

# UTILISATION DES ANALYSES CHROMOSOMIQUES EN TANT QUE DOSIMÉTRIE BIOLOGIQUE\*

M. T. BIOLA et R. LE GÔ

Département de la Protection Sanitaire, Commissariat à l'Énergie Atomique  
Fontenay-aux-Roses, France

**Résumé**—L'irradiation *in vitro* de sang prélevé sur un sujet sain, a été faite à l'intérieur d'un fantôme humain, auprès d'un montage critique expérimental. Six échantillons de ce sang ont été inclus en des points divers du fantôme, de façon à ce que chacun reçoive une dose différente de rayonnement mixte gamma + neutrons. Les doses se sont étagées entre 38 rads et 555 rads. Chacun des tubes était par ailleurs entouré de nombreux dosimètres de types divers également inclus dans le fantôme.

Vingt-huit cultures de lymphocytes ont été faites à partir de ces échantillons. La technique utilisée a été une micro-méthode, dérivée de celles de Edwards, de Arakaki et Sparkes.

On a étudié les aberrations chromosomiques au niveau de chaque point expérimental, sur deux groupes de cultures: pour le premier groupe, l'arrêt de culture a été fait au bout de 72 h; pour le second groupe, au bout de 96 h.

Les auteurs discutent des relations entre la dose reçue et les aberrations observées, pour chaque point selon le temps de culture et selon les types d'aberrations.

Ils tentent de les relier aux observations faites avant eux sur du sang irradié soit par des rayons X, soit par des rayons  $\gamma$  du  $^{60}\text{Co}$ .

Ils discutent de la possibilité de relier ces observations faites sur des irradiations *in vitro*, avec les observations d'anomalies chromosomiques portant sur des sujets humains irradiés.

## INTRODUCTION

De nombreux chercheurs ont, depuis que les techniques de culture de sang humain ont permis d'obtenir et d'étudier des images de chromosomes, observé des aberrations de nombre et de structure dans ce matériel biologique.

L'établissement de relation dose-effet a donc été tenté par plusieurs d'entre eux, sur du sang humain, soit *in vivo* à l'occasion d'irradiations accidentelles, soit *in vitro* dans un but expérimental plus précis. C'est ainsi que des courbes ont été établies *in vitro* par:

Bender<sup>(1)</sup> "Irradiation aux rayons X de 250 keV" aux doses de 0-200 R;

Gooch, Randolph et Bender<sup>(2)</sup> "Irradiation aux neutrons de 14 MeV" aux doses de 0-200 R;

Kelly et Brown<sup>(3)</sup> "Irradiation aux rayons X de 200 keV" aux doses de 0-1600 R.

A l'occasion de l'accident d'irradiation humaine survenu à Mol, le 30 décembre 1965, auprès de l'assemblage critique Venus, il nous a semblé intéressant de procéder à de semblables études expérimentales. En effet,

(1°) d'une part, nous avons, sur le sang de cet irradié, effectué des analyses chromosomiques dans un but d'estimation des dommages; les résultats obtenus seront exposés plus particulièrement dans un autre rapport de ce congrès<sup>(4)</sup> (H. Jammet, R. Gongora, R. Le Gô, G. Marblé et M. Faes);

(2°) d'autre part, au cours d'une reconstitution dosimétrique de l'accident auprès du même assemblage critique, faite sur un fantôme en Mix-D, il nous a semblé intéressant de recouper les données précédentes par une irradiation *in vitro*.

Des tubes contenant des échantillons de sang normal provenant d'un même individu, ont été introduits en divers points

\* Ce travail a été effectué avec la collaboration technique de M. Bourguignon, J. Dacher, G. Ducatez et O. Foissac.

dans la profondeur de ce fantôme où ils étaient environnés de dosimètres fournissant des valeurs précises de la dose; (3°) enfin, nous avons complété les données de cette irradiation *in vitro*—un mélange de  $\gamma$  + 10% neutrons—en effectuant une irradiation aux  $\gamma$  du  $^{60}\text{Co}$ , aux doses de 400 et 600 R, toujours sur du sang normal du même sujet.

C'est l'ensemble des résultats obtenus sur ces 3 groupes d'analyses chromosomiques que nous voulons exposer ici.

### CONDITIONS TECHNIQUES

#### I. Technique des irradiations

(a) *Irradiation accidentelle.* Les conditions de cette irradiation et la dosimétrie à laquelle elle donna lieu, étant exposées par ailleurs de manière extensive au cours de ce congrès, nous nous bornerons à rappeler ici qu'il s'est agi d'une irradiation totale très hétérogène à des doses étagées entre environ 1000 rads et 300 rads pour le tronc et la tête, avec une dose médiane estimée à 500 rads.

Le sang fut prélevé au 4<sup>e</sup> jour après l'accident.

(b) *Irradiation au  $^{60}\text{Co}$ .* Nous avons exposé 2 groupes de 3 tubes contenant 3 cc de sang normal aux doses de 400 et 600 R avec un débit de dose de 30 R/min.

(c) *Irradiation dans le fantôme* (Fig. 1). Des tubes contenant 5 cc de sang normal ont été disposés de la façon suivante:

- 1 tube au niveau des coupes 12 et 13 exposées à 40 R,
- 1 tube au niveau des coupes 24 et 25 exposées à 85 R,
- 1 tube au niveau des coupes 33 et 34 exposées à 165 R.

En outre, des tubes ont été placés au niveau du membre inférieur, au niveau de la jambe (en profondeur), et au niveau du pied (à sa surface), à des doses respectives de 200 R et 587 R. La durée de l'irradiation ayant été la même pour tous les tubes, soit 150 minutes, le débit de dose a été très faible, et il a varié selon les points d'irradiation de 0,26 R/min. à 4R/min.

#### II. Technique des cultures

Le sang prélevé a été mis en culture immédiatement après, soit le prélèvement, soit l'irradiation expérimentale; dans le cas du fantôme le sang a voyagé, après mise en culture, entre Mol et Paris dans un container isotherme pendant 6 h.

A partir de ces échantillons, nous avons effectué des microcultures selon la technique de Moorhead<sup>(5)</sup> modifiée par Lejeune.<sup>(6)</sup> Pour chaque dose nous avons effectué des cultures de 72 h et 96 h. Le contact avec la colchicine a duré 2 heures.

REMARQUE: Il est certain, et nous en sommes conscients, que le temps de culture de 72 h est un facteur technique critiquable: il n'est pas douteux —et nous en donnerons la preuve dans ce qui va suivre—qu'une partie des métaphases observées ont déjà franchi la première mitose. Cependant, comme notre propos était de nous référer par comparaison à des résultats établis précédemment par les auteurs déjà cités, et qui avaient utilisé des cultures de 72 h, il nous a paru préférable de ne pas nous écarter de ces premières conditions expérimentales.

#### III. Technique d'analyse

Toutes les analyses ont été faites après établissement des caryotypes des cellules sélectionnées—sans tenir compte des anomalies chromosomiques—uniquement sur la netteté des centromères et des extrémités des bras.

Seules n'ont pas été montées en caryotypes les cellules polyploïdes, pour lesquelles on a pris en compte les dicentriques et les anneaux qui s'y trouvaient.

Indépendamment des analyses sur caryotypes, nous avons établi, sur 1000 cellules, le pourcentage des polyploïdies et des endoreduplications sur 2 types de cultures de 72 h et 96 h.

### RÉSULTATS

Tous nos résultats numériques sont donnés dans le tableau 1.

#### I. Comparaison des méthodes

La courbe de relation dose-effet concernant les dicentriques peut être tirée des résultats obtenus respectivement par Bender et Gooch et par Kelly et Brown.

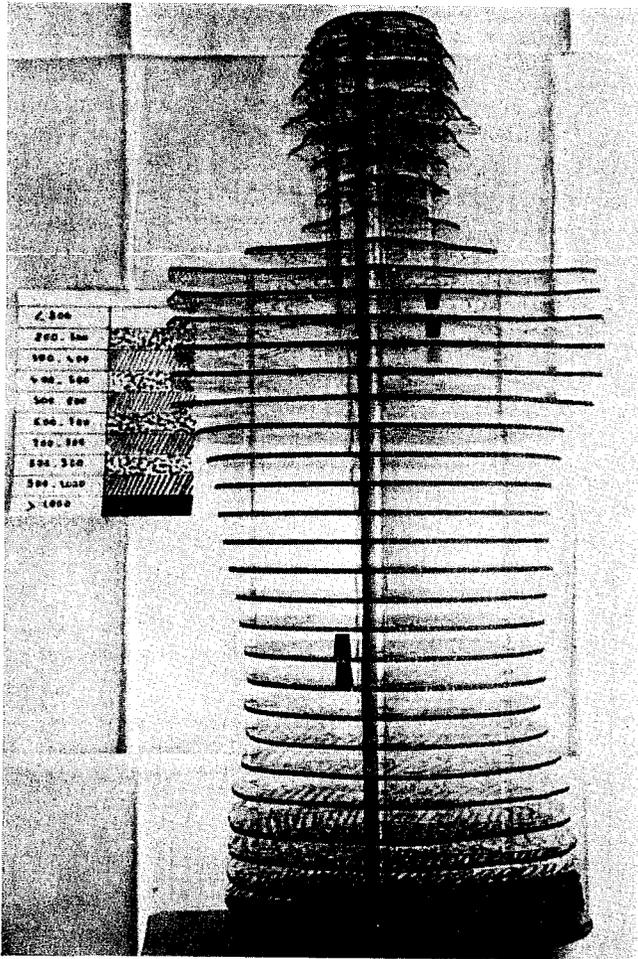


FIG. 1. Répartition des échantillons de sang dans le fantôme au moment de l'irradiation.

Tableau 1. Évolution des différents types d'anomalies chromosomiques en fonction de la dose, après irradiation de sang humain in vitro.

Nombre des Aberrations pour 100 Cellules	DOSE	Gamma + 10% Neutrons					Gamma $^{60}\text{Co}$	
		40	85	165	200	587	400	600 (R)
Dicentriques		1,25	4,5	7,7	12,5	85,0	47,0	85,0
Dicentriques + Anneaux		1,25	4,5	9,2	20,8	97,0	52,7	110,0
Cassures direct <sup>T</sup> observables		7,5	26,0	48,0	67,0	243,0	192,0	308,0
Cassures totales sur cariotypes		15,0	37,0	61,0	83,0	320,0	231,0	348,0
Cellules anormales		11,3	26,6	41,7	50,0	90,0	83,0	100,0
Nombre de cariotypes étudiés pour chaque dose		80	45	65	24	41	70	26

(a) *Culture*. Ces auteurs ont utilisé la macro-technique originale de Moorhead. Nous avons utilisé, pour notre part, une microtechnique dérivée de façon à limiter le volume total des prélèvements—tant sur l'accidenté—que sur l'unique donneur sain dont le sang a été irradié expérimentalement. Le temps de culture a été de 72 heures pour Bender, de 70 à 96 pour Kelly. Nous avons fait des cultures à 72 et 96 heures en deux séries indépendantes.

Kelly ont porté sur des sangs normaux prélevés sur plusieurs individus sains.

Notre expérience n'a utilisé qu'un seul et même donneur pour toutes les doses, dans les deux séries d'irradiation (n,  $\gamma$  et  $^{60}\text{Co}$ ).

—*Débits de dose et rayonnements utilisés*: Les expériences de Bender aux rayons X de 250 keV ont été faites aux débits de 60 R/min et 10 R/min.

Les débits de dose employée par Kelly (rayons X de 200 keV) ont varié de 42 à 48 R/min.

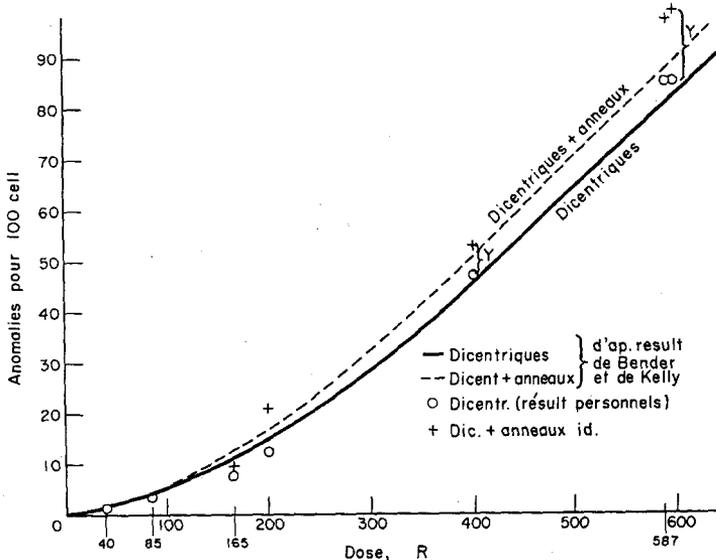


FIG. 2. Évolution du nombre de dicentriques, pour 100 cellules, en fonction de la dose. Analyses chromosomiques Sang Irradié *in vitro*. Comparaison avec les résultats de Bender et de Kelly.

(b) *Analyse chromosomique*. Par ailleurs, les auteurs précédents ont fait leurs évaluations par observation microscopique directe ou sur photographies sans montage de caryotypes.

Pour ces techniques, seules ont été prises en considération, par Bender, les anomalies directement constatables: dicentriques, anneaux et les délétions portant sur les paires les plus caractéristiques (1-5), (13-15), (19-22).

Notre travail a comporté, en plus, l'estimation de toutes les translocations et délétions, estimations rendues possibles sur les caryotypes montés.

(c) *Irradiation*.

—*Sang*: Les expériences de Bender, de

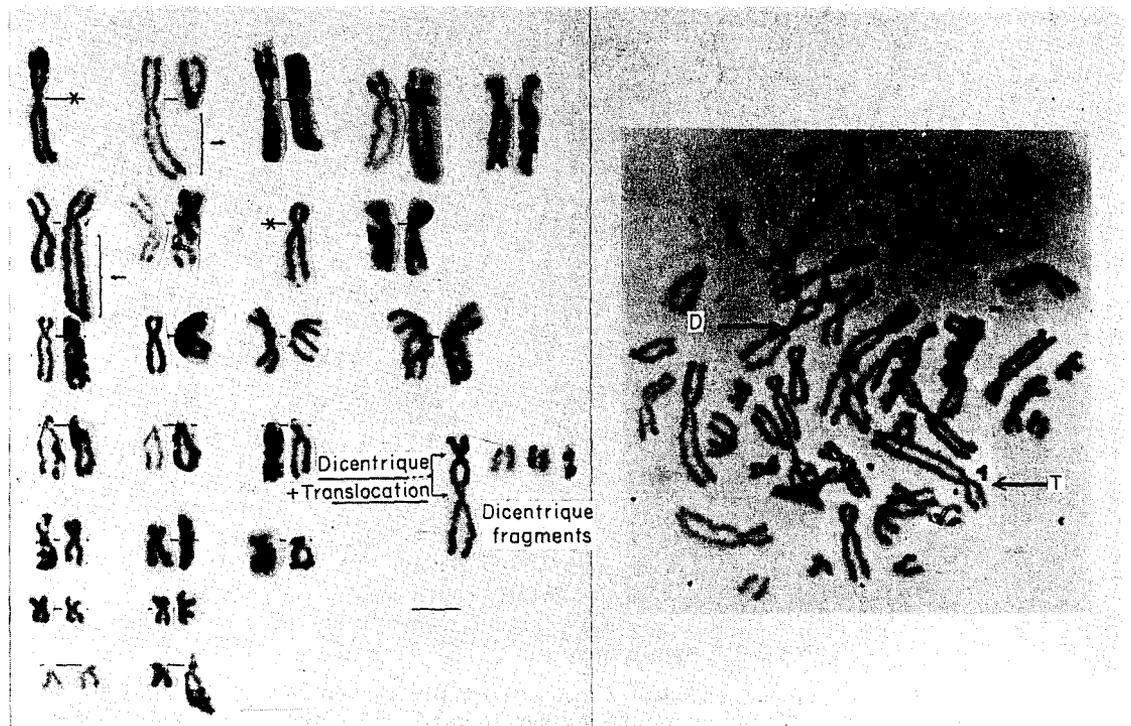
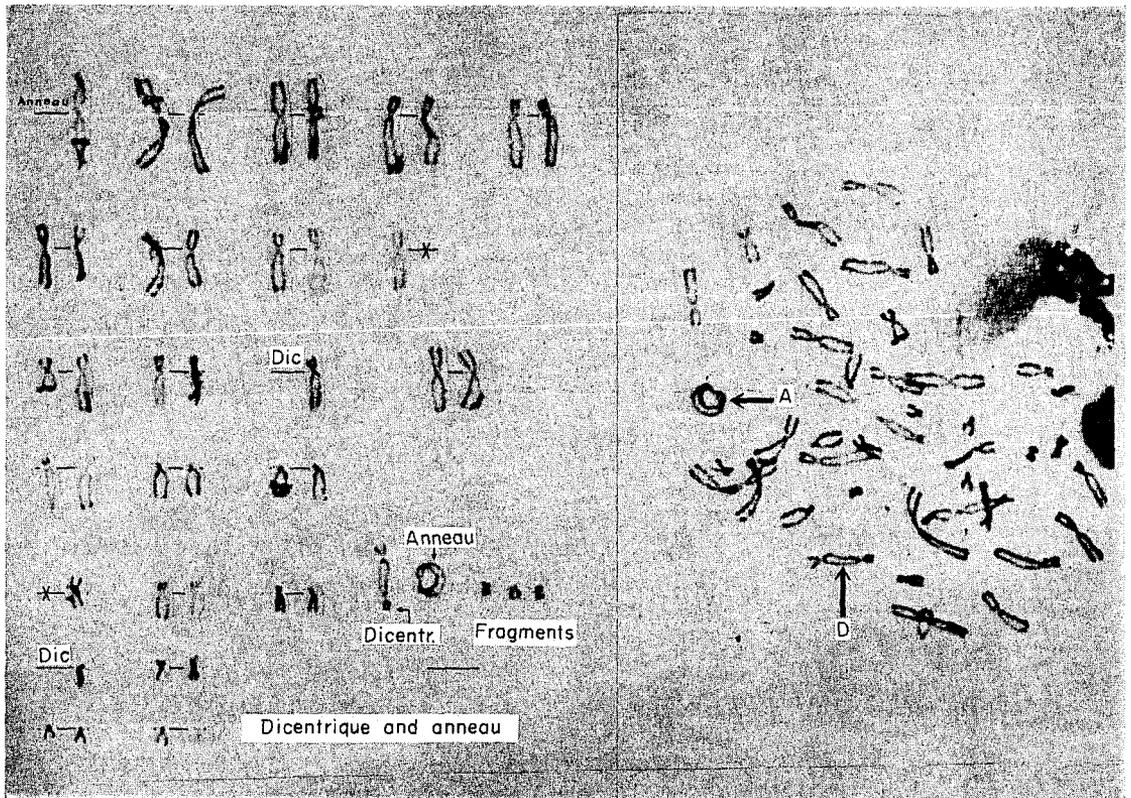
Dans notre expérience au  $^{60}\text{Co}$ , le débit de dose a été de 30 R/min. Dans notre expérience avec le fantôme à Mol, c'est la durée qui a été constante (150 minutes), et les débits de dose ont varié suivant les points entre 0,26 R/min (pour la dose la plus faible 40R) et 4 R/min (pour la plus forte 587 R).

## II. Comparaison des résultats

(a) *Courbe des dicentriques* (Fig. 2). Cette courbe a été tracée en utilisant les points expérimentaux de Bender pour les faibles doses (50-200 R) et ceux de Kelly pour les doses fortes, supérieures à 200 R.

A noter que les points de Bender ont été





Figs. 5, 6. Cellules porteuses d'anomalies multiples après irradiation de sang aux doses de 587 R et 600 R.

établis sur 300 à 500 cellules, tandis que ceux de Kelly ne portent que sur un nombre limité de cellules, surtout aux très fortes doses: 59 à 250, 53 à 300, 86 à 400, 10 à 800, 33 à 1600.

La variance sur ces points est donc plus élevée. Une autre raison de variance est le fait que les résultats globaux ont porté sur des temps de culture variables, entre 3 et 4 jours.

Nos points expérimentaux se trouvent cependant en excellente concordance avec cette courbe. *Pour les faibles doses*, jusqu'à 200 R, nos points sont un peu au-dessous de la courbe. Ceci provient probablement de nos débits de dose très faibles. En effet, si l'on compare le point 200 R avec le point établi par Bender, avec une dose fractionnée de 200 R, on obtient une coïncidence exacte. *Pour les fortes doses*, nos points sont légèrement au-dessus de la courbe. Pour les doses supérieures à 200 R, il semble comme l'a déjà signalé Kelly, que la courbe expérimentale dicentriques + anneaux croisse moins vite que la courbe théorique proposée par Bender selon la formule  $y = 0,52 \cdot 10^{-5} D^2$  ( $y$  (nb de  $D + A$ /cellule)).

Si l'on porte sur ces courbes les résultats obtenus chez l'homme accidenté à Mol, la dose estimée est de 470 R. (Culture de sang prélevé 4 jours après l'accident.)

Il n'a pas été rare d'observer pour les doses très fortes, tant chez l'accidenté qu'*in vitro*, des cellules porteuses de 2 ou 3 dicentriques (Figs. 3, 4) et des cellules porteuses de dicentriques associés avec un anneau ou une translocation (Figs. 5, 6).

(b) *Courbe des "cassures"* (Fig. 7). Il est admis que les déletions et fragments proviennent d'un seul impact sur le chromosome, et représentent des lésions à 1 coup;

que les remaniements chromosomiques (dicentriques, anneaux, translocations) sont dus à 2 impacts et doivent être comptés comme lésions à 2 coups.

L'estimation du nombre des "cassures" doit donc tenir compte du nombre total d'impacts, c'est-à-dire:

(nb de déletions + fragments) + 2 × (nb de remaniements : dicentriques + anneaux + translocations).

Les translocations n'étant pas toujours directement observables microscopiquement ou sur

photographie, il est nécessaire de les dénombrer sur des caryotypes montés. Notre estimation tient compte de ce fait, qui fournit une relation dose-effet plus précise.

Si nous ne décomptons pas les translocations, ni les déletions sur les paires non reconnaissables sans établissement de caryotypes, nous obtenons des résultats qui sont en parfait accord avec ceux de Bender et ceux de Kelly, sauf aux doses les plus fortes (587 et 600 R) où nos résultats sont inférieurs à ceux de Kelly.

Si nous comptons, au contraire, le nombre total des cassures selon notre technique, c'est-à-dire déletions et translocations comprises, nos points dessinent une courbe qui, pour les doses inférieures à 200 R, est une droite régulière, à telle enseigne que nous pourrions nous en servir comme courbe de référence pour ces faibles doses.

Pour les doses inférieures à 200 R, nous trouvons un coefficient de production de cassures/cellule/R, égal à 0,0032; ce coefficient est en parfait accord avec celui trouvé par Bender<sup>(7)</sup> sur des leucocytes humains irradiés au cours de la culture lorsque les cellules sont en phase  $G_2$  du cycle mitotique (chromatides déjà dédoublés). L'estimation du nombre total d'anomalies est alors plus simple puisqu'elle ne nécessite pas l'établissement de caryotypes.

Vers 200 R, cette courbe s'infléchit et sa pente augmente; mais au-delà de 400 R, elle passerait au-dessous de la courbe de Kelly (établie sans caryotypes). Leur point de croisement est autour de 400 R.

Nous ne nous croyons pas autorisés à tracer de courbe passant par nos points expérimentaux. Nous nous bornons ici à une simple comparaison.

Par ailleurs, les résultats comparés des deux expériences d'irradiation ( $\gamma + n$  et  $\gamma$  du  $^{60}\text{Co}$ ) sont sensiblement équivalents; mais rappelons le faible débit de dose dans l'expérience  $\gamma, n$ .

(c) *Courbe des "cellules anormales"* (Fig. 8). Nous prenons ici en considération le nombre des cellules porteuses d'une anomalie chromosomique quel qu'en soit le type, exprimé en pourcentage des cellules examinées.

Ces valeurs sont mises en comparaison avec les résultats établis par De Grouchy.<sup>(8)</sup> Cet auteur a utilisé des rayons X de 200 keV, débit d'exposition de 10-15 R/min, pour

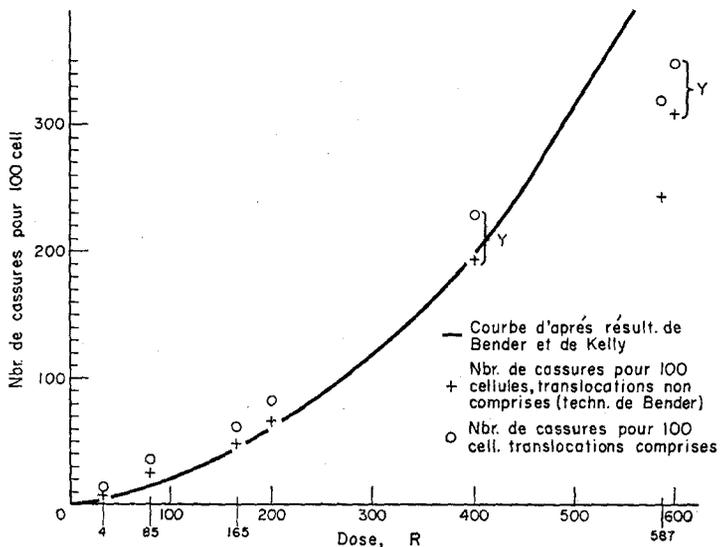


FIG. 7. Evolution du nombre de cassures pour 100 cellules en fonction de la dose.

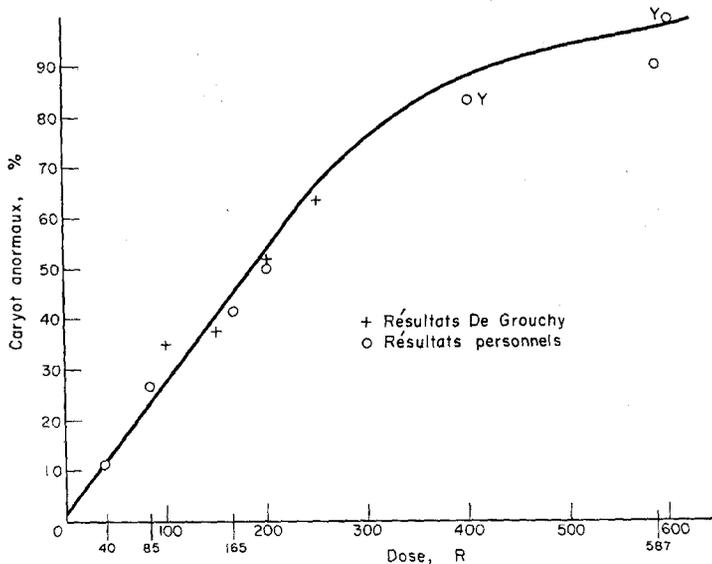


FIG. 8. Evolution du pourcentage de cellules porteuses d'anomalie chromosomique en fonction de la dose.

irradier des cultures de sang venant d'être ensemencées, aux doses de 100 à 300 R. Les résultats portent sur des cultures de 3 jours et 4 jours.

Nous exprimons ici des valeurs obtenues sur cultures de 3 jours uniquement, aux doses déjà indiquées. Nos points sont parfaitement alignés avec la courbe de De Grouchy. Nous obtenons une relation linéaire jusqu'à 250 R.

Pour la dose de 200 R, la fréquence de cellules anormales est de 0,5:  $y = 0,0025 D$ . Bender et Kelly ne fournissant pas de données sur le taux

constation dont on ne peut tirer d'argument dosimétrique. En effet, il existe un certain pourcentage d'hypoploïdies sur des cellules normales (bruit de fond), et la pente de la courbe obtenue est faible donc imprécise.

L'existence d'un bruit de fond implique vraisemblablement l'intervention d'un facteur technique dépendant de la fragilité du cytoplasme cellulaire. Et ceci ne peut être apprécié quantitativement.

2°/Polyplôidies-endoreduplications (tableau 2): Les polyplôidies ont été évaluées sur 1000

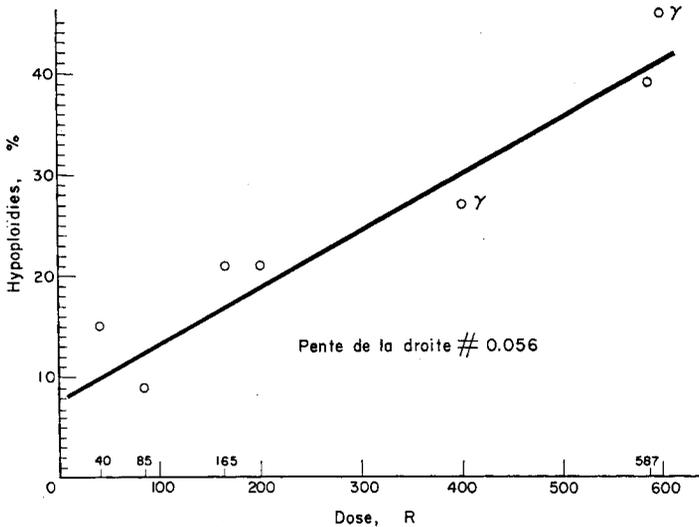


Fig. 9. Évolution du pourcentage de cellules hypoploïdes en fonction de la dose.

de cellules anormales, nous n'avons pas pu faire d'autres comparaisons.

Aux alentours de 300 R, la pente de courbe diminue et tend vers un plateau pour des doses supérieures à celles de nos expériences (600 R).

Ce point de changement de pente (300 R) équivaut approximativement à "1 coup par cellule" estimé sur la courbe des cassures de la figure 7 précédente.

#### (d) Anomalies modales

1°/Hypoploïdies (Fig. 9): Les hypoploïdies ont été évaluées pour 100 cellules. Nous observons une augmentation régulière avec la dose, selon une loi quasi-linéaire. Ceci est une simple

cellules, au cours d'un travail complètement indépendant de l'établissement des cariotypes qui était la base du travail précédent. On a établi en même temps, à cette occasion, le taux des endoreduplications. C'est un type particulier de polyplôidies dans lequel les chromosomes conjoints sont spontanément appariés.

Le taux des polyplôidies s'élève avec la dose sur les deux types de culture, comme le montre le tableau 2.

Cette augmentation linéaire jusqu'à 400 R est assez régulière. Les points obtenus à 600 R avec les  $\gamma$  du  $^{60}\text{Co}$  sont également alignés sur cette courbe. Nous avons toutefois obtenu un point extrêmement éloigné pour la dose de

587 R, n, aussi bien sur les cultures de 3 jours que sur celles de 4 jours.

Nous ne formulons aucune conclusion sur cette divergence (EBR des neutrons? Influence du long séjour des cellules dans des tubes en polystyrène précédant leur mise en culture: 8 heures environ avant et durant l'irradiation?).

*Du point de vue cytologique*, la grande majorité des cellules polyploïdes sont 4 n au 4ème jour. On observe également des cellules 3 n à 10 n (tableau 3).

Les cultures de 3 jours ne montrent pratiquement que des polyploïdies 3 n et 4 n. On en observe même aux doses faibles et dans le témoin.

Les *endoreduplications* au 3ème jour n'apparaissent pas avant la dose de 400 R. Par contre,

sur les cultures de 4 jours, elles apparaissent à partir de 100 R environ (85-112).

*Reduplication des "anomalies par remaniement"*: dans les cellules tétraploïdes prises en compte dans l'établissement des caryotypes, aux doses de 585 R et 600 R, sur des cultures du 3ème jour, nous avons observé des reduplications portant sur les "anomalies par remaniement" (dicentriques). Ces dicentriques allant par paire, ont naturellement été comptés pour 2 coups seulement et non 4 coups dans l'estimation des cassures et des dicentriques (Figs. 10, 11).

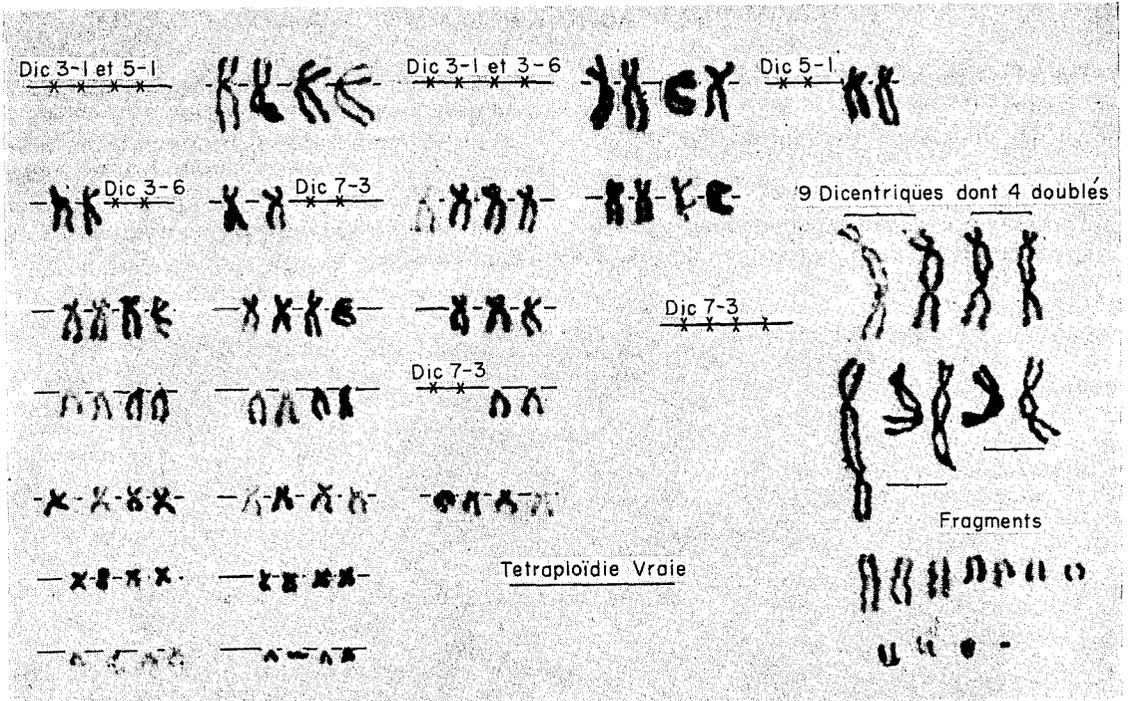
Cette constatation évoque avec force l'intervention d'une seconde mitose dans de telles cellules. Néanmoins, leur pourcentage est très faible (4 sur 41 = 10% pour 585 R; 1 sur 25 = 4% pour 600 R).

Tableau 2 Évolution de la proportion des cellules polyploïdes en fonction de la dose.

Irr. $\gamma$ , n Dose (R)	Polyploïdies pour 1000 cellules			
	Cultures de 3 jours		Cultures de 4 jours	
	Nombre total	Endoreduplication	Nombre total	Endoreduplication
Témoin établi (sur 2000 cell.)	1	0	—	—
40	2	0	8	0
85	6	0	12	1
112	—	—	17	1
165	3	0	14	4
200	37	0	32	3
587	188	5	226	46
Irr. $\gamma^{60}\text{Co}$ Dose (R)				
400	45	5	58	12
600	53	1	90	10

Tableau 3. Répartition des polyploïdies dans les cultures de 4 jours, provenant de sang irradié aux différentes doses.

Polyploïdies	3 n	4 n	5 n	6 n	7 n	8 n	9 n	10 n
Cultures de 4 jours	9	103	10	8	3	3	1	1



Figs. 10, 11. Tétraploïdies avec duplication d'anomalies.

Dans les cultures de 4 jours, cette proportion est beaucoup plus forte, et par ailleurs on observe des anomalies trisomiques (Fig. 12).

#### CONCLUSIONS

1°. Les pourcentages des anomalies chromosomiques observés, dans notre travail, sur des

tage la valeur des analyses chromosomiques en tant que dosimétrie biologique.

2°. L'estimation dosimétrique pour les doses fortes, supérieures à 200-300 R, peut être faite à partir de courbes de dicentriques + anneaux, ce qui peut être établi par observation directe au microscope.

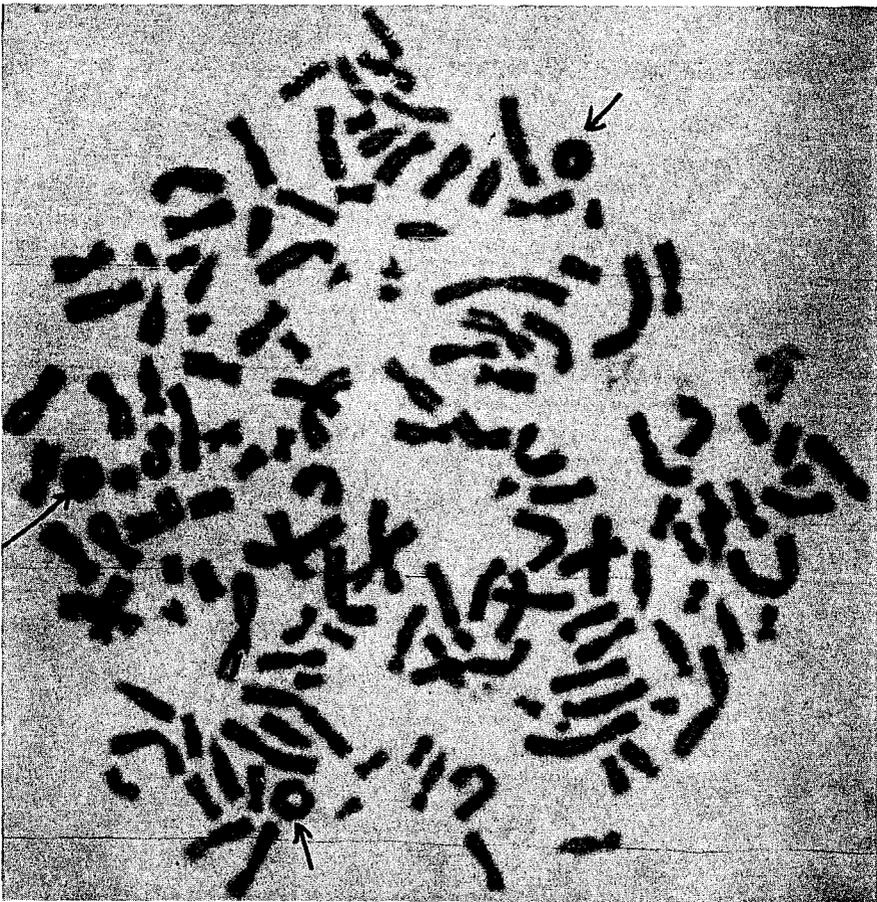


Fig. 12. Cellule hexaploïde porteuse d'anomalie triple.

cultures de 72 heures, sont en accord avec les résultats établis, par ailleurs, par d'autres auteurs. Les différences dans les conditions expérimentales (débit de dose, technique de culture, modes d'observation et d'expression des résultats) n'affectent pas, semble-t-il, la concordance des chiffres observés.

Cette constatation permet d'affirmer davan-

Cependant, il nous semble que l'établissement de relation dose-effet pour les doses inférieures à 200 R nécessite l'utilisation d'une technique plus raffinée, qui doit avoir recours à l'établissement des caryotypes complets, afin de tenir compte de toutes les anomalies.

3°. Bien qu'il puisse se trouver des cellules en seconde mitose, dans des cultures de 72 heures,

il nous est apparu que le pourcentage de ces secondes mitoses est relativement faible (moins de 10%). A ces doses, l'erreur entre dans le cadre des variances biologiques.

### RÉFÉRENCES

1. M. A. BENDER et P. C. GOOCH. Types and rates of X-ray induced chromosome aberrations in human blood irradiated *in vitro*, *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)* **48**, 522-532 (1962).
2. P. C. GOOCH, M. L. RANDOLPH et M. A. BENDER. Chromosome aberrations induced in human somatic cells by neutron, AIEA, Biological effects of neutron and proton irradiation, (Upton) 1963, October 7-11, Vienna AIEA (1964), **1**, 325-342.
3. S. KELLY et C. D. BROWN. Chromosome aberrations as a biological dosimeter, *Am. J. Publ. Health*, **55**, 9, 1419-1429 (1965).
4. H. JAMMET, R. GONGORA, R. LE GÔ et G. MARBLÉ. Observation clinique et traitement d'un cas d'irradiation globale accidentelle—DS: *Radiation Protection*, IRPA Congress, Rome, 5-10 September 1966.
5. P. S. MOORHEAD, P. C. NOWELL, W. J. MELLMAN, D. M. BATIPPS et D. A. HUNGERFORD. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood, *Exp. Cell. Res.* **20**, 613-616 (1960).
6. J. LEJEUNE. Techniques d'étude des chromosomes humains, Microtechnique, ds. R. Turpin et J. Lejeune, *Les chromosomes humains*, Ed. Gauthier Villars (1965), 26-29.
7. M. A. BENDER et P. C. GOOCH. Chromatid type aberrations induced by X-rays in human leukocyte cultures, *Cytogenetics*, **2**, 2/3, 107-116 (1963).
8. J. DE GROUCHY, G. VALLÉE et C. NAVA. Analyse chromosomique de cellules cancéreuses et de cellules médullaires et sanguines irradiées *in vitro*, *Annales de Génétique*, **6**, 1, 9-29 (1963).