

---

**Etude de la sensibilité des cellules germinales femelles à l'irradiation par les rayons-X, avec une attention particulière pour les aberrations chromosomiques pouvant conduire à des anomalies congénitales dans la descendance**

P. Jacquet<sup>1</sup>, S. Baatout<sup>1</sup>, L. de Saint-Georges<sup>1</sup>, J. Buset<sup>1</sup>, J. Vankerkom<sup>2</sup> et L. Baugnet-Mahieu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Radiobiologie, CEN/SCK, 2400-Mol

<sup>2</sup> VITO, 2400-Mol

---

## TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION.....	1
I.1 Cadre général de la recherche	
I.2 Objectifs de la recherche	
II. CADRE THEORIQUE .....	2
III. METHODES .....	2
Etudes chez la souris	
Etudes chez le cobaye	
III.1 Animaux	
III.2 Types d'effets considérés	
III.3 Procédure d'analyse	
III.4 Irradiation	
IV. RESULTATS .....	23
Etudes chez la souris	
Etudes chez le cobaye	
IV.1 Radiosensibilité de l'ovocyte immature	
IV.2 Radiosensibilité de l'ovocyte au cours de sa croissance	
IV.3 Transmission d'anomalies chromosomiques à la descendance	
V. DISCUSSION .....	6
VI. ANNEXE .....	10
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	12

## I. Introduction

### I.1. Cadre général de la recherche

Tout comme de nombreux agents chimiques, les radiations ionisantes peuvent affecter le matériel génétique des cellules germinales et induire des maladies ou anomalies héréditaires dans la descendance de l'individu irradié. De tels désordres, qui apparaissent déjà "spontanément" dans la population, pourront éventuellement causer un préjudice important aux personnes affectées, à leur famille et à la société en général. Déterminer dans quelle mesure l'exposition aux radiations ionisantes est susceptible d'accroître l'incidence des anomalies congénitales et maladies génétiques spontanées, demeure une tâche cruciale pour les politiciens chargés des décisions quant à l'utilisation d'agents potentiellement nocifs. C'est également un problème difficile pour les agences et les responsables chargés d'édicter des règlements et recommandations concernant l'exposition de la femme aux radiations ionisantes, et il est important que ces décisions et conseils puissent s'appuyer sur des bases scientifiques solides.

Les données quantitatives sur les risques de maladies et anomalies génétiquement transmissibles chez l'homme, suite à une exposition aux radiations, sont très peu nombreuses. Aucun accroissement significatif de celles-ci n'a été constaté chez les enfants de personnes irradiées, même parmi la population importante des survivants d'Hiroshima et de Nagasaki. Ceci est notamment dû à la fréquence naturelle élevée de tels dommages et à la difficulté de prouver de manière inéquivoque son accroissement dans une population hétérogène. Dès lors, l'estimation des risques doit être essentiellement basée sur les résultats d'études sur animaux, et leur extrapolation doit se fonder sur une compréhension des mécanismes d'action et des différences entre espèces.

### I.2. Objectifs de la recherche

Diverses études réalisées chez la souris ont montré que l'irradiation des cellules germinales mâles ou femelles pouvait conduire à des anomalies congénitales dans la descendance. La base génétique de ces anomalies congénitales radio-induites n'a pas été complètement établie. Une partie importante d'entre elles pourrait être due à des mutations dominantes à pénétrance élevée, qui s'exprimeraient et seraient éliminées en première génération suivant l'exposition. D'autres mutations dominantes auraient une pénétrance faible, et pourraient persister dans les générations suivantes. Alternativement, les anomalies congénitales peuvent être dues à des mutations impliquant plusieurs gènes, ou à des anomalies chromosomiques mineures (par exemple de petites délétions) ou majeures (translocations chromosomiques).

Jusqu'à présent, la souris a été le modèle le plus utilisé pour l'étude des effets génétiques des radiations. Un premier volet de notre travail consiste à déterminer l'incidence d'une irradiation de souris femelles par des doses faibles de rayons X sur l'apparition d'anomalies congénitales dans leur descendance directe. L'irradiation des ovocytes a lieu au stade immature. Le but de cette étude purement morphologique est de vérifier une hypothèse relativement récente (Nomura, 1988) selon laquelle, chez la souris, ce stade extrêmement important de l'ovogenèse serait particulièrement sensible à ce type d'effet radio-induit.

Nous avons montré que le cobaye constitue sans doute un des meilleurs modèles pour l'évaluation des risques génétiques potentiels, pour la femme, d'une exposition aux radiations ionisantes (voir ci-dessous). Notre projet se focalise donc essentiellement sur cette espèce. Les buts poursuivis sont 1) de caractériser la sensibilité des cellules germinales femelles du cobaye à l'induction par les radiations de translocations chromosomiques, 2) de déterminer l'efficacité avec laquelle ces anomalies chromosomiques peuvent être transmises à la descendance, et 3) d'évaluer le rôle potentiel qu'elles peuvent exercer dans l'induction d'anomalies congénitales.

Nos études cytogénétiques sont réalisées sur des ovocytes irradiés par diverses doses de rayons X au stade complètement immature ou à divers stades de leur croissance. Des études réalisées chez la souris, il est en effet ressorti que la sensibilité de l'ovocyte aux anomalies chromosomiques radio-induites pouvait varier fortement, en fonction du stade atteint par celui-ci au moment de l'irradiation.

La transmission des translocations à la descendance et leur rôle potentiel dans l'induction d'anomalies congénitales sont étudiées après irradiation par une dose moyennement élevée au stade qui, dans nos études, s'est révélé le plus sensible à l'induction d'anomalies chromosomiques.

L'ensemble des données recueillies par nous-mêmes et par d'autres chez le cobaye et la souris, devrait permettre une meilleure évaluation des risques potentiels, pour la descendance de la femme, d'une irradiation des cellules germinales aux différentes étapes de leur croissance.

## II. Cadre théorique

On dispose d'un certain nombre d'informations sur les risques génétiques des radiations ionisantes chez l'individu mâle, du fait que les étapes de la maturation des spermatogonies de la souris ressemblent à celles de l'homme, et qu'il existe un certain nombre de données sur les anomalies chromosomiques induites par les radiations dans les cellules germinales de certains primates et même de l'homme.

En ce qui concerne la femelle, les connaissances acquises à ce jour demeurent relativement fragmentaires, notamment en raison des difficultés techniques liées à l'obtention d'ovocytes analysables cytogénétiquement. Comme pour le mâle, ces connaissances reposent en grande partie sur les résultats d'expériences réalisées chez la souris. Il existe toutefois d'importantes différences entre espèces, dans la manière dont le matériel génétique est arrangé dans les noyaux des ovocytes immatures (représentant à eux seuls plus de 90 % de la population ovocytaire totale de l'ovaire), ainsi que dans leur sensibilité à la mort radio-induite. A cet égard, le noyau de l'ovocyte immature de souris possède une chromatine d'aspect pulvérulent (type "dictyé"), alors que celui de l'ovocyte immature de la femme a un aspect "diplotène" typique. D'autre part, quelques centaines de mGy suffisent à tuer la plupart des ovocytes immatures chez la souris et à rendre celle-ci très rapidement stérile, alors que plusieurs Gy sont requis pour provoquer la stérilité chez une femme.

Des études réalisées dans notre laboratoire ont montré que l'ovocyte de cobaye, contrairement à ceux de la souris et des autres rongeurs, possédait des caractéristiques morphologiques et de sensibilité aux radiations ionisantes fort proches de celles de la femme (Jacquet et al., 1994). Ces caractéristiques suggèrent que le cobaye représente un des meilleurs modèles pour l'évaluation des risques génétiques des radiations chez l'homme.

### **III. Méthodes**

#### ***Etudes chez la souris***

Le but des expériences réalisées chez la souris était de voir si des doses faibles de rayons X administrées à des souris femelles trois à quatre mois avant l'accouplement étaient susceptibles de provoquer l'apparition d'anomalies congénitales dans leur descendance directe. L'intervalle entre l'irradiation et l'accouplement étant largement supérieur au temps requis pour qu'un ovocyte immature effectue toute sa croissance et parvienne à l'ovulation (6 à 8 semaines chez la souris), les foetus examinés devaient nécessairement être issus de la fécondation d'ovocytes qui étaient immatures au moment de l'irradiation. Ces études, entamées lors de notre précédent contrat SSTC, ont été terminées durant la première année du présent contrat. Les méthodes suivies ont été détaillées dans un rapport final précédent. Nous ne ferons donc que les résumer.

Les souris choisies pour ces expériences étaient de races BALB/c et CF1, et les doses de radiation ont été de 5, 10, 20 ou 50 cGy. Les femelles irradiées ont été mises en présence de mâles non irradiés 13 à 16 semaines plus tard, et les contenus de leurs utérus ont été examinés en fin de gestation, pour déterminer la mortalité embryonnaire radio-induite aux différents stades (mortalité préimplantatoire, résorptions précoces et foetales, foetus morts en fin de gestation). Les foetus vivants ont été pesés et examinés sous le stéréomicroscope, afin de détecter la présence d'anomalies externes. Les foetus ont ensuite été préparés en vue de l'examen stéréomicroscopique de leur squelette (technique du rouge d'alizarine S).

#### ***Etudes chez le cobaye***

##### **III.1. Animaux**

Des cobayes de race Dunklin-Hartley ont été utilisés pour toutes nos expériences.

Chez le cobaye, la durée du cycle oestral est de 17 jours. Ce n'est qu'au moment de l'oestrus que le vagin s'ouvre et que l'accouplement est possible. En dehors de cette période (qui peut durer 2 à 3 jours), il reste fermé par une membrane vaginale. Les cobayes sont inspectés tous les jours, et le jour de l'ouverture du vagin est considéré comme le premier jour du cycle (ou jour de l'ovulation). La réalisation de certaines expériences a nécessité l'obtention d'animaux nouveaux-nés. Dans ce cas, des femelles ont été mises en présence de mâles, la veille de l'ovulation présumée, et elles ont été séparées de ceux-ci le lendemain. La mise-bas a lieu 68 jours après l'ovulation et l'accouplement.

##### **III.2. Types d'effets considérés**

Les anomalies chromosomiques structurelles constituent une partie importante des dommages génétiques produits par les radiations. Du point de vue des risques génétiques, seules les anomalies chromosomiques induites dans les cellules germinales ou dans leurs prédécesseurs immatures sont à considérer; les aberrations induites dans les cellules somatiques peuvent éventuellement causer des préjudices à l'individu concerné, mais elles ne seront pas transmises à sa descendance.

Parmi les anomalies chromosomiques structurelles, les "translocations" réciproques entre chromosomes non homologues occupent une place essentielle. Celles-ci sont des aberrations stables qui peuvent être transmises à la descendance avec une grande efficacité, entraînant éventuellement chez celle-ci des anomalies congénitales ou retards mentaux sévères. Les translocations et autres aberrations chromosomiques de structure peuvent être visualisées sous le microscope, dans les ovocytes fixés en métaphase de première division méiotique.

### III.3. Procédure d'analyse

Chez la souris femelle, l'utilisation conjointe d'hormones "superovulantes" et de colchicine permet d'obtenir aisément de grandes quantités d'ovocytes en métaphase de première division méiotique (MI). Cette technique est toutefois inopérante chez le cobaye. De plus, chez cette dernière espèce, le nombre d'ovocytes ovulés au cours de chaque cycle est peu élevé (habituellement 2 à 5). La meilleure façon d'obtenir un nombre suffisant d'ovocytes en MI consiste donc à prélever dans les ovaires les ovocytes "méiotiquement compétents" (c'est à dire ceux ayant atteint une taille critique nécessaire pour leur évolution ultérieure en culture), et à les cultiver *in vitro* jusqu'à ce stade. La culture d'ovocytes de cobaye et la préparation de leurs chromosomes présentent un certain nombre de difficultés, entre autres le fait que le nombre de chromosomes est très élevé (64), ce qui rend l'obtention de métaphases complètes encore plus difficile que chez la souris (40 chromosomes).

Nous avons donc consacré un certain temps à développer des méthodes permettant la maturation\* *in vitro* des ovocytes de cette espèce, et leur préparation en vue de leur examen cytogénétique en MI. Ces méthodes ont été décrites en détails dans un article (P. Jacquet et al., 1995).

En MI, les 64 chromosomes du cobaye apparaissent normalement groupés sous forme de 32 paires d'homologues, ou "bivalents". Des cassures suivies de recombinaisons entre 2 ou plusieurs chromosomes de paires différentes (translocations) donneront lieu à des associations aberrantes, visibles sous le microscope : formation de figures trivalentes, quadrivalentes...en chaînes ou en anneaux.

(\* Le mot "maturation" est ici pris dans le sens restrictif de la reprise de la méiose par le noyau quiescent de l'ovocyte, bloqué jusqu'alors au stade diplotène de fin de prophase; la "maturation" ne dure que quelques heures et se réalise juste avant l'ovulation. Des confusions sont fréquentes, du fait de l'utilisation de l'expression "ovocyte immature", où le mot *immature* désigne un ovocyte n'ayant pas encore entamé sa croissance qui, elle, durera un certain nombre de semaines).

### III.4. Irradiation

Les premières expériences ont porté sur la radiosensibilité de l'ovocyte immature. A cette fin, des cobayes adultes (3-4 mois) ont été accouplés, et les femelles nouveaux-nées ont été irradiées sur les ovaires avec 1 ou 2 Gy de rayons X. Les irradiations ont eu lieu au cours des 2 premiers jours suivant la naissance, soit à un moment où un maximum d'ovocytes sont du type immature "diplotène", et la collecte des ovocytes a eu lieu lorsque les animaux avaient atteint l'âge d'un an, afin d'être sûr que les ovocytes examinés étaient bien au stade immature au moment de l'irradiation. Les ovocytes "méiotiquement compétents" ont été prélevés par ponction des follicules situés en surface des ovaires, le 10e jour d'un cycle. Ils ont été cultivés pendant 6 heures, durée nécessaire à la reprise de la méiose et l'arrivée en MI.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la radiosensibilité de l'ovocyte aux stades ultérieurs de sa croissance, soit 15, 8, 4, 3, 2 ou 1 semaine avant l'ovulation, ou encore 2 jours avant celle-ci. Pour ces expériences, les ovaires d'animaux adultes ont été irradiés avec 1, 2 ou 4 Gy, et leurs ovocytes méiotiquement compétents ont été récoltés et cultivés le 10e jour d'un cycle (premières expériences), ou le 15e (expériences suivantes).

Enfin, pour l'étude de la transmission des translocations chromosomiques à la descendance, les ovaires de femelles adultes ont été irradiés avec 1 Gy 2 jours avant l'ovulation (15e jour), c'est-à-dire à un stade particulièrement propice à l'induction de telles aberrations. Les femelles ont été mises en présence de mâles, et les ovocytes de leur descendance femelle ont été analysés lorsque les jeunes animaux avaient atteint l'âge de 4 mois. La qualité insuffisante des préparations de testicules (quelle que soit la technique utilisée) n'a pas permis une analyse cytogénétique objective des spermatozoïdes chez la descendance mâle. D'autre part, il a été procédé à l'examen externe de tous les jeunes animaux (mâles et femelles), afin de détecter la présence éventuelle d'anomalies congénitales.

## IV. Résultats

### *Etudes chez la souris*

Les résultats finaux des expériences réalisées chez la souris sont résumés dans les tableaux 1 à 3, ainsi que dans la figure 1. Le tableau 1 montre que chez la race CF1 et pour des doses inférieures à 0,5 Gy, l'effet le plus évident qui ait pu être constaté à la dissection consiste en une diminution légère et continue du nombre de foetus vivants par femelle, en fonction de la dose administrée. Lorsque la dose passe à 0,5 Gy, cette diminution est particulièrement importante. Comme la mortalité aux différents stades postimplantatoires demeure faible, cet effet reflète vraisemblablement le nombre extrêmement réduit d'ovules produits chez ces souris ainsi peut-être qu'une mortalité prononcée de leurs embryons aux stades préimplantatoires. En ce qui concerne la race BALB/c, les doses faibles de radiation utilisées ne semblent pas avoir exercé d'effet net sur sa fertilité. Nous avons jugé inutile de tester la dose de 0,5 Gy chez cette race, au vu de ses effets extrêmement prononcés sur la fertilité des femelles CF1 (déjà beaucoup plus fertiles que les BALB/c).

Les anomalies externes constatées chez les foetus originaires de femelles contrôles ou irradiées ont été essentiellement l'exencéphalie, la gastroschisis, l'hypodactylie et la polydactylie, auxquelles il faut ajouter la fissure palatine et la fusion buccale. L'irradiation n'a pas entraîné d'augmentation significative de la fréquence des anomalies externes chez les foetus de race BALB/c ou CF1 (tableau 2). D'autre part, il est intéressant de noter que parmi les 317 foetus contrôles obtenus en fin de gestation chez la race CF1, pas moins de 5 étaient malformés. Au cours d'une étude antérieure portant sur les effets d'une irradiation de l'embryon unicellulaire, nous n'avons trouvé qu'1 seul individu malformé (exencéphalie) pour 862 foetus contrôles. Ce fait illustre la grande prudence avec laquelle les résultats de ce type d'études doivent être interprétés, particulièrement lorsqu'une augmentation apparente de la fréquence d'anomalies relativement rares est constatée dans des groupes traités: des variations dans les résultats d'une expérience à l'autre peuvent survenir, reflétant l'influence de certains paramètres non contrôlables (effet des saisons,...).

La pesée des foetus a aussi mis en évidence la présence d'individus "dwarfs" ou sous-développés. Le dwarfisme cause un handicap sévère ou léthal après la naissance, et est souvent associé à des malformations visibles du foetus. Il est donc considéré comme une anomalie congénitale au même titre que ces dernières. Toutefois, les critères utilisés pour qualifier un foetus de dwarf sont quelque peu arbitraires et varient largement selon les auteurs. Dans la figure 1, 4 courbes ont donc été dessinées, représentant les fréquences de foetus anormaux (somme des "dwarfs" et des malformés) en fonction de la dose administrée aux femelles BALB/c et CF1, et du critère retenu pour définir les dwarfs (A: moins de 75 % du poids moyen de la nichée; B: moins de 75 % du poids moyen des autres de la nichée; C: moins de 75 % du poids moyen du groupe contrôle; D: moins de 75 % du poids moyen du groupe considéré). Ici encore, et quelle que soit la définition retenue pour les dwarfs, il n'apparaît pas de corrélation nette entre la dose de radiation reçue par les mères et la fréquence de foetus anormaux.

Enfin, le tableau 3 résume nos observations au niveau du squelette des foetus. Malgré le nombre considérable de foetus CF1 contrôles analysés, aucune anomalie squelettique n'a été trouvée dans ce groupe. D'autre part, 1 seul individu anormal (fusion entre 2 vertèbres cervicales) a été observé chez les groupes traités de cette race. Le nombre d'anomalies squelettiques était légèrement plus élevé chez la race BALB/c, sans que des différences apparaissent entre les groupes contrôle et irradiés.

## ***Etudes chez le cobaye***

### **IV.1. Radiosensibilité de l'ovocyte immature**

Le tableau 4 reprend les nombres et proportions d'ovocytes en MI dans lesquels on a pu détecter la présence d'une ou plusieurs aberrations chromosomiques. Aucune anomalie n'a été trouvée dans le groupe d'ovocytes témoins. Chez les groupes irradiés au stade immature 1 an plus tôt, diverses anomalies ont été recensées. Celles-ci consistaient en translocations, fragments et cassures ("breaks"). La proportion d'ovocytes porteurs d'une ou plusieurs aberrations s'est révélée dépendante de la dose, tout comme la proportion d'ovocytes porteurs de translocations. Le nombre d'aberrations trouvées était toutefois peu élevé. En particulier, la proportion d'ovocytes montrant une translocation était de l'ordre de 1 % par Gy.

### **IV.2. Radiosensibilité de l'ovocyte au cours de sa croissance**

#### ***IV.2.1. Récolte et culture des ovocytes le 10e jour du cycle***

Les expériences suivantes ont été consacrées à la caractérisation de la radiosensibilité de stades relativement proches de l'ovulation. Une comparaison a donc été établie entre la sensibilité d'ovocytes situés à 1 ou 2 semaines de l'ovulation présumée.

Pour ces expériences, des femelles ont été irradiées sur les ovaires par 1 ou 2 Gy de rayons X, le 3e jour (aucun follicule visible en surface de l'ovaire) ou le 10e jour du cycle (follicules en croissance clairement visibles en surface de l'ovaire). Leurs ovocytes "méiotiquement compétents" ont été récoltés des follicules le 10e jour, soit 1 semaine après l'irradiation ou directement après.

Les résultats de ces expériences sont rapportés dans le tableau 5. Les anomalies chromosomiques détectées dans les groupes irradiés consistaient à nouveau en translocations, cassures et fragments. La proportion d'ovocytes porteurs d'anomalies augmentait avec la dose de rayons X administrée. D'autre part, des différences importantes de sensibilité ont été constatées selon le moment auquel l'irradiation avait été réalisée. Ainsi, les ovocytes irradiés 2 semaines avant l'ovulation (jour 3 du cycle) ont montré une sensibilité faible, comparable en fait à celle des ovocytes totalement immatures (taux d'ovocytes avec translocation(s) voisins de 1,5 % par Gy), alors que ceux irradiés 1 semaine avant l'ovulation (jour 10 du cycle) ont montré une radiosensibilité très élevée (taux de cellules avec translocation(s) de l'ordre de 30-35 % par Gy). Dans des expériences ultérieures, nous avons toutefois pu établir que l'irradiation au jour 10 entraînait également la mort et l'élimination de l'ovaire de tous les ovocytes contenus dans les gros follicules, et donc en particulier de ceux porteurs d'aberrations. L'élimination de ces ovocytes survenait apparemment 1-2 jours après l'irradiation, et résultait indirectement de l'atrésie (ou dégénérescence) des gros follicules, particulièrement radiosensibles. Ce phénomène entraînait d'autre part une réaction de l'organisme irradié: ainsi, la perte des gros follicules était compensée par une accélération de la croissance des plus petits follicules, plus résistants, de sorte que les ovaires irradiés au jour 10 mais examinés peu avant l'ovulation (jour 15), laissaient à nouveau apparaître un grand nombre de follicules en croissance à leur surface. Il est à supposer que plusieurs des ovocytes contenus dans ces follicules auraient pu être ovulés et, peut-être, fécondés, et il nous est dès lors apparu intéressant de refaire des expériences d'irradiation 1 ou 2 semaines avant l'ovulation, en récoltant toutefois les ovocytes au jour 15. Ceci pour nous permettre d'avoir une idée encore plus exacte du taux d'anomalies chromosomiques radio-induites réellement susceptibles d'être transmises à la descendance des individus irradiés. Cette manière de faire (récolte des ovocytes au jour 15) a d'autre part été adoptée pour toutes nos expériences suivantes, concernant la sensibilité des ovocytes aux autres stades de leur croissance.

#### *IV.2.2. Récolte et culture des ovocytes le 15e jour du cycle*

Les stades considérés pour ces expériences ont été les suivants: 15, 8, 4, 3, 2, 1 ou 0 semaine avant l'ovulation (0 semaine = irradiation le jour 15, soit 2 jours avant l'ovulation, avec récolte et culture des ovocytes immédiatement après). D'autre part, il a été décidé d'administrer 3 doses d'irradiation aux ovaires (au lieu de 2 précédemment), soit 1, 2 ou 4 Gy.

Comme pour les expériences précédentes, aucune anomalie chromosomique n'a été trouvée dans les ovocytes du groupe témoin. En ce qui concerne les groupes irradiés, les anomalies ont augmenté en fonction de la dose administrée, avec toutefois de grandes différences selon le stade de croissance auquel les ovocytes avaient été irradiés (tableau 6; 90 à 170 ovocytes examinés par groupe). Ainsi, la radiosensibilité est demeurée faible et relativement constante entre les 15e et 3e semaines précédant l'ovulation. Elle a commencé à s'accroître à partir de la 3e semaine, et cet accroissement s'est accentué au cours des 2e et 1ère semaines avant l'ovulation. Les figures 2 et 3 illustrent le fait que, pour les groupes irradiés 3, 2 ou 1 semaine(s) avant l'ovulation, l'effet par unité de dose tendait à augmenter à partir d'une dose de 2 Gy. La radiosensibilité a encore très fortement augmenté au cours de la dernière semaine précédant l'ovulation. Ainsi, les ovocytes irradiés 2 jours avant l'ovulation ont montré une sensibilité extrêmement élevée, apparemment comparable à celle constatée dans les expériences précédentes pour les groupes irradiés 1 semaine avant l'ovulation et analysés immédiatement après, avant que l'atrésie n'entraîne leur élimination de l'ovaire. Après une dose de 4 Gy, pratiquement 100 % de ces ovocytes ont montré au moins 1 aberration. De très nombreux ovocytes étaient porteurs d'aberrations multiples, et les figures de translocations étaient le plus souvent complexes, impliquant plus de 2 paires de chromosomes.

#### *IV.3. Transmission d'anomalies chromosomiques à la descendance*

Si un ovocyte porteur d'une translocation est fécondé, l'embryon unicellulaire résultant de cette fécondation transmettra nécessairement, s'il est viable, cette aberration à toutes les cellules de l'organisme. En particulier, la translocation pourra être observée dans tous les ovocytes de la descendance femelle, ou tous les spermatoocytes de la descendance mâle. La présence d'une translocation isolée dans un seul des ovocytes d'un individu devra donc, théoriquement, relever d'une autre cause que l'irradiation des cellules germinales parentales.

Des examens cytogénétiques ont été réalisés dans les ovocytes méiotiquement compétents de 19 femelles issues d'animaux irradiés par 1 Gy au stade immédiatement préovulatoire. Les ovocytes de 31 femelles issues d'animaux non irradiés mais traités de la même manière pour le reste ont également été analysés (individus contrôles "sham irradiated"). Comme on pouvait s'y attendre, aucune translocation n'a été trouvée dans les ovocytes des animaux contrôles. En ce qui concerne les ovocytes des animaux issus de femelles irradiées, 1 translocation qualifiée de "probable" a été trouvée. Cette aberration "probable" n'était présente que dans 1 seul des 10 ovocytes ayant pu être analysés chez l'individu concerné (ne montrant par ailleurs aucune

anomalie externe), ce qui semble exclure -si l'aberration est réelle- qu'elle ait été directement provoquée par l'irradiation des cellules germinales maternelles.

D'autre part, les mères irradiées ont montré une fertilité tout à fait normale, et aucun individu parmi leur descendance femelle n'a montré d'anomalie externe. En ce qui concerne la descendance mâle, 1 individu est né affecté d'une anomalie cérébrale non caractérisée, entraînant des troubles de comportement et des pertes d'équilibre. En raison de problèmes techniques, les spermatozoïdes de cet individu n'ont pu être analysés. La proportion d'individus vivants malformés parmi les descendants directs des femelles irradiées était de 1/63, contre 0/56 pour la population témoin. Un certain nombre d'individus morts-nés ont également été recensés dans les groupes témoin et exposé, la différence entre ces deux groupes n'étant pas non plus significative (9 morts-nés pour 56 jeunes vivants dans le groupe témoin, et 11 morts-nés pour 63 jeunes vivants dans le groupe des femelles exposées).

## V. Discussion

Différentes études réalisées chez la souris ont montré que l'irradiation des cellules germinales mâles ou femelles de cette espèce pouvait conduire à des anomalies congénitales dans la descendance. En ce qui concerne la femelle, il a été suggéré que la sensibilité de l'ovocyte à ce type d'effet pouvait varier en fonction du stade de l'ovogenèse, mais les résultats obtenus par les différents auteurs sont équivoques. Ainsi, si l'on compare la sensibilité de l'ovocyte au cours des 4 dernières semaines précédant l'ovulation, on voit que Kirk et Lyon (1982) ont observé plus d'anomalies congénitales lorsque les ovocytes étaient irradiés 2 ou 3 semaines avant l'ovulation, alors que Müller et Schotten (1995) ont obtenu des résultats plus prononcés lorsque l'irradiation avait lieu 1 semaine avant celle-ci. Les résultats de Müller et Schotten semblent en accord avec ceux de Nomura (1988), mais ce dernier auteur précise que ses données sont insuffisantes que pour permettre une conclusion valable sur ce point. D'autre part, Nomura fait aussi mention de résultats partiels obtenus avec une très faible dose de rayons X (36 cGy), et suggérant que l'ovocyte immature (10 semaines avant l'ovulation) pourrait être encore plus sensible que l'ovocyte mature (1 semaine de l'ovulation) à l'induction de dommages génétiques entraînant des anomalies congénitales dans la descendance (Nomura, 1988). Nos propres résultats, obtenus après irradiation par diverses doses très faibles de rayons X (5, 10, 20 ou 50 cGy), n'ont pu confirmer cette hypothèse, les ovocytes immatures des deux races étudiées s'étant montrés complètement réfractaires à ce type d'effet.

Pour le reste, l'essentiel des recherches entreprises dans le cadre du présent contrat a porté sur une définition de la radiosensibilité relative des différents stades de l'ovogenèse "postnatale" du cobaye. Les résultats d'études récentes réalisées dans notre laboratoire ont suggéré que le cobaye femelle constituait un modèle plus approprié que la souris, pour les recherches concernant les risques génétiques des radiations ionisantes (Jacquet et al., 1994). Deux paramètres principaux ont été utilisés pour caractériser la radiosensibilité des ovocytes : l'induction de translocations chromosomiques, potentiellement responsables de l'apparition d'anomalies congénitales dans la descendance, mais aussi la sensibilité à la mort cellulaire qui conditionne pour une large part la transmission des anomalies chromosomiques à l'embryon. Nous avons aussi examiné directement l'influence d'une irradiation de cobayes femelles sur l'apparition d'anomalies congénitales dans leur descendance.

L'ensemble de nos résultats expérimentaux nous autorise à tirer les conclusions suivantes:

1) Chez le cobaye, l'ovocyte immature de type "diplotène" typique apparaît très résistant aux effets létaux des radiations et relativement résistant à l'induction d'anomalies chromosomiques du type translocation. De ce point de vue, l'ovocyte immature du cobaye diffère de celui de la souris, de type "dictyé", qui est extrêmement sensible aux effets létaux des radiations et, selon des résultats récents, relativement sensible à l'induction d'anomalies chromosomiques du type translocation (Straume et al., 1991).

2) Les ovocytes en croissance inclus dans les petits follicules sont également résistants aux effets létaux des radiations, ainsi qu'à l'induction d'anomalies chromosomiques. La sensibilité des ovocytes reste faible et apparemment constante au fur et à mesure que diminue l'intervalle les séparant de l'ovulation, jusqu'à 3-2 semaines avant l'ovulation. A partir de ce moment, la sensibilité de l'ovocyte augmente, proportionnellement à la taille du follicule. Les ovocytes de cobaye situés à des stades proches de l'ovulation (à partir d'1 semaine avant l'ovulation), et donc inclus dans les plus gros follicules, sont par conséquent les plus sensibles à l'induction d'anomalies chromosomiques par les radiations. Toutefois, ils sont aussi extrêmement sensibles à la mort radioinduite, un effet qui résulte de l'atrésie rapide des follicules. En principe, les ovocytes aberrants sont donc rapidement éliminés de l'ovaire. Ici encore, l'ovocyte de cobaye affiche un profil de sensibilité différent de celui de la souris. Chez cette espèce en effet, la sensibilité des ovocytes à l'induction d'anomalies chromosomiques semble relativement constante entre les 4e et 2e semaines précédant l'ovulation, puis elle diminue fortement. Les ovocytes inclus dans les follicules proches de l'ovulation sont donc très peu sensibles à l'induction d'anomalies chromosomiques (exception faite de



l'ovocyte en "diacynèse", quelques heures avant l'ovulation). Ils montrent d'autre part une grande résistance à la mort radioinduite (Brewen et Payne, 1979).

3) Si l'on considère l'ovogenèse "postnatale" du cobaye dans son ensemble, aucun des stades étudiés n'est apparu réfractaire à l'induction de translocations. Toutefois, si l'irradiation a lieu 1 semaine ou plus avant l'ovulation, les taux de translocations induits dans les ovocytes susceptibles de survivre jusqu'à l'ovulation (les seuls intéressants du point de vue des risques génétiques) restent faibles pour des doses inférieures ou égales à 2 Gy. Un risque potentiel plus important existe au-delà de cette dose, l'effet par unité de dose augmentant alors fortement, tout au moins pour des irradiations réalisées 1 à 2 semaines avant l'ovulation.

4) Le risque le plus important concerne théoriquement les ovocytes qui seraient irradiés en fin de cycle, juste avant l'ovulation : ceux-ci pourraient échapper à l'atrésie, et être ovulés et fécondés. Or, du fait de leur extrême sensibilité à l'induction d'anomalies chromosomiques, le risque de transmission de translocations à la descendance pourrait être considérable, même pour des doses inférieures à 1 Gy. Nos expériences ont montré que les cobayes femelles irradiés par 1 Gy dans les 2 jours précédant l'ovulation avaient une fertilité normale (exprimée par un nombre normal de jeunes), ce qui indique qu'un certain nombre de leurs ovocytes avaient effectivement échappé à l'atrésie. Nos observations n'ont par ailleurs pu mettre en évidence de lien net entre un tel traitement et la présence de translocations et/ou d'anomalies congénitales parmi les jeunes. Ces résultats négatifs doivent donc être attribués à une élimination sélective des ovocytes et/ou des embryons porteurs d'aberrations. Cependant, le nombre extrêmement restreint d'animaux utilisés dans ces expériences réduit considérablement la portée d'une telle conclusion.

Dans des études déjà anciennes portant sur la radiosensibilité des ovocytes du cobaye, Cox et Lyon (1975) et Caine et Lyon (1979) ont eu recours au test indirect des "létaux dominants". La méthode consiste à irradier des femelles, puis à les croiser à différents intervalles de temps suivant le traitement avec des mâles non traités. L'influence du traitement des mères sur la mortalité pré- et/ou post-implantatoire des embryons est examinée, et une augmentation de celle-ci est considérée comme résultant de l'induction, dans l'ovocyte, d'anomalies chromosomiques incompatibles avec la survie de l'embryon jusqu'à terme (délétions, pertes de chromosomes ou translocations "non balancées"). Les auteurs précités ont trouvé que, chez le cobaye femelle, la sensibilité de l'ovocyte aux mutations dominantes létales augmentait des stades les moins mûrs aux stades les plus mûrs, et que les effets résultant d'une exposition à 1 ou même 2 Gy de rayons X étaient apparemment faibles, pourvu que l'irradiation n'ait pas lieu au cours des 5-11 derniers jours précédant l'ovulation. La comparaison effectuée par ces auteurs n'a toutefois porté que sur un nombre fort restreint de stades. Nos études cytogénétiques directes, portant sur un large éventail de stades, ont permis d'étendre et de préciser considérablement ces conclusions.

L'importance de la recherche des translocations radio-induites dans les cellules germinales réside, comme nous l'avons dit, dans le fait que ces anomalies chromosomiques peuvent induire des malformations chez l'embryon, même si la majorité d'entre elles sont éliminées avec les ovocytes qui les portent, ou au cours du développement prénatal. Cox et Lyon (1975) n'ont pas noté d'augmentation de la proportion d'embryons malformés chez des cobayes femelles irradiés par 1, 2 ou 4 Gy de rayons X et croisées avec des mâles non traités 5-11 jours, 22-28 jours ou 3 mois plus tard. Dans des expériences réalisées plus récemment dans notre propre laboratoire, nous n'avons pas trouvé de diminution de la fertilité ni d'augmentation de la proportion d'embryons malformés chez des femelles irradiées par 2 ou 4 Gy de rayons X et croisées avec des mâles non traités 6 et 12 mois plus tard (Jacquet et al., 1994). Des résultats similaires ont encore été enregistrés dans les dernières expériences du présent contrat, portant sur des femelles irradiées par 1 Gy dans les 2 jours précédant l'ovulation, avec les réserves mentionnées plus haut. Dans ces expériences, l'absence de malformations chez les jeunes allait de pair avec une absence de translocations dans leurs ovocytes. Enfin, dans des expériences réalisées par Caine et Lyon (1979), aucune figure de translocation n'a été relevée dans les spermatozoïdes de 20 jeunes cobayes mâles issus de mères irradiées par 4 Gy de rayons X et mises en présence de mâles non irradiés 3 jours plus tard. Ces auteurs ont toutefois irradié à n'importe quel moment du cycle, et les femelles traitées ont été laissées avec les mâles durant 2 ans, de sorte que la progéniture mâle examinée était apparemment hétérogène, provenant probablement de la fécondation d'ovocytes situés à des stades très divers au moment de l'irradiation.

Transposés à l'homme, les résultats de ces différentes études pourraient suggérer que l'irradiation de l'ovocyte humain par des doses moyennement élevées de rayons X n'entraînerait qu'un risque mineur d'anomalies congénitales visibles dans la descendance directe, quel que soit le stade de l'ovogenèse postnatale auquel l'irradiation ait lieu. Le terme "mineur" implique qu'il n'est pas prouvé que ce risque soit nul, mais aussi qu'il convient de le relativiser par rapport aux risques "spontanés" qui accompagnent toute grossesse. Selon des enquêtes à grande échelle réalisées dans nos pays, il ressort en effet que 2 à 3 % des individus nés vivants montreraient l'une ou l'autre anomalie congénitale sérieuse à la naissance. A ce chiffre, il faudrait encore

ajouter 2 à 3 % supplémentaires, si l'examen a lieu plus tard au cours de la prime enfance, lorsque toutes les anomalies congénitales ont eu le temps de s'exprimer (UNSCEAR, 1988).

L'absence quasi totale d'individus malformés parmi la progéniture des cobayes femelles irradiés ne nous a pas permis de préciser le rôle des translocations dans l'étiologie des anomalies congénitales radio-induites. Cependant, la fréquence généralement faible de ces aberrations chromosomiques pour des doses allant jusqu'à 2 Gy, jointe à l'élimination préférentielle des ovocytes ou embryons qui les portent, suggère qu'elles ne pourraient de toute façon pas contribuer de manière significative à un accroissement de la fréquence des anomalies congénitales, tout au moins si l'irradiation précède l'ovulation d'au moins 1 semaine. Pour des doses dépassant 2 Gy et surtout pour des irradiations aux stades immédiatement pré-ovulatoires, le risque pourrait théoriquement être plus important, malgré les résultats en apparence rassurants de nos dernières expériences. Des études réalisées très récemment chez la souris ont montré que, lorsque l'irradiation avait lieu dans les heures qui précèdent immédiatement l'ovulation, il existait une possibilité réelle que des translocations soient transmises à l'embryon (Tease et Fisher, 1996). Dans ces études, environ 4 % des foetus issus de mères irradiées avec 1 Gy de rayons X 9 heures avant l'ovulation montraient des translocations dans leurs cellules somatiques. Ces translocations n'étaient pas accompagnées de malformations externes visibles, mais l'examen des foetus avait eu lieu à un stade très précoce (14<sup>e</sup> jour de la gestation), peu propice à la détection de toutes les anomalies congénitales possibles. D'autre part, la viabilité jusqu'à terme des foetus porteurs de translocations n'a pu être contrôlée dans ces études.

L'extrapolation à l'homme de résultats obtenus chez le cobaye suppose encore que cette espèce constitue un modèle adéquat dans le domaine des risques génétiques des radiations ionisantes. Une telle supposition est sans doute vraie pour les ovocytes complètement immatures, du type "diplotène" typique chez les deux espèces, et qui affichent une résistance équivalente vis-à-vis des effets létaux des radiations, avec une DL50 (dose tuant 50 % des ovocytes) d'environ 4 Gy (Jacquet et al., 1994; Wallace et al., 1989). Nos résultats, suggérant que les ovocytes immatures constitueraient peut-être le stade le moins radiosensible de l'ovogenèse postnatale, en tous les cas du point de vue de l'induction d'anomalies chromosomiques pouvant éventuellement conduire à des malformations dans la descendance, revêtent donc une importance particulière. Les ovocytes immatures représentent en effet le stade le plus important du point de vue de l'évaluation des risques génétiques, vu leur très grande longévité -jusqu'à 50 ans et plus chez la femme- et le fait qu'ils représentent à eux seuls environ 90 % de la population ovocytaire totale de l'ovaire.

La question est plus délicate pour les stades ultérieurs de l'ovogenèse postnatale. Les résultats de nos études ont montré que le profil de radiosensibilité de l'ovocyte de cobaye, au cours de sa croissance, diffère fortement de celui de l'ovocyte de souris. Le problème est donc de savoir si l'ovocyte humain en croissance ressemble plus à celui du cobaye ou à celui de la souris, de ce point de vue. En relation directe avec ce problème, on peut se poser la question de savoir si des différences de sensibilité apparentes entre des ovocytes de deux espèces irradiés à des stades comparables sont réellement et/ou uniquement dues à des différences intrinsèques de sensibilité des ovocytes eux-mêmes, ou si elles sont partiellement influencées par leur micro-environnement. Dès que la croissance folliculaire débute, la morphologie des chromosomes de l'ovocyte est celle du "diplotène" typique chez toutes les espèces de mammifères étudiées, et cette condition est généralement maintenue jusque dans les dernières heures précédant l'ovulation. Dès lors, des facteurs autres que la configuration chromosomique pourraient être au moins partiellement responsables des différences de sensibilité observées entre espèces (cobaye et souris) et stades de maturation. On a pu démontrer que dans les cellules germinales mâles de différentes espèces, certaines hormones telles que FSH ou les prostaglandines pouvaient influencer les taux de translocations radioinduites par une interférence probable avec les processus de réparation de l'ADN (van Buul et Goudzwaard, 1982; van Buul et Seelen, 1991; Sankaranarayanan et al., 1995). On possède très peu d'informations sur la capacité de l'ovocyte de réparer les lésions à l'ADN induites par les radiations, mais il semble bien que cette capacité se modifie au cours de la croissance folliculaire (Pedersen et Brandriff, 1980). Les processus de réparation de l'ADN sont probablement sous la dépendance partielle du follicule, du fait de la sécrétion d'hormones et autres facteurs impliqués dans des processus métaboliques importants, tels que le maintien de l'arrêt méiotique ou l'acquisition de la compétence méiotique. Nous avons montré que, chez le cobaye, l'irradiation des follicules en fin de croissance induit chez ceux-ci une atresie extrêmement rapide. Recueillis et cultivés avant leur élimination de l'ovaire, ces ovocytes montrent des taux d'aberrations beaucoup plus élevés que ceux observés dans les ovocytes inclus dans des follicules qui n'ont qu'une semaine de moins, et qui ne subissent pas d'atresie immédiate. Les premiers stades de l'atresie se caractérisent, entre autres, par des modifications hormonales dans le fluide folliculaire (Crisp, 1992; Brailly et al., 1981). Ainsi, de telles modifications dans le micro-environnement de l'ovocyte pourraient avoir une incidence directe sur les taux d'aberrations chromosomiques radioinduites, par leur influence négative sur les processus de réparation. Un tel phénomène pourrait expliquer que pratiquement aucun jeune cobaye résultant de la fécondation de femelles irradiées dans les 2 jours précédant l'ovulation n'ait montré de figure de translocation dans ses ovocytes: ces cobayes étaient nécessairement issus de la fécondation d'ovocytes ayant échappé à l'atresie, et ayant donc pu

“réparer” normalement. S’il est probable que certains facteurs folliculaires, et notamment certaines hormones impliquées dans le processus de l’atrésie, peuvent influencer de façon très importante sur la radiosensibilité de l’ovocyte, on ne sait pas avec certitude si les ovocytes humains en fin de croissance sont aussi sensibles au phénomène d’atrésie radioinduite que ceux du cobaye, mais cela a été clairement suggéré (Baker, 1971; Bianchi, 1983). On serait donc tenté de conclure que, dans leur ensemble, les conclusions tirées de nos études sur cobaye fournissent une indication valable du risque d’induction d’anomalies congénitales dans la descendance directe, suite à une irradiation aiguë des ovocytes humains.

En résumé, les résultats de nos différentes études réalisées chez le cobaye suggèrent que le risque d’anomalies congénitales résultant d’une irradiation de la mère par des doses moyennes de rayons X serait faible par rapport aux risques naturels inhérents à toute grossesse, et que la participation des translocations chromosomiques à ce risque serait, elle aussi, mineure. Une certitude sur ce dernier point requerrait cependant une expérimentation sur un nombre très élevé d’animaux, étant donné la très faible fréquence d’induction de tels effets chez le cobaye.

## VI. Annexe

### Publications

- P. Jacquet, L. de Saint-Georges, S. Barrio and L. Baugnet-Mahieu, Morphological effects of caffeine, okadaic acid and genistein in one-cell mouse embryos blocked in G2 by X-irradiation, *Int. J. Radiat. Res.*, 67, 347-358, 1995 (expériences réalisées dans le cadre du contrat précédent).
- P. Jacquet, L. de Saint-Georges, J. Vankerkom and L. Baugnet-Mahieu, Embryonic death, dwarfism and fetal malformations after irradiation of embryos at the zygote stage: studies on two mouse strains, *Mutation Res.*, 332, 73-87, 1995 (expériences réalisées dans le cadre du contrat précédent).
- P. Jacquet, L. de Saint-Georges, J. Vankerkom and L. Baugnet-Mahieu, A method for chromosome preparation of guinea-pig oocytes, *Mutation Res.*, 334, 309-316, 1995.
- P. Jacquet, L. de Saint-Georges, J. Buset, J. Vankerkom et L. Baugnet-Mahieu, Radiosensitivity of the guinea-pig oocyte at different stages of follicular development, *Annales de l'Association Belge de Radioprotection*, 21, 367-371, 1996.
- P. Jacquet, L. de Saint-Georges, J. Buset, S. Baatout, J. Vankerkom and L. Baugnet-Mahieu, Cytogenetic effects of X-rays in the guinea-pig female germ cells. I. The immature oocyte, *Mutation Res.*, 391, 189-192, 1997.
- P. Jacquet, L. de Saint-Georges, J. Buset, S. Baatout, J. Vankerkom and L. Baugnet-Mahieu, Cytogenetic effects of X-rays in the guinea-pig female germ cells. II. The maturing oocyte, *Mutation Res.*, 391, 193-199, 1997.
- P. Jacquet, J. Buset, J. Vankerkom, S. Baatout, L. de Saint-Georges and L. Baugnet-Mahieu, Modifications of the radiosensitivity of the mammalian oocyte, from the immature stage to the pre-ovulatory stage, soumis pour publication.

### Participations à des colloques et séminaires scientifiques

- P. Jacquet, L. de Saint-Georges, J. Buset, J. Vankerkom and L. Baugnet-Mahieu, Radiation-induced translocations in immature and mature oocytes of the guinea-pig, 10th Intern. Congress of Radiation Research, Würzburg, Germany, August 27-September 1, 1995. Book of abstracts, p. 375.
- P. Jacquet, L. de Saint-Georges, J. Buset, J. Vankerkom and L. Baugnet-Mahieu, Radiosensitivity of the guinea-pig oocyte at different stages of follicular development, 9th Intern. Congress of the International Radiation Protection Association, Vienna, Austria, April 14-19, 1996. Proc., Vol. 4, pp. 94-96.
- P. Jacquet, L. de Saint-Georges, J. Buset, S. Baatout and L. Baugnet-Mahieu, The G2-arrest in the BALB/c embryo: relationship with transcription, 27th annual meeting of the European Society for Radiation Biology, Montpellier, France, September 1-4, 1996. Book of abstracts, p. 55.
- L. de Saint-Georges, P. Jacquet, J. Vankerkom, J. Buset, S. Baatout and L. Baugnet-Mahieu, Congenital anomalies in the offspring of low dose X-irradiated mouse, 27th annual meeting of the European Society for Radiation Biology, Montpellier, France, September 1-4, 1996. Book of abstracts, p. 122.

- P. Jacquet, J. Buset, J. Vanckerkom, S. Baatout, L. de Saint-Georges and L. Baugnet-Mahieu, Modifications of the radiosensitivity of the mammalian oocyte, from the immature stage to the pre-ovulatory stage, 29th annual meeting of the European Society for Radiation Biology, Capri, Italie, October 4-6, 1998. Book of abstracts, p. 57

#### Exposés

- P. Jacquet, Studies on the radiosensitivity of female germ cells and of preimplantation embryos, BFS/ISH Munchen, Germany, invited lecture, may 8, 1996.

- P. Jacquet, Effets potentiels d'une irradiation des cellules reproductrices ou de l'embryon, réunion de l'Association Belge de Radioprotection, Bruxelles, exposé sur invitation, 13 décembre 1996.

#### Réunions dans le cadre du programme

- P. Jacquet, J. Buset, L. de Saint-Georges et L. Baugnet, présentation d'un poster sur les recherches réalisées dans le cadre du contrat présent avec les SSTC, lors d'une journée d'études au Palais des Congrès, Bruxelles, 30 octobre 1996.

- P. Jacquet, Etude de la sensibilité des cellules germinales femelles à l'irradiation par les rayons X, avec une attention particulière pour les aberrations chromosomiques pouvant conduire à des anomalies congénitales dans la descendance, *in* "Risques pour la Santé Liés aux Expositions Professionnelles: Recherches, Méthodes et Perspectives", Services Fédéraux des Affaires Scientifiques, Techniques et Culturelles, livre présenté à l'occasion de la journée d'études du 30 octobre 1996, pp. 51-57.

## VII. Références bibliographiques

- Baker, T.G., 1971, Comparative aspects of the effects of radiation during oogenesis. *Mutation Res.* 11, 9-22.
- Bianchi, M., 1983, Cytotoxic insult to germinal tissue, Part 2; The ovary. In *Cytotoxic Insult to Tissue Effects on Cell Lineages*, ed. C.S. Potten & J.H. Hendry, Churchill-Livingstone, Edinburgh, pp. 309-328.
- Brailly, S., Gougeon, A., Milgrom, E., Bomsel-Helmreich, O. and Papiernik, E., 1981, Androgens and progestins in the human ovarian follicle: differences in the evolution of preovulatory, healthy non-ovulatory, and atretic follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53, 128-133.
- Brewen, J. G. and Payne, H.S., 1979, X-ray stage sensitivity of mouse oocytes and its bearing on dose-response curves. *Genetics* 91, 149-161.
- Caine, A. and Lyon, M.F., 1979, Reproductive capacity and dominant lethal mutations in female guinea-pigs and djungarian hamsters following X-rays or chemical mutagens. *Mutation Res.* 59, 231-244.
- Cox, B.D. and Lyon, M.F., 1975, X-ray induced dominant lethal mutations in mature and immature oocytes of guinea-pigs and golden hamsters. *Mutation Res.* 28, 421-436.
- Crisp, Th.M., 1992, Organization of the ovarian follicle and events in its biology: oogenesis, ovulation or atresia. *Mutation Res.* 296, 89-106.
- Jacquet, P., Vankerkom, J. and Lambiet-Collier, M., 1994, The female guinea-pig, a useful model for the genetic hazard of radiation in man; preliminary results on germ cell radiosensitivity in foetal, neonatal and adult animals. *Int. J. Radiat. Biol.* 65, 357-367.
- Jacquet, P., de Saint-Georges, L., Vankerkom, J. and Baugnet-Mahieu, L., 1995, A method for chromosome preparation of guinea-pig oocytes, *Mutation Res.* 334, 309-316.
- Kirk, M. and Lyon, M.F., 1982, Induction of congenital anomalies in offspring of female mice exposed to varying doses of X-rays. *Mutation Res.* 106, 73-83.
- Müller, W.U. and Schotten, H., 1995, Induction of malformations by X-ray exposure of various stages of the oogenesis of mice. *Mutation Res.* 331, 119-125.
- Nomura, T., 1988, X-ray- and chemically induced germ-line mutation causing phenotypical anomalies in mice. *Mutation Res.* 198, 309-320.
- Pedersen, R.A. and Brandriff, B., 1980, Radiation and drug-induced DNA repair in mammalian oocytes and embryos. In *DNA repair and mutagenesis in eukaryotes*, ed. Generoso, Shelby and de Serres, Plenum Publishing Corp., New-York, pp. 389-410.
- Sankaranarayanan, K., Duyn-Goedhart, A.V., De Rooij, D.G. and van Buul, P.P.W., 1995, Radioprotective effects of prostaglandins for chromosomal aberrations and cell killing in V79 Chinese hamster cells grown as spheroids *in vitro* and for mouse spermatogonial stem cells and bone marrow cells *in vivo*. *Int. J. Radiat. Biol.* 67, 47-55.
- Straume, T., Kwan, T.C., Goldstein, L.S. and Dobson, R.L., 1991, Measurement of neutron-induced damage in mouse immature oocytes. *Mutation Res.* 248, 123-133.
- Tease, Ch. and Fisher, G., 1996, Cytogenetic and genetic studies of radiation-induced chromosome damage in mouse oocytes. I. Numerical and structural chromosome anomalies in metaphase II oocytes, pre- and post-implantation embryos. *Mutation Res.* 349, 145-153.
- UNSCEAR, Sources and Effects of Ionizing Radiations, 1988 Report, Annex E: Genetic Hazards, United Nations, New York, 1988.
- van Buul, P.P.W. and Goudzwaard, J.H., 1982, Effects of follicle-stimulating hormone FSH on radiation-induced chromosomal aberrations in mouse germ cells and Chinese hamster cells *in vitro*. *Mutation Res.* 106, 247-253.
- van Buul, P.P.W. and Seelen, M.C.J., 1991, The relationship between induced reciprocal translocations and cell killing of rhesus monkey spermatogonial stem cells after combined treatments with follicle-stimulating hormone and X-rays. *Mutation Res.* 163, 1-8.
- Wallace, W.H.B., Shalet, S.M., Hendry, J.H., Morris-Jones, P.H. and Gattamaneni, H.R., 1989, Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: the radiosensitivity of the human oocyte. *Brit. J. Radiol.* 62, 995-998.

Figure 1: Pourcentages de foetus anormaux en fonction de la dose de rayons X administrée à la mère, et du critère retenu pour l'évaluation des "dwarfs"

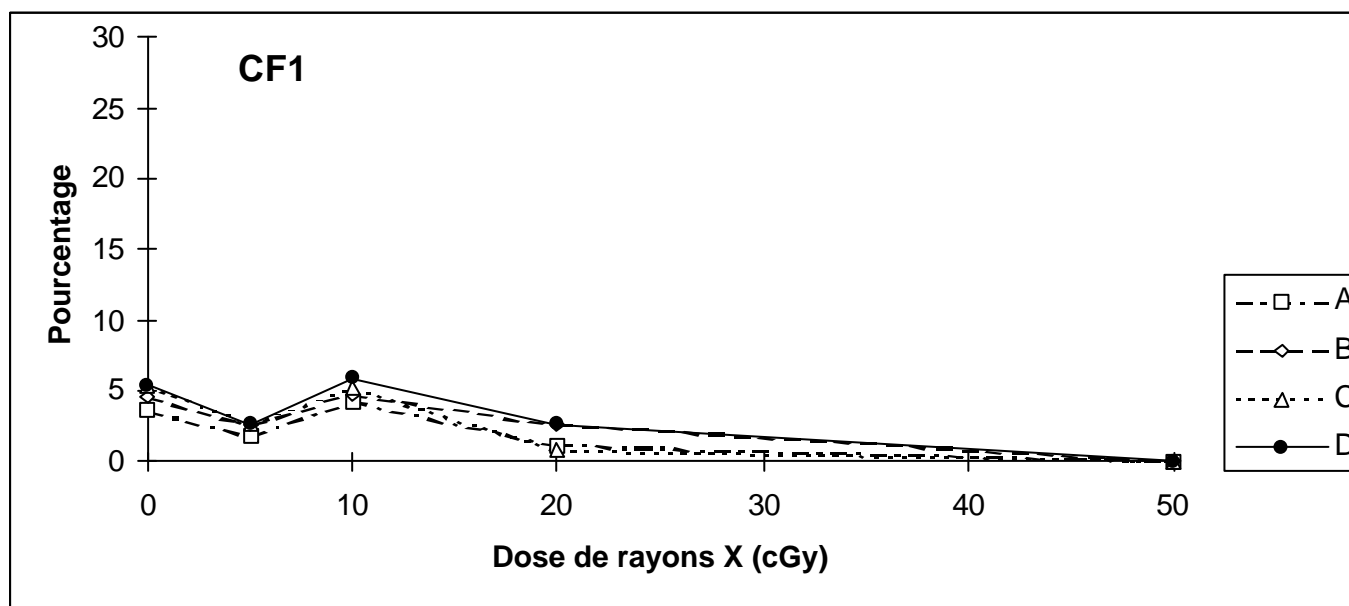
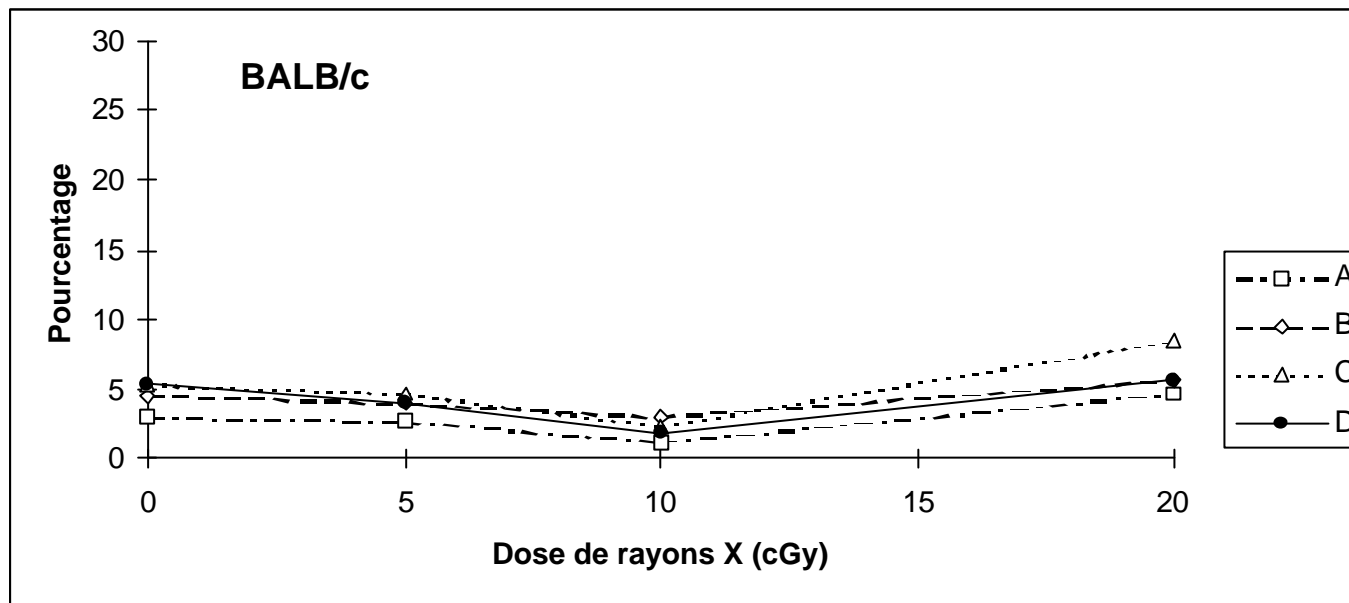


Figure 2 : Pourcentages d'ovocytes porteurs d'au moins une anomalie chromosomique, en fonction de la dose de rayons X administrée à différents moments précédant l'ovulation.

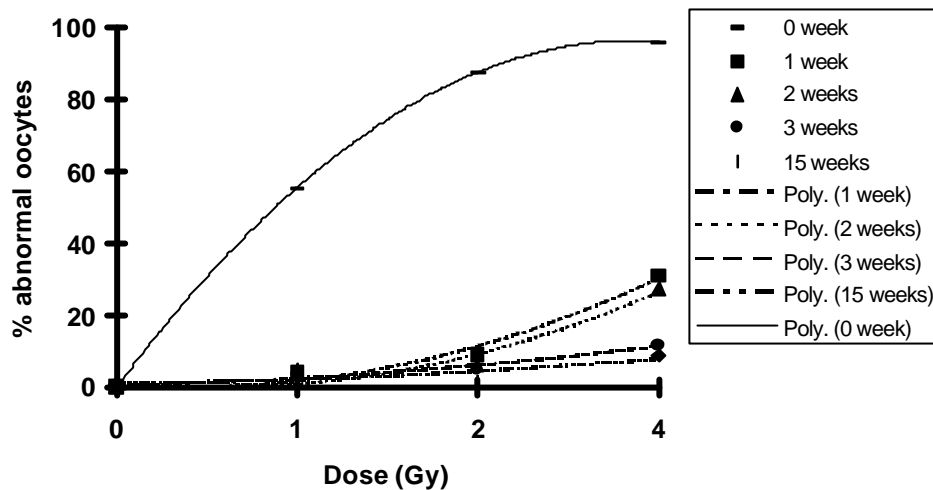
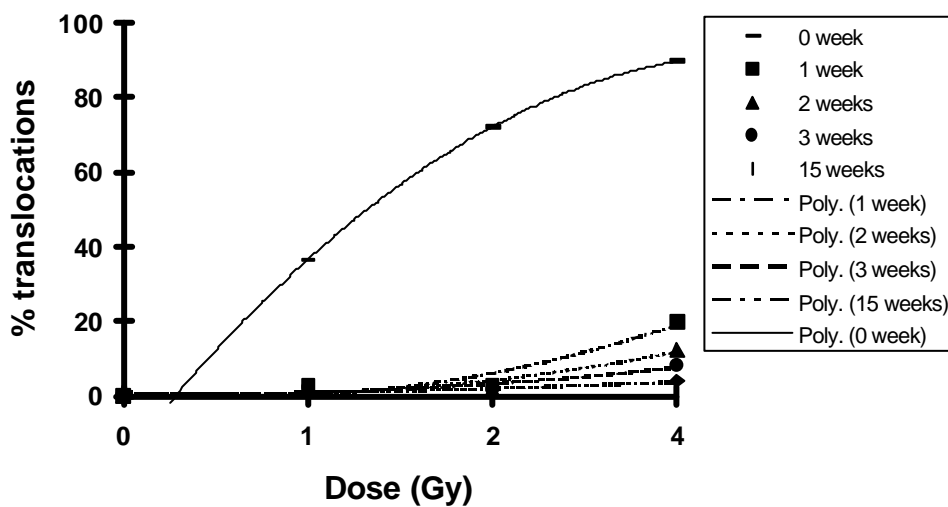


Figure 3 : Pourcentages d'ovocytes porteurs d'une ou plusieurs translocations en fonction de la dose de rayons X administrée à différents moments précédant l'ovulation.





**Tableau 1 : Résultats des accouplements et dissections**

**BALB/c**

Groupe	Femelles croisées	Bouch.	(%)	Grav.	( %)	Nombre d'embryons					Embryons / femelle gravide					Rel. %			
						Total	Vivant	Mort	Résorp.	Résorp.	Total	Vivant	Mort	Résorp.	Résorp.	Vivant	Mort	Résorp.	Résorp.
								tardif	foetale	précoce			tardif	foetale	précoce		tardif	foetale	précoce
0 cGy	191	71	37.2	27	38.0	191	133	2	7	49	7.07	4.93	0.07	0.26	1.81	69.63	1.05	3.66	25.65
5 cGy	332	79	23.8	31	39.2	209	156	1	4	48	6.74	5.03	0.03	0.13	1.55	74.64	0.48	1.91	22.97
10 cGy	198	68	34.3	28	41.2	200	168	0	4	28	7.14	6.00	0.00	0.14	1.00	84.00	0.00	2.00	14.00
20 cGy	344	84	24.4	23	27.4	144	106	0	3	35	6.26	4.61	0.00	0.13	1.52	73.61	0.00	2.08	24.31

**CF1**

Groupe	Femelles croisées	Bouch.	(%)	Grav.	( %)	Nombre d'embryons					Embryons / femelle gravide					Rel. %			
						Total	Vivant	Mort	Résorp.	Résorp.	Total	Vivant	Mort	Résorp.	Résorp.	Vivant	Mort	Résorp.	Résorp.
								tardif	foetale	précoce			tardif	foetale	précoce		tardif	foetale	précoce
0 cGy	290	51	17.6	39	76.5	380	315	2	4	59	9.74	8.08	0.05	0.10	1.51	82.89	0.53	1.05	15.53
5 cGy	152	25	16.4	17	68.0	171	132	0	2	37	10.06	7.76	0.00	0.12	2.18	77.19	0.00	1.17	21.64
10 cGy	227	38	16.7	27	71.1	260	208	3	2	47	9.63	7.70	0.11	0.07	1.74	80.00	1.15	0.77	18.08
20 cGy	283	57	20.1	51	89.5	431	360	0	3	68	8.45	7.06	0.00	0.06	1.33	83.53	0.00	0.70	15.78
50 cGy	648	48	7.4	9	18.8	16	8	0	2	6	1.78	0.89	0.00	0.22	0.67	50.00	0.00	12.50	37.50

Tableau 2 : Nombre de foetus avec malformations externes

**BALB/c**

Groupe	Foetus observés	Gastroschisis	Polydactylie	Hypodactylie	Autres	Total	%
0 cGy	135	2		1		3	2,22
5 cGy	157	4				4	2,55
10 cGy	168		1			1	0,60
20 cGy	106	2		2		4	3,77

**CF1**

Groupe	Foetus observés	Gastroschisis	Polydactylie	Exencéphalie	Autres	Total	%
0 cGy	317	1		2	2	5	1,58
5 cGy	132		1	1		2	1,52
10 cGy	211	1		2	1	4	1,90
20 cGy	360	1		1	1	3	0,83
50 cGy	8					0	0,00

Tableau 3 : Nombre de foetus avec anomalies squelettiques

Groupe	BALB/c			CF1		
	Total observé	Anormaux	Pourcent.	Total observé	Anormaux	Pourcent.
0 cGy	128	2	1,56	298	0	0,00
5 cGy	136	0	0,00	127	0	0,00
10 cGy	160	1	0,62	199	1	0,50
20 cGy	94	1	1,06	344	0	0,00
50 cGy				8	0	0,00

Tableau 4

Aberrations chromosomiques détectées dans des ovocytes de cobaye irradiés au stade immature (examen 1 an après l'irradiation)

Dose (Gy)	Nombre d'ovocytes examinés	Pourcentages d'ovocytes anormaux	Pourcentages d'ovocytes avec translocation(s)	Pourcentages d'ovocytes avec break/fragment
0	74	0	0	0
1	202	1.98	0.99	0.99
2	151	3.31	2.64	0.66

Tableau 5

Aberrations chromosomiques détectées dans des ovocytes de cobaye irradiés les 3<sup>e</sup> ou 10<sup>e</sup> jour du cycle oestral (examen 1 semaine après l'irradiation, ou directement après)

Dose (Gy)	Jour de l'irradiation	Nombre d'ovocytes examinés	Pourcentages d'ovocytes anormaux	Pourcentages d'ovocytes avec translocation(s)	Pourcentages d'ovocytes avec break(s)/ fragment(s)
0	-	78	0	0	0
1	3	132	3.8	1.5	3.0
2	3	147	10.2	3.4	7.5
1	10	122	40.9	36.1	22.1
2	10	120	74.1	63.3	44.2

Tableau 6 : Aberrations chromosomiques détectées dans des ovocytes de cobaye irradiés à différents moments précédant l'ovulation

Semaine avant l'ovulation	0			1			2			3			4			8			15		
Dose (Gy)	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
% Ovocytes anormaux	55,5	87,7	96,3	4,1	8,9	31,0	3,9	6,0	27,4	3,5	5,0	11,7	3,4	5,3	9,4	1,8	2,4	9,0	4,8	1,6	8,7
% Ovocytes avec transloc.	36,6	72,2	89,8	2,9	3,2	20,0	2,4	2,2	12,4	2,3	1,7	8,0	1,7	3,6	3,1	0,9	2,4	5,0	1,9	0,8	4,0
% Ovocytes avec break/frag.	30,0	71,1	58,3	1,2	7,6	14,0	1,6	3,7	17,7	1,1	3,3	1,5	1,7	1,8	6,3	0,9	0,0	4,0	2,9	0,8	4,8