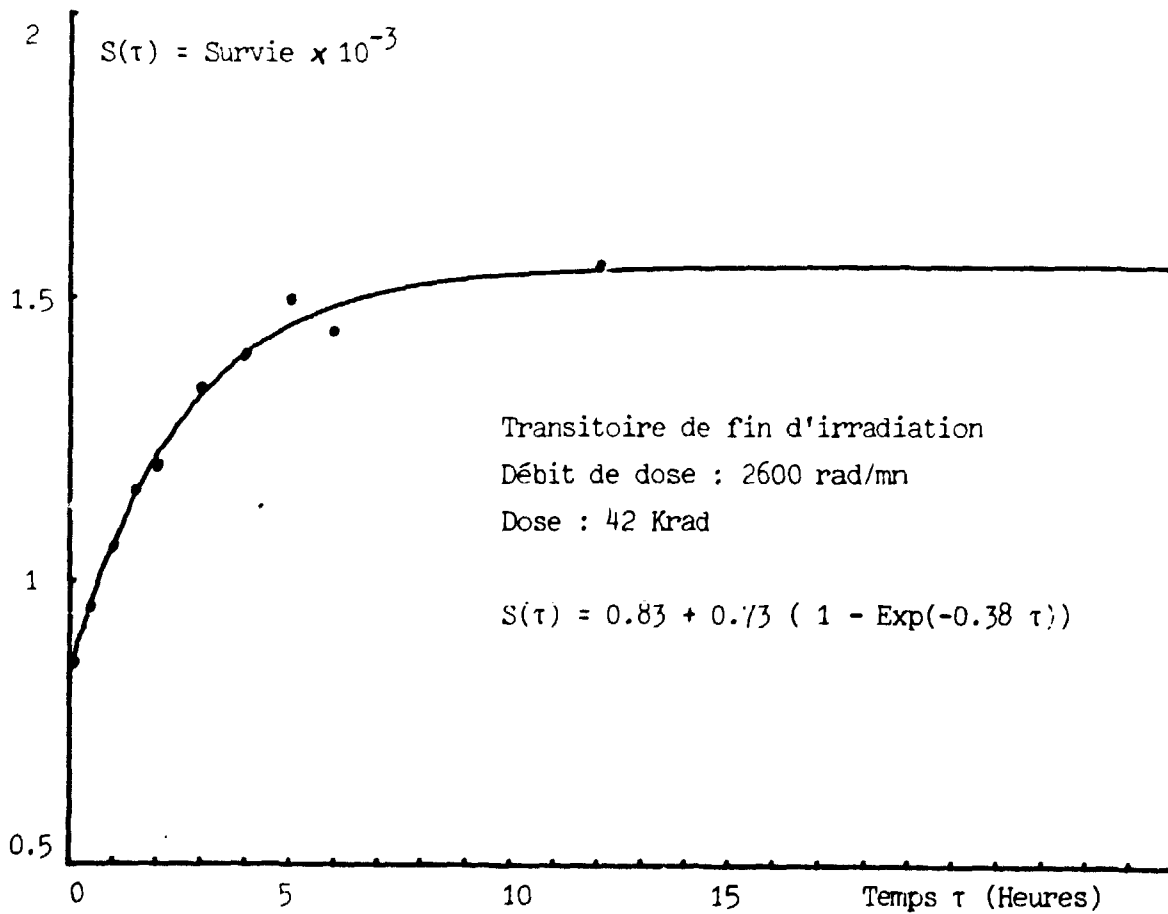


Figure 12

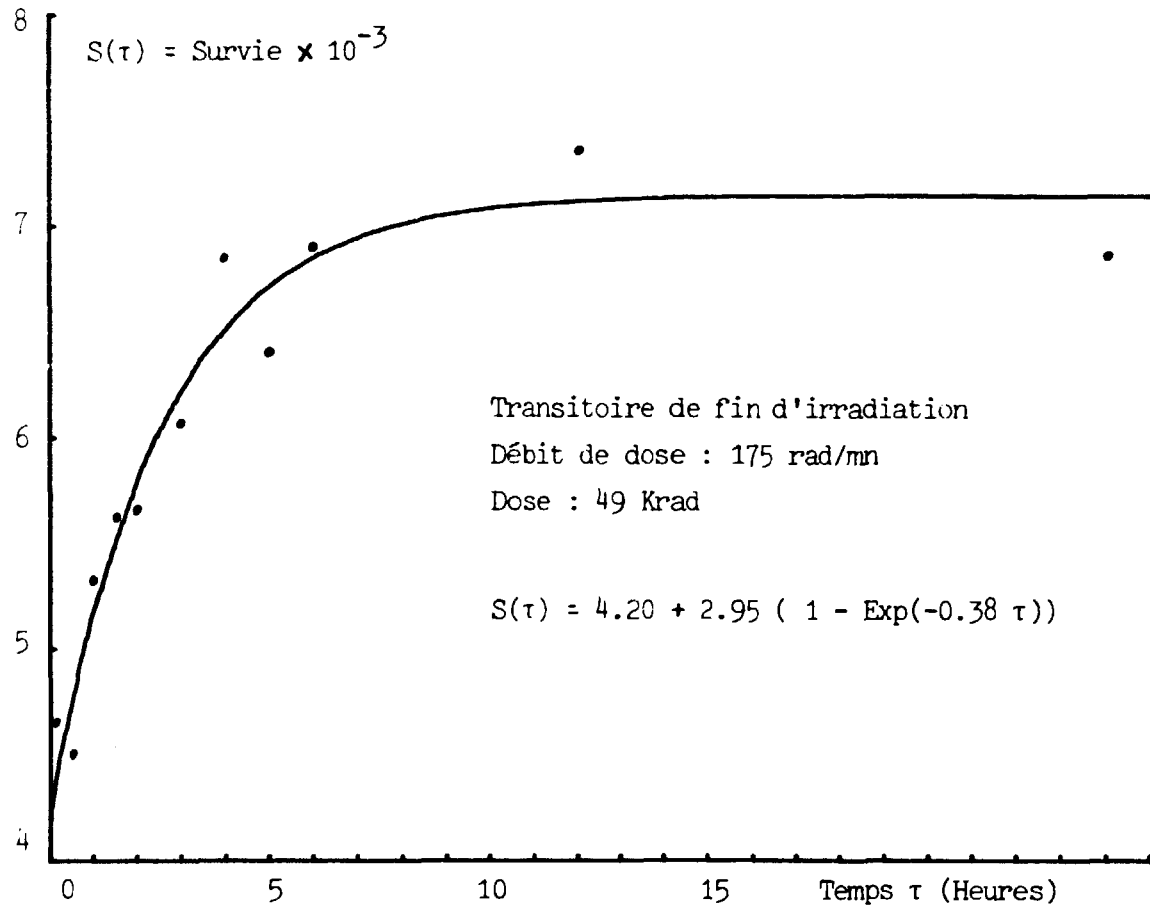


Figure 13

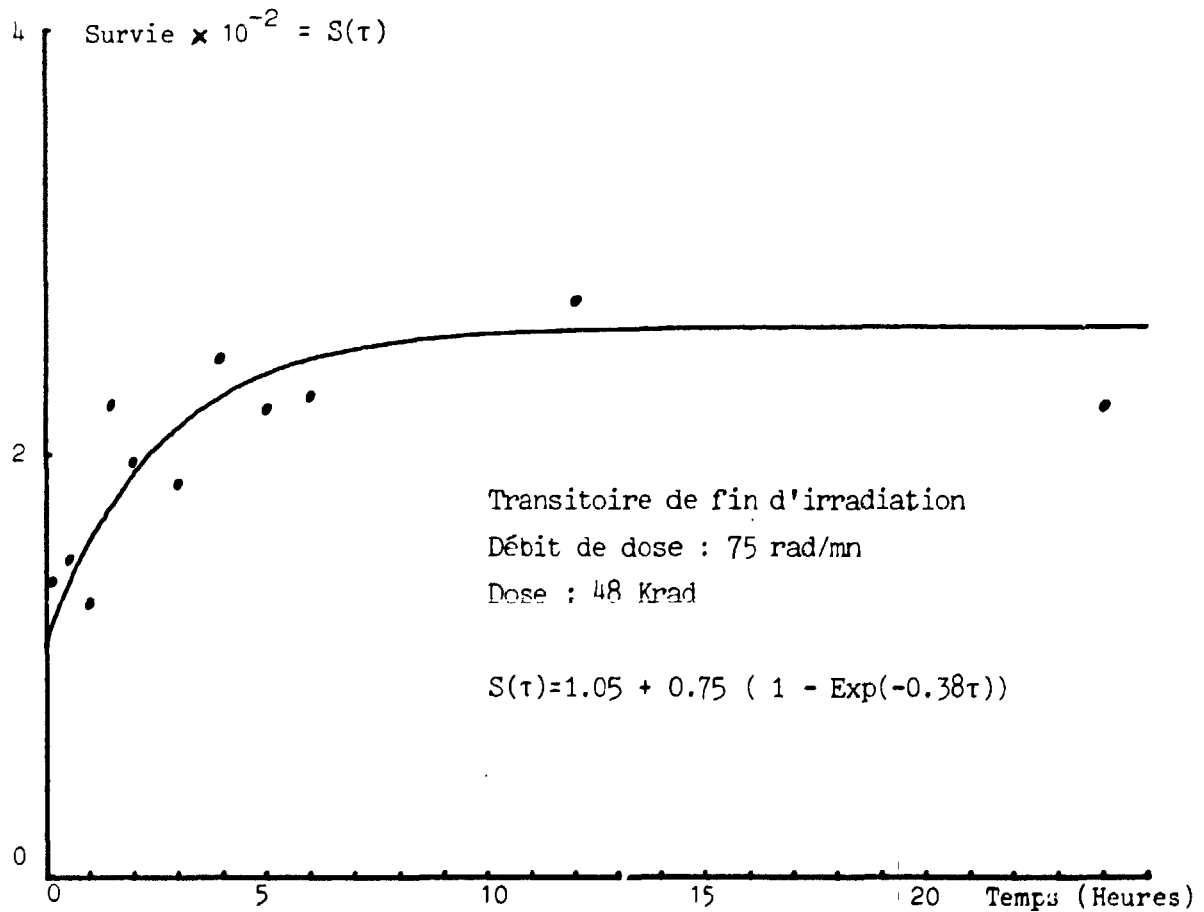


Figure 14

$$S(\tau) = S_0 + (S_\infty - S_0) (1 - \exp(-\lambda\tau)) \quad (5)$$

avec S_0 la survie à la coupure du rayonnement ($\tau = 0$)

S_∞ la survie à la fin des restaurations (en théorie $\tau = +\infty$
en réalité $\tau = 24$ heures pour les chlorelles)

où λ est un coefficient indépendant de la dose administrée et
du débit de dose utilisé ($\lambda = 0,38$ pour τ exprimé en
heures, soit $\lambda = 0,0064$ pour τ exprimé en minutes).

Ce résultat signifie que la deuxième catégorie ne contient
qu'une seule classe d'équivalence puisque la cinétique des retours
de la catégorie 2 vers la catégorie 1 est, aux erreurs expérimentales
près, de la forme d'une exponentielle pure, et peut donc s'interpré-
ter comme l'existence d'une classe unique dans la catégorie 2 se
vidant dans les classes de la catégorie 1. La constante de temps λ
correspond alors à la somme de probabilités par unité de temps
des retours d'éléments de cette unique classe de la catégorie 2
vers les diverses classes de la catégorie 1.

6.3 - Matrice d'observation

Nous avons donc mis en évidence l'existence de trois classes
dans la catégorie 1 et d'une seule classe dans la catégorie 2. Ce
résultat ne sera pas remis en cause dans les études plus profon-
dies des données expérimentales qui vont suivre.

On aboutit donc au schéma suivant :

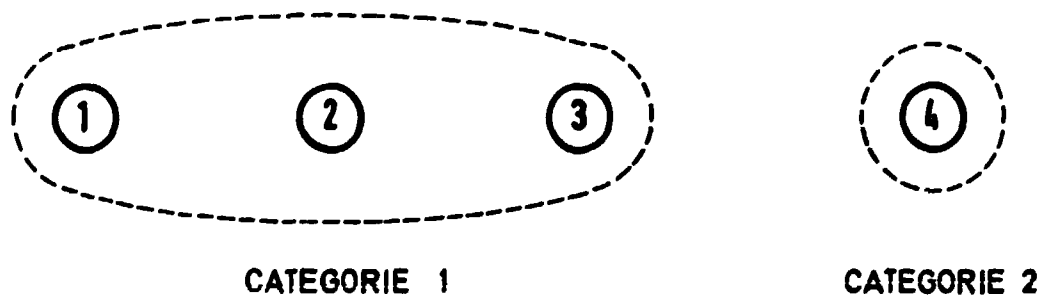


Figure 15

C'est-à-dire aux équations :

$$\begin{pmatrix} \mathcal{J}_1(t) \\ \mathcal{J}_2(t) \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{pmatrix} N_1(t) \\ N_2(t) \\ N_3(t) \\ N_4(t) \end{pmatrix}$$

7 - ETUDE DES TRANSFORMATIONS ENTRE CLASSES

7.1 - Mise en évidence des transformations nécessaires

7.1.1 - Choix des conditions initiales

Expérimentalement nous connaissons le nombre de micro-organismes présents dans les catégories 1 et 2 au début de l'irradiation. Comme il n'y a aucune perte spontanée du pouvoir de multiplication, le nombre d'éléments présents dans la deuxième catégorie, c'est-à-dire dans la classe 4, est évidemment nul. Par contre, un problème se pose pour le choix des conditions initiales de la première catégorie puisque nous mesurons seulement la somme des conditions initiales des trois classes. Cependant, comme aucune donnée expérimentale n'est en contradiction avec cette hypothèse, nous supposerons que la population initiale est homogène, c'est-à-dire que seule une classe de la première catégorie est initialement non vide. Nous utiliserons donc les conditions initiales suivantes (normalisées à 1 suivant la coutume) :

$$\begin{array}{|l} N_1(0) = 1 \\ N_2(0) = 0 \\ N_3(0) = 0 \\ N_4(0) = 0 \end{array}$$

7.1.2 - Etude des courbes d'évolution obtenues à 12 krad/mn

Rappelons que ces courbes d'évolution ont été obtenues avec un débit de dose tel que les transformations spontanées n'ont pratiquement aucune influence sur l'évolution du système. L'étude de la courbe d'évolution de la catégorie 1 a montré la nécessité d'introduire trois classes dans cette première catégorie (§ 6.1), ce qui conduit à introduire au minimum les transformations dépendant du rayonnement : $\sigma_{21} \phi$, $\sigma_{32} \phi$, $\sigma_{43} \phi$ (cette dernière transformation est nécessaire puisque l'évolution de la catégorie 2 est non nulle). Le fait que l'on soit obligé d'introduire trois classes dans la première catégorie implique que si la transformation directe entre la classe 1 et la classe 3 existe, elle doit être très faible.

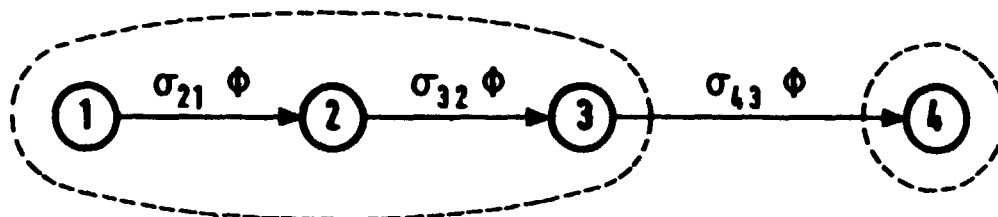


Figure 16

L'observation de la courbe d'évolution de la deuxième catégorie montre qu'elle présente, aux erreurs expérimentales près, la même pente asymptotique (en échelle semi-log) que la courbe d'évolution de la première catégorie. Les retours de la catégorie 2 vers la catégorie 1 étant négligeables avec le débit de dose utilisé, l'existence d'une pente négative implique l'existence d'une sortie de la catégorie 2, c'est-à-dire l'existence de la transformation $\sigma_{e4} \Phi$. En outre, sans rentrer dans le détail de la démonstration, signalons que l'égalité des pentes asymptotiques signifie que la valeur de σ_{e4} est supérieure à la valeur absolue de la pente asymptotique des courbes d'évolution tracées en fonction de la dose. (Démonstration basée sur des propriétés de décomposition des graphes (DELATTRE 1971)).

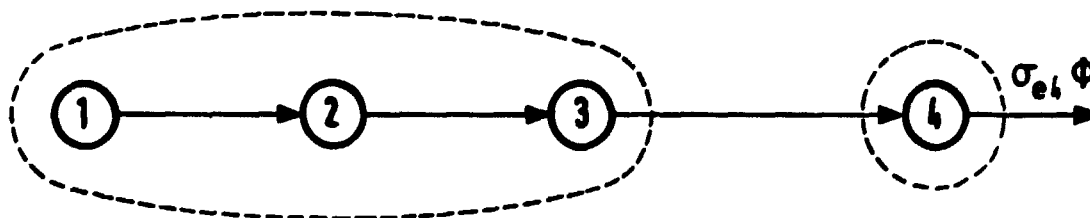


Figure 17

7.1.3 - Etude des pentes initiales

L'observation des pentes initiales de l'ensemble des courbes expérimentales conduit à deux remarques :

1 - Quelle que soit l'expérience considérée, la pente initiale de la courbe d'évolution de la catégorie 1 et la pente initiale de la courbe d'évolution de la somme des deux catégories (courbe obtenue avec $\tau = 24$ h) sont identiques. La pente initiale de la courbe d'évolution de la catégorie 2 est donc nulle. Cela signifie qu'il n'y a aucun transfert direct d'éléments de la classe 1, seule classe initialement non vide, vers la classe 4. De même, les études numériques montrent que, si la transformation entre la classe 2 et la classe 4 est possible, elle doit avoir une influence très faible.

2 - Les pentes initiales des courbes d'évolution tracées en fonction du temps sont non nulles, et proportionnelles à l'intensité ϕ du rayonnement, c'est-à-dire que les pentes initiales des courbes tracées en fonction de la dose sont indépendantes du débit de dose. Ce résultat est en accord avec les résultats antérieurs de GILET et SANTIER (1973). Il signifie que les éléments de la classe 1 peuvent perdre directement et de façon définitive leur pouvoir de multiplication, c'est-à-dire que nous devons introduire la transformation $\sigma_{e1}\phi$.

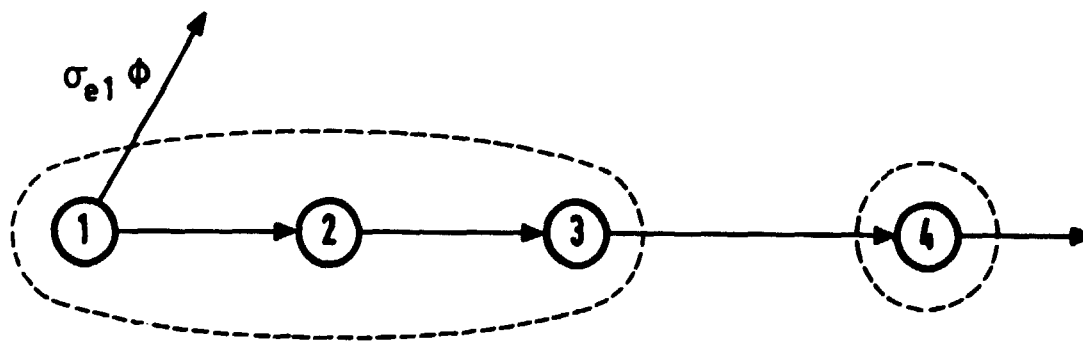


Figure 18

7.1.4 - Etude des phénomènes de restauration

L'existence de transitoires de fin d'irradiation montre la nécessité d'introduire un retour spontané de la catégorie 2 vers la catégorie 1. Nous considérons logiquement, dans un premier temps, la transformation η_{34} qui correspond à la restauration de la perte temporaire du pouvoir de multiplication dû à la transformation $\sigma_{43}\phi$. D'après les résultats de § 6.2, nous connaissons directement la valeur de η_{34} :

$$\eta_{34} = \lambda = 0,0064$$

L'existence de retours spontanés de la classe 4 vers les classes 1 et 2 n'a pas été mise en évidence avec les données expérimentales utilisées.

Cependant, l'existence de cette seule restauration (η_{34}) ne permet pas de rendre compte de l'importance de l'effet de débit de dose observée. Il est donc nécessaire d'introduire une transformation spontanée correspondant à un phénomène de restauration à l'intérieur même de la catégorie 1. Des études numériques des données expérimentales ont montré la nécessité d'une transformation spontanée très importante entre la classe 3 et la classe 2 (cette transformation spontanée est au moins 15 fois plus rapide que la restauration mise en évidence par les transitoires de fin d'irradiation).

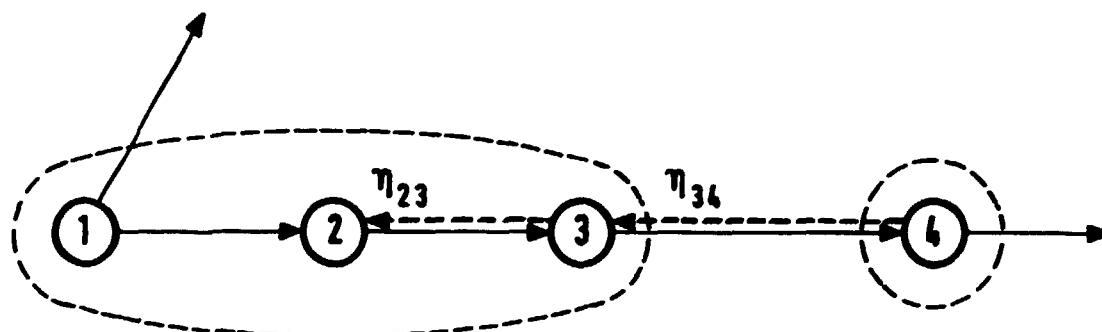


Figure 19

Par contre, ces mêmes études ont montré qu'une éventuelle transformation spontanée de la classe 2 vers la classe 1 devrait, si elle existe, être très faible. Ce résultat est en accord; d'une part avec les données expérimentales de (GILET 1970) obtenues par fractionnement de dose et qui mettent en évidence l'existence de lésions non létales et non réparables, et d'autre part avec l'existence d'une courbe limite présentant un épaulement lorsque le débit de dose diminue et que l'on trace les courbes en fonction de la dose. Cette courbe limite a été mise en évidence par GILET et SANTIER (1973). L'existence d'un épaulement, même aux très faibles débits de dose, a été confirmée par nos nouvelles données expérimentales.

Le rapport entre ces données expérimentales et la non-existence probable de la restauration des lésions dues à la

transformation $\sigma_{21}\phi$ est évident : en effet, quand le débit de dose est suffisamment faible, les retours spontanés de la classe 3 vers la classe 2 deviennent prépondérants vis-à-vis des autres sorties de cette classe. En particulier, la classe 4 reçoit peu d'éléments, ce qui explique la difficulté rencontrée pour mettre en évidence des transitoires de fin d'irradiation aux très faibles débits de dose. De même le nombre des éventuels éléments qui quittent la classe 3 en perdant définitivement leur pouvoir de multiplication ne peut être alors que négligeable. Or, l'interprétation d'un épaulement nécessite l'introduction d'au moins deux classes ayant une influence suffisamment importante au cours de l'évolution. Une transformation spontanée de la classe 2 vers la classe 1 aurait, pour un débit de dose suffisamment faible, pour effet de réduire de façon importante le nombre d'éléments présents dans la classe 2, c'est-à-dire aboutirait finalement à une courbe limite rectiligne en coordonnées semi-logarithmiques correspondant à l'existence d'une seule classe décelable (classe 1) se vidant par la transformation $\sigma_{e1}\phi$.

La transformation $\sigma_{e2}\phi$ devient alors indispensable pour que la classe 2 puisse se vider même au très faible débit de dose.

Notons, pour terminer, que les études numériques finales ont nécessité l'introduction d'une sortie de la classe 3 vers l'extérieur du système, notée $\sigma_{e3}\phi$.

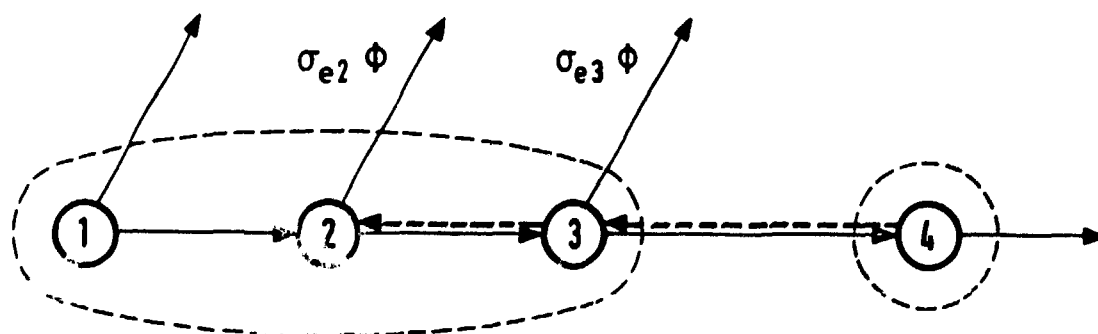


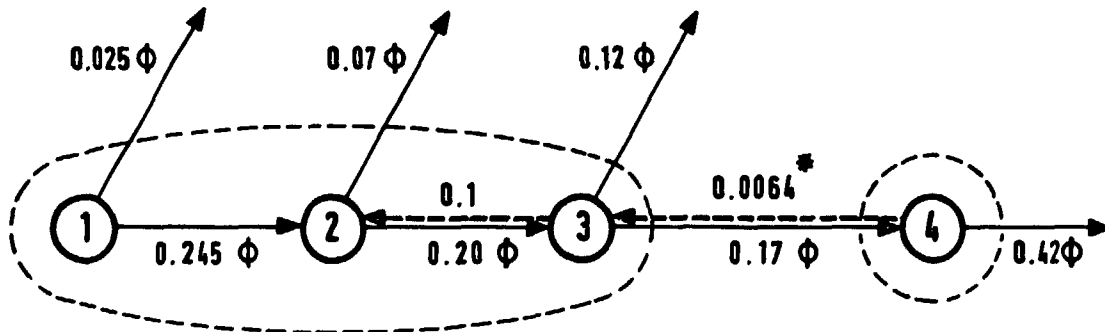
Figure 20

7.2 - Recherche numérique des paramètres du modèle

Il n'est pas possible de rappeler ici en détail la méthode que nous utilisons pour la recherche des valeurs numériques

des paramètres du modèle (cf. DELFORGE 1976a). Son principe est très simple : les paramètres η_{kj} et σ_{kj} du modèle sont déterminés de telle manière que la différence entre les valeurs expérimentales et les valeurs correspondantes calculées à partir du modèle soit minimum. Il s'agit donc d'un problème de minimisation d'une norme, résolu par des méthodes très puissantes de l'analyse numérique. Bien que posant des problèmes complexes au niveau théorique et au niveau de la programmation, cette méthode a surtout le grand mérite d'être très générale, et en particulier de n'imposer aucune contrainte sur les données expérimentales.

Le résultat final obtenu est le suivant :



avec ϕ le débit de dose exprimé en krad/mn.

Figure 21

*Cette valeur a été imposée dans le programme utilisé puisqu'elle a été identifiée lors de l'étude des transitoires de fin d'irradiation.

La comparaison des résultats calculés à partir de ce modèle et des points expérimentaux est montrée par les figures 22 à 30.

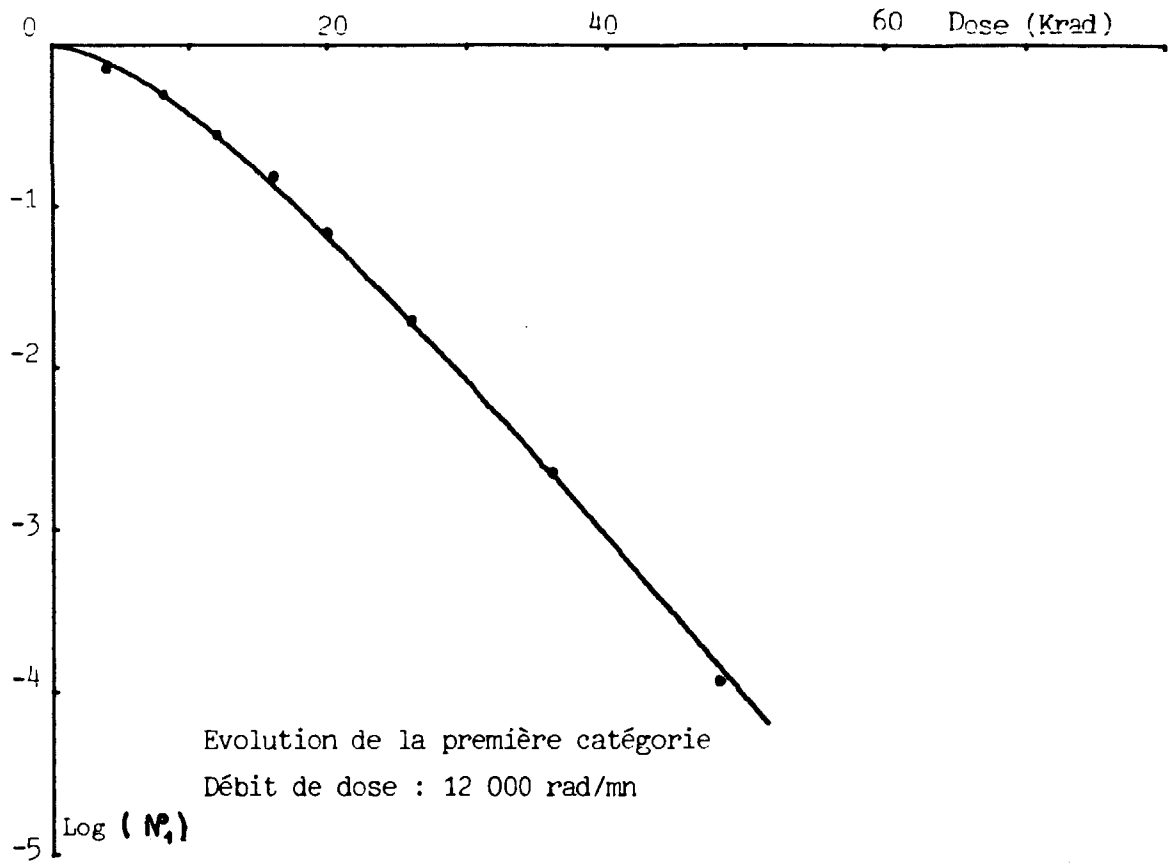


Figure 22

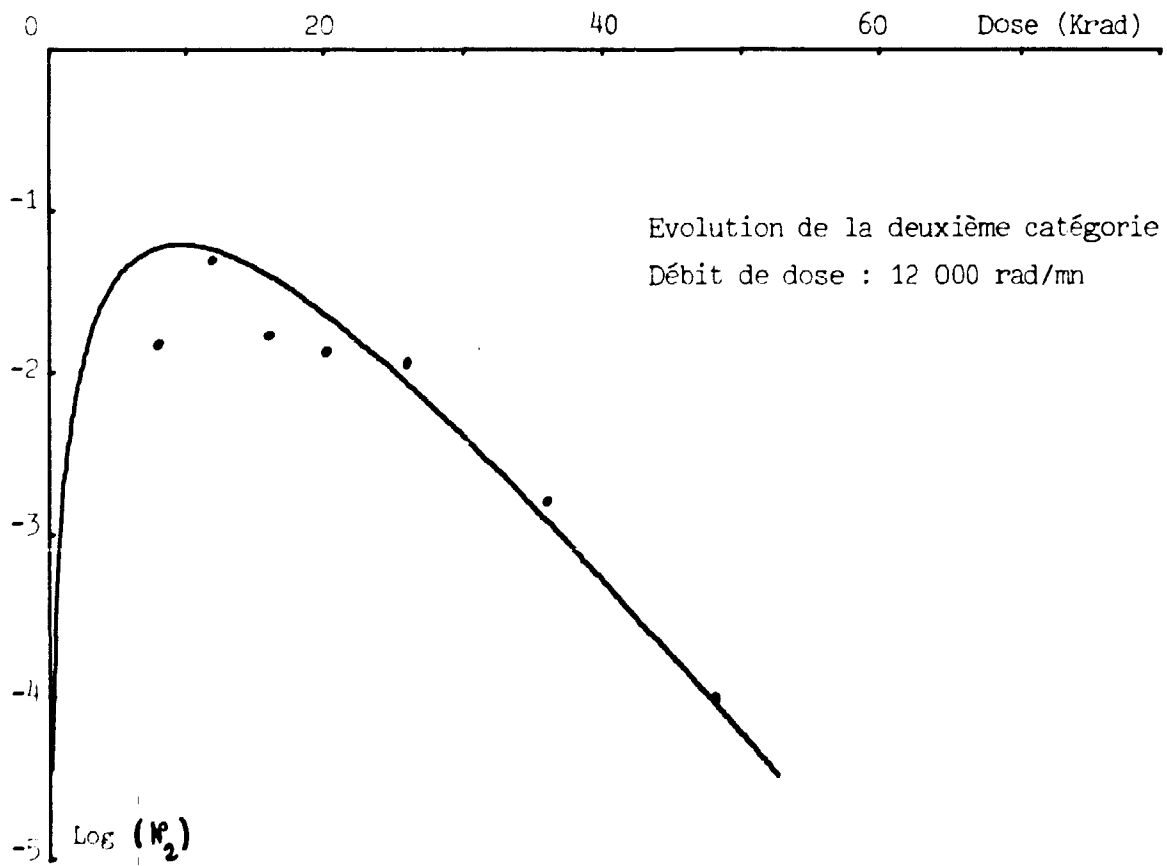


Figure 23

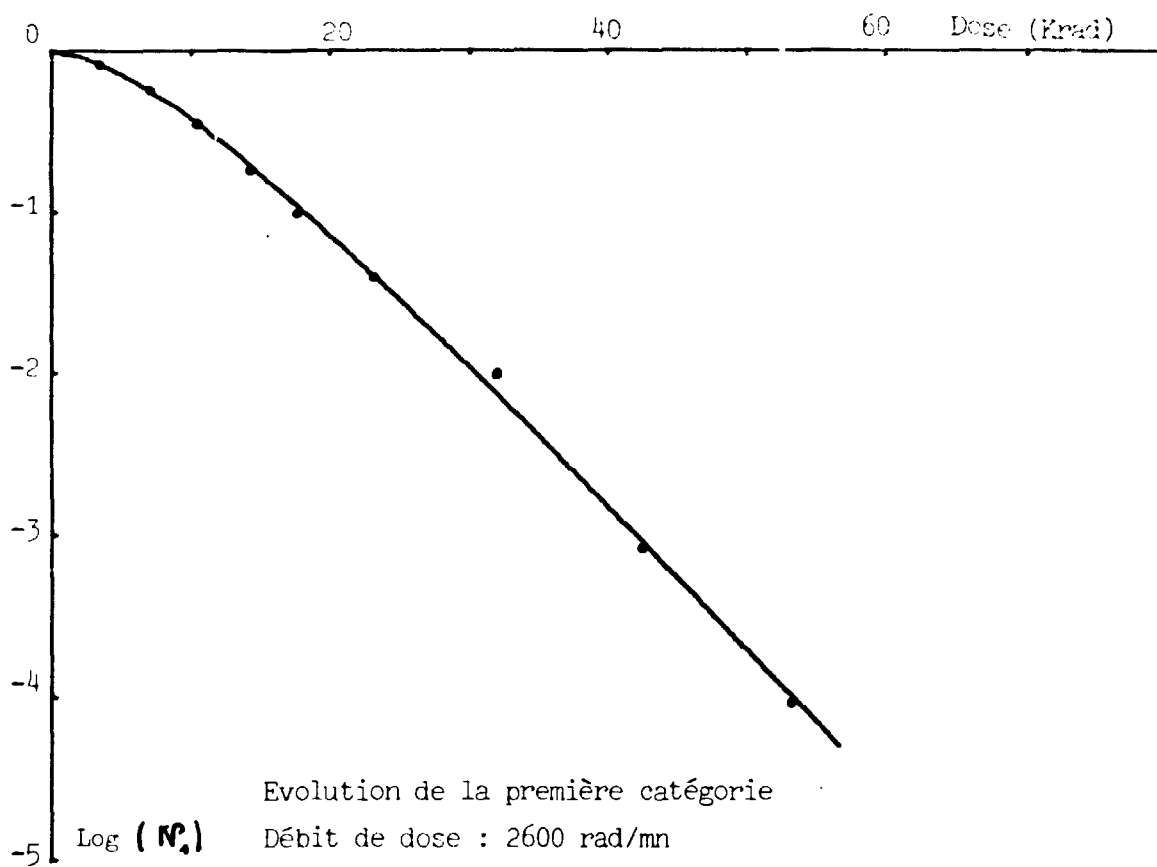


Figure 24

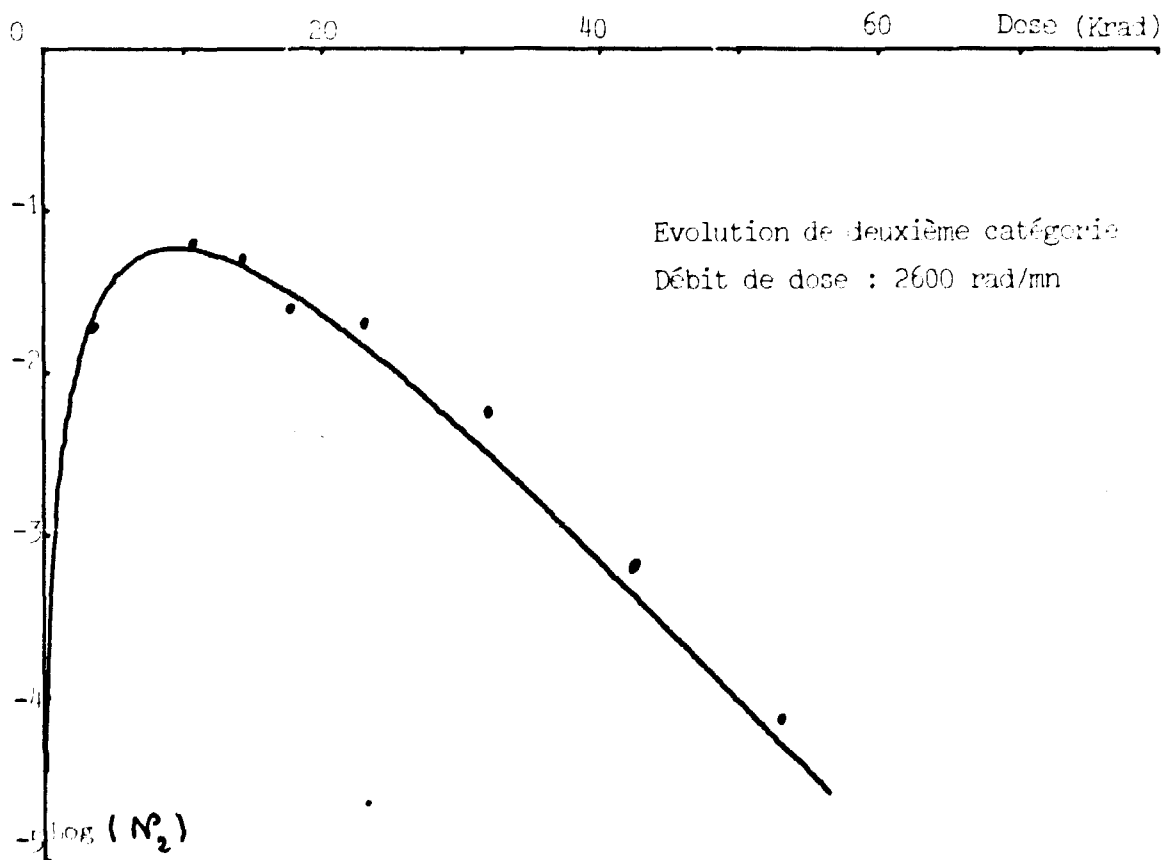


Figure 25

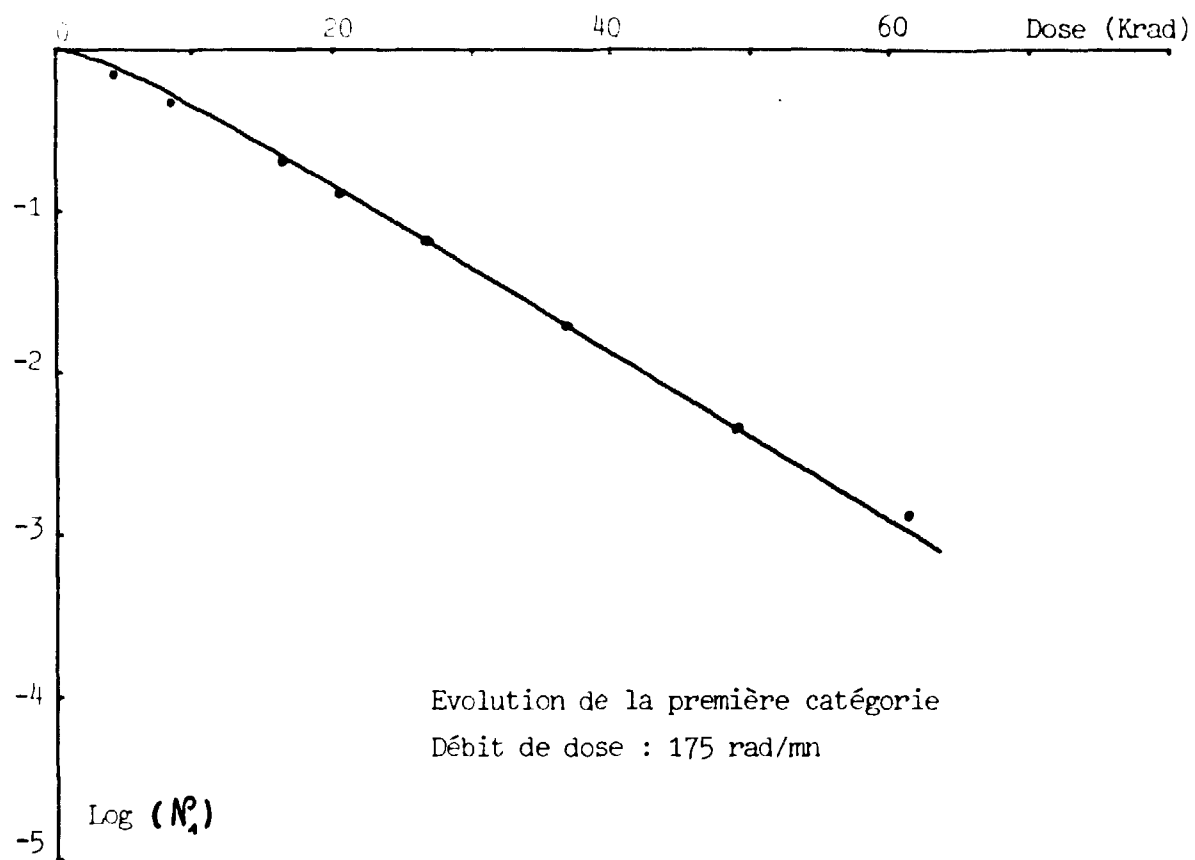


Figure 26

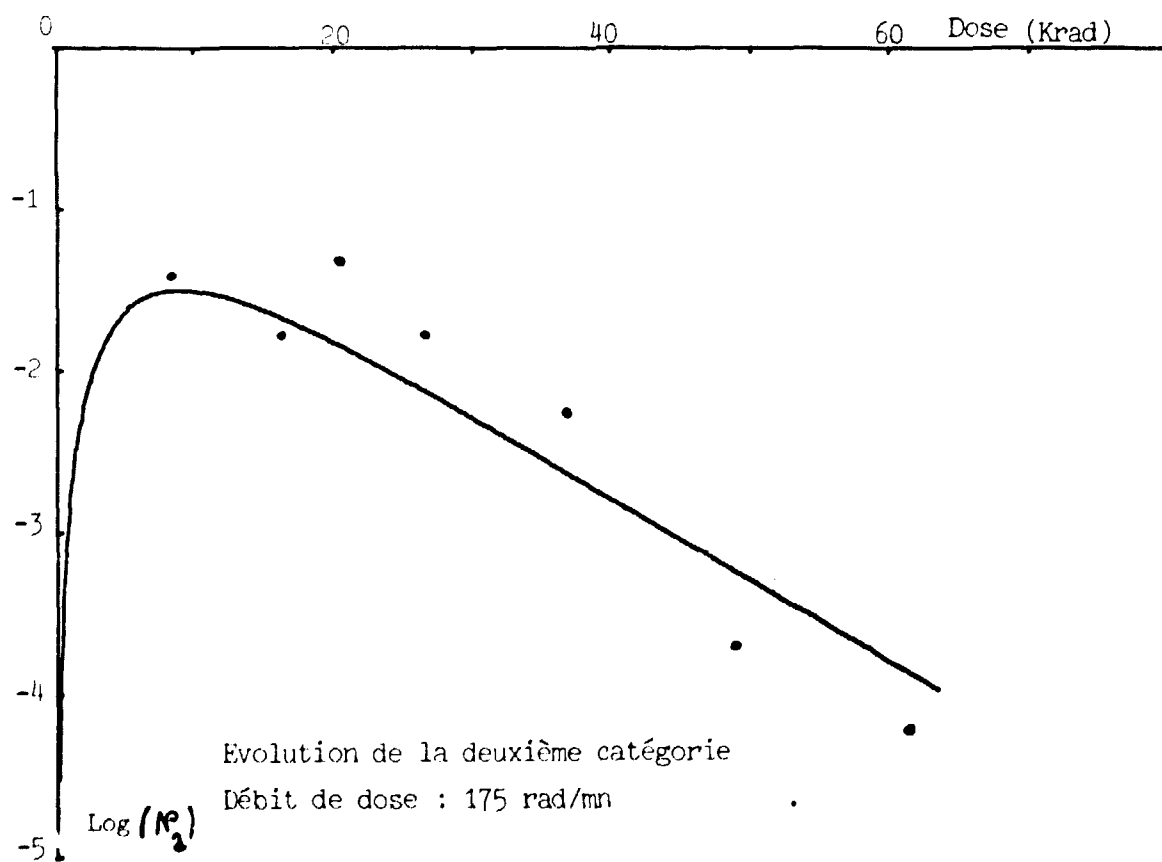


Figure 27

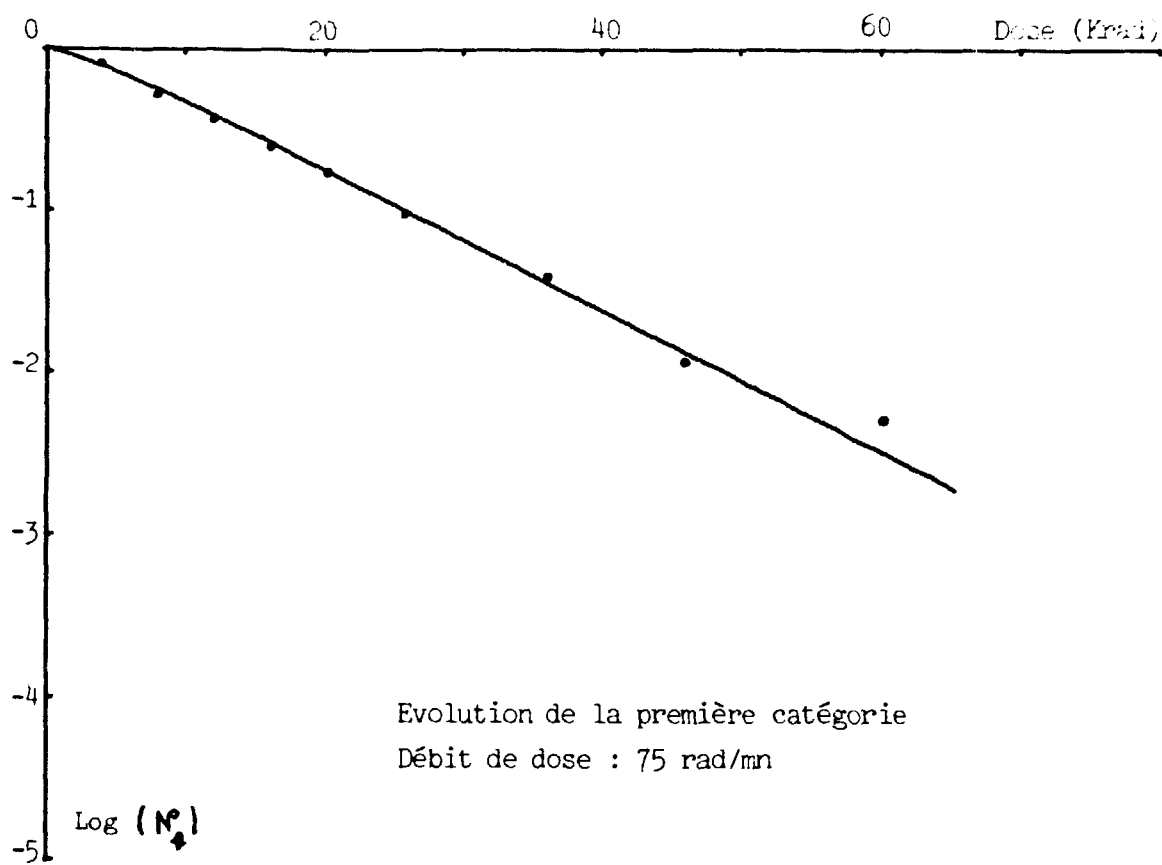


Figure 28

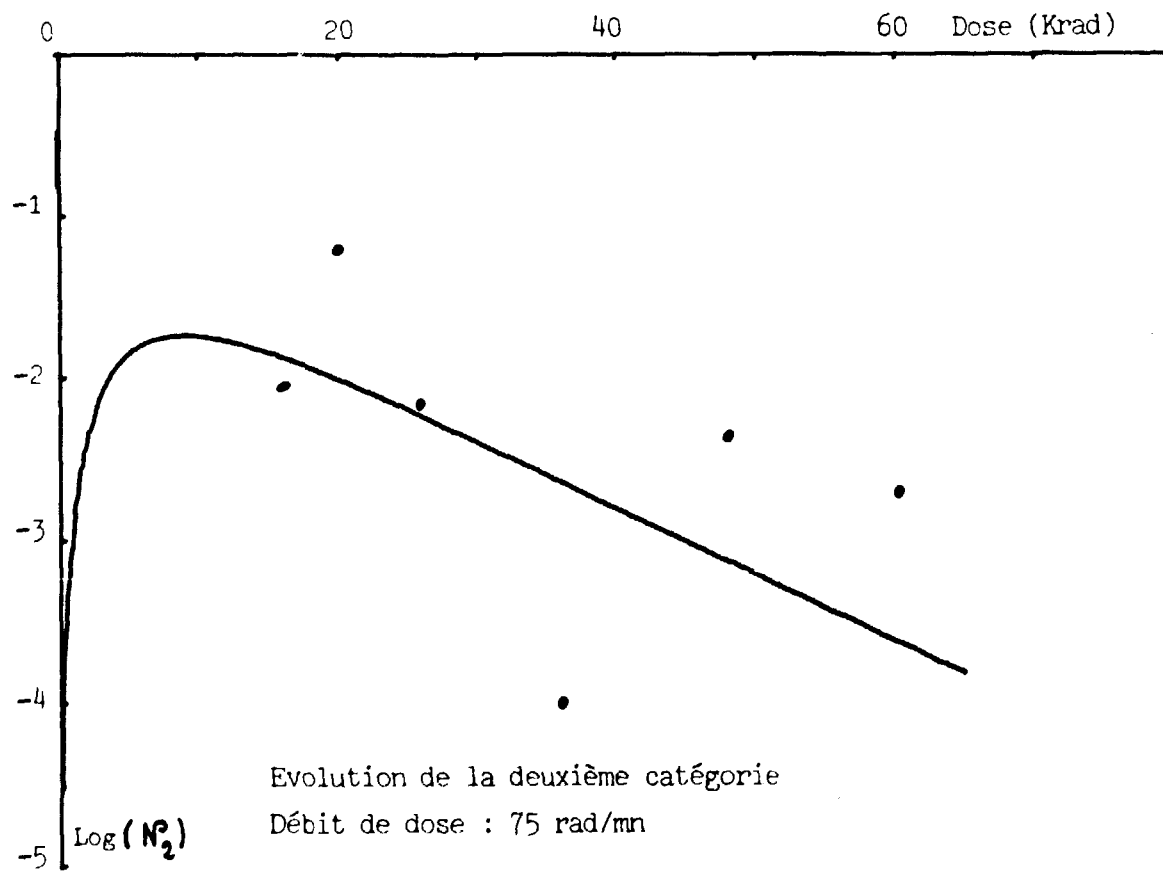


Figure 29

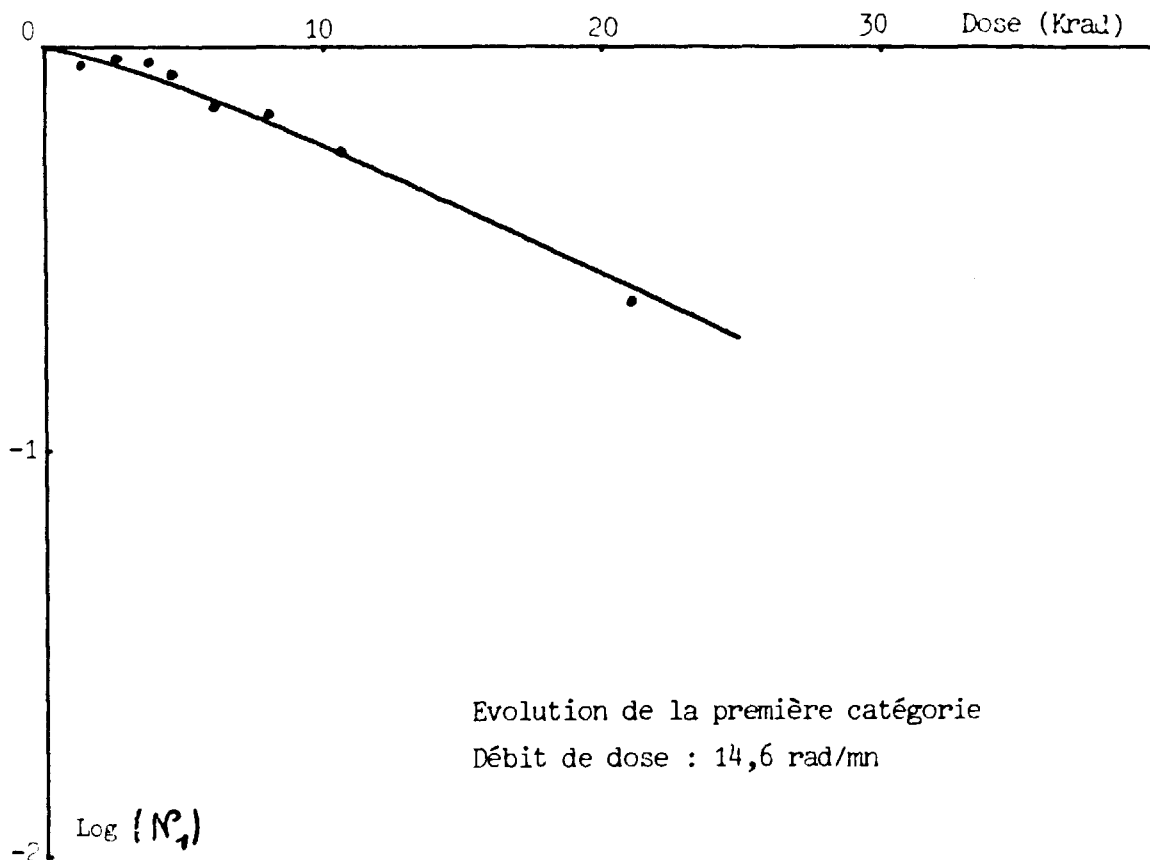


Figure 30

N.B. Pour l'expérience effectuée à 14,6 rad/mn, le nombre d'éléments présents dans la deuxième catégorie est si faible que les résultats expérimentaux donnant l'évolution de cette catégorie sont inexploitable car ils sont trop perturbés par les erreurs expérimentales.

7.3 - Utilisation du modèle

Le modèle permet de calculer l'évolution du système en résolvant le système différentiel linéaire :

$$\begin{cases} \frac{d\vec{N}(t)}{dt} = (\eta + \sigma\phi(t)) \vec{N}(t) \\ \vec{N}(t_0) = (1, 0, 0, 0) \end{cases} \quad (4)$$

$$\text{où} \quad \varepsilon_1 = \begin{vmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0,1 & 0 \\ 0 & 0 & -0,1 & 0,0064 \\ 0 & 0 & 0 & -0,0064 \end{vmatrix}$$

$$\text{et} \quad \varepsilon_2 = \begin{vmatrix} -0,27 & 0 & 0 & 0 \\ 0,245 & -0,27 & 0 & 0 \\ 0 & 0,20 & -0,29 & 0 \\ 0 & 0 & 0,17 & -0,42 \end{vmatrix}$$

Dans le cas d'une irradiation continue à un débit de dose constant ϕ pendant un temps t suivie d'une mise à l'obscurité pendant un temps τ , la fonction $\phi(t)$ est la fonction égale à ϕ dans l'intervalle $(0,t)$ et nulle dans l'intervalle $(t,t+\tau)$. Il est important de souligner que le modèle permet de prévoir l'évolution du système avec une fonction $\phi(t)$ quelconque.

Même dans les cas simples, une résolution analytique du système différentiel (4) est très difficile. En pratique on utilisera pour sa résolution une méthode classique du type RUNGE-KUTTA (cf par exemple RALSTON 1960).

8 - CONCLUSIONS

Après avoir exposé les principes d'une nouvelle procédure de recherche des modèles, celle-ci a été appliquée au traitement des données expérimentales concernant les effets du rayonnement γ sur les chlorelles.

L'utilisation d'un cadre théorique adéquat a permis de proposer un protocole expérimental ne présentant aucune difficulté particulière dans sa réalisation, mais permettant d'obtenir une richesse d'informations bien supérieure aux protocoles classiques. En particulier, la mesure systématique de l'évolution de la deuxième catégorie est, à notre connaissance, originale.

Bien que la justification du modèle proposé ne soit pas encore parfaite (en particulier la non-existence de certaines transformations n'a pas pu être démontrée avec certitude), celui-ci représente une bonne base pour la continuation de l'étude entreprise. Il permettra en effet d'envisager de nouveaux protocoles expérimentaux conduisant à un approfondissement du problème.

Par exemple, les courbes expérimentales utilisées dans ce rapport ont toutes été obtenues à partir d'un débit de dose constant. Or, une modification du débit de dose en cours d'irradiation devrait apporter de précieux renseignements permettant une amélioration de la précision sur certains paramètres et une vérification de la non-existence de certaines transformations.

Ce modèle a cependant déjà permis de mettre en évidence au moins trois états différents parmi les chlorelles ayant conservé leur pouvoir de multiplication, et l'existence d'un seul état parmi les chlorelles ayant perdu temporairement leur pouvoir de multiplication. Il a également montré l'existence d'une restauration interne à la catégorie 1, ainsi que la possibilité de perte définitive du pouvoir de multiplication à partir de chacune des quatre classes du modèle. Il a enfin permis de confirmer l'existence de lésions non létales mais non réparables.

La justification biologique du modèle c'est-à-dire en particulier la signification biologique des classes d'équivalence est maintenant le problème qui se pose avec le plus d'acuité.

On pourrait tenter de rechercher l'"entité biochimique" dont l'atteinte par les radiations provoque la mort de la cellule. Une première étape consiste à faire des observations morphologiques externes et d'essayer d'identifier certaines classes homogènes que l'on analysera par la suite (par exemple mise en évidence de différences moléculaires sur l'ADN).

La taille des clones pourrait également être un critère intéressant pour guider de telles recherches. En effet, depuis longtemps on s'était aperçu de l'existence de différentes tailles de clones sur les boîtes de Pétri. Mais les dénombrements par classe étaient peu précis et très laborieux. A l'aide d'un compteur automatique, une telle discrimination est maintenant possible.

L'étude d'un éventuel lien entre classes d'équivalence et tailles des clones devrait permettre une nouvelle approche de ce difficile problème, en liaison avec les études de biologie moléculaire sur les mécanismes cellulaires fondamentaux.

REFERENCES

- A.S.T.M. Committee, 1959, Tentative Method of Mesuring Absorbed Gamma Radiation Dose by FRICKE dosimetry
Report D 1671-59 T, 663-665
- DELATTRE P., 1971
L'évolution des systèmes moléculaires
Maloine, Paris
- DELATTRE P., 1972
Etude de la dosimétrie à la lumière d'une théorie générale de l'évolution des systèmes de transformation,
Proceedings of the third Symposium on Microdosimetry
EURATOM EUR 4810 d.f.e., 701-740
- DELATTRE P., 1974
System Approach of Theoretical model in Radiobiology and Radiotherapy
Int. J. General Systems, 1, 105-117
- DELATTRE P., 1975
On Methodology for the Elaboration of a Theoretical Model
Int. J. General Systems, 2, 87-97
- DELATTRE P., 1976 a
Sur l'interprétation de certains aspects morphologiques des courbes de survie, *Proceedings of the fifth Symposium on microdosimetry*, Euratom EUR 5452 d.e.f., 479-515
- DELATTRE P., 1976 b
Variables et paramètres pertinents dans l'étude des effets des rayonnements de faible intensité
Proceedings of the Symposium IAEA-SM-202, 275-301
- DELFORGE J., 1975
Recherche d'un modèle des effets du rayonnement γ sur les chlorelles. Premier résultat théorique.
Note DB/GEERSM, n° 56, CEN-Saclay

- DELFORGE J., 1976 a
Model Identification in Linear Transformations systems,
to Appear in *Applied Mathematics and Computation*
- DELFORGE J., 1976 b
Procédure de recherche des modèles
Proceedings of the Symposium IAEA-SM-202, 303-317
- DIENES G.J., 1966
A Kinetic Model of Biological Radiation Response,
Radiation Research, 28, 183-202
- GILET R., 1970
Etude au moyen des courbes de survie de la restauration
cellulaire après irradiation chez les chlorelles
Rapport CEA.R.4139
- GILET R., 1972
Potentially lethal Damage After γ Irradiation in Chlorella
Cells, *Studia biophysica*, 30, 37-44
- GILET R., SANTIER S., 1973
Analyse des courbes de survie clonale obtenues chez les
chlorelles après irradiation γ à divers débits de dose,
Biophysik, 9, 335-348
- KAPPOS A., POHLIT W., 1972
A Cybernetic Model for Radiation Reactions in living
Cells, *Int. J. Radiat. Biol.* 22, 51-65
- MOYSE A., 1956
Etude de la croissance d'algues monocellulaires
(Chlorelles et espèces voisines) en cultures accélérées II :
Vitesse de croissance et milieux de culture
J. Rech. CNRS, 35, 177-192
- RALSTON A., 1960
Mathematical Methods for Digital Computer
Herbert S., Wilf, New-York

TREMEAU O., 1971

Evolution d'une population de E. Coli K 12 après irradiation U.V., Note CEA.N.1471

VANDERLAAN M., BURMS F.J., ALBERT R.E., 1976

A Model Describing the Effects of Dose and Dose rate on tumour Induction by Radiation in rat skin, *Proceedings of the Symposium IAEA-SM-202*, 253-263.

Manuscrit reçu le 15 novembre 1976



Edité par
le Service de Documentation
Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay
Boîte Postale n° 2
91190 · Gif-sur-YVETTE (France)