

ANNALEN  
VAN  
DE BELGISCHE VERENIGING  
VOOR  
STRALINGSBESCHERMING

---

---

VOL. 18, N° 2

2e trim. 1993

Driemaandelijkse periodiek  
1050 Brussel 5

Périodique trimestriel  
1050 Bruxelles 5

---

---

ANNALES  
DE  
L'ASSOCIATION BELGE  
DE  
RADIOPROTECTION

Hoofdredacteur

Dr M.H. Faes  
Fazantendreef, 13  
B- 3140 Keerbergen

Rédacteur en chef

Redactiesecretariaat

Mme Cl. Stiévenart  
Av. Armand Huysmans 206, bte 10  
B- 1050 Bruxelles - Brussel

Secrétaire de Rédaction

Publikatie van teksten in de Annalen gebeurt onder volledige verantwoordelijkheid van de auteurs.

Nadruk, zelfs gedeeltelijk uit deze teksten, mag enkel met schriftelijke toestemming van de auteurs en van de Redactie.

Les textes publiés dans les Annales le sont sous l'entière responsabilité des auteurs.

Toute reproduction, même partielle, ne se fera qu'avec l'autorisation écrite des auteurs et de la Rédaction.

## SOMMAIRE

Ce numéro contient les textes des exposés présentés le 19 mars 1993 lors d'une réunion organisée par l'A.B.R. à Bruxelles consacrée à:

### RADIOSENSIBILITE DE L'EMBRYON

- J. MAISIN  
Introduction 109 - 110
  
- P. SMEESTERS  
L'être humain avant la naissance: du risque radiologique à la norme 111 - 127
  
- P. JACQUET  
Conséquences possibles pour l'embryon d'une irradiation en période préimplantatoire 129 - 138
  
- W.U. MULLER  
Combined effect of radiation and chemicals on preimplantation embryos 139 - 150
  
- H. REINERS  
Neurologie du retard mental sévère causé par une irradiation prénatale 151 - 157
  
- J. MAISIN  
Conclusions 159 - 160

## INHOUD

Dit nummer bevat de teksten van de uiteenzettingen gedaan op 19 maart 1993 ter gelegenheid van een vergadering van de B.V.S. in Brussel gewijd aan:

### STRALINGSGEVOELIGHEID VAN HET EMBRYO VÓÓR DE INPLANTING

**RADIOSENSIBILITE DE L'EMBRYON  
INTRODUCTION****J.MAISIN**

Texte de l'exposé du 19 mars 1993

Chers collègues,

L'Association Belge de Radioprotection a eu une excellente initiative d'organiser la réunion d'aujourd'hui sur la radiosensibilité de l'embryon. L'embryon a toujours été reconnu comme étant particulièrement radiosensible. C'est pourquoi la femme enceinte au travail est soumise à des normes très strictes.

La réunion d'aujourd'hui vient à son heure car ces dernières années des observations intéressantes ont été publiées sur la radiosensibilité de l'embryon, embryon qui est peut-être encore plus radiosensible que ce que l'on pensait. Je ne citerai que deux exemples:

De nombreux chercheurs étaient persuadés que l'irradiation d'un embryon avant son implantation dans la paroi utérine, c'est-à-dire lorsqu'il n'est composé que par un petit nombre de cellules non spécialisées avait comme seule conséquence la non-implantation de l'embryon et sa mort subséquente. Aujourd'hui, il semblerait qu'il n'en soit pas ainsi et que certains de ces embryons pourraient survivre et présenter des malformations.

Le deuxième exemple est l'effet des rayonnements ionisants sur le cerveau humain en voie de développement prénatal. Parmi les survivants des bombardements atomiques d'Hiroshima et de Nagasaki qui ont subi une exposition prénatale, on a constaté une incidence plus élevée d'oligophrénie profonde. Ce sont les embryons qui ont été irradiés à l'âge de 8 à 15 semaines, c'est-à-dire lors de la plus grande prolifération des neurones et leur migration vers le cortex cérébral qui sont les plus radiosensibles. Je pourrais encore vous citer bien d'autres exemples mais j'espère que les deux exemples retenus vous auront montré le grand intérêt de cette session sur la radiosensibilité de l'embryon.

Je passe sans tarder la parole au premier conférencier de cet après-midi, le Dr Smeesters du SPRI qui nous parlera de l'être humain avant la naissance: du risque radiologique à la norme.

**L'ETRE HUMAIN AVANT LA NAISSANCE :  
DU RISQUE RADIOLOGIQUE A LA NORME.**

**SMEESTERS P.**

**Service de protection contre les radiations ionisantes,  
Ministère de la Santé publique et de l'Environnement,  
Bruxelles**

Texte de l'exposé du 19 mars 1993

**Résumé :**

Tout en passant en revue les débats scientifiques actuels relatifs à l'évaluation des risques liés à l'irradiation in utero et en décrivant l'évolution des recommandations internationales et des projets de réglementation en matière de protection de l'enfant à naître, l'exposé s'attache à mettre en évidence l'interférence omniprésente de questions ou d'enjeux d'ordres parfois épistémologique, souvent culturel, presque toujours éthique.

## 1. L'APPROCHE SUIVIE

L'exposé s'intitule : "du risque radiologique à la norme : l'être humain avant la naissance". Il aurait pu s'appeler : "risques de l'irradiation in utero" et tenter de broser une synthèse des connaissances, à la lumière des publications de la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) ou du Comité scientifique des Nations Unies (UNSCEAR) ou d'autres travaux scientifiques réputés.

Il aurait pu avoir pour titre : "évolution des normes de protection radiologique des embryons et foetus" et faire le point sur les travaux réglementaires aux plans belge, européen et international. Mais les normes doivent s'appuyer sur un état des connaissances et, inversement, la recherche doit au moins en partie s'articuler avec une demande opérationnelle et surtout, la réalité ne se laisse pas enfermer dans le paradigme d'une seule discipline : le problème qui nous occupe nous interpelle tant sur la qualité de notre approche scientifique que sur la correction des conclusions que nous en tirons. Et derrière le mot même de "correction" employé ici, apparaissent déjà en filigrane la notion de "bien", les enjeux éthiques, la pierre d'achoppement que constituent la hiérarchie et les conflits de valeurs.

C'est pour mettre cela en évidence que les mots "utérus" et même "foetus" ou "embryon" ont été écartés dans le titre de cet exposé, au profit des termes "l'être humain avant la naissance". Qu'on le veuille ou non, nous touchons là à un thème qui, pour beaucoup (et pour moi-même), relève d'un autre domaine du savoir, celui qui touche au sacré ou, si l'on veut, aux questions fondamentales de l'origine et du sens de la vie elle-même. Pour notre part, nous tâcherons de ne pas éluder ces questions et de nous mouvoir dans cette problématique avec, pour reprendre un mot célèbre, "les pieds sur terre et la tête dans les étoiles".

C'est ainsi que, si nous brancherons les projecteurs, avec acuité, sur les débats scientifiques puis, brièvement, sur les normes en gestation, nous en profiterons pour mettre en lumière quelques enjeux "d'un autre ordre".

## 2. DES CONNAISSANCES SCIENTIFIQUES EN MOUVEMENT : UNE GESTION DIFFICILE.

D'emblée, une mise au point : que les connaissances scientifiques évoluent, c'est une lapalissade. Le problème n'est pas là. La difficulté, c'est que nous devons arriver à évoluer - et à réévaluer - en même temps et cela, ce n'est pas gagné d'avance ...

Si nous faisons un sondage rapide dans le monde médical intéressé aux radiations ionisantes ou chez les divers experts du domaine de la radioprotection, et que nous leur demandions de résumer en quelques lignes le risque radiologique avant la naissance, voilà probablement ce que nous entendrions dans l'ensemble, avec bien sûr d'inévitables variantes : pas de danger dans les stades très précoces, car l'irradiation a un effet "tout ou rien", "tout" signifiant ici la mort ; peu de danger dans les premières semaines, vu le seuil élevé, de l'ordre de 20 cGy, pour la tératogenèse ; un problème sérieux au moment de la formation des structures cérébrales , mais avec des échos scientifiques récents tout à fait rassurants dans le domaine des doses de l'ordre de quelques cGy ou moins ; un risque de cancer radioinduit, même aux doses du domaine du radiodiagnostic, mais ce risque est relativisé par les nombreux débats et contestations que sa mise en évidence a suscités et est dès lors perçu comme douteux ; pour le reste, rien de très sérieux.

Toutes ces choses que nous entendrions ne sont pas toujours fausses, loin de là, mais elles ne sont pas toujours vraies non plus : elles manquent surtout de nuances et de prudence. Elles sont comme le résultat d'une décantation, processus dans lequel notre connaissance tend naturellement à se "lisser", à s'élaguer, à se débarrasser d'encombrantes nuances et attend pour évoluer des signaux redondants et préalablement amplifiés par d'autres. Sans prétendre à l'exhaustivité, nous tâcherons d'ajouter quelques branches à notre "arbre de connaissance".

### 3. LES PREMIERES SEMAINES DE LA GROSSESSE.

Les premières semaines de grossesse, autrefois objet de toutes les sollicitudes, sont aujourd'hui considérées par beaucoup comme peu inquiétantes sur le plan de la radioprotection. Cette impression, avec son corollaire immédiat de démotivation en matière de mesures de protection, est-elle fondée sur des bases valables ?

Pour ce qui est de la phase toute précoce de préimplantation, la CIPR, dans sa publication 60, décrit uniquement la possibilité d'effets létaux, et ce déjà pour une dose de 10 cGy ; elle se base d'ailleurs sur les données de l'UNSCEAR (1986 Report), pour qui des effets tératologiques radioinduits n'ont pas été décrits.

Un document rédigé par un groupe de consultants pour le compte de l'AEN et relatif aux bases biologiques pour le contrôle de l'irradiation prénatale confirme ces données, tout en mentionnant une exception possible pour certaines souches animales avec une labilité génétique particulière et en signalant que le seuil d'inactivation in vitro des blastomères de souris peut descendre à 5 cGy (Rx ou Gamma) et qu'au bilan on ne peut exclure un seuil assez bas chez l'être humain pour les mortalités embryonnaires précoces. Les auteurs suggèrent que ces faits sont cependant de peu de gravité vu le taux très élevé d'avortements spontanés à ce stade. Qu'on me permette de souligner au passage le fait qu'on ne peut éviter ici la question de la justification éthique d'une telle prise de position.

Par ailleurs, est-il vraiment exact que l'on puisse affirmer, aujourd'hui, le caractère tout ou rien des effets au stade de préimplantation et que l'on puisse exclure la possibilité d'effets tératogènes à connotation stochastique. Nous écouterons avec intérêt ce que les orateurs suivants, spécialisés dans cette question, ont à nous dire à ce propos.

Je me contenterai de me référer ici aux publications disponibles sur la base desquelles il me paraît qu'une salubre prudence aurait déjà dû voir le jour.

Remarquons que c'est dans ce contexte actuel que les mesures de protection pour les femmes en état de procréer disparaissent des recommandations internationales et des règlements en préparation.

Pendant la phase suivante de la grossesse, celle de l'organogenèse, la CIPR 60 relève le risque de malformations radioinduites et signale que des seuils de dose ont été observés pour ces effets chez le rat et la souris et que des seuils similaires pourraient exister chez l'homme.

Pour la valeur chiffrée de ces seuils, la CIPR 60 renvoie à UNSCEAR 1986 (table 15, annexe C) où la valeur minimale pour les grosses malformations reconnaissables est estimée à 25 cGy.

Il est intéressant de noter que la question du risque de malformation radioinduite n'est même pas mentionnée dans un document de synthèse sur les effets radioinduits publié par le NRPB en 1988 et qu'elle est à peine effleurée dans le rapport publié en 1990 par le Comité BEIR de l'Académie des Sciences des Etats-Unis (BEIR V).

Pourtant, la lecture attentive du rapport AEN 1988 n'incite pas à autant d'optimisme. Les auteurs distinguent ainsi, au sein de l'organogenèse, les périodes d'induction et de différenciation. Pendant la période d'induction, la capacité embryonnaire de régénération et de réorganisation est assez grande mais les lésions radioinduites sont sérieuses (anencéphalie, exencéphalie, ...). Le pronostic en terme de malformation à la naissance dépend du degré de sélection intrautérine, c'est-à-dire de la tendance à avorter, à éliminer les embryons malformés. Or, les auteurs citent d'une part un seuil de dose pour les effets radioinduits pendant cette période d'induction de 5 cGy seulement (contre 10 à 25 cGy pour la période de différenciation) et d'autre part,

ils relèvent que le degré de sélection intrautérine peut varier selon les populations étudiées. D'une façon plus générale, le rapport souligne le rôle que pourraient jouer la variabilité biologique des populations et le caractère insuffisant des données, notamment humaines, relatives aux courbes dose-réponse dans le domaine de la tératogénèse.

Ici encore, le simple fait de retourner aux sources, de renuancer, de "rebrancher" les connaissances, permet d'avoir une idée plus juste du risque qui, ici, même s'il n'est plus à la mode, est moins négligeable qu'on ne tend à le croire actuellement, ce qui justifie, à mon sens, le maintien de certaines précautions, notamment en radiologie, où les doses ne sont pas toujours si éloignées de la valeur de 5 cGy.

#### 4. LES EFFETS SUR LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL EN DEVELOPPEMENT.

D'abord un bref rappel des faits, désormais bien connus.

Parmi les 1.544 individus inclus dans l'échantillon des survivants de Hiroshima et Nagasaki ayant subi une irradiation prénatale, on a observé 30 cas de retard mental sévère, c'est-à-dire d'incapacité de réaliser des calculs simples, de tenir une conversation simple et de prendre soin d'eux-mêmes. Le risque n'est pas apparent avant 8 semaines (entendez : 8 semaines après la conception), soit parce qu'il n'existe pas, soit parce que les lésions radioinduites n'autorisent pas la survie jusqu'à l'âge où le retard mental peut s'observer. Le risque est maximal de la 8ème à la 15ème semaine et peut être correctement décrit par une courbe dose-réponse linéaire ou linéaire - quadratique avec un coefficient de  $40 \% \text{ Gy}^{-1}$  ; de la 16ème à la 25ème semaine, le risque diminue ( $10 \% \text{ Gy}^{-1}$ ) et un seuil semble exister (de l'ordre de 50 cGy).

Selon la CIPR 60, l'utilisation de la nouvelle dosimétrie (DS 86) et l'élimination de cas de retard mental dont la radioinduction est improbable (mongolisme, suites d'encéphalite, ...) a permis de "démontrer" que la relation dose-effet avec seuil (de l'ordre de 12 à 20 cGy) est plus probable que la relation linéaire sans seuil. Les auteurs rajoutent que cette dernière relation était "a priori" (en italique dans le texte) improbable vu "la nature supposée déterministe du phénomène considéré". Pour rappel, le mécanisme présumé est un décalage radioinduit uniforme de la courbe de quotient intellectuel, décalage relié à la dose et évalué à 30 points QI par Sv. Les observations relatives à l'apparition de retard mental et à la diminution du QI sont de plus mathématiquement compatibles.

L'avis du Comité BEIR (BEIR V), basé sur les mêmes données, est moins catégorique. Sans exclure la possibilité d'un seuil de dose pour le retard mental, le Comité relève que, d'une part, sur le plan statistique, l'utilisation du modèle linéaire avec seuil aboutit à prédire un effet des hautes doses plus important que celui qui est réellement observé et que, d'autre part, la sélection clinique arbitraire d'un niveau de retard mental sévère dichotomise la distribution des niveaux d'intelligence et pourrait conduire à un seuil apparent pour cet effet.

Dans une publication récente de la CIPR (1991) consacrée aux risques associés aux radiations ionisantes, SCHULL tend à relativiser également de façon nette les affirmations contenues dans la CIPR 60. Ses conclusions méritent d'être citées in extenso : "Vu les incertitudes concernant la véritable relation dose-effet, c'est une affaire de jugement que de savoir si les recommandations devraient être basées sur l'hypothèse qu'un seuil existe ou sur l'hypothèse inverse. Ni les données épidémiologiques, ni les données expérimentales, ni les considérations théoriques radiobiologiques n'apportent un argument décisif en faveur de l'une ou de l'autre hypothèse".

Selon SCHULL, les données observées peuvent être décrites aussi bien par un modèle linéaire que par un modèle linéaire - quadratique mais l'existence d'un seuil, quoique possible dans l'hypothèse linéaire - quadratique, est contredite, dans le cas du modèle linéaire, par les observations faites dans le domaine des hautes doses : tout fœtus exposé à plus d'1 Gy devrait souffrir de retard mental sévère.

SCHULL relève également un certain nombre de données radiobiologiques susceptibles d'inciter à la prudence. Ainsi, dans une étude récente sur des fœtus de rongeurs, l'apparition de cellules pycnotiques dans les neurones de la zone ventriculaire du télencéphale s'est avérée suivre une courbe dose-effet linéaire pour la gamme des doses inférieures à 24 cGy. Des études de résonance magnétique nucléaire chez des individus retardés suite à une exposition prénatale révèlent, tantôt l'existence de matière grise ectopique bilatérale, traduisant sans doute un déficit dans la migration des neurones (irradiation à la 8ème semaine), tantôt des perturbations de l'architecture cérébrale (irradiation vers 12 - 13 semaines).

Les événements biologiques impliqués ne se résument sans doute pas à la mort cellulaire, comme dans les mécanismes déterministes classiques, mais incluent des défauts de migration ou des erreurs de synaptogenèse.

Le même auteur évoque les travaux de RAKIC et d'autres qui laissent entendre que le cortex pourrait être une collection de colonnes de développement originaires chacune d'une unité de prolifération spécifique. Il en conclut, et ceci est essentiel, que, si de telles hypothèses de développement cérébral sont correctes, la perte de quelques cellules, voire d'une seule cellule, pourrait aboutir à compromettre ou annuler des fonctions cérébrales spécifiques.

Tout ceci soulève selon moi une question de nature épistémologique : les conclusions tirées par certains au départ des données japonaises ne reposent-elles pas sur un énoncé de base fautif, à savoir que les mécanismes radioinduits sont soit stochastiques, soit déterministes et que, dans ce dernier cas les effets radioinduits sont directement proportionnels au nombre de cellules inactivées. La réalité n'est-elle pas parfois plus complexe avec peut-être ici un mélange d'effets de type déterministe, basés sur la "quantité" de cellules touchées et d'effets d'apparence aléatoire, basés sur la "qualité" de la cellule atteinte ou du mécanisme perturbé. Pour imaginer, ce serait un peu comme l'effet du grain de sable dans un mécanisme fin d'horlogerie.

#### 5. INDUCTION DE CANCER.

L'association entre l'irradiation in utero et la probabilité de développer une leucémie ou un cancer, observée depuis longtemps dans le domaine des expositions diagnostiques médicales, était en 1986 considérée comme fermement établie, mais à la même époque l'incohérence avec les données japonaises (et animales) laissait planer des doutes sur la relation causale entre les deux (UNSCEAR 1986).

De fait, les controverses à ce propos ont longtemps agité les milieux scientifiques.

Tant le Comité BEIR (BEIR V) que la CIPR en 1990 (CIPR 60) disposaient de données nouvelles en provenance du Japon relatives aux individus ayant subi une exposition prénatale à Hiroshima et Nagasaki. Ces données paraissent confirmer la radioinduction de cancers tant à court terme (cancers de l'enfance) qu'à long terme. Le risque à court terme est compatible avec l'estimation de BITHELL et STILLER résultant de l'Oxford Survey ( $\pm 2 \text{ à } 3 \cdot 10^{-2} \cdot \text{Gy}^{-1}$ ) et le risque à long terme paraît plus important pour les irradiations prénatales que pour celles qui ont lieu après la naissance .

La CIPR 60 estime que la susceptibilité spéciale des fœtus à la radioinduction de cancers apparaissant dans l'enfance doit être "considérée comme réelle même pour des doses très faibles". La CIPR cite, sans prendre position, deux estimations pour le facteur de risque de cancer mortel de l'enfance radioinduit suite aux expositions prénatales : celle de la NAS, à savoir 2,8 % par Sv et celle, nettement plus élevée, de GILMAN, 13 % par Sv.

#### 6. LES NORMES ET LEUR EVOLUTION.

La réglementation belge actuelle stipule qu'aucune femme enceinte, à partir de la déclaration de grossesse, ne peut être affectée à un poste de travail qui ferait d'elle une personne professionnellement exposée, c'est-à-dire en pratique à un poste où elle risque d'encourir une dose supérieure aux limites de dose pour les personnes du public. De facto, l'enfant qu'elle porte est protégé au même niveau que les membres du public. Par ailleurs, une obligation d'étalement assez stricte des doses dans le temps a pour objectif de protéger les embryons méconnus portés par les travailleuses en état de procréer.

Ces dispositions sont plus sévères que les exigences de la directive Euratom du 15/07/1980 sur les normes de base en radioprotection, pour qui l'enfant porté peut recevoir jusqu'à 10 mSv entre la déclaration de grossesse et le terme de celle-ci et pour qui l'étalement des doses exigé pour les femmes en état de procréer est moins important.

Notons qu'un arrêt récent de la Cour de Justice européenne dans un litige opposant la Commission des Communautés européennes au Royaume de Belgique a admis le principe de limites de dose nationales plus sévères que celles exigées par les directives européennes, ceci devant être considéré, selon la Cour, comme une conséquence logique des finalités de la directive elle-même et du principe d'optimisation de la protection. Pour la Cour de Justice, les limites de dose figurant dans la directive doivent être entendues comme un "niveau minimum de protection".

Dans les nouvelles recommandations de la CIPR (CIPR 60), les chapitres consacrés aux données biologiques relatives à l'irradiation in utero pèchent parfois, à mon sens, - nous l'avons vu - par un manque de prudence et par une tendance à tirer des conclusions trop catégoriques. Je cite : "il semble à présent clair que des effets déterministes chez l'enfant né vivant, y compris le retard mental sévère, ne se produiront pas si l'exposition de la mère n'excède pas les limites de dose actuellement recommandées pour l'exposition professionnelle, quelle que soit la distribution de l'exposition dans le temps".

Néanmoins, - et les débats qu'a suscités la diffusion du projet de recommandations n'y sont peut-être pas étrangers - les recommandations elles-mêmes, même si elles sont parfois un peu incohérentes, on choisi la voie d'une relative prudence.

Je cite à nouveau : "les méthodes de protection au travail des femmes en état de procréer devraient procurer un niveau de protection pour tout enfant conçu qui serait largement comparable à celui offert aux membres du public". Curieusement, la Commission poursuit en estimant que tel sera le cas si on applique le système de protection qu'elle propose, y compris les limites de dose pour l'exposition professionnelle ! Elle ne recommande donc pas de limite de dose spéciale pour les femmes en état de procréer.

Pour ce qui est des femmes enceintes (dès la déclaration de grossesse), la Commission recommande d'appliquer une limite de dose supplémentaire de 2 mSv jusqu'à la naissance, à la surface de l'abdomen de la femme, et de limiter les incorporations de radionucléides à environ 1/20 de l'ALI. Elle souhaite insister sur le fait que ces limites devraient "généralement" pouvoir être respectées sans trop de difficultés - et notamment sans menacer l'emploi de la femme - si des contraintes de dose liées à la source sont correctement mises en place et s'il n'y a pas de risque d'exposition accidentelle. A charge pour les autorités nationales de s'en assurer. Notons que la CIPR ne recommande pas explicitement que les limites de dose pour les enfants à naître soient identiques à celles pour les membres du public.

En ce qui concerne les expositions médicales, si la CIPR maintient le conseil d'éviter - sauf indications cliniques majeures - les examens diagnostiques ou les thérapies susceptibles de causer des expositions abdominales chez les femmes enceintes ou susceptibles de l'être, elle écarte les classiques conseils de prudence relatifs à la seconde phase du cycle menstruel, affirmant l'absence de risque d'effets déterministes ou stochastiques pour l'enfant "né vivant". Ce qui sous-entend que la mortalité embryonnaire précoce radioinduite peut être négligée ... .

Dans le projet de révision de la directive "normes de base" préparé par le groupe d'experts de l'article 31 du Traité Euratom et adopté par la Commission des Communautés européennes, les dispositions suivantes ont été prévues : "Dès qu'une grossesse a été déclarée à la hiérarchie, le fœtus est protégé dans toute la mesure du possible comme s'il s'agissait d'une personne du public. L'exposition de la femme enceinte dans le cadre de son emploi est la plus faible qu'il est raisonnablement possible d'obtenir et les conditions de son travail sont telles que la dose équivalente au fœtus ne dépassera vraisemblablement pas 1 mSv pendant le reste de la grossesse".

On peut constater une volonté beaucoup plus marquée que chez la CIPR d'affirmer explicitement le parallélisme entre la protection de l'enfant à naître et celle des membres du public, avec toutefois une souplesse, traduite par des mots comme "vraisemblablement" ou "dans toute la mesure du possible", souplesse justifiée par les difficultés actuelles de la dosimétrie embryonnaire et foetale. Les dispositions de l'actuelle directive relatives aux femmes en état de procréer ne sont pas reprises dans le projet, mais une disposition stipule que celles-ci doivent être informées sur la nature de leurs "risques sanitaires particuliers", ce qui sous-entend notamment qu'on doit attirer leur attention sur la nécessité d'une déclaration de grossesse aussi précoce que possible.

## 7. ENJEUX ET CONFLITS DE VALEURS.

Remarquons d'abord que ce qui va suivre est vu dans l'optique du législateur - ou de celui qui doit le conseiller -, représentant du public dans un contexte démocratique et appelé à établir des normes de protection générale dans le cadre de la gestion de "pratiques" ou de la préparation d'interventions.

Une autre réflexion doit être menée lorsqu'on s'intéresse aux cas individuels où une intervention est nécessaire : par exemple après irradiation accidentelle d'une travailleuse enceinte.

Nous avons déjà souligné, tout au long de l'exposé, un certain nombre de questions d'ordre épistémologique - poids des théories dominantes, difficulté de rencontrer le paradigme d'autres disciplines - et de questions éthiques - exigence scientifique quant aux sources, exigence quant à la cohérence du raisonnement, légitimité des affirmations, attitude face au degré de prudence à adopter vu l'incertitude des données.

L'attitude que l'on prend vis-à-vis de ces questions et les réponses qu'on leur donne influencent bien évidemment la position que l'on a devant le problème du risque et des normes de protection pour l'enfant à naître.

Pour ma part, j'estime que, d'après les données dont je dispose, je me dois de conseiller la prudence quant à l'existence éventuelle d'un seuil d'inocuité ou à sa valeur chiffrée exacte. Sans parler de la cancérogenèse, pour laquelle les coefficients de risque semblent plus élevés pour les irradiations prénatales que pour les irradiations postnatales, on a pu voir que des effets induits aux stades de la préimplantation et du développement du système nerveux central pourraient avoir un caractère stochastique ou partiellement stochastique.

Un autre enjeu essentiel qui ressort cependant aussi de toute la discussion qui précède est celui de savoir si, pour le législateur, l'enfant à naître doit ou non être protégé comme un véritable membre du public. Et si la réponse est "oui", de prendre vraiment les mesures aptes à assurer la réalisation de cet objectif, même si celles-ci entraînent une certaine gêne ou un certain coût.

Remarquons que, dans cette optique, la question de savoir si la dose de 1 mSv est dangereuse ou non, par exemple au regard des doses délivrées par l'irradiation naturelle, n'est pas pertinente. Ou bien il faut remettre également en question les normes pour les membres du public !

Si vous posez à un expert ou à un savant la question de savoir si l'enfant à naître doit être protégé comme une personne du public, vous aurez sans doute des réponses en sens divers. Dans leur (notre ?) champ sémantique, l'être humain avant la naissance est souvent d'abord un blastomère, un embryon ou un fœtus. Le bocal de formol n'est pas loin dans l'imaginaire. Et puis, il y a les 50 % d'avortements spontanés, la sélection naturelle, ... . D'autres évoqueront cependant l'absence de hiatus biologique de la conception au terme, les si précoces interactions mère - enfant, tout le jeu des relations anténatales avec l'environnement.

Si vous posez cette question à un juriste, vous entendrez sans doute parler du droit de la femme, des discriminations sexuelles, du risque pour l'emploi, ... ; d'autres évoqueront cependant les droits de l'enfant, les règles de succession, etc ... .

Posez cependant la question à la femme ou au couple qui attend un enfant désiré. Vous découvrirez souvent là, indépendamment des convictions religieuses des intéressés, un vécu culturel, une perception bien différente de l'enfant à naître.

Dès la conception, ou dès le résultat positif de ces nouveaux tests de grossesse aux résultats si précoces, ce n'est pas d'un blastomère ou d'une morula que se préoccupent les parents, mais d'emblée d'un nouveau membre de leur famille. Pas d'un membre potentiel, mais de quelqu'un de bien présent, de bien réel. On remarque certainement ici l'influence des nombreux films et livres consacrés au sujet, et surtout des extraordinaires images produites par les examens ultrasonographiques. Une telle image n'est-elle pas reproduite actuellement sur de grandes affiches ornant les murs de la ville avec les mots évocateurs : "quand l'homme protège l'eau, l'eau protège l'homme". L'homme, pas le fœtus. Faut-il le protéger comme un membre du public ? il y a de bonnes chances que ces parents vous répondent : pas "comme" un membre du public, mais "mieux" !

Et que doit faire le législateur ? En appeler à la science ? Mais la science ne peut pas répondre à cette question. Rester neutre ? Mais quoi qu'on décide, par le fait même de décider, on prend position. On ne peut échapper au choix de valeurs prioritaires. Personnellement, j'ai choisi. Et je suis heureux de constater que l'article 31 et la Commission des Communautés Européennes ont fait un choix qui ne devrait pas trop déplaire aux jeunes parents dont je parlais plus haut.

## Références bibliographiques :

1. 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection, ICRP Publication 60, (Annals of the ICRP, vol. 21, n° 1 - 3), 1991.
2. Genetic and somatic effects of ionizing radiation, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR), 1986.
3. The biological basis for the control of prenatal irradiation, Nuclear Energy Agency, Paris, 1988.
4. Health effects of exposure to low levels of ionizing radiation, Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiations (BEIR V), National Academy Press, Washington, D.C., 1990.
5. SCHULL W.J., Ionizing Radiation and the Developing Human Brain. In : Risks associated with ionizing radiations, Annals of the ICRP, Vol.22, n°1, 1991.
6. Health Effects Models Developed from the 1988 UNSCEAR Report, NRPB - R 226, 1988.
7. Low Dose Radiation, biological bases of risk assessment, K.F. BAVERSTOCK and J.W. STATHER, Taylor and Francis, 1989.

Samenvatting :

Naast een overzicht van de aktuele wetenschappelijke diskussies met betrekking tot de risikobepaling verbonden met de bestraling in utero en een beschrijving van de evolutie van de internationale aanbevelingen en ontwerpen van reglementering ter bescherming van het ongeboren kind, wordt in deze uiteenzetting de nadruk gelegd op de alomtegenwoordige wisselwerking met vragen en bekommernissen die soms van epistemologische, veelal van kulturele en bijna altijd van etische aard zijn.

Abstract :

While reviewing the present scientific discussions on the evaluation of the risks of irradiation in utero and while describing the evolution of the international recommendations and projects of regulation on the subject of protection of the unborn child, the paper tries to emphasize the everpresent interactions of questions or issues of sometimes epistemological, often cultural and nearly always ethical nature.

## CONSEQUENCES POSSIBLES POUR L'EMBRYON D'UNE IRRADIATION EN PERIODE PREIMPLANTATOIRE

P. JACQUET

Laboratoire de Radiobiologie  
Département de Radioprotection  
C.E.N. - S.C.K.  
B-2400 Mol - Belgique

texte de l'exposé du 19 mars 1993

### RESUME

Depuis les années '70, les techniques de culture in vitro ont été largement utilisées pour étudier les effets et mécanismes d'action des radiations administrées à l'embryon durant la période préimplantatoire. Ces expériences ont montré que la radiosensibilité est généralement plus élevée durant les premiers stades et diminue au fur et à mesure que le nombre de cellules embryonnaires s'accroît. Toutefois, les variations de radiosensibilité observées entre les différentes phases du cycle cellulaire sont encore plus importantes que celles notées entre les différents stades du développement. La radiosensibilité semble maximale au stade unicellulaire, vers le moment de la formation des pronuclei (8 premières heures du développement). La mort embryonnaire radio-induite résulte essentiellement d'aberrations chromosomiques structurales et numériques, susceptibles de se développer même plusieurs cycles cellulaires après l'irradiation. D'autres études ont mis en évidence des altérations biochimiques fines chez les embryons irradiés, telles que des inhibitions dans la synthèse ou la phosphorylation de protéines spécifiques. Des résultats obtenus aux Etats-Unis et dans notre laboratoire ont mis en évidence une "tendance" à un accroissement du nombre de foetus malformés chez certaines races de souris suite à une irradiation dans les heures qui suivent la fécondation. Bien que moins prononcés, ces effets vont dans le même sens que ceux obtenus en Allemagne, chez une autre race de souris.

### 1. Introduction

Les effets classiques résultant d'une irradiation de l'embryon de mammifère sont 1) un retard de la croissance intra- ou extra-utérine, 2) la mort embryonnaire, foetale ou néonatale et, 3) des malformations congénitales. Chez les animaux multipares, ces trois effets peuvent être présents simultanément dans la même portée, après irradiation. Dans le cas d'une grossesse ne concernant qu'un seul embryon, comme chez l'homme, l'embryon avorté peut être également malformé aussi bien qu'affecté d'un retard de croissance. La probabilité de trouver un ou plusieurs de ces effets chez un embryon exposé aux radiations dépend en fait d'un certain nombre de facteurs incluant la dose absorbée, le débit de dose et le stade de la

gestation auquel l'exposition a eu lieu.

Chez les mammifères, le développement embryonnaire peut être grossièrement divisé en trois périodes, correspondant chacune à une sensibilité particulière aux différents effets radio-induits. Ces périodes sont la période préimplantatoire, qui s'étend de la fécondation de l'embryon jusqu'à son implantation dans l'utérus maternel, la période de l'organogenèse durant laquelle les différents organes sont formés, et la période foetale, correspondant à la croissance des organes nouvellement formés chez un animal qui présente déjà toutes les caractéristiques morphologiques de l'espèce.

La longueur relative des deux dernières périodes varie considérablement selon les espèces. Ainsi, par exemple, chez l'homme c'est la période foetale qui est de loin la plus longue, puisqu'elle représente environ 80% du temps total de la grossesse. La période de l'organogenèse, qui s'étend de la 2<sup>e</sup> à la 8<sup>e</sup> semaine, ne représente donc qu'une quinzaine de pourcents. Chez les rongeurs, qui sont les animaux de laboratoire les plus utilisés, c'est la période de l'organogenèse qui est la plus longue. Elle représente environ 40% du temps de la gestation chez la souris, alors que la période foetale en représente 25 à 30%.

Les expériences réalisées sur animaux ont montré que les effets induits par les agents physiques aussi bien que chimiques varient considérablement entre les trois périodes de la gestation. Ainsi, la mort prénatale est caractéristique d'un traitement durant la phase préimplantatoire. La mortalité néonatale et les malformations sont particulièrement liées à l'organogenèse. Un agent administré durant la période foetale n'induit en principe pas de malformations importantes, mais plutôt des retards de croissance, particulièrement du système nerveux central et des gonades et, si les doses sont très élevées, la mort postnatale. En fait, si ce schéma reste valable dans la plupart des cas, il souffre néanmoins quelques exceptions ayant trait à la période préimplantatoire. Ces exceptions concernent certains agents chimiques et peut-être les radiations, qui seraient susceptibles dans certains cas de produire des malformations congénitales après administration au cours des tout premiers stades du développement.

Au cours d'un article précédent, nous avons abordé le problème des malformations, suite à une irradiation de l'embryon préimplanté. Nous referons donc brièvement le point sur cette question, deux ans plus tard, à la lumière des quelques données nouvelles obtenues dans notre laboratoire et ailleurs. Avant cela, nous donnerons un aperçu des méthodes utilisées pour étudier la sensibilité de l'embryon préimplanté aux autres effets des radiations, et des résultats obtenus à l'heure actuelle.

2. Utilité des techniques modernes de culture in vitro, pour l'étude de la radiosensibilité de l'embryon préimplanté.

Chez l'homme, il est virtuellement impossible d'étudier les événements survenant chez l'embryon avant son implantation, étant donné que l'on ne peut savoir si la fécondation a eu lieu avant que les tests radioimmunologiques les plus sensibles aient détecté une augmentation de la concentration d'hCG dans les urines, indicatrice d'une activité trophoblastique. Il est toutefois largement admis que beaucoup de grossesses se terminent avant même d'avoir été diagnostiquées cliniquement, et souvent même avant la première menstruation. Ceci explique pourquoi les observations directes des stades préimplantatoires humains soient si rares, tant pour le développement normal que pour l'exposition à des agents embryotoxiques comme les radiations. On est donc obligé de se fier aux résultats obtenus chez les animaux d'expérience. D'où surgit inévitablement le problème de l'extrapolation à l'homme des résultats obtenus. De ce point de vue toutefois, l'embryon mammalien préimplanté présente quelques avantages, car il existe une grande similarité entre de nombreuses espèces de mammifères pour ce qui concerne les premiers stades du développement. Cette similarité porte sur le timing des changements morphologiques, aussi bien que sur de nombreux paramètres métaboliques, comme par exemple l'utilisation par les embryons du pyruvate comme source d'énergie principale, ou le métabolisme de l'ADN et de l'ARN, semblable chez beaucoup d'espèces. Ces nombreuses similarités suggèrent que les résultats d'études sur embryons de rongeurs, comme la souris, pourraient être extrapolés à l'homme sans trop de problèmes.

Durant les années '70, les techniques in vitro furent introduites en radiobiologie, pour étudier les effets et mécanismes d'action des radiations sur l'embryon préimplanté. Ces techniques présentaient divers avantages, tels que l'incubation dans des conditions bien définies ainsi qu'un timing rigoureux des traitements, la possibilité d'observer le développement de l'embryon à tout moment, et de réaliser sur lui des études morphologiques, cytogénétiques ou biochimiques précises.

Dans les études consacrées aux effets des radiations sur l'embryon préimplanté, on peut arrêter les cultures après 4 ou 5 jours, au moment où les embryons ont normalement dû atteindre le stade de blastocyste prêt à s'implanter.

Dans ces études, le clivage des embryons et leur développement jusqu'au stade de blastocyste constituent les paramètres critiques les plus évidents. Des effets sévères se traduisent par la mort rapide des cellules, d'autres effets moins prononcés s'exprimeront par

une activité de clivage moindre, ou par un arrêt du développement à partir d'un certain stade. Outre leurs effets létaux, les radiations peuvent donc induire un simple retard de développement, qui n'est pas toujours évident à première vue. En effet, si le nombre de cellules d'un embryon peut facilement être déterminé jusqu'au stade 8-cellules, il n'en est plus de même après, à partir du stade morula et plus encore du stade blastocyste, qui peut facilement compter une bonne centaine de cellules au moment de l'implantation. Pour compter le nombre de cellules dans des embryons préimplantés, on soumet ceux-ci à un choc hypotonique, puis on les dépose sur une lame dégraissée, et on laisse tomber sur eux une ou plusieurs gouttes de fixateur, selon le stade, sous le contrôle de la coupe binoculaire. Les cellules disloquées de l'embryon s'étalent donc sur la lame. Après coloration des noyaux, on peut déterminer le nombre de cellules, de même que l'index mitotique.

Une autre technique, très récente et que nous commençons à utiliser au laboratoire, est celle des chimères embryonnaires. Brièvement, deux embryons au même stade, et dont l'un des deux a été irradié, sont accolés après dissolution de la zone pellucide qui les entoure, et marquage de l'embryon témoin ou irradié par le FITC, un marqueur cytoplasmique non toxique. On laisse l'embryon chimérique se développer durant deux cycles cellulaires, puis on détermine la contribution relative de chacune des deux parties au nombre total de cellules atteint. Si l'irradiation n'a pas d'effet, l'embryon chimérique aura 50% de ses cellules originaires de la partie irradiée et 50% originaires de la partie témoin. La technique des embryons chimériques permet la mise en évidence d'effets subtils induits par des doses extrêmement faibles de radiations, et se manifestant par une activité de clivage moindre chez les embryons irradiés. Aux doses utilisées, de tels effets passeraient inaperçus sans le recours à cet artifice, et l'on peut se demander quels seraient leurs conséquences éventuelles à long terme pour l'embryon lésé.

Les études morphologiques sur embryons peuvent être complétées par des études cytogénétiques, permettant la mise en évidence d'aberrations chromosomiques radio-induites dans les cellules embryonnaires en division. Pour de telles études, on incube les cellules embryonnaires dans un milieu contenant de la colchicine, afin d'arrêter leur divisions au stade de la métaphase permettant leur examen au microscope. Une autre possibilité consiste à les laisser se diviser et à compter dans leurs cellules-filles le nombre de noyaux secondaires, ou micronoyaux, formés par des fragments chromosomiques ou des chromosomes entiers non inclus dans le noyau principal, suite à des lésions radio-induites de l'appareil mitotique. Enfin, on peut réaliser sur l'embryon préimplanté un certain nombre d'études biochimiques, pour étudier par exemple de façon précise les effets d'une irradiation sur la synthèse d'ADN ou sur la synthèse et/ou phosphorylation de protéines spécifiques. Il nous est toutefois impossible de rentrer dans le détail de ces techniques, dans le cadre de cet article général.

### 3. Résultats principaux des études réalisées avec les techniques de culture *in vitro*

Les études réalisées avec l'aide des techniques de culture *in vitro* ont généralement montré que la mort embryonnaire résultant d'une irradiation des différents stades préimplantatoires survenait vers le moment de l'implantation, c'est à dire au moment de la formation du blastocyste.

Toutefois, les valeurs de LD50 (doses nécessaires pour empêcher 50% des embryons d'atteindre le stade de blastocyste) obtenues après irradiation des divers stades montrent de grandes variations selon les auteurs. Ainsi, par exemple, les valeurs obtenues pour une irradiation du stade 2-cellules varient d'environ 2 à 4 Gy, tandis que pour le stade 4-cellules, elles vont de 2,3 à 5,7 Gy. Pour le stade morula, les valeurs de LD50 montrent encore de plus grandes variations, allant de 3 à plus de 10 Gy. En fait, la plupart de ces contradictions peuvent probablement s'expliquer par le fait que les embryons ont été irradiés à différents moments du cycle cellulaire. En effet, des études plus détaillées, réalisées notamment dans notre laboratoire, ont montré que les variations de radiosensibilité observées au cours d'un même cycle cellulaire étaient bien plus importantes que celles qui pouvaient exister entre différents stades de développement. De telles expériences ont été réalisées essentiellement sur des embryons aux stades 1- et 2-cellules, rigoureusement synchronisés. Ainsi, par exemple, la radiosensibilité de l'embryon peut varier d'un facteur 10 au cours du même stade 1-cellule, et c'est dans les 4 à 8 heures suivant la fécondation qu'elle semble le plus importante de tout le développement embryonnaire préimplantatoire, avec une LD50 située entre 40 et 70 cGy selon les races de souris (1,2).

Les mécanismes de la mort embryonnaire radioinduite ont été étudiés dans quelques laboratoires. Rugh et Grupp (3), parmi les premiers, ont rapporté que des doses très faibles de radiations étaient capables de provoquer de dommages morphologiques dans l'embryon. Des embryons qui n'avaient reçu que 5 cGy peu après la fécondation montraient déjà 6 heures plus tard des anomalies cytoplasmiques et nucléaires, une pycnose ou une dissolution complète des blastomères. Des observations semblables ont été rapportées plus tard par Kirckpatrick (4).

D'autre part, les observations également anciennes de Russell et Montgomery (5) suggéraient que des anomalies chromosomiques, entre autre des aneuploïdies, pourraient jouer un rôle important dans la mortalité radioinduite. Depuis lors, des études cytogénétiques détaillées ont été réalisées. En comparant les effets des radiations chez l'embryon à 1 et 2 cellules, Weissenborn et Streffer (6) trouvèrent que la mort embryonnaire était clairement liée à la présence de micronoyaux après l'irradiation, et que ces deux

phénomènes étaient plus clairs après irradiation du stade 1-cellule que du stade 2-cellules. Ils notèrent que les embryons qui se divisaient plus tôt après l'irradiation montraient plus de micronoyaux que ceux qui se développaient plus lentement, ce qu'ils attribuèrent au fait que les embryons qui se divisaient plus tard disposaient de plus de temps pour réparer les dommages chromosomiques.

Une autre constatation intéressante était que de nouvelles aberrations chromosomiques apparaissaient au cours de la seconde mitose suivant l'irradiation. Les auteurs assumèrent qu'il existait des lésions à l'ADN qui exigeaient le passage par deux cycles cellulaires au moins avant de se transformer en aberrations chromosomiques visibles. De même, d'autres micronoyaux se formaient même après les 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> mitoses suivant l'irradiation. Ces micronoyaux étaient constitués de fragments chromosomiques acentriques mais aussi de chromosomes entiers, comme le montrait l'accroissement concomittant de métaphases hypoploïdes (6).

En conclusion, selon l'équipe d'Essen, la mort embryonnaire résulterait essentiellement d'aberrations chromosomiques structurales et numériques, qui se développeraient même plusieurs cycles cellulaires après l'irradiation. Dans les études de Matsuda et collaborateurs au Japon, ainsi que dans notre laboratoire, les aberrations chromosomiques ont été étudiées au cours de la première mitose suivant l'irradiation d'embryons unicellulaires (7,8). Ces études ont confirmé la corrélation étroite entre la mort embryonnaire et l'induction d'anomalies chromosomiques par les radiations.

Ainsi que nous l'avons évoqué plus tôt, les radiations peuvent également provoquer, à faibles doses, de simples retards de développement dont les conséquences possibles à long terme ne sont pas encore connues. Un cas très particulier de retard de développement a été constaté dans notre laboratoire, chez les embryons de souris unicellulaires de race BALB/c. Suite à une irradiation, ceux-ci peuvent évoluer normalement jusque vers la fin de leur premier cycle cellulaire, mais demeurent ensuite bloqués juste avant la mitose, incapables de se diviser. Ce blocage temporaire de la division, connu sous le nom de "G2-delay" est un phénomène commun à toutes les cellules irradiées, mais il est très fortement amplifié chez les embryons unicellulaires BALB/c (9). Depuis plus de 30 ans, de très nombreuses études ont été consacrées au G2-delay, dont on commence seulement à saisir certains mécanismes partiels. Pour diverses raisons, l'embryon BALB/c constitue un des meilleurs systèmes possibles pour de telles études, et les résultats obtenus jusqu'à présent dans notre laboratoire sont fort encourageants. La mise en oeuvre de techniques biochimiques très fines, telles que celles évoquées plus haut, jointe à l'utilisation d'agents bien caractérisés, tels que la caféine, capables de renverser le G2- delay, nous permet paradoxalement de

dépasser le cadre strict de la Radiobiologie pour aborder le problème extrêmement important du mécanisme de la division cellulaire et de son contrôle. Les implications potentielles de telles recherches sont évidentes, notamment dans le domaine de la cancérologie.

#### 4. Les risques de malformations congénitales liés à l'irradiation des stades préimplantatoires : résultats récents.

Comme nous l'avons signalé il y a deux ans, des études réalisées en Allemagne ont montré que l'irradiation de souris gestantes de race Heiligenberger au cours des premiers stades suivant la fécondation était susceptible d'entraîner l'apparition de malformations chez l'embryon (10,11). De tels résultats remettaient en question le dogme selon lequel pour pouvoir induire des malformations chez l'embryon, il faut exposer celui-ci durant la période de l'organogenèse. En fait, ces études ne sont pas les seules à avoir bousculé ce dogme, puisque d'autres recherches effectuées aux États-Unis avec divers agents chimiques ont abouti aux mêmes conclusions. Il ressortait de ces divers travaux que l'embryon préimplanté était le plus sensible à ce type d'effet au cours du stade unicellulaire, dans les 7 premières heures suivant la fécondation. L'an passé, la même équipe américaine a publié les résultats d'expériences réalisées avec des rayons X, administrés 2 heures 30 après la fécondation d'embryons hybrides (C3H x C57Bl). Les taux d'embryons malformés obtenus en fin de gestation étaient de 1,2% chez les individus témoins, 3,6% chez ceux qui avaient été exposés à 1,5 Gy et 6,2% chez ceux qui avaient été irradiés par 2 Gy (12). Toutefois, seule la valeur obtenue après 2 Gy était significativement augmentée par rapport aux témoins. D'autre part, le spectre d'anomalies trouvées était assez large, comme pour les agents chimiques, alors qu'en ce qui concerne les études réalisées en Allemagne, il y avait une forte prédominance de gastroschisis (anomalie de la paroi abdominale) parmi les embryons anormaux.

A notre tour, nous avons réalisé des études similaires chez deux autres races de souris, soit la BALB/c et la CF1. Comme pour les deux autres études récentes, les femelles ont été mises en présence des mâles durant un laps de temps assez court après la superovulation, de façon à disposer de populations embryonnaires bien synchronisées. Elles ont été irradiées 7 heures après la fécondation présumée mais, contrairement aux autres études, les doses de rayons X administrées étaient assez faibles : 5, 10, 20 ou 50 cGy. De plus, nous avons utilisé deux sortes de groupes témoins, soit des animaux n'ayant subi aucune manipulation et d'autres "sham-irradiés" c'est-à-dire ayant subi exactement les mêmes manipulations que les animaux

irradiés, excepté l'irradiation proprement dite. Un jour avant la mise-bas, les femelles ont été sacrifiées et leurs embryons pesés et examinés sous la loupe binoculaire. D'autre part, les squelettes d'une partie d'entre eux ont été également examinés en détail, après enlèvement de la peau et des viscères, et coloration par le rouge d'alizarine S.

On peut brièvement résumer les résultats obtenus et non encore publiés de la façon suivante. Chez les souris de race BALB/c, les malformations sont apparues dans pratiquement tous les groupes, y compris les témoins, et aucune augmentation du nombre d'embryons anormaux ou sous-développés n'a été notée suite à l'irradiation. De plus, le nombre de malformations squelettiques constatées n'a pas été accru non plus. De toute évidence, aux doses utilisées, l'irradiation n'augmente pas le risque tératogène chez cette race.

Chez la race CF1, très peu de malformations ont été observées également, mais la proportion d'embryons anormaux était apparemment plus élevée dans les groupes irradiés que chez les témoins. Les malformations externes étaient de différents types, soit exencéphalie, gastroschisis, hypo- et polydactylie, malformation sévère de la face. Si les embryons sous-développés étaient ajoutés à ceux porteurs de malformations externes, la proportion d'embryons anormaux augmentait en fonction de la dose de radiation, la différence vis-à-vis des témoins étant significative pour la dose la plus élevée, soit 50 cGy. Quant aux malformations squelettiques, aucun effet des radiations n'a pu être noté.

Ces résultats obtenus chez la race CF1 vont donc dans la même direction que ceux obtenus chez deux autres races, en Allemagne et aux Etats-Unis, en ce sens qu'une "tendance" à un accroissement du nombre d'anomalies foetales a été constatée après irradiation de l'embryon peu après la fécondation, avec des doses relativement faibles de radiations. De tels résultats demanderaient toutefois confirmation après utilisation d'une dose plus élevée de radiations (1 Gy).

## 5. Conclusion

La dose reçue par l'embryon lors d'irradiations diagnostiques in utero est normalement inférieure à 5 cGy. De plus, dans la plupart des cas, les expositions lors d'examens diagnostiques intensifs sont fractionnées et/ou le débit de dose est faible. Théoriquement, ce type d'exposition est moins efficace pour provoquer des malformations qu'une exposition aiguë. On peut penser que, dans les conditions de la vie courante, le risque dû aux expositions est faible, comparé aux risques spontanés qui accompagnent la grossesse : selon les estimations les plus récentes, en effet, environ 15% des conceptions reconnues se termineraient par un avortement spontané. En outre, bien que la fréquence naturelle de

toutes les anomalies congénitales chez l'homme soit fort difficile à évaluer pour de multiples raisons, il semble bien qu'elle puisse atteindre 6% de toutes les naissances d'enfants.

Toutefois, 30% de ces anomalies ont à l'heure actuelle une origine inexpliquée, et il nous semble impérieux de poursuivre les recherches récemment entreprises dans des conditions parfaitement contrôlées, afin de mieux préciser une participation éventuelle, si faible soit-elle, des radiations dans ce risque tératogène.

D'autre part, il reste toujours la possibilité que des modifications biochimiques ou fonctionnelles puissent être induites par les radiations, comme l'ont montré par exemple les recherches sur le "G2-delay". De telles recherches doivent elles aussi être poursuivies et même intensifiées, en utilisant les nombreuses techniques fines récemment développées pour ce type d'études chez l'embryon.

### Remerciements

Les recherches concernant les effets tératogènes possibles des radiations durant la période préimplantatoire font partie du Programme d'Impulsion "Risques pour la Santé", mis en oeuvre à l'initiative de l'Etat Belge. Services du Premier Ministre - Programmation de la Politique Scientifique (contrat HH/52/016).

### Références

1. Yamada, T., O. Yukawa, Y. Matsuda and A. Okkawa (1982), *J. Radiat. Res.*, 23, 450-456.
2. Jacquet, P., and S.Grinfeld (1990), *Teratology*, 42, 453-462.
3. Rugh, R., and G. Grupp (1959), *J. Exp. Zool.*, 143, 571-587.
4. Kirkpatrick, J.F. (1973), *Anat. Rec.*, 176, 397-404.
5. Russell, L.B., and C.S. Montgomery (1966), *Int. J. Radiat. Biol.*, 10, 151-164.
6. Weissenborn, U., and C. Streffer (1988), *Int. J. Radiat. Biol.*, 54, 381-394.
7. Matsuda, Y., I. Tobar, and T. Yamada (1985), *Mutat. Res.*, 151, 275-280.
8. Grinfeld, S., and P. Jacquet (1988), *Int. J. Radiat. Biol.*, 54, 257-268.
9. Grinfeld, S., and P. Jacquet (1987), *Int. J. Radiat. Biol.*, 51, 353-363.
10. Pampfer, S., and C. Streffer (1988), *Teratology*, 37, 599-607.
11. Müller, W.U., and C. Streffer (1990), *Teratology*, 42, 643-650.
12. Rutledge, J.C., W.M. Gereroso, A. Shourbaji, K.T. Cain, M. Gans, and J. Oliva (1992), *Mutat. Res.*, 296, 167-177.

### Samenvatting

Muis embryo culturen in vitro werden in de loop van de zeventiger jaren veelvuldig gebruikt voor het onderzoek naar de effecten en werkingsmechanismen van straling toegediend gedurende pre-implantatie stadia van de ontwikkeling. Dergelijke experimenten hebben over het algemeen aangetoond dat de stralingsgevoeligheid groter is gedurende de vroege stadia en dan afneemt naarmate het aantal cellen in het embryo toeneemt. De verschillen in gevoeligheid tussen de verschillende fasen van de celcyclus zijn niettemin nog belangrijker dan deze tussen de verschillende ontwikkelingsstadia. De radiogevoeligheid schijnt het grootst in het ééncellig stadium, en wel rond het ogenblik van de pronucleus vorming. Stralingsgeïnduceerde embryonale sterfte is vooral het gevolg van structurele of numerieke chromosoomafwijkingen. Deze komen zelfs tot uiting vele celgeneraties na de bestraling. Andere studies toonden biochemische alteraties aan in bestraalde embryos, zoals inhibitie van de synthese of fosforylatie van specifieke proteïnen. Héél recent werd zowel in ons laboratorium als in laboratoria in Duitsland en de Verenigde Staten aangetoond dat, tenminste in sommige muisstammen, bestraling kort na de bevruchting het aantal voldragen misvormde embryos kan verhogen.

### Abstract

During the years '70, in vitro cultured mouse embryos have been widely used to study the effects and mechanisms of action of radiation given during the preimplantation stages. Such experiments generally showed that the radiosensitivity is higher during early stages and decreases as the number of cells in the embryo increases. However, the variations of sensitivity between the different phases of the cell cycle are even more important than those between the different stages. Radiosensitivity seems to be highest at the one-cell stage, around the time of pronuclear formation. Radiation-induced embryonic death results essentially from structural and numerical chromosome aberrations. These should develop even during several cell generation cycles after irradiation. Other studies evidenced fine biochemical alterations in irradiated embryos, like inhibition of synthesis or phosphorylation of some specific proteins. Very recent results obtained in Germany, as well as in the United States and in our laboratory, showed that in some mouse strains radiation delivered soon after fertilization could increase the number of malformed embryos at term.

## **Combined Effects of Radiation and Chemicals on Preimplantation Embryos**

W.-U. Müller

Institut für Medizinische Strahlenbiologie  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstr. 55  
D4300 Essen 1  
Germany

### Abstract

Preimplantation mouse embryos are a very useful system for studying combined effects of radiation and chemicals, mainly because of the well-defined conditions under which the experiments can be carried out. Control of conditions is absolutely essential in this context, because the result of combined exposures strongly depends on the conditions chosen (time factors, temperature, concentration, radiation doses, radiation quality, endpoint measured etc.).

Most of the chemicals that were tested in our system just added their effect to that one after radiation exposure; only a few substances were able to increase radiation risk under very specific conditions with caffeine and mercury being the most interesting examples.

### 1. Introduction

Almost one century of intensive radiation research has provided us with a sound basis for risk estimation after radiation exposure. There are, of course, still problems to be solved, in particular in the low dose range and with regard to modifiers of radiation damage. The results of studies in early pregnancy referring to the latter aspect will be summarized in this paper.

A crucial prerequisite for studies of a possible modification of radiation risk by chemicals is a well-defined experimental system. This depends on the fact, as we shall see,

that the conditions, under which the studies have been carried out, determine whether a substance just adds its effects to the radiation effect, or whether an increase or decrease in risk is observed. For a number of reasons, the mouse preimplantation embryo in vitro is a very useful model system. Some of these advantages are: growth in a simple culture medium (without any ill-defined compounds as in media containing fetal calf serum or comparative mixtures of compounds); constant temperature and pH; a well-known sequence of developmental steps (including a detailed knowledge of the cell cycle stages up to the 8-cell embryo); a highly synchronous development up to the 4-cell stage and a comparatively synchronous development up to the 8-cell stage; direct observation of development under the microscope; the possibility to monitor many different endpoints; studying a complete organism (and not single cells); extrapolation to human embryos is possible, because of the close similarity in the development of all mammalian embryos during the preimplantation stage.

If one is interested not only in the question, whether risk is increased in a situation where radiation and chemicals are acting jointly, but also in the question, whether there is an interaction between both agents, one has to carry out an isobologram analysis (for an overview see Streffer and Müller, 1984). This means, that one has to take into consideration the shape of the dose response curves of the agents participating in the combined exposure. Simply adding the effects is sufficient for answering the question of a possible increase in risk, but this procedure does not answer the question, whether the increase depends on an interaction of the agents or on the dose response relations.

## 2. Results

During recent years, we studied quite a number of substances for their potential to affect radiation risk in early pregnancy (for an overview see Table 1). Most of these

Table 1: Summary of the results of experiments on combined exposure of preimplantation embryos in vitro  
 Endpoints: morphol. = morphological development to the stage of the hatched blastocyst; prolif. = proliferation, i.e. the number of cells observed at the stage of the hatched blastocyst; cytogen. = cytogenetic effect, i.e. either micronucleus formation up to the morula stage or SCEs (sister chromatid exchange) in the blastocyst stage.

<u>Treatment</u>	<u>Dose or concentration</u>	<u>Effect on embryonic</u>			<u>Ref.*</u>
		<u>morphol.</u>	<u>prolif.</u>	<u>cytogen.</u>	
X-rays +	1 Gy (sometimes 0.25, 0.5 or 2 Gy)				
phenol	0.5 mM	+	+/-	+	1
p-nitrophenol	0.05 mM	+	+	+	1
2,4-dinitrophenol	0.01, 0.03 mM	+	+	+	2
arsenic	0.3 $\mu$ M	+	+	+	3
cadmium	0.3, 3 $\mu$ M	+ / ++	+	+	4
lead	0.36, 3.6 $\mu$ M	+	+	++	5
mercury as					
HgCl <sub>2</sub>	3, 10 $\mu$ M	++	++	+	6
CH <sub>3</sub> HgCl	0.1, 0.2, 0.3 $\mu$ M	++	nd	nd	7
nitrite	1, 2.5 mM	+	+	+	8
caffeine	1, 2 mM	++	+ / ++	++	9, 10
nicotine	1, 2 mM	+	+	+	11
ethidiumbromide	0.5 $\mu$ M	+	+	nd	12
actinomycin D	0.3 nM	++	+	nd	12
<sup>3</sup> H-thymidine +	0.25, 1 kBq/ml				
caffeine	1 mM	++	++	+(SCE)	13
actinomycin D	0.3 nM	++	+	nd	12
UV +	1.4, 4.1 J/qm				
caffeine	0.5 mM	nd	nd	++(SCE)	13

nd = not determined

+ = additive effects

- = risk is less than expected from the addition of the single effects

++ = risk is greater than expected from the addition of the single effects

\*Ref.: 1 = Müller et al. 1981; 2 = Müller et al. 1982a; 3 = Müller et al. 1986; 4 = Müller et al. 1982b; 5 = Molls et al. 1983; 6 = Müller et al. 1985a; 7 = Müller and Streffer, unpubl. result; 8 = Müller et al. 1982c; 9 = Müller et al. 1983; 10 = Müller et al. 1985b; 11 = Müller, unpubl. result; 12 = Müller and Streffer 1982; 13 = Müller and Spindle 1986.

chemicals were chosen, because one could expect an effect on radiation risk for the one or the other reason. Nevertheless, Table 1 reveals that most of the substances just added their effect to that one observed after radiation exposure, irrespective of the endpoint chosen.

Some of the chemicals were able to increase or decrease radiation effects under very specific conditions. The latter statement is of high significance. This is obvious already from the data of Table 1: if an agent decreases or increases radiation risk with regard to one of the endpoints studied, this does not necessarily mean that there is also a decrease or increase in risk for the other endpoints (see, for example, phenol, cadmium, lead, mercury, actinomycin D). The only substance which increased radiation risk for all endpoints was caffeine. As we shall see, however, caffeine was able to do this only at extraordinarily high concentrations.

The extent in decrease or increase in risk was just at the borderline of statistical significance for phenol and cadmium. Somewhat more pronounced was the increase for actinomycin D and mercury: the observed effects were about 1.3 to 1.5 times greater than expected from the addition of the single effects. The most potent agent in this context was caffeine at very high concentrations (see below): the combination effects were about 1.7 to 2 times greater than expected.

An observed effect greater than expected from the addition of the single effects does not always mean that there is an interaction between both agents. Sometimes, it is just the shape of the dose-response curves that is responsible for the result described. Therefore, one has to carry out an isobologram analysis to establish a possible interaction. In the cases of caffeine and mercury, it turned out that the shape of the dose-response relations cannot explain the observed increase in risk; this means, that there must be an interaction between X-rays and caffeine or mercury, respectively. In the case of cadmium, on the other hand, the shape of the

dose-response relations can explain the observed small increase in risk, when morphological development is used as endpoint.

It is not possible to discuss the influence of all the conditions on the outcome of the experiments (for additional information see the references mentioned in Table 1). Therefore, three aspects of pertinent interest will be considered in some detail in the following: radiation dose and substance concentration, respectively, time factors, and temperature.

### 2.1 Effect of radiation dose and substance concentration

Figure 1 shows that in the experiments with preimplantation embryos rather high doses (exceeding 0.5-1 Gy) and concentrations (1-2 mM in the case of caffeine and about 3  $\mu$ M in the case of mercuric chloride) were necessary to obtain an increase in risk. In particular, the caffeine concentration is extraordinarily high (corresponding to several hundred cups of coffee or tea per day), so that this behaviour of caffeine is scientifically interesting, but without relevance for the everyday life.

a) X-rays + caffeine					b) X-rays + mercuric chloride				
Gy \ mM	0.1	0.5	1	2	Gy \ $\mu$ M	0.5	3	5	10
0.25			+		0.25			+	
0.5		+	+++		0.5	+		+	
1	+		++++	++++	1		+++		+++
2				+++	2		+++		

+ additive effects      +++ greater than additive effects

Fig. 1: Dose and concentration dependence of the outcome of combined exposures of embryos to X-rays and caffeine or mercury

The mercury concentration is somewhat closer to reality. It is true that the concentration being effective in increasing radiation risk is approximately 100 times higher than the average maternal blood content (Kuntz et al., 1982), but one has to keep several aspects in mind (Müller et al., 1985): 1. the albumin concentration *in vitro* plays a significant role, in so far as lower albumin concentrations result in a higher efficiency of mercury (presumably by less binding of mercury); 2. methylmercury (a compound found in particular in sea-food) is increasing radiation risk at an about tenfold lower concentration than mercuric chloride; 3. blood concentrations of mercury in mercury exposed employees can be markedly higher than the average concentration mentioned above.

There are chemicals that are able to increase radiation risk at very low concentrations. Actinomycin D is an example, because 0.3 nM is sufficient in this context (Table 1). Fortunately, actinomycin D is not a substance with a ubiquitous distribution.

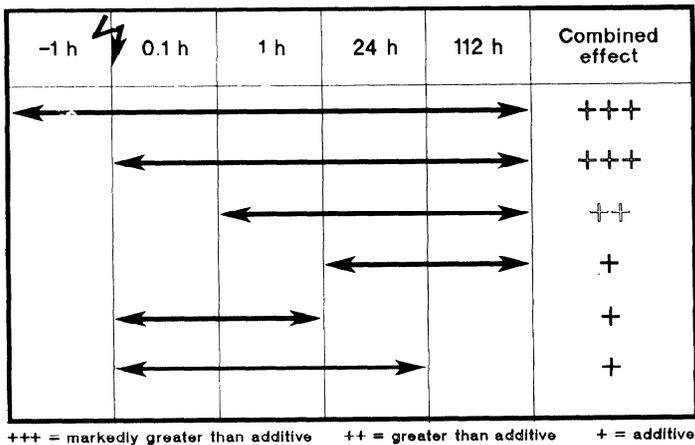


Fig. 2: Effect of the presence of mercury on the combined effect with X-rays  
(Please note, that the times given are out of scale.)

## 2.2 Time factors

Timing of radiation and chemical exposure markedly affects the outcome of combination experiments. An example is given in Figure 2. There is no need for mercury being present at the time of radiation exposure, but it must be applied shortly thereafter (within a couple of minutes) to exert a maximal enhancing effect. In addition, it has to be present for rather long intervals.

Another aspect is worth mentioning: exposing 2-cell embryos in early  $G_2$ -phase to X-rays and mercury does not result in an increased risk, but only exposure in the late  $G_2$ -phase (Müller and Streffer, 1986).

## 2.3 Temperature

Originally, we thought that sub-optimal culture conditions might further enhance an increased combination risk. Just the opposite, however, turned out to be true in the case of temperature dependence (Figure 3). An increased risk was observed only in the range of optimal culture temperature, i.e. around 37° C. This result was obtained not only for mercury, but also for caffeine (unpublished).

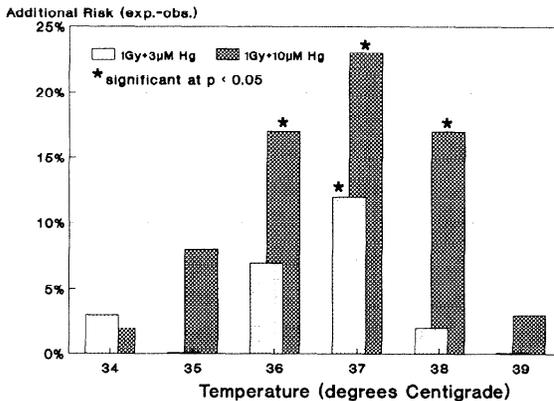


Fig. 3: Difference between expected and observed effect after combined exposure to X-rays and mercury in dependence on temperature (endpoint: hatching of blastocysts)

### 3. Discussion

The question of a possible effect of chemicals on radiation risk is of high relevance in radiation protection. This depends, of course, on the fact that everybody is exposed to a multitude of various agents. Fortunately, most of these substances just add their effect to that one observed after exposure to radiation and, at least up to now, there is no report in the scientific literature that a chemical occurring in the environment is able to increase radiation risk for mammalian cells dramatically. One of the most potent chemicals with regard to increasing radiation risk still is oxygen with an enhancement factor of about 3 in combinations with radiation of low LET. Some other substances have been found which affect radiation risk at a measurable degree under very specific conditions.

The dependence on the conditions chosen in the studies is of utmost significance, because for the most part these conditions determine, whether a substance adds its effects to those ones after radiation exposure, or whether an increase or decrease in risk is observed. Therefore, it is not reasonable to state, for example, that chemical XYZ "increases radiation risk", without mentioning the conditions under which the increase is achieved.

Only four factors (endpoint, dose/concentration, time, temperature) affecting the outcome of experiments were mentioned in this paper. A lot more have to be considered: the experimental system itself, radiation quality, oxygen tension, mode of application, or interfering substances necessary in the experiments (medium compounds, for example). This makes studies in this field very complex and time-consuming.

Another aspect that even increases the difficulties has not been touched at all: usually not just two agents are participating in a combined exposure, but several agents. The number of experiments necessary for a systematic study increases exponentially with  $2^n$ , where  $n$  is the number of

agents. In addition, one has to establish complete dose-response curves for all the agents, if one is interested in the question, whether a possible deviation of the observed effect from the effect expected from the addition of the single effects is due to the shape of the dose-response relations or to an interaction of the agents. Thus, it is not surprising that systematic studies of combined exposures with more than two agents are scarce. The author of this paper studied the combined action of X-rays, caffeine, and mercury (Müller, 1989). It turned out that the observed increase in risk was entirely explainable at the level of the twofold combinations; there was no additional increase in risk specific for the joint action of the three agents mentioned.

It is obvious from the explanations given above that it is impossible to study all the various exposure conditions with all the chemicals that are known. Our aim must be to elucidate general mechanisms, by which agents might affect radiation risk.

#### 4. Conclusions

The conclusions mentioned in the following, are not only based on the experiments with preimplantation embryos, but are of a more general nature:

4.1 Up to now, only a few chemicals have been found that are able to modify radiation risk, and this only under very limited conditions.

4.2 The chemical that affects radiation risk has to act upon very specific radiation-induced processes like radical mechanisms, DNA repair, cell proliferation.

4.3 The doses and concentrations required for a risk modification are often comparatively high. (There are exceptions; e.g. actinomycin D, some hormones.)

4.4 It was frequently found that a long interval between radiation exposure and uptake of the chemical did not result in an interaction. (Important exception: promoting effects in carcinogenesis).

4.5 Chemicals that diminish radiation risk usually have to be present during radiation exposure.

4.6 If there is an increase in radiation risk for mammalian cells due to the presence of a chemical, this increase will usually not exceed a doubling of that risk expected from the addition of the single effects.

## 5. Acknowledgement

This work was supported by the Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Federal Republic of Germany.

6. References

- Molls, M., Pon, A., Streffer, C., van Beuningen, D., Zamboglou, N., Intern. J. Radiat. Biol. 43 (1983) 57
- Müller, W.-U., Intern. J. Radiat. Biol. 56 (1989) 315
- Müller, W.-U., Spindle, A., Teratog., Carcinog., Mutag. 6 (1986) 107
- Müller, W.-U., Streffer, C., Strahlentherapie 158 (1982) 630
- Müller, W.-U., Streffer, C., Zamboglou, N., Radiat. Environ. Biophys. 19 (1981) 247
- Müller, W.-U., Streffer, C., Zamboglou, N., In: Developmental Effects of Prenatal Irradiation; Kriegel, H., Schmahl, W., Kistner, G., Stieve, F.-E. (eds); G. Fischer, Stuttgart (1982a) 293
- Müller, W.-U., Streffer, C., Kaiser, U., Arch. Toxicol. 51 (1982b) 303
- Müller, W.-U., Streffer, C., Fischer, C., Radiat. Environ. Biol. 20 (1982c) 187
- Müller, W.-U., Streffer, C., Fischer-Lahdo, C., Radiat. Environ. Biol. 22 (1983) 85
- Müller, W.-U., Streffer, C., Fischer-Lahdo, C., Arch. Toxicol. 57 (1985a) 114
- Müller, W.-U., Streffer, C., Wurm, R., Teratog., Carcinog., Mutag. 5 (1985b) 123
- Müller, W.-U., Streffer, C., Fischer-Lahdo, C., Arch. Toxicol. 59 (1986) 172
- Streffer, C., Müller, W.-U., Advances in Radiation Biology 11 (1984) 173

## **Résumé**

Les embryons de souris avant l'implantation représentent un système très utile pour l'étude des effets combinés des radiations et des substances chimiques, surtout grâce aux conditions très précises dans lesquelles les expériences peuvent être menées. Le contrôle des conditions de travail est essentiel dans ce contexte, l'effet des expositions combinées étant fortement dépendant des paramètres choisis (les facteurs temps, température, concentration, dose de radiations, qualité du rayonnement, nature du résultat mesuré, etc.). La plupart des substances testées dans notre système ont uniquement additionné leur effet à celui des radiations. Quelques rares substances ont augmenté l'effet des radiations dans des conditions très spécifiques, les exemples les plus courants étant la Caféine et le Mercure.

## **Samenvatting**

Preimplantatie muisembryos vertegenwoordigen een zeer nuttig systeem in het onderzoek naar de effecten van de combinatie stralen-scheikundige produkten, in het bijzonder omdat de experimenten in zeer nauwkeurige omstandigheden kunnen uitgevoerd worden. In deze context is de controle van de werkomstandigheden uitermate belangrijk omdat het effect van de combinatie sterk afhankelijk is van deze werkomstandigheden (tijdfactoren, temperatuur, concentratie, stralendosis, stralenkwaliteit, eindpunt metingen, enz.). Meest van de in ons systeem onderzochte produkten telden hun effecten samen met die van de bestraling, enkele zeldzame produkten verhoogden het effect van de stralen in bepaalde condities met Coffeine en Kwik als bijzonderste voorbeelden.

## NEUROLOGIE DU RETARD MENTAL SEVERE CAUSE PAR UNE IRRADIATION PRENATALE.

H. Reyners, L. van Ravestyn et E. Gianfelici de Reyners.  
CEN-SCK, Radiobiologie, Mol, Belgique.

texte de l'exposé du 19 mars 1993

### RESUME

35 mSv de neutrons de 600 keV sont susceptibles d'induire une microcéphalie foetale faible (-2 %) mais significative chez le rat. Les conséquences fonctionnelles d'un si petit déficit restent méconnues pour l'adulte; les altérations comportementales pour des doses inférieures à 500 mSv sont en effet rares et controversées. On pourrait dès lors, en arriver à admettre que de faibles déficits structuraux ne prêtent guère à conséquences et que le cerveau est suffisamment souple pour pallier à la perte de certains de ses réseaux en activant des connexions de remplacement. Cette hypothèse est peu fondée.

### 1. INTRODUCTION

Les rapports successifs sur les conséquences sanitaires des explosions atomiques d'Hiroshima et de Nagasaki ont fait ressortir que la radiosensibilité du cerveau en développement est beaucoup plus élevée que celles des autres organes. Certains experts n'excluent même pas que dans le cas japonais, des **retards mentaux sévères** puissent avoir été causés par des doses de moins de 5 cGy (ICRP, 1986). Il subsistera pourtant toujours une incertitude à propos de la dosimétrie réelle de ces observations épidémiologiques mais le recours à l'expérimentation animale peut pallier à cet inconvénient. Tout comme le cerveau humain, celui du rat foetal s'est avéré particulièrement concerné lui aussi par une exposition aux radiations et ce même pour des doses aussi faibles que **1 cGy de neutrons** de 600 KeV (au jour 15 de la gestation); la biométrie y décèle en effet une perte pondérale significative de 2 % (Reyners et al., 1992).

L'observation d'effets extrêmement faibles pour des doses qui ne le sont pas moins, incite cependant à se poser des questions sur les conséquences pratiques et concrètes

de déficits proportionnellement aussi minimes. Entraîneraient ils des conséquences comportementales détectables s'ils se produisaient dans le cerveau humain? Rien n'est moins sûr étant donné les possibilités compensatrices ou palliatives que l'on reconnaît à ce dernier. Mais où donc alors fixer la dose seuil? On retombe dans le sempiternel débat pour philosophes où qui ne risque rien, n'a rien.

De telles questions méritent d'être considérées avec attention d'autant plus que les mécanismes de la cérébrogenèse normale, et plus encore après irradiation, présentent certainement encore des facettes insoupçonnées. Très récemment, des **expositions continues** non seulement à de faibles doses d'irradiation mais à de faibles débits de dose ont été réalisées sur des rats gravides. Contrairement aux prévisions de la radiobiologie classique, ces expériences ont montré que le cerveau foetal est d'une radiosensibilité anormalement élevée pour les faibles débits. Il faut en conclure que les phénomènes de réparation jouent très mal leur rôle dans un tel modèle que nous continuons à étudier au CEN-SCK de Mol grâce à l'appui du programme **Radioprotection** des Communautés Européennes.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

Après une irradiation prénatale humaine, quelle est la dose minimale susceptible d'entraîner l'apparition ultérieure de troubles mentaux graves? Ce problème de la **dose seuil** est à la base d'innombrables travaux qui ont eux-mêmes soulevé d'interminables controverses mais aussi une série de nouveaux points d'interrogation. Quelques uns d'entre eux sont envisagés ci-après.

**Les problèmes à résoudre:** Que faut il entendre par des troubles mentaux graves? Ne conviendrait il pas surtout de pouvoir détecter les éventuelles altérations nerveuses ou psychologiques mineures qui pourraient elles aussi apparaître? Quelles sont les différences entre les cerveaux d'animaux soumis à des irradiations prénatales aiguës ou prolongées? Les troubles et les lésions neurologiques ne seraient ils pas simplement une conséquence indirecte de l'effet des radiations sur l'hématopoïèse de

la mère? Dans cette hypothèse, une simple transfusion représenterait la fin de bien des problèmes.

**Les troubles mentaux graves** (Severe Mental Retardation: SMR). D'après les travaux d'Otake et Schull consacrés aux survivants d'Hiroshima et de Nagasaki, une exposition prénatale du fœtus humain à 1 Sv de radiations entre la 8<sup>ème</sup> et la 15<sup>ème</sup> semaine de la grossesse entraînerait l'apparition de SMR dans 40 % des cas (ICRP, 1986). Clarke (1991) du NRPB a souligné la gravité d'une telle situation en la comparant au risque de cancer fatal qui n'est lui que de 4% par Sv; celui du transfert d'une anomalie héréditaire est encore 4 fois moindre.

**Les troubles mentaux légers:** les données précédentes ne laissent pas d'inquiéter même si Schull et al. prévoient pour la SMR, l'existence probable d'un seuil qui se situerait entre 12 et 23 cGy (1991). C'est que, étant donnée la gravité de cette pathologie, il y a tout lieu de se poser des questions au sujet de l'existence possible de dysfonctions nerveuses certes moins graves mais qui se situeraient dans le vaste éventail compris entre la normalité psychologique et la SMR.

C'est probablement en réponse à une préoccupation de ce genre que des travaux toujours basés sur l'examen des survivants japonais irradiés in utero, ont tenté de déterminer pour ce groupe, le taux de diminution du QI mais aussi les échecs scolaires ou encore le nombre d'attaques épileptiques. Assez curieusement, il n'apparaît pas de diminution du QI pour des doses inférieures à 0.1 Sv (Clarke, 1991) mais ceci est vraisemblablement dû à l'énorme variabilité existant sur ce type de mesures même au sein d'une population apparemment normale!

**Le recours à l'expérimentation animale.** L'irradiation d'animaux de laboratoire gravides permet d'éclairer les problèmes précédents, grâce à un arsenal de méthodes allant de la morphologie à la psychologie animale. Elles permettent aussi d'utiliser des conditions reproductibles de doses, de débits, d'élevage et d'espèces.

En ce qui concerne **l'irradiation aiguë du rat foetal**, nous avons pu mettre en évidence, en collaboration avec A. Crametz (BCMN -CCE, Geel; laboratoire du Van de Graaff), une atrophie cérébrale légère (2 %) mais irréversible et significative après une dose aussi faible que 1 cGy de neutrons de 600 keV (soit 0.035 Sv) fournie au 15<sup>ème</sup> jour de la gestation, au moment du pic de la cérébrogenèse (Reyners et al., 1992). On peut supposer que cette perte de poids cérébral est la résultante d'une miniaturisation générale de l'ensemble du Système Nerveux Central, un phénomène qui reste indécélable aux analyses plus fines portant sur des zones nécessairement plus restreintes de l'encéphale. Il faut en effet 2.5 cGy de neutrons (87 mSv) pour causer une atrophie significative (-10.3 %) du cingulum, un composant du corps calleux, lui-même principal élément de la substance blanche du cerveau et assurant la connection entre les 2 hémisphères. Chez le rat foetal irradié par les rayons X, une atrophie cingulaire de 9.8 % s'avère elle aussi significative après 10 cGy (100 mSv). Le volume du cingulum est un critère particulièrement radiosensible parce que comme précédemment pour le poids du cerveau, il intègre dans une masse restreinte, les axones émanant de dizaines de milliers de neurones corticaux. Ce paramètre est par conséquent plus sensible que l'analyse des dérangements de l'arborisation dendritique des neurones qui portent sur des populations plus réduites: les résultats de Konermann à ce sujet ne sont pas significativement différents des témoins pour les doses inférieures à 25 cGy (250 mSv; 1987). Il n'est pas sans intérêt de noter ici que les données ci-dessus vont à l'encontre des conclusions optimistes de R. Mole (1990) sur l'origine "maternelle" des effets des radiations sur le cerveau foetal: les doses très faibles utilisées ne pourraient entraîner qu'une diminution minimale de l'érythropoïèse maternelle étant donné le fort turnover cellulaire des précurseurs de la lignée rouge.

Les critères biochimiques classiques sont pour le moment encore moins sensibles que ceux de l'anatomie et de la microscopie. Par ailleurs, les tests fonctionnels mettant en évidence des anomalies comportementales pour des doses inférieures à 500 mSv restent rarissimes (Bornhausen et al., 1982) et ... controversés.

Le bilan de l'expérimentation animale est important: d'une part, il souligne la très forte radiosensibilité du cerveau à certaines périodes de sa croissance. D'autre part, il soulève des questions sur les corrélations possibles entre les effets morphologiques et les altérations comportementales. Il est curieux en effet de constater que ni l'expérimentation fonctionnelle animale (sauf Bornhausen, 1982), ni les analyses du QI des survivants japonais ne détectent des altérations pour les doses plus faibles que 250 mSv. Il est possible, ainsi qu'on l'a déjà proposé plus haut, que les circuits du cerveau humain ou animal puissent s'adapter afin de compenser la perte de certaines connections causée par d'éventuelles microlésions d'origine accidentelle ou nosologique. Si tel était le cas, le seuil fonctionnel de l'irradiation prénatale au moment le plus critique se situerait aux alentours des 250 mSv.

**Irradiations prénatales prolongées:** c'est un constat radiobiologique que l'effet d'une dose de radiations est proportionnel à son débit; toutefois, R. Mole a fait remarquer la maigre étendue des connaissances actuelles dans le domaine des faibles débits (1990). Des expériences récentes à Mol et au CEA de Fontenay aux Roses (H. Coffigny) ont porté sur des animaux irradiés par des doses faibles (<25 cGy) de rayons gamma du Cobalt 60 durant tout ou partie de leur gestation. En comparant les effets obtenus par des doses identiques fournies soit en quelques secondes (fort débit), soit en 4 jours (du 12<sup>ème</sup> au 16<sup>ème</sup> jour de la gestation du rat), il fut très surprenant de constater que le taux de réduction de l'effet sur le poids du cerveau, après l'irradiation continue, n'était que de 30 % (Reyners et al., 1992).

Plus récemment encore, nous avons pu examiner des cerveaux de rats soumis, dans les mêmes conditions que ci-dessus, aux neutrons du Californium 252. Ici aussi, l'effet sur le poids du cerveau est décelable et significatif même pour une dose aussi faible que 4 cGy (+/- 140 mSv) fournis en 4 jours (Reyners et al., in preparation).

En ce qui concerne les rayons gamma du Cobalt 60, la dose seuil pour des expositions prolongées se situe aussi entre 100 et 160 mSv pour les effets sur le poids du cerveau. Il faut cependant faire remarquer que plusieurs rats irradiés avec 50 ou 100 mSv présentaient cependant une ventriculomégalie notable. L'avenir nous dira si cette observation est reproductible ou s'il s'agit de cas de radiosensibilité individuelle.

**Conclusions:** Le débat sur les risques causés par les faibles doses de radiations ionisantes n'est pas clos et il est sans doute trop tôt pour tenter même de le conclure. Les microscopistes sont parvenus à déceler des altérations cérébrales pour des doses de 85 mSv ainsi qu'une microcéphalie légère (- 2%) mais significative après seulement 35 mSv. Que les doses soient fournies à fort ou à faible débit n'a que peu d'importance sur leurs effets quoique les mécanismes pathogéniques sous-jacents soient vraisemblablement différents. Il est aussi curieux de constater que les conséquences fonctionnelles de ces lésions de faible intensité restent méconnues: les très rares travaux signalant des altérations comportementales pour des doses inférieures à 500 mSv restent en effet controversés ou sujets à caution. On pourrait, dans ces conditions, aller jusqu'à admettre que les faibles lésions microscopiques détectées ne prêtent guère à conséquences; ce serait souscrire aux théories qui prétendent que le cerveau est suffisamment souple pour compenser la perte de certains de ses réseaux en activant des connections de remplacement; cette perspective qui pourrait être la solution à bien des problèmes nous apparaît pourtant encore comme hypothétique et peu fondée.

### 3. REFERENCES

Bornhausen M., Burgmeier A., Matthes R., Poller I and Semder B., in: "Developmental Effects of Prenatal Irradiation", G. Fisher Stuttgart Publishers, (1982), 309-311.

Clarke R. H., Radiological Protection Bulletin, 119 S, (1991), 1-16.

ICRP, Annals of the ICRP, 16 (4), Publ. 49, (1986), 1-43

Konermann G., Advances in Radiation Biology, 13, (1987), 91-167.

Mole R., International Journal of Radiation Biology, 57, (1990), 647-663.

Reyners H., Gianfelici de Reyners E., Poortmans F., Crametz A., Coffigny H. and Maisin J.-R., International Journal of Radiation Biology, 62, (1992), 619-626.

Schull W.J., Nishitani H. and Hasuo K., RERF Hiroshima Technical report, (1991), 13-91.

## **SUMMARY**

A dose of 35 mSv of 600 keV neutrons induces a small (-2%) but significant microcephaly in the foetal rat. The functional consequences of such a small deficit remain unassessed in the adult since up to now, behavioral tests cannot reveal consistent abnormalities below 500 mSv. In these conditions, one might consider that small structural lesions have no consequences assuming that the compensative abilities of the brain may correct for selected diminutive injuries. This hypothesis still remains unfounded.

## **SAMENVATTING**

Een dosis van 35 mSv van 600 keV neutronen veroorzaakt een lichte foetale microcephalie (-2%) die bij de rat niet te verwaarlozen is. De functionele gevolgen van deze kleine beschadigingen bij de volwassen rat zijn nog altijd niet goed gekend; gedragswijzigingen bij dosissen kleiner dan 500 mSv zijn inderdaad zeldzaam en discussiëerbaar. Men zou dus kunnen aanvaarden dat kleine structurele beschadigingen geen belangrijke gevolgen met zich meebrengen en dat de hersenen voldoende soepel zouden zijn om door aktivatie van reservekonnnecties, verliezen in bepaalde netwerken te overwinnen. Deze stelling is nog steeds niet gegrond.

**RADIOSENSIBILITE DE L'EMBRYON  
CONCLUSION****J.MAISIN**

Texte de l'exposé du 19 mars 1993

Je voudrais d'abord remercier tous les conférenciers de cet après-midi pour leur excellent exposé ainsi que tous ceux qui ont participé à la discussion.

Toutes les données présentées cet après-midi ont attiré l'attention des membres de la société sur la grande radiosensibilité de l'embryon.

C'est ainsi que l'évaluation des risques pour l'oligophrénie profonde faite pour les êtres humains en utilisant le système de dosimétrie révisé pour les survivants des bombardements atomiques sont de  $0.39 \text{ Gy}^{-1}$  (IC à 95%: 0.21-057) pour des foetus irradiés 8 à 15 semaines après la fécondation et de  $0.09 \text{ Gy}^{-1}$  pour la période de 16 à 25 semaines. Ces évaluations supposent une fonction dose-réponse linéaire sans seuil. Si après l'exclusion, des cas d'oligophrénie probablement étrangères à l'irradiation, on ajuste à ces données un modèle linéaire à seuil, le seuil évalué est environ 0.10 Gy. Pour les périodes de 16 à 25 semaines, aucun cas d'oligophrénie profonde n'a été observé pour des irradiations avec moins de 0.5 Gy. On peut admettre qu'il existe un seuil dans ce dernier cas.

Je pense personnellement que s'il est indéniable que le cerveau du foetus humain irradié à l'âge de 8 à 15 semaines est particulièrement radiosensible à l'induction d'une oligophrénie profonde, bien des observations sont encore nécessaires avant de pouvoir conclure à l'absence de seuil.

La biologie de l'oligophrénie demeure énigmatique et le rôle que peuvent jouer les rayonnements ionisants ne pourra pas être déterminé sans une compréhension claire des événements moléculaires et cellulaires qui aboutissent à un défaut fonctionnel.

Les études expérimentales sur le rat foetal présenté par Hubert Reyners et ses collaborateurs confirment la grande radiosensibilité du cerveau du rat. C'est ainsi que des doses aussi faibles que 1 cGy de neutron de 600 KeV au 15e jour de la gestation, montrent une diminution significative du poids du cerveau alors qu'aucune lésion biochimique morphologique ou du comportement ne peut être mis en évidence. Les travaux de Paul Jacquet et ses collaborateurs ont attiré l'attention sur la radiosensibilité des embryons de souris en période préimplantatoire.

Enfin l'exposé du Dr Mueller a montré qu'il était très difficile de démontrer un effet additif ou synergique des radiations et de certains produits chimiques pour l'induction de malformations de l'embryon de souris lorsque ceux-ci sont administrés à de fortes doses avant l'implantation de l'embryon.

Quelles sont les influences que ces observations pourraient avoir sur les normes en radioprotection? Je pense que les normes recommandées par la CIPR pour la femme enceinte sont très prudentes et tiennent compte des effets sur l'embryon qui ont été décrits cet après-midi.