

Dosimétrie cytogénétique : Applications à la préparation et à la conduite des interventions d'urgence radiologique



DATE DE PUBLICATION : SEPTEMBRE 2013



IAEA

Agence internationale de l'énergie atomique

**DOSIMÉTRIE CYTOGÉNÉTIQUE :
APPLICATIONS À LA PRÉPARATION ET
À LA CONDUITE DES INTERVENTIONS
D'URGENCE RADIOLOGIQUE**

Les États ci-après sont Membres de l'Agence internationale de l'énergie atomique :

AFGHANISTAN,	GHANA	PAKISTAN
RÉP. ISLAMIQUE D'	GRÈCE	PALAOS
AFRIQUE DU SUD	GUATEMALA	PANAMA
ALBANIE	HAÏTI	PAPOUASIE-NOUVELLE-GUINÉE
ALGÉRIE	HONDURAS	PARAGUAY
ALLEMAGNE	HONGRIE	PAYS-BAS
ANGOLA	ÎLES MARSHALL	PÉROU
ARABIE SAOUDITE	INDE	PHILIPPINES
ARGENTINE	INDONÉSIE	POLOGNE
ARMÉNIE	IRAN, RÉP. ISLAMIQUE D'	PORTUGAL
AUSTRALIE	IRAQ	QATAR
AUTRICHE	IRLANDE	RÉPUBLIQUE ARABE
AZERBAÏDJAN	ISLANDE	SYRIENNE
BAHREÏN	ISRAËL	RÉPUBLIQUE
BANGLADESH	ITALIE	CENTRAFRICAINE
BÉLARUS	JAMAÏQUE	RÉPUBLIQUE DE MOLDOVA
BELGIQUE	JAPON	RÉPUBLIQUE DÉMOCRATIQUE
BELIZE	JORDANIE	DU CONGO
BÉNIN	KAZAKHSTAN	RÉPUBLIQUE DÉMOCRATIQUE
BOLIVIE	KENYA	POPULAIRE LAO
BOSNIE-HERZÉGOVINE	KIRGHIZISTAN	RÉPUBLIQUE DOMINICAINE
BOTSWANA	KOWEÏT	RÉPUBLIQUE TCHÈQUE
BRÉSIL	LESOTHO	RÉPUBLIQUE-UNIE DE
BULGARIE	LETTONIE	TANZANIE
BURKINA FASO	L'EX-RÉPUBLIQUE YOUNGO-	ROUMANIE
BURUNDI	SLAVE DE MACÉDOINE	ROYAUME-UNI
CAMBODGE	LIBAN	DE GRANDE-BRETAGNE
CAMEROUN	LIBÉRIA	ET D'IRLANDE DU NORD
CANADA	LIBYE	RWANDA
CHILI	LIECHTENSTEIN	SAINT-SIÈGE
CHINE	LITUANIE	SÉNÉGAL
CHYPRE	LUXEMBOURG	SERBIE
COLOMBIE	MADAGASCAR	SEYCHELLES
CONGO	MALAISIE	SIERRA LEONE
CORÉE, RÉPUBLIQUE DE	MALAWI	SINGAPOUR
COSTA RICA	MALI	SLOVAQUIE
CÔTE D'IVOIRE	MALTE	SLOVÉNIE
CROATIE	MAROC	SOUDAN
CUBA	MAURICE	SRI LANKA
DANEMARK	MAURITANIE,	SUÈDE
DOMINIQUE	RÉP. ISLAMIQUE DE	SUISSE
ÉGYPTE	MEXIQUE	TADJIKISTAN
EL SALVADOR	MONACO	TCHAD
ÉMIRATS ARABES UNIS	MONGOLIE	THAÏLANDE
ÉQUATEUR	MONTÉNÉGRO	TOGO
ÉRYTHRÉE	MOZAMBIQUE	TRINITÉ-ET-TOBAGO
ESPAGNE	MYANMAR	TUNISIE
ESTONIE	NAMIBIE	TURQUIE
ÉTATS-UNIS	NÉPAL	UKRAINE
D'AMÉRIQUE	NICARAGUA	URUGUAY
ÉTHIOPIE	NIGER	VENEZUELA,
FÉDÉRATION DE RUSSIE	NIGERIA	RÉP. BOLIVARIENNE DU
FIDJI	NORVÈGE	VIETNAM
FINLANDE	NOUVELLE-ZÉLANDE	YÉMEN
FRANCE	OMAN	ZAMBIE
GABON	OUGANDA	ZIMBABWE
GÉORGIE	OUZBÉKISTAN	

Le Statut de l'Agence a été approuvé le 23 octobre 1956 par la Conférence sur le Statut de l'AIEA, tenue au Siège de l'Organisation des Nations Unies, à New York ; il est entré en vigueur le 29 juillet 1957. L'Agence a son Siège à Vienne. Son principal objectif est « de hâter et d'accroître la contribution de l'énergie atomique à la paix, la santé et la prospérité dans le monde entier ».

DOSIMÉTRIE CYTOGÉNÉTIQUE : APPLICATIONS À LA PRÉPARATION ET À LA CONDUITE DES INTERVENTIONS D'URGENCE RADIOLOGIQUE



**AGENCE INTERNATIONALE DE L'ÉNERGIE ATOMIQUE
VIENNE, 2013**

DROIT D'AUTEUR

Toutes les publications scientifiques et techniques de l'AIEA sont protégées par les dispositions de la Convention universelle sur le droit d'auteur adoptée en 1952 (Berne) et révisée en 1972 (Paris). Depuis, le droit d'auteur a été élargi par l'Organisation mondiale de la propriété intellectuelle (Genève) à la propriété intellectuelle sous forme électronique. La reproduction totale ou partielle des textes contenus dans les publications de l'AIEA sous forme imprimée ou électronique est soumise à autorisation préalable et habituellement au versement de redevances. Les propositions de reproduction et de traduction à des fins non commerciales sont les bienvenues et examinées au cas par cas. Les demandes doivent être adressées à la Section d'édition de l'AIEA :

Unité de la promotion et de la vente, Section d'édition
Agence internationale de l'énergie atomique
Centre international de Vienne
B.P. 100
1400 Vienne (Autriche)
fax : +43 1 2600 29302
téléphone : +43 1 2600 22417
mél. : sales.publications@iaea.org
<http://www.iaea.org/books>

Pour obtenir de plus amples informations sur cette publication, s'adresser au :

Centre des incidents et des urgences,
Département de la sûreté et de la sécurité nucléaires
Agence internationale de l'énergie atomique
Vienna International Centre
B.P. 100
1400 Vienne (Autriche)
Mél. : Official.Mail@iaea.org

DOSIMÉTRIE CYTOGÉNÉTIQUE :
APPLICATIONS À LA PRÉPARATION ET À LA CONDUITE
DES INTERVENTIONS D'URGENCE RADIOLOGIQUE
AIEA, VIENNE, 2013
IAEA-EPR

© AIEA, 2013
Imprimé par l'AIEA en Autriche
Septembre 2013

AVANT-PROPOS

La dosimétrie cytogénétique est reconnue comme une méthode d'évaluation des doses qui comble un manque dans ce domaine, surtout lorsqu'il est difficile d'interpréter les données, dans des cas où l'on a des raisons de penser que des personnes qui ne portaient pas de dosimètre ont été exposées à des rayonnements, lorsque des demandes de réparation pour radiolésion ne sont pas étayées par des données dosimétriques incontestables et dans des cas d'exposition pendant toute la vie active d'un individu.

Depuis 1978, l'AIEA intervient régulièrement dans le domaine de la dosimétrie biologique. Cela s'est traduit par une succession de projets de recherche coordonnée (PRC), par des cours à l'échelle régionale et nationale, par le financement de bourses individuelles et par la fourniture d'équipements à des laboratoires des États Membres, ce qui leur a permis de créer des capacités en dosimétrie biologique.

Des conseils ont ensuite été donnés aux États Membres sur les axes de recherche les plus prometteurs et sur les techniques les plus appropriées pour les futures utilisations de la dosimétrie biologique.

En 1986, l'un des PRC a donné lieu à la publication d'un manuel intitulé *Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment* (n° 260 de la collection Rapports techniques). En 2001, ce manuel a été remplacé par une deuxième édition révisée, publiée dans la même collection sous le -numéro 405.

La présente publication constitue la troisième édition de ce manuel, lequel a été largement mis à jour afin de rendre compte des progrès considérables qui ont été accomplis dans le domaine de la dosimétrie biologique cytogénétique au cours des 10 dernières années.

L'AIEA tient à exprimer ses remerciements à tous les auteurs et relecteurs de la présente publication. Elle remercie tout particulièrement M. D. Lloyd pour sa contribution déterminante.

La présente publication a été coparrainée par l'Organisation panaméricaine de la santé et par l'Organisation mondiale de la Santé.

Au sein de l'AIEA, elle a été établie sous la responsabilité d'E. Buglova, du Département de la sûreté et de la sécurité nucléaires.

NOTE DE L'ÉDITEUR

L'utilisation de désignations particulières de pays ou de territoires ne suppose aucun jugement de l'éditeur, l'AIEA, concernant le statut juridique de ces pays ou territoires, de leurs autorités et institutions ou de la délimitation de leurs frontières.

La mention de noms d'entreprises ou de produits spécifiques (qu'il soit ou non précisé qu'ils sont enregistrés) n'implique aucune intention de porter atteinte aux droits de propriété et ne doit pas non plus être interprétée comme un soutien ou une recommandation de la part de l'AIEA.

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION.....	1
1.1. Généralités.....	1
1.2. Objectif.....	4
1.3. Champ d'application et évolution de la présente publication.....	4
1.4. Structure	5
2. APPLICATION DES NOTIONS DE DOSE À LA DOSIMÉTRIE BIOLOGIQUE.....	7
3. DONNÉES BIOPHYSIQUES SUR LES LÉSIONS CHROMOSOMIQUES	9
4. LYMPHOCYTES HUMAINS.....	15
5. STRUCTURE DES CHROMOSOMES	19
5.1. Condensation de la chromatine	19
5.2. Caryotype humain et pourcentage de l'ADN contenu dans les différents chromosomes.....	20
5.3. Cycle cellulaire.....	23
6. ALTÉRATIONS CHROMOSOMIQUES RADIO-INDUITES	25
6.1. Lésions de l'ADN radio-induites	25
6.2. Aberrations de type chromosomique.....	27
6.3. Aberrations chromatidiques	33
6.4. Condensation prématurée des chromosomes	35
6.5. Micronoyaux	38
7. PRÉLÈVEMENTS SANGUINS.....	41
7.1. Déroulement	41
7.2. Anticoagulant	42
7.3. Récipients	42
7.4. Transport	42
8. OBTENTION D'UNE COURBE DOSE-EFFET <i>IN VITRO</i>	45
8.1. Considérations générales.....	45
8.2. Considérations physiques	45
8.3. Considérations statistiques	48
9. ANALYSE DES DICENTRIQUES	53
9.1. Culture des cellules	53
9.2. Méthode de fixation	57
9.3. Coloration.....	59
9.4. Analyse des lames	61
9.5. Enregistrement des données	62
9.6. Stockage des informations et des lames	64
9.7. Évaluation de la dose reçue	64
10. ANALYSE DES TRANSLOCATIONS	85
10.1. Culture des cellules et méthodes de fixation.....	87
10.2. Peinture des chromosomes	88

10.3. Critères d'examen	90
10.4. Traitement des données	91
10.5. Niveau de référence des translocations	94
10.6. Persistance des translocations	98
10.7. Courbes d'étalonnage	100
10.8. Exemples d'utilisation de la méthode FISH en dosimétrie biologique rétrospective	101
11. CONDENSATION PRÉMATURÉE DES CHROMOSOMES (PCC).....	109
11.1. PCC par fusion en mitose.....	109
11.2. PCC chimio-induite.....	114
11.3. Accident radiologique étudié en estimant la fréquence des anneaux après une PCC.....	117
12. ANALYSE DES MICRONOYAUX PAR BLOCAGE DE LA CYTOKINÈSE (CBMN)	119
12.1. Généralités.....	119
12.2. Culture des lymphocytes pour le test CBMN.....	120
12.3. Critères d'analyse pour le test CBMN	120
12.4. Traitement des données du test CBMN.....	123
12.5. Application du test CBMN en dosimétrie biologique.....	127
13. AUTOMATISATION DES TESTS CHROMOSOMIQUES.....	133
13.1. Traitement automatisé des échantillons	133
13.2. Analyse automatique d'images	134
13.3. Système de gestion de l'information de laboratoire (LIMS)	140
14. ÉVÉNEMENTS AFFECTANT UN GRAND NOMBRE DE PERSONNES.....	143
14.1. Cas de figure possibles d'exposition aux rayonnements	143
14.2. Historique	144
14.3. Rôle de la dosimétrie biologique.....	146
14.4. Stratégies applicables à ce type d'événement.....	148
15. DÉMARCHES QUALITÉ ET NORMES ISO	151
15.1. Justification des programmes d'assurance et de contrôle de la qualité	151
15.2. Structure actuelle de la norme ISO 19238	153
15.3. Application au tri d'une population	154
16. SÉCURITÉ DU PERSONNEL DE LABORATOIRE	159
16.1. Infections.....	159
16.2. Optique	160
16.3. Substances chimiques.....	160
RÉFÉRENCES	163
ANNEXE I : ANALYSE DES DICENTRIQUES	185
ANNEXE II : DÉNOMBREMENT DES TRANSLOCATIONS PAR LA MÉTHODE FISH.....	189
ANNEXE III : CONDENSATION PRÉMATURÉE DES CHROMOSOMES	193

ANNEXE IV : ANALYSE DES MICRONOYAUX PAR BLOCAGE DE LA CYTOKINÈSE	199
ANNEXE V : CRITÈRES DE DÉTERMINATION DE L'INDEX MITOTIQUE	205
ANNEXE VI : ANALYSE STATISTIQUE	207
ANNEXE VII : EXEMPLE DE COMPARAISON INTERLABORATOIRES DESTINÉE À CONTRÔLER L'ASSURANCE DE LA QUALITÉ	217
RÉFÉRENCES POUR LES ANNEXES	221
LISTE DES ABRÉVIATIONS	223
DÉFINITIONS	227
PERSONNES AYANT COLLABORÉ À LA RÉDACTION ET À L'EXAMEN.....	241
REMERCIEMENTS POUR LES COMMENTAIRES REÇUS	243

1. INTRODUCTION

1.1. GÉNÉRALITÉS

La biologie dosimétrique, qui repose sur l'analyse de chromosomes dicentriques colorés de manière uniforme, est utilisée depuis le milieu des années 1960. La période qui a suivi a connu de grandes améliorations, au point que cette technique fait systématiquement partie des programmes de radioprotection dans de nombreux États Membres [1]. Son application à des milliers de cas de surexposition réelle ou suspectée a montré l'intérêt de cette méthode et a également contribué à préciser ses limites. La dosimétrie biologique, qui utilise des biomarqueurs des altérations chromosomiques, est particulièrement importante car, contrairement aux mesures physiques de doses, elle tient compte des différences de sensibilité entre individus.

Il convient de noter que les aberrations chromosomiques sont utilisées comme dosimètre et fournissent une donnée souvent très importante qui s'intègre à l'ensemble des informations qui doivent être collectées et analysées en cas d'investigation liée à une situation d'urgence nucléaire ou radiologique¹ [2]. Les informations diagnostiques peuvent avoir pour origine d'autres biomarqueurs des rayonnements, des manifestations cliniques que les personnes peuvent présenter, ainsi que des mesures physiques, par exemple celles qui sont réalisées à l'aide de dosimètres thermoluminescents, de détecteurs à luminescence stimulée optiquement ou d'une résonance paramagnétique électronique sur des parties des personnes irradiées (par exemple l'émail dentaire, les ongles, des échantillons d'os, etc.) ou sur des objets associés à celles-ci (par exemple montre, lunettes, etc.). Les renseignements obtenus en posant de simples questions aux patients et aux témoins, par exemple sur le moment où ils se trouvaient dans la région concernée ou sur la distance qui les séparait de la source de rayonnement, peuvent également aider les spécialistes à calculer les doses reçues. Toutes ces sources d'information peuvent être comparées aux résultats de la dosimétrie biologique afin d'aboutir à une meilleure évaluation de la situation.

Pendant de nombreuses années, le dénombrement des dicentriques dans les lymphocytes sanguins a été la seule méthode de dosimétrie biologique disponible et, aujourd'hui encore, il constitue la technique la plus courante. Les dicentriques et les autres aberrations peuvent également être observées dans d'autres cellules, comme les fibroblastes de la peau ou les cellules épithéliales buccales, mais cela sort du périmètre de la présente publication, laquelle se limite aux examens réalisés sur des lymphocytes sanguins. Néanmoins, il existe plusieurs autres paramètres biologiques des lymphocytes – micronoyaux, translocations et aberrations présentes dans les chromosomes prématurément condensés (Fig. 1 et tableau 1) – qui peuvent aujourd'hui être étudiés. Ils font l'objet d'une description dans le présent ouvrage.

¹ Dans ce contexte, « situation d'urgence radiologique » a le même sens que « situation d'urgence nucléaire ou radiologique ».

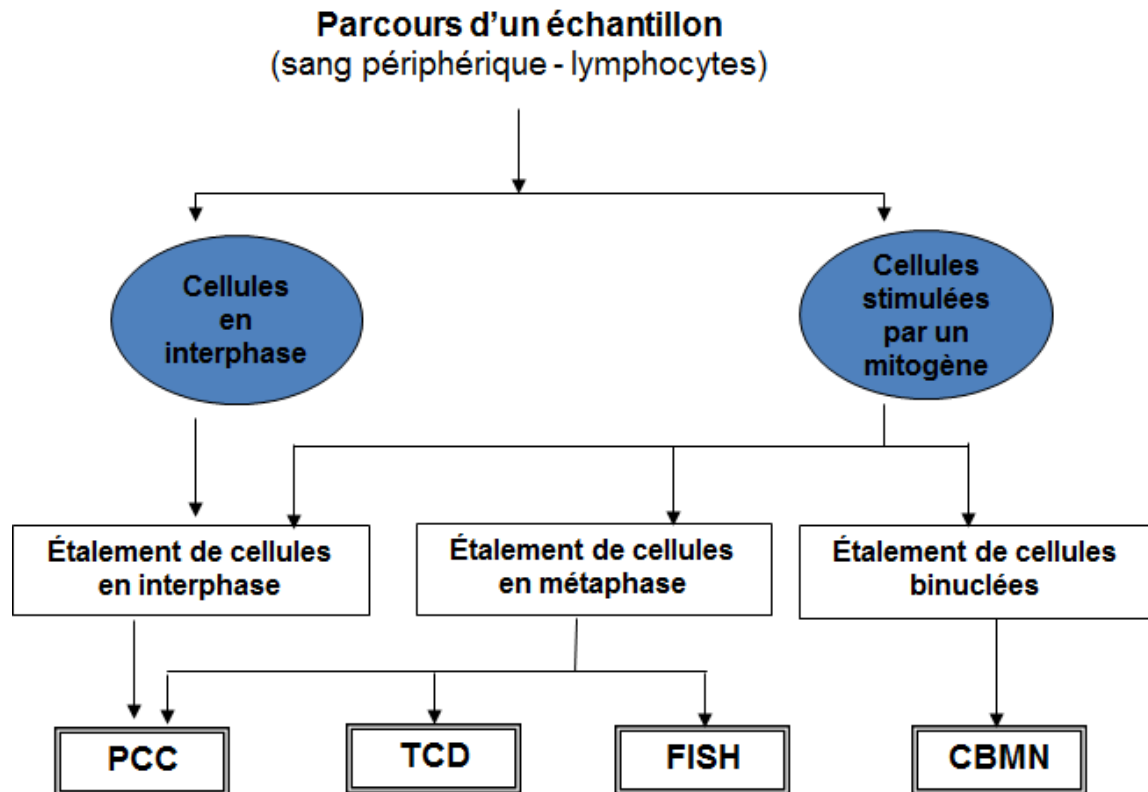


FIG. 1. Schéma du parcours d'un échantillon de lymphocytes du sang périphérique pour différents tests d'aberrations chromosomiques utilisés pour évaluer les doses reçues, à savoir la condensation prématurée des chromosomes (PCC), le test des chromosomes dicentriques (et des anneaux) sur des étalements métaphasiques (TCD), l'analyse des translocations sur des étalements métaphasiques par hybridation fluorescente in situ (FISH) et l'analyse des micronoyaux par blocage de la cytokinèse (CBMN).

TABLEAU 1. COMPARAISON ENTRE LES DIFFÉRENTS TESTS D'ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES UTILISÉS POUR ÉVALUER LES DOSES REÇUES^a

	Tests d'aberrations chromosomiques			
	Condensation prématurée des chromosomes (PCC)	Dicentriques (et anneaux) (TCD)	Hybridation fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	Micronoyaux par blocage de la cytokinèse (CBMN)
Aberrations généralement dénombrées en dosimétrie biologique	Fragments de chromosomes en excès ; dicentriques ^b et anneaux translocations ^b	dicentriques ^b (et anneaux)	dicentriques ^b (et anneaux) translocations ^b	micronoyaux ponts nucléoplasmiques
Types d'expositions pour lesquelles la technique est généralement utilisée	aiguë exposition récente	aiguë prolongée exposition récente	aiguë prolongée exposition ancienne	aiguë prolongée exposition récente
Équivalent photonique, plage de dose adéquate (en Gy) pour évaluer une dose à l'organisme	0,2 à 20	0,1 à 5	0,25 à 4	0,3 à 4
Utile pour les expositions partielles	Oui	Oui	s.o. ^c	s.o.
Utile pour évaluer les doses reçues à des fins de tri	Oui	Oui	s.o.	Oui
Normalisation	n.d. ^d	Normes ISO [3, 4]	n.d.	Norme ISO (à l'étude) et [5]

^a Tableau réalisé en s'inspirant de celui qui figure dans le *TMT Handbook* [6].

^b Aberrations chromosomiques particulières qui sont en général détectées à l'aide de sondes centromériques et de sondes d'hybridation de l'ADN spécifiques qui marquent le chromosome entier.

^c s.o. : sans objet.

^d n.d. : non disponible.

D'autres méthodes, qui ne rentrent pas dans le cadre de la présente publication, se servent de données moléculaires qui permettent de dénombrer les cassures de l'ADN ou d'évaluer les changements apportés à la régulation de certains gènes sentinelles ou la présence de biomarqueurs protéiques qui peuvent être détectés dans les cellules, dans le plasma sanguin ou dans le sérum. Dans ce domaine, de nouvelles techniques apparaissent rapidement et plusieurs analyses qui se trouvent à différents stades de développement et de vérification existent. La diversité des méthodes de dosimétrie biologique disponibles à l'heure actuelle a conduit à proposer une approche multiparamètre en cas d'investigation portant sur une personne surexposée [7]. Par ailleurs, le fait de disposer de plusieurs techniques différentes peut être particulièrement utile lorsqu'un laboratoire doit faire face à un événement qui a fait de nombreuses victimes.

Lors d'une investigation portant sur une urgence radiologique, il est important de pouvoir estimer la dose reçue par les personnes exposées pour plusieurs raisons. En cas de forte exposition (> 1 Gy aiguë), des précisions sur la dose reçue aident les médecins à planifier la thérapie et les alertent sur les effets sanitaires déterministes (lésions tissulaires) qui pourraient apparaître dans les semaines et les mois suivants.

Lorsque l'exposition est inférieure au seuil au-delà duquel un traitement est nécessaire, la dosimétrie est très utile au médecin pour pouvoir informer les personnes irradiées sur le risque de développer des effets stochastiques, c'est-à-dire un cancer. Les individus qui ont été très faiblement exposés sont souvent rassurés d'apprendre qu'aucune augmentation significative des lésions chromosomiques n'a été découverte. Cela est particulièrement vrai lorsque les détails de l'événement sont mal connus et qu'aucune mesure ou calcul de la dose physique n'existe. La dosimétrie biologique est parfois alors le seul moyen de quantifier la dose reçue même si, comme on le verra plus loin, il subsiste des problèmes de quantification liés à des facteurs comme les expositions non uniformes, l'incorporation de radionucléides et les prélèvements sanguins effectués tardivement.

La biologie dosimétrique joue également un rôle utile dans la période qui suit immédiatement une urgence radiologique ou un attentat terroriste lorsque de nombreuses personnes peuvent avoir été exposées. Dans ces situations, il est nécessaire de trier les victimes à l'aide de critères biologiques et cliniques qui permettent dès le début et rapidement de repérer les individus que l'on soupçonne d'avoir été exposés à des doses qui mettent leur vie en danger et de fixer des seuils de dose pour ce tri.

1.2. OBJECTIF

L'objectif principal de la présente publication est de donner au lecteur des informations techniques qui lui permettent de choisir et de mettre en œuvre l'analyse cytogénétique adéquate de manière uniforme afin d'évaluer des doses d'une façon comparable à la suite d'une exposition aux rayonnements ionisants. Elle décrit les quatre méthodes cytogénétiques possibles (Fig. 1 et tableau 1) qui existent aujourd'hui. Il faut pouvoir être en mesure d'appliquer immédiatement toutes ces techniques dans les principales régions géographiques mais, à un certain degré de coopération et d'échanges internationaux, il n'est pas nécessaire de disposer de toutes ces méthodes dans chaque laboratoire national de dosimétrie biologique.

1.3. CHAMP D'APPLICATION ET ÉVOLUTION DE LA PRÉSENTE PUBLICATION

Le premier manuel de cette série [1] portait exclusivement sur l'analyse des dicentriques. Publié à un moment opportun, il a constitué une étape utile et fréquemment citée dans le domaine de la dosimétrie biologique. Cette publication était destinée à être lue à deux niveaux. Tout d'abord, elle pouvait servir de manuel de laboratoire et de source d'information pratique et détaillée dans un contexte technique. Par ailleurs, elle avait pour objectif d'offrir une brève synthèse technique sur le sujet à des fins d'enseignement en radiobiologie ou pour des personnes comme des physiciens médicaux, des juristes ou des décideurs, lesquels peuvent avoir besoin de connaissances en dosimétrie biologique dans le cadre de leur travail.

Dans une édition révisée du présent manuel [8], publiée 15 ans plus tard, ont été ajoutées la peinture chromosomique par FISH, la condensation prématurée des chromosomes (PCC) et l'analyse des micronoyaux (CBMN).

Le présent document a été réalisé une décennie après. La plus grande partie du texte d'origine qui concerne le test des chromosomes dicentriques (et des anneaux) sur des étalements métaphasiques (TCD) reste valable et a été conservée même si, lorsque cela été nécessaire, une mise à jour a été effectuée. Les analyses par FISH, PCC et CBMN ont été considérablement revues à la lumière des recherches et des expériences récentes dans ce

domaine. Il était inévitable que, pendant les 25 années couvertes par ces trois éditions, la dosimétrie cytogénétique se développât dans des proportions importantes et devienne plus complexe sur le plan technique. Toutefois, la présente édition est conçue de telle sorte qu'un laboratoire qui ne dispose que de l'appareillage minimal et se lance dans cette activité ne doit pas trouver le texte trop difficile. Il est possible de n'extraire que les parties des sections qui concernent les deux tests les plus importants à mettre en place, à savoir l'analyse des dicentriques et l'analyse des micronoyaux. La présente publication donne des conseils éclairants sur la manière de les réaliser en pratique, en construisant des courbes dose-effet et en interprétant les données obtenues lors d'investigations portant sur des cas de surexposition.

Ces dernières années, les dispositifs mis en place pour effectuer un tri en cas d'événement radiologique affectant un grand nombre de personnes ont constitué une évolution marquante et figurent dans la présente édition. Celle-ci donne des éléments sur la manière dont un laboratoire de dosimétrie biologique peut faire face à un afflux de cas en réalisant des tests en vue d'effectuer un premier tri, en réduisant le temps d'analyse grâce à la microscopie assistée par ordinateur et en travaillant en réseau avec d'autres laboratoires. En même temps que ces moyens renforcés permettant un travail en commun en intervention d'urgence, sont apparues des directives internationales sur l'assurance de la qualité, le contrôle de la qualité et la participation à des comparaisons interlaboratoires. Ces questions sont aujourd'hui traitées dans la présente édition.

En dosimétrie biologique, les analyses cytogénétiques multiples sont utiles car aucun test seul n'est suffisamment complet pour tous les cas d'irradiation possibles, notamment les expositions aiguës en début d'événement, les expositions partielles, les expositions passées (par exemple un échantillonnage biologique effectué plusieurs années après une exposition) et les tris réalisés lors d'événements radiologiques affectant un grand nombre de personnes.

1.4. STRUCTURE

La présente publication est organisée comme suit. Après l'introduction (section 1), la section 2 explique ce que signifie la « dose » évaluée à partir des lésions chromosomiques et la rattache à la valeur de la dose individuelle issue des méthodes physiques et à la notion de dose équivalente telle que l'a définie la Commission internationale de protection radiologique (CIPR). La section 3 présente des données biophysiques et microdosimétriques sur l'induction de lésions chromosomiques. Elle est suivie, dans la section 4, par une brève description des lymphocytes humains, parmi lesquels les cellules T sont utilisées en dosimétrie biologique. La section 5 donne un aperçu rapide de la structure des chromosomes. La section 6 présente les types de lésion de l'ADN induites par une interaction avec des rayonnements ionisants, ainsi qu'une description et une classification des altérations chromosomiques que l'on peut observer dans les lymphocytes après une irradiation. Dans la section 7 figurent les règles à respecter pour effectuer les prélèvements sanguins tandis que la section 8 porte sur les critères physiques, biologiques et statistiques à respecter pour pouvoir construire des courbes dose-effet. Les sections 9, 10, 11 et 12 décrivent les quatre techniques de dosimétrie cytogénétique étudiées, soit respectivement l'analyse des dicentriques, le dénombrement des translocations par hybridation fluorescente *in situ*, la condensation prématurée des chromosomes et l'analyse des micronoyaux. La section 13 porte sur les progrès considérables qui ont été accomplis ces dernières années pour automatiser l'analyse des tests chromosomiques et la section 14 sur une autre évolution récente, à savoir la manière dont les acteurs de la dosimétrie cytogénétique peuvent réagir le plus efficacement lors d'événements qui affectent un grand nombre de personnes. Dans la section 15, on trouvera des indications et des procédures pour l'assurance de la qualité et l'ultime section, la section 16, traite de la sécurité du personnel de laboratoire qui effectue des analyses cytogénétiques. La liste complète de références mise à jour est suivie de plusieurs annexes, les quatre premières présentant des protocoles de travail

reproductibles pour le TCD, le dénombrement des translocations par la méthode FISH, la PCC et l'analyse CBMN. L'annexe V présente la méthode qui permet de calculer l'index mitotique et l'annexe VI offre un aperçu de plusieurs tests statistiques couramment utilisés pour analyser des données en dosimétrie biologique et à des fins de recherche dans ce domaine. La dernière, l'annexe VII, contient un exemple réel d'exercice interlaboratoires d'assurance de la qualité portant sur le dénombrement des dicentriques et sur l'estimation des doses reçues. L'ouvrage se termine par une liste des abréviations utilisées, un glossaire des termes techniques importants et enfin par la liste des personnes ayant collaboré à la rédaction et à l'examen de cette troisième édition, fortement revue.

2. APPLICATION DES NOTIONS DE DOSE À LA DOSIMÉTRIE BIOLOGIQUE

La présente section donne de brèves informations sur des termes de dosimétrie, sur la signification physique de la dose absorbée et sur son interprétation à des fins d'évaluation biologique (cytogénétique) de la dose résultant d'une exposition accidentelle à différents types de rayonnements ionisants.

Les aberrations chromosomiques présentes dans les lymphocytes sont utilisées pour estimer la dose absorbée par des personnes surexposées. La correspondance entre leur nombre et cette dose est effectuée grâce à une courbe d'étalonnage dose-effet. Cette dernière courbe est obtenue en exposant du sang *in vitro* à des doses de rayonnement d'une qualité adéquate. Les doses reçues par les échantillons doivent être traçables à un étalon primaire ou secondaire grâce à un instrument de mesure physique, par exemple une chambre d'ionisation.

Les appareils qui mesurent les photons et les neutrons sont en général étalonnés par le kerma dans l'air, par conséquent, lorsque l'on s'intéresse aux doses délivrées à des tissus (ou à des échantillons de sang), il convient d'appliquer des facteurs de correction. Pour les photons, ceux-ci découlent des coefficients d'absorption d'énergie massique et les valeurs à utiliser figurent dans des tables de référence [9]. Pour les neutrons, les instruments de mesure peuvent être constitués de matériau équivalent tissu et ainsi indiquer la dose au tissu. Autre solution possible, certains laboratoires primaires ou secondaires de dosimétrie effectuent un étalonnage sur la fluence des neutrons, laquelle peut être transformée en dose au tissu.

Le paramètre biologique mesuré étant les aberrations chromosomiques, celles-ci sont, en toute rigueur, le reflet de la dose reçue par les noyaux de cellule. Pour les photons et les neutrons, la dose aux tissus mous constitue une très bonne approximation de la dose reçue par les noyaux. En effet, le diamètre du noyau des lymphocytes est petit – 6 μm – si on le compare au parcours des particules secondaires produites par les photons comme par les neutrons. Il est donc possible d'appliquer le principe de Bragg-Gray [10].

Il existe néanmoins quelques exceptions. En cas d'exposition à de l'eau tritiée, par exemple, la distance parcourue par les particules bêta est comprise entre 0 et 7 μm . De ce fait, la majeure partie de la dose reçue par le noyau d'une cellule est due aux émissions du tritium contenu dans ce noyau. Dans ce cas, la dose au noyau du lymphocyte sert de base à l'étalonnage et elle dépend de la teneur en eau du noyau par rapport à celle du sang [11]. Autre exemple, l'exposition à des neutrons de faible énergie (inférieure à 100 keV), pour lesquels les protons de recul ont un parcours inférieur à 2 μm . Dans ce cas, la dose reçue par le noyau d'un lymphocyte dépend de sa teneur en hydrogène. Il est toutefois peu probable qu'un accident entraîne une exposition à des neutrons principalement dans cette gamme d'énergie.

La valeur de la dose obtenue en reportant la fréquence mesurée pour certaines aberrations, par exemple les dicentriques, sur une courbe d'étalonnage correspond à une dose moyenne absorbée par les lymphocytes. Elle est à peu près égale à une dose moyenne à l'organisme car les lymphocytes sont présents dans la plus grande partie du corps et sont mobiles. Par des méthodes qui seront décrites plus loin dans la présente publication, il est parfois possible d'affiner l'estimation de la dose à l'organisme en cas d'irradiation non uniforme ou partielle due à une source externe.

La plupart des radionucléides incorporés provoquent également des irradiations non uniformes mais, dans ces situations, la dose à évaluer n'est pas celle qui a été reçue par les lymphocytes mais la dose aux organes ou tissus spécifiques où les particules radioactives se sont déposées. L'intérêt de l'analyse chromosomique est souvent quelque peu limité car, à titre d'exemple, à la suite de l'incorporation de radio-iode, des aberrations seront induites dans les lymphocytes mais celles-ci ne permettent pas d'évaluer la dose reçue par la thyroïde.

Les nucléides qui se répandent dans une grande partie de l'organisme, comme l'eau tritiée ou le radiocésium, constituent une exception car l'expérience a montré que, dans ce cas, l'analyse des aberrations présentes dans les lymphocytes donne des estimations de dose pertinentes.

Lorsqu'une dosimétrie biologique rétrospective est effectuée 10 ans ou plus après une exposition et que les translocations sont mesurées par la méthode FISH, la dose estimée représente la dose moyenne reçue par la moelle osseuse rouge. En effet, l'exposition initiale concernait les cellules souches des lymphocytes qui font l'objet d'une mesure. Pour des écarts de temps moins longs, les translocations sont observées dans un mélange de lymphocytes à vie longue et de descendants des cellules souches irradiées.

C'est souvent le résultat d'une mesure de dose de routine enregistrée par un dosimètre individuel qui déclenche une investigation. Ces dosimètres sont normalement étalonnés pour mesurer l'équivalent de dose individuel à une profondeur donnée. Cette grandeur opérationnelle donne une estimation assez juste de la dose efficace ou de la dose équivalente pour la plupart des champs de rayonnement que l'on rencontre en pratique. La dose efficace et la dose équivalente sont destinées à être utilisées en radioprotection. Elles ne conviennent pas pour déterminer les effets de doses absorbées élevées.

Il est donc recommandé aux laboratoires qui effectuent de la dosimétrie biologique d'étalonner leurs procédures en fonction de la dose absorbée (en grays) en donnant, lorsqu'il y a lieu, suffisamment de détails pour caractériser le type et la qualité des rayonnements [12-15].

3. DONNÉES BIOPHYSIQUES SUR LES LÉSIONS CHROMOSOMIQUES

La présente section donne des informations destinées à mieux comprendre et interpréter les principes qui sous-tendent la méthodologie présentée dans les sections suivantes. Pour plus de renseignements, il convient de consulter les références [16] et [17].

Lorsqu'un rayonnement ionisant pénètre dans un objet, il provoque l'éjection d'électrons appartenant aux atomes qu'il traverse et donc la formation d'ions chargés positivement. La distribution des premiers événements – ionisations et excitations – le long de la trajectoire d'une particule ionisante varie en fonction du type de rayonnement. L'intervalle moyen entre ces événements décroît avec la charge et la masse des particules (neutrons ou particules alpha). Comme on le verra plus loin, il est nécessaire de définir un rayonnement particulier par la quantité d'énergie déposée par unité de distance parcourue, étant donné que ces caractéristiques influent sur l'aptitude de ce rayonnement à induire des effets biologiques divers.

Le transfert linéique d'énergie (TLE) constitue une grandeur utile pour décrire le dépôt d'énergie pour différents types de rayonnement. Pour des rayonnements dont la plage de TLE est étendue, il est possible de calculer un TLE moyen. Celui-ci peut être obtenu en pondérant chacun des intervalles de TLE par l'énergie communiquée (ou par la dose) ou par la longueur du chemin parcouru. Il apparaît que ce dernier type de TLE constitue la meilleure grandeur pour décrire les variations de l'efficacité biologique relative (EBR) pour les lésions chromosomiques [18]. Pour des rayons X de 250 kVp (tension de crête en kilovolts), il s'élève à environ 2 keV/μm contre 100-2 000 keV/μm ou plus pour des particules lourdes chargées. Le point important à prendre en compte est que la quantité d'énergie déposée par micromètre de parcours pour un type de rayonnement donné peut connaître des variations considérables, ce qui a indiscutablement une incidence sur l'efficacité biologique des différents types de rayonnement.

L'une des conséquences de la manière dont l'ionisation est distribuée pour des rayonnements dont le TLE diffère est la fréquence de répartition des aberrations chromosomiques entre les cellules. Lorsque le TLE est faible, l'ionisation, quelle que soit la dose, est répartie aléatoirement entre les cellules, notamment parce que le nombre de parcours est très élevé. Les lésions de l'ADN sont dans ce cas elles aussi distribuées de manière aléatoire entre les cellules et, en prenant l'hypothèse que la probabilité que toute lésion puisse se transformer en aberration est constante, les aberrations seront réparties aléatoirement entre les cellules. On a pu montrer que tel était bien le cas pour une irradiation X ou gamma dont les aberrations chromosomiques induites suivaient une loi de Poisson. Lorsque le TLE est élevé, les parcours ionisants ne sont pas répartis de manière aléatoire entre les cellules et l'énergie se dépose davantage en « paquets discrets ». Le nombre de parcours est bien moindre que lorsque le TLE est faible à dose équivalente. Le résultat, en partant de la même hypothèse que pour les rayonnements de faible TLE, est que les aberrations induites ne sont pas distribuées aléatoirement entre les cellules. Quelle que soit la fréquence moyenne des aberrations, on trouvera davantage de cellules comportant plusieurs ou aucune aberrations que ne le prévoit la loi de Poisson. En dosimétrie biologique, ces considérations peuvent être utiles, comme on le verra au paragraphe 9.7.4.3, surtout pour les expositions non uniformes ou partielles.

L'aptitude des différents types de rayonnement à avoir une incidence biologique particulière est généralement représentée par le terme « efficacité biologique relative » (EBR). L'EBR se définit comme le rapport de la dose d'un rayonnement de référence (en général, des rayons X de faible énergie) à celle du rayonnement considéré qui produit le même effet biologique. Soit la formule suivante :

$$EBR = \frac{\text{dose de rayons X de 200-250 kVp produisant l'effet Z}}{\text{dose de rayonnement produisant l'effet Z}} \quad (1)$$

Il convient de souligner que les rayons X sont deux à trois fois plus efficaces que les rayons gamma. Le rayonnement de référence doit donc toujours être défini [19].

La figure 2 montre les courbes dose-effet de forme caractéristique linéaire et linéaire quadratique pour des rayonnements dont le TLE est respectivement élevé et faible.

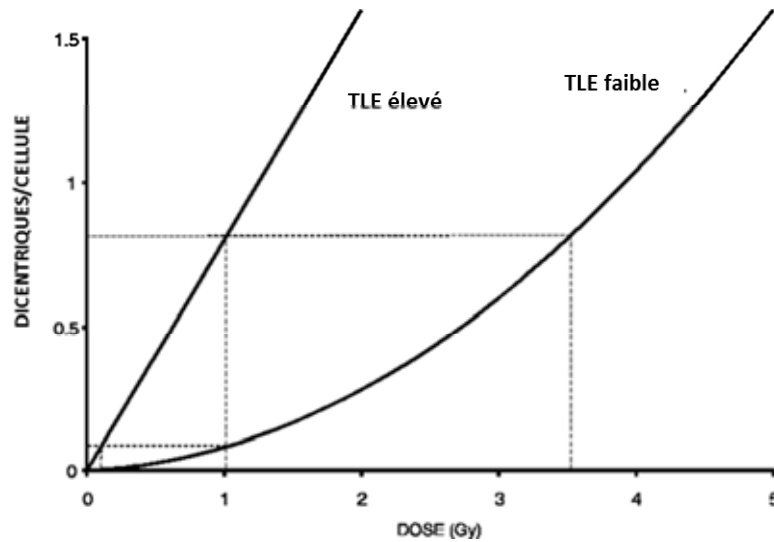


FIG. 2. Courbes dose-effet classiques, de forme linéaire ou linéaire quadratique, et montrant comment l'EBR évolue avec la fréquence des aberrations [8].

L'explication de la forme des courbes figure plus loin dans la présente section. L'EBR correspondant à l'association d'une proportion élevée de dicentriques et de doses élevées est représentée par la ligne horizontale en pointillés du dessus, ligne qui coupe les deux courbes à 1,0 et 3,5 Gy, respectivement. L'EBR est égale au rapport des deux doses soit $3,5/1,0 = 3,5$. La ligne horizontale en pointillés du dessous coupe les courbes respectivement à 0,1 et 1,0 Gy, ce qui conduit à une EBR plus élevée : $1,0/0,1 = 10$. L'EBR maximale, qui correspond au cas des faibles doses, généralement noté EBR_m , correspond au rapport des coefficients linéaires des deux courbes.

Il a été démontré que pour de nombreux paramètres (y compris les mutations, la destruction des cellules et les aberrations chromosomiques) la courbe qui décrit les variations de l'ERB en fonction du TLE est en forme de cloche (Fig. 3).

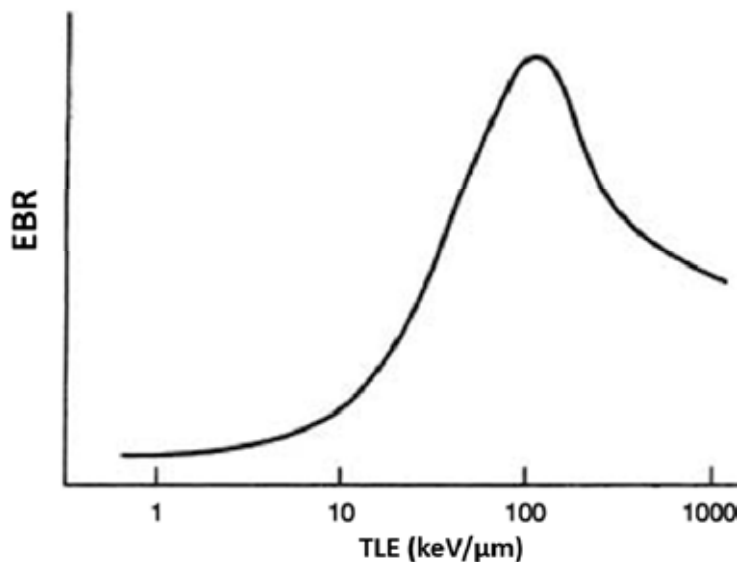


FIG. 3. Relation générale entre l'EBR et le TLE [8].

Cette courbe montre que l'EBR augmente jusqu'à une valeur optimale de 100 keV/μm puis décroît lorsque le TLE est plus élevé. C'est pour l'induction des aberrations chromosomiques que l'interprétation de la courbe est la plus intéressante. On se servira ici des aberrations dicentriques à titre d'exemple, notamment parce qu'elles supposent une interaction (ou un échange) entre deux chromosomes et aussi parce qu'il s'agit du type d'aberration le plus fréquemment analysé en dosimétrie biologique.

Pour qu'une aberration dicentrique apparaisse, il faut qu'une lésion de l'ADN soit induite dans deux chromosomes non dupliqués de sorte que les chromosomes endommagés puissent donner lieu à un échange. Celui-ci peut se produire soit à cause d'une réparation incorrecte des cassures de brins d'ADN directement induites par le rayonnement soit en raison d'une erreur pendant la réparation des lésions par excision de base. Il apparaît donc que les lésions des deux chromosomes doivent être proches et situées dans ce que l'on appelle la « distance de jointure » pour qu'une mauvaise réparation puisse avoir lieu. Cette zone peut être considérée comme la cible. À l'intérieur de cette cible, il faut provoquer deux lésions, une sur la double hélice d'ADN de chaque chromosome non dupliqué. Cette cible, ou zone d'interaction, est petite : on considère en général qu'elle fait moins d'1,0 μm de diamètre. Le TLE des rayons X est faible, tout comme, pour ce type de rayon, la fréquence d'ionisation par unité de longueur parcourue. Il est par conséquent peu probable que deux ionisations induites par le même parcours se produisent à l'intérieur de la cible. Il faut deux ionisations, au minimum, pour provoquer des lésions sur les deux chromosomes qui formeront un chromosome dicentrique. Il est bien plus probable que ces deux lésions soient provoquées par des ionisations résultant de deux trajectoires différentes. La fréquence des dicentriques produites par un parcours est proportionnelle à la dose, tandis que la fréquence de ceux qui sont induits par deux parcours est proportionnelle au carré de la dose. À des doses inférieures à 0,5 Gy, la probabilité que deux trajectoires traversent une cible est suffisamment faible pour que les dicentriques soient produites quasi exclusivement par un seul trajet et à une fréquence faible. Si la dose augmente, le nombre de dicentriques induites par deux parcours augmentera également. Par conséquent, la courbe dose-effet pour les dicentriques induites par un rayonnement de faible TLE (Fig. 2) correspond à la somme des événements à un parcours et à

deux parcours, ceux-là étant beaucoup plus fréquents quand la dose est faible et ceux-ci beaucoup plus nombreux à dose élevée. On considère généralement que la fréquence des dicentriques suit la formule (2) :

$$F = C + \alpha D + \beta D^2 \quad (2)$$

où:

F est la fréquence des dicentriques,

D est la dose,

C est le contrôle (fréquence naturelle),

α est le coefficient linéaire et

β est le coefficient de la dose au carré.

Le rapport α/β peut être appelé dose de croisement. Il est égal à la dose à laquelle les composantes linéaire et quadratique contribuent à parts égales à la formation de dicentriques.

Au fur et à mesure que le TLE du rayonnement s'approche du maximum, il devient plus probable que deux lésions soient induites à l'intérieur de la cible par deux ionisations le long du même parcours, ce qui a deux conséquences. Lorsque le transfert linéique d'énergie est supérieur à environ 20 keV/ μ m, la courbe dose-effet devient linéaire (Fig. 2). De plus, l'aptitude, ou EBR, des rayonnements à TLE plus élevé à induire des dicentriques augmente avec le TLE du fait que la probabilité qu'un seul parcours provoque la formation de deux lésions s'accroît. Il est beaucoup plus facile de provoquer les deux lésions nécessaires par un seul trajet que par le processus aléatoire qui consiste à provoquer une lésion par un deuxième trajet à proximité d'une lésion engendrée par un autre parcours, surtout lorsque la dose, et donc la densité des parcours, est faible. L'EBR maximale correspond à la valeur de TLE pour laquelle les ionisations sont espacées de manière optimale afin de provoquer des lésions sur chacune des deux hélices d'ADN qui participent à la formation de dicentriques sans « gaspiller » d'énergie, c'est-à-dire, sans engendrer plus d'ionisations dans la cible qu'il n'est nécessaire. Cependant, si le TLE dépasse cette valeur optimale, l'énergie déposée dans la cible sera plus élevée que nécessaire et, dans ces circonstances, l'EBR suit la courbe inverse du TLE, comme le montre le tracé de l'EBR en fonction du TLE présenté sur la figure 3.

Synthèse des explications données ci-dessus : pour les rayonnements à faible TLE, les protons de haute énergie et les neutrons rapides, la courbe dose-effet (fig. 2) est non linéaire et c'est du modèle linéaire quadratique qu'elle est la plus proche. Pour les rayonnements dont le TLE est élevé (neutrons de fission et particules alpha), cette courbe est linéaire ou quasi linéaire ; l'EBR augmente avec le TLE jusqu'à un maximum d'environ 100 keV/ μ m puis décroît pour des valeurs de TLE plus élevées (Fig. 3). Quelle est l'incidence du débit de dose sur la fréquence des altérations cytogénétiques ? Dans le cadre de la présente analyse, il est plus facile de s'intéresser aux dicentriques même si les principes énoncés s'appliquent également aux micronoyaux et aux translocations. On sait que les lésions induites sur l'ADN qui sont susceptibles d'entraîner l'apparition de dicentriques peuvent être réparées en quelques minutes ou plusieurs heures, en fonction de la lésion en jeu. Si les deux lésions nécessaires pour induire la formation d'une dicentrique sont provoquées par des parcours distincts et que le débit de dose est faible, il est probable que la lésion engendrée par le premier trajet soit réparée avant que la cible ne soit traversée par un deuxième trajet et qu'ainsi une deuxième lésion se forme. Même si deux lésions ont été engendrées à l'intérieur de la cible, elles ne peuvent pas se combiner pour entraîner la formation d'une dicentrique. La probabilité qu'un tel événement se produise décroît avec le débit de dose : plus ce dernier est faible, plus la fréquence des parcours ionisants par unité de temps est basse et, par

conséquent, plus le temps disponible pour réparer la première lésion avant que la deuxième ne se forme est élevé. Ainsi, pour les rayonnements dont le TLE est faible, la situation est la suivante : la diminution du débit de dose entraîne une baisse de la fréquence des dicentriques par unité de dose. Lorsque le débit de dose est très faible, ce qui a pour conséquence que la probabilité d'apparition d'aberrations dues à deux parcours est pratiquement nulle, la courbe dose-effet pour les dicentriques est linéaire, avec une pente égale à celle de la partie linéaire de la courbe linéaire quadratique pour les expositions aiguës. Il en va de même pour les doses fractionnées. Si deux doses ou plus sont reçues, les lésions engendrées par la première peuvent se combiner avec les lésions provoquées par la seconde ou par une dose ultérieure, à condition que le laps de temps entre la première dose et la suivante n'excède pas le temps nécessaire pour réparer les lésions induites par la première ou par la dose précédente. Par conséquent, si les doses sont espacées d'une durée suffisamment longue pour qu'une réparation puisse avoir lieu pendant ce temps, la fréquence des dicentriques engendrées par la dose totale (somme des doses fractionnées) est inférieure à celle qui résulte de la dose totale si celle-ci est délivrée en une seule fois.

La situation peut être différente pour les rayonnements dont le TLE est élevé étant donné que, dans ce cas, les deux lésions qui induisent la formation de dicentriques ne sont provoquées que par un seul parcours. De ce fait, la diminution du débit de dose n'a aucun impact sur la fréquence des dicentriques car la réparation des lésions durant des expositions plus longues n'a pas d'incidence. Il en va de même pour les expositions fractionnées : la réparation des lésions entre les doses fractionnées n'a que peu de conséquences étant donné que toutes deux sont provoquées simultanément par un seul trajet.

Les points examinés dans la présente section font apparaître les facteurs à prendre en compte en pratique en dosimétrie biologique. La qualité du rayonnement (TLE) a une incidence sur l'aspect de la courbe dose-effet. Par conséquent, lorsque l'on estime une dose, la courbe type à utiliser doit correspondre à une qualité de rayonnement identique, ou quasi identique, à celle du type de rayonnement particulier qui est en jeu dans la situation d'urgence. Il s'agit d'une contrainte importante car l'EBR relative aux lésions chromosomiques induites connaît des différences notables pour divers types de rayonnement dont le TLE est faible même si, en radioprotection, ceux-ci sont pondérés de la même manière ($W_R = 1$) [19]. Lorsque le TLE est faible, la diminution du débit de dose entraîne également une baisse de la fréquence des dicentriques par unité de dose, de sorte que, à débit de dose très faible, la courbe est linéaire et est identique à la partie linéaire de la courbe dose-effet associée aux expositions aiguës. Une courbe linéaire peut être obtenue à partir d'une courbe type « expositions aiguës » pour les rayons X et/ou gamma et peut éventuellement être utilisée comme courbe type pour les expositions chroniques en appliquant les corrections nécessaires pour tenir compte de la durée d'exposition et de la durée de vie des lymphocytes. Lorsque le TLE est élevé, la modification du débit de dose n'a pas d'incidence sur la fréquence des dicentriques. Par conséquent, la courbe obtenue pour les expositions aiguës peut être utilisée pour les expositions chroniques ou fractionnées, en tenant là aussi compte de la durée d'exposition et de la durée de vie des lymphocytes périphériques.

4. LYMPHOCYTES HUMAINS

Pour la plupart, les lymphocytes humains périphériques se situent à un stade de la vie d'une cellule où celle-ci ne synthétise pas d'ADN (à savoir la phase G_0). Seuls 0,2 % ou moins des lymphocytes périphériques suivent le cycle cellulaire classique et ils viennent probablement du pool de grandes cellules lymphoïdes constitué de lymphocytes stimulés ou de plasmoblastes. Les cellules de ce groupe peuvent donner lieu aux rares mitoses parfois observées dans le sang périphérique.

Nowell [20] a été le premier à montrer que les « leucocytes humains » périphériques peuvent être stimulés par la phytohémagglutinine (PHA), une protéine extraite du haricot *Phaseolus vulgaris*, pour effectuer une mitose *in vitro*. De son côté, Carstairs [21] a montré que les cellules cibles du déclenchement de la mitose par la PHA sont les « petits lymphocytes ».

Lorsqu'on les observe sur un étalement sanguin, les petits lymphocytes périphériques comportent un grand noyau dense entouré d'un cytoplasme relativement petit (Fig. 4 et 5). Leur diamètre est d'à peu près $6\text{ }\mu\text{m}$ et leur volume est estimé à environ $110\text{ }\mu\text{m}^3$.

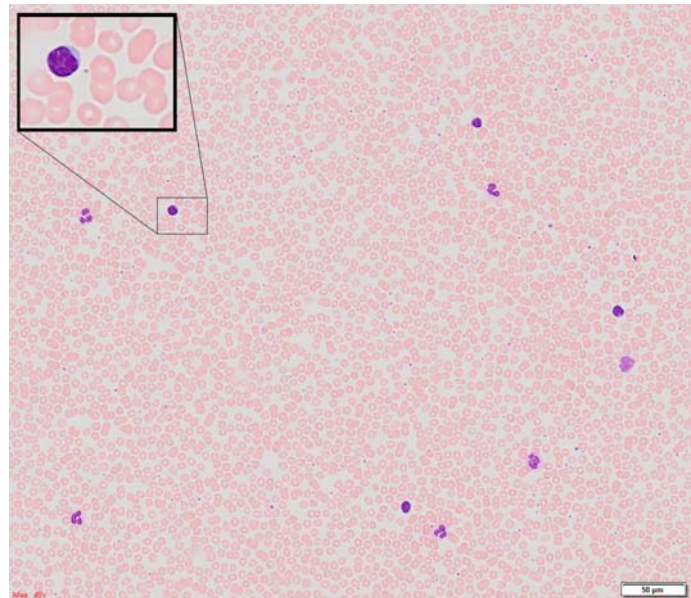


FIG. 4. Étalement sanguin typique sur lequel un petit lymphocyte et quelques globules rouges sont agrandis.

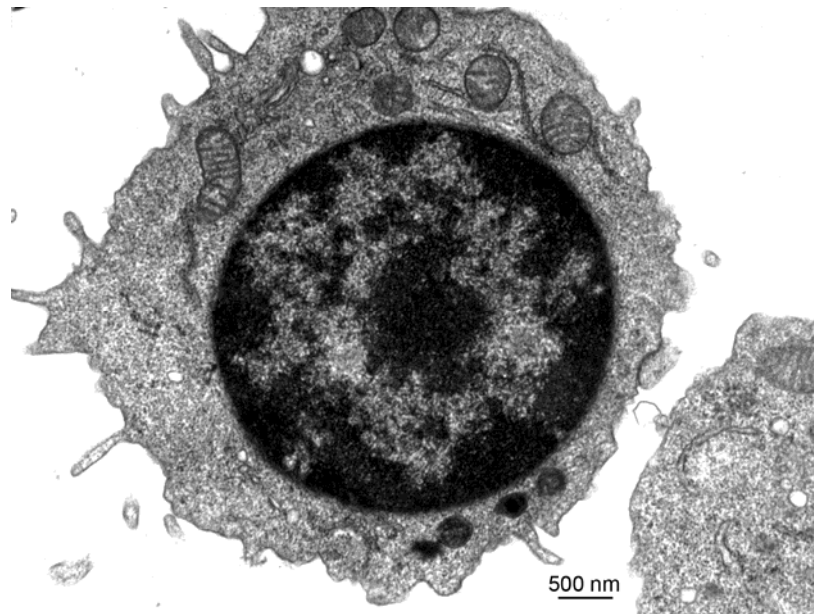


FIG. 5. Petit lymphocyte, tel qu'il apparaît au microscope électronique.

On distingue deux types principaux de lymphocytes, les cellules T et les cellules B. Ces deux types de cellules sont dérivés de cellules souches immunoincompétentes du sac vitellin et se fixent dans la moelle osseuse. Ces cellules souches indifférenciées migrent vers le thymus et d'autres organes lymphoïdes primaires, s'y multiplient, subissant des mutations somatiques, et donnent naissance à un pool de lymphocytes à vie longue qui circulent. En fonction de leur marqueur de surface, les cellules T et B comprennent un mélange de cellules naïves et de cellules mémoire dont la durée de vie et le rôle dans les processus immunologiques diffèrent [22]. Ce sont les cellules T, surtout les $CD4^+$ et les $CD8^+$, qui sont stimulées *in vitro* par la phytohémagglutinine et sont utilisées en biologie dosimétrique.

La concentration des lymphocytes dans le sang périphérique varie en fonction de l'âge, de l'origine ethnique, de la présence d'agents pathogènes et de facteurs environnementaux (c'est-à-dire tabagisme, obésité, consommation d'alcool, etc.). Ainsi, dans certaines populations ethniques (par exemple en Afrique de l'Est), le nombre de lymphocytes de référence est plus faible que dans l'ensemble de la population mondiale. On observe également une baisse du nombre de lymphocytes avec l'âge. Cette tendance est particulièrement nette durant l'enfance, où l'on constate une diminution constante de leur concentration, qui atteint environ $2 \times 10^9/L$ à l'âge de 15 ans. Elle est également présente chez les adultes, mais elle est plus lente et, à 75 ans et plus, la concentration des lymphocytes est inférieure à $2 \times 10^9/L$ [23].

En général, pour un adulte en bonne santé, la plage normale de concentration des lymphocytes est comprise entre $1,5 \times 10^9/L$ et $4,0 \times 10^9/L$ [24]. Cela étant, en cas d'exposition d'une grande partie du corps à des doses élevées (quelques grays), l'un des effets déterministes précoces est une chute rapide du nombre de lymphocytes dans le sang périphérique. Il convient de garder à l'esprit ces éléments lorsque l'on prélève du sang sur des victimes des rayonnements à des fins de dosimétrie biologique peu de temps après qu'elles aient été exposées [25].

Le nombre total de lymphocytes chez un jeune adulte en bonne santé a été évalué à environ 500×10^9 . Seuls environ 2 % (10×10^9) d'entre eux sont présents dans le sang périphérique, tous les autres se trouvant dans d'autres tissus, avec des concentrations plus élevées dans le thymus, les ganglions lymphatiques, les amygdales, les tissus lymphatiques des intestins, la rate et la moelle osseuse. La durée de vie des lymphocytes est variable et la

fin de la vie d'une cellule peut avoir deux définitions différentes : soit correspondre à sa mort, soit à sa division. Les cellules T de sous-type $CD4^+$ et $CD8^+$ peuvent être divisées en sous-groupes en fonction de l'expression des différents isoformes de l'antigène CD45. À la naissance, plus de 90 % des cellules T expriment l'isoforme CD45RA et ont été appelées cellules naïves. À l'âge adulte, cette proportion chute à environ 50 % par transformation en cellules mémoire, lesquelles expriment l'isoforme CD45RO.

Les lésions chromosomiques induites par la radiothérapie ont été étudiées sur des cellules T exprimant les formes RA et RO et stimulées par la PHA [26]. La persistance de lésions instables a montré que les cellules naïves se divisent en moyenne une fois tous les trois ans et demi, tandis que les cellules mémoire se divisent plus fréquemment, en moyenne toutes les 22 semaines. Les cellules mémoire peuvent également réacquérir le phénotype naïf mais seulement, en moyenne, après avoir acquis le phénotype mémoire pendant environ trois ans et demi.

Pour pouvoir interpréter les aberrations chromosomiques humaines induites *in vivo*, il est d'une grande importance que la plupart des lymphocytes périphériques appartiennent au « pool redistributif ». C'est-à-dire que les lymphocytes doivent pouvoir quitter le sang périphérique, traverser la rate, les ganglions lymphatiques et d'autres tissus, puis retourner dans le sang. Un lymphocyte du pool redistributif reste en moyenne dans le sang périphérique pendant 30 minutes. On estime qu'environ 80 % (soit 400×10^9) des lymphocytes appartiennent à ce pool et que le délai de recirculation est d'environ 12 heures. Cela signifie que les lymphocytes qui comportent des aberrations chromosomiques induites dans n'importe quelle partie du corps se retrouvent *in fine* dans le sang périphérique. Ainsi, en analysant des lymphocytes humains, on peut non seulement détecter les aberrations chromosomiques induites dans les lymphocytes du sang périphérique mais aussi celles qui ont été induites dans les lymphocytes répartis dans différents organes du corps [27].

La plupart des lymphocytes périphériques se trouvent à l'état de « repos » du cycle cellulaire (G_0) et contiennent chacun environ 5,6 picogrammes d'ADN. Ces cellules peuvent subir des divisions mitotiques *in vitro* si l'on introduit de la phytohémagglutinine (PHA). La PHA est un mitogène extrêmement complet qui stimule un large éventail de cellules T. Sous l'influence de la PHA, les lymphocytes se transforment en lymphoblastes et le volume du noyau et de l'ensemble de la cellule augmente. Quarante-huit heures après la stimulation, le volume de lymphocytes périphériques est d'environ $500 \mu m^3$ contre à peu près $110 \mu m^3$ avant la stimulation. Le volume du cytoplasme est respectivement d'environ $50 \mu m^3$ et $350 \mu m^3$ avant et après stimulation. Le volume du noyau passe d'à peu près $50 \mu m^3$ à environ $170 \mu m^3$ après la stimulation.

Après stimulation par la PHA, l'évolution du cycle cellulaire des lymphocytes peut être assez différente en fonction des conditions de culture et des milieux de cultures utilisés, par exemple Ham F10, RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640, le milieu 199 ou le milieu essentiel minimum (MEM). Ainsi, dans un milieu Ham F10, la synthèse de l'ADN débute environ 26 heures après la mise en culture et il faut 10 heures de plus pour observer les premières mitoses. La synthèse de l'ADN comporte deux pics (mesurés à l'aide de thymidine tritiée), le premier à 34 heures et le second à 40 heures, tout comme l'activité mitotique, l'un à environ 44 heures et l'autre autour de 49 heures. Il est possible que ces deux pics correspondent à deux sous-populations de cellules qui présentent des caractéristiques de stimulation différentes lors d'une mise en culture dans du Ham F10 avec de la PHA [28]. Cela étant, lorsque les lymphocytes sont cultivés dans un milieu 199, les caractéristiques des cellules en interphase marquées au tritium et des index mitotiques sont irrégulières, ce qui permet difficilement de tirer des conclusions sur la question des sous-populations.

5. STRUCTURE DES CHROMOSOMES

5.1. CONDENSATION DE LA CHROMATINE

L'association de l'ADN et des histones dans un nucléosome a été expliquée de manière très détaillée, même si le lien entre les protéines non histones et le nucléosome n'est pas encore parfaitement compris. En outre, il est certain que l'ADN ne fait pas partie de la particule cœur du nucléosome. Certaines études soutiennent que, dans un chromosome métaphasique, il existe une structure axiale du cœur formée par des protéines non histones ou une charpente de protéines non histones [29, 30]. L'incidence de ces structures sur la formation des aberrations chromosomiques n'a pas encore été éclaircie. Au microscope optique, ces régions apparaissent par coloration à l'argent sur des chromosomes qui se trouvent à différentes étapes de la mitose. Alors que l'existence d'une matrice protéique nucléaire organisée en interphase est bien établie, la présence d'une charpente dans les chromosomes métaphasiques est probablement un artefact. La figure 6 présente la structure type d'un chromosome métaphasique.

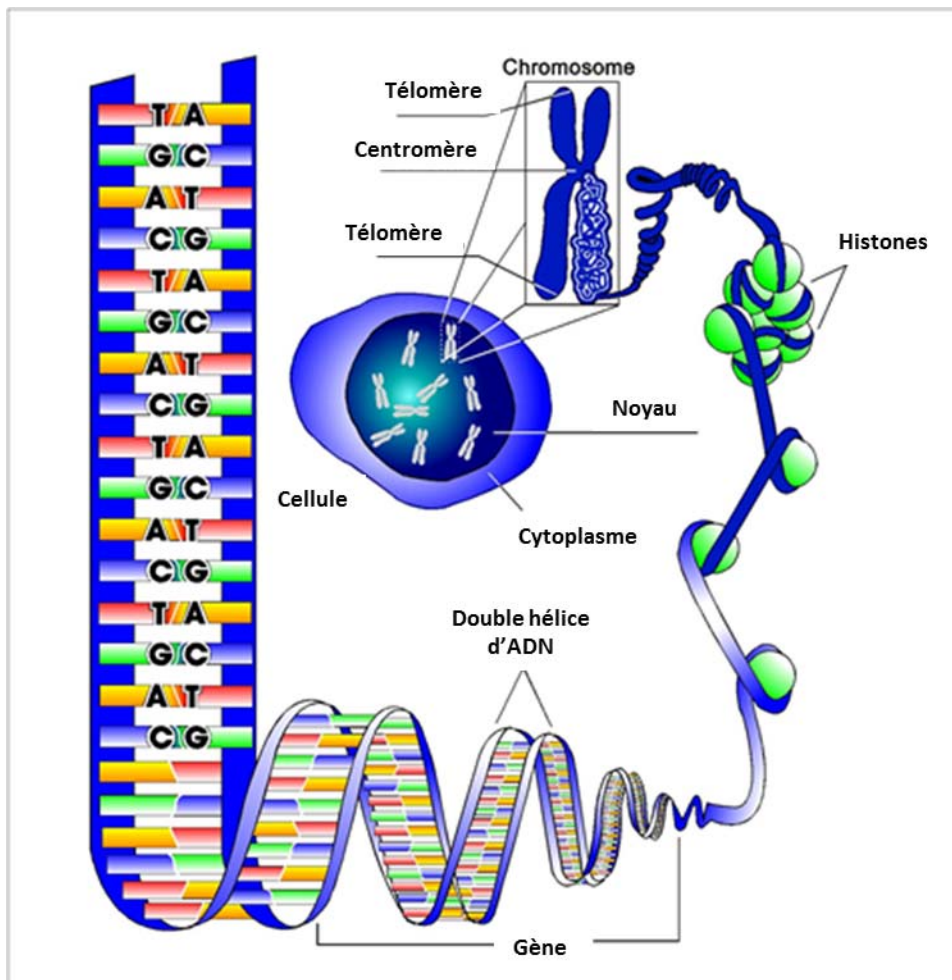
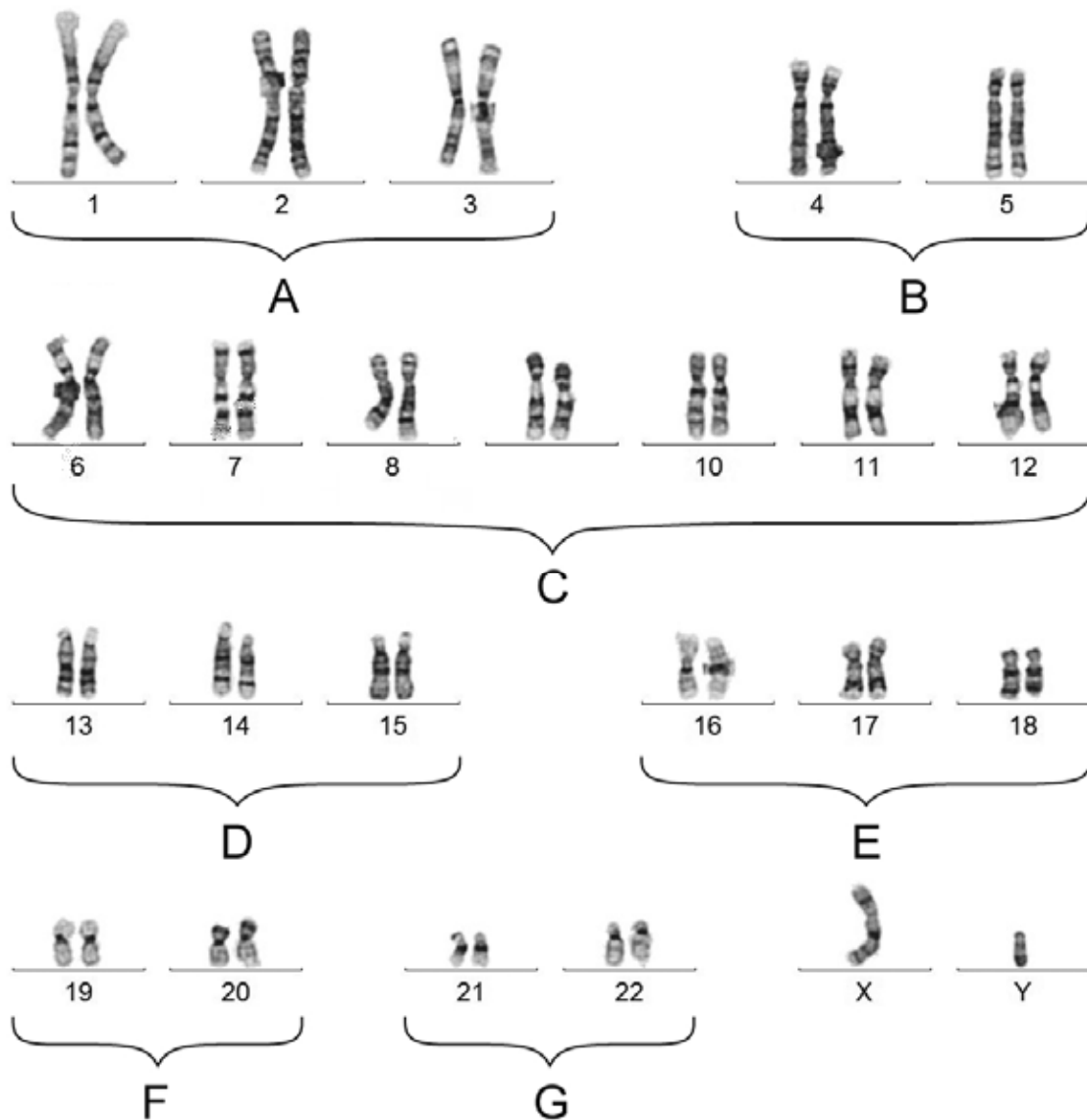


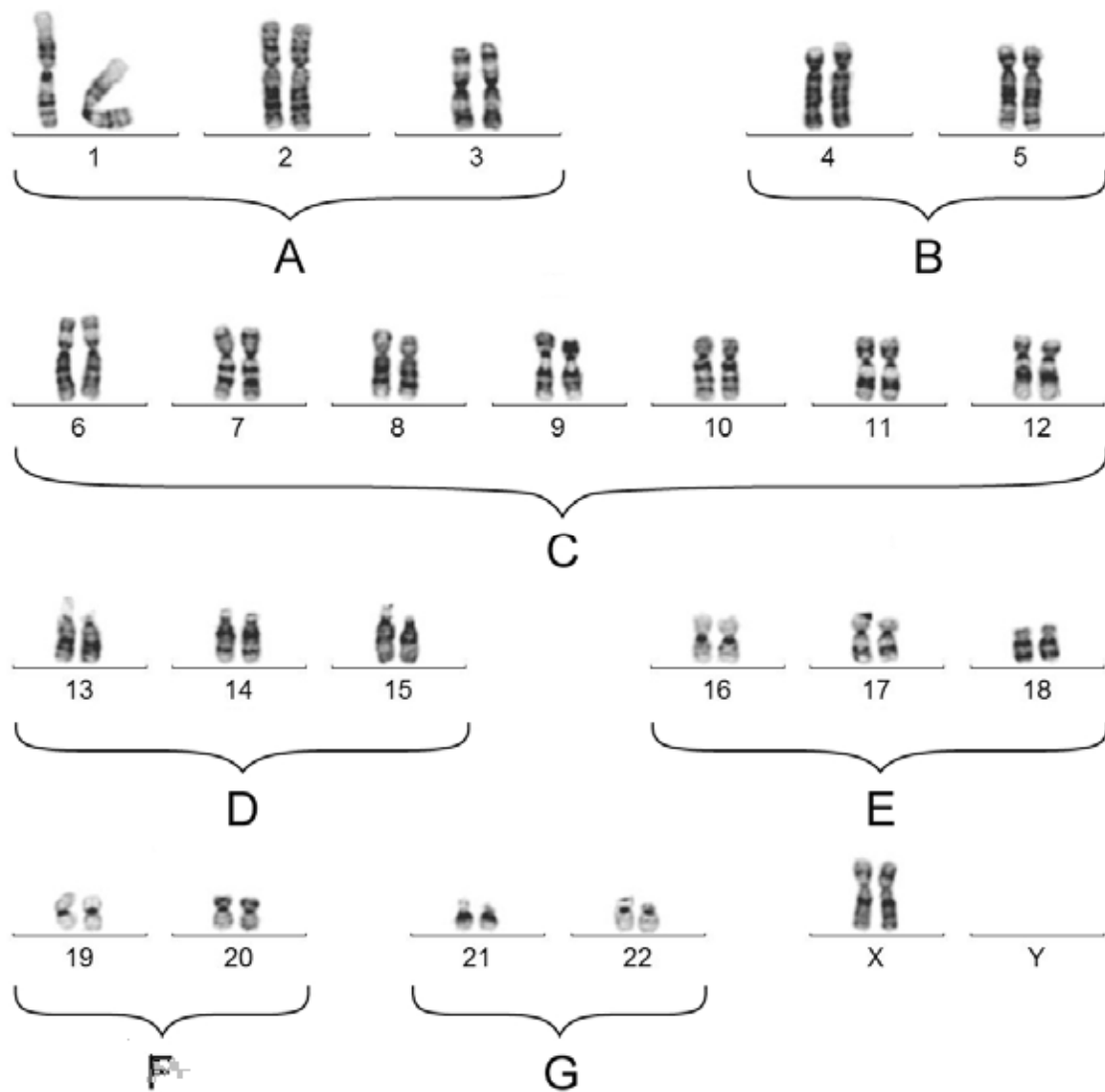
FIG. 6. Schéma illustrant les différents niveaux de condensation de la chromatine, lesquels donnent lieu aux chromosomes métaphasiques, fortement condensés (reproduit avec l'aimable autorisation de REACT/TS, États-Unis).

5.2. CARYOTYPE HUMAIN ET POURCENTAGE DE L'ADN CONTENU DANS LES DIFFÉRENTS CHROMOSOMES

Le caryotype humain (Fig. 7) est la garniture chromosomique caractéristique de l'être humain et est constitué de 23 paires de grands chromosomes linéaires de tailles différentes, ce qui donne un total de 46 chromosomes dans chaque cellule diploïde. Les chromosomes humains sont normalement répartis en sept groupes (de A à G), auxquels s'ajoute une paire d'hétérochromosomes X et Y [31]. Les groupes de chromosomes sont les suivants : A : 1–3, B : 4 et 5, C : 6–12, D : 13–15, E : 16–18, F : 19 et 20 et G : 21 et 22.



Masculin



Féminin

FIG. 7. Caryotype montrant les chromosomes et leurs bandes pour un homme normal, 46, XY, et pour une femme normale, 46, XX (reproduit avec l'aimable autorisation de la Mayo Clinic, États-Unis).

Le pourcentage de l'ADN contenu dans les différents chromosomes humains pour les deux sexes figure dans les tableaux 2 et 3. Ces chiffres ont été établis en s'appuyant sur Morton, 1991 [32].

TABLEAU 2. POURCENTAGE D'ADN DU GÉNOME MASCULIN CONTENU DANS CHAQUE PAIRE D'AUTOSOMES ET DANS CHAQUE HÉTÉROCHROMOSOME

Chromosome n°	Bras p	Bras q	Deux bras	Chromosome n°	Bras p	Bras q	Deux bras
1	4,03	4,25	8,28	13	0,50	3,09	3,59
2	3,12	4,92	8,04	14	0,50	2,93	3,43
3	3,12	3,62	6,74	15	0,54	2,80	3,34
4	1,76	4,63	6,39	16	1,23	1,86	3,09
5	1,64	4,47	6,11	17	0,88	2,02	2,90
6	2,05	3,72	5,77	18	0,63	2,05	2,68
7	2,05	3,34	5,39	19	0,94	1,17	2,11
8	1,57	3,31	4,88	20	0,98	1,29	2,27
9	1,61	2,96	4,57	21	0,35	1,23	1,58
10	1,38	3,15	4,53	22	0,41	1,35	1,76
11	1,83	2,71	4,54	X	0,97	1,61	2,58
12	1,23	3,27	4,50	Y	0,20	0,73	0,93
Total							100

TABLEAU 3. POURCENTAGE D'ADN DU GÉNOME FÉMININ CONTENU DANS CHAQUE PAIRE DE CHROMOSOMES

Chromosome n°	Bras p	Bras q	Deux bras	Chromosome n°	Bras p	Bras q	Deux bras
1	3,97	4,18	8,15	13	0,49	3,04	3,53
2	3,07	4,83	7,90	14	0,50	2,88	3,38
3	3,07	3,56	6,63	15	0,53	2,76	3,29
4	1,74	4,55	6,29	16	1,21	1,83	3,04
5	1,61	4,40	6,01	17	0,87	1,98	2,85
6	2,02	3,66	5,68	18	0,62	2,01	2,63
7	2,01	3,29	5,30	19	0,93	1,15	2,08
8	1,55	3,25	4,80	20	0,96	1,27	2,23
9	1,58	2,91	4,49	21	0,34	1,21	1,55
10	1,36	3,10	4,46	22	0,40	1,34	1,74
11	1,80	2,66	4,46	X	1,92	3,16	5,08
12	1,21	3,22	4,43	Total			100

5.3. CYCLE CELLULAIRE

On peut obtenir des informations importantes sur les effets clastogènes des agents physiques ou chimiques sur des cellules en interphase en examinant les chromosomes au moment de la division cellulaire, laquelle, pour les cellules somatiques, a lieu lors de la mitose. Le cycle cellulaire comporte plusieurs étapes qui se distinguent par leur aspect et leur rôle (Fig. 8).

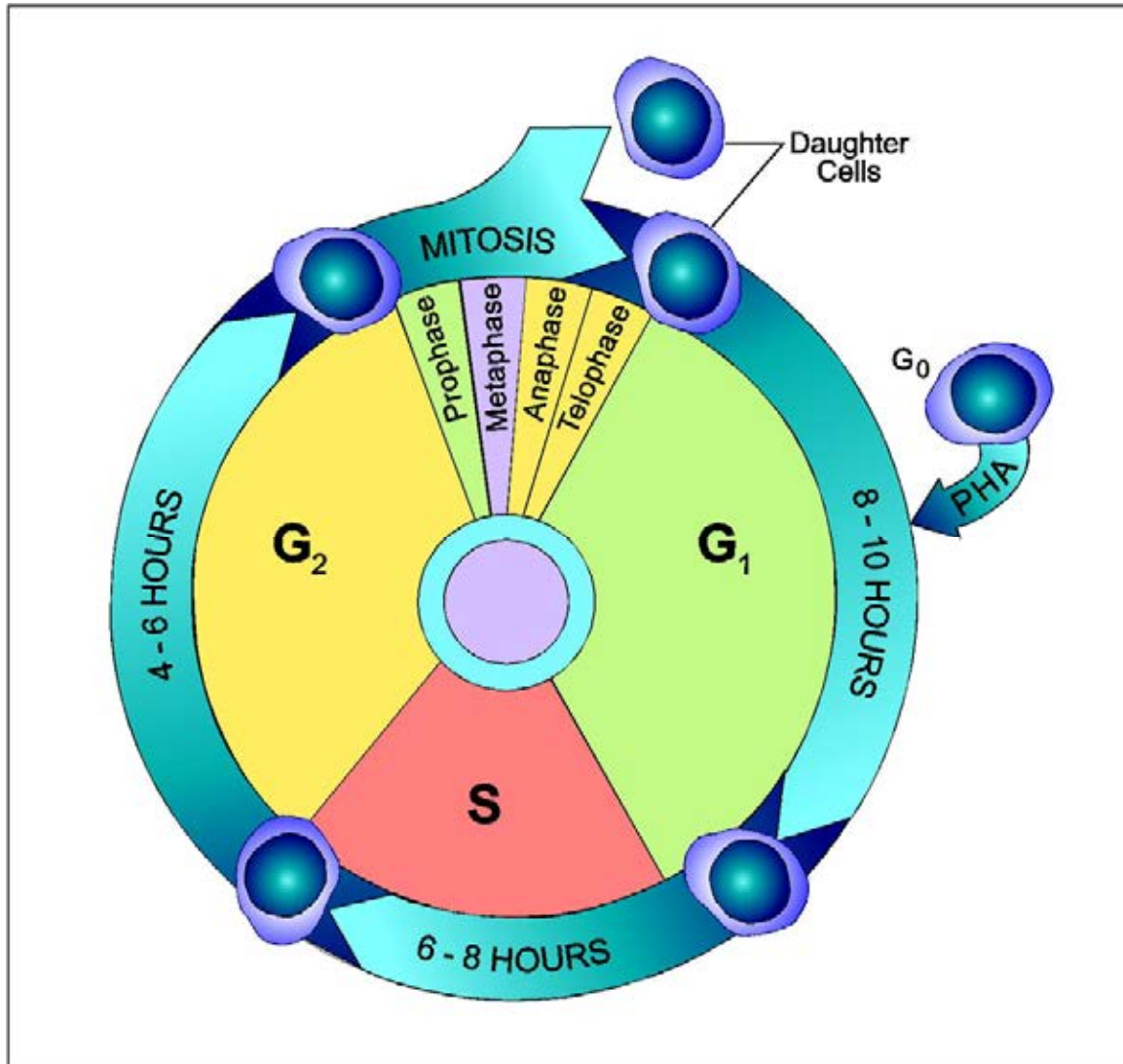


FIG. 8. Le cycle cellulaire (reproduit avec l'aimable autorisation de REAC/TS, États-Unis).

Durant la mitose, on distingue la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. En interphase, le matériel chromosomique (c'est-à-dire l'ADN et les protéines associées) se duplique. Cette période, appelée phase « S » (synthétique), est précédée d'une période appelée G₁ (intervalle présynthèse) et est suivie par la phase G₂ (intervalle postsynthèse) durant l'interphase. Les cellules qui ne suivent pas le cycle cellulaire, par exemple les lymphocytes périphériques, restent en phase G₀.

Pour les cellules qui suivent le cycle, l'interphase est, sur le plan métabolique, la partie la plus active du cycle et, dans le noyau, la plupart des réactions consommatrices d'énergie ont lieu pendant cette phase. La durée de chaque étape du cycle varie en fonction du type de cellule et des conditions de croissance. On peut déterminer cette durée à l'aide de précurseurs radiomarqués de l'ADN comme la thymidine tritiée. Pour les lymphocytes, le premier cycle cellulaire qui suit la stimulation est à peu près synchronisé et ce type de cellule est particulièrement adapté aux études radiobiologiques. Certes, les cellules de mammifère qui suivent le cycle en culture ne sont pas synchronisées, mais elles peuvent être rendues synchrones par plusieurs techniques. En fonction de l'étape du cycle où elle se trouve, une cellule n'a pas la même sensibilité aux agents chimiques et aux rayonnements. De plus, le type d'aberration chromosomique induit dépend de la phase où l'opération a été effectuée [33]. Par conséquent, dans ce type d'étude, il est important de travailler avec une population synchronisée ou au moins de pouvoir estimer le pourcentage de cellules qui se trouvent dans les différentes phases au moment de l'opération.

La progression dans le cycle cellulaire est contrôlée en différents points afin que l'intégrité de l'ADN soit maximale et que la ségrégation chromosomique préalable à la formation des cellules filles s'effectue correctement. Les principaux points de contrôle se situent à la fin de G_1 , avant la réplication, à la fin de G_2 , avant la mitose et à la transition métaphase-anaphase, avant la ségrégation chromosomique et la division cellulaire. À ces points de contrôle, la progression dans le cycle peut être bloquée si des lésions de l'ADN, une réplication incomplète ou une structure de fuseau anormale sont détectées.

6. ALTÉRATIONS CHROMOSOMIQUES RADIO-INDUITES

Dans ses études génétiques sur *Drosophila*, Müller [34] a été le premier à signaler que les rayons X pouvaient induire des aberrations chromosomiques. Cette observation a été confirmée par les études cytologiques réalisées par Painter et Müller [35]. Plus tard, Sax [36] a élaboré son hypothèse « *breakage first* » sur l'origine des aberrations chromosomiques induites par les rayons X. Il a été suivi par Revell [37], lequel a proposé une hypothèse différente, celle de l'échange. Sax [36] a suggéré que les régions endommagées de chromosomes distincts entrent en contact après que des cassures ont été induites et que les extrémités se déplacent, puis se recombinent, ce qui entraîne des échanges. De son côté, Revell [37] a émis l'hypothèse qu'il n'y a pas de cassure aux points où se trouvent les lésions mais que ces points sont instables et peuvent interagir avec des points similaires et donner lieu à des échanges deux à deux. Il existe une troisième possibilité, envisagée plus tard par Chadwick et Leenhouts [38], l'interaction lésion non-lésion. Dans ce modèle, un point endommagé, au sens de Revell, peut interagir avec une partie d'un chromosome intact et entraîner un échange.

6.1. LÉSIONS DE L'ADN RADIO-INDUITES

Les rayonnements ionisants se caractérisent par des événements de dépôts discrets d'énergie (c'est-à-dire des grappes isolées, des essaims et des traces) dans l'espace et le temps qui endommagent l'ADN directement et indirectement en provoquant l'apparition d'espèces réactives principalement produites par la radiolyse de l'eau [39]. Des études biophysiques de la structure des traces montrent que les rayonnements dont le TLE est faible peuvent engendrer des grappes localisées d'ionisations sur le parcours d'un seul électron. Ceux dont le TLE est élevé produisent davantage d'ionisations, celles-ci étant peu éloignées [17] (Fig. 9A). Les rayonnements ionisants induisent une grande diversité de lésions de l'ADN, notamment les lésions de base (LB), les cassures simple brin (CSB), les sites abasiques (SA), les pontages ADN-protéines (PAP) et les cassures double brin (CDB) (Fig. 9B).

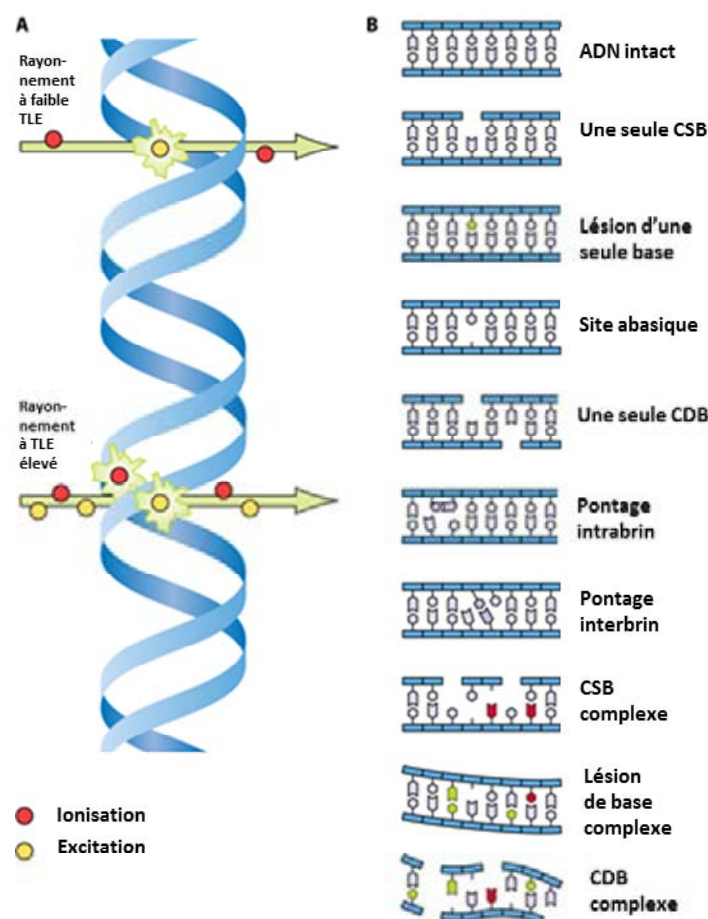


FIG. 9. Caractéristiques d'ionisation des rayonnements à faible TLE et à TLE élevé (A) et lésions de l'ADN radio-induites (B) [40, 41].

L'énergie nécessaire pour former une paire d'ions ($\text{H}_2\text{O}^+ + \text{e}^-$) par radiolyse de l'eau est d'environ 20 eV et les rayonnements ionisants provoquent des événements d'une énergie qui peut atteindre plusieurs centaines d'électrons-volts, la moyenne étant de 60 eV. Comme cette énergie est suffisante pour produire environ trois paires d'ions, les radicaux formés réagissent au voisinage d'une petite région localisée. Les lésions de l'ADN qui en résultent pour tous les types de rayonnement peuvent être des lésions uniques, par exemple des CSB, des SA ou des LB, ou encore des sites multilésés (SM) ou des clusters de lésion de l'ADN [42]. Les SM induits sur l'ADN peuvent comporter une ou plusieurs CDB, plusieurs CSB, ainsi que des LB. Les clusters complexes de lésions de l'ADN peuvent être plus difficiles et même impossibles à réparer et font donc parfois apparaître des aberrations chromosomiques létales [43].

La cellule dispose d'une transduction du signal, de points de contrôle du cycle cellulaire et de voies de réparation complexes pour faire face aux lésions de l'ADN. Les LB, les SA et les CSB sont traités par différents processus comme la réparation par excision de base (BER), la réparation par excision de nucléotides (NER) ou la réparation des cassures simple brin (SSBR) [44, 45]. Les PAP sont traités par NER et au moyen de la réparation par recombinaison homologe (HRR) [46]. Les CDB sont des lésions critiques qui, mal ou non réparées, jouent un rôle dans la formation d'aberrations chromosomiques comme les dicentriques et les translocations [47]. La HRR et la religation non homologue (NHEJ) constituent les deux principaux mécanismes de réparation des CDB [48, 49]. Ces deux processus interviennent à différentes phases du cycle cellulaire. Alors que la NHEJ contribue substantiellement à la réparation des CDB à toutes les phases du cycle, la HRR n'y contribue

que modestement en G_1 puis progressivement plus au fur et à mesure que la cellule avance dans le cycle vers G_2 [50]. Sasaki [51] a publié une étude complète sur les processus biophysiques et moléculaires qui conduisent à la formation d'aberrations chromosomiques radio-induites.

6.2. ABERRATIONS DE TYPE CHROMOSOMIQUE

Des systèmes de classification des aberrations chromosomiques ont été présentés [52, 53].

La population de lymphocytes périphériques stimulée par des mitogènes ne suit normalement pas le cycle cellulaire et se trouve au stade G_0 . Par conséquent, les aberrations chromosomiques radio-induites sont de type chromosomique, c'est-à-dire qu'elles concernent les deux chromatides d'un chromosome. On sait que le rayonnement ionisant est un agent clastogène indépendant de la phase S, contrairement aux rayons ultraviolets et aux mutagènes chimiques, qui eux en dépendent. Par conséquent, avec des rayonnements ionisants, les aberrations induites quand la cellule se trouve en phase G_0 ou G_1 sont de type chromosomique tandis qu'en phase G_2 ou S, on observe la formation d'aberrations chromatidiques. En revanche, les ultraviolets et les substances chimiques induisent principalement des aberrations chromatidiques à toutes les étapes du cycle cellulaire. Si l'on observe des aberrations chromatidiques dans des cellules en phase G_0 ou G_1 qui ont été exposées à des rayonnements ionisants, on peut supposer qu'elles ne sont pas radio-induites ou qu'elles ont déjà effectué un deuxième cycle cellulaire *in vitro*.

En dosimétrie biologique, les aberrations chromatidiques ne jouent donc pas un grand rôle, car elles ne peuvent pas être induites par irradiation de lymphocytes en phase G_0 . Néanmoins, compte tenu de la fréquence naturelle des lésions chromosomiques, elles existent et peuvent être présentes en quantités supérieures à la normale si l'individu qui subit un examen parce que l'on soupçonne qu'il a été irradié a également été exposé à des substances chimiques clastogènes. Il importe donc que les personnes qui analysent les échantillons connaissent bien les aberrations chromatidiques et ne les confondent pas avec les aberrations de type chromosomique. En outre, les efforts de recherche portant de plus en plus sur l'instabilité chromosomique différée et sur les effets de voisinage, les aberrations chromatidiques suscitent un regain d'intérêt. Pour cette raison, les aberrations de type chromosomique sont traitées dans la présente section, tandis que les aberrations chromatidiques seront étudiées dans la section 6.4.

6.2.1. Aberrations instables

Dicentriques

Les dicentriques (Fig. 10) constituent la principale aberration utilisée en dosimétrie biologique.



FIG. 10. Chromosome dicentrique accompagné de son fragment acentrique (coloration au Giemsa).

Il s'agit d'un échange entre les parties centromériques de deux chromosomes cassés. Dans sa forme complète, ce chromosome est accompagné d'un fragment acentrique constitué des parties acentriques des chromosomes originaux. Des configurations multicentriques peuvent se former, surtout après qu'une dose élevée a été reçue. Les chromosomes tricentriques sont accompagnés de deux fragments, les quadricentriques de trois, etc. L'analyse des dicentriques est examinée en détail dans la section 9.

Anneaux centriques

Dans les lymphocytes humains, les anneaux centriques sont beaucoup plus rares que les dicentriques. Pour estimer la dose reçue, certains chercheurs les associent aux dicentriques tandis que d'autres choisissent de les ignorer. Le chromosome en anneau est le résultat d'un échange survenu à la suite de deux cassures sur des bras distincts du même chromosome et est également accompagné d'un fragment acentrique (Fig. 11).

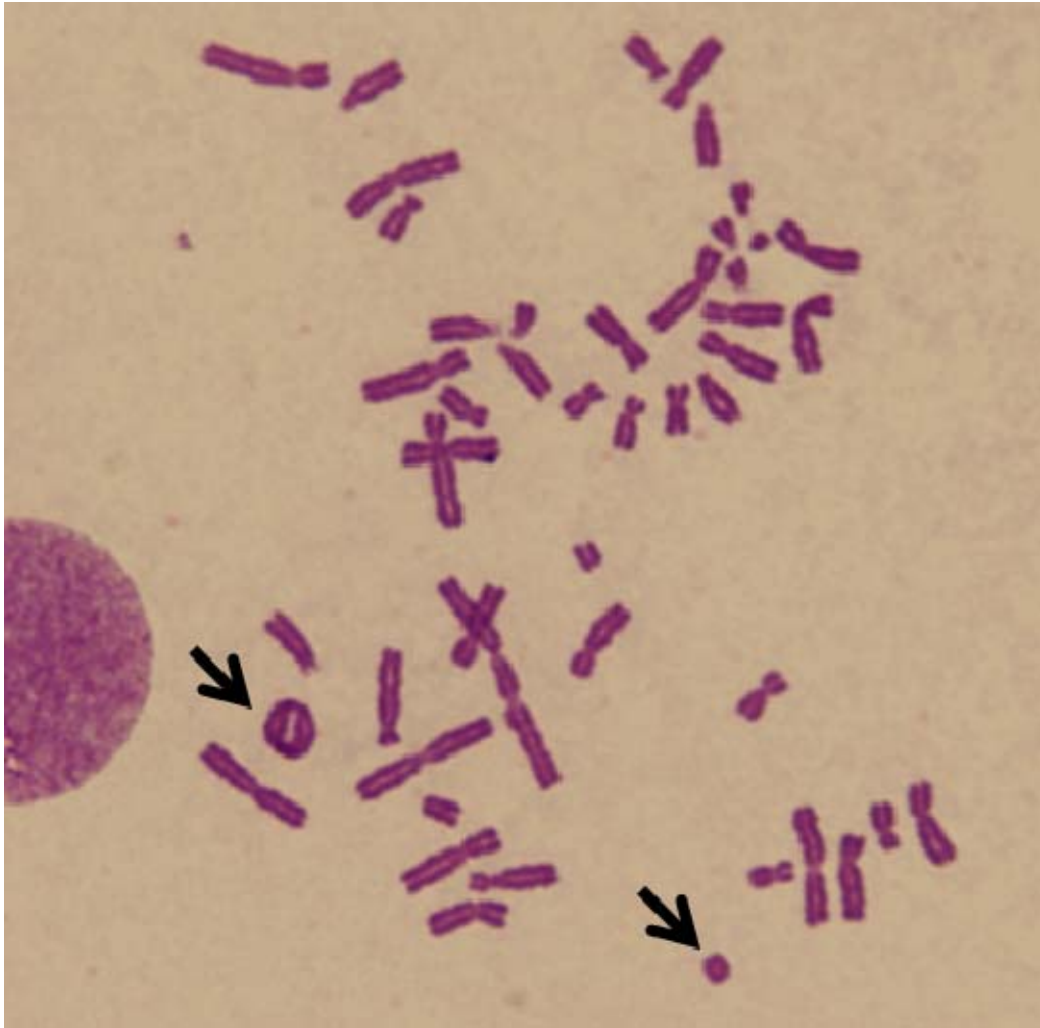


FIG. 11. Étalement métaphasique sur lequel figurent deux anneaux (repérés par des flèches), un chromosome dicentrique et des fragments acentriques (coloration au Giemsa).

Fragments acentriques

Des aberrations acentriques peuvent se former indépendamment des échanges décrits ci-dessus et sont généralement appelées fragments excédentaires. Il peut s'agir de délétions terminales ou interstitielles de taille variable, mais il n'est pas toujours possible de déterminer leur origine. Elles sont par conséquent regroupées. Les anneaux acentriques, pour lesquels on peut observer un espace vide à l'intérieur d'une petite structure circulaire, sont normalement considérés comme le résultat des délétions interstitielles alors que les chromosomes minuscules doubles, qui se présentent comme des paires de petites taches complètement colorées, résultent principalement de délétions terminales [54, 55].

Cellules rogues

Les cellules rogues sont des cellules en métaphase préparées à partir de lymphocytes sanguins cultivés qui présentent un nombre de lésions chromosomiques extrêmement élevé sans raison évidente. La figure 12 en donne un exemple. Les cassures et les réarrangements de chromosome sont si nombreux qu'il est difficile de trouver plus d'un ou deux chromosomes d'apparence normale, c'est-à-dire monocentriques.

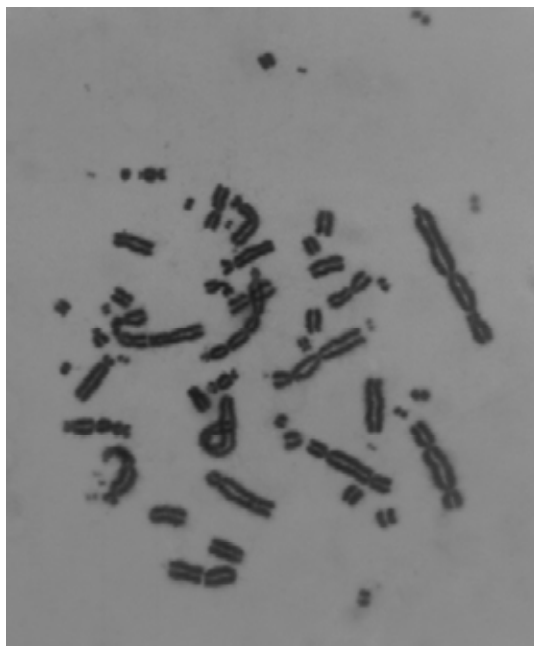


FIG. 12. Cellule rogue observée parmi 500 cellules normales en métaphase prélevées chez une personne en bonne santé, qui ne fume pas, qui n'a pas été exposée à des rayonnements dans le cadre de son travail ou de soins médicaux et qui vit dans une zone où la teneur en radon est faible. En métaphase, on observe de nombreux chromosomes polycentriques et beaucoup de fragments acentriques, y compris un grand nombre de chromosomes minuscules doubles.

En revanche, la cellule comporte des chromosomes polycentriques, des fragments acentriques et des chromosomes minuscules doubles en grand nombre. Les chromosomes minuscules doubles sont de petites masses de chromatine qui contiennent quelques mégabases d'ADN et peuvent être définis comme les équivalents cytogénétiques des séquences d'ADN amplifiées [56].

Ces cellules très particulières sont présentes dans tous les groupes ethniques et races du monde. C'est ainsi en 1968, dans du sang prélevé sur des membres des tribus indiennes de Yanomami qui vivent dans les forêts tropicales humides du Venezuela, qu'elles ont été observées pour la première fois [57]. Par la suite, on en a découvert chez des individus de nombreux pays dont l'Angleterre, le Japon, l'Ukraine, la Lituanie et la Fédération de Russie. Le terme « cellule rogue » a été forgé par Awa et Neel [58], lesquels ont décrit ces cellules chez des enfants de personnes irradiées et non irradiées (sujets témoins) à la suite du bombardement de Hiroshima. Les évaluations cytogénétiques réalisées sur des populations exposées et non exposées qui vivaient à proximité de Tchernobyl, évaluations similaires aux études portant sur les survivants de la bombe atomique, ont montré que les cellules rogues n'ont aucun lien avec les rayonnements ionisants car on en a également trouvé chez les personnes non exposées (groupes témoins) [59, 60].

Même si, à l'échelle mondiale, la fréquence des cellules rogues dans la population humaine est aujourd'hui bien établie, leur éventuelle signification clinique est inconnue. Dans les études où un échantillonnage séquentiel a été effectué, on a observé que ces cellules étaient transitoires et apparaissaient par intermittence et simultanément par courtes poussées chez certains individus de populations discrètes. Il convient de souligner que l'on ne trouve pas trace des cellules rogues dans la littérature de cytogénétique médicale, sans doute en raison de la durée de culture plus longue (trois jours), ce qui permet deux ou trois divisions

cellulaires, les cellules en question ayant par conséquent probablement disparu. De plus, les cytogénéticiens médicaux analysent relativement peu de cellules en métaphase (entre 15 et 20) pour déterminer si le caryotype d'un individu est normal ou pas. En revanche, les cytogénéticiens spécialisés dans les rayonnements analysent en routine, pour un seul individu, des centaines, voire un millier ou plus de cellules en métaphase qui se divisent pour la première fois, ce qui accroît grandement la probabilité de détecter des cellules rogues, sachant que leur fréquence est faible. En conclusion, l'étiologie et la signification médicale de ces cellules rogues dans les lymphocytes humains restent une énigme, même si certains indices donnent à penser que des virus comme le polyomavirus JC jouent peut-être un rôle dans leur apparition [61].

Compte tenu des conditions d'apparition des cellules rogues, il est recommandé, dans la plupart des applications de la dosimétrie biologique, d'exclure de l'évaluation de la dose les cellules en métaphase isolées qui ont l'aspect de cellules rogues. On peut faire une exception lorsqu'il existe d'autres signes d'une exposition à des rayonnements à TLE élevé et, dans l'idéal, plusieurs cellules multilésées de manière continue.

6.2.2. Aberrations stables

Translocations réciproques

Une translocation réciproque est un échange des parties terminales entre deux chromosomes distincts. À l'origine, les différents types de translocation ont été décrits à l'aide du marquage en bandes G et du caryotypage, mais cette technique est trop lourde pour la dosimétrie biologique en routine. La coloration au Giemsa ne permet pas de détecter les translocations avec une fiabilité suffisante. Grâce à la méthode FISH (voir la section 10), il est aujourd'hui possible de se servir de ces aberrations en dosimétrie. Les chromosomes concernés apparaissent alors sous forme de chromosomes monocentriques bicolores (Fig. 13).

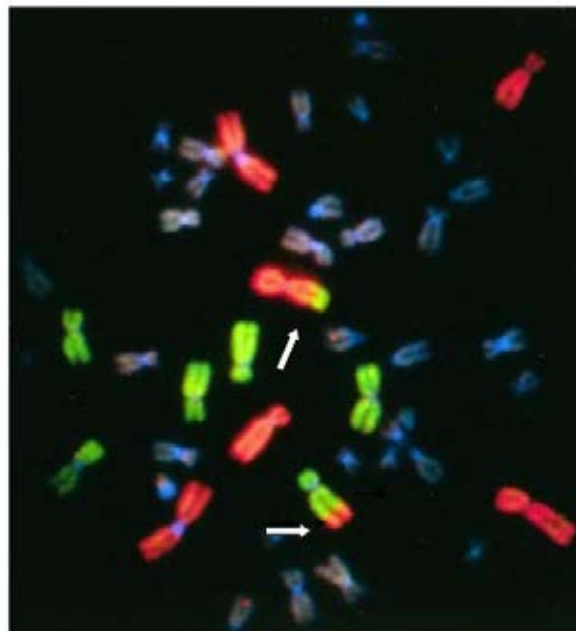


FIG. 13. Étalement en métaphase illustrant la « peinture » chromosomique par FISH utilisée pour détecter les translocations. Les paires de chromosomes 1, 2 et 4 sont « peintes » en rouge et les paires de chromosomes 3, 5 et 6 sont « peintes » en vert. Une translocation réciproque a eu lieu sur les deux chromosomes bicolores (2 et 5), lesquels ont échangé des segments aux extrémités de leur bras long (reproduit avec l'aimable autorisation de MM. Ramsey et Tucker, LLNL, États-Unis).

Translocations non réciproques

Lorsque l'on n'observe qu'un seul chromosome bicolore, on parle en général de translocation non réciproque. Toutefois, en utilisant conjointement une sonde permettant de peindre un chromosome entier, une sonde centromérique et une sonde télomérique, il est apparu que plusieurs translocations considérées comme non réciproques étaient en réalité réciproques. Il est très probable que le signal émis par la partie manquante est inférieur à la résolution visuelle. Certains ont donc suggéré d'appeler ces translocations « échanges unidirectionnels ». On estime aujourd'hui que les translocations non réciproques existent bel et bien mais ne représentent qu'un faible pourcentage de l'ensemble des translocations. Ainsi à 4 grays, on en compte environ 5 % [62].

Translocations interstitielles (insertions)

Ce type d'aberration se forme lorsqu'une partie acentrique d'un chromosome s'insère dans le bras d'un autre chromosome. Ce dernier apparaît alors bicolore. La figure 14 en donne un exemple.

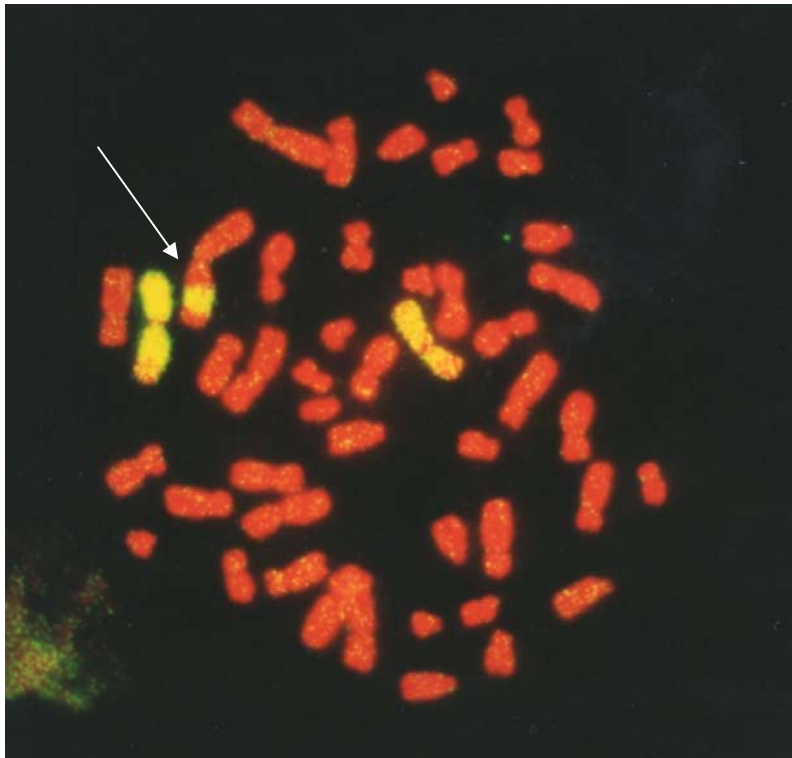


FIG. 14. Un étalement de cellules humaines en métaphase comportant une insertion. La paire de chromosomes 1 est peinte en jaune et tous les autres chromosomes sont contre-colorés à l'iodure de propidium.

Stabilité des cellules

La dosimétrie biologique rétrospective par méthode FISH est possible parce que les aberrations stables comme les translocations réciproques ne sont pas éliminées lors de la mitose et se transmettent aux cellules filles. Néanmoins, pour que cela se produise, il faut que le génome complet soit stable. La division d'une cellule qui comporte une translocation peut échouer si elle contient également une structure indépendante et instable comme un chromosome dicentrique ou un fragment excédentaire. Il est donc apparu nécessaire de ne pas

s'intéresser uniquement à la stabilité de chaque type d'aberration mais aussi à celle de la cellule dans son ensemble. Dès 1967, Buckton *et al.* [63] ont pris conscience de ce problème et ont créé les abréviations Cs et Cu pour désigner respectivement les cellules stables et les cellules instables. Cette notion a repris de l'importance avec le développement de la dosimétrie biologique rétrospective par FISH, technique qui a fait apparaître que les translocations réciproques sont plus stables que les translocations non réciproques [64, 65].

6.3. ABERRATIONS CHROMATIDIQUES

Les aberrations chromatidiques sont généralement classées de la même manière que les aberrations de type chromosomique. En cas d'aberration chromatidique, seule une des deux chromatides (et non l'ensemble du chromosome, comme pour une aberration de type chromosomique) est en apparence concernée dans la plupart des cas.

Délétions terminales et délétions interstitielles

Une délétion terminale est un déplacement sensible du fragment de chromatide situé du côté de l'extrémité par rapport à la lésion (Fig. 15).

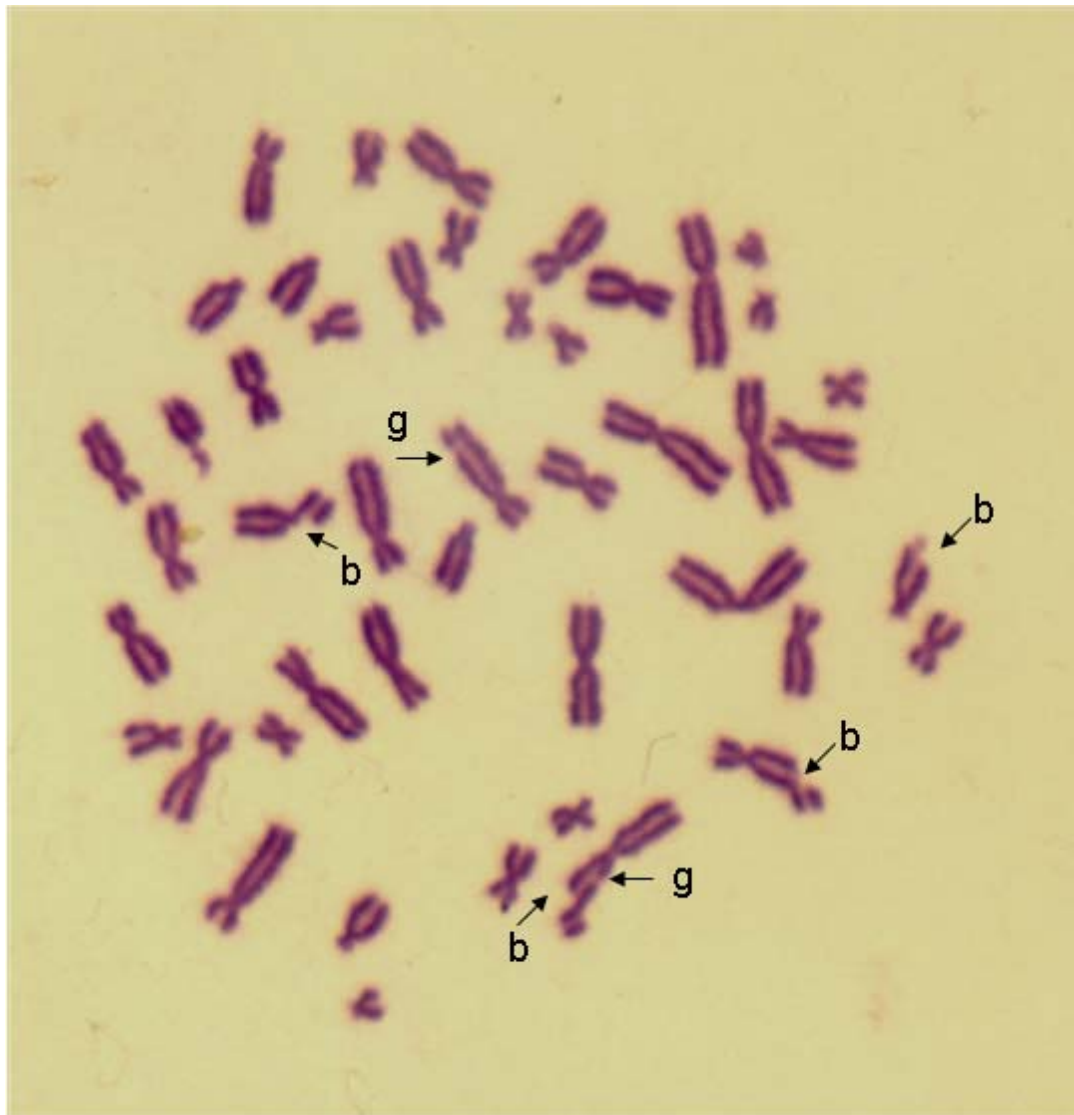


FIG. 15. Étalement en métaphase sur lequel apparaissent des chromatides cassés (b) et des trous (g).

En l'absence de déplacement, la zone non colorée comprise entre les régions centrique et acentrique doit être d'une largeur supérieure à celle d'une chromatide pour être considérée comme une délétion terminale. Cette définition permet de distinguer les délétions terminales (cassures de chromosomes) des lésions achromatiques (trous).

Les délétions interstitielles chromatidiques ne sont pas aussi faciles à observer que leurs équivalents chromosomiques, notamment parce que le petit fragment résultant de la délétion se sépare souvent du chromosome qui a subi cette aberration et n'est pas visible.

Lésions achromatiques

Les lésions achromatiques (trous), visibles sur la figure 15, sont des zones non ou très légèrement colorées des chromosomes présentes sur une chromatide (unique) ou sur les deux chromatides sœurs en des loci apparemment identiques (double). Si la largeur de la zone non colorée est inférieure à celle d'une chromatide, l'événement est considéré comme une lésion achromatique. Il est clair qu'il s'agit d'une définition pratique. On conseille généralement de noter les lésions achromatiques, mais toujours séparément des délétions chromatidiques. Il ne faut pas les inclure dans le total des aberrations par cellule car leur signification et leur rapport avec les autres types de « véritables » aberrations restent obscurs.

Délétions isochromatidiques

Ce type de délétion constitue une exception dans la catégorie des aberrations chromatidiques car elle concerne les deux chromatides, apparemment avec des « cassures » au même endroit sur les deux chromatides. Toutefois, avec un équipement adéquat, on peut montrer qu'elles sont induites par des rayonnements reçus lors des phases S et G₂ du cycle cellulaire, à l'instar des autres aberrations chromatidiques.

Il en existe de plusieurs types en fonction du type d'union qui lie les chromatides sœurs. Si une telle union se produit, il est possible de distinguer les aberrations isochromatidiques des délétions terminales de type chromosomique. Cependant, dans les cellules de mammifère, de telles unions sont rares et la plupart des délétions isochromatidiques ne sont pas des unions et sont de type proximal ou distal. Le plus souvent, le fragment acentrique n'est pas associé à la partie centrique du chromosome qui a subi une délétion. Étant donné que les aberrations radio-induites sur des lymphocytes en phase G₀ sont de type chromosomique, la convention retenue pour l'analyse est que tous les fragments acentriques qui sont groupés par deux doivent être considérés comme des délétions terminales de type chromosomique. Comme la fréquence des délétions isochromatidiques dans les lymphocytes est toujours faible, cette convention n'est pas dénuée de fondement.

Échanges asymétriques

Les échanges asymétriques (entre les deux bras ou asymétriques sur la même chromatide) sont les équivalents chromatidiques des dicentriques.

Échanges symétriques

Les échanges symétriques (échanges chromatidiques symétriques), dont la figure 16 présente un exemple, sont les équivalents chromatidiques des translocations réciproques.



FIG. 16. Étalement métaphasique sur lequel figure un échange chromatidique symétrique (coloration au Giemsa).

Dans le cas des échanges chromatidiques symétriques, l'appariement somatique maintient un lien entre les chromosomes concernés par l'échange. Il est donc facile de les observer, même sans utiliser de technique de marquage en bandes.

Échanges symétriques et asymétriques

Il existe deux types d'échanges entre bras (symétriques ou asymétriques), mais, lors d'une analyse de cellules en métaphase, on ne peut observer que les échanges asymétriques, et ce, grâce à l'appariement somatique.

Chromosomes triradiaux

Un chromosome triradial (à trois bras) peut être décrit comme l'interaction entre un chromosome qui a subi une délétion isochromatidique et un deuxième chromosome qui, lui, a subi une délétion chromatidique.

La classification présentée ici n'est bien sûr pas exhaustive étant donné qu'il existe de nombreux types d'aberrations complexes. Celles qui ont été décrites sont de loin les plus fréquemment observées. Savage [52] propose une classification plus complète.

6.4. CONDENSATION PRÉMATURÉE DES CHROMOSOMES

Lorsque des cellules qui suivent le cycle cellulaire entrent en mitose, la chromatine se condense et donne aux chromosomes leur aspect familier. Des techniques qui permettent une condensation de la chromatine alors que la cellule n'est pas en mitose ont été mises au point. On parle alors de condensation prématurée des chromosomes (PCC). Cette condensation prématurée peut être induite en fusionnant des cellules en interphase et des cellules ovariennes de hamster chinois en mitose (CHO) ou des cellules HeLa en utilisant le virus Sendai ou du polyéthylène glycol (PEG) comme agent de fusion [66]. Toutefois, le virus Sendai n'est efficace que si les membranes des cellules sont particulièrement réceptives aux particules virales et il a été signalé que des lymphocytes en phase G₀ ne pouvaient correctement être

fusionnés à l'aide de cet agent. En biologie dosimétrique, cette difficulté a été surmontée en utilisant du PEG pour induire la PCC [67].

Des méthodes chimiques permettant de provoquer une PCC ont également été mises au point. Elles se servent d'inhibiteurs de la phosphorylation de l'ADN comme l'acide okadaïque ou la calyculine A. Dans la plupart de ces méthodes, les cellules doivent être cultivées et doivent suivre le cycle cellulaire [68, 69].

La PCC, technique décrite en détail dans la section 11, est très utile pour étudier les processus et la cinétique des réparations correctes et/ou incorrectes des cassures chromosomiques qui entraînent des aberrations (c'est-à-dire des dicentriques et des translocations) juste après une irradiation [70–72]. Ces recherches montrent que les dicentriques, les translocations réciproques et non réciproques et les fragments acentriques que l'on observe *in fine* en métaphase se forment en G_0 à différents moments en fonction de la dose. Dans les lymphocytes humains, à faibles doses de rayons X (1-2 grays), les dicentriques et les translocations se forment rapidement. En revanche, lorsque la dose est plus élevée (entre 4 et 6 grays) la fréquence des échanges chromosomiques augmente dans les mêmes proportions que les réparations des chromosomes.



FIG. 17. Condensation prématurée des chromosomes induite par la fusion d'un lymphocyte humain non irradié et d'une cellule CHO en mitose à l'aide de PEG. Quarante-six chromatides distinctes apparaissent.

6.4.1. Techniques de PCC

Les différentes techniques de PCC sont les suivantes :

La *PCC par fusion*. Il s'agit de la première technique décrite dans une publication (en 1974) [73, 74]. Elle consiste à fusionner les lymphocytes avec des cellules mitotiques, souvent des cellules CHO, afin d'induire une condensation prématurée des chromosomes humains [67]. Par cette méthode, il est possible de compter les pièces chromosomiques et par conséquent de dénombrer celles qui sont radio-induites, c'est-à-dire que l'on trouve en plus du nombre d'aberrations présent naturellement. Elle permet également d'estimer les expositions non uniformes [75]. Le principal intérêt de cette technique est qu'elle offre la possibilité d'observer les lésions peu de temps après un prélèvement sanguin.

Le *test rapide sur des chromosomes interphasiques (RICA)* permet d'observer des lésions radio-induites à l'aide de sondes FISH. L'ADN des chromosomes est condensé artificiellement afin de repérer les domaines chromosomiques et de détecter les échanges entre deux domaines différents [76–78].

L'*analyse des dicentriques par PCC* permet d'observer ces derniers dans d'autres phases du cycle cellulaire (principalement en phase G₂) que l'habituelle phase M et ainsi de disposer d'images de cellules qu'il n'aurait pas été possible d'obtenir par une analyse classique des dicentriques [79]. Elle est particulièrement intéressante lorsque le nombre de lymphocytes a chuté à la suite d'une exposition et lorsqu'il est difficile d'obtenir des mitoses classiques. Elle permet aussi de réduire le délai entre le prélèvement et l'estimation de la dose [79]. Toutefois, comme la plupart des laboratoires se servent de méthodes chimiques pour induire la PCC, les cellules sont mises en culture pendant 48 heures et, dans ce cas, le délai est le même.

L'*analyse des anneaux par PCC* consiste à observer les anneaux radio-induits dans des cellules à différentes phases du cycle cellulaire (Fig. 18).

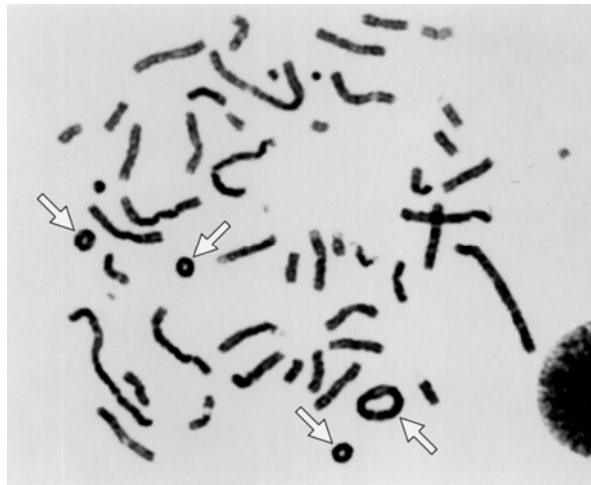
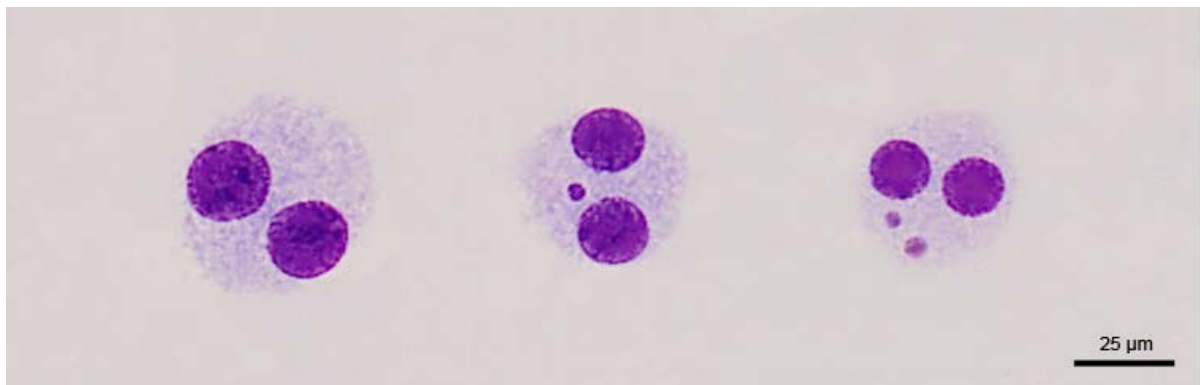
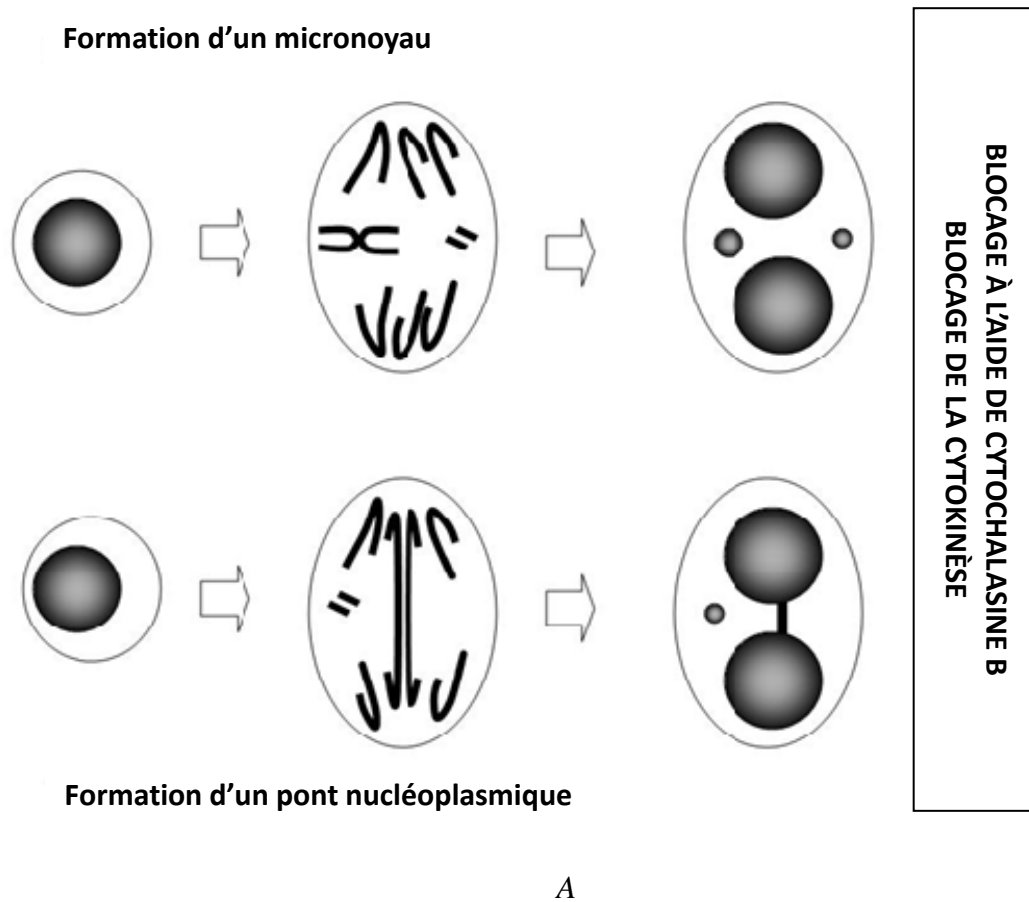


FIG. 18. Après PCC, anneaux (repérés par des flèches) détectés dans un lymphocyte prélevé sur le patient A après l'accident survenu à Tōkai-Mura (voir la section 11.3).

Le principal intérêt de cette technique est de pouvoir mesurer des doses beaucoup plus élevées qu'avec l'analyse classique des dicentriques car la saturation du nombre d'anneaux ne se produit qu'à des doses supérieures à 20 grays pour les rayonnements dont le TLE est faible [70, 80, 81].

6.5. MICRONOYAUX

Les micronoyaux sont constitués de fragments chromosomiques ou de chromosomes entiers qui sont en retard lors de l'anaphase et qui ne font pas partie du noyau des cellules filles (Fig. 19, A et B). Ils ont ainsi l'apparence de petits objets sphériques bien distincts qui ont la même morphologie et les mêmes propriétés de coloration que le noyau à l'intérieur du cytoplasme des cellules filles [82].





C

FIG. 19. A) Schéma du mécanisme de formation des micronoyaux et des ponts nucléoplasmiques lors d'une analyse des micronoyaux par blocage de la cytokinèse. B) Exemple de cellule binucléée sans micronoyaux et comportant un ou deux micronoyaux. C) Exemple de cellule binucléée comportant un ou deux ponts nucléoplasmiques. Dans chaque cas, celui-ci est accompagné d'un micronoyau.

Au milieu des années 1980, une innovation technique importante a eu lieu, : il s'agit du blocage de la cytokinèse dans des lymphocytes en culture par ajout de cytochalasine B (Cyt B) au milieu sans inhibition de la division cellulaire. Le blocage de la cytokinèse [83, 84] provoque la formation de cellules binucléées en empêchant les deux cellules filles de se séparer. Avec cette technique, il est donc possible de distinguer les cellules prolifératives (après la première mitose) et les cellules non prolifératives et de compter spécifiquement les micronoyaux dans les cellules capables d'en former, c'est-à-dire les cellules binucléées. Le test modifié permet de détecter et de compter les micronoyaux dans des cellules binucléées dont le cytoplasme est intact (Fig. 19 B).

Les sondes centromériques permettent de distinguer les micronoyaux issus de fragments de chromosomes acentriques et ceux qui sont issus de chromosomes entiers et donc d'affiner la mesure des micronoyaux présents dans les cellules binucléées [85, 86].

Les développements actuels concernant l'automatisation de l'analyse des micronoyaux ouvrent de nouvelles perspectives pour l'utilisation de cet examen en cas d'accident radiologique affectant un grand nombre de personnes et pour la biosurveillance en routine [87] (voir la section 13.3.3).

L'analyse des micronoyaux par blocage de la cytokinèse est aujourd'hui devenue un test cellulaire qui permet d'évaluer plusieurs lésions chromosomiques dont les cassures, le réarrangement des chromosomes asymétriques, les pertes et non-disjonctions de chromosomes ainsi que la nécrose, l'apoptose et la cytostase [86]. Cette méthode est aussi tout particulièrement utilisée pour compter les ponts nucléoplasmiques (PN) (Fig. 19, A et C), un autre biomarqueur des chromosomes dicentriques issus d'une fusion des télomères ou d'une mauvaise réparation des cassures double brin de l'ADN [86]. Les PN comptés lors d'un test cellulaire par blocage de la cytokinèse peuvent donc également servir en dosimétrie biologique pour évaluer une exposition aux rayonnements ionisants [88]. Une étroite corrélation a été observée entre les PN, les chromosomes dicentriques et les anneaux centriques. Leurs courbes dose-effet sont également similaires [89].

La section 12 contient des informations détaillées sur l'analyse des micronoyaux et sur le test cellulaire.

7. PRÉLÈVEMENTS SANGUINS

7.1. DÉROULEMENT

Un prélèvement par ponction veineuse, de préférence de 10 ml, peut être effectué quelques heures après une exposition corps entier. En revanche, en cas d'exposition partielle ou non uniforme, l'équilibre entre les lymphocytes circulants et les lymphocytes extravasculaires n'est pas atteint avant 24 heures [90]. Si on prélève du sang avant ce délai, la proportion de cellules irradiées dans les échantillons risque de ne pas être représentative. Dans ce cas, il est donc conseillé de reporter le prélèvement au moins au jour suivant. Il convient de s'assurer que l'échantillon est obtenu rapidement car, alors que les paramètres hématologiques ne dépassent pas les limites normales après environ quatre semaines, la fréquence des aberrations, elle, commence à baisser, ce qui accroît l'incertitude associée à l'estimation de la dose reçue [91].

En cas de grave surexposition, lorsqu'il est probable que le nombre de globules blancs va fortement diminuer, il existe une « fenêtre temporelle » de seulement quelques heures ou quelques jours peut-être avant que le nombre de lymphocytes ne soit trop faible pour qu'une analyse cytogénétique puisse être effectuée. Si un traitement médical comprend une transfusion de sang total ou une transfusion partielle, il est important d'obtenir un échantillon du sang du patient avant que ce traitement ne débute. À des fins scientifiques, le laboratoire devrait s'efforcer d'obtenir des échantillons de sang à intervalles réguliers. Sur le plan éthique, cette pratique est acceptable car ces prélèvements permettraient de surveiller les variations du nombre de globules blancs dans l'organisme de l'individu concerné.

Il n'est pas toujours possible de cultiver les cellules rapidement, notamment lorsque les prélèvements sont effectués dans une région reculée et dont les voies de communication sont insuffisantes. Les échantillons de sang peuvent être conservés au froid mais la viabilité des lymphocytes devient rapidement un problème important [92]. Il peut être surmonté en stimulant les lymphocytes avec de la phytohémagglutinine (PHA) juste après la ponction veineuse et en les conservant au frais (en dessous de 20 °C) afin qu'ils ne se transforment pas et ne progressent pas dans le cycle cellulaire avant que les cellules n'aient été portées à 37 °C. La méthode suivante, conçue par M. S. Sasaki (communication personnelle) a permis de cultiver des cellules jusqu'à deux semaines après un prélèvement :

- 1) Préparer des tubes stériles de 10 ml contenant 5 ml de milieu de Leibovitz L-15, 20 % de sérum fœtal de veau et 4 % de PHA déshydratée (il est indispensable d'avoir recours au milieu de Leibovitz L-15 pour les transports de longue durée car son tampon contient 10 fois plus d'acides aminés que les autres milieux de culture courants et son pH est stable pendant longtemps).
- 2) Recueillir un échantillon de sang dans un tube hépariné classique.
- 3) Verser 5 ml de sang hépariné dans le tube contenant le milieu L-15 et les mélanger.
- 4) Conserver les tubes au frais (< 20 °C) ; dans ces conditions, ils peuvent être stockés ou expédiés au laboratoire sans réduire de manière notable la viabilité des échantillons.
- 5) Laver alors les cellules dans un milieu classique et les traiter en suivant les étapes décrites à la section 9.1 pour les mises en cultures courantes.

Si l'on a recours à cette méthode, il convient de la valider au moyen d'une courbe dose-effet obtenue dans les mêmes conditions.

7.2. ANTICOAGULANT

L'héparine de lithium sans conservateur est l'anticoagulant le plus souvent utilisé pour les cultures de lymphocytes, même s'il est également possible de se servir d'héparine de sodium ou d'ammonium. Si l'on utilise un des autres anticoagulants les plus répandus, par exemple l'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA), la croissance des cellules est souvent faible, ils sont donc déconseillés. Si l'on reçoit un échantillon mélangé à un anticoagulant inadéquat, il est préférable d'en demander un autre. Cela n'est toutefois pas toujours possible et, dans ce cas, on peut « sauver » l'échantillon en le lavant. Extraire 4 ml de celui-ci, ajouter 6 ml d'une solution saline équilibrée (solution de Hanks ou de Earle) ou d'un milieu de culture et centrifuger à 600 g pendant trois à cinq minutes. Retirer le surnageant, ajouter 10 ml de liquide de lavage au culot cellulaire et centrifuger à nouveau. Après avoir retiré une deuxième fois le surnageant, il est possible de ramener les cellules lavées au volume de sang initial en ajoutant un milieu de culture contenant 10 % de sérum fœtal de veau. Les cultures peuvent alors être préparées conformément à la section 9.1 en considérant l'échantillon lavé comme un échantillon de sang normal.

7.3. RÉCIPIENTS

Plusieurs fabricants commercialisent des tubes à échantillons en verre ou en plastique qui contiennent la quantité d'héparine de lithium appropriée. On peut aussi bien utiliser des tubes à bouchon à vis classiques que des tubes sous vide. Ces contenants doivent être stériles. De nombreux fabricants les fournissent systématiquement stériles mais il convient de le vérifier. Il faut éviter les tubes qui contiennent des microbilles en verre ou en plastique ou des gels. Si l'on utilise de l'héparine séchée, il importe de mélanger soigneusement le sang en retournant le tube plusieurs fois. Il est préférable, si possible, que le laboratoire de cytogénétique fournisse un tube à échantillon issu de son propre stock. Accessoirement, cela permet de joindre une série d'instructions détaillées à l'intention du médecin et de prévoir un emballage adéquat sur lequel figure la bonne adresse pour le renvoi de l'échantillon.

7.4. TRANSPORT

Dans l'idéal, les échantillons de sang devraient être maintenus entre 18 et 24 °C durant le transport. Si l'on risque d'être confronté à des températures qui se situent bien en dehors de cette plage, il est recommandé de se munir de liquide de refroidissement ou d'emballages permettant de maintenir leur contenu à température ambiante, ainsi que d'enregistreurs de température. Dans tous les cas, il convient d'éviter que les échantillons ne gèlent durant leur transport.

Les échantillons doivent être transportés conformément aux règles nationales et/ou internationales applicables au transport de matières infectieuses, comme l'indique le *Guide pratique sur l'application du Règlement relatif au transport des matières infectieuses* publié par l'OMS [93]. Ce document explique également aux expéditeurs comment classer, marquer, étiqueter et emballer les matières infectieuses ou potentiellement infectieuses comme les échantillons de sang et fixe la liste des documents nécessaires.

On peut utiliser des tubes classiques avec héparine de lithium en verre ou en plastique. Ces tubes doivent être placés dans un emballage secondaire rigide, résistant à l'écrasement et étanche. Cet emballage doit également contenir un matériau de rembourrage et suffisamment de matériau absorbant pour pouvoir absorber la totalité de son contenu, mais il ne doit pas contenir d'éléments réfrigérants. Cet emballage secondaire doit être placé dans un emballage extérieur, par exemple un carton solide correctement étiqueté. Les expéditions, à des fins diagnostiques, d'échantillons de sang qui ne contiennent a priori pas d'agents pathogènes sont désignées comme « N° ONU 3373. MATIÈRE BIOLOGIQUE, CATÉGORIE B ».

L'étiquette doit donc porter cette mention (en anglais), accompagnée d'un losange blanc dans lequel figure, en lettres noires, « UN 3373 ». De plus, doivent figurer sur le colis le nom, l'adresse et le numéro de téléphone de l'expéditeur, le nom, l'adresse et le numéro de téléphone du destinataire, et le numéro de téléphone d'une personne responsable, avertie de l'expédition [93].

Si l'on juge nécessaire d'installer des éléments réfrigérants ou qui permettent de maintenir les produits à température ambiante, ces éléments doivent se trouver à l'extérieur de l'emballage secondaire et l'emballage extérieur doit être constitué d'un isolant thermique, par exemple du polystyrène expansé. Des kits d'emballage conformes au règlement sont disponibles sur le marché.

Pour les envois internationaux, les expéditeurs doivent obtenir les permis d'exportation et d'importation nécessaires et le laboratoire destinataire doit être averti avant envoi des échantillons qu'il va recevoir afin d'obtenir un permis d'importation s'il y a lieu. Il est souvent commode de faire appel à une société de courrier international qui propose un service rapide « porte à porte » et s'occupe de toutes les formalités douanières, etc.

Des durées de transport de deux ou trois jours sont acceptables. Les échantillons de sang nécessitent néanmoins des services de livraison express afin d'éviter les attentes trop longues, par exemple autour des jours fériés.

Du sang transporté par avion ne doit pas être radiographié aux contrôles de sécurité. Si cela risque d'arriver, il convient de mettre dans l'emballage un film radiologique, un dosimètre thermoluminescent (DTL) classique ou un détecteur à luminescence stimulée optiquement (OSL). Une étiquette « NE PAS RADIOGRAPHIER » devrait figurer sur le colis. Cette condition devrait également être mentionnée dans les documents d'accompagnement.

8. OBTENTION D'UNE COURBE DOSE-EFFET *IN VITRO*

8.1. CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

En dépit de l'amélioration des techniques et de l'adoption par différents professionnels de programmes statistiques plus comparables pour l'analyse des données, des différences subsistent entre les courbes d'étalonnage obtenues par les laboratoires. L'interprétation d'une dose à l'aide d'une courbe d'étalonnage venant de l'extérieur peut introduire une incertitude supplémentaire, par conséquent, il est recommandé à tout laboratoire qui envisage de travailler dans le domaine de la dosimétrie biologique de se constituer ses propres données sur la relation dose-effet [94].

Un nombre non négligeable d'événements sont liés aux rayons X, même si la plupart des surexpositions concernent des sources gamma. Il est bien établi que l'étalonnage pour ces deux rayonnements à faible TLE est différent, surtout à faible dose. C'est pourquoi, lorsqu'un laboratoire s'engage dans un programme de dosimétrie biologique, c'est pour les rayonnements qui ont ces qualités que la relation dose-effet doit être établie en premier. Les événements relatifs à des expositions aux neutrons sont heureusement rares mais un laboratoire ne doit pas exclure d'avoir à intervenir en réponse à un accident de criticité. Si tel est le cas, il devra disposer d'une courbe d'étalonnage pour les neutrons de fission.

Des lymphocytes devraient être irradiés *in vitro* afin de s'approcher autant que possible des conditions *in vivo*. Lorsque l'on y parvient, on obtient la même relation dose-effet [95]. Il faut irradier des échantillons de sang fraîchement prélevés contenus dans des tubes avec héparine de lithium à 37 °C sans en séparer les constituants. Après irradiation, ces échantillons doivent être maintenus deux heures de plus à 37 °C puis cultivés par la méthode habituelle, identique à celle utilisée pour évaluer les dicentriques, les translocations ou les micronoyaux sur des échantillons de patients dont on soupçonne qu'ils ont été surexposés.

8.2. CONSIDÉRATIONS PHYSIQUES

Une courbe dose-effet doit reposer sur une dosimétrie physique fiable et précise. Dans ces conditions, plusieurs éléments doivent être pris en compte. Le sang doit être placé de telle sorte qu'il est facile de calculer la dose délivrée et il doit être exposé suffisamment loin de la source pour que l'irradiation puisse être considérée comme uniforme. Ainsi, si l'échantillon mesure un centimètre d'épaisseur, il doit être à au moins un mètre de la source pour que l'écart entre la dose reçue par l'avant et celle reçue par l'arrière de l'objet soit inférieur à 2 %. Le sang doit être entouré de suffisamment de matériaux pour que l'équilibre des particules chargées se réalise. Pour des rayons gamma émis par du cobalt 60, 4 mm d'une matière dont la densité est unitaire suffisent. Pour des rayons X dont le kVp s'élève à 250, 1 mm suffit. Pour des neutrons, 1 mm est aussi généralement suffisant.

Les matériaux qui entourent l'échantillon doivent être réduits au minimum afin d'éviter les complications liées au rayonnement diffusé. Ces matériaux doivent avoir une composition atomique similaire au sang car la dose reçue par la fraction de sang proche du récipient qui contient l'échantillon est due aux électrons mus par les interactions à l'intérieur de la paroi. Si les compositions atomiques sont trop différentes, les cellules ne seront pas irradiées uniformément. Dans ce contexte, la densité électronique est le principal facteur à prendre en compte pour les rayons X et gamma, tandis que pour les neutrons, la constitution des atomes joue un rôle important car les neutrons interagissent avec le noyau des atomes cibles.

Le dispositif d'exposition doit être étalonné par des mesures physiques. Le plus souvent, on utilise une chambre d'ionisation mais d'autres méthodes sont possibles. La figure 20 illustre par exemple des mesures réalisées à l'aide d'alanine.



FIG. 20. Portoir utilisé pour placer et maintenir des tubes à essai de 15 ml et des tubes Vacutainer de 10 ml contenant du sang destinés à être irradiés par des sources gamma. La boîte qui contient le portoir est en plexiglas et ses parois sont de 6 mm afin d'assurer l'équilibre des particules chargées. Cette boîte est également munie de points d'accès aux deux extrémités pour permettre à de l'eau provenant d'un bain-marie (non représenté) de circuler afin de maintenir le contenu de la boîte à 37 °C durant l'irradiation. Des tubes à essai et Vacutainer contenant de l'eau et une fiole d'alanine utilisée pour les mesures de dosimétrie sont également représentés [97] (reproduit avec l'aimable autorisation de l'AFRRI, États-Unis).

Le détecteur d'un dosimètre physique devrait être entouré d'un matériau équivalent à celui qui entoure le sang. Il doit, si possible, avoir des dimensions similaires à l'échantillon de sang afin de pouvoir le remplacer pour mesurer les doses délivrées. Le dosimètre physique doit normalement être étalonné en kerma dans l'air (en grays) et être traçable à un étalon national. Le facteur de conversion en grays pour les tissus mous est le rapport des coefficients d'absorption d'énergie massique. Il est obtenu en multipliant le kerma dans l'air par 1,09 pour des rayons dont le kVp est égal à 250 et par 1,10 pour des rayons gamma émis par du cobalt 60. Le facteur de conversion dépend donc de l'énergie et décroît lorsque celle-ci diminue. Le facteur de conversion n'est pas non plus le même pour les tissus mous et pour le sang, mais, pour les rayonnements à faible TLE, la différence est suffisamment petite pour ne pas en tenir compte. Pour les neutrons, elle peut avoisiner les 5 %. Le facteur d'étalonnage intègre l'absorption par la paroi de la chambre d'ionisation mais il est souvent nécessaire de corriger le débit de dose en raison de l'auto-absorption par le sang.

La méthode habituelle pour calculer les doses consiste à convertir le kerma dans l'air mesuré en dose absorbée par un tissu ou du sang puis à effectuer les conversions nécessaires pour tenir compte de la distance (loi de l'inverse des carrés), de l'absorption et de la différence de matériaux au contact du sang. La taille et la géométrie générale du dispositif constituent un compromis entre ces facteurs car plus l'échantillon de sang est petit, plus la correction liée à l'absorption est faible et plus la correction liée aux différences de matériaux est importante. Néanmoins, la géométrie et les matériaux doivent être choisis de telle sorte que les corrections nécessaires soient réduites au minimum.

Afin d'obtenir une courbe d'étalonnage *in vitro* applicable aux cas d'expositions accidentelles aiguës, le débit de dose doit être choisi de telle sorte que les doses soient délivrées en moins de 15 minutes. Les différences entre les durées pendant lesquelles les diverses doses sont reçues sont alors suffisamment faibles pour que β , le coefficient de la dose au carré pour le calcul de la fréquence des aberrations, ne varie pas de plus d'environ 4 %. Par ailleurs, certains chercheurs ont choisi de réaliser des étalonnages pour des expositions non

aiguës afin de mieux comprendre comment le coefficient β doit être modifié afin d'interpréter la fréquence des aberrations pour les accidents liés à une irradiation prolongée. Il est encore plus indispensable, pour ces étalonnages, que la température des échantillons soit de 37 °C. Si l'irradiation s'effectue à température ambiante, il y aura peu ou pas de réparation durant l'exposition de sorte que la courbe dose-effet sera la même que pour une irradiation aiguë. Il ne faut pas oublier le point important suivant : c'est la durée d'exposition, et non le débit de dose, qui constitue le paramètre essentiel d'un étalonnage réalisé pour une irradiation prolongée. Par conséquent, chaque point de la courbe doit correspondre à du sang irradié pendant la même durée. Ce résultat est obtenu en faisant varier la distance entre la source et l'échantillon, ce qui nécessite évidemment beaucoup plus de mesures physiques d'étalonnage. L'autre solution, la plus simple, consiste à délivrer un débit de dose constant, et, par conséquent, à ne pas déplacer la source. Elle impose de fixer des durées d'exposition différentes pour chaque dose et les données obtenues ne s'adaptent pas aussi bien à l'équation linéaire quadratique pour la relation entre la dose et l'effet [96].

Pour l'étalonnage, certains laboratoires préfèrent mettre l'échantillon de sang dans un fantôme car, de cette manière, la diffusion du rayonnement dans le corps humain est dans une certaine mesure prise en compte (Fig. 20 et 21).

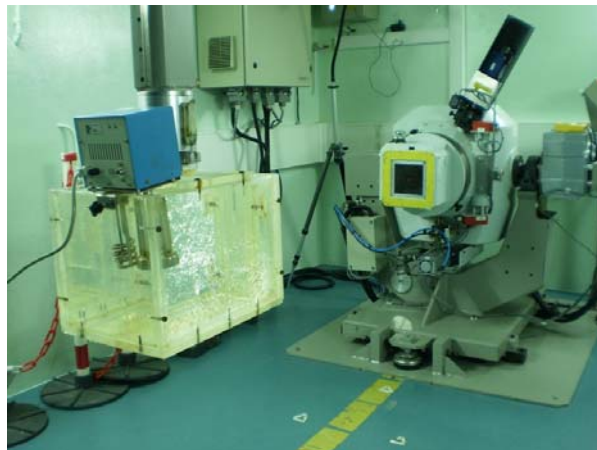


FIG. 21. Bain-marie chauffé à 37 °C et placé devant une source gamma de cobalt 60. Afin d'obtenir l'équilibre électronique, l'échantillon de sang se trouve à l'intérieur d'un support en plexiglas.

Cela étant, il convient de s'intéresser davantage aux facteurs de correction dosimétrique évoqués ci-dessus et à la question de savoir si une chambre d'ionisation peut être installée à côté de l'échantillon de sang. L'eau sert généralement de fantôme et doit être maintenue à 37 °C. Le fait de placer la chambre d'ionisation dans les mêmes conditions géométriques que l'échantillon de sang permet de prendre en compte la dose due au rayonnement diffusé. L'utilisation d'eau chaude impose d'appliquer des corrections de température et de pression importantes. Il faut bien sûr éviter que la chambre ne soit mouillée. Il est particulièrement difficile d'effectuer des étalonnages pour des neutrons dans un fantôme. Dans ce cas, il est préférable d'utiliser un matériau équivalent tissu pour le fantôme plutôt que de l'eau. On obtient alors un spectre de rayonnement analogue à celui qui traverse l'organisme, voire une composante de faible TLE pour la dose aux lymphocytes bien plus proche de la réalité. Il peut être très difficile de déterminer le spectre des composantes du rayonnement qui contribuent à la dose totale absorbée.

8.3. CONSIDÉRATIONS STATISTIQUES

Comme indiqué dans la section 3, il y a de très fortes raisons de penser que la fréquence des aberrations chromosomiques ou des micronoyaux (F) est liée à la dose (D) par une équation linéaire quadratique :

$$F = C + \alpha D + \beta D^2 \quad (3)$$

Dans le cas de rayonnements à TLE élevé, α est grand et β est moins important sur le plan biologique et est aussi statistiquement « masqué ». L'équation linéaire suivante constitue alors une bonne approximation de la relation entre la dose et l'effet :

$$F = C + \alpha D \quad (4)$$

L'objectif de l'ajustement de la courbe est de déterminer les valeurs de C, α and β pour lesquels les courbes réelles et théoriques sont les plus proches. Pour les dicentriques, l'irradiation par rayons X ou gamma se traduit par une distribution des lésions qui est très bien représentée par une loi de Poisson [98]. En revanche, pour les neutrons et les autres types de rayonnement à TLE élevé, les distributions présentent une surdispersion pour laquelle la variance (σ^2) est supérieure à la moyenne (f). Le fait de savoir si le rapport entre la variance et la moyenne (σ^2/f) est fonction de la dose reste à l'heure actuelle une question ouverte. Pour les micronoyaux, on observe une surdispersion des données quelle que soit la dose reçue, même en cas d'irradiation photonique.

Comme les méthodes d'ajustement de courbes reposent sur une statistique de Poisson, il convient de vérifier que la distribution des dicentriques suit la loi de Poisson pour chaque dose utilisée pour construire la courbe d'étalonnage. À cette fin, on se sert aujourd'hui le plus souvent du test u [99, 100]. Celui-ci consiste à calculer l'indice de dispersion (σ^2/y) dans une unité normalisée, laquelle, si les données suivent une loi de Poisson, vaut un. Si u est supérieur à 1,96, il y a surdispersion (avec un seuil de signification bilatéral α égal à 0,025).

$$u = (\sigma^2/f - 1) \sqrt{\frac{N-1}{2(1-1/X)}} \quad (5)$$

où :

N représente le nombre de cellules analysées et

X le nombre de dicentriques (ou de dicentriques et d'anneaux) détectées.

Si u est inférieur à 1,96, il y a sous-dispersion. En biologie, il est très peu probable qu'une sous-dispersion se produise. Des valeurs de u inférieures à 1,96 peuvent être le signe d'un problème sur l'échantillonnage des données.

Pour pouvoir ajuster correctement la courbe, il faut disposer de suffisamment de degrés de liberté pour réduire au maximum l'erreur sur la courbe. L'idéal est d'utiliser 10 doses comprises entre 0,25 et 5,0 grays. Pour les rayonnements à faible TLE, il n'est pas nécessaire de disposer de données pour des doses supérieures à environ 5 grays et, qui plus est, au-delà de cette valeur, on a constaté une saturation de la fréquence des aberrations, ce qui entraîne un biais sur le coefficient β [101]. Pour les rayonnements à TLE élevé, il est recommandé de délivrer une dose de 2,0 grays au maximum.

Comme la plupart des accidents radiologiques concernent des doses inférieures à 1,0 gray, le début de la courbe est particulièrement important pour pouvoir estimer les doses reçues. Il convient donc d'entreprendre un effort réel afin de réduire l'incertitude statistique associée au coefficient linéaire α . Pour l'étalonnage, il est recommandé de délivrer plusieurs doses,

certainement au moins quatre, dans la plage comprise entre 0,25 et 1,0 gray. Il est fortement souhaitable que le laboratoire soit capable d'obtenir des valeurs pour des doses inférieures à 0,25 gray. Pour des doses plus élevées, il convient de détecter 100 dicentriques à chaque dose. Toutefois, si la dose est plus faible, cette valeur est difficile à obtenir et il convient plutôt d'analyser plusieurs milliers de cellules par essai, la plage recommandée étant comprise entre 3 000 et 5 000. Dans tous les cas, le nombre de cellules à examiner doit dépendre du nombre de points prévus pour le début de la courbe et il faut s'attacher à réduire au maximum l'erreur associée à la courbe ajustée. Le tableau 4 présente un exemple de données utilisées pour construire des courbes dose-effet pour un rayonnement gamma à faible TLE et pour un rayonnement alpha à TLE élevé.

TABLEAU 4. RÉSULTATS CYTOGÉNÉTIQUES OBTENUS À PARTIR D'ÉCHANTILLONS DE SANG IRRADIÉS PAR DES PARTICULES GAMMA ET PAR DES PARTICULES D'HÉLIUM 4 [102, 103]

rayons γ (cobalt 60)											
dose (Gy)	N	X	distribution cellulaire des dicentriques							σ^2/f	u
			0	1	2	3	4	5	6		
0,000	5000	8	4992	8						1,00	-0,07
0,100	5002	14	4988	14						1,00	-0,13
0,250	2008	22	1987	20	1					1,08	2,61
0,500	2002	55	1947	55						0,97	-0,86
0,750	1832	100	1736	92	4					1,03	0,79
1,000	1168	109	1064	99	5					1,00	-0,02
1,500	562	100	474	76	12					1,06	1,08
2,000	332	103	251	63	17	2				1,14	1,82
3,000	193	108	104	72	15	2				0,83	-1,64
4,000	103	103	35	41	21	4	2			0,88	-0,84
5,000	59	107	11	19	11	9	6	3		1,15	0,81
Moyenne										1,0	

Particules d' ^4He de 20 MeV											
dose (Gy)	N	X	distribution cellulaire des dicentriques							σ^2/f	u
			0	1	2	3	4	5	6		
0,000	2000	3	1997	3						1,00	-0,04
0,051	900	19	881	19						0,98	-0,44
0,104	1029	27	1004	23	2					1,12	2,84
0,511	1136	199	960	154	21	1				1,07	1,60
1,010	304	108	217	69	15	3				1,09	1,15
1,536	142	96	75	40	25	2				0,98	-0,20
2,050	137	120	63	44	16	12	2			1,20	1,65
2,526	144	148	66	34	25	14	3	2		1,40	3,40
3,029	98	108	47	16	17	17	0		1	1,56	3,93
Moyenne										1,19	

Pour chaque dose délivrée, le tableau indique le nombre total de cellules analysées (N), le nombre total de dicentriques observées (X), la distribution cellulaire des dicentriques, l'indice de dispersion (σ^2/f) et le test u (u). Une valeur de u supérieure à 1,96 signale une surdispersion.

La méthode recommandée pour déterminer les meilleurs coefficients d'ajustement est celle du maximum de vraisemblance [104, 105]. Dans cette approche, la meilleure valeur d'ajustement pour chaque coefficient est obtenue en supposant que les données suivent une loi de Poisson et en maximisant la probabilité des observations par la méthode des moindres

carrés repondérés itérativement. Pour les distributions surdispersées (qui ne suivent pas la loi de Poisson), que l'on obtient notamment avec des rayonnements à TLE élevé, les pondérations doivent tenir compte de la surdispersion. Si les données montrent une relation statistiquement significative entre σ^2/f et la dose, il convient de l'utiliser. Sinon, il faut, en chaque point, diviser les coefficients de pondération de Poisson par la valeur moyenne de σ^2/f .

La qualité d'ajustement de la courbe et la signification des coefficients α et β ajustés doivent être vérifiées, par exemple à l'aide respectivement du test du khi² (χ^2) et d'une forme appropriée du test de Fisher (par exemple le test de Fisher, le test z ou le test t). Ces tests sont détaillés dans l'annexe VI. S'il apparaît que l'ajustement n'est pas bon [par exemple si le χ^2 est supérieur aux degrés de liberté (ddl)], on doit ajouter $(\chi^2/df)^{1/2}$ à l'erreur type (Er. T.). De nombreux programmes informatiques calculent les valeurs des Er. T. à partir de la somme des carrés, et non de l'estimation de la variance en suivant la loi de Poisson, ce qui peut conduire à une sous-estimation de l'erreur poissonnienne. Pour cette raison, lorsque les erreurs types sont calculées par cette méthode et lorsque les ddl sont supérieurs au χ^2 , il est de bonne pratique d'ajouter $(df/\chi^2)^{1/2}$ aux Er. T.

Le tableau 5 indique les coefficients ajustés obtenus lorsque les données du tableau 4 sont utilisées et lorsque les erreurs types sont calculées en s'appuyant sur une hypothèse poissonnienne.

TABLEAU 5. RÉSULTATS DE L'AJUSTEMENT DES DONNÉES RELATIVES AUX DICENTRIQUES DU TABLEAU 4

rayons γ (cobalt 60)				
C \pm Er. T.	α (Gy ⁻¹) \pm Er. T.	β (Gy ⁻²) \pm Er. T.	χ^2	ddl
0,00128 \pm 0,00047	0,02103 \pm 0,00516 $F = 4,08$, $p < 0,03$	0,06307 \pm 0,00401 $F = 15,73$, $p < 0,01$	6,61 $p = 0,58$	8
Particules d' ⁴ He de 20 MeV				
C \pm Er. T.	α (Gy ⁻¹) \pm Er. T.	β (Gy ⁻²) \pm Er. T.	χ^2	ddl
0,00143 \pm 0,00093	0,32790 \pm 0,02875 $F = 11,41$, $p < 0,01$	0,02932 \pm 0,01636 $F = 1,79$, $p = 0,25$	7,40 $p = 0,39$	6
0,00193 \pm 0,00097	0,37290 \pm 0,01787 $F = 20,87$, $p^1 < 0,01$		10,91 $p = 0,14$	7

¹ $F_{0,05 [7, 7]} = 3,77$

Les valeurs p associées au test du χ^2 présentées dans le tableau 5 indiquent que les points de données ajustés ne sont pas statistiquement différents de ceux qui ont été observés, ce qui confirme la qualité de l'ajustement. En outre, la signification des coefficients linéaire et quadratique α , elle aussi, été confirmée par le test de Fisher, c'est-à-dire en calculant le rapport entre chaque coefficient et son erreur type. Pour chaque coefficient, la valeur F est supérieure à 3,44 (valeur de seuil pour $F_{0,05 [8, 8]}$) et la valeur z est supérieure à 1,96 (valeur de seuil pour une distribution normale ; ces deux valeurs figurent dans les tables de référence). Le test de Fisher, décrit dans l'annexe VI, consiste à calculer le rapport entre deux distributions qui suivent la loi du khi² et $F_{0,05 [8, 8]}$ désigne la valeur de seuil lorsque $\alpha = 0,05$ avec huit degrés de liberté pour le numérateur et huit degrés de liberté pour le dénominateur. Pour les particules d'hélium 4, on a soustrait aux pondérations la valeur moyenne de σ^2/f , c'est-à-dire 1,19. Le coefficient β de l'équation linéaire quadratique n'est

pas significatif (la valeur de seuil pour $F_{0,05 [6, 6]}$ est égale à 4,28 ; pour le test z, $p = 0,12$), c'est pourquoi un ajustement linéaire est également présenté.

Les opinions varient concernant la manière de prendre en compte la fréquence naturelle des aberrations pour ajuster la courbe. Trois techniques sont généralement appliquées : un effet à zéro gray est inclus dans la méthode d'ajustement de la courbe, ce point est ignoré ou encore il est représenté, dans chaque technique d'ajustement, par une fréquence naturelle de référence. Si la fréquence mesurée quand la dose est nulle est utilisée comme point de donnée pour l'ajustement de la courbe (ce qui a été fait dans l'ajustement présenté ci-dessus), la fréquence naturelle devient un paramètre variable. Cependant, comme la fréquence des aberrations observées dans des cellules non irradiées est généralement faible, on n'en observe souvent aucune, par conséquent, la fréquence mesurée à dose nulle est nulle. Comme indiqué précédemment, à faible dose, la précision statistique des observations est habituellement faible. C'est pourquoi le fait d'inclure la fréquence à dose nulle lors de l'ajustement de la courbe peut parfois aboutir à des estimations négatives pour la fréquence naturelle (C) et à des coefficients linéaires négatifs (α), ce qui, à l'évidence, n'a aucun sens sur le plan biologique. Certains chercheurs résolvent ce problème en ignorant les points associés à une dose nulle et en forçant la courbe à passer par l'origine. Cependant, il existe suffisamment de données publiées dans des études sur des sujets exposés uniquement au rayonnement naturel pour établir qu'il existe une petite fréquence naturelle d'aberrations. Pour cette raison, certains spécialistes ont décidé d'utiliser une petite fréquence de fond comme point de données et de lui attribuer une grande incertitude. Dans l'idéal, un laboratoire devrait se constituer ses propres valeurs pour la fréquence naturelle des aberrations, même si cela impose d'analyser plusieurs milliers de cellules. Le consensus qui s'est dégagé est que la fréquence naturelle des dicentriques est comprise entre 0,5 et 1,0 pour 1 000 cellules [106], tandis que pour les translocations [107] et les micronoyaux [108], les fréquences de référence sont plus élevées.

Plusieurs programmes peuvent être utilisés pour ajuster les courbes, par exemple le programme *Poisson Iteratively Reweighted Least Squares* (PIRLS) destiné aux modèles additifs, multiplicatifs, de puissance et non linéaire, programme qui a été développé par Peterson [109], ou encore des outils basés sur R^2 . Ils doivent être associés à un sous-programme spécialement conçu pour ajuster des courbes et qui figure dans la présente publication dans l'annexe VI, section 3. De plus, plusieurs programmes informatiques spécialisés dans l'ajustement de courbes ont été récemment développés par des professionnels de cytogénétique radiologique [110]. CABAS [111] utilise des méthodes de maximum de vraisemblance pour ajuster des données d'étalonnage à une équation linéaire quadratique. *Dose Estimate* [112] est un outil similaire qui permet d'ajuster des courbes à une équation linéaire ou à une équation linéaire quadratique. En plus de la fonction d'ajustement de courbes, CABAS et *Dose estimate* disposent d'outils qui aident à traiter les données issues d'accidents radiologiques afin d'estimer les doses reçues lorsqu'il ne s'agit pas d'une exposition récente et aiguë corps entier. Ils effectuent l'ensemble des calculs qui sont décrits dans la section 9.7.

Que l'on se serve de ces logiciels ou d'autres outils, le programme utilisé doit donner suffisamment d'informations sur les méthodes appliquées et indiquer la variance et la covariance des coefficients ajustés, car celles-ci sont nécessaires au calcul des incertitudes associées à l'estimation des doses (voir la section 9.7.3).

² R est un environnement logiciel libre conçu pour effectuer des calculs statistiques et peut être téléchargé à l'adresse <http://www.r-project.org/>.

9. ANALYSE DES DICENTRIQUES

Le texte qui suit et qui porte sur la culture de cellules, la fixation et la coloration a été élaboré pour l'analyse des dicentriques mais, pour l'essentiel, est également applicable aux autres tests qui sont décrits dans la présente publication. Comme les procédures sont présentées ici de manière exhaustive, les sections qui concernent les autres analyses se contentent d'expliquer en quoi les procédures qui s'y rapportent s'écartent de celles qui sont utilisées pour les dicentriques.

En bref, les différences importantes sont les suivantes :

- a) Pour l'analyse des dicentriques, on cultive les cellules pendant deux jours contre trois jours pour le test des micronoyaux et/ou des ponts nucléoplasmiques [test cellulaire des micronoyaux par blocage de la cytokinèse (CBMN Cyt)].
- b) La condensation prématurée des chromosomes par fusion en mitose n'impose pas de mise en culture de cellules alors que celle-ci est en général nécessaire si la condensation est induite par une substance chimique.
- c) L'analyse des dicentriques et les autres tests effectués en métaphase nécessitent d'arrêter la mitose à l'aide de Colcemid, ce qui n'est pas le cas pour le CBMN Cyt.
- d) En revanche, ce dernier essai impose de bloquer la cytokinèse à l'aide de cytochalasine B.

9.1. CULTURE DES CELLULES

À réception d'un échantillon de sang, il convient de mettre en place plusieurs cultures dupliquées.

9.1.1. Choix du milieu de culture

On peut se servir de plusieurs milieux de culture précis. Tous sont disponibles sur le marché et se sont révélés adaptés à la culture des lymphocytes. Il convient de ne pas utiliser de milieux dépourvus d'acide folique, lesquels servent à détecter les sites fragiles héréditaires. Il apparaît que certains milieux (F10 et RPMI 1640) favorisent une croissance plus rapide que d'autres, le MEM ou le milieu 199, par exemple [113]. Même si le nombre de cellules qui ont subi une deuxième métaphase (M2) *in vitro* peut être déterminé par la méthode de fluorescence plus Giemsa (FPG), il est de bonne pratique d'appliquer en routine un protocole qui donne en général le moins de cellules M2 possible au bout de 48 heures.

Le milieu de culture doit être supplémenté avec de la L-glutamine, de l'héparine et des antibiotiques. La pénicilline et la streptomycine sont fréquemment utilisées (on trouvera plus de détails en annexe I). Suivant le fabricant, certains milieux contiennent déjà ces antibiotiques. Cependant, il peut être nécessaire d'ajouter des antibiotiques lorsque l'on dilue le milieu jusqu'à la concentration active si celui-ci a été acheté sous forme de poudre ou de concentré. Certains laboratoires préfèrent utiliser des milieux de culture dépourvus d'antibiotiques, auquel cas il est indispensable de travailler dans des conditions d'asepsie, et notamment de se servir de tubes stériles pour les échantillons de sang.

9.1.2. Choix du sérum

Il convient d'utiliser du sérum fœtal de veau ou du sérum AB humain. Comme il peut y avoir des différences considérables entre les lots de sérum, il faut vérifier que les nouveaux produits qui arrivent favorisent la croissance des cellules. Le sérum doit être rendu inactif en

le chauffant à 56 ± 1 °C pendant une demi-heure à une heure dans un bain-marie car cela contribue à réduire les différences entre les lots. Il est également possible de cultiver des lymphocytes dans un milieu dépourvu de sérum. De tels milieux sont disponibles sur le marché.

9.1.3. Bromodésoxyuridine

Il convient d'ajouter de la bromodésoxyuridine (BrdU) aux cultures afin de pouvoir utiliser la technique fluorescence plus Giemsa (FPG). Cet analogue de la thymidine est sélectionné de préférence pour la réplication de l'ADN. Lorsqu'il y a substitution des deux brins d'une chromatide et d'un seul brin de l'autre, la FPG fait apparaître un effet « arlequin » sur des chromosomes métaphasiques de cellules qui ont subi deux divisions ou plus après la substitution (Fig. 22).

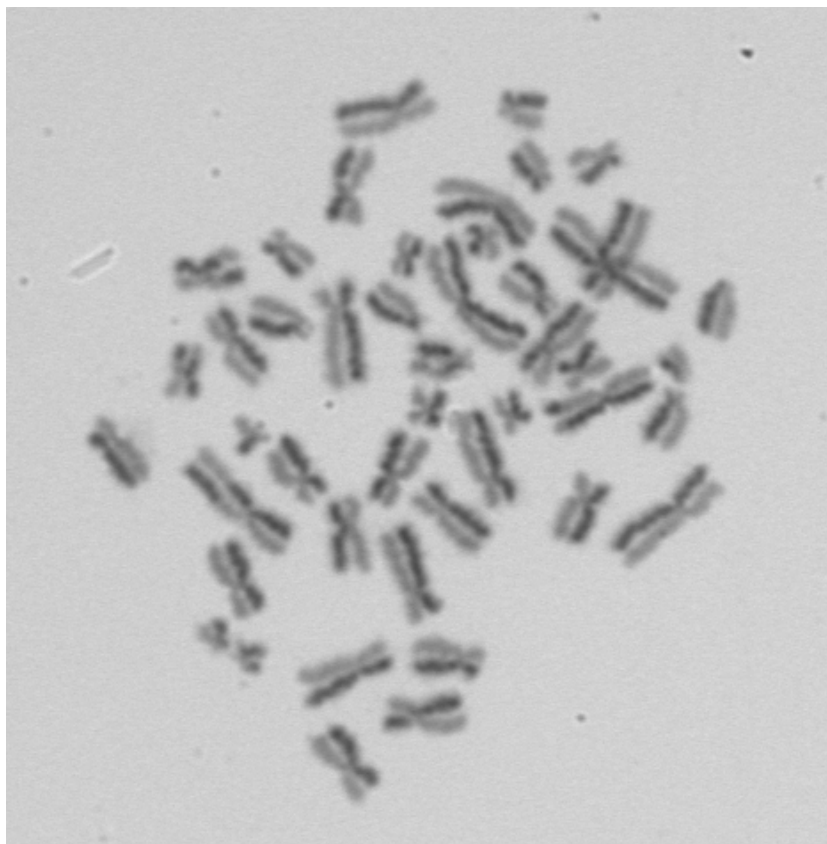


FIG. 22. Chromosomes métaphasiques ayant subi deux divisions et colorés à la FPG. La coloration des chromatides sœurs n'est pas la même, c'est l'effet « arlequin ».

La concentration de BrdU à utiliser n'est pas universelle. La quantité optimale à ajouter dépend de facteurs comme la concentration de thymidine dans le milieu de culture particulier utilisé. Les laboratoires doivent mener leurs propres expériences pour déterminer la quantité adéquate. Il est d'usage d'ajouter la BrdU au milieu de culture à une concentration telle que sa concentration dans le milieu de culture final n'excède pas 50 μ M (15,4 μ g/ml). Au-dessus de cette valeur, la BrdU risque d'entraîner un retard de mitose excessif [115]. Avec des échantillons de sang frais (< 24 heures), une concentration finale d'à peu près 15 μ M est souvent satisfaisante. Si la livraison des échantillons a pris du retard à cause du transport de sorte que le prélèvement date de plus de 24 heures, il peut être nécessaire d'augmenter la concentration en BrdU jusqu'à environ 40 μ M pour que la FPG soit fiable [116]. Il convient de noter que la BrdU est sensible à la lumière, par conséquent, les cultures doivent être

préparées sous une lumière tamisée (par exemple une lumière inactinique jaune) puis incubées dans l'obscurité. Il peut être utile d'envelopper les récipients de culture dans du papier d'aluminium.

Lorsque l'on se sert de BrdU, il convient de choisir une durée de fixation optimisée pour laquelle une proportion élevée de cellules analysables se trouve au stade de la première division. Il n'est malheureusement pas possible de prévoir systématiquement quelle est la durée optimale. Des différences peuvent apparaître non seulement en raison des variations individuelles mais aussi à cause des effets des rayonnements sur la durée des cycles cellulaires. Des cellules fortement lésées peuvent réagir assez lentement à une stimulation mitogénique. En pratique, les laboratoires cultivent les échantillons pendant une durée fixe, en général 48 heures. Une autre solution consisterait à effectuer un grand nombre de mises en culture, à fixer des durées d'incubation différentes pour chaque culture puis à choisir celle où la proportion de cellules qui effectuent leur première mitose est la plus élevée. Toutefois, cette technique prend du temps et est coûteuse et irréalisable, surtout lorsqu'il faut effectuer des analyses pour de nombreux patients rapidement. C'est pourquoi il a été proposé d'apporter une légère modification aux conditions de culture. On peut ajouter de la cytochalasine B (Cyt B), normalement utilisée pour les préparations liées aux micronoyaux (section 12), à des cultures de cellules en métaphase, ce qui permet de distinguer les cellules qui ont subi plusieurs divisions et, à des fins d'analyse, de ne retenir que les cellules qui sont au stade de la première mitose. La Cyt B est ajoutée 24 heures après la mise en culture à une concentration finale de 2 µg/ml. Hayata *et al.* [117] ont été les premiers à appliquer cette technique pour repérer les cellules qui effectuaient leur premier cycle, alors que l'on se servait auparavant du nombre de chromosomes et non de l'effet arlequin observé sur les chromatides sœurs grâce à la BrdU. La Cyt B n'est pas très répandue pour l'analyse des dicentriques mais a été utilisée avec succès pour estimer des doses lors de comparaisons interlaboratoires [118,119].

9.1.4. Mitogènes

Plusieurs mitogènes, principalement des lectines végétales, sont disponibles sur le marché. Dans la plupart des cas, les populations particulières de lymphocytes qu'ils stimulent n'ont pas été précisément définies. Il est conseillé de se servir de phytohémagglutinine (PHA), qui est le mitogène le plus couramment utilisé. Plusieurs fabricants commercialisent deux versions de la PHA, parfois appelées types M et P. La version plus coûteuse et hautement purifiée (P) n'est pas nécessaire pour les cultures de sang total en routine. Cela étant, certains laboratoires estiment qu'il est judicieux de s'en servir pour cultiver des lymphocytes isolés.

Il existe d'autres mitogènes, par exemple la concanavaleine A ou le mitogène du raisin d'Amérique, qui stimulent certaines catégories de lymphocytes. Ils ont des applications dans certains dispositifs expérimentaux et pour les cellules non humaines. Aucun n'a un spectre aussi large que la PHA et il convient de ne pas y avoir recours en dosimétrie biologique.

9.1.5. Les cultures

On peut utiliser des récipients en verre stérilisables à l'autoclave ou des récipients stériles et jetables en plastique. Les échantillons sont souvent cultivés dans des tubes jetables à fond rond. Ceux-ci doivent être maintenus inclinés à 45°, les bouchons dévissés, dans un incubateur à 37 °C contenant 5 % de CO₂. Il est également possible de cultiver les cellules sans incubateur à CO₂ mais les bouchons doivent alors être fermés.

Les cellules doivent être incubées à 37,0 ± 0,5 °C. La stabilité thermique de l'incubateur est importante et il est recommandé de surveiller son fonctionnement, à l'aide d'un thermocouple et d'un enregistreur à tracé continu. Si la température est trop basse, il y aura peu, voire pas, de cellules en métaphase au bout de 48 heures. Si la température est élevée

(38 °C ou plus), les cellules progressent plus rapidement dans le cycle de sorte qu'au bout de 48 heures, il y aura beaucoup trop de cellules en métaphase qui auront subi une deuxième division [120]. Dans un laboratoire très actif, où un incubateur commun peut être ouvert et fermé fréquemment, il existe un risque que, même avec un ventilateur, la température des cultures devienne sous-optimale pendant une durée non négligeable. Une autre solution consiste à incuber les échantillons dans un bain-marie thermostaté. Ceux-ci permettent un transfert de chaleur vers les cultures plus rapide que par l'air et présentent une plus grande stabilité thermique pendant les 48 heures d'incubation. Si l'on applique cette méthode, il doit y avoir un espace d'au moins 10 ml au-dessus d'une culture de 5 ml, et cet espace doit être rempli d'air contenant 5 % de CO₂ filtré. Les couvercles des récipients doivent être hermétiquement fermés. Le bain-marie doit être muni d'un couvercle afin que les cultures qui contiennent du BrdU soient dans l'obscurité.

Les méthodes de culture reposent, avec des modifications, sur les techniques initialement publiées par Moorhead *et al.* [121] et par Hungerford [122]. En résumé, on peut mettre en culture du sang total ou des lymphocytes isolés. Les avantages et inconvénients de ces techniques concernent le volume des échantillons de sang fournis, le temps nécessaire pour effectuer une mise en culture et le nombre de cellules en métaphase analysables (index mitotique plus élevé) qui en résulte. Les critères qui permettent de déterminer l'index mitotique figurent en annexe V.

9.1.5.1. Sang total

Cette méthode peut être appliquée pour de petits échantillons de sang (1–2 ml) et, si nécessaire, pour du sang prélevé par une piqûre au doigt. Avec cette méthode, les mises en culture sont rapides et faciles. Cependant, le nombre de cellules en métaphase obtenues par lame de microscope est en général plus faible qu'avec les autres techniques. Le mode opératoire consiste à verser 0,3 ml de sang total et 0,1 ml de solution de travail de PHA dans un récipient contenant 4 ml de milieu et 1 ml de sérum puis à incuber ce récipient.

9.1.5.2. Lymphocytes isolés

Cette méthode consiste à ajouter au milieu un inoculum enrichi en lymphocytes. Elle est adaptée lorsque l'on dispose d'échantillons sanguins de plus de 3 ml. Il existe deux techniques pour obtenir des inoculums enrichis :

- a) La première consiste à ajouter 0,15 ml de PHA à 2 ml de sang puis à agiter doucement le mélange. Le sang va s'agglutiner sur les parois du récipient. 2 ml de sérum sont ensuite ajoutés au mélange, lequel est alors agité doucement puis centrifugé pendant une minute à 50 g. On retire le surnageant d'environ 3 ml, constitué de sérum, de plasma et de la couche leucocytaire avec une seringue, en laissant la plupart des globules rouges agglutinés. Le fait de remuer la couche leucocytaire avec la pointe de l'aiguille pendant que l'on retire le surnageant facilite cette opération. Se servir d'une aiguille de gros calibre afin de réduire autant que possible la tension de cisaillement sur les cellules. Les 3 ml de liquide obtenus sont suffisants pour effectuer deux mises en culture et sont répartis également entre deux récipients qui contiennent chacun 4 ml de milieu.
- b) La seconde consiste à séparer les lymphocytes du sang total en couches dans une colonne Ficoll-Hypaque stérile. Pour ce faire, on trouve sur le marché des tubes prêts à l'emploi. Ces tubes sont centrifugés puis la couche riche en lymphocytes est retirée. Ces lymphocytes sont lavés dans une solution saline tamponnée au phosphate puis mis en culture. Il est possible de déterminer la concentration de cellules viables par exclusion du colorant sur un petit aliquot dont le nombre de cellules est compté dans un hématimètre afin d'ajuster la concentration de cellules dans les cultures à sa valeur optimale. Celle-ci est susceptible de varier en fonction du laboratoire et doit donc être

établie de manière indépendante, mais elle est généralement comprise entre 0,5 et $2,0 \times 10^6/\text{ml}$. Hayata *et al.* et McFee *et al.* [123, 124] ont proposé un protocole détaillé pour cette méthode. Ils soulignent qu'elle est particulièrement adaptée à l'obtention de préparations propres contenant de nombreuses cellules en métaphase. Certains laboratoires préfèrent utiliser des cultures de lymphocytes isolés pour l'analyse par FISH et lorsqu'ils préparent des lames examinées à l'aide d'un détecteur automatique de cellules en métaphase (sections 10 et 13.3.1). Cette technique est sans doute trop compliquée pour compter les aberrations par coloration classique au Giemsa à l'aide d'un microscope optique normal lorsque la méthode a) décrite ci-dessus ou des cultures de sang total suffisent.

9.1.6. Arrêt de la mitose

On peut utiliser de la colchicine ou son analogue synthétique, la démecolcine (Colcemid), ce dernier étant privilégié par la plupart des chercheurs. Une solution mère adéquate du produit contiendra $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ de Colcemid en solution saline physiologique, et, si elle est préparée dans des conditions d'asepsie et stockée à 4°C , peut être conservée pendant six mois. L'ajout de 25 à $50 \mu\text{l}$ de cette solution à chaque culture de 5,0 ml (concentration finale : $0,05\text{--}0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$) devrait permettre d'obtenir un nombre suffisant de cellules en métaphase tout en évitant les problèmes de toxicité cellulaire qui surviennent à des concentrations plus élevées. On ajoute généralement le Colcemid deux ou trois heures avant l'arrêt des cultures. Quelques chercheurs [125] préfèrent ajouter le Colcemid au milieu de la période de culture, c'est-à-dire après 24 heures, ou, dans certains cas, au début de la culture [123]. Cette technique doit empêcher les cellules de progresser au-delà de la première métaphase et permet donc d'éviter l'analyse des cellules M2. Il convient de souligner que le fait d'ajouter le Colcemid tôt peut entraîner une condensation excessive des chromosomes si l'on ne diminue pas sa concentration finale dans les cultures pour la ramener à environ $0,05 \mu\text{g}/\text{ml}$ [123]. Cette technique permet de prolonger les cultures au-delà de 48 heures afin de tenir compte de durées de cycles cellulaires plus longues chez certains individus, par exemple les personnes âgées.

9.2. MÉTHODE DE FIXATION

Les cultures de lymphocytes sont généralement incubées pendant 48 heures, même si la durée exacte peut fluctuer, en fonction du laboratoire, de 46 à 52 heures. Les laboratoires doivent déterminer la durée optimale qui permet normalement d'obtenir le plus de cellules M1 en métaphase avec leur protocole de routine. Il est également recommandé de ne fixer que quelques-unes des cultures dupliquées à la fin de cette période et de laisser les autres dans l'incubateur. Cela laisse la possibilité d'analyser les cellules de certains individus qui mettent plus de temps à atteindre la métaphase et des cellules qui ont reçu une dose élevée entraînant un retard de mitose.

Lorsque l'on arrête les cultures, il n'est plus nécessaire de travailler dans des conditions d'asepsie et, sauf mention contraire, les opérations suivantes peuvent être effectuées à température ambiante. En revanche, il est important de continuer à manipuler les substances de manière sécurisée car elles peuvent contenir des agents pathogènes humains. Les cultures doivent être centrifugées et le surnageant retiré et remplacé par une solution hypotonique (5 ml) de chlorure de potassium à $0,075 \text{ mol.l}^{-1}$. Lorsque le surnageant est aspiré, la vitesse de la centrifugeuse doit être de 200 g pendant 10 minutes. En revanche, si le surnageant est renversé, le culot cellulaire doit être plus solide (ce qui impose une vitesse de 600 g pendant trois minutes), même si cela risque de détruire davantage de cellules. Les tubes doivent être laissés au repos pendant approximativement 15 minutes à 37°C mais, si l'on a utilisé des lymphocytes isolés, 3 à 5 minutes suffisent. Il est également possible d'ajouter environ 1 ml

de fixateur à la solution hypotonique pendant 5 à 10 minutes afin de réduire au maximum la cytolyse lors de la centrifugation. Les tubes doivent alors être centrifugés à nouveau, la solution hypotonique retirée et le culot cellulaire remis en suspension dans 5 à 10 ml d'un fixateur préparé récemment [mélange méthanol-acide acétique (3/1)]. Le fixateur doit être versé lentement mais à débit constant pendant que le tube est agité, à l'aide d'un agitateur vortex, par exemple. Ce point est important car il permet de garantir que les cellules sont dispersées dans une suspension uniforme. Les cellules sont ensuite centrifugées puis remises en suspension trois fois dans le fixateur. Si nécessaire, elles peuvent être conservées pour une longue durée dans le fixateur, idéalement à -20 °C au congélateur. Sinon, les lames peuvent être préparées immédiatement ou le jour suivant et, pour un stockage de courte durée, la suspension cellulaire peut être maintenue à 4 °C.

Il faut retirer la dernière dose de fixateur versée en en laissant une quantité suffisante (0,25 ml) afin de disposer d'un volume de suspension adéquat pour le déposer sur les lames. Néanmoins, le volume final dépend de la densité de cellules et la suspension peut être davantage diluée dans du fixateur si cela paraît nécessaire. Il faut utiliser des lames propres et exemptes de graisse. Même si certains fabricants affirment que les lames qu'ils fournissent sont suffisamment propres, de nombreux laboratoires préfèrent s'en assurer et les conservent dans du liquide de dégraissage. Il peut s'agir d'un mélange d'acétone et de méthanol (1/1) ou d'éther et d'éthanol (1/1) ou d'acide chlorhydrique concentré à 1 % dans du méthanol. Lorsqu'il y a lieu, les lames peuvent être essuyées et séchées avec du papier de soie propre. Il convient de noter que les mouchoirs en papier de qualité ne conviennent pas car ils contiennent de la lanoline pour les rendre plus doux. Les chromosomes s'écartent mieux lorsque les lames sont froides et humides. Pour ce faire, on peut les conserver au congélateur, ne les sortir que peu de temps avant de s'en servir et faire fondre le givre en soufflant dessus quelques instants avant de déposer les cellules sur les lames. Il est également possible de tremper celles-ci quelques secondes dans un bœcher d'eau distillée contenant des glaçons. On obtient une meilleure humidification des lames si l'on verse un peu de méthanol sur le liquide, mais sans l'agiter. Il faut secouer les lames pour en retirer le liquide de surface un peu avant d'y déposer les cellules. L'expérience a montré que la température ambiante et l'humidité relative du laboratoire peuvent avoir une influence importante sur l'étalement des chromosomes. Les fluctuations de qualité dues à ces facteurs peuvent être éliminées en déposant les cellules dans une enceinte climatique. Des enceintes conçues spécialement pour les laboratoires de cytogénétique sont disponibles sur le marché.

Il faut mettre les cellules en suspension avec soin dans ce qui reste de fixateur en produisant des bulles avec une pipette et verser deux à trois gouttes du mélange sur une lame. Les cellules issues d'une même culture doivent être déposées sur au moins deux lames et de nombreux professionnels préfèrent préparer jusqu'à 10 lames à partir d'une seule culture. Avant de déposer toutes les cellules d'une culture sur les lames, il est de bonne pratique de verser une goutte de la suspension sur une lame de test. Cela permet de juger de la concentration des cellules en métaphase et, si nécessaire, d'augmenter la concentration de la suspension restante ou de la diluer à l'aide d'un fixateur. Lorsque l'aspect des cellules en métaphase sur la lame de test est peu satisfaisant, c'est-à-dire lorsque l'on observe des groupes de chromosomes mal étalés et trop de débris cellulaires, il est souvent efficace de laver à nouveau les cellules au fixateur, de boucher les tubes et de les stocker au réfrigérateur pendant la nuit, puis de les centrifuger et de déposer les cellules le jour suivant. Les lames doivent être séchées à l'air, opération qui peut être accélérée en les chauffant doucement sur une plaque, en les plaçant dans un léger courant d'air chaud ou ambiant produit par un ventilateur ou en les passant dans la flamme d'une lampe à alcool (ne pas mettre le feu au fixateur).

9.3. COLORATION

La technique de fluorescence plus Giemsa (FPG) est recommandée car elle permet de limiter l'analyse aux cellules en métaphase qui effectuent leur première division *in vitro* (M1) [126]. Cependant, cette méthode présente quelques inconvénients qui peuvent être évités en effectuant une coloration classique au Giemsa en même temps que la FPG. De nombreux professionnels ont constaté des différences de qualité considérables sur la coloration par FPG entre des lames dupliquées, ainsi qu'entre les différentes taches présentes sur une même lame. Cette technique donne les meilleurs résultats si elle est effectuée quelques jours (jusqu'à cinq) après que les lames ont été préparées. Le reste des lames peut être mis dans une boîte et conservé à -20 °C avant d'être utilisé. La qualité obtenue est moins bonne si l'on se sert de lames plus récentes ou si les lames datent de plus de deux ou trois semaines. La conservation de lames colorées à la FPG pendant plus de quelques semaines peut entraîner leur détérioration. Il existe alors un risque que les images des cellules en métaphases colorées à la FPG ne soient pas assez nettes pour distinguer avec précision toutes les aberrations. Toutefois, la qualité obtenue est en général suffisante pour déterminer les proportions relatives de cellules M1, qui sont colorées de manière uniforme, et de cellules M2, sur lesquelles apparaît l'effet arlequin. Afin de vérifier que la coloration s'est bien effectuée, il convient d'inclure au lot de lames quelques lames préparées à partir de cultures plus longues (72 heures) dont on sait qu'elles contiennent des cellules M2.

Le protocole recommandé consiste donc à colorer à la FPG une ou plusieurs lames dupliquées pour chaque culture. Si la coloration fonctionne, elles peuvent être utilisées pour compter les aberrations présentes sur les cellules M1. Sinon, elles doivent servir à vérifier le rapport M1/M2 et l'analyse des aberrations doit être effectuée avec des lames obtenues à partir de la même culture et colorées au Giemsa à condition que la FPG ait permis de déterminer que la proportion de cellules M2 était inférieure à 5 %. Si le chiffre est plus élevé, il peut être nécessaire d'ajuster la fréquence des aberrations, ce qui risque d'introduire des erreurs supplémentaires. Cela impose d'adopter certaines hypothèses concernant, par exemple, la proportion, parmi les cellules M2, de dicentriques qui sont toujours accompagnées d'un fragment acentrique. Comme souligné précédemment, il est préférable de choisir une méthode de culture qui ne conduit à la formation que de peu de cellules M2 même si, bien sûr, il est impossible d'en être certain pour tout individu étant donné que la stimulation et la prolifération des lymphocytes sont différentes pour chaque personne [127].

D'autres techniques de culture comme le recours à la Cyt B, accompagnée de Colcemid ou de Colcemid ajouté tôt dans le processus peuvent être plus simples et plus rapides que la coloration à la FPG [117–119, 125]. Ces méthodes peuvent être particulièrement utiles lorsque l'on a besoin d'estimer les doses rapidement à des fins de tri.

9.3.1. Prétraitement

Grâce à un prétraitement des lames à l'ARNase A avant coloration, il est possible d'éliminer le matériel cytoplasmique résiduel susceptible d'être coloré [128]. Il s'agit d'une étape optionnelle qui permet d'obtenir des images des chromosomes beaucoup plus nettes pour effectuer un comptage sur des préparations colorées en bloc, qui présentent l'effet arlequin ou marquées en bandes. Elle s'est en outre avérée utile pour étudier des lames à l'aide de systèmes automatiques d'analyse d'images.

Le protocole est le suivant : une solution mère de 10 mg/ml d'ARNase A tamponnée au Tris-EDTA est chauffée pendant 10 minutes à 70 °C puis est refroidie lentement. Des aliquots de cette solution peuvent être conservés plusieurs années à -20 °C. Les lames sont rincées à l'eau distillée et placées dans une solution d'ARNase A à 0,5 mg/ml (solution mère, eau distillée : 1/20) pendant 10 minutes à 37 °C. Cette opération peut être effectuée soit dans un

bocal préalablement chauffé ou, de manière plus économique, en déposant un petit volume de la solution mère diluée sur une lame et en le recouvrant d'une lamelle. Les lames sont ensuite lavées à l'eau distillée, placées dans le fixateur, un mélange de méthanol et d'acide acétique (3/1), pendant deux minutes, séchées puis colorées suivant la technique décrite ci-après. La méthode de nettoyage à l'ARNase A peut également être appliquée après avoir décoloré d'anciennes lames ou pour des préparations destinées à compter les micronoyaux. Pour ce type d'application, les concentrations et les durées indiquées peuvent être différentes [128].

9.3.2. Coloration par fluorescence plus Giemsa (FPG)

Cette méthode est celle qui a été publiée par Perry et Wolff [114], avec quelques modifications. Déposer environ 10 gouttes du colorant Hoechst 33258 (0,5 µg/ml dans un tampon de phosphate à pH 6,8) sur une lame et la recouvrir d'une lamelle en s'assurant qu'aucune bulle d'air ne reste prisonnière. À ce stade, le professionnel qui dispose d'un microscope à fluorescence peut, s'il le souhaite, vérifier rapidement le rapport M1/M2 à l'aide de la méthode de Latt [129], laquelle provoque un effet arlequin qui s'estompe très rapidement. Sinon, on peut éclairer les lames sous une lampe à ultraviolets de 20 W (longueur d'onde > 310 nm) pendant une demi-heure ou sous une lampe fluorescente de 30 W pendant une heure et demie. Après avoir retiré les lamelles avec précaution, il faut bien laver les lames dans une solution de pH 6,8 tamponnée au phosphate. À ce stade, certains professionnels mettent les lames dans une SSC (concentration x 2) (chlorure de sodium à 0,075 mol.l⁻¹ et citrate trisodique à 0,03 mol.l⁻¹) à 60 °C pendant 20 à 30 minutes.

L'expérience a montré que cette dernière étape peut être omise si elle entraîne un gonflement excessif des chromatides qui rend l'analyse au microscope plus difficile. Cependant, le recours à une SSC (concentration x 2) permet d'éliminer certains débris cellulaires et donc d'obtenir des préparations plus propres. Les lames sont ensuite lavées à l'eau distillée puis immergées dans du colorant de Giemsa (5–10 % dans un tampon à pH 6,8, Gurr R66) pendant trois à cinq minutes. Elles sont ensuite rincées au tampon, puis à l'eau distillée, et enfin mises à sécher. Les lames peuvent alors être examinées au microscope ou nettoyées et fixées sous une lamelle.

9.3.3. Coloration classique au Giemsa

Les lames doivent être immergées dans du colorant de Giemsa à 2 % (Gurr R66 amélioré) tamponné au phosphate à un pH de 6,8 pendant cinq minutes, lavées au tampon, rapidement rincées à l'eau distillée, mises à sécher et enfin placées sous une lamelle à l'aide d'un milieu de montage. Les figures 10 et 11 montrent des chromosomes métaphasiques colorés au Giemsa.

Il est possible de modifier la coloration afin de mieux faire apparaître les centromères même si, pour les praticiens expérimentés, cette opération n'est normalement pas nécessaire [130]. Elle peut être effectuée par la méthode FISH, à l'aide d'une sonde centromérique, (Fig. 27) ou grâce au colorant de Giemsa en effectuant un marquage en bandes C (Fig. 23).



FIG. 23. Chromosomes métaphasiques colorés au Giemsa par la méthode du marquage en bandes C, méthode qui met en évidence les centromères.

Le protocole du marquage en bandes C est le suivant :

- 1) Placer les lames dans de l'acide chlorhydrique à $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ à température ambiante pendant 30 minutes ;
- 2) Laver les trois fois à l'eau distillée ;
- 3) Mettre les lames dans de l'hydroxyde de baryum à 5 % à 60°C pendant une minute ;
- 4) Laver dans de l'acide chlorhydrique à $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ pendant deux minutes ;
- 5) Laver à l'eau distillée pendant deux minutes ;
- 6) Mettre les lames dans une SSC (concentration x 2) à 60°C pendant 45 minutes ;
- 7) Laver à l'eau distillée ;
- 8) Laisser sécher à l'air et colorer au Giemsa à 2 % tamponné au phosphate à un pH de 6,8 pendant 10 minutes ;
- 9) Si l'intensité de la coloration est insuffisante, les lames peuvent être retrempées dans du colorant de Giemsa pendant 5 à 10 minutes de plus.

9.4. ANALYSE DES LAMES

9.4.1. Microscopie classique

Les lames doivent être munies d'un code afin d'éviter les biais lors du comptage et doivent être observées méthodiquement afin que toute la surface soit analysée. L'observation doit être effectuée à un grossissement faible (x 100 à x 200 environ). À ce niveau, il n'est pas possible de déterminer si tous les chromosomes sont présents ni de détecter les aberrations. Cependant, avec de l'expérience, le professionnel peut repérer les étalements qui comportent environ 40 parties

ou plus et dont l'apparence donne à penser qu'ils seront d'une qualité suffisante pour être analysés à un grossissement plus fort. Il est important que cette observation initiale soit effectuée à un grossissement suffisamment faible afin d'éviter le biais qui consisterait à choisir les cellules qui comportent des aberrations. Après avoir trouvé une probable métaphase, l'opérateur doit passer à un grossissement fort (x 1 000 à x 2 000 environ), ignorer, si possible, la présence d'éventuelles aberrations et juger immédiatement si les chromosomes sont d'une qualité qui permet de compter les anomalies. Ce jugement s'appuie sur la netteté des images et sur la quantité de chromosomes déformés ou qui se chevauchent. En cas de coloration à la FPG, la cellule ne doit pas être retenue si elle présente l'effet arlequin, ce qui indique qu'il ne s'agit pas d'une cellule M1.

S'il prend la décision d'analyser l'étalement, l'opérateur doit compter le nombre de chromosomes individuels et noter la présence d'aberrations. Il est recommandé de n'effectuer cette analyse que si la métaphase est complète, c'est-à-dire si l'étalement comporte 46 centromères. Si la cellule présente des aberrations instables, le nombre de morceaux doit toujours s'équilibrer. Ainsi, un étalement qui contient une dicentrique doit également comporter un fragment acentrique et le nombre de morceaux doit être de 46. En revanche, un anneau centrique est lui aussi accompagné d'un fragment, mais le nombre d'objets dans la cellule s'élèvera alors à 47. Chaque fragment, c'est-à-dire chaque morceau qui n'est pas associé à une dicentrique ou à un anneau centrique, fait augmenter le nombre de morceaux de un au-delà de 46. Lorsque l'on note les aberrations, il ne faut pas inclure les fragments associés à une dicentrique ou à un anneau dans le nombre de fragments excédentaires. Lorsque la cellule a reçu une dose élevée, l'étalement peut comporter plus d'une aberration, mais le nombre de morceaux doit toujours s'équilibrer. Une aberration tricentrique est équivalente à deux dicentriques et doit être accompagnée de deux fragments, tandis que les quadricentriques sont accompagnés de trois fragments, etc. Il convient de noter toutes les anomalies présentes dans la cellule, même si, en dosimétrie, seules les dicentriques ou la somme des dicentriques et des anneaux seront analysés. Il faut noter les coordonnées x et y indiquées sur la platine pour toutes les cellules complètes analysées, y compris celles qui sont dépourvues d'aberrations, pour pouvoir éventuellement s'y référer ultérieurement.

9.4.2. Microscopie assistée par ordinateur

La détection des cellules en métaphase au moyen de dispositifs de reconnaissance automatique de formes a fait son apparition dans de nombreux laboratoires et plusieurs systèmes différents sont disponibles sur le marché. Ces appareils intègrent également une analyse semi-automatique des images numérisées qui aide à repérer les chromosomes aberrants. Cependant, aucun système n'est complètement automatisé : tous prévoient des étapes où l'opérateur doit évaluer la situation et prendre une décision. Ces appareils doivent être utilisés de telle sorte que les recommandations ci-dessus continuent à être appliquées, c'est-à-dire que la sélection de cellules potentiellement en métaphase pour le comptage ne doit pas introduire de biais susceptible de fausser le calcul de la fréquence des aberrations et que seuls des étalements complets de chromosomes doivent être analysés. Les dispositifs automatiques de détection et de comptage sont examinés en détail dans la section 13.

9.5. ENREGISTREMENT DES DONNÉES

Les bonnes pratiques de laboratoire exigent qu'un code d'identification unique ou qu'un dispositif d'étiquetage soit conçu pour les échantillons, les lames et les documents associés. La réception et le traitement des échantillons, que ce soit pour une expérience ou pour une investigation en cas de surexposition, doivent être consignés dans un journal de laboratoire. Il existe des systèmes informatiques qui permettent de stocker et de gérer les données (voir la section 13.4). Néanmoins, de nombreux chercheurs continuent à consigner leurs observations

au microscope sur une feuille de résultats et la plupart des laboratoires ont mis au point leur propre méthode pour enregistrer les données. Les systèmes informatiques existants permettent de stocker et d'afficher les résultats de plusieurs manières afin de s'adapter aux souhaits des laboratoires. Il est important d'être en mesure de récupérer toutes les données essentielles constituées des observations réalisées sur chaque cellule afin de pouvoir effectuer ultérieurement toutes les compilations et agrégations de données possibles.

Le tableau 6 donne un exemple de feuille de résultats utilisée pour consigner les aberrations.

TABLEAU 6. FEUILLE DE RÉSULTATS UTILISÉE POUR CONSIGNER LES ABERRATIONS

Lame n° :
Opérateur :
Microscope n° :
Date :

Cellule n°	Coordonnées sur la platine		Nombre de pièces chromosomiques	Dicentriques	Anneaux centriques	Fragments excédentaires	Remarques
	x	y					
1	100,1	1,2	46				
2	103,4	1,5	47	1		1	
3	105,4	1,2	49	2	1	2	
4	112,4	1,6	46				
5	112,7	1,8	48			2	
6	120,1	1,2	46	1			
7	122,7	1,5	47		1		
8	124,1	1,4	45				Échange chromatidique
9	126,8	1,7	46	2*			*= 1 tricentrique
etc.							

À partir des renseignements qui figurent sur cette feuille, il est possible d'identifier n'importe quelle cellule et de la réexaminer à l'avenir. Pour la coloration classique au Giemsa en dosimétrie biologique, les aberrations instables sont les plus importantes, même si l'on n'a pas essayé de recenser séparément les chromosomes minuscules, les fragments et les anneaux acentriques. La raison en est qu'il n'est pas toujours possible de les distinguer. Toutefois, si on le souhaite, on peut les signaler en mettant respectivement M, F et AA à la place des chiffres dans la colonne « Fragments excédentaires ». La colonne « Remarques » peut servir à noter d'autres anomalies, par exemple les anomalies de nombre, les lésions chromosomiques stables ou les aberrations chromatidiques. Toutes les autres données chiffrées qui peuvent être nécessaires, par exemple le pourcentage de cellules qui présentent des lésions ou la répartition des aberrations entre les cellules, peuvent facilement être déduites de cette feuille.

9.6. STOCKAGE DES INFORMATIONS ET DES LAMES

Les données d'examen doivent de toute évidence être classées et stockées pour pouvoir être consultées ultérieurement. Il convient de souligner que les dossiers qui concernent des surexpositions sont quelquefois réexaminés longtemps après qu'une analyse a été effectuée. Si une personne développe une affection maligne, parfois des dizaines d'années plus tard, le dossier peut être rouvert afin de statuer sur une demande de réparation.

Certains laboratoires souhaiteraient également conserver les lames de microscope ou y sont obligés, ce qui peut poser quelques problèmes. Les préparations colorées classiquement au Giemsa ont tendance à se décolorer et le matériel coloré à la FPG pose davantage de difficultés car il se décolore souvent après plusieurs mois. Il est conseillé de stocker les lames colorées dans une boîte dans un endroit sec à température ambiante. Toutefois, il est possible de restaurer une lame décolorée en décollant délicatement la lamelle et en recolorant la lame au Giemsa classique. Il n'est pas possible de recolorer une lame à laquelle une FPG a été appliquée. Des lames dupliquées conservées à -20 °C et qui n'ont jamais subi de coloration peuvent également être colorées classiquement au Giemsa de nombreuses années plus tard.

Il est également de bonne pratique de conserver des cellules fixées en surplus en cas d'investigation relative à une surexposition. Pour faciliter leur stockage, elles peuvent être concentrées dans de petites ampoules (2 ml) et conservées à -20 °C. Les lames préparées à partir de ces cellules peuvent, des années plus tard si nécessaire, être colorées de manière classique, par FPG ou par FISH.

9.7. ÉVALUATION DE LA DOSE REÇUE

9.7.1. Choix de la courbe

Les rayonnements auxquels les travailleurs sont généralement exposés sont les rayons gamma, les rayons X et, parfois, les neutrons de faible énergie. On observe généralement une différence entre les courbes de fréquence pour les rayons X et gamma, surtout à faible dose (< 0,5 gray). Il est donc recommandé de disposer d'une courbe d'étalonnage pour une plage d'énergie adéquate pour les rayons X (par exemple 200–250 kVp) ainsi que pour le cobalt 60 ou le césium 137. En général, la plupart des laboratoires de recherche ont plus facilement accès à une source de cobalt 60 qu'à du césium 137. Pour les neutrons, un spectre de faible énergie est similaire à un spectre de fission. Les données disponibles montrent que les courbes dose-effet pour les neutrons de fission sont linéaires et ne dépendent que marginalement de l'énergie des particules. Il suffit donc de disposer d'une seule courbe, réalisée pour le spectre de fission.

En radiographie industrielle, l'iridium 192 est fréquemment utilisé. Son énergie gamma est en moyenne de 400 keV. Peu de laboratoires ont accès à cet isotope et peuvent ainsi construire une courbe d'étalonnage qui doit se trouver entre celle des rayons X et celle des rayons gamma avec du cobalt 60 ou du césium 137. Cependant, on considère généralement qu'elle est plus proche de cette dernière. Il est donc recommandé de se servir de la courbe établie pour les rayons gamma.

9.7.2. Nombre de cellules à analyser

Pour obtenir une estimation de la dose pour laquelle l'incertitude statistique est suffisamment faible pour que cette valeur ait un intérêt, il faut en général examiner un grand nombre de cellules. Le nombre de cellules que l'on décide d'analyser est un compromis entre l'importance du cas étudié, le temps que l'on peut y consacrer et la qualité des préparations. Ainsi, après une exposition à une dose de plusieurs grays ou plus, le nombre de lymphocytes présents dans l'organisme du sujet peut fortement diminuer, ce qui se traduit par un faible nombre de cellules en métaphase sur les lames. Néanmoins, comme le nombre d'aberrations

par cellule est dans ce cas élevé, il est possible d'obtenir une estimation raisonnable de la dose en n'analysant que quelques dizaines de cellules. Il est important de corréliser l'incertitude sur la dose et le nombre de cellules examinées lorsque l'on utilise l'analyse des dicentriques comme moyen de tri à des fins d'évaluation rapide après un événement qui a affecté un grand nombre de personnes. Cette question est étudiée plus en détail plus loin (section 14).

Lorsque la dose est plus faible, et donc que le nombre de cellules présentes ne constitue pas le facteur limitant, il est possible d'estimer la dose en examinant environ 500 cellules. Au microscope classique, cette tâche peut prendre deux ou trois jours de travail, même si, en situation d'urgence, plusieurs personnes peuvent collaborer pour analyser des cultures dupliquées. Lorsque la fréquence des dicentriques est faible ou nulle, les limites de confiance obtenues après examen de 500 cellules sont généralement suffisantes. On porte le nombre de cellules analysées à 1 000 ou plus lorsque des éléments laissent à penser que le sujet a été gravement surexposé, ce qui justifie un examen approfondi, ou lorsque le maintien d'un travailleur exposé à son poste de travail est compromis. De toute évidence, il n'est pas possible d'indiquer un nombre de cellules à analyser qui soit applicable à toutes les situations. Cependant, en règle générale, il est conseillé d'examiner 500 cellules ou d'observer 100 dicentriques afin d'aboutir à une estimation de la dose qui soit raisonnablement précise.

Le tableau 7 montre les limites obtenues par cette méthode pour plusieurs estimations de dose qui vont jusqu'à 1,0 gray.

TABLEAU 7. EFFET DE L'AUGMENTATION DU NOMBRE DE CELLULES EXAMINÉES SUR LES LIMITES DE CONFIANCE À 95 % SUPÉRIEURES ET INFÉRIEURES POUR QUATRE ESTIMATIONS DE DOSE RÉSULTANT D'UNE EXPOSITION AIGUË AUX RAYONS GAMMA
(chiffres obtenus à partir de la courbe de la figure 24)

Estimation de la dose (en mGy)	Limites de confiance	Nombre de cellules examinées	
		500	1 000
100	Supérieure	320	245
	Inférieure	< 0	16
250	Supérieure	448	380
	Inférieure	111	141
500	Supérieure	677	627
	Inférieure	333	383
1 000	Supérieure	1 178	1 127
	Inférieure	830	881

Une méthode simple pour calculer les limites de confiance relatives aux estimations de dose figure dans la section qui suit.

9.7.3. Incertitude associée aux estimations de dose

Alors qu'il n'est pas difficile de calculer une dose à partir d'une mesure de la fréquence des dicentriques, il existe plusieurs méthodes différentes pour évaluer l'incertitude associée à cette fréquence. L'objectif est d'exprimer cette incertitude sous forme d'intervalle de confiance et, en pratique, on calcule généralement les limites à 95 %. Les limites de confiance à 95 % définissent un intervalle qui contient la vraie valeur de la dose dans au moins 95 % des cas. Il est difficile de calculer les limites de confiance car l'incertitude comporte deux composantes : l'une est due au caractère poissonien de la fréquence des aberrations visibles dans les cellules prélevées sur un sujet surexposé et l'autre résulte des incertitudes associées aux courbes d'étalonnage, dont la distribution n'est qu'approximativement normale. Dans la

littérature spécialisée, ce problème a été examiné par Savage *et al.* [131], Merkle [105] et, plus récemment, par Szłuińska *et al.* [132]. C'est Merkle qui a proposé la solution la plus simple : celle-ci permet à la fois de tenir compte de l'erreur poissonnienne sur la fréquence des dicentriques et de l'erreur associée à la courbe d'étalonnage.

La technique de Merkle, illustrée par la figure 24, comporte les étapes suivantes :

- 1) En supposant que la distribution est poissonnienne, on calcule la fréquence correspondant aux limites de confiance supérieure et inférieure à 95 % pour la fréquence mesurée (F_I et F_S).
- 2) On calcule la dose à laquelle F_I coupe la courbe supérieure. Ce point correspond à la limite de confiance inférieure (D_I).
- 3) On calcule la dose à laquelle F_S coupe la courbe inférieure. Ce point correspond à la limite de confiance supérieure (D_S).

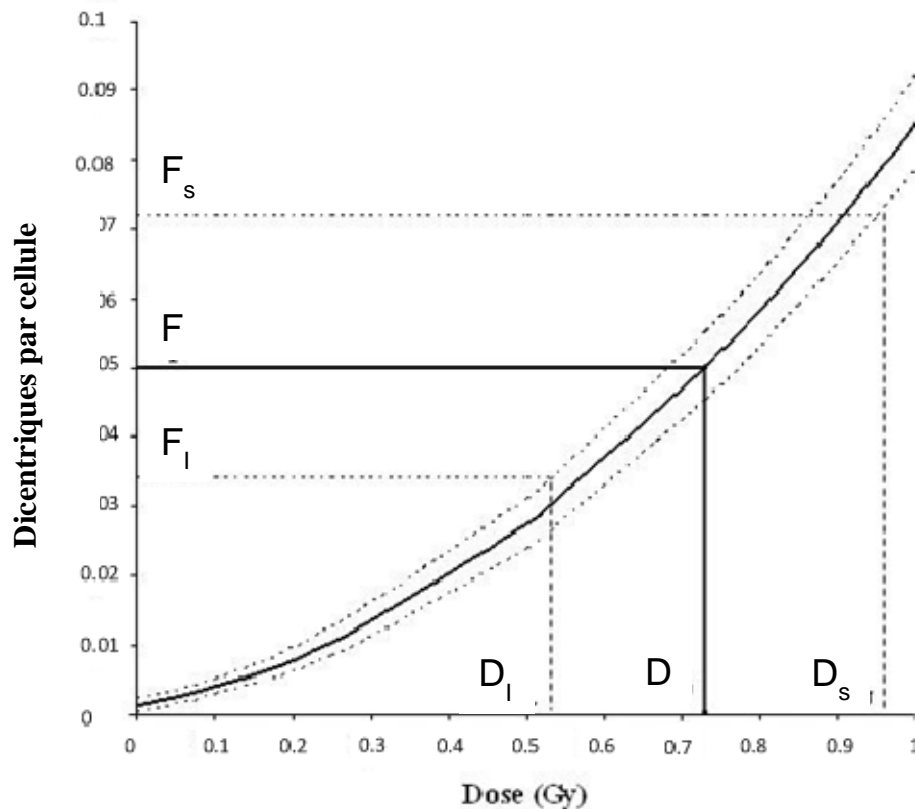


FIG. 24. Courbe d'étalonnage dose-effet et ses limites de confiance à 95 % utilisées pour estimer les incertitudes.

Exemple : Cinq cents cellules ont été analysées et 25 d'entre elles comprenaient une dicentrique unique. Cela donne une fréquence (F) de 0,05 dicentriques par cellule et un indice de dispersion et un test u de 0,95 et 0,78, respectivement. La dose a été estimée à l'aide de la courbe dose-effet correspondant au cobalt 60. Cette courbe est représentée sur la figure 24 et les coefficients, les variances et covariances associés sont les suivants :

$$\begin{aligned}
C &= 1,28 \times 10^{-3} \\
\alpha &= 2,10 \times 10^{-2} \\
\beta &= 6,31 \times 10^{-2} \\
\text{var } C &= 2,22 \times 10^{-7} \\
\text{var } \alpha &= 2,66 \times 10^{-5} \\
\text{var } \beta &= 1,61 \times 10^{-5} \\
\text{covar } (C, \alpha) &= -9,95 \times 10^{-7} \\
\text{covar } (C, \beta) &= 4,38 \times 10^{-7} \\
\text{covar } (\alpha, \beta) &= -1,512 \times 10^{-5}
\end{aligned}$$

- 1) Comme la courbe dose-effet est linéaire quadratique ($F = C + \alpha D + \beta D^2$), la dose estimée – à savoir 0,73 gray – est obtenue par la formule suivante :

$$D = \frac{-\alpha + \sqrt{\alpha^2 + 4\beta(F - C)}}{2\beta} \quad (6)$$

- 2) F_I et F_S proviennent de tables statistiques usuelles de limites de confiance pour l'espérance d'une variable poissonnienne [133]. Le tableau 8 montre les limites à 95 % pour des nombres de dicentriques observées compris entre 0 et 103. Pour les 25 dicentriques observées dans notre exemple, F_I vaut 16,768/500 soit 0,034 et F_S 36,03/500, soit 0,072.

TABLEAU 8. LIMITES DE CONFIANCE À 95 % SUPÉRIEURES ET INFÉRIEURES POUR DES NOMBRES (X) DE DICENTRIQUES OBSERVÉS QUI SUIVENT UNE LOI DE POISSON
(inspiré de [133])

X	Inférieure	Supérieure	X	Inférieure	Supérieure	X	Inférieure	Supérieure	X	Inférieure	Supérieure
0	0	3,285	26	16,77	37,67	52	38,165	66,76	78	61,9	96,06
1	0,051	5,323	27	17,63	38,165	53	39,76	68,1	79	62,81	97,545
2	0,355	6,686	28	19,05	39,76	54	4,094	69,62	80	62,81	99,17
3	0,818	8,102	29	19,05	40,94	55	40,94	71,09	81	63,49	99,17
4	1,366	9,598	30	20,335	41,75	56	41,75	71,28	82	64,95	100,32
5	1,97	11,177	31	21,36	43,45	57	43,45	72,66	83	66,76	101,71
6	2,613	12,817	32	21,36	44,26	58	44,26	74,22	84	66,76	103,315
7	3,285	13,765	33	22,945	45,28	59	44,26	75,49	85	66,76	104,4
8	3,285	14,921	34	23,76	47,025	60	45,28	75,785	86	68,1	104,58
9	4,46	16,768	35	23,76	47,69	61	47,025	77,16	87	69,62	105,905
10	5,323	17,633	36	25,4	48,74	62	47,69	78,73	88	71,02	107,32
11	5,323	19,05	37	26,31	50,42	63	47,69	79,98	89	71,09	109,11
12	6,686	20,335	38	26,31	51,29	64	48,74	80,25	90	71,28	109,61
13	6,686	21,364	39	27,735	52,15	65	50,42	81,61	91	72,66	110,11
14	8,102	22,945	40	28,97	53,72	66	51,29	83,14	92	74,22	111,44
15	8,102	23,762	41	28,97	54,99	67	51,29	84,57	93	75,49	112,87
16	9,598	25,4	42	30,02	55,51	68	52,15	84,67	94	75,49	114,84
17	9,598	26,306	43	31,675	56,99	69	53,72	86,01	95	75,785	114,84
18	11,177	27,735	44	31,675	58,72	70	54,99	87,48	96	77,16	115,605
19	11,177	28,966	45	32,28	58,84	71	54,99	89,23	97	78,73	116,93
20	12,817	30,017	46	34,05	60,24	72	55,51	89,23	98	79,98	118,35
21	12,817	31,675	47	34,665	61,9	73	56,99	90,37	99	79,98	120,36
22	13,765	32,277	48	34,665	62,81	74	58,72	91,78	100	80,25	120,36
23	14,921	34,048	49	36,03	63,49	75	58,72	93,48	101	81,61	121,06
24	14,921	34,665	50	37,67	64,95	76	58,84	94,23	102	83,14	122,57
25	16,768	36,03	51	37,67	66,76	77	60,24	94,705	103	84,57	123,77

- 3) Les limites de confiance à 95 % supérieures et inférieures de la courbe sont données par la formule :

$$F = C + \alpha D + \beta D^2 \pm R \sqrt{\text{var}C + \text{var}\alpha D^2 + \text{var}\beta D^4 + 2\text{covar}(C, \alpha)D + 2\text{covar}(C, \beta)D^2 + 2\text{covar}(\alpha, \beta)D^3} \quad (7)$$

où :

R^2 est le facteur de confiance de la régression et est égal à la limite de confiance à 95 % d'une distribution qui suit la loi du χ^2 et qui comporte deux ou trois degrés de liberté (ddl).

R^2 vaut 7,81 pour une courbe linéaire quadratique (trois ddl) et 5,99 pour une droite. Dans la formule (7), il faut prendre 2,79 comme valeur de R. Si la courbe était linéaire, la valeur utilisée serait 2,45. Étant donné que l'on se sert de limites de confiance à 95 % pour la courbe de fréquence des dicentriques comme pour la courbe d'étalonnage, certains auteurs ont proposé d'utiliser une limite de confiance à 83 % au lieu de 95 % pour la courbe de régression

afin de limiter une éventuelle surestimation de l'incertitude [134, 135]. Dans ce cas, R^2 vaut 5,02 pour une courbe linéaire quadratique et 3,54 pour une droite.

- 4) Le calcul de l'abscisse du point où F_I coupe la courbe correspondant à la limite de confiance supérieure, abscisse qui est égale à la limite de confiance à 95 % inférieure pour la dose estimée (D_I), peut être effectué par itération. Excel contient un outil « Solver » qui peut être utilisé à cette fin. Le point où F_S coupe la courbe correspondant à la limite de confiance inférieure peut être obtenu de la même manière. Dans notre exemple, D_I et D_S valent respectivement 0,51 et 0,97 gray.

Si les covariances ne sont pas connues, la formule (8) permet d'obtenir une valeur approchée des limites de confiance. Cette formule est valable car la contribution des covariances à l'incertitude est relativement faible.

$$F = C + \alpha D + \beta D^2 \pm R \sqrt{\text{var}C + \text{var}\alpha D^2 + \text{var}\beta D^4} \quad (8)$$

Pour les courbes d'étalonnage bien établies qui reposent sur l'analyse d'un grand nombre de cellules, la variance due à la courbe est faible par rapport à celle de la fréquence observée pour le sujet concerné et peut être ignorée. Il est possible d'obtenir une estimation approximative plus simple de D_I et de D_S uniquement à l'aide de la courbe d'étalonnage en regardant où F_I et F_S croisent la ligne en trait plein sur la figure 25.

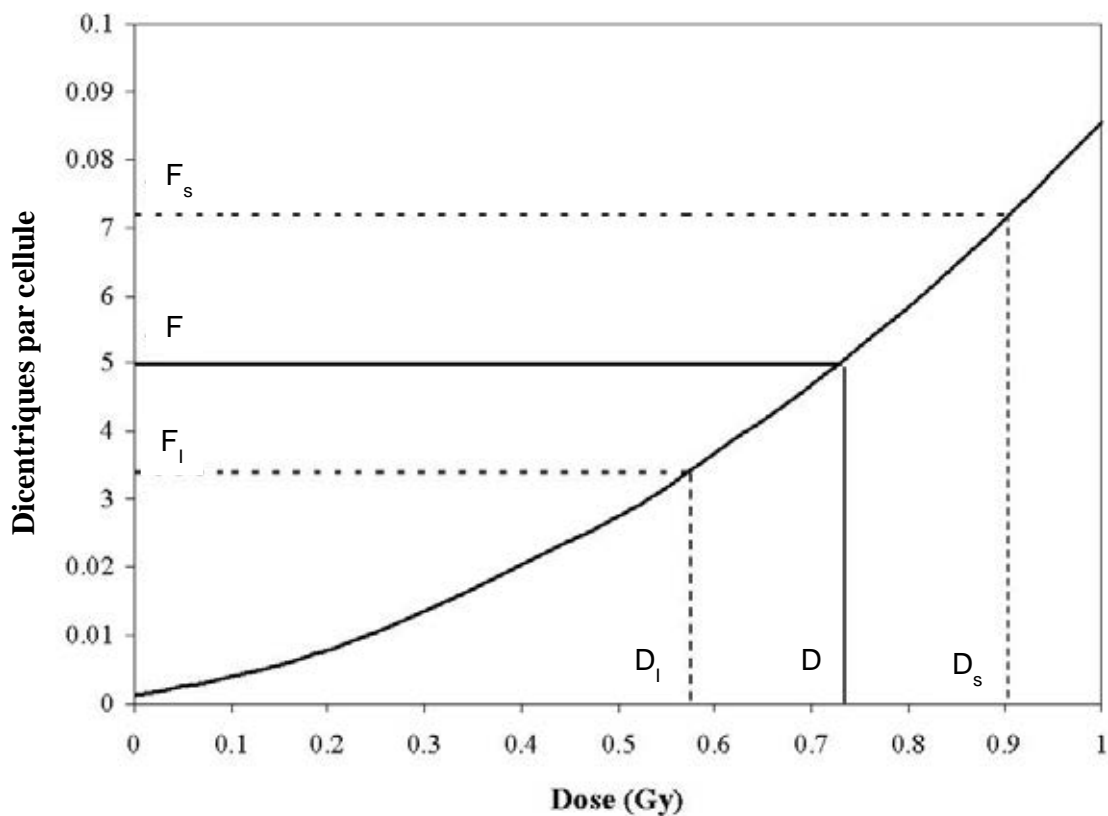


FIG. 25. Courbe d'étalonnage dose-effet utilisée pour estimer les incertitudes en ignorant l'erreur due à la courbe.

Dans notre exemple, à 0,73 gray, l'erreur associée à la courbe est de 0,002. Cette valeur est obtenue en remplaçant D par 0,73 dans le dernier terme de la formule (7). Elle est plus petite que l'erreur type associée à la fréquence de dicentriques observée $[(25)^{1/2}/500]$, erreur qui vaut 0,01. Par cette méthode, D_I et D_S sont respectivement égales à 0,57 et 0,91.

Si la valeur obtenue par le test u est supérieure à 1,96, F_S et F_I doivent être corrigées pour tenir compte de la dispersion en les multipliant par le coefficient ci-après, où LC est la limite de confiance qui figure dans les tables usuelles pour une distribution de Poisson, X est le nombre de dicentriques observées et σ^2/f est l'indice de dispersion observé :

$$\text{Coefficient} = \left(\frac{LC}{X} \right)^{\sqrt{\sigma^2/f}} \quad (9)$$

Dans l'exemple présenté plus haut, si, au lieu de 25 cellules comportant chacune une dicentrique, on a observé 19 cellules avec une dicentrique et trois cellules contenant deux dicentriques, σ^2/f vaut 1,19 et u 3,19. Dans ce cas, F_S et F_I valent respectivement :

$$F_S = \frac{36,03}{500} \times \left(\frac{36,03}{25} \right)^{\sqrt{1,19}} = 0,1074 \quad (10)$$

$$F_I = \frac{16,77}{500} \times \left(\frac{16,77}{25} \right)^{\sqrt{1,19}} = 0,0217 \quad (11)$$

Pour ces valeurs, D_I et D_S sont respectivement égales à 0,39 et 1,19 gray.

9.7.4. Extension des calculs de dose à des cas d'expositions aux rayonnements plus complexes

La section précédente s'applique à des cas où une personne a été surexposée accidentellement de manière aiguë et importante à des rayonnements dont le TLE est relativement faible uniformément sur tout l'organisme et où un échantillon de sang a pu être prélevé rapidement. La comparaison de la fréquence des dicentriques par cellule et d'une courbe dose-effet obtenue par exposition aiguë *in vitro* permet d'aboutir à une estimation fiable de la dose à l'organisme. Néanmoins, en pratique, cette situation idéale arrive rarement et les irradiations prolongées et fractionnées sont fréquentes. En général, les expositions accidentelles ne sont pas uniformes et ne touchent, par exemple, qu'une partie du corps. Il peut également s'écouler beaucoup de temps avant qu'un échantillon de sang ne soit prélevé à des fins d'analyse cytogénétique. Ces facteurs conduisent à un échantillonnage de populations de lymphocytes hétérogènes et la fréquence des dicentriques obtenue, si on la compare à une courbe dose-effet *in vitro* de référence, donne une estimation irréaliste de la dose. L'inhomogénéité se traduit par une fréquence des dicentriques qui ne suit pas une loi de Poisson et qui est en général surdispersée. Pour une exposition partielle, la raison en est bien entendu que les lymphocytes des tissus qui se trouvent en dehors du champ de rayonnement ne sont pas lésés. Si l'exposition est très localisée, les cellules lésées, en nombre plus faible qu'attendu, peuvent contenir chacune plusieurs aberrations. Même lorsque la dose de rayonnement reçue par la peau est uniforme, sa diminution monotone au fur et à mesure que le rayonnement pénètre dans les tissus fait que les doses reçues par les lymphocytes sont diverses. Cet effet est particulièrement sensible pour les rayonnements peu pénétrants mais, lorsque le rayonnement est plus pénétrant, par exemple des rayons X dont le kVp vaut 250 ou des rayons gamma émis par

des sources de cobalt 60, d'iridium 192 ou de césium 137, cet effet est suffisamment faible pour que la fréquence des dicentriques suive à peu près une loi de Poisson.

Une exposition accidentelle à un rayonnement dont le TLE est élevé, par exemple à des neutrons, se traduit également par une distribution surdispersée en raison de la manière dont la dose est déposée à l'échelle cellulaire (voir la section 3).

Le fait de prélever un échantillon de sang tardivement a une incidence sur la fréquence des aberrations car les cellules qui contiennent des aberrations instables ne se trouvent plus dans le sang et sont remplacées par des cellules nouvelles qui ne contiennent pas de dicentriques.

La présente section explique comment l'inhomogénéité de l'exposition, due au fait que les échantillons sont prélevés tardivement ou que l'exposition a été prolongée, influe sur les aberrations chromosomiques et comment les chiffres obtenus peuvent néanmoins être exploités afin d'aboutir à une bonne estimation de la dose reçue. On s'intéressera également aux cas des urgences où sont reçues de très faibles doses qu'il est difficile, en raison des limites statistiques, de distinguer des doses nulles.

La section suivante contient un exemple chiffré pour chacune des situations d'exposition d'urgence présentée.

9.7.4.1. Accident de criticité

Lors d'un accident de criticité, l'organisme est exposé à la fois à des neutrons et à des rayons gamma. Si le rapport entre la dose due aux neutrons et celle qui résulte des rayons gamma est connu, et cette information est en général accessible grâce à des mesures physiques, il est possible d'estimer séparément ces deux doses par itération. Le processus d'itération est le suivant :

- 1) On suppose que toutes les aberrations sont dues aux neutrons et, à partir de la fréquence de dicentriques mesurées, on estime la dose grâce à la courbe applicable aux neutrons ;
- 2) On se sert de la dose neutronique et du rapport entre les neutrons et les rayons gamma fourni pour estimer la dose due au rayonnement gamma ;
- 3) On utilise la dose due au rayonnement gamma pour estimer la fréquence de dicentriques imputable aux rayons gamma ;
- 4) On soustrait cette fréquence de dicentriques imputable aux rayons gamma de la fréquence mesurée afin d'obtenir une nouvelle valeur de la fréquence des aberrations due aux neutrons ;
- 5) On répète les étapes 1 à 4 jusqu'à ce que l'on obtienne des estimations cohérentes entre elles.

Lorsqu'il n'existe pas d'estimation des proportions respectives des doses dues aux neutrons et aux rayons gamma par des mesures physiques, la méthode présentée ci-dessus ne peut être appliquée. Il serait possible d'exprimer la dose en grays équivalents, comme cela a été fait pour les victimes de l'accident de Tōkai-Mura. Brame et Groer [136] ont néanmoins présenté une approche bayésienne d'estimation de la dose en cas d'accident de criticité qui peut être appliquée si ces proportions ne sont pas connues. Dans une situation d'accident simulé, il est apparu que la méthode bayésienne donnait des résultats très similaires à ceux de la technique itérative classique [137].

9.7.4.2. Cas de surexposition à faible dose

On avance souvent que la limite inférieure d'estimation de la dose par détection des dicentriques pour les rayonnements à faible TLE se situe autour de 0,1-0,2 gray. La sensibilité d'une personne aux faibles doses dépend de la fréquence naturelle des dicentriques (laquelle, dans la population générale, est de l'ordre de 0,5 à 1 dicentrique pour 1 000 cellules) et du nombre maximal de cellules en métaphase qui peuvent raisonnablement être examinées. Lorsque la dose est faible, son estimation comporte de grandes incertitudes statistiques. Comme indiqué plus haut, celles-ci résultent principalement de l'erreur poissonnienne sur la fréquence, mais avec une faible contribution de l'erreur type sur les coefficients de la courbe dose-effet, parmi lesquels α est le plus important à faible dose. Pour des raisons pratiques, celui-ci peut être ignoré, sauf si les résultats d'étalonnage à faible dose sont rares.

Certes, une dose de 100-200 mGy a peu d'importance si l'on considère les conséquences d'une telle exposition sur la santé mais, d'un point de vue légal, il s'agit d'une dose élevée si on la compare à la limite de dose recommandée par la CIPR pour les travailleurs (20 mSv). On exige souvent de la cytogénétique qu'elle éclaire des situations où l'on soupçonne qu'il y a eu faible surexposition, ce qui est peut-être demander plus à cette méthode qu'elle ne peut apporter.

Lorsque l'on communique des résultats, l'expérience montre que les non-spécialistes comprennent rarement la notion d'incertitude. Plusieurs démarches peuvent faciliter l'interprétation des données. Tout d'abord, même si ce n'est pas strictement exact sur le plan statistique, on peut expliquer qu'il n'y a que 2,5 % de chances que la dose soit plus élevée que la limite de confiance à 95 % supérieure. De plus, la limite de confiance inférieure peut être utilisée pour définir une « limite de détection » de l'analyse : si l'on se sert des chiffres du tableau 9, pour que la dose soit statistiquement au-dessus de zéro gray, il faut qu'il y ait au moins quatre dicentriques pour 1 000 cellules, c'est-à-dire que la limite de confiance inférieure soit supérieure à zéro gray.

TABLEAU 9. LIMITES DE CONFIANCE À 95 % POUR DIVERSES FRÉQUENCES DE DICENTRIQUES DANS 1 000 CELLULES ET RAPPORTS DES COTES QUI MONTRENT LES PROBABILITÉ D'UNE DOSE DE 0 OU DE 0,25 GRAY
(doses calculées à l'aide de l'équation $F = 0,0010 + 0,0164D + 0,0492D^2$)

Observation (dicentriques)	Dose (Gy)			Rapport des cotes p(0 Gy):p(0,25 Gy)
	Limite de confiance inférieure	Moyenne	Limite de confiance supérieure	
0	—	0	0,12	1 306 : 1
1	0	0	0,18	160 : 1
2	0	0,05	0,23	20 : 1
3	0	0,09	0,26	2 : 1
4	0,01	0,13	0,30	1 : 3
5	0,03	0,16	0,33	1 : 28
6	0,06	0,19	0,36	1 : 229
7	0,09	0,22	0,38	1 : 1 868

Une autre solution consiste à considérer qu'il n'existe que deux cas de figure possibles - une dose nulle ou la dose suspectée (mesurée par exemple par un dosimètre) – dont les probabilités relatives peuvent être utilisées pour calculer le rapport des cotes des deux doses. Ces probabilités se déduisent de la loi de Poisson comme suit : si la dose est nulle, la fréquence des dicentriques attendue est la fréquence naturelle, soit, d'après la courbe dose-effet, une dicentrique pour 1 000 cellules. Pour une dose de 0,25 gray, la fréquence attendue est de 8,2 pour 1 000. D'après la loi de Poisson, la probabilité relative de n'observer aucune dicentrique lorsque 1 et 8,2 aberrations sont attendues vaut $e^{-1}/e^{-8.2}$, soit 0,36788/0,00027, ce qui fait à peu près 1 300. Les valeurs des limites inférieure et supérieure et de la moyenne de l'intervalle de confiance pour la dose, ainsi que le rapport des cotes entre dose nulle et dose mesurée par un dosimètre figurent sur la première ligne du tableau 9, accompagnés d'autres valeurs en dessous qui auraient été citées si le nombre de dicentriques observées pour 1 000 cellules avait été différent.

Un laboratoire peut avoir recours à l'une ou l'autre de ces techniques ou aux deux lorsqu'il présente les résultats d'une analyse, en fonction du cas particulier qui lui a été soumis.

9.7.4.3. Exposition partielle

En cas d'exposition partielle, la distribution des dicentriques dans les cellules en métaphase observées chez un patient ne suit pas la loi de Poisson. Par conséquent, la première étape consiste à calculer le rapport entre la variance et la moyenne (σ^2/f), puis à se servir du test u pour déterminer si ce rapport s'écarte de un de manière significative (voir la section 8.3). Si les valeurs obtenues sont compatibles avec une distribution de Poisson, il est recommandé de donner comme résultat une estimation de la dose moyenne à l'organisme. Dans le cas contraire, deux méthodes (voir ci-après) qui permettent d'aboutir à une estimation de la dose partielle plutôt que de se contenter de communiquer la valeur de la dose moyenne ont été proposées. Le fait de décider d'estimer la dose partielle dépend aussi parfois des informations dont on dispose sur les circonstances de la surexposition. La méthode recommandée pour déterminer si des données suivent une loi de Poisson est le test u mais nombreux sont ceux qui considèrent que ce test n'est pas très robuste, surtout lorsque le nombre d'étalements métaphasiques examinés est faible. C'est pourquoi il est d'usage courant dans de nombreux laboratoires de comparer également les estimations de dose à l'organisme et les doses partielles obtenues à l'aide d'une des deux méthodes décrites ci-après aux données. Si l'estimation de la dose à l'organisme s'écarte de manière significative de la dose partielle, le laboratoire doit considérer qu'il s'agit peut-être d'une exposition partielle. S'il existe une incertitude quant à savoir si les estimations de dose à l'organisme et de dose partielle présentent des différences significatives (voir la section 9.7.3), il est recommandé de n'appliquer les deux méthodes décrites ici que lorsque les données s'écartent de manière significative de la loi de Poisson.

Méthode 1

Cette méthode a été proposée pour la première fois par Dolphin [138] et est appelée la méthode à contamination poissonnienne. Elle s'intéresse à la distribution surdispersée des dicentriques parmi les cellules examinées et considère que cette distribution est la somme a) d'une distribution de Poisson qui correspond à la partie irradiée de l'organisme et b) de données qui correspondent au reste du corps, lequel n'a pas été exposé. Les cellules qui présentent des aberrations proviennent nécessairement de la partie irradiée de l'organisme. Les cellules intactes sont constituées de deux sous-populations : celles qui proviennent de la partie non exposée du corps et les cellules irradiées qui n'ont subi aucune lésion (elles

constituent le premier terme (e^{-F}) de la série de Poisson). L'équation (12) décrit la distribution des lésions dans les cellules :

$$\frac{F_p}{1 - e^{-F}} = \frac{X}{N - n_0} \quad (12)$$

où :

F_p est la fréquence moyenne des dicentriques dans la partie irradiée de l'organisme,

e^{-F} représente le nombre de cellules intactes dans cette même partie,

X est le nombre de dicentriques observées,

N est le nombre total de cellules et

n_0 représente le nombre de cellules qui ne contiennent pas de dicentriques.

L'équation (12) peut être résolue par itération pour trouver l'estimation du maximum de vraisemblance pour la fréquence et F_p peut alors être utilisée pour calculer la fraction f des cellules examinées qui ont été irradiées à l'aide de l'équation (13) :

$$F_p f = \frac{X}{N} \quad (13)$$

La dose reçue par la partie irradiée de l'organisme peut alors être calculée à l'aide de F_p et de la courbe d'étalonnage adéquate. La taille de la partie du corps qui a été irradiée peut être déduite de f après correction des effets de l'apoptose et du retard de mitose. Ces facteurs font que des cellules irradiées, même si elles ne comportent pas d'aberrations, sont moins susceptibles que les cellules qui n'ont pas été exposées d'atteindre la métaphase au bout de 48 heures de culture. Si la fraction de cellules irradiées qui sont parvenues à la métaphase vaut p , la partie de l'organisme irradiée, P , est donnée par :

$$P = \frac{f / p}{1 - f + f / p} \quad (14)$$

Une estimation de la valeur p est fournie par la formule :

$$p = \exp(-D/D_0) \quad (15)$$

où :

D est la dose estimée et

l'expérience montre que D_0 est compris entre 2,7 et 3,5 [139, 140].

Cette méthode présente néanmoins plusieurs limites :

- 1) Elle suppose que la partie de l'organisme irradiée a été exposée de manière homogène.
- 2) Elle calcule la fraction de lymphocytes irradiés qui ne peuvent provenir que de la partie exposée du corps en s'appuyant sur l'hypothèse simplificatrice que les lymphocytes sont répartis uniformément dans tout l'organisme.
- 3) Elle impose que la dose localisée soit suffisamment élevée pour que plusieurs cellules observées comportent deux dicentriques ou plus. Cette condition est nécessaire au calcul du meilleur ajustement pour les cellules irradiées mais intactes.
- 4) Elle suppose un laps de temps très court entre l'irradiation et le prélèvement sanguin afin que la fréquence des dicentriques ne soit pas modifiée de manière significative par les cellules intactes nouvellement formées qui pénètrent dans le sang. Si une dilution se

produit, la partie irradiée du corps calculée par cette méthode risque d'être sous-estimée [141].

Méthode 2

Elle a été proposée par Sasaki et Miyata [142] et est appelée méthode du Qdr. Elle s'intéresse à la fréquence des dicentriques et des anneaux présents uniquement dans les cellules qui comportent des aberrations instables et suppose que ces cellules étaient présentes au moment de l'accident. Cette technique contourne donc les problèmes de dilution par des cellules intactes provenant d'une partie non exposée de l'organisme et de reconstitution des lymphocytes à partir de cellules souches. Elle n'impose pas non plus la présence de cellules fortement lésées comportant deux aberrations ou plus. Le Qdr est la fréquence attendue de dicentriques et d'anneaux parmi les cellules lésées, N_U , et est donné par la formule :

$$Qdr = \frac{X}{N_U} = \frac{F_1}{1 - \exp(-F_1 - F_2)} \quad (16)$$

où :

X est le nombre de dicentriques et d'anneaux et

F_1 et F_2 représentent respectivement la fréquence des dicentriques et des anneaux et la fréquence des fragments excédentaires.

Comme F_1 et F_2 dépendent de la dose d'une manière connue et peuvent être calculées à l'aide de courbes dose-effet construites pour des cellules irradiées *in vitro*, le Qdr n'est fonction que de la dose et permet d'estimer la dose reçue par la partie irradiée de l'organisme du sujet.

Cette méthode présente elle aussi plusieurs limites :

- 1) Comme la méthode 1, elle suppose que la partie du corps irradiée a été exposée de manière uniforme, mais, selon Sasaki et Miyata [142], elle ne donne aucune information sur la taille de cette partie. Toutefois, celle-ci peut être calculée en appliquant pratiquement la même démarche que dans la méthode 1, c'est-à-dire en transformant la dose en fréquence puis en se servant des équations (13) et (14).
- 2) Elle suppose que les fragments excédentaires suivent également une loi de Poisson, mais cette hypothèse n'est pas corroborée par les données issues d'expériences effectuées *in vitro*. Si cette limite est jugée importante, elle peut être contournée en s'intéressant à la fréquence des dicentriques et des anneaux uniquement dans les cellules lésées qui ne contiennent que des dicentriques et des anneaux. Dans ce cas, la formule (16) devient :

$$Qdr = \frac{X}{N_U} = \frac{F_1}{1 - \exp(-F_1)} \quad (17)$$

qui est identique à l'équation (12). Cette formule simplifiée conduit à une estimation de la dose identique à celle qui est obtenue avec la méthode 1 décrite ci-dessus.

- 3) Cette méthode suppose que toutes les cellules qui contiennent des aberrations instables étaient présentes au moment de l'irradiation et qu'aucune cellule contenant des aberrations chromosomiques résultant de lésions chromatidiques induites sur des cellules souches n'a été examinée.

9.7.4.4. Prélèvements sanguins effectués tardivement

Il est bien établi que certains lymphocytes qui comportent des aberrations continuent à se trouver dans le sang périphérique de nombreuses années après une irradiation. Toutefois, il est apparu que si le prélèvement est effectué plus de quelques semaines après une exposition, la fréquence des aberrations est plus faible. Cela est particulièrement évident lorsque la dose reçue est suffisamment élevée pour provoquer des effets déterministes précoces comme la chute du nombre de globules blancs. Lorsque la dose est plus faible et est inférieure au seuil des effets déterministes, il est plus facile de confirmer tardivement une surexposition. Il est par conséquent nécessaire de procéder à quelques ajustements afin d'aboutir à une estimation plus réaliste de la dose reçue. Il n'existe malheureusement que peu de données qui permettent d'obtenir un facteur de correction fiable. En effet, étant donné que les variations individuelles sont très nettes et dépendent de facteurs comme les infections contractées, la baisse de la fréquence des aberrations ne peut sans doute pas être exprimée de manière simple en fonction du temps. Néanmoins, certains ont avancé qu'elle pouvait avoir la forme d'une exponentielle décroissante avec une demi-vie d'environ trois ans [106]. Cette approximation générale paraît satisfaisante lorsque le prélèvement est effectué longtemps après l'exposition, soit cinq ans ou plus. Cependant, lorsque l'on étudie de brèves expositions accidentelles, l'écart temporel est rarement aussi grand. Il est en général compris entre quelques jours et quelques semaines. Il est probable qu'il sera de quelques semaines si l'exposition n'est détectée que lorsqu'un dosimètre individuel classique est analysé et si l'irradiation a eu lieu peu de temps après que ce dosimètre a été délivré. Au maximum, il peut arriver qu'une année s'écoule entre l'irradiation et le prélèvement et, pendant cette période, une décroissance exponentielle avec une demi-vie d'environ trois ans ne correspond pas à la réalité.

Buckton *et al.* [63, 143, 144] qui, pendant plus de 30 ans, ont prélevé des échantillons de sang à maintes reprises sur un groupe de patients traités par des rayons X délivrés de manière fractionnée pour une spondylarthrite ankylosante, ont sans doute publié la masse de données la plus complète sur cette question. Ces études ont fait apparaître que la courbe de fréquence des aberrations comportait un long plateau initial, d'une durée d'environ 20 semaines, qui était suivi d'une chute qui se poursuivait pendant quatre ans. Ils ont calculé que, pendant les quatre premières années, la fréquence des dicentriques baissait à un rythme d'environ 43 % par an et que, par la suite, le déclin se poursuivait à une vitesse de 14 % par an. Compte tenu des variations considérables observées sur des données limitées, aucune indication définitive ne peut être donnée, surtout si le prélèvement a lieu plus de quelques semaines après une irradiation. C'est pourquoi le fait de ne pas corriger la fréquence des dicentriques conduit vraisemblablement à sous-estimer la dose reçue mais l'ampleur de cette sous-estimation dépend de facteurs généralement inquantifiables qui sont propres à chaque individu.

Dans l'analyse des irradiations partielles (section 9.7.4.3 ci-dessus), il a été indiqué que la méthode du Qdr ne s'intéresse à la fréquence des dicentriques et des anneaux que pour les cellules lésées. Par conséquent, l'application de cette méthode aux prélèvements sanguins effectués tardivement permet également d'éviter le problème de dilution qui résulte du fait que des cellules intactes pénètrent dans le sang, à condition que l'on observe suffisamment de cellules comportant des aberrations instables. Cela n'est manifestement pas possible lorsque le prélèvement est effectué très tardivement. En pareil cas, il est néanmoins possible de s'intéresser à la persistance des cellules qui présentent des aberrations stables. Pendant de nombreuses années, cela n'a été possible que par caryotypage de nombreuses préparations colorées en bloc puis marquées en bandes. Par ces méthodes, l'étude des patients traités pour une spondylarthrite ankylosante a révélé que la fréquence de ces cellules restait plus ou moins constante pendant les 30 ans qu'a duré le suivi. Awa [145] a également indiqué qu'il existe une bonne corrélation entre la fréquence des aberrations stables et les estimations des doses reçues

par les survivants de la bombe atomique dans le DS86. Les cellules en division qui contiennent des aberrations instables sont sélectivement éliminées par non-disjonction lors de la mitose. On suppose que le surnombre d'aberrations stables observé au cours du temps s'explique par le fait que les cellules qui comportent des lésions stables et celles qui présentent des lésions instables disparaissent au même rythme mais que la perte des aberrations stables est compensée par des divisions qui ne sont pas bloquées parmi les cellules souches. Le caryotypage laborieux par marquage en bandes a aujourd'hui été remplacé par la méthode FISH, laquelle constitue la meilleure technique pour examiner un grand nombre de cellules à la recherche de translocations rares, aléatoires, stables et non constitutionnelles en dosimétrie biologique rétrospective. Cette technique est décrite dans la section 10.

9.7.4.5. Expositions prolongées et fractionnées

Une exposition prolongée ou fractionnée peut également se traduire par une fréquence d'aberrations chromosomiques plus faible que si la même dose était reçue de manière aiguë. Pour les rayonnements dont le TLE est élevé (pour lesquels la relation entre la dose et l'effet est pratiquement linéaire), on estime que le débit de dose ou le fractionnement de l'irradiation n'a aucune incidence sur la fréquence des aberrations. En revanche, lorsque le TLE est faible, un prolongement de l'exposition entraîne une baisse du coefficient de la dose au carré, β , dans la formule (2). Ce terme représente les aberrations potentiellement provoquées par deux parcours et susceptibles d'être modifiées par des mécanismes de réparation qui ont le temps d'agir pendant une exposition prolongée ou pendant les périodes qui séparent des expositions aiguës intermittentes. Plusieurs études ont montré que la diminution de la fréquence des aberrations suit une exponentielle simple dont la demi-vie est d'environ deux heures. La majorité des lésions qui se transforment en aberrations chromosomiques sont réparées ou ne peuvent plus subir d'interaction au-delà de cinq ou six heures après une exposition.

Lea et Catchside [146] ont proposé d'introduire un paramètre dépendant du temps, la fonction G , afin de modifier le coefficient de la dose au carré et de tenir compte des effets d'une exposition prolongée. La formule linéaire quadratique (2) peut alors être modifiée comme suit :

$$F = C + \alpha D + \beta G(x) D^2 \quad (18)$$

où

$$G(x) = \frac{2}{x^2} [x - 1 + e^{-x}] \quad (19)$$

et

$$x = d/d_0 \quad (20)$$

où :

d est la durée pendant laquelle l'irradiation s'est produite et

d_0 est la durée de vie moyenne des cassures. On a pu montrer que celle-ci était d'environ deux heures [96, 147].

Par conséquent, dans le cas d'une irradiation continue, il est nécessaire de connaître la durée de l'exposition et d'adopter l'hypothèse simplificatrice selon laquelle le débit de dose est resté plus ou moins constant. Cette méthode ne présente d'intérêt que si la dose totale est suffisamment élevée et que la durée de l'exposition est de quelques heures, voire de quelques jours. Évidemment, pour les petites expositions ($< 0,3$ gray) à des rayonnements de

faible TLE, même aiguës, la majorité des aberrations sont provoquées par le passage de particules qui ne provoquent qu'une seule ionisation de sorte que la fréquence suit à peu près la formule $F = \alpha D$ de toute façon. Lorsqu'une dose est reçue sur une longue période, la fonction $G(x)$ devient à peu près nulle. Par conséquent, même si la dose suspectée est élevée ($> 1,0$ gray) la fréquence suit en réalité la formule $F = \alpha D$. On peut considérer les expositions brèves et intermittentes, lorsque les écarts entre les irradiations sont de plus de six heures, comme plusieurs expositions aiguës isolées pour lesquelles les fréquences des aberrations induites s'ajoutent. Lorsque l'intervalle qui sépare les irradiations est plus court, $G(x)$, dans la formule (18), peut être remplacé par $\exp(-d_1/d_0)$ où d_1 est le temps qui s'est écoulé entre deux expositions. Lloyd *et al.* [96] et Bauchinger *et al.* [147] ont présenté des données expérimentales à l'appui de la théorie de la fonction G .

9.7.4.6. Incorporation de radionucléides

Elle constitue une forme particulière d'irradiation prolongée, la complication supplémentaire étant que l'organisme est généralement exposé de manière très irrégulière. En effet, les sites où se dépose un radionucléide et sa durée de rétention dépendent d'un grand nombre de facteurs. Parmi ceux-ci, on peut citer la voie de pénétration dans l'organisme, la forme physico-chimique, la qualité du rayonnement émis, les voies métaboliques par lesquelles le nucléide peut être incorporé et l'état physiologique du sujet.

On peut observer une fréquence des aberrations chromosomiques supérieure à leur fréquence naturelle dans des lymphocytes prélevés sur des personnes qui ont subi une contamination interne. Cependant, en raison de l'existence de nombreux facteurs de confusion, il n'est pas possible de déduire de la fréquence des aberrations une estimation sûre de la dose reçue par l'organisme entier ou par des organes particuliers. La fréquence des aberrations peut être comparée à une courbe dose-effet pour laquelle des lymphocytes ont été irradiés *in vitro* par le radionucléide en question, ce qui permet d'estimer la dose *in vivo* reçue par les lymphocytes circulants du patient. DuFrain *et al.* [148] ont présenté un exemple de cette technique pour un cas d'accident dans lequel un homme a été massivement contaminé par de l'américium 241. Cependant, la dose aux lymphocytes, en particulier pour les émetteurs alpha, peut être très éloignée de la dose reçue par les autres cellules et tissus de l'organisme.

Ainsi, en général, les analyses cytogénétiques sont d'un intérêt limité lorsque des radionucléides ont été incorporés. À titre d'exception, on peut citer le cas de figure où les radionucléides se répandent assez uniformément dans l'organisme. Tel est le cas par exemple des isotopes du césium et de l'eau tritiée. Le césium a tendance à se concentrer dans les muscles, lesquels sont présents à peu près partout dans l'organisme. Sa clairance comporte deux pics d'élimination : il est éliminé à 10 % au bout de deux jours et à 90 % au bout de 100 jours. Lors de l'accident de Goiânia, c'est ce nucléide qui a contaminé la population [149, 150]. À Tchernobyl, le césium 137 était l'un des principaux responsables de la dose qui résultait de la contamination de l'environnement [151]. Le tritium absorbé sous forme d'eau ou de gaz tritié se retrouve dans l'eau du corps et provoque donc une irradiation plus ou moins uniforme. Sa période biologique est d'environ 10 jours de sorte que comme pour le césium, l'exposition peut être considérée comme chronique et, en pratique, la relation attendue entre la dose et l'effet est linéaire. En l'absence de courbe dose-effet spécifique réalisée à partir de cellules *in vitro* pour le tritium, il suffit de disposer d'une courbe pour des rayons X dont le kVp est compris entre 200 et 300. Prosser *et al.* [152] ont montré que, pour une dose ou un débit de dose faible, l'EBR du tritium par rapport à des rayons X de 250 kVp était de 1,13.

9.7.5. Exemples d'estimations de dose

9.7.5.1. Exposition aiguë corps entier

Brewen *et al.* [91] et Preston *et al.* [153] ont décrit un accident avec une source de cobalt 60 au cours duquel la face antérieure du corps de la victime a reçu une dose élevée de manière relativement homogène. La dose moyenne reçue par le dos était plus faible, mais cette partie du corps a également été exposée lorsque l'homme en question s'est retourné et s'est éloigné de la source. La durée totale d'exposition a été inférieure à une minute. Plusieurs échantillons de sang ont été prélevés entre six heures et trois ans après l'événement. La fréquence des aberrations est restée relativement constante sur la période comprise entre 6 heures et 32 jours après l'accident, période au cours de laquelle 7 échantillons de sang ont été prélevés et 300 cellules en métaphase analysées à chaque fois. Si l'on associe les données obtenues à partir des 7 échantillons, 478 dicentriques et anneaux ont été observés dans 2 100 cellules. Les personnes qui ont effectué ces analyses utilisaient une courbe dose-effet obtenue par irradiation de cellules *in vitro* par des rayons gamma, courbe pour laquelle la dose était exprimée en röntgen (R) :

$$F = 3,93 \times 10^{-4} D + 8,16 \times 10^{-6} D^2 \quad (21)$$

ce qui a conduit à une estimation de l'exposition moyenne corps entier de 144 R (1 R = 0,0095 Gy). Elle était en adéquation avec l'estimation de 127 R obtenue grâce au dosimètre thermoluminescent que l'homme en question portait et à une reconstitution de l'événement à l'aide d'un fantôme. Les modifications hématologiques générales constatées corroboraient également une exposition d'environ 150 R.

9.7.5.2. Accident de criticité

Considérons un accident de criticité pour lequel 100 cellules sont examinées et 120 dicentriques observées, soit 1,2 dicentrique par cellule. Les mesures physiques montrent que le rapport entre les neutrons et les rayons gamma dans la dose absorbée est de 2/3. Les estimations de dose par des méthodes cytogénétiques doivent être effectuées à l'aide de courbes d'étalonnage réalisées pour des neutrons de fission de 0,7 MeV et pour des rayons gamma émis par une source de cobalt 60. Pour ces courbes, les formules associées à la fréquence des aberrations sont les suivantes :

$$\text{Neutrons : } F = 0,0005 + 8,32 \times 10^{-1} D \quad (22)$$

$$\text{Rayons gamma : } F = 0,0005 + 1,64 \times 10^{-2} D + 4,92 \times 10^{-2} D^2 \quad (23)$$

En suivant les étapes décrites dans la section 9.7.4.1 :

- 1) 1,20 dicentrique par cellule est équivalent à 1,44 gray dû aux neutrons ;
- 2) $1,44 \times 3/2 = 2,16$ grays dus aux rayons gamma ;
- 3) 2,16 grays dus aux rayons gamma sont équivalents à 0,266 dicentrique par cellule ;
- 4) $1,20 - 0,266 = 0,934$, ce qui représente la fréquence des dicentriques attribuable aux neutrons ;
- 5) 0,934 dicentrique par cellule est équivalent à 1,12 gray dû aux neutrons.

Si l'on répète l'étape 2, $1,12 \times 3/2 = 1,683$ gray dû aux rayons gamma, etc. Après quelques itérations, on obtient des doses d'1,21 gray pour les neutrons et d'1,82 gray pour les rayons gamma. La séquence complète est présentée dans le tableau 10.

Dans le cadre d'exercices internationaux destinés à comparer les techniques de dosimétrie appliquées en cas d'accident de criticité, cette méthode a été validée *in vitro* et a permis d'obtenir de très bonnes estimations des doses réellement dues aux neutrons et aux rayons gamma [137, 154].

TABLEAU 10. SUCCESSION DES ÉTAPES SUIVIES POUR OBTENIR UNE ESTIMATION DE LA DOSE EN CAS D'IRRADIATION DUE À LA FOIS À DES RAYONS GAMMA ET À DES NEUTRONS

Étapes 1 et 5	Étape 2	Étape 3	Étape 4
Dose due aux neutrons	Dose due aux rayons gamma	Fréquence due aux rayons gamma	Fréquence due aux neutrons
(Gy)	(Gy)	(dicentriques par cellule)	(dicentriques par cellule)
1,44	2,16	0,266	0,934
1,12	1,68	0,167	1,032
1,24	1,86	0,201	0,999
1,20	1,80	0,189	1,011
1,21	1,82	0,194	1,006

9.7.5.3. Surexposition à faible dose

Une personne spécialisée dans le contrôle non destructif par radiographie et qui travaillait avec des sources d'iridium 192 a renvoyé un dosimètre thermoluminescent à usage mensuel qui avait enregistré une exposition à un rayonnement pénétrant de 250 mSv. Aucun dosimètre de ses collègues réguliers n'avait relevé la moindre irradiation. Rien n'indiquait qu'un système avait connu une défaillance et rien ne pouvait expliquer pourquoi le dosimètre avait enregistré une surexposition. Une analyse cytogénétique au cours de laquelle 1 000 cellules en métaphase ont été examinées a eu lieu et toutes les cellules étaient intactes. Ce résultat était considéré comme la meilleure estimation possible que la dose avait été nulle mais, si l'on considérait la courbe $F = 0,001 + 0,0164D + 0,0492D^2$, la limite de confiance à 95 % supérieure pour zéro était égale à 0,12 gray. Les personnes qui étudiaient cette affaire doutaient que l'homme en question eût réellement été irradié. Dans ce cas, il s'est avéré utile de présenter les résultats d'une autre manière. Si l'on utilisait la méthode du rapport des cotes décrite à la section 9.7.4.2, il apparaissait que la cote associée au fait que la dose soit nulle était d'environ 1 300 contre 1.

9.7.5 4. Exposition non uniforme aiguë

Une irradiation inhomogène qui a provoqué une exposition fortement localisée et suffisante pour entraîner des brûlures cutanées s'est produite lorsqu'une personne non directement affectée à des travaux sous rayonnement a ramassé une source d'iridium 192 de

250 GBq (6,7 Ci) et l'a mise dans sa poche [155]. Un prélèvement de sang a été effectué rapidement et 1 000 lymphocytes en métaphase ont été examinés. 99 d'entre eux comportaient les aberrations suivantes : 86 dicentriques, 2 anneaux centriques et 60 fragments excédentaires. La répartition des dicentriques était la suivante :

TABLEAU 11. RÉPARTITION DES DICENTRIQUES APRÈS UNE EXPOSITION NON UNIFORME AIGUË

	Dicentriques par cellule					
	0	1	2	3	4	5
Nombre de cellules	932	56	9	1	1	1

Les courbes dose-effet *in vitro* dont disposait le laboratoire d'analyse correspondaient aux formules suivantes :

$$F_{dicentriques} = 1,57 \times 10^{-2} D + 5,00 \times 10^{-2} D^2 \quad (24)$$

$$F_{acentriques} = 2,30 \times 10^{-2} D + 3,90 \times 10^{-2} D^2 \quad (25)$$

Si l'on applique la méthode à contamination poissonnienne, l'estimation du maximum de vraisemblance pour la fréquence des dicentriques, F_P , dans les cellules irradiées est obtenue en remplaçant les termes de l'équation (12) par les données de l'exemple. Par itération, $F_P = 0,489$ dicentriques par cellule irradiée, ce qui correspond, sur la courbe dose-effet, à 2,97 grays.

La fraction f des cellules irradiées est obtenue en résolvant l'équation (13), ce qui, dans cet exemple, donne $f = 0,176$. Comme cette valeur représente la population de cellules qui a été irradiée et a survécu, elle doit être corrigée, à l'aide de la formule (14), afin de tenir compte de la sélection qu'ont subie les cellules exposées en raison de facteurs comme l'apoptose ou le retard de mitose. Des expériences qui ont été menées [147] indiquent que cette sélection varie exponentiellement avec la dose, D_0 valant 2,70 grays. Dans l'exemple qui a été pris, l'estimation de dose à environ 3,0 grays impliquerait que seules environ 33 % des cellules irradiées [p dans la formule (14)] ont survécu et ont pu être analysées. La partie initialement exposée, P , est égale à 0,393 et est obtenue en appliquant la formule (14). La partie du corps irradiée représente donc à peu près 40 % de l'organisme, avec une dose moyenne d'environ 3,0 grays.

La méthode du Qdr (section 9.7.4.3) a également été appliquée et il convient de noter que le laboratoire d'analyse n'a pas, contrairement à l'habitude, eu recours à la fréquence des dicentriques et des anneaux pour estimer la dose mais uniquement aux dicentriques, c'est-à-dire au Qd. Comme les anneaux sont des aberrations que l'on observe plus rarement que les dicentriques et les fragments excédentaires, cette différence n'a que peu d'incidence. Par conséquent, si l'on remplace les inconnues par les données de l'exemple dans la formule (16) et si l'on néglige les anneaux centriques, on obtient l'équation suivante :

$$Qd = \frac{86}{99} = \frac{1,57 \times 10^{-2} D + 5,00 \times 10^{-2} D^2}{1 - e^{-3,87 \times 10^{-2} D - 8,90 \times 10^{-2} D^2}} \quad (26)$$

Il est possible de résoudre cette équation et d'obtenir la valeur de D par itération. On obtient une estimation de 3,19 grays pour la dose. Ce chiffre concorde bien avec la valeur de 2,97 grays obtenue par la méthode à contamination poissonnienne.

9.7.5.5. *Prélèvements sanguins effectués tardivement*

On trouvera ci-après deux exemples de calcul de dose dans des cas où le prélèvement sanguin a été effectué tardivement.

Correction de la fréquence des dicentriques

Stephan *et al.* [156] ont rendu compte d'un accident au cours duquel deux hommes ont été exposés relativement uniformément à une source gamma de cobalt 60 pendant environ cinq minutes. Ils portaient des dosifilms qui indiquaient que les doses reçues étaient de 470 et 170 mSv et ces valeurs concordaient très bien avec le calcul physique des doses reçues. Malheureusement, du sang n'a été prélevé que 215 jours après l'accident chez l'homme le plus exposé et 103 jours après l'accident chez son collègue. Environ 1 500 cellules en métaphase ont été examinées pour chacun d'entre eux et des fréquences pratiquement identiques de 0,47 et 0,46 dicentriques pour 100 cellules ont été obtenues. Elles correspondent à 0,13 gray sur la courbe dose-effet dont la formule est la suivante :

$$F = 3,00 \times 10^{-4} D + 5,00 \times 10^{-6} D^2 \quad (27)$$

Les auteurs ont choisi de corriger les fréquences de dicentriques d'un facteur 3 et 2, respectivement, afin de tenir compte des dates de prélèvement. Cette décision s'appuyait sur les données fournies par Brewen *et al.* [91] et Preston *et al.* [153] sur l'exposition accidentelle corps entier décrite à la section 9.7.5.1. Si l'on utilise les fréquences de dicentriques corrigées, on obtient des estimations de dose de 0,31 et 0,22 gray. Même si cela permet de rapprocher, pour l'homme le plus exposé, l'estimation biologique de la dose de l'estimation physique, il reste un écart. Si les auteurs avaient choisi d'utiliser les données de l'étude sur les patients atteints de spondylarthrite ankylosante [143], une correction maximale de 1,4 aurait été appliquée, de sorte que l'écart entre l'estimation biologique et l'estimation physique pour le premier homme aurait été plus grand. Étant donné que la même étude faisait apparaître que la fréquence des aberrations n'évoluait pas pendant les 20 premières semaines, la fréquence calculée sur un prélèvement effectué au bout de 103 jours ne nécessitait aucune correction.

Utilisation de la méthode du Qdr

Ishihara *et al.* [157] ont décrit un accident grave au cours duquel une source de radiographie industrielle d'iridium 192 a été emportée dans une habitation et a irradié six personnes. Les deux sujets les plus gravement surexposés ont été irradiés partiellement, ce que les brûlures cutanées montraient bien. Cela apparaissait également dans les données relatives aux aberrations, étant donné que les doses estimées par la méthode du Qdr étaient de 1,95 et 1,50 gray, soit sensiblement plus élevées que les valeurs de 1,52 et 0,54 gray obtenues pour une dose à l'organisme à partir de la fréquence des dicentriques et des anneaux par cellule. Le nombre de dicentriques et d'anneaux par cellule a légèrement varié au cours des deux premiers mois qui ont suivi l'exposition puis est devenu plus stable jusqu'à six mois. En revanche, les valeurs du Qdr sont restées relativement constantes depuis l'irradiation jusqu'à 400 et 200 jours, respectivement, c'est-à-dire jusqu'à l'arrêt des examens.

9.7.5.6. *Expositions prolongées et fractionnées*

En décembre 1998, un grave accident s'est produit à Istanbul lorsqu'une source de cobalt 60 anciennement utilisée en radiothérapie a été éventrée dans un dépôt de ferraille [158]. Dix personnes ont été irradiées, surtout pendant une seule journée, les durées

d'exposition étant comprises entre deux et sept heures [159]. On s'intéresse ici à l'une de ces victimes à titre d'exemple. Elle a été exposée aux rayonnements pendant sept heures et la fréquence des dicentriques, obtenue à partir des résultats cumulés de quatre laboratoires, était de 157 dicentriques pour 688 cellules soit $0,228 \pm 0,18$ dic/cellule. La formule de la courbe dose aiguë-effet étant la suivante :

$$F = 0,001 + 0,003D + 0,060D^2 \quad (28)$$

de sorte que la dose aiguë (\pm Er. T.) est estimée à $1,7 \pm 0,1$ gray. L'incertitude est ici légèrement simplifiée en ignorant les éventuelles erreurs associées à la courbe dose-effet. En appliquant la fonction G, où

$$x = d/d_0 = 7/2 = 3,5 \quad (29)$$

de sorte que $G(x) = 0,413$, la formule associée à la courbe dose-effet devient

$$F = 0,001 + 0,003D + 0,025D^2 \quad (30)$$

La fréquence des dicentriques correspond maintenant à une exposition à une dose de $2,5 \pm 0,1$ grays pendant sept heures.

9.7.5.7. Incorporation de radionucléides

Lloyd *et al.* [160] se sont intéressés à un accident au cours duquel une ouvrière a inhalé des gouttelettes d'eau tritiée d'une activité d'environ 35 GBq (~ 1 Ci). L'élimination du tritium contenu dans son organisme a été accélérée par une diurèse forcée. La dose engagée pour les tissus mous a été obtenue en mesurant la concentration et le débit d'excrétion du tritium dans ses urines. La fréquence des dicentriques a été évaluée dans des échantillons de sang prélevés à différents moments après l'événement, et les données obtenues à 40-50 jours ont été utilisées à des fins de dosimétrie biologique étant donné qu'à ce moment-là toute la dose engagée avait été reçue. Les fréquences de dicentriques ont été associées au coefficient d'une courbe d'étalonnage dose-effet linéaire obtenue *in vitro*, $5,37 \times 10^{-2}$, ce qui a conduit à une estimation de la dose moyenne aux lymphocytes de 0,58 gray. Cette valeur devait être multipliée par un facteur de 0,66. Ce facteur résulte des différences de teneur en eau entre le corps entier, les tissus mous et les lymphocytes. La fréquence des aberrations est étalonnée par rapport à la dose reçue par les lymphocytes alors que l'eau tritiée délivre principalement sa dose aux tissus mous de l'organisme. Cette correction a abouti à une estimation de la dose biologique de 0,38 gray avec des limites de confiance à 95 % de 0,48 et 0,28 gray, estimation plus réaliste qui se rapproche du $0,47 \text{ gray} \pm 20 \%$ obtenu à l'aide de mesures sur les urines. La conversion de la concentration de tritium dans les urines en dose reçue par les tissus mous tenait également compte de la teneur en eau de ces tissus [160].

10. ANALYSE DES TRANSLOCATIONS

L'un des inconvénients notables de l'examen des dicentriques et de l'analyse des micronoyaux par blocage de la cytokinèse (CBMN) est que la lésion est instable et, par conséquent, est éliminée des lymphocytes du sang périphérique au rythme du renouvellement cellulaire (voir la section 4). On sait depuis longtemps qu'il est nécessaire d'étudier des types de lésion plus persistantes, comme les translocations stables, pour pouvoir effectuer de la dosimétrie biologique lorsque l'exposition est ancienne ou de longue durée. Les translocations sont détectables par caryotypage, technique, qui, toutefois, est trop laborieuse pour être appliquée en routine en dosimétrie biologique. L'apparition de la méthode FISH [161] a permis de détecter les translocations par un autre moyen.

Cette technique a recours à des séquences spécifiques d'ADN qui peuvent être utilisées comme sondes sur une certaine partie du génome, puis fixées à divers fluorochromes pour mettre en évidence ou « peindre » les régions en différentes couleurs. Au microscope à fluorescence, les translocations se présentent comme des réarrangements colorés (visibles sur les figures 26 et 27).

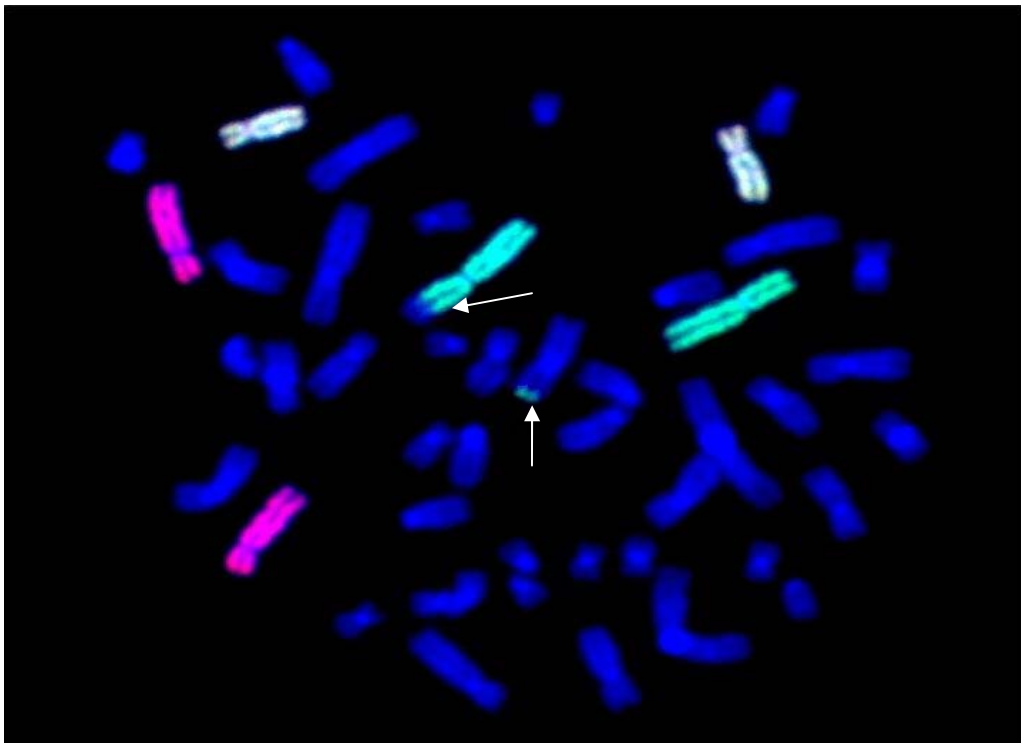


FIG. 26. Étalement métaphasique d'une cellule humaine sur lequel les chromosomes 2 (FITC, vert), 4 (Texas red) et 8 (FITC + Texas red, jaune) sont peints et le reste des chromosomes est contre-coloré au DAPI. On observe une translocation apparemment simple ou réciproque [t(Ba), t(Ab)] sur le chromosome 2.

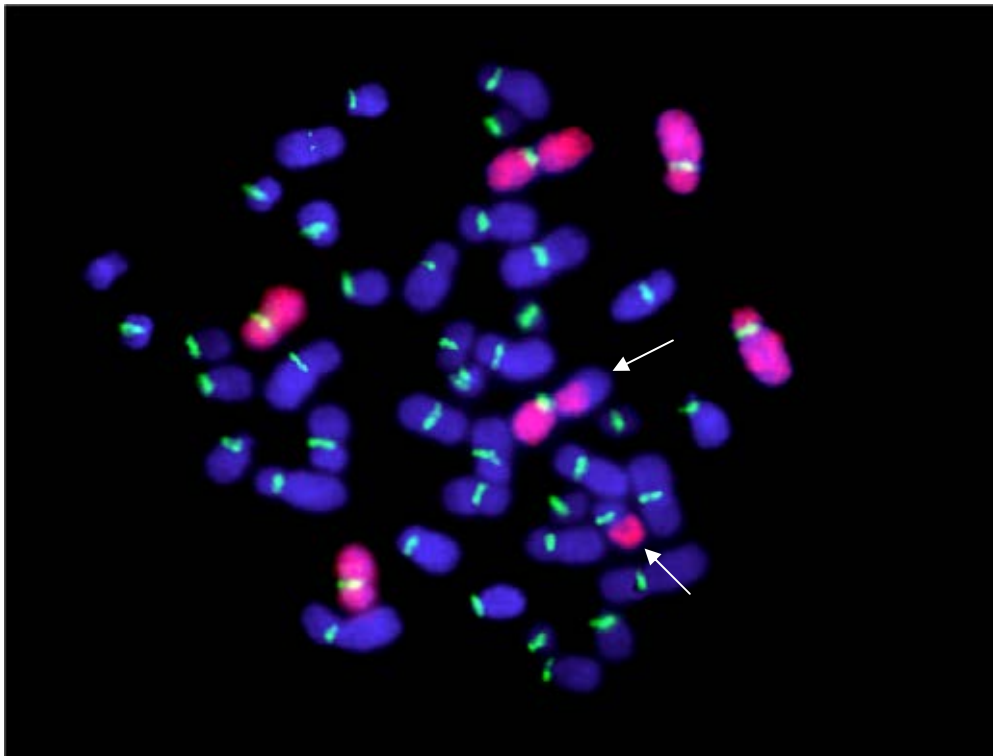


FIG. 27. Étalement métaphasique d'une cellule humaine sur lequel les chromosomes 1, 4 et 11, marqués à la Cy3 (en rouge) sont monochromes, les centromères étant mis en évidence par une sonde centromérique marquée au FITC (en vert), le reste étant contre-coloré au DAPI. On observe une translocation apparemment simple ou réciproque [t(Ba), t(Ab)] sur le chromosome 1.

La méthode FISH a de nombreuses applications en médecine et en cytogénétique fondamentale. Toutefois, la présente publication ne s'intéresse qu'à son utilisation en dosimétrie biologique. On trouve aujourd'hui un large éventail de sondes, de sorte qu'il est possible de ne peindre qu'une partie ou l'ensemble de chacun des chromosomes humains. En fixant des fluorochromes dans des proportions variées sur des sites spécifiques, il est possible de mettre en évidence plusieurs régions en même temps avec une grande diversité de couleurs. L'un des inconvénients du recours à de nombreuses couleurs, comme dans la méthode FISH multicolore (mFISH), est que les différences de teintes sont parfois trop subtiles pour que l'œil puisse les distinguer. Par conséquent, il est nécessaire de disposer de systèmes électroniques pour recueillir les images et les afficher en leur appliquant de fausses couleurs (figures 28 et 29).

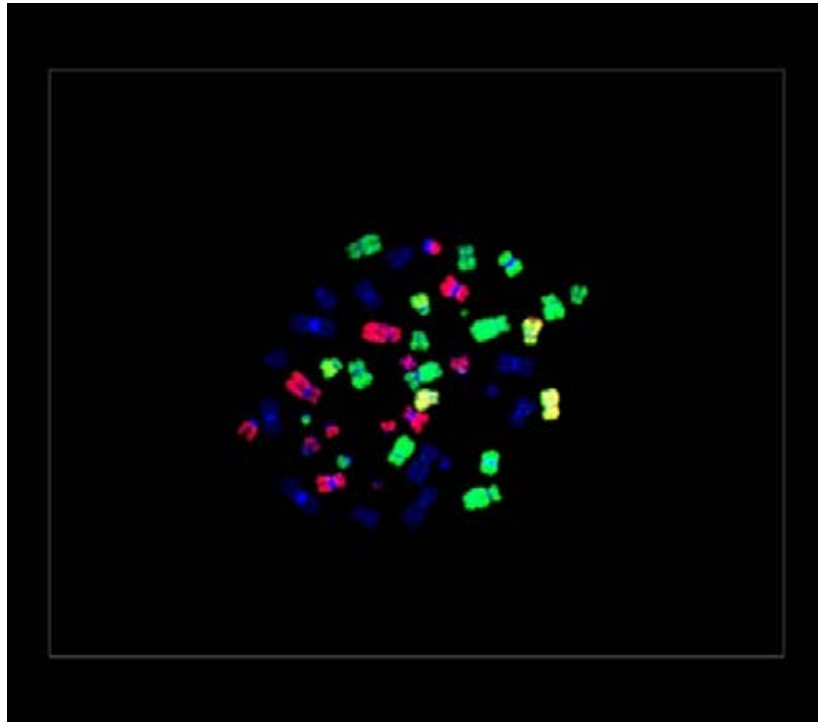


FIG. 28. Étalement en métaphase coloré par la méthode mFISH : en couleurs RVB tel qu'il a été pris par l'appareil photo.

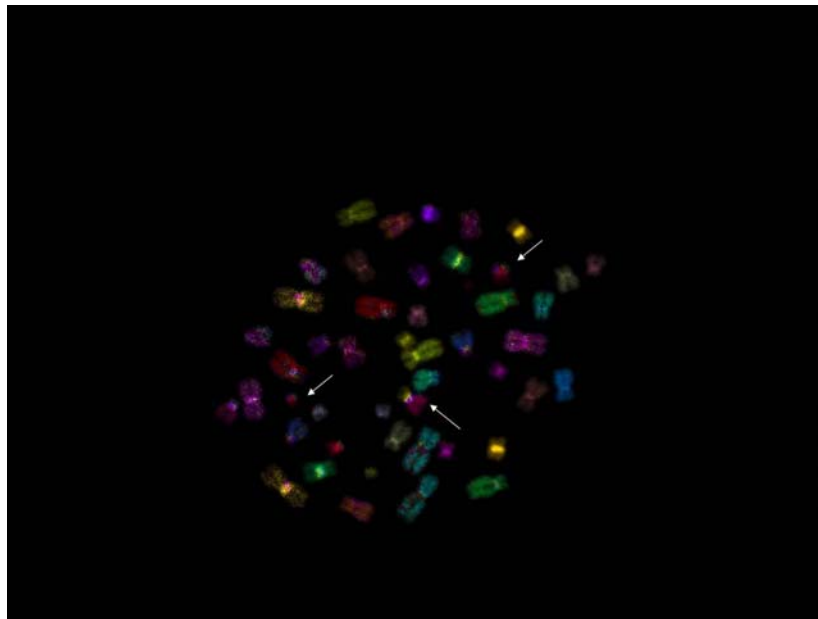


FIG. 29. Étalement en métaphase coloré par la méthode mFISH : même métaphase que ci-dessus mais pour laquelle une pseudo-couleur a été associée à chaque paire de chromosomes.

10.1. CULTURE DES CELLULES ET MÉTHODES DE FIXATION

Les méthodes utilisées pour obtenir du sang, cultiver les lymphocytes et prélever les cellules fixées sont similaires à celles qui sont décrites pour l'analyse des dicentriques (sections 9.1 et 9.2). Même si les translocations subsistent après la mitose, il est de bonne pratique d'effectuer l'analyse sur des cellules qui effectuent leur première métaphase. Ce

point est d'une grande importance car la destruction des cellules contenant des aberrations instables lors de la mitose peut fausser le calcul de la fréquence moyenne des translocations. De plus, il peut arriver que l'on ait besoin en même temps de la fréquence des translocations (stables) et des dicentriques (instables) pour un même échantillon. Pour l'analyse par FISH, il est préférable de stocker les suspensions cellulaires fixées au froid. Les cellules déposées sur des lames de microscope peuvent être stockées. Elles doivent être conservées à -20° C mais, même dans ces conditions, une détérioration de leur état a parfois été observée. Les suspensions cellulaires fixées sont plus faciles à transporter vers d'autres laboratoires.

Généralement, en dosimétrie biologique, seule une partie du génome (par exemple, trois paires de chromosomes) est peinte. Cette contrainte impose d'examiner plus de cellules en métaphase que pour l'analyse des dicentriques. Il est par conséquent utile et rentable de préparer plusieurs lames, chacune présentant un grand nombre de cellules en métaphase de qualité et analysables.

10.2. PEINTURE DES CHROMOSOMES

Compte tenu de l'éventail des combinaisons de sondes et de fluorochromes disponibles sur le marché, il est possible de faire ressortir tous les chromosomes par la méthode appelée FISH multicolore (mFISH) [162]. Cela permet un caryotypage complet et, par conséquent, une détection de toutes les translocations interchromosomiques. Les centromères et les télomères de tous les chromosomes peuvent également être mis en évidence distinctement.

Les échanges intrachromosomiques, comme les inversions péricentriques, peuvent être détectés en peignant les bras p et q d'un chromosome dans des couleurs différentes [163] et les réarrangements à l'intérieur d'un même bras peuvent être repérés par mBAND, technique qui consiste à réaliser un marquage en bandes multicolore sur un chromosome dans le sens de la longueur [164, 165]. Certains ont proposé de considérer une fréquence accrue des modifications intrachromosomiques par rapport aux échanges interchromosomiques comme une caractéristique de l'effet des rayonnements dont le TLE est élevé [166]. Pour cette raison, ces méthodes sont particulièrement utilisées pour rechercher les effets de la qualité des rayonnements.

Dans la plupart des applications de dosimétrie biologique rétrospective, il suffit de détecter les translocations interchromosomiques et, dans l'idéal, la méthode mFISH peut donner le maximum d'informations pour chaque cellule en métaphase. Cette méthode peut être étendue de sorte que les bras des chromosomes apparaissent dans des couleurs différentes (pq-mFISH) [167] mais c'est une technique coûteuse, longue et qui exige des systèmes de capture et de manipulation d'images très sophistiqués. C'est pour cette raison qu'en pratique on s'est orienté vers une peinture d'un nombre limité de paires de chromosomes dans la même couleur ou dans des couleurs distinctes, accompagnée d'une contre-coloration pour le reste des chromosomes. Il est recommandé d'utiliser une sonde centromérique [168] tout en peignant des chromosomes en entier afin de mieux distinguer les dicentriques des translocations (Fig. 30).

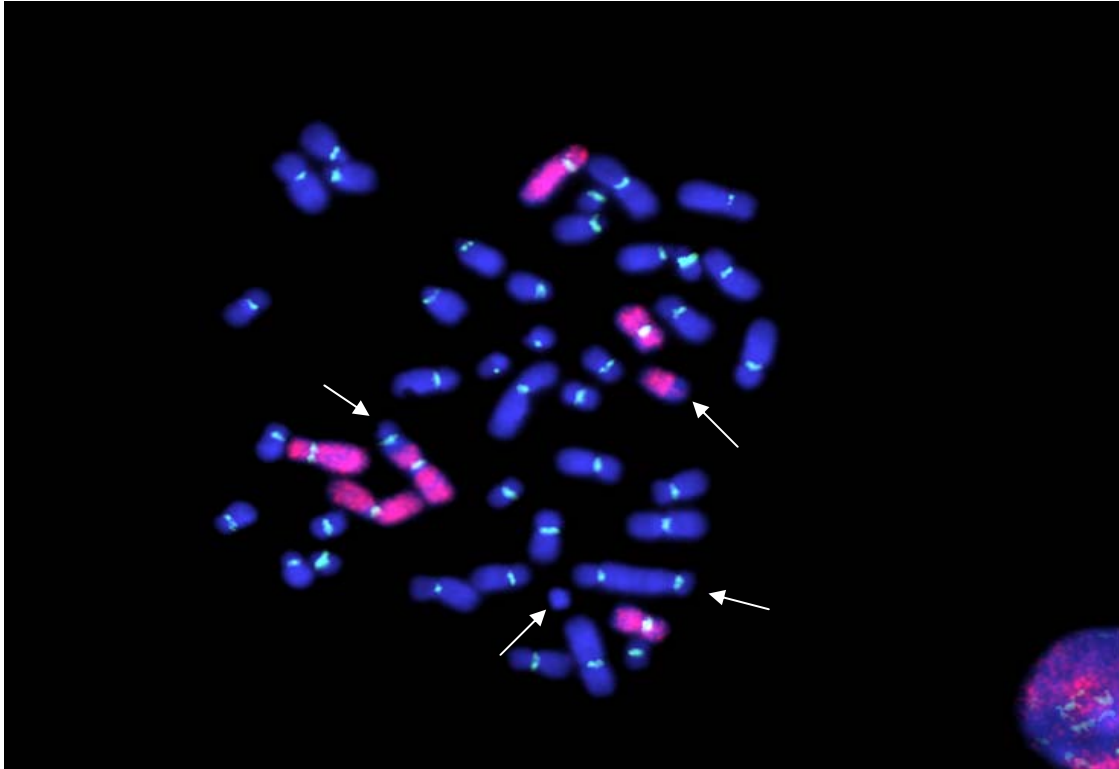


FIG. 30. Étalement métaphasique d'une cellule humaine sur lequel les chromosomes 1, 4 et 11 sont marqués à la Cy3 (rouge), les centromères sont mis en évidence par une sonde centromérique marquée au FITC (vert), le reste étant contre-coloré au DAPI. On observe une dicentrique apparemment simple [dic(BA),ace(ab)] formée à partir du chromosome 1. Les chromosomes contre-colorés comprennent également une dicentrique accompagnée d'un fragment acentrique.

En général, le fait de peindre trois des plus gros chromosomes (c'est-à-dire 1 à 12, voir la figure 7) qui représentent environ 20 % du génome (cf. tableaux 2 et 3) permet de détecter environ 33 % des translocations lorsque l'on n'utilise qu'une seule couleur. Le pourcentage du génome que chaque cocktail de substances « peint » est estimé à partir de la taille des chromosomes concernés [169]. La fréquence des translocations peut être évaluée à l'aide d'une formule type proposée par Lucas *et al.* [170], formule qui repose sur l'hypothèse que les échanges sont simples et se font deux à deux. Il est conseillé de ne pas utiliser une combinaison de sondes qui interagit avec les chromosomes 7 et 14 étant donné que les translocations et d'autres aberrations qui touchent ces chromosomes peuvent apparaître *in vivo* au cours du développement du système immunitaire et peut donc fausser l'évaluation des effets des rayonnements [171, 172].

En dosimétrie biologique rétrospective, il paraît suffisant d'appliquer une méthode FISH à une seule couleur avec un cocktail ciblant trois chromosomes différents. Une peinture multicolore de trois chromosomes accroît l'efficacité de la détection (si l'on met en évidence les chromosomes 1, 4 et 12, celle-ci passe d'à peu près 31 % à environ 34 %) et permet de mieux repérer les translocations complexes qui peuvent apparaître à la suite d'une exposition récente à une dose élevée. Les formules qui permettent d'obtenir une équivalence pour le génome entier sont présentées ci-après dans la section 10.4 et peuvent être appliquées aussi bien à la peinture d'une seule couleur qu'à la peinture multicolore.

10.3. CRITÈRES D'EXAMEN

10.3.1. Sélection des cellules analysables

Même s'il n'existe pas de consensus solide au sujet des cellules en métaphase à analyser, on considère que celles qui sont bien étalées peuvent être examinées si elles apparaissent intactes, si les centromères sont morphologiquement détectables et présents sur tous les chromosomes peints et si le marquage au fluorochrome est suffisamment brillant pour faire apparaître les échanges entre chromosomes marqués avec des couleurs différentes [107].

En routine, on ne tient pas compte du fait que tous les chromosomes contre-colorés soient présents ou non, mais la plupart des chercheurs écarteraient une cellule en métaphase s'il était évident qu'il lui manquait plusieurs chromosomes, par exemple s'il y en avait moins de 40.

Certains chercheurs considèrent que tout le matériel chromosomique peint qui est présent doit être examiné, même si cela implique un certain jugement étant donné qu'avec les techniques FISH actuelles, la limite de résolution se situe autour de 11-15 Mb [173]. Par conséquent, certaines translocations symétriques ressemblent à des échanges apparemment incomplets, mais des études menées avec des sondes télomériques ont montré qu'une grande partie des translocations apparemment incomplètes sont en réalité complètes [62]. Les cellules qui présentent visiblement des déficiences sur une grande partie du matériel chromosomique peint ou des centromères marqués ne doivent pas être retenues pour l'analyse.

En dosimétrie rétrospective, il a été établi que la fréquence des translocations dans les cellules stables, au sens où elles ne comportent ni dicentriques, ni anneaux centriques ni fragments acentriques, ne varie pas au cours du temps [64, 174]. Il est par conséquent recommandé de noter, pour chaque translocation, si celle-ci a été détectée dans une cellule stable ou dans une cellule instable.

10.3.2. Classification et enregistrement des données

Pour décrire les aberrations chromosomiques détectées par des techniques de peinture, deux systèmes de classification spécifiques ont été développés indépendamment et des descriptions s'appuyant sur la terminologie classique des examens cytogénétiques de routine ont également été utilisées [173, 175–178]. Les systèmes de classification ont été introduits car, avec une analyse partielle du génome, la terminologie classique s'est avérée inadéquate étant donné que de nombreux motifs révélés par méthode FISH sont apparus plus compliqués qu'attendu.

- i) Un système, dont l'acronyme est PAINT, a été développé uniquement afin de décrire chaque objet aberrant peint en métaphase [175]. Chacun est donc décrit individuellement sans référence aux autres objets aberrants présents dans la cellule. Chaque couleur est désignée par une lettre, qui commence dans l'ordre alphabétique par la contre-couleur. Une lettre en majuscule désigne un objet qui contient un centromère. Ainsi, avec une peinture d'une seule couleur, t(Ab) désigne un objet bicolore composé d'une partie centromérique d'un chromosome contre-coloré et d'une partie non centromérique d'un chromosome peint. Inversement, t(Ba) est un objet pour lequel le centromère se trouve sur la partie peinte. La peinture multicolore est prise en compte en ajoutant d'autres lettres à la classification. Pour une description complète des abréviations utilisées dans ce système, le lecteur est invité à consulter Tucker *et al.* [175]. Une autre suggestion formulée dans cet article, à savoir considérer les jonctions de couleurs comme un indice des lésions qui résultent de la dose reçue n'a aucune application pratique en dosimétrie rétrospective.

- ii) Savage et Simpson [176, 177] ont proposé une terminologie composée de chiffres et de lettres qui décrivent complètement chaque échange. Les chiffres correspondent aux numéros des objets qui contiennent du matériel chromosomique peint et l'ordre alphabétique des lettres indique la probabilité d'apparition du motif. Ce système ne s'applique qu'à la peinture en une seule couleur. Il peut cependant être utilisé lorsque la peinture est bicolore ou tricolore, mais chaque chromosome peint doit dans ce cas être examiné séparément, indépendamment de la couleur des autres chromosomes [131]. Cette classification est très utilisée dans les études mécanistiques et notamment, par exemple, pour comprendre les réarrangements complexes.

On peut aussi se servir d'une terminologie plus classique qui désigne les translocations comme réciproques, non réciproques ou interstitielles [179]. Ce troisième type de translocation comprend les inversions et les insertions. Les études mécanistiques ont montré que les motifs non réciproques ne permettaient pas d'aboutir à une certitude quant à l'incomplétude des échanges [180]. L'insertion constitue l'un des nombreux types de réarrangements complexes dont la définition officielle est qu'elle résulte de trois cassures ou plus sur deux chromosomes ou plus [177].

Les classifications décrites ci-dessus ne s'excluent pas mutuellement mais sont plutôt complémentaires. Elles ont été comparées pour un même jeu de données [175].

Aujourd'hui, la méthode la plus utilisée pour enregistrer les résultats consiste à considérer chaque anomalie en métaphase comme une unité en appliquant la classification PAINT [175] mais d'une manière légèrement modifiée [178] qui tient compte du mécanisme sur lequel repose la formation des aberrations. Les abréviations de la classification PAINT sont utilisées mais il est également fait référence aux associations entre objets en métaphase, ce qui revient à intégrer aussi certains aspects de la terminologie classique. Les aberrations chromosomiques sont classées comme simples ou complexes, ce dernier cas s'appliquant lorsqu'il faut trois cassures ou plus sur deux chromosomes ou plus pour aboutir à l'anomalie observée. Les aberrations sont considérées comme complètes lorsque toutes les pièces cassées se sont refixées et incomplètes lorsqu'une ou plusieurs pièces apparaissent disjointes.

Ainsi, t(Ba) observée avec t(Ab) est considéré comme une translocation simple complète – ou translocation réciproque – et chacun de ces motifs pris séparément est classé comme translocation simple incomplète ou translocation non réciproque quand ils sont reconnus seuls en métaphase, parfois associés à un fragment acentrique peint, t(Ba) plus ace(b). Les objets complexes sont enregistrés comme tels et sont décrits soit comme des insertions, par exemple ins(Aba), soit comme des réarrangements plus compliqués comme t(Ba) associé à ace(ab) ou dic(BA) associé à t(Ab).

Notons que si l'on ne peint qu'un nombre limité de chromosomes, des aberrations comme t(Ba) plus t(Ab) seront considérées comme « apparemment » simples. On utilise l'adverbe « apparemment » car elles apparaissent simples alors qu'elles peuvent résulter d'aberrations complexes, mais cela ne peut être déterminé que si l'on peint l'ensemble de la garniture chromosomique par mFISH [181, 182].

10.4. TRAITEMENT DES DONNÉES

Lucas *et al.* [170] ont établi les formules qui permettent d'extrapoler les résultats obtenus à l'ensemble du génome et ces formules ont été synthétisées par Lucas et Deng [183].

La fréquence des translocations est habituellement calculée en appliquant la formule suivante pour la fraction peinte du génome [32] :

$$F_G = \frac{F_p}{2,05 f_p (1 - f_p)} \quad (31)$$

où :

F_G est la fréquence des aberrations pour l'ensemble du génome,

F_p est la fréquence des translocations détectées par la méthode FISH et

f_p est la fraction du génome hybridée [170], en tenant compte du sexe des sujets.

Cette formule est expliquée plus en détail dans la section 10.4.1 ci-après.

Il est recommandé d'extrapoler les données à l'ensemble du génome lorsqu'elles doivent être associées ou que des comparaisons interlaboratoires doivent être effectuées à partir de résultats issus d'études diverses et lorsque différentes combinaisons de sondes qui permettent de peindre des chromosomes en entier ont été utilisées. L'hypothèse de base, parfois appelée formule de Lucas, est que la probabilité qu'une aberration fasse intervenir un chromosome peint donné est proportionnelle au pourcentage de l'ADN qu'il contient. Cette question a fait l'objet d'études approfondies [184–186] et, pour l'essentiel, les spécialistes considèrent que cette hypothèse aboutit à une approximation raisonnable. Toutefois, on s'accorde à reconnaître que si on utilise le pourcentage de l'ADN dans la formule de Lucas, la contribution des grands chromosomes aux aberrations qui résultent d'un échange simple risque d'être surestimée par rapport à celle des chromosomes plus petits [187, 188]. C'est pourquoi l'utilisation du (pourcentage de l'ADN)^{2/3} à la place du pourcentage de l'ADN dans cette formule donne de meilleurs résultats. Certains auteurs ont avancé que ce type de proportionnalité était peut-être symptomatique d'échanges qui font principalement intervenir la chromatine qui se trouve à la frontière des territoires chromosomiques [186–188]. Les données les plus fiables sur le pourcentage de l'ADN contenu dans chaque chromosome humain ont été fournies par Morton [32] et les valeurs qui figurent dans les tableaux 2 et 3 ont été calculées à partir des données inscrites dans la colonne 2 de son tableau 4.

10.4.1. Peinture d'une seule couleur

Une fraction f du génome est peinte (en vert) et le reste, $1 - f$, est contre-coloré (en bleu).

Note : Par souci de simplification, le f_p de l'équation (31) ci-dessus a été abrégé en f .

On a	f^2	échanges vert-vert
	$(1 - f)^2$	échanges bleu-bleu
	$2f(1 - f)$	échanges bleu-vert
	Total 1,00	

Toutefois, ce total comprend les échanges qui ont eu lieu au sein d'un même chromosome, par exemple les inversions. Le total qui fait intervenir les échanges interchromosomiques est égal à 0,974 si l'on applique l'hypothèse déjà évoquée de proportionnalité par rapport au pourcentage d'ADN (les calculs détaillés figurent dans Lucas *et al.* [170]). Par conséquent, la fraction de toutes les translocations qui sont des translocations bleu-vert est donnée par l'équation (32) :

$$\frac{F_P}{F_G} = \frac{2f(1-f)}{0,74} = 2,05f(1-f) \quad (32)$$

où :

F_P et F_G sont respectivement la fréquence des translocations mesurée par la méthode FISH et la fréquence des translocations pour l'ensemble du génome.

On pourrait appliquer la même formule aux dicentriques bleu-vert.

Exemple

Supposons que les paires de chromosomes 1, 2 et 4 soient peintes. D'après le tableau 2, le pourcentage de l'ADN qu'elles contiennent (pour une personne de sexe masculin) s'élève respectivement à 0,0828, 0,0804 et 0,0639.

Par conséquent, $f = 0,2271$, de sorte que $F_P/F_G = 0,360$.

Cette combinaison de chromosomes peints permet de détecter 36 % des translocations bicolores. C'est pourquoi, pour obtenir la fréquence des translocations sur l'ensemble du génome, il faut diviser la fréquence mesurée par 0,36.

10.4.2. Peinture bicolore

Supposons qu'une fraction f_1 soit peinte en rouge et qu'une autre fraction f_2 soit peinte en vert et que $(1 - f_1 - f_2) = f_3$ soit contre-coloré en bleu.

On aura :	f_1^2	échanges rouge-rouge
	f_2^2	échanges vert-vert
	f_3^2	échanges bleu-bleu
	$2f_1f_2$	échanges rouge-vert
	$2f_1f_3$	échanges rouge-bleu
	$2f_2f_3$	échanges vert-bleu

Encore une fois, le total qui fait intervenir les échanges interchromosomiques est égal à 0,974, par conséquent la fraction de toutes les translocations bicolores est donnée par l'équation suivante :

$$\frac{2(f_1f_2 + f_1f_3 + f_2f_3)}{0,974} - 2,05[f_1(1-f_1) + f_2(1-f_2) + f_3(1-f_3)] \quad (33)$$

Exemple

Supposons que les paires de chromosomes 1, 2 et 4 soient peintes en rouge, que les paires 3, 5 et 6 soient peintes en vert et que le reste soit contre-coloré en bleu. D'après le tableau 2, les valeurs des fractions f_1 et f_2 sont les suivantes : $f_1 = 0,227$ et $f_2 = 0,186$:

$$\frac{F_P}{F_G} = 2,05(0,175 + 0,151 - 0,042) = 2,05(0,284) = 0,582 \quad (34)$$

Cette combinaison permet de détecter 58 % des translocations. Il convient de souligner que lorsqu'un échange réciproque entre deux chromosomes peints d'une couleur différente se produit, cet échange reste considéré comme un événement unique.

10.4.3. Plus de deux couleurs

Les calculs peuvent être étendus à la peinture FISH multicolore. Lorsque le nombre de couleurs est élevé, l'équation devient :

$$\frac{F_P}{F_G} = 2,05 \left[\sum_i f_i (1 - f_i) - \sum_{i < j} f_i f_j \right] \quad (35)$$

Tous les calculs détaillés dans la présente section sont intégrés au logiciel Dose Estimate, mentionné dans la section 8.3.

10.5. NIVEAU DE RÉFÉRENCE DES TRANSLOCATIONS

Le niveau de référence des translocations est plus élevé que la fréquence naturelle des dicentriques, ce qui est dû en partie au fait que les translocations sont des aberrations qui persistent. Il importe donc de tenir compte de ce niveau de référence, surtout lorsque la dose reçue a été faible, quand on cherche à mesurer cette dose par dosimétrie biologique rétrospective.

Bien sûr, il n'existe pas d'échantillon de sang de référence avant exposition pour le sujet irradié accidentellement ou pour un groupe de personnes donné, c'est pourquoi il faut utiliser une valeur hypothétique en s'appuyant sur les résultats d'études génériques. Dans l'idéal, un laboratoire devrait établir sa propre base de données mais il s'agit d'une entreprise de grande envergure étant donné qu'une telle base devrait tenir compte de plusieurs facteurs de confusion et surtout d'une grande diversité de tranches d'âge. Une méta-analyse complète publiée par Sigurdson *et al.* [107] offre aujourd'hui la meilleure base de données internationale par âge, sexe, race et consommation de tabac. Elle intègre des données issues d'une étude plus ancienne qui regroupait les résultats obtenus par quelques laboratoires européens [189].

Ces deux études font clairement apparaître que l'âge constitue le principal facteur qui détermine la fréquence naturelle des translocations, laquelle augmente substantiellement au-delà de 60 ans (Fig. 31).

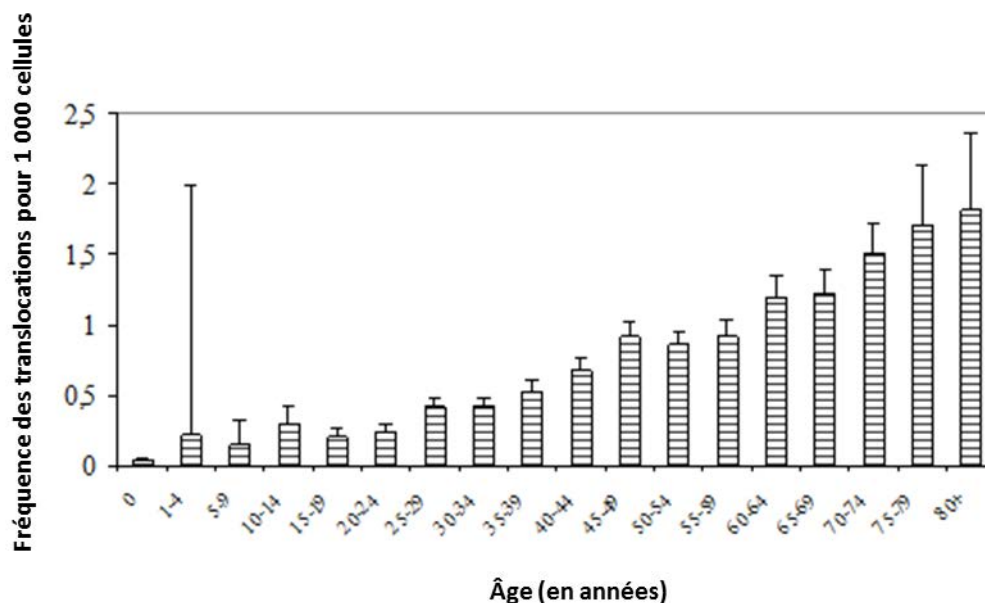


FIG. 31. Nombre de translocations en fonction de l'âge [107].

Il est important de tenir compte de la fréquence naturelle des translocations et de soustraire à la fréquence de ce type d'aberration évaluée dans les lymphocytes d'un individu la fréquence des translocations attendue étant donné son âge. L'étude de Sigurdson *et al.* [107] a confirmé l'existence d'un effet de laboratoire et a également mis en évidence des différences significatives entre les quatre principales zones géographiques. En revanche, aucune incidence de l'origine ethnique ou du sexe n'a été constatée. Il apparaît donc indispensable de ne comparer que des données qui proviennent d'un même laboratoire lorsque l'on étudie les facteurs qui influent sur la fréquence des translocations.

Parmi les quelques études qui signalent un effet du sexe de l'individu sur la fréquence des translocations [107, 189, 190], seule celle qui a été réalisée par Whitehouse *et al.* [189] montre une fréquence plus élevée chez les hommes que les femmes pour la tranche d'âge 20-29 ans, situation notablement différente de celle de la tranche d'âge 30-39 ans ($p < 0,05$). Pour les autres tranches d'âge, la fréquence était plus élevée chez les femmes que les hommes, même si la différence n'était pas significative. Les autres études qui se sont intéressées à l'incidence du sexe sur ce type d'aberration n'ont constaté aucune différence [107, 190, 191], même par tranche d'âge.

Les études publiées s'accordent toutes pour dire que la fréquence des translocations augmente avec l'âge mais cette tendance n'est pas aussi nette pour d'autres facteurs (tableau 12).

TABLEAU 12. SYNTHÈSE DES EFFETS DES FACTEURS ÉTUDIÉS SUR LA FORMATION DES TRANSLOCATIONS ET DES DICENTRIQUES

Facteur de confusion	Études importantes et références associées	Références complémentaires
Alcool	Badr et Hussain [192]	
	Burim <i>et al.</i> [193]	
Tabac	Ramsey <i>et al.</i> [191]	Tawn et Cartmel [195]
	Bothwell <i>et al.</i> [194]	Van Diemen <i>et al.</i> [196]
	Sigurdson <i>et al.</i> [107]	Pressl <i>et al.</i> [190]
		Tucker <i>et al.</i> [197]
		Whitehouse <i>et al.</i> [189]
		Maeng <i>et al.</i> [198]
		Beskid <i>et al.</i> [199]
		Pluth <i>et al.</i> [200]
Pesticides	Steenland <i>et al.</i> (utilisateurs) [201]	Tucker [197]
Benzène	Smith <i>et al.</i> (> 31 ppm) [203]	Kim <i>et al.</i> [202]
		Smith <i>et al.</i> (< 31 ppm) [203]
		Zhang <i>et al.</i> [204]
Pollution industrielle	Beskid <i>et al.</i> [199]	Beskid <i>et al.</i> [205]
	Sram <i>et al.</i> [206]	
Métaux lourds	Maeng <i>et al.</i> (chrome, fumeurs uniquement) [198]	Dulout <i>et al.</i> (arsenic) [208]
	Doherty <i>et al.</i> (chrome) [207]	Maeng <i>et al.</i> (chrome, non-fumeurs uniquement) [198]

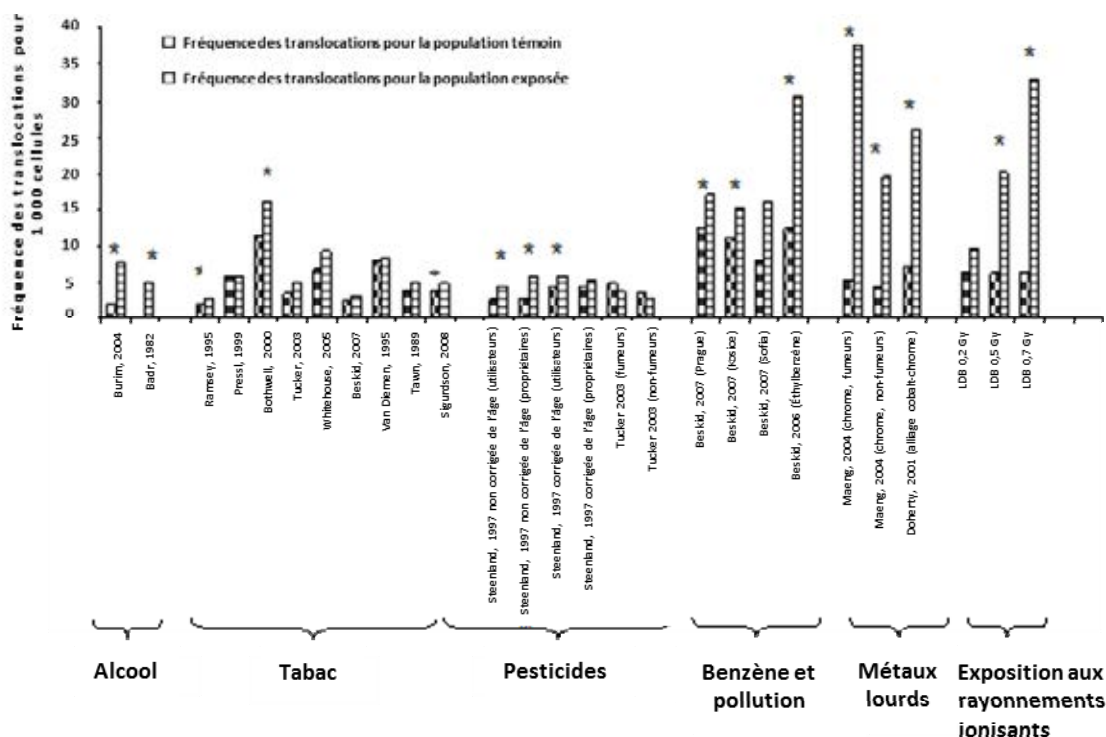
Seul l'alcool a tendance à créer un surcroît de translocations dans les deux études qui s'y sont intéressées. Cette incidence n'a pas été observée pour le tabac (8 à 11 études) ni pour les pesticides (1 à 2 études). Le cas du benzène est particulier car les analyses ont été effectuées pour les chromosomes qui jouent un rôle dans des maladies spécifiquement associées à l'exposition à cette substance. Cela signifie que seuls les échanges entre deux chromosomes (8 et 21 ou 14 et 18) ont été examinés dans les études en question [202–204]. Toutes trois ont signalé une incidence notable du chrome. En revanche, trois autres études, dans lesquelles les translocations entre ces chromosomes et le reste du génome ont été examinées, n'ont fait apparaître aucune différence significative.

Les substances qui font l'objet d'une consommation ou d'un abus par choix, comme le tabac, les drogues ou l'alcool, n'influencent pas les translocations que lorsque leur consommation est élevée et chronique. Toutefois, elles induisent souvent une augmentation notable de la fréquence des translocations lorsqu'elles sont combinées ou associées à d'autres types de produits (métaux et mutagènes chimiques) [192]. Les effets synergiques des substances qui

donnent lieu à un abus signalés par certaines études laissent supposer que le tabac augmente la fréquence des translocations dues à une exposition professionnelle. Tel est le cas pour les personnes exposées à des rayonnements ionisants [194], à des pesticides [197] et au chrome [198]. L'effet synergique du tabac est d'autant plus manifeste que la plupart des études sur les effets du tabac seul ne montrent aucune augmentation significative de la fréquence des translocations. En revanche, pour l'alcoolisme, l'effet synergique est plus difficile à mettre en évidence car il est rare que les personnes alcooliques n'aient qu'une seule addiction et, surtout, parce que ceux d'entre eux qui n'ont pas d'autre addiction sont trop peu nombreux pour que l'on puisse effectuer une analyse comparative avec un groupe témoin. Une étude de l'impact de l'alcoolisme sur la fréquence des translocations serait donc instructive.

L'effet des agents toxiques utilisés en milieu professionnel (pesticides, benzène et métaux) sur le nombre de translocations est souvent proportionnel à la dose et à la durée d'exposition. Il a également été démontré qu'une exposition à un mélange de produits est plus nocive qu'une exposition à un seul élément chimique. Enfin, l'efficacité des protections individuelles (gants, masques ou combinaisons) a été mise en évidence par une diminution de la fréquence des translocations dans la population exposée à ces types de mutagènes.

La figure 32 illustre l'incidence des facteurs examinés sur la fréquence des translocations en fonction du type de facteur, de l'exposition et des études.



LDB : Fréquence des translocations obtenue au Laboratoire de dosimétrie biologique pour une dose de rayonnement donnée (exposition au cobalt, débit de dose de 0,5 Gy/mn)

* Études pour lesquelles l'écart entre le groupe exposé et le groupe témoin est significatif

FIG. 32. Comparaison entre les fréquences des translocations induites par différents agents et les fréquences des translocations produites par une irradiation in vitro.

Pour chaque étude figure la fréquence des translocations pour 1 000 cellules dans la population témoin et dans la population exposée. Est également indiquée la fréquence des translocations obtenue par irradiation *in vitro* d'échantillons de sang à des doses de 0,2, 0,5 et 0,7 gray à des fins de comparaison. Toutefois, il convient de souligner que les irradiations ont été effectuées sur une courte durée et constituaient des expositions aiguës alors que les expositions à l'alcool, au tabac, aux pesticides ou au benzène sont chroniques. Une exposition est qualifiée de chronique lorsqu'un individu est exposé à un agent génotoxique pendant toute sa vie ou pendant une partie importante de celle-ci (exposition professionnelle ou liée au mode de vie).

La figure 32 montre également que la fréquence des translocations observée dans les populations exposées à l'alcool, au tabac et aux pesticides est notablement plus faible que pour les expositions au benzène et surtout, au chrome. En outre, les valeurs obtenues pour les groupes témoins sont assez similaires à celles des groupes exposés à l'alcool, au tabac et aux pesticides. Comparée à celle qui est observée dans un groupe exposé à des rayonnements ionisants à une dose de 0,5 gray, la fréquence des translocations constatée chez des personnes exposées à l'alcool, au tabac et aux pesticides est faible. On peut donc en conclure, en cas de fréquence des translocations élevée, que celle-ci est due à une irradiation. En revanche, lors d'une étude rétrospective de l'exposition aux rayonnements ionisants menée parmi des personnes qui ont été fortement exposées au chrome ou au benzène, il n'est pas possible de différencier les translocations dues aux rayonnements de celles qui résultent de ces facteurs environnementaux. Cela étant, une exposition au benzène ou au chrome n'est pas fréquente et il doit être possible de la détecter par un questionnaire approprié portant sur les activités professionnelles passées et actuelles.

10.6. PERSISTANCE DES TRANSLOCATIONS

Le principal inconvénient de la méthode des dicentriques est que la fréquence des aberrations chez les personnes exposées diminue avec le temps après une exposition. Les dicentriques induites dans les lymphocytes du sang périphérique disparaissent en raison de la mort des cellules et sont diluées par le renouvellement des cellules sanguines. Pour la mitose, elles constituent des aberrations instables : les cellules qui en contiennent ne peuvent plus subir de division cellulaire. En revanche, les translocations sont généralement stables vis-à-vis de la mitose et, à condition que la cellule dans son ensemble soit stable (C_s), les translocations induites dans des cellules souches n'empêchent pas celles-ci de se transformer en lymphocytes circulants matures. Au départ, les translocations sont induites à une fréquence similaire à celle des dicentriques mais c'est leur stabilité après irradiation qui fait qu'elles sont plus adaptées à la dosimétrie biologique rétrospective que les dicentriques.

La persistance des translocations est une question qui a longtemps été débattue. Plusieurs années après l'accident de Goiânia survenu au Brésil, il est apparu que la fréquence des translocations était plus faible que la fréquence des dicentriques observée juste après l'exposition [209, 210]. Toutefois, la fréquence initiale des translocations ne figurait dans aucune de ces deux études. Dans une étude rétrospective portant sur le personnel du complexe industriel nucléaire de Maïak (Oural méridional), les doses estimées étaient, dans leur ensemble, plus faibles que ne le préoyaient les courbes d'étalonnage correspondant aux translocations apparemment simples transmissibles [211]. D'autres études de suivi de personnes irradiées accidentellement ont montré que la fréquence des translocations restait relativement constante dans le temps. Aucune modification notable de la fréquence des translocations n'a été observée chez les sujets irradiés à Tchernobyl entre cinq et huit ans après l'accident [212]. Chez des individus qui ont subi une exposition corps entier lors d'un accident en Estonie, la fréquence des translocations est restée à peu près constante pendant deux ans, sauf chez un individu qui avait été exposé de manière prolongée sur le corps entier

mais qui avait aussi subi une irradiation non uniforme [213]. Cependant, quatre ans après cet accident, la fréquence de toutes les translocations dans les cellules qui ne contenaient que des réarrangements simples a chuté en moyenne à 65 % de leur valeur initiale, même si les translocations réciproques étaient légèrement plus persistantes que l'ensemble des translocations [214]. La baisse de la fréquence des translocations au cours du temps a été attribuée à l'irradiation partielle et conforte l'hypothèse d'une distribution identique des dicentriques et des translocations lors de telles expositions [215, 216]. Il semble donc que, longtemps après une exposition partielle, l'estimation de la dose à l'organisme aura tendance à diminuer d'autant plus que la dose reçue était élevée [215].

Une baisse plus prononcée de la fréquence des translocations au cours du temps à la suite d'une irradiation lorsque la dose était plus élevée a été décrite dans d'autres cas où des personnes ont été exposées accidentellement. La fréquence des translocations restait stable dans le temps pour les doses inférieures à un gray mais diminuait lorsque la dose avait été plus élevée [217, 218]. Chez des patients atteints d'un cancer et traités par radiothérapie, on a observé une nette baisse de la fréquence des translocations avec le temps, baisse qui était plus marquée chez les individus pour lesquels la fréquence initiale était plus élevée [219–222]. Une des explications possibles de ces observations est que la dose reçue est supérieure à la dose létale pour les cellules souches et que la zone concernée est repeuplée par des cellules non irradiées qui proviennent de la partie de l'organisme qui n'a pas été exposée. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent qu'à dose élevée, la fréquence initiale des translocations n'est pas toujours constante dans le temps à la suite d'une irradiation.

La complétude et la complexité sont des facteurs qui peuvent avoir une incidence sur la disparition des translocations avec le temps après une exposition. La majorité des aberrations complexes ne sont pas transmissibles et, par conséquent, les cellules qui comportent de telles aberrations disparaissent à la longue après une irradiation [213, 215, 223–226].

La cooccurrence de translocations et d'aberrations instables dans la même cellule influe également sur la persistance des translocations. Certains ont donc proposé de ne s'intéresser qu'aux cellules stables et non à l'ensemble des cellules pour effectuer une estimation rétrospective de la dose reçue. Cette méthode est en cours d'examen. Dans une étude de suivi portant sur les victimes de l'accident survenu en Estonie, la fréquence des translocations, en tenant compte de toutes les cellules, a diminué pour atteindre 70 % de sa valeur initiale au bout de deux ans [214]. Cependant, une autre étude portant sur le même groupe de personnes, dans laquelle les images numérisées des cellules lésées ont été réanalysées afin de choisir celles qui ne comportaient pas d'aberrations instables, a fait apparaître qu'au bout de sept ans, la fréquence des translocations était similaire à celle des deux premières années. Cette étude présentait néanmoins des limites car elle s'appuyait sur les images de cellules qui avaient été conservées parce qu'elles comportaient des lésions sur les chromosomes peints. Il n'était pas possible d'appliquer une correction pour tenir compte des cellules initialement considérées comme « normales » du point de vue du matériel chromosomique peint parce que les images de celles-ci n'avaient pas été numérisées. Néanmoins, cette étude, associée à la probabilité théorique selon laquelle, après une longue période de temps, seules les cellules stables subsistent, donne à penser qu'il est préférable de s'intéresser à la fréquence des translocations dans les cellules stables plutôt que dans l'ensemble des cellules. Ce point ne pourra définitivement être résolu que par des études de suivi de bonne facture comportant des examens par la méthode FISH et des analyses des aberrations instables, analyses et examens qui seront effectués en parallèle sur des victimes d'irradiation et qui débiteront peu de temps après l'exposition des sujets.

10.7. COURBES D'ÉTALONNAGE

Pour estimer une dose à l'aide des translocations détectées par la méthode FISH, chaque laboratoire doit établir ses propres courbes. Les considérations mathématiques relatives à l'ajustement des courbes sont exactement les mêmes que pour les dicentriques et ont été décrites plus haut (section 8.3). Ces courbes doivent être réalisées avec le cocktail de sondes FISH utilisé pour les analyses de routine. Cela évite d'effectuer des conversions vers l'ensemble du génome, conversions qui peuvent introduire une incertitude supplémentaire.

Pour les rayonnements dont le TLE est faible, lorsque des courbes d'étalonnage pour les translocations ont été construites en tenant compte des cellules stables ou de l'ensemble des cellules, les coefficients ajustés ne présentaient aucune différence si l'on ne s'intéressait qu'aux translocations apparemment simples [227, 228]. Néanmoins, lors d'une analyse au microscope, il est recommandé de noter toutes les aberrations détectées sur le jeu de chromosomes complet, et pas seulement celles qui affectent le matériel chromosomique peint [64]. Cette option offre la possibilité d'établir avec certitude si le fait de se limiter aux cellules stables permet d'obtenir des estimations de dose plus réalistes.

On effectue généralement des estimations de dose par la méthode FISH lorsque la dose reçue était élevée mais l'exposition prolongée ou après une exposition ancienne de faible intensité qui ne s'est traduite par aucun symptôme médical. Contrairement à la dosimétrie applicable aux expositions aiguës, pour laquelle on utilise la courbe linéaire quadratique, ici, c'est le coefficient linéaire α de la courbe dose-effet qui est d'une importance cruciale. Le test de Fisher mentionné dans la section 8.3 peut être utilisé pour vérifier la fiabilité de ce coefficient. Peu de (peut-être même aucune) courbes d'étalonnage publiées comportent assez de données dans la plage des faibles doses pour obtenir un coefficient linéaire suffisamment fiable pour lequel l'intervalle de confiance est petit [64]. Pour établir la relation de linéarité entre l'effet et la dose, il faut relever plusieurs points à des doses inférieures à un gray en examinant un grand nombre de cellules, ce qui représente une charge de travail considérable. Avant qu'une telle entreprise ait abouti, il est possible de retenir des hypothèses raisonnables pour résoudre ce problème. Le rapport entre le nombre de dicentriques et de translocations formées est d'environ 1/1 [229, 230], par conséquent, on peut s'attendre à ce que les coefficients entre la dose et l'effet soient similaires. Diverses données publiées pour les dicentriques semblent indiquer que le coefficient linéaire d'étalonnage s'élève à environ 15-20 translocations pour 1 000 cellules complètes par gray pour les rayons gamma de haute énergie [51]. On sait également que le coefficient linéaire des courbes dose-effet est principalement déterminé par la qualité du rayonnement, telle qu'elle est définie par son transfert d'énergie linéique, alors que la courbure due au coefficient β dépend du débit de dose (comme il est expliqué au paragraphe 9.7.4.5 pour la correction de la formule par la fonction G). Certains résultats semblent indiquer que le coefficient linéaire obtenu par une exposition chronique *in vitro*, à condition que celle-ci ait lieu à la température du corps, n'est pas différent des valeurs calculées pour le coefficient linéaire de la courbe en cas d'exposition aiguë [233]. Par conséquent, tant que des coefficients linéaires fiables pour les translocations mesurées par méthode FISH n'auront pas été obtenus par des expériences *in vitro* permettant de construire une courbe d'étalonnage à faible dose, il est raisonnable de se servir du coefficient linéaire d'une courbe d'étalonnage construite pour les dicentriques en exposition aiguë avec la même qualité de rayonnement.

En cas de reconstitution d'une dose longtemps après une exposition, l'estimation repose sur l'hypothèse que la fréquence des translocations est similaire pour des lymphocytes irradiés *in vitro* et pour des cellules souches sanguines irradiées *in vivo*. Il n'est pas certain que la radiosensibilité des cellules souches soit identique à celle des lymphocytes matures. On ne sait pas non plus si les divisions cellulaires survenues dans l'intervalle, au cours desquelles les

cellules contenant des aberrations instables sont éliminées, ont une incidence sur cette fréquence. La dosimétrie rétrospective suppose qu'il ne s'agit pas de facteurs de confusion déterminants et les publications récentes laissent à penser que ce point n'a aucune importance en pratique [64].

En conclusion, la reconstitution d'une dose en comptant les translocations présentes dans des cellules stables est une méthode éprouvée [174] mais qui présente des limites. Elle semble être efficace après une exposition prolongée à faible dose, lorsque la partie linéaire de la courbe d'étalonnage prédomine. À titre provisoire, on peut supposer qu'elle est la même que celle des courbes dose-effet construites pour les dicentriques. Après une exposition élevée et particulièrement aiguë, le fait de se limiter aux cellules stables peut entraîner une sous-estimation de la dose reçue car le nombre de cellules instables comportant des translocations augmente en même temps que le nombre d'aberrations complexes. De plus, il existe une limite supérieure pour l'étalonnage des doses, car lorsque celles-ci augmentent, les cellules exemptes de lésions instables deviennent de plus en plus rares.

10.8. EXEMPLES D'UTILISATION DE LA MÉTHODE FISH EN DOSIMÉTRIE BIOLOGIQUE RÉTROSPECTIVE

Ces études ont été conçues pour examiner la faisabilité de l'analyse des translocations par la méthode FISH à des fins de dosimétrie rétrospective chez 1) des populations pour lesquelles aucune enquête de dosimétrie biologique et physique n'avait préalablement été effectuée ; 2) des populations pour lesquelles on disposait d'estimations grâce à des mesures de dosimétrie physique ; 3) des populations pour lesquelles on disposait d'estimations obtenues par dosimétrie biologique grâce à une analyse classique des dicentriques effectuée juste après une exposition. Les résultats de ce dernier groupe sont considérés comme les plus fiables pour une comparaison avec la fréquence des translocations afin de déterminer la stabilité des translocations.

Les quatre groupes étudiés étaient respectivement composés de 1) personnes travaillant dans des centrales nucléaires ; 2) populations vivant dans des zones contaminées ; 3) travailleurs chargés d'assainir le site de Tchernobyl ; 4) individus ou groupes de personnes exposés accidentellement.

10.8.1. Dosimétrie biologique rétrospective pour des groupes de population pour lesquels il n'existait pas de dosimétrie individuelle auparavant

Afin d'estimer les doses reçues de manière rétrospective, on a déterminé la fréquence des aberrations chromosomiques chez 15 personnes gravement exposées à la suite de l'accident de Tchernobyl, toutes ayant été soignées pour des symptômes de la phase tardive du syndrome cutané d'irradiation.

Ces études ont commencé en 1991 et des examens de suivi ont eu lieu jusqu'en 1994 [212, 233, 234]. En 1991, des estimations de dose par des techniques biologiques ont été obtenues en mesurant la fréquence des dicentriques et des anneaux à l'aide de la méthode du Qdr ou en évaluant la fréquence des translocations stables par FISH avec des banques d'ADN de synthèse spécifiques de chromosomes entiers et une sonde d'ADN centromérique. Ces deux techniques ont abouti à des estimations de dose individuelle assez comparables, comprises entre 1,1 et 5,8 grays pour 12 des 15 personnes, tandis que la fréquence des aberrations observées chez les autres n'était pas élevée [234]. Au cours des études de suivi, la fréquence des translocations a été examinée chez les mêmes sujets sur une période de trois ans comprise entre septembre 1991 et juillet 1994 et, dans 11 cas sur 12, elle s'est avérée relativement constante. Cela a permis de disposer d'estimations de dose comparables pour les diverses dates de prélèvement d'échantillons [212].

Ces études ne permettent pas directement de conclure à la stabilité des translocations car il n'existait aucune donnée de référence pour la période qui suivait immédiatement l'exposition (c'est-à-dire des résultats de dosimétrie biologique et physique). Néanmoins, les études de suivi montrent que les translocations peuvent rester constantes à partir de cinq après une exposition à différents niveaux de dose.

10.8.2. Dosimétrie biologique rétrospective pour des groupes de populations ou de travailleurs exposés pour lesquels on dispose d'estimations quant à la dose physique reçue

Plusieurs études, principalement conçues pour estimer les doses absorbées, ont été réalisées au sujet de la fréquence des aberrations chromosomiques dans les lymphocytes, par exemple chez les victimes des bombes atomiques larguées sur Hiroshima et Nagasaki (Japon) ou chez les travailleurs chargés d'assainir le site de Tchernobyl. La fréquence des translocations relevée chez des survivants de la bombe atomique semblait proche des valeurs attendues si l'on comparait les doses estimées pour les personnes concernées grâce au DS86 (*Dosimetry System* 1986) et des courbes dose-effet obtenues par irradiation *in vitro* [145]. Par conséquent, ces études confortent l'idée d'une persistance à long terme des translocations. Néanmoins, une différence notable a été observée chez quatre travailleurs irradiés lors de l'accident survenu en 1959 à l'usine Y-12 d'Oak Ridge (États-Unis), pour lesquels, quelques années plus tard, la fréquence des translocations était notablement inférieure aux valeurs attendues [170].

En 1994, une étude pilote portant sur environ 60 personnes recrutées en Estonie pour effectuer des travaux d'assainissement à Tchernobyl en 1986 ou 1987 et pour lesquelles les doses indiquées étaient comprises entre 0 et 300 mSv a été menée afin de déterminer si l'analyse des dicentriques et celle des translocations pouvaient toutes deux confirmer les doses relevées [235]. Lors d'une autre série de recherches, 52 personnes chargées de travaux d'assainissement ont fait l'objet d'examens à l'aide de la méthode FISH [236]. Les estimations obtenues en analysant les dicentriques n'étaient plus pertinentes mais les translocations pouvaient être utilisées pour vérifier les mesures de dose effectuées sur les personnes les plus irradiées dès le début. Pour la grande majorité des sujets moins exposés, il est apparu que la méthode FISH ne pouvait servir de dosimètre individuel. Néanmoins, il a été avancé qu'elle pouvait présenter un intérêt pour distinguer des groupes de personnes exposées à des doses différentes [235], idée confirmée par l'étude menée sur les Estoniens qui étaient chargés de travaux d'assainissement [92, 237].

On dispose également de données sur 75 travailleurs de Maïak pour lesquels des mesures physiques de dose existaient et qui ont principalement été exposés entre 1948 et 1963 [238]. Des doses externes cumulées comprises entre 0,02 et 9,91 sieverts et des charges en plutonium comprises entre 0,26 et 18,5 kBq étaient indiquées. Entre 35 et 40 ans après une exposition prolongée, la fréquence des translocations a été déterminée à l'aide d'une sonde centromérique associée à des sondes permettant de peindre en entier les chromosomes 1, 4 et 12. Les résultats ont montré que la fréquence des translocations était plus élevée chez les travailleurs de Maïak que dans un groupe témoin apparié. Cependant, la plage des fréquences de translocations était généralement plus faible qu'attendu d'après les doses individuelles relevées et les courbes d'étalonnage [235, 238].

La peinture par la méthode FISH a été appliquée à des préparations en métaphase obtenues à partir de cellules prélevées sur 73 personnes habitant le long de la Tetcha et exposées à des rayonnements. Le groupe étudié était constitué de deux sous-groupes d'individus qui vivaient soit entre 7 et 60 km, soit entre 78 et 148 km en aval de l'installation nucléaire. Il y avait également un groupe témoin distinct, et la fréquence moyenne des translocations mesurée était notablement plus élevée pour les personnes qui n'en faisaient pas partie [239].

Des études de dosimétrie biologique sur des travailleurs du site nucléaire de Sellafield exposés à des rayonnements et pour lesquels la dose à l'organisme cumulée sur l'ensemble de la vie était comprise entre 173 et 1 108 mSv, toutes sauf trois étant supérieures à 500 mSv, ont été menées entre 1991 et 1994. Lorsque ces travailleurs ont été répartis en cohortes en fonction de la dose reçue, il est apparu que la fréquence moyenne des translocations au sein de chaque groupe augmentait de manière significative avec la dose. En revanche, il n'y avait aucun lien entre la dose cumulée sur l'ensemble de la vie et la fréquence des dicentriques [240].

Chez des survivants de la bombe atomique larguée sur Hiroshima, on a pu établir une bonne corrélation entre la dosimétrie par résonance paramagnétique électronique et la dosimétrie cytogénétique en mesurant la fréquence des translocations dans les lymphocytes de 40 survivants qui vivaient à proximité (environ 2 km) du point zéro et avaient au moins 10 ans au moment du bombardement [241]. Les études menées sur ces survivants montrent la persistance des translocations stables. Néanmoins, compte tenu des études mentionnées plus haut, il est possible de conclure que le nombre de certaines translocations diminue avec le temps après une exposition.

10.8.3. Dosimétrie biologique rétrospective chez des personnes pour lesquelles on dispose d'estimations de dose par analyse classique des dicentriques effectuée peu de temps après un accident

Accident mettant en jeu du tritium

La surexposition accidentelle à de l'eau tritiée décrite plus haut (section 9.7.5.7) a également fait l'objet d'une analyse rétrospective par la méthode FISH [242]. Au départ, l'examen des dicentriques aboutissait à une dose moyenne de 0,38 gray, assez comparable au 0,47 gray obtenu en mesurant le tritium dans les urines. Ces valeurs représentent des doses moyennes aux tissus mous de l'organisme car le tritium s'incorpore à l'eau de l'organisme et expose ainsi tous les tissus mous de manière plus ou moins uniforme. Les prélèvements de sang ultérieurs ont montré une baisse attendue de la fréquence des dicentriques cohérente avec une demi-vie de 3,3 années.

Six et sept ans après l'accident, une dosimétrie à l'aide de la méthode FISH a été entreprise en étudiant la fréquence conjointe des translocations non réciproques et des translocations réciproques. La première fois, un laboratoire a effectué cette analyse en peignant d'une seule couleur les chromosomes 1, 2 et 4, et pour la deuxième étude, le travail a été partagé avec un deuxième laboratoire qui a peint les chromosomes 2, 3 et 5. Les estimations de dose ont été obtenues en s'appuyant sur un étalonnage effectué sur des cellules *in vitro* avec du tritium dans un des laboratoires, étalonnage qui a abouti à une fréquence des translocations en fonction de la dose pour l'ensemble du génome définie par la formule suivante : $F = C + (5,26 \pm 0,49) \times 10^{-2}D$. Les données agrégées de toutes les analyses effectuées par la méthode FISH ont conduit à une estimation de la dose de 0,48 gray.

Accident de Goiânia

Lors de l'accident radiologique de Goiânia (Brésil, 1987), un grand nombre de personnes ont été exposées à des rayonnements lorsqu'une source de radiothérapie (du césium 137) a été éventrée [149, 150]. Ces personnes formaient une cohorte suffisante pour réaliser une étude de suivi. Immédiatement après la découverte de l'accident, les lymphocytes de 129 individus affectés ont été analysés afin de mesurer la fréquence des dicentriques et des anneaux. Pour 29 personnes, la dose reçue estimée était comprise entre 0,3 et 5,9 grays [243]. Même si la plupart des individus ont été exposés de manière inhomogène, ce que semble indiquer la présence de lésions cutanées localisées, dans tous les cas sauf six, la fréquence des aberrations

suivait une loi de Poisson. Certaines des victimes ont été suivies pendant plusieurs années en mesurant la fréquence des dicentriques (analyses qui ont débuté immédiatement) ainsi que celle des translocations par la méthode FISH (à partir de cinq ans après l'accident) à des fins de dosimétrie rétrospective [209].

Les données relatives à la fréquence des translocations (en utilisant divers cocktails de sondes qui couvrent environ 80 % du génome) obtenue par la méthode FISH pouvaient directement être comparées avec la fréquence initiale de référence pour les dicentriques mesurée chez les mêmes personnes [209]. La fréquence des translocations évaluée des années après l'exposition aux rayonnements (à partir de 1992 et au-delà) à des doses plus élevées (> 1 Gy) était deux à trois fois inférieure à la fréquence initiale des dicentriques obtenue en 1987. Pour les doses estimées inférieures à 0,9 gray, on a constaté de petites différences entre la fréquence des translocations et la fréquence initiale des dicentriques. Il serait possible d'accroître la précision de ces estimations de dose en examinant davantage de cellules. Néanmoins, des facteurs comme la diminution des lymphocytes qui comportent des translocations, le fait que le nombre de translocations n'est pas proportionnel à la taille des chromosomes et les différences entre individus limitent la précision de ces estimations. Au cours du suivi, aucune diminution du nombre de translocations non réciproques et réciproques n'a été observée [209], comme lors des études sur Tchernobyl. Straume *et al.* [244] ont également procédé à des examens sur deux victimes de l'accident de Goiânia un an après leur exposition aux rayonnements à l'aide de la méthode FISH. Lorsque les résultats obtenus ont été comparés à la fréquence des dicentriques mesurée immédiatement après l'accident, on a constaté que le nombre de translocations était plus faible.

Accidents survenus en Allemagne et en Estonie

En revanche, dans une autre étude [245] menée 11 ans après un accident ayant affecté trois personnes qui travaillaient sous rayonnement, la fréquence des translocations obtenue par la méthode FISH, avec peinture des chromosomes 2, 4 et 8 et utilisation d'une sonde centromérique, était stable et sa valeur était peu différente de la fréquence moyenne des dicentriques calculée par la FPG classique peu de temps après la découverte de l'accident. Environ 75 % des translocations ont été classées comme réciproques. À la suite d'un accident radiologique survenu en Estonie en 1994, des analyses cytogénétiques ont été effectuées au bout d'un mois puis 2, 6, 10, 12, 17, 22 et 24 mois après l'exposition de cinq personnes qui auraient reçu des doses comprises approximativement entre 1 et 3 grays [213, 246]. Au cours des études de suivi, les translocations réciproques sont restées relativement stables chez les cinq sujets et, pour l'un d'entre eux, une baisse notable du nombre des translocations non réciproques a été observée. Chez tous ces individus, la fréquence des dicentriques a diminué pour atteindre environ 50 % de la fréquence initiale 12 mois après l'irradiation [246]. Il ressort d'une autre étude de suivi qui s'étalait sur les sept années qui ont suivi l'accident que le fait de compter les translocations uniquement dans les cellules stables compense la baisse du nombre de translocations observée si l'on s'intéresse à toutes les cellules. Dans les cellules stables, la fréquence des translocations ne variait pas avec le temps au cours des premières années de suivi [174].

Accident d'Istanbul

La section 9.7.5.6 décrit un accident au cours duquel plusieurs personnes ont été irradiées par une source de cobalt 60 non protégée mélangée à de la ferraille. Un mois s'écoula entre l'accident et le moment où les autorités découvrirent qu'une exposition aux rayonnements avait eu lieu. Le nombre de cellules sanguines des patients avait considérablement diminué. Pour les cinq personnes les plus gravement exposées, l'analyse des dicentriques aboutissait à des doses comprises entre 2,2 et 3,1 grays. Ces valeurs ont été obtenues en ajustant la courbe dose-effet avec la fonction G pour tenir compte du fait que l'exposition avait duré plusieurs

heures. Dans la section 9.7.4.4, il est indiqué que, quand une exposition est suffisamment importante pour provoquer des effets déterministes, comme la baisse du nombre de cellules sanguines, la fréquence des dicentriques peut diminuer sensiblement sur une période de quelques semaines.

Une mesure de dose par la méthode FISH a également été effectuée en se servant des mêmes échantillons de sang que ceux qui avaient été utilisés pour compter les dicentriques. Les analyses ont été réalisées dans trois laboratoires [158] et les estimations de doses obtenues reposaient sur l'agrégation des fréquences des translocations non réciproques et réciproques calculées par les différents laboratoires. Les estimations de dose par la méthode FISH, qui comprenaient elles aussi un ajustement par la fonction G, étaient 20 à 30 % plus élevées que les valeurs obtenues par comptage des dicentriques.

On envisage généralement d'appliquer la méthode FISH à des fins de dosimétrie rétrospective lorsque l'on effectue des prélèvements sanguins pendant plusieurs années après une irradiation ou lorsqu'une exposition de longue durée a eu lieu, par exemple en cas de contamination de l'environnement par des radionucléides. Néanmoins, l'exemple présenté ici montre bien que cette méthode a aussi un rôle à jouer dans des cas où une dose élevée a été reçue, où le prélèvement sanguin n'est pas effectué immédiatement mais dans un délai raisonnable et où, compte tenu de la durée d'exposition, à des doses plus faibles, l'analyse des dicentriques est généralement considérée comme relativement pertinente.

Accident survenu en Géorgie

Onze jeunes gardes frontière ont été accidentellement exposés à une ou plusieurs sources de césium 137 dont l'activité ne dépassait pas 150 GBq au centre de formation militaire de Lilo. Les sources devaient servir pour des formations et pour l'étalonnage d'appareils. Les victimes ont été irradiées pendant environ un an, entre la mi-1996 et avril 1997 [247].

Les quatre personnes les plus exposées ont été hospitalisées en France, où une analyse cytogénétique a été réalisée en novembre 1997 [248] (tableau 13).

TABLEAU 13. NOMBRE ET, ENTRE PARENTHÈSES, FRÉQUENCES PAR CELLULE DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES INSTABLES^a

Patient	Cellules examinées	Dic	Rc	Ace	Test u	Dose Dic	Dose, FISH
						Gy [IC à 95 %]	Gy [IC à 95 %]
1	500	14 (0,03)	0 (0,000)	11 (0,022)	-0,43	0,4 [0,2–0,6]	0,7 [0,4–1,0]
2	500	19 (0,04)	1 (0,002)	15 (0,030)	-0,59	0,5 [0,4–0,7]	0,4 [0,1–0,7]
3	502	55 (0,11)	4 (0,008)	24 (0,048)	4,68	1,1 [0,9–1,3]	0,8 [0,6–1,1]
4	518	80 (0,15)	4 (0,008)	25 (0,048)	3,61	1,3 [1,1–1,5]	1,7 [1,4–1,9]

^a Le test u indique une surdispersion significative ($u > 1,96$) ou une sous-dispersion ($u < 1,96$). Les estimations de dose sont déduites de l'analyse des dicentriques et des translocations réciproques.

Pour estimer les doses reçues, on a construit une courbe d'étalonnage pour une exposition aiguë ($0,5 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$) à du cobalt 60 *in vitro* pour les dicentriques et les anneaux. Pour les personnes 1 et 2, la reconstitution de la dose physique semblait indiquer que l'irradiation était très localisée, ce qui n'a pas été confirmé par la distribution des dicentriques par cellule ($u < 1,96$, tableau 13). C'est pourquoi les doses qui ont été calculées en supposant que l'exposition avait été aiguë et homogène sont bien inférieures aux doses estimées pour les personnes 3 et 4, pour lesquelles les aberrations étaient surdispersées ($u > 1,96$), ce qui tendait à montrer que l'irradiation avait été partielle. Cette conclusion est en accord avec les circonstances de l'accident telles qu'elles ont été reconstituées par dosimétrie physique.

Les quatre patients souffraient probablement de lymphopénie avant leur arrivée en France, c'est pourquoi, si l'on se sert de la fréquence des aberrations instables (section 9.7.7.4), la dose moyenne à l'organisme peut être sous-estimée. C'est pour cette raison qu'un comptage des translocations par la méthode FISH a également été réalisé en s'intéressant à toutes les cellules et pas seulement aux cellules stables. Trois paires de chromosomes (2, 4 et 12) ont été peintes et une sonde centromérique a été utilisée. Pour la personne 2, on n'a constaté aucune différence entre la dose estimée à l'aide du calcul de la fréquence des dicentriques et celle obtenue en comptant les translocations (tableau 13). Pour les patients 1 et 4, les valeurs obtenues par la méthode FISH étaient plus élevées que celles qui découlaient d'une analyse des dicentriques mais les différences n'étaient pas statistiquement significatives. En revanche, pour la personne 3, la dose estimée était plus élevée si l'on comptait les dicentriques. Ces divergences s'expliquent probablement par l'hétérogénéité et le fractionnement des expositions qui, notablement différentes d'un patient à l'autre, ont par conséquent modifié la répartition des translocations dans les cellules instables et, de ce fait, ont eu une incidence sur la disparition relative des dicentriques par rapport aux translocations.

D'autres analyses cytogénétiques de suivi ont été réalisées (figures 33 et 34), même s'il n'y a pas eu de prélèvement de sang pour chaque personne à chaque occasion.

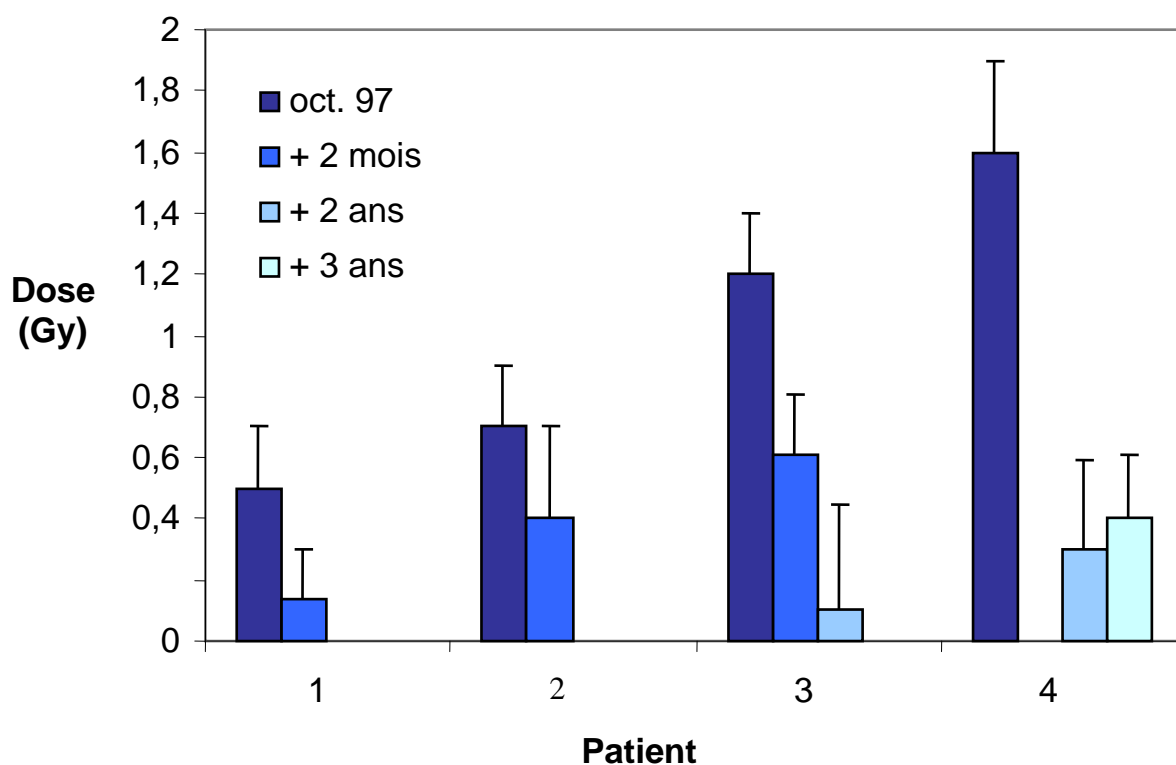


FIG. 33. Évolution de la dose estimée par analyse des dicentriques au cours du temps après une irradiation.

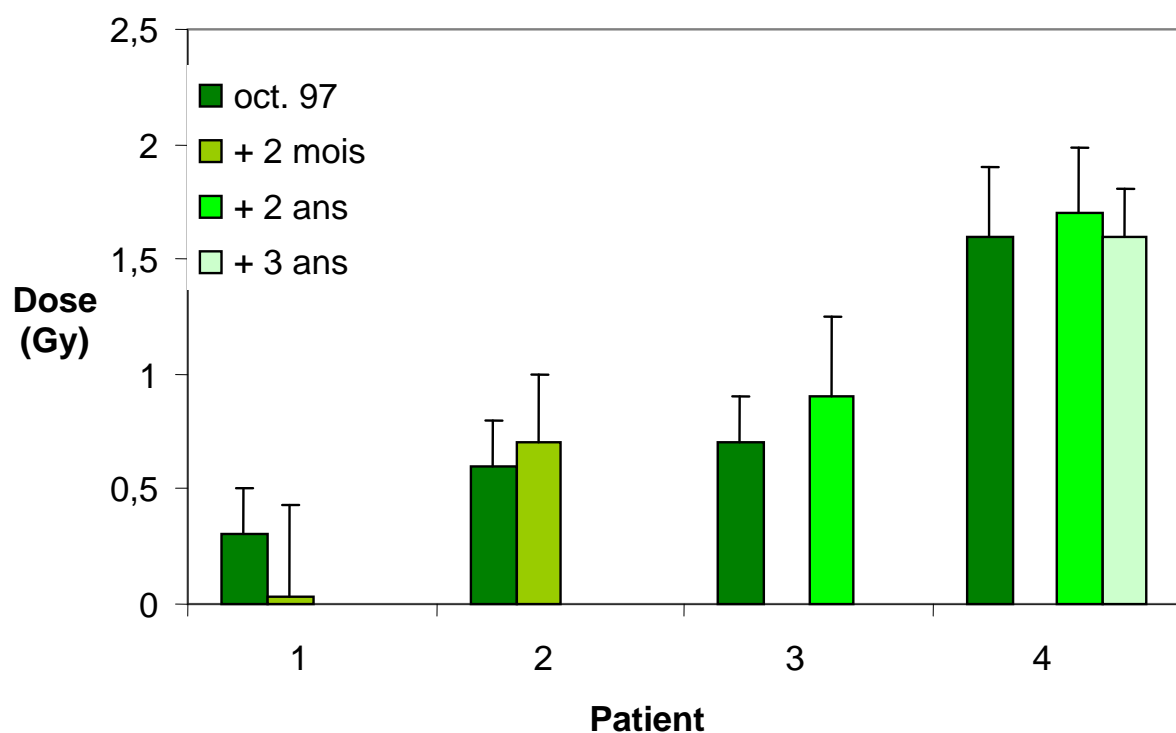


FIG. 34. Évolution temporelle de la dose estimée par comptage des translocations réciproques après une irradiation.

Conformément aux prévisions, on a observé une baisse de la fréquence des dicentriques au cours du temps chez tous les patients. En revanche, on n'a observé aucune diminution de la fréquence des translocations réciproques chez trois des quatre patients. Chez la personne 1, la fréquence des translocations a diminué deux mois après le premier prélèvement sanguin mais, compte tenu des incertitudes, cette baisse n'était pas statistiquement significative. La stabilité générale de la fréquence des translocations observée par la suite s'explique probablement par le renouvellement rapide des lymphocytes résultant de leur lymphopénie et par l'élimination rapide des aberrations instables. Les résultats ultérieurs obtenus par la méthode FISH correspondent peut-être à la dose reçue par les cellules souches de la moelle osseuse.

11. CONDENSATION PRÉMATURÉE DES CHROMOSOMES (PCC)

En général, on estime des doses par des moyens biologiques en analysant les dicentriques et/ou les translocations lors de la première mitose à la suite d'une transformation lymphoblastique provoquée *in vitro* par de la PHA. Ces méthodes présentent plusieurs inconvénients bien connus, à savoir le retard de mitose et la mort des cellules radio-induits qui ont lieu durant les deux jours de culture, surtout quand la dose reçue est élevée, et qui peuvent entraîner une notable sous-évaluation de cette dose [250]. La présente section décrit les techniques qui permettent d'induire une condensation prématurée des chromosomes, c'est-à-dire avant la première mitose, afin de réduire la durée de culture ou de supprimer celle-ci et ainsi d'empêcher l'apparition d'un retard de mitose ou la mort de cellules.

11.1. PCC PAR FUSION EN MITOSE

Le fait d'induire une PCC en fusionnant des lymphocytes humains avec des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) en mitose en présence d'un agent de fusion, le polyéthylène glycol (PEG), permet de compter les aberrations chromosomiques tout de suite après une irradiation sans avoir besoin d'une stimulation mitogénique ni d'une mise en culture [66]. Le recours à cette technique de PCC, associée à des méthodes classiques comme le marquage en bandes C ou une méthode FISH mise en œuvre en se servant de banques d'ADN spécifiques à certains chromosomes, avec ou sans sonde centromérique, permet de détecter les cassures, les dicentriques et les anneaux, ainsi que les translocations. Cette technique a été proposée comme outil de dosimétrie biologique par analyse de la fréquence des aberrations chromosomiques, c'est-à-dire des cassures, des dicentriques et des translocations excédentaires [67, 72, 75, 250]. Cette méthode est utile en cas d'exposition à faible dose ou si une dose aiguë et élevée qui met en danger la personne irradiée, que le TLE du rayonnement soit faible ou élevé, a été reçue. En outre, elle permet de distinguer précisément les expositions corps entier des expositions partielles [75]. Étant donné que, lorsque l'on utilise cette technique, le nombre de cellules normales reflète plus fidèlement la proportion de lymphocytes non irradiés, elle est efficace pour détecter un petit pourcentage de cellules épargnées (même de 5 %). Elle permet aussi de mieux évaluer les petites brûlures localisées qui résultent d'expositions partielles.

11.1.1. Culture des cellules et conditions de fusion cellulaire

11.1.1.1. Utilisation de cellules CHO en mitose

Il convient de préparer des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) en mitose avant de réaliser une analyse par PCC. Les mises en culture de cellules CHO sont généralement effectuées avec des cellules vendues sur le marché. Celles-ci sont immédiatement disponibles et très faciles à manipuler. Leur cycle cellulaire est court (environ 12 heures). Les cellules CHO peuvent être cultivées dans des flacons de culture cellulaire ou roulants de 750 ml dans un milieu complet (composé de F10, de 15 % de sérum de veau nouveau-né et d'antibiotiques). Des cellules en mitose peuvent être obtenues en ajoutant du Colcemid (à une concentration finale de 0,1 µg/ml) pendant quatre à six heures une fois que les flacons sont à moitié pleins, puis en les agitant régulièrement. Les cellules mitotiques d'un flacon classique ou roulant peuvent être isolées plusieurs fois par jour. C'est pourquoi, après chaque séparation, il faut rajouter du milieu de culture frais et du Colcemid dans les flacons qui contiennent les cellules restantes. Les cellules en mitose peuvent être préparées en grande quantité à l'avance et conservées dans un congélateur à une température comprise entre -80 et -110 °C avant d'être utilisées.

11.1.1.2. Isolation des lymphocytes

En général, pour isoler les lymphocytes, il faut utiliser une colonne Ficoll-Hypaque en suivant le mode opératoire décrit à la section 9.1.5.2 ci-dessus. L'avantage de cette méthode, c'est qu'à partir du moment où suffisamment de lymphocytes ont été isolés, une partie d'entre eux peut être utilisée immédiatement et le reste congelé à une température comprise entre -80 et -120 °C pour un usage ultérieur si cela paraît nécessaire.

11.1.1.3. Agent de fusion

En général, il convient d'utiliser du polyéthylène glycol (PEG) de masse molaire 1 450 g.mol⁻¹ et la concentration souhaitable pour la fusion est comprise entre 40 et 50 % (m/v) (dans du F10 sans sérum, dans une PBS ou de préférence dans du RPMI avec de l'HEPES mais sans sérum).

11.1.1.4. Processus de fusion et de condensation des chromosomes

Pour induire une condensation prématurée des chromosomes, il convient de fusionner les lymphocytes avec des cellules CHO (dans un rapport de 5/1), lesquelles possèdent une caractéristique qui favorise la mitose en présence de PEG. Le processus de fusion ne prend que quatre minutes (une minute dans du PEG seul, puis un milieu de lavage, le F10, doit être ajouté progressivement). Il faut ensuite effectuer une incubation pendant une heure dans un milieu complet avec du Colcemid à 37 °C [67, 72, 251].

11.1.1.5. Techniques de fixation

En principe, elles sont similaires aux méthodes utilisées pour des cellules en métaphase (section 9.2) mais les durées et les concentrations optimales diffèrent légèrement. Les lymphocytes doivent être traités avec une solution hypotonique de chlorure de potassium (à 0,075 ml.l⁻¹) et maintenus dans un bain-marie préalablement chauffé (à 37 °C) pendant trois à quatre minutes et, après centrifugation, les cellules peuvent être fixées avec un mélange d'acide acétique et de méthanol (dans un rapport de 1/3).

Les lames sont préparées par une technique classique similaire à celle qui est décrite plus haut pour d'autres analyses (voir la section 9.2).

11.1.1.6. Techniques de coloration

Le choix de la technique de coloration dépend du paramètre biologique à analyser de la manière suivante :

1) Analyse classique des cassures de chromosomes

Pour analyser les cassures de chromosomes radio-induites, les lames peuvent être colorées de manière classique au Giemsa (Gurr R66 amélioré) ou à la FPG, comme exposé plus haut à la section 9.3.2 (Fig. 35) [67, 252]. Le recours à la FPG a été mis au point pour la PCC dans des cas où les deux garnitures chromosomiques fusionnées sont complètement entremêlées. Elle n'est probablement pas nécessaire pour la technique qui utilise les lymphocytes et qui est décrite ici car les deux jeux de chromosomes ont tendance à rester en deux groupes, comme le montre la figure 35, sur laquelle on peut distinguer très nettement les chromosomes humains simple brin. Un des inconvénients de la coloration à la FPG est qu'en général les chromosomes gonflent, ce qui peut nuire à un comptage précis des fragments condensés par PCC étant donné que de petits objets adjacents gonflés peuvent se toucher et apparaître comme une seule structure.



FIG. 35. PCC de chromosomes humains en phase G_0 produite par fusion en mitose. Certains fragments sont repérés par des flèches.

2) Analyse des dicentriques à l'aide d'un marquage en bandes C

Outre les cassures chromosomiques, on peut également observer les dicentriques. À cette fin, les lames doivent être prétraitées par une solution d'hydroxyde de baryum et de sel (section 9.3.3) puis colorées au Giemsa, ce qui fait apparaître la région centromérique de tous les chromosomes, de sorte qu'il est facile de distinguer les chromosomes dicentriques des chromosomes monocentriques (Fig. 36) [70, 79].

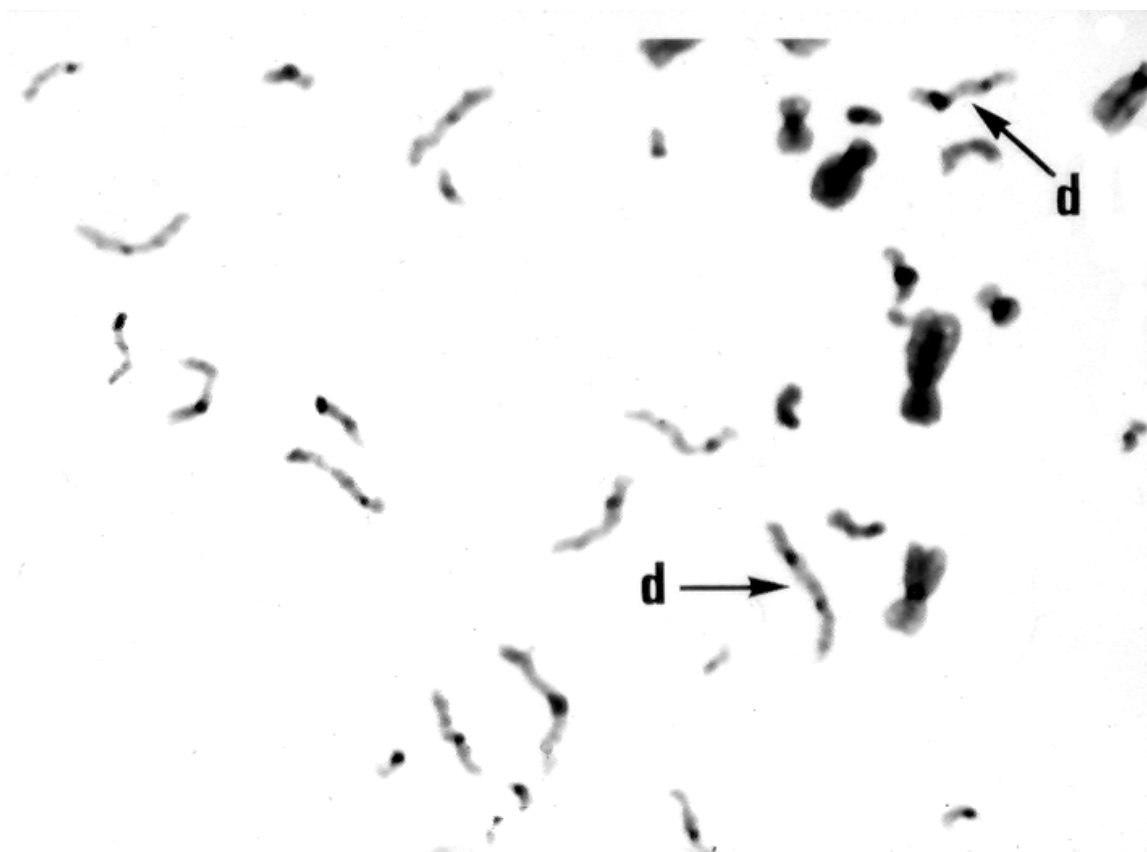


FIG. 36. Chromosomes condensés par PCC et colorés par la technique du marquage en bandes C. Deux dicentriques (d) apparaissent.

3) Analyse des translocations et des dicentriques par peinture des chromosomes

La fréquence des translocations et des dicentriques radio-induites peut également être déterminée pour des préparations ayant subi une PCC en ayant recours à la méthode FISH, soit en n'utilisant que des sondes qui permettent de peindre des chromosomes entiers, soit en les associant à des sondes centromériques (Fig. 37). Cette dernière solution permet de mieux distinguer les translocations des dicentriques [72].

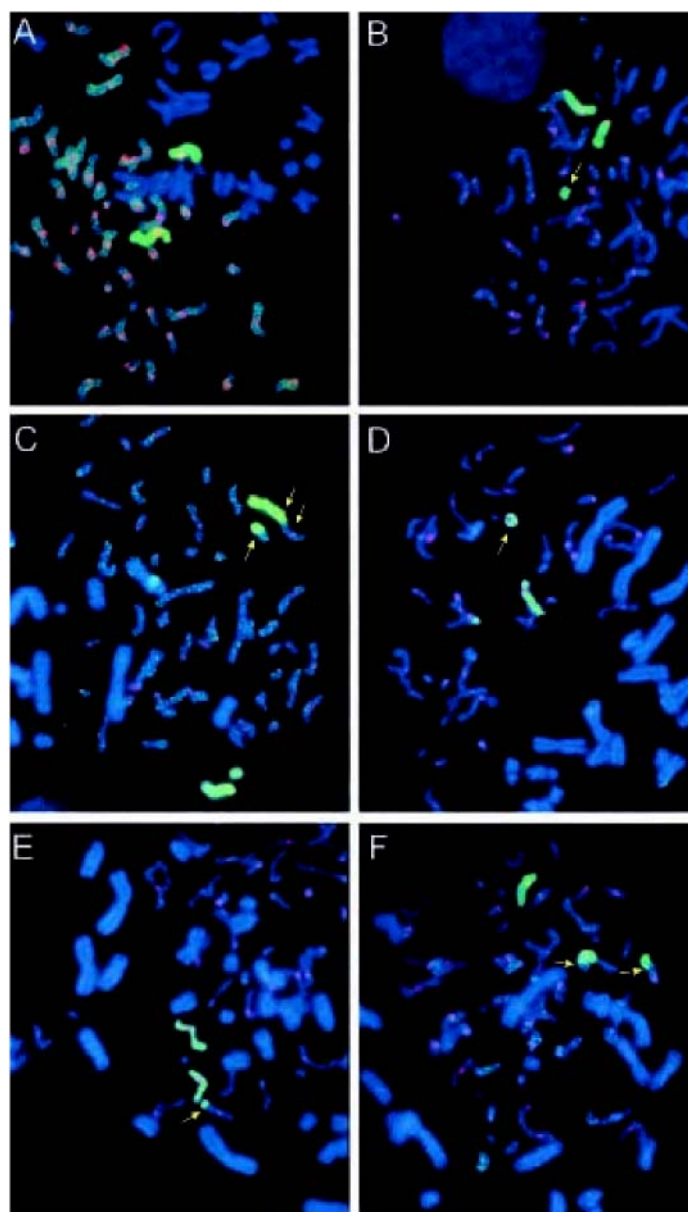


FIG. 37. PCC et méthode FISH bicolore, avec association de la peinture d'un chromosome (le 8) et d'une sonde centromérique pour l'ensemble du génome. Chez un sujet témoin non irradié (A), PCC normale. Dans des cellules irradiées, les flèches indiquent des fragments excédentaires en PCC, ace(b) (B), des dicentriques, dic (BA), et des fragments bicolores, ace(ba) (C), des anneaux, r(B) (D), et des translocations non réciproques, t(BA) et t(AB), (E), (F) [8].

11.1.2. Analyse

Les méthodes d'analyse des lames sont en partie similaires à celles qui sont décrites dans la section 9.4 (c'est-à-dire le fait d'associer un code à chaque lame, les paramètres d'observation, etc.). Les étalements de cellules qui ont subi une PCC peuvent être repérés manuellement ou à l'aide d'un détecteur automatique de cellules en métaphase, appareil plus fréquemment utilisé (voir la section 13.3) [75]. Il est conseillé de faciliter l'examen en se servant d'un dispositif d'enregistrement qui permet de marquer chaque pièce chromosomique sur un dessin ou une image de l'étalement. On peut utiliser un accessoire de microscope (la chambre claire) pour observer les étalements à une échelle beaucoup plus grande et pour noter les marques sur un dessin. Certains détecteurs automatiques de cellules en métaphase sont

équipés d'applications spécifiques qui permettent d'annoter les images numérisées. Il convient de relever les coordonnées des étalements sur la lame par rapport à la platine du microscope. Par ailleurs, la méthode de sélection des étalements potentiels à des fins d'analyse ne doit pas introduire de biais qui fausserait le calcul de la fréquence des aberrations.

L'analyse comprend le comptage du nombre de pièces chromosomiques qui apparaissent sous forme de chromatides uniques et qui peuvent facilement être distinguées des chromosomes mitotiques CHO dans un étalement en interphase qui a subi une PCC après une coloration au Giemsa. Lorsque l'on a recours à la FPG, les chromosomes humains apparaissent d'une couleur sombre tandis que les cellules CHO, qui ont été cultivées pendant plus de deux cycles cellulaires dans un milieu auquel on a ajouté de la BrdU, présentent l'effet arlequin et apparaissent très légèrement colorées (cf. figure 22). Lorsque l'on utilise la méthode FISH, on peut utiliser de l'ADN cot-1 de hamster afin de masquer tous les signaux émis par les chromosomes CHO de sorte que seuls les chromosomes humains qui ont subi une PCC soient mis en évidence (Fig. 37).

11.1.3. Critères d'examen

L'aspect des chromosomes qui ont subi une PCC peut être utilisé afin d'établir facilement la position des lymphocytes dans le cycle cellulaire au moment de leur traitement. Les chromosomes des cellules qui se trouvent en phase G₁, S et G₂ apparaissent respectivement sous forme de chromatide unique, de chromosomes pulvérisés et de deux chromatides. En dosimétrie biologique, avec des préparations colorées au Giemsa, on n'examine que les étalements qui comprennent une seule chromatide, c'est-à-dire les lymphocytes qui ont été traités en phase G₀ ou G₁, et chaque élément représente un seul chromosome humain (Fig. 35).

Par conséquent, pour un lymphocyte non irradié, on dénombre 46 pièces. Pour les échantillons exposés, on note le nombre de pièces chromosomiques et on estime la fréquence induite en lui soustrayant la valeur obtenue pour des échantillons non traités. Pour les cas où l'on soupçonne qu'une exposition partielle a eu lieu, une autre méthode d'analyse, la Qpcc, qui consiste à évaluer la fréquence des fragments excédentaires qui ont subi une PCC dans les cellules lésées (qui contiennent de tels fragments excédentaires) a été mise au point [75]. Le principe est le même que pour la méthode du Qdr élaborée par Sasaki et Miyata [142] (voir la section 9.7.4.3). À la suite d'un marquage en bandes C ou du recours à la méthode FISH en utilisant une sonde centromérique et des banques d'ADN propres à certains chromosomes, on peut rechercher la présence de dicentriques et/ou de translocations sur les lames (voir la figure 37), puis les enregistrer et les analyser comme indiqué aux sections 9.4 et 10.4.

11.2. PCC CHIMIO-INDUITE

11.2.1. Test rapide sur des chromosomes interphasiques (RICA)

Ce test permet lui aussi de se dispenser d'une longue culture de cellules. On place des lymphocytes isolés du sang par une colonne Ficoll-Hypaque (voir la section 9.1.5.2) dans un milieu de culture contenant un inhibiteur de phosphatases comme l'acide okadaïque ou la calyculine A, de l'adénosine triphosphate et de la kinase p34^{cdc2}/cycline B et on les incube à 37 °C pendant seulement trois heures. Le protocole complet a été décrit par Prasanna *et al.* [76]. La fixation et la préparation des étalements (solution hypotonique de chlorure de potassium, méthanol et acide acétique dans un rapport 3/1 et gouttes déposées sur des lames nettoyées) se font de la même manière que pour des cellules en métaphase.

Les lésions radio-induites sont alors analysées au microscope à fluorescence après hybridation *in situ* et peinture chromosomique (Fig. 38).

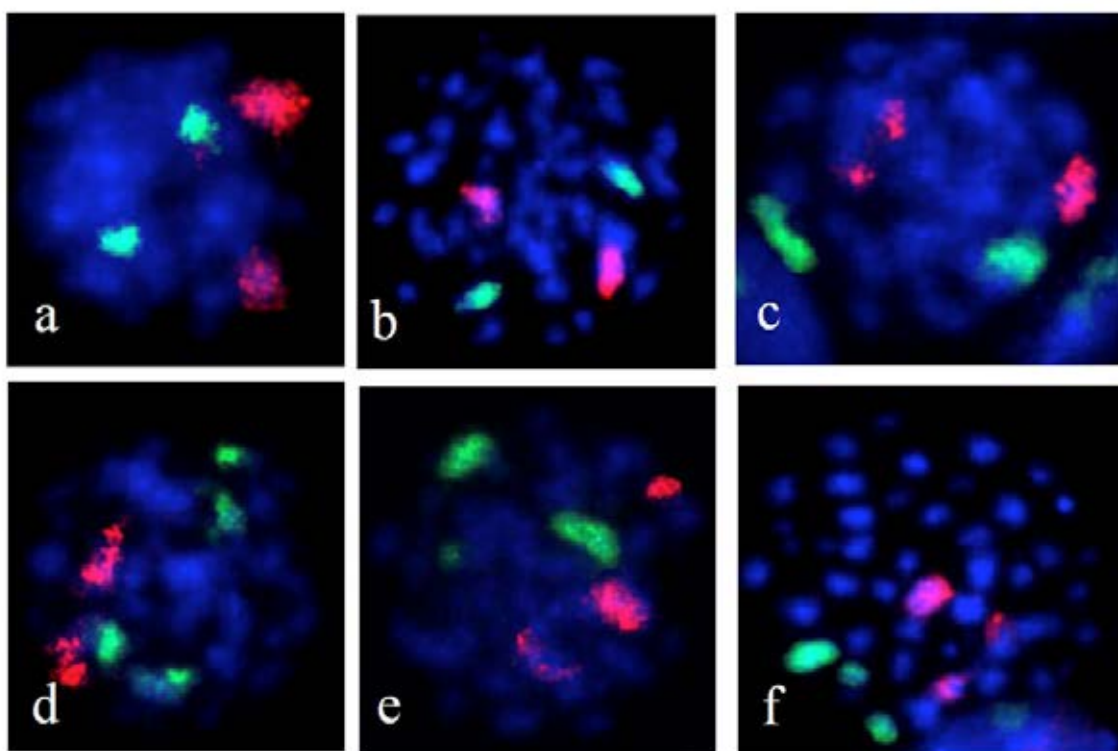


FIG. 38. Photomicrographies montrant les chromosomes humains 1 (rouge) et 2 (vert) peints par la méthode FISH sur des lymphocytes en interphase irradiés par des rayons gamma émis par une source de cobalt 60 et auxquels on a appliqué le test RICA [78]. On observe des cellules normales qui forment deux taches rouges et deux taches vertes (a et b), un chromosome 1 aberrant qui forme plus de deux taches rouges (c), un chromosome 2 aberrant qui forme plus de deux taches vertes (d) et des cellules qui forment plus de deux taches vertes et deux taches rouges (e et f) (reproduit avec l'aimable autorisation de Pathak et Prasanna, AFRRRI, États-Unis).

Les cellules normales présentent deux taches fluorescentes par chromosome tandis que les cellules qui comportent des aberrations structurales (cassures et échanges) faisant intervenir le ou les chromosomes peints peuvent faire apparaître plus de deux taches. En dosimétrie biologique, on peut se contenter d'une seule grande sonde chromosomique [76]. Toutefois, le fait d'utiliser plus d'une sonde chromosomique améliore la sensibilité du test [78].

11.2.2. Analyse des anneaux après PCC

En biologie dosimétrique, une des applications simples et utiles des PCC chimio-induites est le comptage des anneaux sur des chromosomes colorés au Giemsa. Cette technique impose tout de même de cultiver les lymphocytes et pour cette méthode, décrite par Kanda *et al.* [68], il est recommandé de cultiver les cellules pendant 48 heures. Elle ne permet donc pas de gagner de temps mais elle s'applique particulièrement bien aux fortes surexpositions pour lesquelles l'effet de la dose mesurée par le test classique des dicentriques présente des signes de saturation. Elle a été étalonnée et utilisée pour des doses pouvant aller jusqu'à 20 grays équivalents en rayons X. À de telles doses, le nombre de dicentriques et de fragments induits est beaucoup trop élevé pour que l'on puisse les compter de manière fiable. En revanche, dans les lymphocytes, les anneaux sont formés à une fréquence beaucoup plus faible, environ 10 %

de celle des dicentriques, ce qui fait que le comptage des anneaux constitue un paramètre exploitable si une personne reçoit une dose très élevée.

11.2.2.1. Culture des cellules, traitement chimique et préparation des lames

Ceux-ci sont décrits pas à pas dans un protocole détaillé dans l'annexe III.

Préparation des substances chimiques

Il convient de préparer des inhibiteurs de la phosphorylation de l'ADN, comme l'acide okadaïque ou la calyculine A. Ces substances chimiques sont cancérigènes et doivent donc être manipulées en respectant les règles de sécurité qui s'imposent. La calyculine A peut provoquer une PCC de manière environ 20 fois plus efficace que l'acide okadaïque, même si leurs mécanismes d'induction de la PCC sont probablement similaires à en juger par la relation à la dose et par la morphologie chromosomique qui en résulte. L'acide okadaïque ou la calyculine A est dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), dilué dans un milieu et conservé à -20 °C comme solution mère (exemple de quantité : 5 à 10 µM).

Culture

Chez les lymphocytes, pour pouvoir induire une PCC par des moyens chimiques, il faut en général que les cellules suivent le cycle cellulaire. C'est pourquoi il convient de les stimuler avec de la PHA et de les cultiver pendant 48 heures en ayant recours à une méthode similaire à celle qui est décrite à la section 9.1 pour obtenir des cellules en métaphase. Même si la PCC peut être induite sur des cultures de sang total, des lymphocytes isolés aboutissent à des préparations plus propres qui contiennent un grand nombre de cellules (la séparation des lymphocytes est décrite à la section 9.1.5.2). Il est donc fortement recommandé d'isoler les lymphocytes, surtout en cas d'exposition à une dose très élevée.

Le protocole classique pour induire une PCC consiste à ajouter de l'acide okadaïque (500 nM) ou de la calyculine A (20–50 nM) aux cellules durant la dernière heure de culture, ce qui provoque la formation d'un mélange de cellules ayant toutes subi une PCC et qui se trouvent aux différentes étapes du premier cycle cellulaire. Toutefois, l'efficacité des substances chimiques peut varier en fonction des conditions de culture et de leur qualité. Chaque laboratoire doit déterminer la concentration et la durée de traitement optimales en évaluant la fréquence des cellules qui présentent une PCC et la qualité morphologique des chromosomes. Si le traitement est insuffisant, il n'y a pas assez de cellules à analyser tandis qu'un traitement excessif provoque la formation de chromosomes pelucheux et trop condensés. Les méthodes de fixation, de préparation des lames et de coloration au Giemsa sont similaires à celles qui sont appliquées pour les cellules en métaphase.

11.2.2.2. Critères d'analyse

Dans des lymphocytes fortement irradiés qui ont été cultivés pendant 48 heures, la plupart des cellules analysables se trouvent entre la fin de la phase G₂ et la métaphase. En cas d'exposition à une dose faible, certaines cellules peuvent être en anaphase. Si on les compare aux anneaux visibles sur des étalements métaphasiques (Fig. 11), les anneaux qui ont subi une PCC et qui sont présents dans des cellules qui se trouvent en fin de phase G₂ ou en anaphase (Fig. 39A) sont étroits, ce qui facilite leur reconnaissance. C'est donc ce type de cellule que l'on privilégie pour compter les anneaux qui ont subi une PCC. Les cellules qui se trouvent en fin de phase G₂ ou en anaphase se distinguent respectivement par la présence de chromatides sœurs jointes ou séparées (Fig. 39B).



FIG. 39. Exemples de PCC induite par de l'acide okadaïque sur des lymphocytes irradiés à différentes phases du cycle cellulaire. (A) PCC induite sur des cellules en fin de phase G₂. (B) Cellule en anaphase pour laquelle une PCC a été provoquée, les chromatides sœurs apparaissent séparées. Les flèches indiquent la présence d'anneaux [68].

Le fait que la cellule se trouve en fin de phase G₂ ou en anaphase n'entraîne pas de différence significative sur la fréquence des anneaux dans les cellules qui ont subi une PCC, ces valeurs peuvent donc être agrégées.

Un chromosome de forme circulaire est noté comme anneau ayant subi une PCC. Dans les cellules de ce type qui ont uniquement été colorées au Giemsa, les centromères n'apparaissent pas nettement, c'est pourquoi on ne classe pas les anneaux observés en anneaux centriques ou en anneaux acentriques.

Comme pour les dicentriques (section 9.7.4.3), la comparaison de la répartition intercellulaire des anneaux ayant subi une PCC avec une distribution de Poisson donne des renseignements sur l'uniformité de l'exposition, en cas de rayonnement de faible TLE, ou sur la qualité du rayonnement responsable de l'accident. Dans les situations où il s'écoule un certain temps entre l'irradiation et le prélèvement sanguin, par exemple quand une surexposition est découverte tardivement, il devrait être possible de se servir du calcul de la demi-vie pour ajuster la fréquence des anneaux observée et ainsi obtenir une estimation de leur fréquence initiale. À l'heure actuelle, il existe encore peu de données solides qui permettent d'étayer cette hypothèse. Toutefois, l'étude de suivi cytogénétique menée sur un des survivants de l'accident de Tōkai-Mura a fait état d'une demi-vie d'environ 8,7 mois [253].

11.3. ACCIDENT RADIOLOGIQUE ÉTUDIÉ EN ESTIMANT LA FRÉQUENCE DES ANNEAUX APRÈS UNE PCC

Peu après que la technique de comptage des anneaux après induction d'une PCC, technique étalonnée *in vitro* avec des rayons X de 200 kV, a été publiée [68], l'occasion d'étudier un grave accident radiologique en appliquant cette méthode, la PCC étant provoquée par de l'acide okadaïque, s'est présentée : trois victimes gravement irradiées de l'accident de criticité de Tōkai-Mura survenu au Japon en 1999 ont subi des tests de dosimétrie biologique [254].

La fréquence des anneaux après induction d'une PCC pour cent cellules dans des échantillons prélevés neuf heures après l'accident s'élevait à 150, 77 et 24, chiffres qui ont conduit respectivement à des estimations de dose supérieure à 20, de 7,4 (IC à 95 % : 6,5–8,2) et de 2,3 (IC à 95 % : 1,8–2,8) grays équivalents. Il ne faut pas perdre de vue que ces personnes ont été exposées à un mélange de rayonnement gamma et de rayonnement neutronique et que la dose équivalente mesurée en sieverts (section 2) n'est pas pertinente à des doses si élevées car elle repose sur les risques estimés d'effets stochastiques à faible dose. Pour caractériser une exposition à une dose élevée, une dose à l'organe pondérée par l'EBR a été spécialement définie à partir de la dose absorbée à l'organe et de l'EBR afin d'estimer quand débuteraient les effets déterministes d'une telle irradiation sur la santé [15]. L'EBR de rayons X de 200 kV est fixé à 1. L'unité de la dose pondérée par l'EBR est le J.kg^{-1} et est appelé gray équivalent (Gy Eq) dans la référence [15]. Pour la personne la plus fortement irradiée, il a seulement été possible d'estimer que la dose était supérieure à 20 Gy Eq car l'étalonnage réalisé *in vitro* qui avait été publié [68] montrait une saturation de la courbe dose-effet de forme linéaire quadratique pour une dose à l'organisme pondérée par l'EBR approchant 20 Gy Eq à des rayons X de 200 kV (ou une dose absorbée par l'organisme de 20 grays étant donné que l'EBR était égale à 1).

En parallèle, on a effectué une analyse classique des dicentriques et des anneaux (dic+rc) en métaphase à partir des échantillons de sang. Comme les doses reçues étaient très élevées, ce qui avait eu pour conséquence une chute rapide du nombre de lymphocytes périphériques, les cellules ont été cultivées par une méthode qui permet de maximiser la probabilité d'obtenir des cellules en métaphase [123]. Elle consiste à concentrer les lymphocytes à l'aide d'une colonne Ficoll-Hypaque et est similaire à celle qui est décrite dans la section 9.1.5.2. Pour le patient le plus gravement irradié, elle a permis de dénombrer 715 dicentriques et 188 anneaux centriques ou acentriques dans 78 cellules, toutes les cellules en métaphase ayant subi des lésions. Pour les deux autres personnes, elle a abouti respectivement à 479 dicentriques et 55 anneaux dans 175 cellules et à 191 dicentriques et anneaux centriques dans 300 cellules. Le tableau 14, extrait de la référence [255], synthétise les estimations de dose obtenues par des méthodes cytogénétiques ainsi que par des mesures physiques effectuées grâce à une analyse par activation du sodium.

TABLEAU 14. COMPARAISON ENTRE LES DOSES ESTIMÉES PAR DIVERS INDICATEURS

Patient	Dose à l'organisme pondérée par l'EBR (Gy Eq) ^a estimée			
	Anneaux (PCC)	Dic	Dic+R/Rc	²⁴ Na ^b
A	> 20	22,6	24,5	17–24
B	7,4 (6,5–8,2)	8,3	8,3	8,7–13
C	2,3 (1,8–2,8)	-	3,0 (2,8–3,2)	2,5–3,6

^a L'EBR est fixée à 1 pour les rayons X (patients A et B) ou gamma (patient C).

^b Ishigure *et al.* [255], où l'évaluation de l'EBR des neutrons est comprise entre 1,5 et 2,0.

12. ANALYSE DES MICRONOYAUX PAR BLOCAGE DE LA CYTOKINÈSE (CBMN)

12.1. GÉNÉRALITÉS

Les rayonnements ionisants induisent la formation de fragments chromosomiques acentriques et, de manière limitée, une mauvaise séparation de chromosomes entiers. Les fragments chromosomiques acentriques et les chromosomes entiers qui ne peuvent interagir avec le fuseau sont en retard lors de l'anaphase et, par conséquent, ne font pas partie du noyau principal des cellules filles. Un fragment chromosomique ou un chromosome entier en retard se transforme en petit noyau distinct, d'où le terme de micronoyau.

C'est Countryman et Heddle [82] qui ont présenté pour la première fois une analyse des micronoyaux dans les lymphocytes du sang périphérique grâce à une mise en évidence de micronoyaux dans des cellules cultivées sur une courte durée. Néanmoins, lors de cette première expérience, on n'a pas cherché à déterminer si les cellules analysées avaient réellement effectué une division cellulaire *in vitro*, ce qui rendait le test peu fiable car, dans une cellule, les lésions chromosomiques ne peuvent donner lieu à des micronoyaux que si la cellule se divise. Par la suite, une technique plus fiable, basée sur l'utilisation d'un inhibiteur de la cytokinèse, la cytochalasine B, a été développée. À l'aide de la cytochalasine B, Fenech et Morley, en 1985 [83, 84], ont pu montrer que des cellules qui avaient subi une division nucléaire complète pouvaient s'accumuler et apparaître comme des cellules binucléées. Il était alors possible de compter spécifiquement et efficacement les micronoyaux dans ces cellules binucléées tout en excluant les cellules mononucléaires qui ne se divisaient pas et ne pouvaient provoquer l'apparition de micronoyaux *in vitro* (Fig. 19). De ce fait, les différences entre individus et entre expériences concernant la fréquence des cellules qui se divisent, facteur dont il a été démontré qu'il avait une incidence profonde sur la fréquence des micronoyaux observée [84, 256, 258], n'ont pas d'incidence sur les résultats obtenus avec ce test. L'analyse des micronoyaux par blocage de la cytokinèse (CBMN) qui en a résulté est depuis devenue la méthode classique de comptage des micronoyaux dans des lymphocytes cultivés.

Les lymphocytes collectés dans un échantillon de sang sont eux-mêmes le résultat de divisions cellulaires qui se sont produites *in vitro*. On pourrait donc s'attendre à ce que certains contiennent déjà des micronoyaux. Il a ainsi été établi que le comptage des micronoyaux présents dans des lymphocytes mononucléaires d'étalements sanguins classiques pouvait être particulièrement utile pour surveiller les lésions génétiques dans les populations exposées de manière chronique [259–263]. De plus, le comptage des micronoyaux dans les cellules mononucléaires pourrait également servir de paramètre complémentaire intéressant pour le test CBMN [262, 263].

Dans les années 1990, des chercheurs ont mis au point le test CBMN-centromères, test qui a recours à la méthode FISH et à une sonde centromérique pour faire apparaître les centromères. Cette technique permet de distinguer les micronoyaux qui contiennent des fragments acentriques de ceux qui contiennent des chromosomes entiers [69, 85, 263–267]. Cette méthode permet d'accroître nettement la sensibilité du test CBMN à faible dose [85, 266, 267] (voir la section 12.4.2).

Plus récemment, une version plus complète du test CBMN appelée test cellulaire des micronoyaux par blocage de la cytokinèse (CBMN Cyt) a été mise au point et validée [86]. En plus des micronoyaux présents dans les cellules binucléées et mononucléaires, l'analyse porte sur les ponts nucléoplasmiques (PN, Fig. 19C) et sur les bourgeons nucléaires dans les cellules binucléées, qui sont respectivement des biomarqueurs des chromosomes dicentriques [89] et de l'amplification génique [86]. En outre, dans le test CBMN Cyt, on calcule les proportions respectives des cellules mononucléaires, binucléées et multinucléées ainsi que des

cellules nécrotiques et apoptotiques, ce qui permet d'obtenir des mesures de la prolifération cellulaire et de la mort des cellules, mesures qui peuvent également être instructives en dosimétrie biologique [88, 268].

Il est également possible de compter les micronoyaux dans les érythrocytes, micronoyaux qui constituent un biomarqueur des lésions chromosomiques, mais il convient de souligner que la limite supérieure de détection par cette méthode est de un gray et que les échantillons doivent être prélevés dès que possible après une exposition en raison de l'inhibition de l'érythropoïèse. Récemment, le test des micronoyaux par cytométrie en flux sur des érythrocytes immatures de souris a été adapté chez l'homme, en limitant le comptage des micronoyaux aux réticulocytes qui portent des récepteurs de la transferrine (Tf-Ret ; CD71) [269]. Une évaluation de l'analyse des réticulocytes chez des patients traités au radio-iode pour des cancers de la thyroïde montre que cette méthode peut être utile pour suivre des personnes dont on soupçonne qu'elles ont été exposées accidentellement à des rayonnements [270, 271].

12.2. CULTURE DES LYMPHOCYTES POUR LE TEST CBMN

La méthode de culture des lymphocytes est similaire à celle qui est décrite à la section 9.1 pour obtenir des cellules en métaphase. Néanmoins, elle présente les différences importantes suivantes : i) la Cyt B est ajoutée aux cultures au bout de 24 ou 44 heures (en dosimétrie biologique, il est préférable d'attendre 24 heures afin de s'assurer que seules les cellules qui ont subi une première division seront analysées) ; ii) la bromodésoxyuridine et le Colcemid ne sont pas utilisés ; iii) la durée de culture est portée à 72 heures et le traitement hypotonique, la fixation et la centrifugation sont modifiées afin que le cytoplasme des cellules soit préservé et ainsi que les cellules binucléées soient faciles à reconnaître. Les préparations sont colorées soit classiquement au Giemsa pour une observation au microscope optique soit avec un colorant fluorescent comme l'orangé d'acridine pour une observation au microscope à fluorescence. Les préparations peuvent également subir des traitements complémentaires pour faire apparaître les centromères en appliquant la méthode FISH et en se servant d'une sonde centromérique. Des protocoles détaillés du test CBMN figurent en annexe IV.

12.3. CRITÈRES D'ANALYSE POUR LE TEST CBMN

Des critères d'analyse détaillés pour tous les biomarqueurs du test CBMN Cyt ont été publiés [86]. Ne figurent dans la présente section que les critères de sélection pour le comptage des micronoyaux et des PN dans les cellules binucléées car il s'agit des biomarqueurs qui ont été les mieux validés en dosimétrie biologique.

12.3.1. Critères de sélection des cellules binucléées qui peuvent être examinées afin de mesurer la fréquence des micronoyaux

Les cellules dont la cytokinèse a été bloquée et qui peuvent être examinées afin de mesurer la fréquence des micronoyaux doivent avoir les caractéristiques suivantes (Fig. 19) :

- a) Elles doivent être binucléées.
- b) La membrane nucléaire des deux noyaux d'une cellule binucléée doit être intacte et ces deux noyaux doivent se trouver dans le même espace cytoplasmique.
- c) La taille, le marquage et l'intensité de la coloration doivent être à peu près les mêmes pour les deux noyaux d'une cellule binucléée.
- d) Les deux noyaux d'une cellule binucléée peuvent être disjoints ou reliés par un ou plusieurs ponts nucléoplasmiques étroits et dont la largeur n'excède pas 1/4 du diamètre du noyau.

- e) Les deux noyaux d'une cellule binucléée peuvent se toucher mais, dans l'idéal, ils ne doivent pas se chevaucher. Une cellule dont les deux noyaux se chevauchent ne peut être examinée que si l'on peut distinguer les limites de chacun de ces noyaux.
- f) La membrane cytoplasmique d'une cellule binucléée doit être intacte et se distinguer nettement des limites cytoplasmiques des cellules adjacentes.

12.3.2. Critères d'examen des micronoyaux

Les micronoyaux sont, sur le plan morphologique, identiques aux noyaux principaux mais plus petits qu'eux (Fig. 19). Ils ont également les caractéristiques suivantes :

- a) Le diamètre des micronoyaux dans les lymphocytes humains varie habituellement entre 1/16 et 1/3 du diamètre moyen des noyaux principaux, ce qui correspond respectivement à 1/256 et 1/9 du volume de l'un des principaux noyaux d'une cellule binucléée.
- b) Les micronoyaux ne sont pas réfringibles et sont donc faciles à distinguer des artefacts comme les particules de colorant.
- c) Les micronoyaux ne sont pas reliés ou attachés aux noyaux principaux.
- d) Les micronoyaux peuvent se toucher mais ne doivent pas chevaucher les noyaux principaux et l'on doit pouvoir distinguer leurs limites et celles de ces noyaux.
- e) La coloration a généralement la même intensité pour les noyaux principaux et pour les micronoyaux mais est parfois plus intense pour ces derniers.

Le tableau 15 donne un exemple de feuille de résultats utilisée pour recenser les micronoyaux observés.

TABLEAU 15. FEUILLE DE RÉSULTATS UTILISÉE POUR RECENSER LES MICRONOYAUX (MN) OBSERVÉS DANS DES CULTURES DUPLIQUÉES (1 ET 2) À PARTIR D'UN MÊME ÉCHANTILLON SANGUIN

Échantillon n° :

Opérateur :

Date :

Lame n°	Répartition des micronoyaux dans les cellules binucléées							Nombre total de cellules binucléées	Nombre total de micronoyaux
	0 MN	1 MN	2 MN	3 MN	4 MN	5 MN	> 5 MN		
1								500	
2								500	
1 + 2								1 000	
Remarques :									

12.3.3. Critères d'examen des ponts nucléoplasmiques

Un pont nucléoplasmique (PN) est une structure continue qui contient de l'ADN et qui relie les deux noyaux d'une cellule binucléée. Les PN sont issus de chromosomes dicentriques (lesquels résultent d'une mauvaise réparation de cassures de l'ADN ou de fusions des télomères) pour lesquels les centromères migrent vers les pôles opposés durant l'anaphase (figures 19A et 19C). Ils ont les caractéristiques suivantes :

- La largeur d'un PN peut varier de manière considérable mais n'excède en général pas 1/4 du diamètre des noyaux au sein de la cellule.
- Les PN doivent avoir les mêmes caractéristiques de coloration que les noyaux principaux.
- À de rares occasions, il peut arriver que l'on observe plus d'un PN au sein d'une même cellule binucléée.
- Une cellule binucléée qui comporte un PN peut contenir un ou plusieurs micronoyaux.
- On peut également observer des cellules binucléées qui comportent un ou plusieurs PN mais aucun micronoyau.

Le tableau 16 donne un exemple de feuille de résultats utilisée pour recenser les PN observés.

TABLEAU 16. FEUILLE DE RÉSULTATS UTILISÉE POUR RECENSER LES PONTS NUCLÉOPLASMIQUES OBSERVÉS DANS DES CULTURES DUPLIQUÉES (1 ET 2) À PARTIR D'UN MÊME ÉCHANTILLON SANGUIN

Échantillon n° :

Opérateur :

Date :

Lame n°	Répartition des PN dans les cellules binucléées							Nombre total de cellules binucléées	Nombre total de PN
	0 PN	1 PN	2 PN	3 PN	4 PN	5 PN	> 5 PN		
1								500	
2								500	
1 + 2								1 000	
Remarques :									

Il peut être plus difficile de compter les PN dans les cellules binucléées dont les noyaux se touchent ; il est donc judicieux de préciser si les PN ont été recensés dans toutes les cellules binucléées indépendamment de la proximité des noyaux au sein d'une cellule binucléée ou s'ils ont été comptés séparément dans les cellules binucléées dans lesquels les noyaux étaient nettement distincts et dans les cellules dont les noyaux se touchaient. On ne dispose pas encore de suffisamment d'éléments concrets pour recommander de ne recenser les PN que dans les cellules binucléées dans lesquelles les noyaux ne se touchent pas.

12.4. TRAITEMENT DES DONNÉES DU TEST CBMN

12.4.1. Courbe dose-effet

Les méthodes de construction des courbes d'étalonnage dose-effet sont les mêmes que celles qui ont été décrites plus haut dans la section 8. De nombreuses études ont montré que la fréquence des micronoyaux radio-induits est fortement corrélée à la dose et à la qualité du rayonnement reçu [87, 272–275]. Comme il existe néanmoins des divergences entre laboratoires concernant le lien entre les micronoyaux et la dose en raison du recours à des protocoles, à des critères d'examen, etc. différents, comme pour les autres analyses décrites dans la présente publication, tout laboratoire qui envisage d'effectuer de la dosimétrie biologique doit établir ses propres courbes d'étalonnage dose-effet par des expériences *in vitro*. Dans l'idéal, il conviendrait de délivrer au moins huit doses différentes comprises entre 0 et 5 grays. Pour ajuster les courbes à des modèles linéaire (TLE élevé) et linéaire quadratique (TLE faible), on applique les méthodes décrites dans la section 8. La figure 40 présente un exemple typique de courbe dose-effet relative aux micronoyaux pour les rayonnements dont le TLE est faible (rayons gamma émis par une source de cobalt 60, débit de dose : 0,5 Gy/mn).

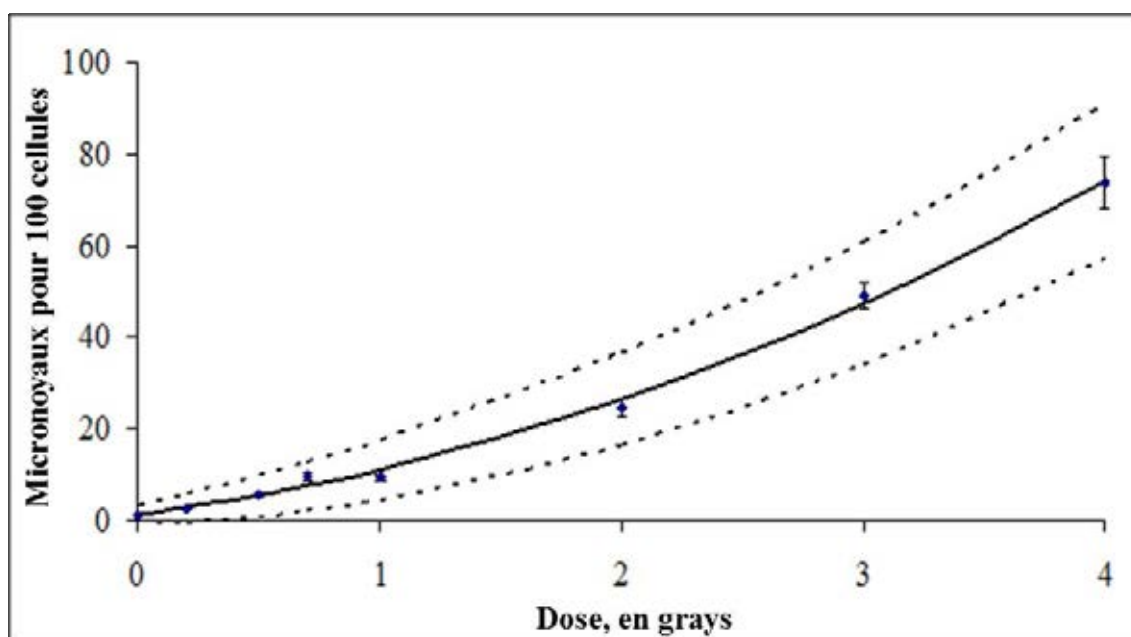


FIG. 40. Courbe dose-effet relative aux micronoyaux typique pour des rayons gamma émis par une source de cobalt 60. Courbe en trait plein : données agrégées pour 47 sujets. Courbes en pointillé : limites de confiance à 95 % inférieures et supérieures.

12.4.2. Fréquence de référence

La fréquence de référence des micronoyaux est considérée comme assez variable, des valeurs comprises entre 0 et 40 micronoyaux pour 1 000 cellules binucléées ayant été signalées [257–286]. Les deux principaux facteurs qui influent sur cette fréquence, en plus de facteurs alimentaires [276] et de l'exposition à toute une série d'agents clastogènes et aneugènes environnementaux, sont l'âge et le sexe [84, 277].

Des études de biosurveillance à grande échelle ont montré que la fréquence naturelle des micronoyaux augmentait systématiquement avec l'âge. Pour une population témoin masculine, des études sur les travailleurs d'une centrale nucléaire et d'un hôpital ont fait apparaître respectivement des hausses de 0,35 MN/1 000 cellules binucléées/an et de 0,44 MN/1 000/an. Ces chiffres sont en accord avec les résultats obtenus par l'étude à grande échelle de Fenech [108] sur les variables qui influent sur la fréquence de référence des micronoyaux : 0,31 MN/1 000/an. Pour une population témoin féminine, une augmentation plus importante de 0,58 MN/1 000/an a été constatée [279]. Cette valeur rejoint elle aussi celle qui a été calculée par Fenech [108] : 0,52 MN/1 000/an. L'examen des micronoyaux à la recherche de centromères à l'aide d'une sonde FISH centromérique (Fig. 41) a montré que l'accroissement de la fréquence naturelle des micronoyaux avec l'âge peut être attribué presque exclusivement aux micronoyaux pourvus d'un centromère, ce qui traduit une augmentation des pertes de chromosomes avec l'âge [266, 279, 280].

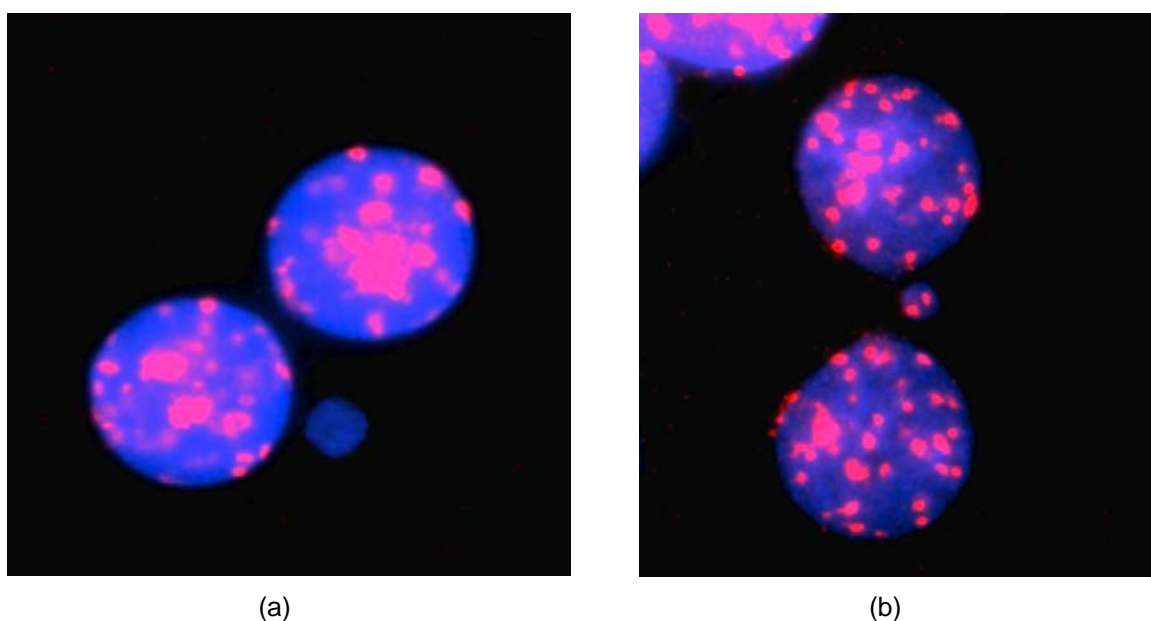


FIG. 41. Cellules binucléées qui présentent un micronoyau dépourvu de centromère (a) et un micronoyau comprenant un centromère (b). Les centromères ont été colorés à l'aide d'une sonde centromérique (spectre orangé) et les noyaux et micronoyaux ont été contre-colorés au DAPI.

Le chromosome X est presque entièrement responsable de ces pertes de chromosomes qui se produisent spontanément [281, 282]. Cela explique les différences entre les sexes pour la fréquence naturelle des micronoyaux : pour des populations dont l'âge moyen respectif était de 41,4 et 41,8 ans, la fréquence naturelle moyenne des micronoyaux était de 16,4 pour 1 000 cellules binucléées chez les hommes et de 23,5 chez les femmes. En revanche, pour les micronoyaux dépourvus de centromères, l'écart n'est pas significatif : 6,7 contre 7,7 [279].

Cette variabilité naturelle limite évidemment l'utilisation des micronoyaux comme dosimètre biologique à faible dose lorsque la fréquence naturelle de ces aberrations pour un individu n'est pas connue. Les estimations qui ont été effectuées laissent supposer que le test CBMN, dans sa forme de base, ne peut détecter des expositions *in vivo* que si les doses reçues sont supérieures à 0,2–0,3 gray pour des rayons X [87, 266, 283].

Comme il a été montré que la plupart des micronoyaux radio-induits sont principalement issus de fragments acentriques alors que les micronoyaux spontanés contiennent surtout des chromosomes entiers [85, 264–267], le test CBMN-centromères accroît notablement la sensibilité du test CBMN à faible dose [85, 266]. Dans les études [85, 266] qui utilisaient une sonde centromérique, la majorité des micronoyaux spontanés contenaient un centromère (respectivement 73 et 71 %) tandis que la plupart des micronoyaux radio-induits en étaient dépourvus. Le nombre de micronoyaux contenant un centromère n'augmentait que très légèrement avec la dose (respectivement de 3,7 et 5,3 par gray pour 1 000 cellules binucléées). En comptant à la main les micronoyaux pourvus de centromères dans 2 000 cellules binucléées, on peut atteindre une limite de détection de 0,1 gray pour une limite de confiance à 95 % [266, 267].

12.4.3. Indice de division nucléaire (IDN)

Lorsque l'on examine des préparations de lymphocytes qui ont subi un blocage de la cytokinèse, on observe des cellules qui comportent 1, 2, 3, etc. noyaux principaux. Les fréquences relatives de ces cellules peuvent servir à déterminer la progression dans le cycle cellulaire des lymphocytes après la stimulation mitogénique.

Cette progression peut être mesurée à l'aide d'un indice appelé IDN [284]. Cet indice n'est pas à lui seul suffisamment complet pour pouvoir servir directement de dosimètre biologique. Néanmoins, ce test est fréquemment utilisé car il est efficace pour comprendre la cinétique du cycle cellulaire dans des cellules en culture. Il indique des perturbations qui peuvent avoir été provoquées par une exposition à un mutagène, par exemple un rayonnement. Les données proviennent directement du test CBMN, sans travail supplémentaire à fournir par le laboratoire. Cette méthode figure donc dans la présente publication.

12.4.3.1. Critères d'examen des cellules mononucléaires, binucléées et multinucléées viables

Ces cellules doivent avoir les caractéristiques suivantes :

- Les cellules mononucléaires, bi- et multinucléées doivent être viables. Leur cytoplasme doit être intact et la morphologie de leur noyau doit être normale. Le nombre de noyaux qu'elles contiennent doit être respectivement de un, deux et trois ou plus.
- Elles peuvent contenir ou non un ou plusieurs micronoyaux ou bourgeons nucléaires et les cellules bi- ou multinucléées peuvent contenir ou non un ou plusieurs PN.

Les cellules nécrotiques et apoptotiques ne doivent pas faire partie des cellules viables examinées.

En de rares occasions, il arrive que l'on observe des cellules multinucléées qui comportent plus de quatre noyaux lorsque le cycle cellulaire est anormalement court ou lorsque la durée de blocage de la cytokinèse est trop longue.

12.4.3.2. Calcul de l'IDN

Cinq cents cellules viables sont examinées afin de déterminer la fréquence des cellules qui comportent 1, 2, 3 ou 4 noyaux et l'IDN est calculé à l'aide de la formule (36) :

$$IDN = \frac{M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4}{N} \quad (36)$$

où :

M_1 à M_4 représentent le nombre de cellules pourvues de un à quatre noyaux et N est le nombre total de cellules viables examinées.

Les méthodes publiées qui permettent de calculer l'IDN [284] ne se sont pas intéressées à son incertitude. Qui plus est, il ne semble pas qu'une démarche permettant de déterminer cette incertitude ait été publiée ultérieurement. Une telle méthode est donc décrite ici et, en raison de sa complexité, on en trouvera un exemple chiffré détaillé dans l'annexe IV-4.

Comme les valeurs M_1 à M_4 sont corrélées, l'incertitude associée à l'IDN ne peut pas être calculée en se servant de l'erreur type. Il faut plutôt se servir de la covariance, laquelle mesure la manière dont les variables dépendent les unes des autres. On peut considérer que les valeurs M_1 à M_4 , dans la formule de calcul de l'IDN, forment une distribution multinomiale, ce qui signifie qu'il y a un nombre fixe (trois ou plus) de résultats possibles pour le nombre de noyaux dans une cellule, c'est-à-dire 1, 2, 3 ou 4 dans ce cas. La variance (var) et la covariance (covar) de chaque variable M_1 à M_4 peut alors être calculée à l'aide des formules (37) à (39) :

$$\text{var}(M_i) = np_i(1 - p_i) \quad (37)$$

$$\text{covar}(M_i, M_j) = -np_i p_j \quad (38)$$

avec i et $j = 1, 2, 3$ ou 4

où :

M_1 , M_2 , M_3 ou M_4 sont les valeurs de $1 \times M_1$, $2 \times M_2$, $3 \times M_3$ et $4 \times M_4$,

n est la somme du nombre total de cellules multipliées par leur nombre respectif de micronoyaux (équivalent du numérateur de la formule de l'IDN) et

p_i et p_j sont les probabilités de M_i et M_j , qui sont égales à M_i ou M_j divisées par n .

En se servant de la définition de la covariance, on peut montrer que la variance de l'IDN dépend des variances et des covariances calculées à l'aide des formules (37) et (38) :

$$\text{var}(IDN) = \sum_{i=1}^4 M_i^2 \text{var}(M_i) + 2 \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^4 M_i M_j \text{cov}(M_i, M_j) \quad (39)$$

Ce calcul est relativement complexe mais peut facilement être effectué à l'aide de l'un des progiciels de statistiques très répandus ou du programme *Dose Estimate* mentionné dans la section 8.3.

12.5. APPLICATION DU TEST CBMN EN DOSIMÉTRIE BIOLOGIQUE

12.5.1. Études sur des patients

Afin de vérifier l'applicabilité de la CBMN à la dosimétrie biologique, la fréquence des micronoyaux a été mesurée dans les lymphocytes du sang périphérique chez 1) différents groupes de patients atteints d'un cancer qui suivaient une radiothérapie avec irradiation partielle fractionnée, par exemple pour un cancer de la prostate ou du col de l'utérus, ou encore pour une maladie de Hodgkin [285–288] et chez 2) des patients atteints d'un cancer de la thyroïde qui suivaient un traitement à base de radio-iode [289–291].

Ces études ont montré que les doses estimées grâce aux micronoyaux concordaient assez bien avec les doses moyennes à l'organisme calculées à l'aide des plans de traitement de radiothérapie et des histogrammes dose-volume cumulatifs [285–287, 292].

Une méta-analyse, centrée sur des patients atteints d'un cancer de la thyroïde [289], a établi que la fréquence des micronoyaux était multipliée par plus de trois après une irradiation, ce qui montre que le test CBMN est suffisamment sensible pour détecter des lésions génétiques dans les lymphocytes circulants exposés à une dose moyenne à l'organisme faible et résultant de l'incorporation d'une source radioactive.

12.5.1.1. Étude du cas du radio-iode

Le test CBMN a été utilisé pour étudier l'effet induit sur les lymphocytes d'un homme de 34 ans par un traitement de radiothérapie ablative à l'iode 131 après une thyroïdectomie totale en raison d'un cancer [291]. Par chance, plusieurs mois avant que sa maladie ne soit diagnostiquée, ce patient avait accepté de donner son sang pour une étude *in vitro* sur la fréquence des micronoyaux à la suite d'une exposition externe à des doses progressives de rayons X (198 mGy/mn). La fréquence moyenne de référence (avant traitement) dans les cellules non exposées était de 6,0 micronoyaux pour 1 000 cellules binucléées tandis que des valeurs moyennes de 18,5, 29,0, 41,0, 61,0 et de 75,5 micronoyaux pour 1 000 cellules binucléées ont été obtenues après une exposition à une dose de rayons X de 50, 100, 150, 200 et 250 mGy, respectivement. Les données ont fait apparaître une relation linéaire sans seuil entre la dose et l'effet ($F = 3,714 + 2,783D$; $r = 0,99$) comme le montre la figure 42.

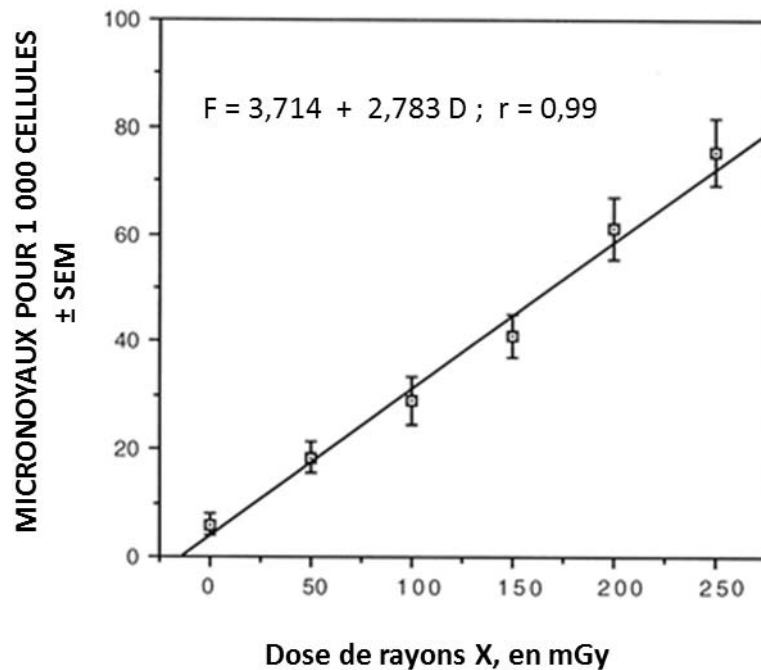


FIG. 42. Courbe dose-effet relative aux micronoyaux pour les lymphocytes d'un patient exposés à de faibles doses de rayons X *in vitro* avant que sa maladie ne soit diagnostiquée et après une radiothérapie à l'iode 131 (reproduit avec l'aimable autorisation de M. Livingston, REAC/TS, États-Unis).

Du sang a été prélevé 11 jours après le premier traitement *in vivo* par de l'iode 131 d'une activité de 48 mCi (1,78 GBq), puis tous les mois et enfin tous les trimestres jusqu'à cinq ans après le traitement. Lors du premier test effectué après le traitement, on comptait 35,5 micronoyaux pour 1 000 cellules binucléées et la multiplication par six par rapport à la fréquence de référence semble indiquer que la dose reçue par le sang périphérique s'est élevée à 110 mGy. Vingt-six mois après le premier traitement à l'iode 131, un deuxième traitement avec de l'iode 131 d'une activité de 390 mCi (14,46 GBq) a été administré au patient. Il s'est traduit par une nouvelle hausse du nombre de micronoyaux. Leur fréquence a connu des fluctuations importantes au cours du temps et était environ 10 fois plus élevée que la fréquence de référence après cinq ans de suivi (Fig. 43).

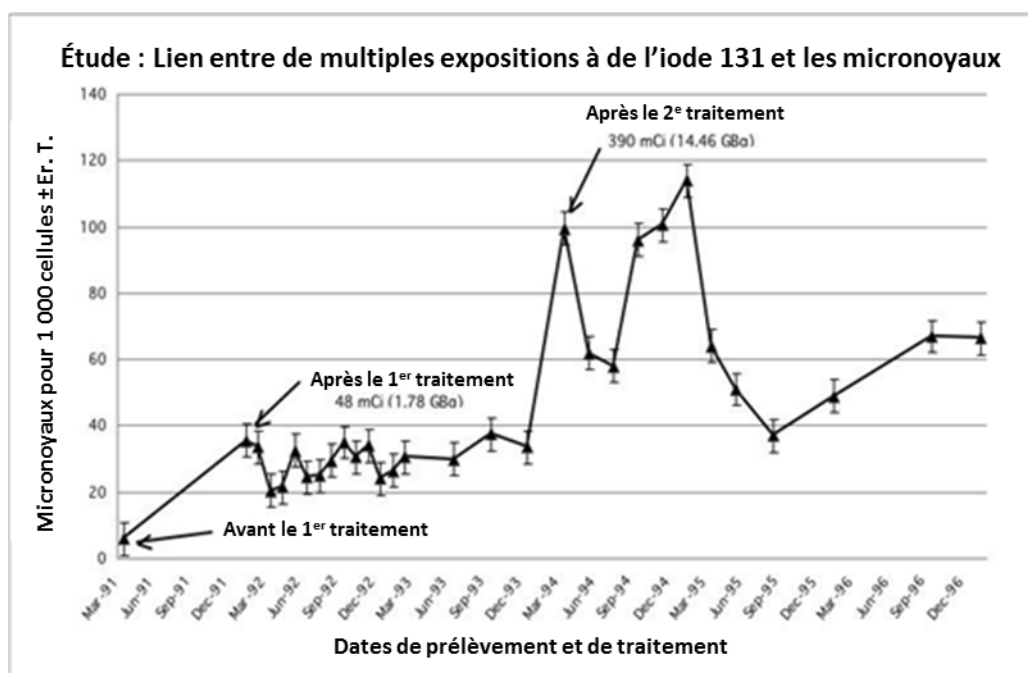


FIG. 43. Suivi pendant cinq ans de la fréquence des micronoyaux chez le patient, avant, pendant et après des traitements thérapeutiques à l'iode 131 (reproduit avec l'aimable autorisation de M. Livingston, REAC/TS, États-Unis).

Plus de 15 ans après le deuxième traitement, le patient n'avait plus de cancer et était en bonne santé. Les résultats de cette étude confirment que le test CBMN est un biomarqueur rapide, sensible et quantitatif de l'exposition aux rayonnements. Néanmoins, de telles études ne permettent pas de déterminer la dose reçue par le tissu cible, lequel, en l'espèce, était constitué des éventuelles cellules résiduelles de la thyroïde et des métastases d'origine thyroïdienne.

12.5.2. Études de biosurveillance

Après avoir été validé comme indicateur biologique *in vivo* dans plusieurs études portant sur des patients, le test CBMN et le test CBMN-centromères ont été utilisés pour une biosurveillance à grande échelle de travailleurs exposés aux rayonnements, par exemple dans une centrale nucléaire et un hôpital [266, 278–280, 293–295]. Ces études de biosurveillance ont permis d'établir la relation qui existe entre les micronoyaux et la dose cumulée reçue durant les années qui ont précédé le prélèvement sanguin. Dans l'étude de Thierens *et al.* [280], une régression linéaire sur les fréquences de micronoyaux, corrigées de l'effet de l'âge (voir la section 12.4.2), indiquait une augmentation de 0,0175 micronoyau pour 1 000 cellules binucléées/mSv avec une valeur de 0,10 pour le coefficient de corrélation de Pearson. Le recours au test CBMN-centromères dans une deuxième étude sur des travailleurs exposés aux rayonnements publiée par Thierens *et al.* [295] a fait apparaître pratiquement la même hausse du nombre de micronoyaux avec la dose, 0,025 micronoyau pour 1 000 cellules binucléées/mGy et a montré que ce lien avec la dose est entièrement dû aux micronoyaux dépourvus de centromère, ce qui témoigne de l'effet clastogène des rayonnements ionisants. Une étude de Vaglenov *et al.* [296] a également établi une relation entre la dose et les micronoyaux dans un cas d'exposition professionnelle. Ces auteurs ont signalé une augmentation de 0,03 micronoyau pour 1 000 cellules binucléées/mGy. Les études de biosurveillance à grande échelle montrent que l'examen des micronoyaux permet de mettre en

évidence des lésions génétiques au niveau d'une population pour des doses cumulées qui, reçues dans le cadre d'une activité professionnelle, sont supérieures à 50 mGy.

12.5.3. Études d'accidents

12.5.3.1. L'accident de Tchernobyl

Le test CBMN a également été utilisé avec succès pour évaluer l'exposition prolongée due à l'incorporation de radionucléides à vie longue par des personnes qui vivaient à proximité de la centrale nucléaire de Tchernobyl. Entre 1989 et 1991, on a évalué la fréquence des micronoyaux dans les lymphocytes binucléés chez 80 personnes qui se trouvaient à une distance comprise entre 100 et 200 kilomètres de Tchernobyl au moment de l'accident, en 1986 [297]. Lors de cette étude, une anthroporadiamétrie a été effectuée afin de mesurer l'activité du césium 134 et du césium 137 incorporés et de pouvoir comparer la fréquence des micronoyaux et la dose à l'organisme. Une analyse de régression multiple sur les données correspondant aux 80 sujets a montré a) qu'il existait une relation significative entre la fréquence des micronoyaux et le niveau d'activité du radiocésium ($p = 0,004$) et que b) la dose interne absorbée estimée (comprise entre 0,6 et 9,2 mGy) était significativement et positivement corrélée à la fréquence des micronoyaux ($R = 0,71$).

12.5.3.2. L'accident d'Istanbul

Pour les accidents qui n'ont affecté que quelques personnes et pour lesquels il n'était pas de première importance d'obtenir rapidement des résultats, la plupart des laboratoires ont choisi de compter les dicentriques. Il n'existe donc qu'un petit nombre de comptes rendus publiés sur l'utilisation des micronoyaux comme dosimètre biologique peu de temps après un accident. Néanmoins, tel est le cas pour l'accident d'Istanbul [158, 159], décrit plus haut dans les sections 9.7.5.6 et 10.9.3, au cours duquel 10 personnes qui travaillaient dans un dépôt de ferraille ont été exposées à une source de cobalt 60 anciennement utilisée en radiothérapie et non protégée. On a compté les micronoyaux à l'aide du test CBMN, ainsi que les dicentriques et les translocations par la méthode FISH dans des lymphocytes prélevés environ un mois après l'irradiation. À partir des données agrégées de deux laboratoires, des estimations de dose reposant sur la fréquence des micronoyaux ont été effectuées pour huit des sujets et ont abouti à des valeurs comprises entre 0,7 et 2,7 grays, en excellent accord avec les doses obtenues en comptant les dicentriques. Dans la section 10.9.3, on a souligné que les estimations de dose basées sur la méthode FISH étaient à peu près 20 à 30 % plus élevées que celles qui reposaient sur la fréquence des dicentriques et que cela était probablement dû à la forte baisse du nombre de cellules sanguines chez les sujets concernés. Le test des micronoyaux est également susceptible de conduire à une sous-estimation de la dose dans une telle situation car il porte, lui aussi, sur un type de lésion dont la persistance *in vivo* est limitée, surtout si une dose élevée a été reçue.

12.5.3.3. Site d'essais nucléaires de Semipalatinsk

Le site de Semipalatinsk a été fortement contaminé par des retombées radioactives pendant 40 années d'essais d'armes nucléaires ininterrompus (1949-1989). Les personnes qui habitaient à proximité du site ont été exposées à une irradiation à la fois interne et externe. Une analyse des dicentriques et des micronoyaux a été effectuée chez des individus qui vivaient dans différents villages contaminés et dans un village de référence. On a trouvé une fréquence plus élevée de dicentriques et de micronoyaux chez les habitants des zones contaminées et cette fréquence plus élevée semble principalement due aux radionucléides qu'ils ont incorporés [298].

12.5.3.4. Accident mettant en jeu un appareil de radiothérapie de contact à rayons X de 50 kV

En 2003, le test CBMN a été utilisé afin d'évaluer rétrospectivement la dose reçue par une personne qui travaillait dans un hôpital et qui avait été irradiée accidentellement par un appareil de radiothérapie de contact à rayons X de 50 kV durant l'entretien de cet appareil [299]. Il a abouti à une estimation de dose de 0,73 gray avec des limites de confiances à 95 % de 0,54 et 0,96 gray. Le comptage des dicentriques a conduit à une estimation de dose de 0,62 gray (intervalle de confiance 0,45–0,90 Gy), en très bon accord avec la dose évaluée par le test CBMN. Une lésion cutanée, sur le dos du travailleur concerné, indiquait que l'irradiation avait été partielle. La surdispersion des dicentriques a permis de conclure que 49 % du corps avait été surexposé. Il n'a pas été possible d'appliquer ce type d'analyse au nombre de micronoyaux étant donné que ceux-ci présentent toujours une surdispersion, même en cas d'irradiation corporelle totale. Un deuxième échantillon de sang, prélevé un an plus tard, a montré que la fréquence des micronoyaux diminuait avec le temps après la surexposition. La demi-vie de disparition de ces aberrations était de 342 jours, un chiffre très proche de la valeur de 377 jours obtenue avec les dicentriques. Ce résultat est en accord avec une baisse de la fréquence des dicentriques avec le temps de 60 % un an après un traitement, chiffre obtenu chez des patients qui suivaient une radiothérapie [292].

12.5.3.5. Accidents radiologiques à grande échelle

En cas d'accident radiologique à grande échelle, lorsque des centaines de personnes peuvent être exposées, il est important de distinguer les individus gravement irradiés (≥ 1 Gy), lesquels ont rapidement besoin d'un traitement médical, et ceux qui ont été moins exposés. Pour ce faire, il faut disposer d'un test de dosimétrie biologique rapide. Une étude récente [87] a confirmé l'efficacité du comptage automatique des micronoyaux pour effectuer un tri sur une population en faisant appel à plusieurs laboratoires. On trouvera plus d'informations sur cette question dans la section 13.3.3.

13. AUTOMATISATION DES TESTS CHROMOSOMIQUES

Pour pouvoir intervenir efficacement en cas d'événements radiologiques affectant un grand nombre de personnes, il est devenu impératif d'automatiser les méthodes cytogénétiques d'évaluation des doses afin d'augmenter les rendements car ces méthodes prennent du temps et sont laborieuses. En outre, l'automatisation améliore également le contrôle et l'assurance de la qualité. Elle renforce également la sécurité du personnel des laboratoires car les protocoles appliqués donnent lieu à un traitement de sang, ce qui constitue un risque biologique professionnel. L'automatisation d'un laboratoire de cytogénétique suppose : i) une automatisation de la préparation des échantillons, ii) une automatisation des analyses et iii) un système de gestion de l'information de laboratoire pour suivre les échantillons et traiter les données [300].

13.1. TRAITEMENT AUTOMATISÉ DES ÉCHANTILLONS

Dans un laboratoire de cytogénétique, les échantillons peuvent être traités automatiquement en faisant appel à tout ou partie des appareils suivants : i) équipement de manipulation du sang robotisé, ii) hotte de sécurité biologique, iii) incubateurs, iv) collecteur de cellules en métaphase, v) étaleuse de cellules en métaphase et vi) automate de coloration de lames.

13.1.1. Équipement de manipulation du sang robotisé

Un automate de manipulation de liquides personnalisé et à haut rendement pour traiter les échantillons de sang et isoler les lymphocytes du sang total périphérique peut éliminer un important goulot d'étranglement dans le traitement des échantillons en dosimétrie cytogénétique [300]. Les automates de manipulation de liquides disponibles sur le marché et qui sont capables de déposer, de diluer et d'aspirer des échantillons de sang, utilisés notamment pour des banques de sang [301], peuvent être adaptés à ce besoin. Ces appareils sont précis, fiables et ne provoquent pas de contamination croisée des échantillons [302]. Un automate de manipulation du sang personnalisé peut être équipé d'une grande platine de travail fabriquée sur mesure, d'un lecteur de code à barres afin de gérer la traçabilité des échantillons, de bras robotisés pour la manipulation des liquides et le transport des tubes Vacutainer, de tubes à centrifuger et d'un dispositif de lavage pour les pointes de pipette. Il peut également être intégré à un appareil d'analyse de la viabilité des cellules afin d'ajuster la densité des lymphocytes lors de la mise en culture et à une centrifugeuse automatisée à godets mobiles pour isoler les lymphocytes par gradient de densité afin de pouvoir cultiver ces lymphocytes isolés. Néanmoins, tous ces appareils doivent se trouver dans un environnement contrôlé dont le niveau de sécurité biologique est égal à 2 afin de garantir la stérilité des échantillons et la sécurité du personnel du laboratoire. Le dispositif utilisé doit assurer une traçabilité réelle [301].

13.1.2. Collecteur de cellules en métaphases

Afin d'obtenir des étalements métaphasiques de haute qualité systématiquement et de manière fiable, on peut se servir de collecteurs de cellules en métaphase disponibles sur le marché et préalablement personnalisés pour préparer des étalements à partir de sang cultivé. Ces appareils suppriment une opération qui prend beaucoup de temps en réalisant les tâches répétitives effectuées lors de la collecte des cellules en métaphase dans les cultures comme la centrifugation des suspensions cellulaires, l'aspiration et l'élimination en toute sécurité du surnageant, le traitement par une solution hypotonique et la fixation des cellules par un mélange d'acide acétique et de méthanol. Ces étapes sont effectuées en environnement contrôlé et en une seule fois sans intervention de l'opérateur, ce qui améliore la qualité et la reproductibilité du processus [300].

13.1.3. Étaleuse de cellules en métaphase

La température et l'humidité influent sur l'étalement de cellules en métaphase sur des lames en verre [303]. Un dispositif automatique offre des conditions de température et d'humidité optimales pour un étalement et permettent d'effectuer cette opération plus rapidement que si elle est réalisée manuellement. L'étaleuse peut être équipée d'un microprocesseur afin d'équilibrer et de contrôler avec précision la température, l'humidité et le temps de séchage. Ces contrôles, grâce à la forme fonctionnelle de l'appareil, permettent aux différents opérateurs d'obtenir des résultats satisfaisants pour des cellules humaines comme pour des cellules animales. Une plaque de guidage intégrée assure un bon étalement des échantillons et contribue à empêcher que ceux-ci ne se mélangent.

13.1.4. Automate de coloration de lames

Ces appareils offrent la possibilité de colorer rapidement et de manière satisfaisante des lames au Giemsa en réduisant au maximum les interventions de l'opérateur. Les automates de coloration qui existent aujourd'hui permettent une programmation intelligente et souple des échantillons pour colorer et rincer entre 1 et 520 lames sans surveillance avec des protocoles identiques ou différents. Grâce à une fonction d'attribution de priorité aux échantillons, il est possible de mettre en file d'attente et de traiter certains lots d'échantillons avant d'autres sans intervention de l'opérateur. La batterie de secours intégrée assure la continuité du traitement des échantillons en cours en permettant à l'appareil de fonctionner pendant 40 minutes en cas de coupure de courant.

13.2. ANALYSE AUTOMATIQUE D'IMAGES

Il y a encore relativement peu de laboratoires qui ont recours à l'analyse automatique en routine pour des images prises au microscope en dosimétrie biologique, même si la situation va sans doute évoluer au fur et à mesure que les systèmes s'amélioreront. Des efforts ont été entrepris afin d'automatiser le comptage pour les quatre examens décrits dans la présente publication.

13.2.1. Détection de cellules en métaphase et capture d'images

Même s'il n'existe pas encore de poste d'analyse automatisé parfaitement fiable pour compter les lésions chromosomiques sur le marché, les détecteurs de cellules en métaphase à haut rendement et les postes de comptage qui permettent d'effectuer une analyse manuelle assistée par ordinateur peuvent améliorer de manière notable la productivité d'un technicien. Les détecteurs de cellules en métaphase aident à repérer les étalements métaphasiques sur les lames et les présentent nets, à un fort grossissement et prêts à être analysés [304, 305].

Un dispositif de détection de cellules en métaphase classique par analyse d'images est constitué d'un ordinateur, d'un appareil photo numérique à haute résolution, d'un microscope de haute qualité, d'une platine automatisée et autofocus et d'un chargeur de lames robotisé. Des logiciels de détection automatique des cellules en métaphase et de comptage et d'annotation automatisés et interactifs sont exécutés sur l'ordinateur afin d'analyser les aberrations chromosomiques. De tels détecteurs de cellules en métaphase permettent d'examiner jusqu'à 150 lames par série à la recherche d'étalements métaphasiques [300]. Au fur et à mesure de l'examen, les résultats (images et emplacement des éventuels étalements) sont stockés sur le serveur centralisé afin d'être transférés automatiquement vers plusieurs postes de comptage, où les chromosomes seront analysés. Une autre solution consiste à crypter numériquement et à transférer par l'intermédiaire d'un réseau privé virtuel les images haute résolution des étalements métaphasiques acquises par les détecteurs de cellules en métaphase à des fins d'analyse et d'évaluation ultérieures à distance. Pour pouvoir effectuer

ce type de « télécomptage », il convient d'établir des critères harmonisés d'examen afin de s'assurer que les résultats obtenus soient comparables.

13.2.2. Automatisation de l'analyse des dicentriques

L'analyse des chromosomes dicentriques au microscope est une tâche qui prend du temps et qui est réalisée dans des laboratoires de dosimétrie biologique en routine par des opérateurs bien formés et expérimentés, opérateurs qui doivent analyser quelques centaines de cellules par jour. À faible dose, il faut analyser un grand nombre de cellules en métaphase, c'est pourquoi la principale stratégie d'amélioration de cette technique consiste à automatiser le comptage des dicentriques afin de gagner du temps, notamment pour les faibles doses.

Dans les années 1980, plusieurs initiatives ont été lancées afin de développer des dispositifs de comptage automatique [306–308]. Pendant cette période, plusieurs systèmes ont été mis sur le marché et les modules logiciels de détection de cellules en métaphase et de caryotypage correspondants ont aujourd'hui fait leurs preuves dans de nombreux laboratoires de cytogénétique. Ce type de microscopie assistée par ordinateur facilite énormément le travail des techniciens. Au départ, une lame est examinée à faible grossissement, les cellules en métaphase sont détectées et leurs coordonnées stockées sans intervention de l'opérateur. Lors de cette phase, il est possible de créer une série d'images de cellules en métaphase détectées. Comme les images de cellules sont transférées et analysées manuellement, il est facile d'enregistrer, d'imprimer et d'archiver les feuilles de résultats individualisées, lesquelles sont conservées sous forme de fichier informatique. En cas d'intervention rapide en situation d'urgence radiologique, il est possible d'acquérir manuellement, de numériser et d'archiver immédiatement les images des cellules observées qui comportent des aberrations. Au total, un détecteur de cellules en métaphase peut permettre de réduire le temps d'examen d'un facteur deux [304].

Il est admis depuis longtemps que la détection automatique des cellules en métaphase, les captures d'images et les autres processus devraient être suivis d'une analyse informatisée des images afin d'effectuer un examen automatique des chromosomes, y compris pour ce qui est du comptage des dicentriques. Un comptage automatique des dicentriques comporte plusieurs étapes. Tout d'abord, un détecteur de cellules en métaphase doit examiner une lame. Dans une deuxième étape, des images des métaphases détectées sont acquises automatiquement et numérisées à haute résolution. Ces images sont ensuite segmentées afin de repérer les chromosomes et les éventuelles dicentriques. Dans les années 1990, seules les images des éventuelles dicentriques et leurs coordonnées étaient stockées. De nos jours, avec les progrès de l'imagerie numérique, ce processus est devenu beaucoup plus rapide et plus efficace. De plus, grâce à l'évolution des technologies des disques durs, il est aujourd'hui possible de stocker les images de toutes les cellules d'une lame en haute résolution.

L'expérience des logiciels de comptage des dicentriques montre qu'il est très difficile de mettre au point des algorithmes hiérarchiques multiétapes qui permettent de segmenter toute une cellule pour détecter 46 chromosomes [308, 309]. En général, certains chromosomes ne sont pas détectés parce qu'ils en recouvrent partiellement d'autres ou qu'ils sont proches et qu'ils forment des grappes de chromosomes. Pour cette raison, certaines dicentriques ne sont pas repérées (faux négatifs). Il arrive aussi que certaines dicentriques soient systématiquement ignorées parce qu'elles sont plus petites que le chromosome X, ce qui se produit peut-être dans moins de 8 % des cas. Un technicien qualifié doit vérifier que les éventuelles dicentriques détectées automatiquement ne sont pas de faux positifs, mais cette tâche est beaucoup plus facile et rapide qu'un comptage manuel. Les éventuelles dicentriques apparaissent avec un signe distinctif sur l'écran (Fig. 44a), ce qui permet une évaluation rapide. La plupart des faux positifs (c'est-à-dire les artefacts et les chromosomes qui se chevauchent, voir la figure 44b) sont faciles à repérer.

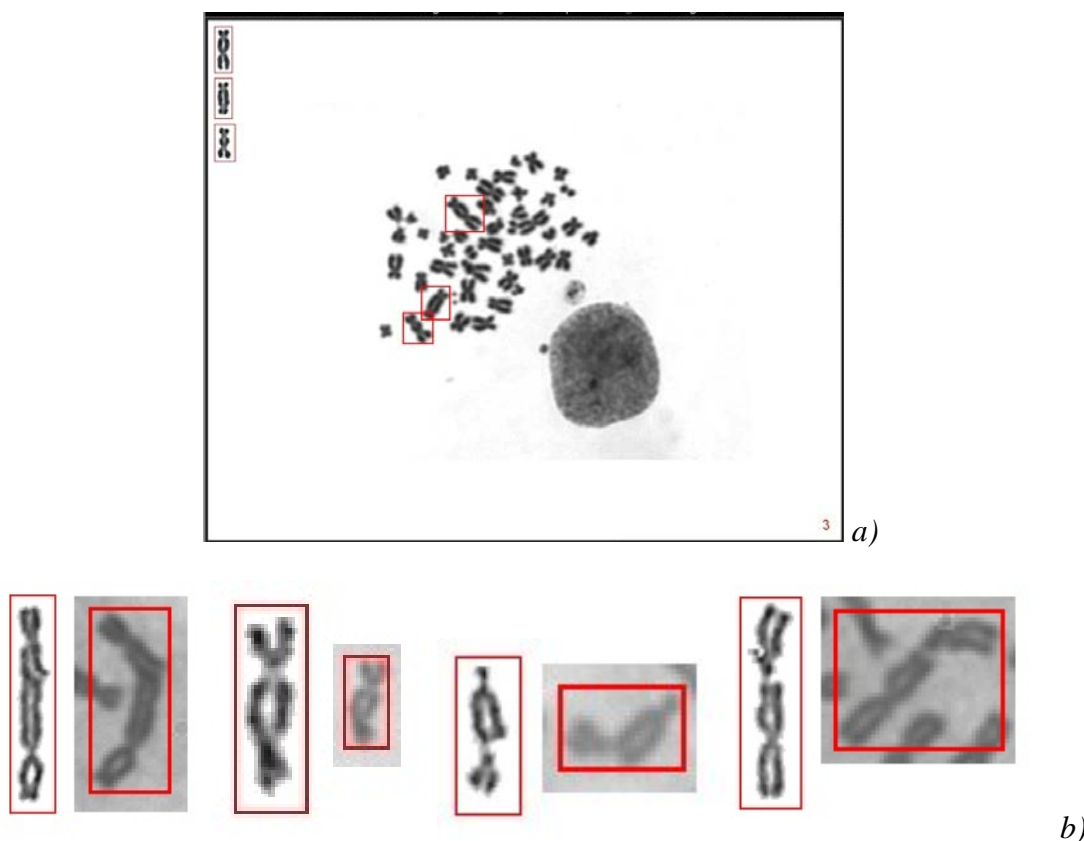


FIG. 44. a) Les éventuelles dicentriques automatiquement détectées sont mises en évidence, ce qui rend l'évaluation plus facile et plus rapide. b) Il est facile de reconnaître et d'écarter les éventuelles dicentriques qui sont de faux positifs (c'est-à-dire les chromosomes qui se chevauchent, les chromatides déformées et les objets non segmentés).

En raison de l'incomplétude de l'analyse des cellules (en mode manuel, la règle est de n'examiner que les cellules complètes qui comportent 46 centromères) et de l'incertitude qui en résulte, l'analyse automatique des dicentriques ne fait pas encore partie des méthodes utilisées en routine. En outre, des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si la fréquence des dicentriques détectées doit être rapportée au nombre de chromosomes détectés ou si l'on peut considérer qu'il s'agit d'un nombre de dicentriques par cellule, en tenant compte du fait que le nombre de chromosomes reconnus par cellule n'est pas constant. Cela pose la question de l'utilisation de l'indice de surdispersion des dicentriques (section 9.7.4.3) et donc des perspectives qu'offre cette méthode pour détecter les irradiations partielles. Il convient également d'évoquer l'incidence de la qualité de préparation des lames sur les résultats obtenus. Lorsqu'un étalement métaphasique est de bonne qualité, le nombre de chromosomes détectés est plus élevé. Il est ici nécessaire de procéder à des essais complémentaires afin d'utiliser au mieux le classificateur de dicentriques en fonction de la qualité des préparations réalisées par le laboratoire.

La détection automatique des dicentriques donne des résultats fortement reproductibles. Les comparaisons entre les courbes dose-effet construites manuellement et celles qui ont été réalisées grâce à des procédures semi-automatiques montrent une très bonne corrélation entre ces deux méthodes. On a observé une efficacité de la détection des dicentriques par des dispositifs automatiques comprise entre 50 et 70 % [310, 311].

L'automatisation du comptage des dicentriques permettrait de faire de l'analyse des dicentriques un outil utile pour examiner un grand nombre d'échantillons de sang en situation d'urgence radiologique de grande ampleur. Il est possible d'ajouter au poste de travail des postes annexes, où les cellules et les dicentriques seront examinées, ce qui augmente la capacité et le rendement du système. En mode de tri, l'automatisation du comptage des dicentriques réduit de manière notable le temps d'analyse et les résultats obtenus sont en bonne adéquation avec ceux auxquels on aboutit avec un comptage manuel [300, 310, 311].

13.2.3. Comptage automatique des micronoyaux

Plusieurs algorithmes d'analyse automatique des images pour le test CBMN avaient déjà été mis au point dans les années 1990 [312, 313]. Ces méthodes présentaient toutefois des limites, par exemple une imprécision relativement élevée concernant la classification des cellules binucléées. À une période plus récente, des dispositifs d'analyse automatique d'images pour le test CBMN nouveaux et plus performants ont été développés. Le module logiciel MN intégré au détecteur de cellules en métaphase MSearch, mis au point et commercialisé par Metasystems (un fabricant de dispositifs d'imagerie microscopique), reconnaît automatiquement les cellules binucléées par des critères morphologiques, à savoir la présence de deux noyaux adjacents colorés de la même manière au DAPI. Dans une deuxième étape, il compte automatiquement les micronoyaux dans une zone circulaire définie autour des deux noyaux de la cellule binucléée [314, 315] (voir la série de photos de cellules binucléées comportant des micronoyaux, Fig. 45). Il n'est pas nécessaire de faire évaluer la fréquence des micronoyaux détectés par un technicien spécialisé. Il est important de souligner que, à la différence des critères de comptage visuel utilisés pour le test CBMN, le logiciel de Metasystems ne se sert pas de la limite du cytoplasme pour repérer les cellules binucléées mais suppose simplement que l'existence de deux noyaux très proches (qui répondent à des conditions bien précises pour les classificateurs de reconnaissance de formes du logiciel) est suffisante pour repérer avec certitude une cellule binucléée. Si nécessaire, il est possible d'observer la limite du cytoplasme à l'aide d'un microscope à contraste de phase, comme le recommandent Eastmond et Tucker (1989) [284], afin de vérifier que la détection de ces cellules s'est effectuée correctement.

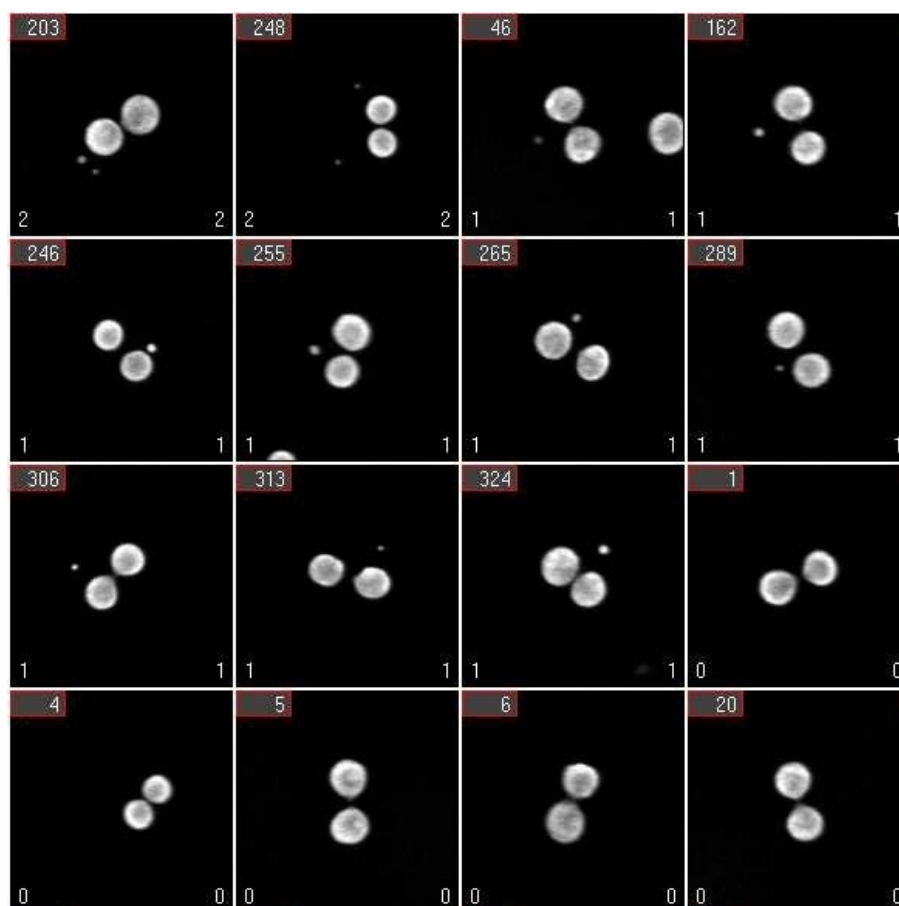


FIG. 45. Série de photos de cellules binucléées dépourvues de micronoyaux prises par un dispositif automatique.

Cordier *et al.* [316] ont développé un système destiné à la biosurveillance des expositions à des agents mutagènes *in vivo*, système qui comporte un poste de capture d'images et deux postes d'analyse des micronoyaux. Ce dispositif repère tout d'abord le cytoplasme des cellules colorées au Giemsa puis détermine le nombre de noyaux présents dans la cellule, ce qui lui permet de détecter les cellules binucléées, et enfin, dans une troisième étape, de compter les micronoyaux.

Une étude réalisée par Willems *et al.* [87] a montré la pertinence et l'intérêt du comptage automatique des micronoyaux à des fins de tri au sein d'une population en cas d'urgence radiologique de grande ampleur, situation dans laquelle il est important de pouvoir distinguer les individus gravement exposés (≥ 1 Gy), lesquels doivent être suivis et traités rapidement par des médecins, des personnes moins exposées.

Dans cette dernière étude, le nombre de micronoyaux obtenu par une méthode complètement automatisée était fortement corrélé au chiffre déterminé manuellement ($r^2 = 0,917$), ce qui a permis d'établir qu'une vérification visuelle n'était pas nécessaire. La courbe dose-effet de référence obtenue par comptage automatique des micronoyaux à partir de la fréquence des micronoyaux calculée pour 10 personnes a montré que l'incertitude associée à une dose de 1 gray s'élevait à 0,2 gray. Les intervalles de confiance à 95 % des doses de 0 et de 1 gray ne se chevauchaient pas. On a également pu aboutir à des estimations de dose précises à des doses plus élevées, c'est-à-dire 2 et 3 grays. Ce dispositif de comptage des micronoyaux est donc capable d'opérer une distinction entre des expositions à des doses de 1, 2 et 3 grays. Les auteurs de cette étude ont estimé que deux opérateurs peuvent traiter au moins 60 échantillons de sang (120 lames) par plage de travail de 12 heures.

En général, il est possible d'augmenter considérablement le nombre d'échantillons sanguins analysés en utilisant plus de postes de travail automatisés. Dans ce cas, des laboratoires en réseau qui sont entraînés, qui disposent d'équipements et de détecteurs de micronoyaux similaires et qui appliquent des protocoles de fixation normalisés peuvent obtenir des résultats comparables. Cette démarche permet d'accroître le rendement du comptage automatique des micronoyaux et donc de réagir rapidement en situation d'urgence radiologique de grande ampleur.

13.2.4. Condensation prématurée des chromosomes

La démarche est ici pratiquement identique à celle qui est appliquée pour l'analyse des dicentriques, c'est-à-dire une détection automatique des cellules en métaphase sur des préparations colorées au Giemsa [75]. Les images obtenues sont ensuite transmises à l'opérateur, lequel effectue un comptage visuel. L'analyse est environ trois fois plus rapide que si elle est entièrement manuelle.

13.2.5. Dénombrement des translocations par la méthode FISH

La coloration par FISH de trois ou quatre paires de chromosomes a permis d'aboutir à des résultats remarquables [75]. Un système constitué d'un ordinateur et d'une caméra CCD refroidie a été mis au point. La méthode choisie comportait deux étapes : le repérage des cellules en métaphase à l'aide d'une contre-coloration fluorescente et la détection des translocations qui mettaient en jeu des chromosomes intégralement peints. En se basant sur la liste des éventuelles translocations, les taux de faux positifs et de faux négatifs mesurés sur des préparations de lymphocytes colorées au Giemsa (environ 10 %) étaient similaires à ceux qui ont été obtenus pour les éventuelles dicentriques détectées sur des lames colorées au Giemsa [317]. La contre-coloration fluorescente nécessite un temps d'analyse plus long : une heure par lame, dont 25 minutes pour la mise au point automatique, contre quelques minutes par lame pour la microscopie à fond clair. C'est pour cette raison que la taille de la puce qui est reliée à la caméra CCD est plus grande, afin d'accélérer le comptage. Pour la détection des chromosomes peints, il semble suffisant d'appliquer un seuil relativement simple basé sur l'histogramme des niveaux de gris, ainsi que quelques opérations morphologiques, pour détecter les chromosomes entiers ou les parties de chromosomes marquées par la sonde [318]. La pertinence de ce système pour compter les translocations a été testée dans une étude qui visait à détecter les translocations induites par des rayons X et affectant le chromosome 4. Les comptages automatiques et manuels ont été comparés et il est apparu que l'efficacité de l'analyse automatique s'élevait à environ 90 % de celle de la méthode manuelle.

Il est possible d'améliorer la sensibilité de cette méthode en augmentant le nombre de chromosomes hybridés dans une seule couleur. Néanmoins, lorsque l'on peint plus de chromosomes, les techniques qui permettent de séparer les éventuels chromosomes qui se touchent et/ou se chevauchent jouent un rôle essentiel [319]. Piper *et al.* [320] ont construit un détecteur de cellules en métaphase colorées par fluorescence à l'aide de matériel informatique disponible sur le marché et d'une station de travail UNIX ordinaire. Ils se sont servis d'un cocktail qui ciblait les chromosomes 1, 2 et 4 et ont effectué une comparaison avec un comptage manuel. Les résultats obtenus ont montré que le temps nécessaire pour l'analyse était réduit d'un facteur trois. De plus, le détecteur de cellules en métaphase avait repéré plus d'étalements analysables que l'opérateur qui avait procédé à un examen visuel. Le comptage assisté par ordinateur présentait d'autres avantages, notamment le fait que les images numérisées des cellules en métaphase simplifiaient parfois l'analyse des réarrangements chromosomiques car il était facile de les réexaminer. Ce dispositif a été enrichi en y ajoutant un arbre de décision binaire pour classer les métaphases observées et pour améliorer la précision de la détection [321]. Les images colorées numérisées et stockées sur un ordinateur présentent également l'avantage de pouvoir être retouchées par

des moyens informatiques, ce qui permet parfois une meilleure discrimination de très petites parties de chromosomes qui ont subi une translocation, parties que l'œil ne peut distinguer.

Certains chercheurs travaillent à un prolongement évident de cette démarche : analyser les préparations réalisées à l'aide de la méthode FISH multicolore par association de banques d'ADN spécifiques de chromosomes entiers et de centromères afin de compter automatiquement et simultanément les translocations et les dicentriques.

13.3. SYSTÈME DE GESTION DE L'INFORMATION DE LABORATOIRE (LIMS)

Un LIMS disponible sur le marché et personnalisé peut être un outil indispensable pour faire face aux difficultés liées à une augmentation du débit des préparations ou de l'analyse des échantillons. Un tel outil peut également contribuer à conserver des données générales au niveau du laboratoire concernant la formation du personnel, l'étalonnage des appareils, l'inventaire des substances chimiques, etc. La gestion électronique des données par l'intermédiaire d'un LIMS offre des avantages comme la possibilité d'associer, de rechercher et de récupérer des données, ainsi que de communiquer rapidement des résultats après une catastrophe radiologique. Plusieurs modules existent. En voici une brève description :

- **Identification des échantillons** — Un code à barres d'identification unique est attribué à chaque échantillon.
- **Transport des échantillons** — Des formulaires précis permettent de saisir des renseignements concernant les conditions de transport de l'échantillon et son état à l'arrivée (par exemple, les valeurs mesurées par un enregistreur de température).
- **Mise en place d'un test** — Définition du traitement et des examens cytogénétiques adéquats qui seront appliqués à un échantillon (par exemple : culture de sang total ou isolation des lymphocytes, analyse des dicentriques ou test CBMN).
- **Programmation des examens** — Définition des priorités pour les analyses d'échantillons en fonction de l'urgence des cas et attribution de dossiers à des membres précis du laboratoire.
- **Sécurité** — Obligation d'authentification des utilisateurs grâce à des mots de passe. Les opérateurs peuvent se voir attribuer des privilèges différents au sein du système.
- **Contrôle** — Les saisies et les modifications sont enregistrées.
- **Archivage** — Assure le bon fonctionnement de la base de données, contribue à maintenir l'intégrité des enregistrements et garantit que les résultats scientifiques sont sauvegardés de manière sûre.
- **Élaboration de comptes rendus** — Génère des comptes rendus individuels mis en forme pour un examen, comptes rendus qui peuvent être communiqués au médecin traitant.
- **Intégration des appareils** — Les données peuvent être collectées et regroupées automatiquement et directement à partir des différents appareils, ce qui réduit le risque d'erreur de transcription. Cela contribue à améliorer la précision et la cohérence des données, ce qui est essentiel en cas d'intervention à la suite d'un événement ayant affecté un grand nombre de personnes.

La figure 46 représente schématiquement un laboratoire de cytogénétique automatisé, modulable et à haut rendement [301, 302].

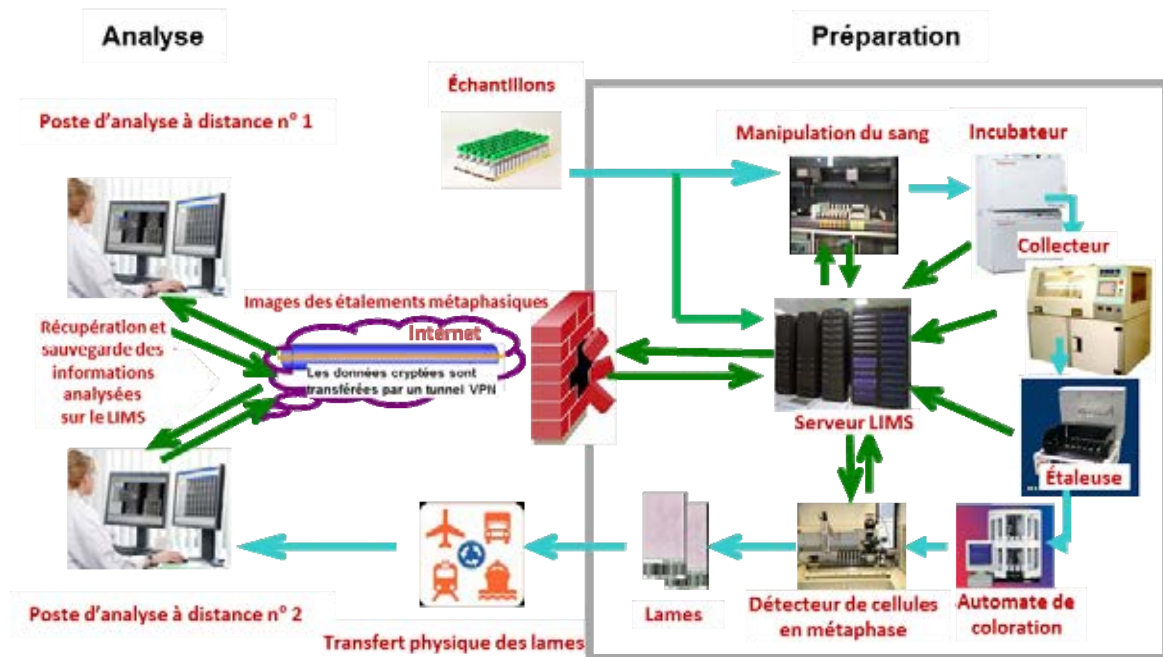


FIG. 46. Représentation schématique d'un laboratoire de cytogénétique à haut rendement automatisé à l'aide d'un LIMS. Les lames préparées dans le laboratoire central peuvent être physiquement transférées à des postes ou à des laboratoires de comptage. Sinon, les images obtenues sont transférées aux laboratoires destinataires par voie électronique à des fins d'analyse (reproduit avec l'aimable autorisation de MM. Ramakuma et Prasanna, AFRRI, États-Unis).

14. ÉVÉNEMENTS AFFECTANT UN GRAND NOMBRE DE PERSONNES

Un événement affectant un grand nombre de personnes est défini comme un événement au cours duquel le nombre de victimes est tel qu'il dépasse les capacités de réaction des intervenants locaux [322, 323]. Lorsque ce type d'événement concerne des rayonnements, la population touchée est parfois importante et la dose reçue peut être comprise entre la dose correspondant au rayonnement naturel et un niveau suffisamment élevé pour avoir des conséquences médicales. Il convient d'évaluer rapidement le degré d'exposition des personnes affectées afin de déterminer si une intervention médicale est nécessaire [4, 322, 324–326].

Les événements mettant en jeu des rayonnements peuvent résulter d'accidents ou d'actes de malveillance, lesquels, s'ils se produisent, peuvent faire des victimes au sein de la population. Des facteurs de confusion comme des dommages corporels classiques peuvent également survenir et le traitement de blessures extrêmement graves passe avant la dosimétrie ou d'autres activités [327].

La planification et la préparation sont essentielles pour pouvoir intervenir efficacement en cas d'événement affectant un grand nombre de personnes. En situation d'urgence radiologique, parmi les principes généraux reconnus, on peut citer : a) la création et la formation d'équipes d'intervention locales et nationales disposant des équipements et des réserves indispensables, b) la connaissance et l'application des approches diagnostiques adéquates pour évaluer les radiolésions et les doses reçues et c) l'accès à des laboratoires de référence, y compris à des laboratoires spécialisés dans l'évaluation des doses par des méthodes cytogénétiques [322, 328, 329]. Le processus de hiérarchisation des priorités relatif aux échantillons appliqué afin d'évaluer rapidement, par des techniques cytogénétiques, les doses reçues à des fins de tri, processus qui requiert une communication dynamique entre les intervenants médicaux et le personnel du laboratoire de dosimétrie cytogénétique de référence, constitue un élément essentiel des principes d'intervention en dosimétrie biologique.

14.1. CAS DE FIGURE POSSIBLES D'EXPOSITION AUX RAYONNEMENTS

14.1.1. Actes de malveillance

Un grand nombre de cas de figure possibles d'expositions aux rayonnements dues à un acte de malveillance ont été recensés et sont regroupés ici en trois grandes catégories [322, 324, 326].

- a) Les dispositifs d'exposition aux rayonnements (RED) sont constitués de sources scellées qui se trouvent dans un environnement donné mais qui ne peuvent donner lieu à une contamination. Les personnes qui s'approchent de ces sources peuvent recevoir des doses localisées importantes mais le nombre d'individus fortement exposés est en principe faible.
- b) Les engins à dispersion de radioactivité (EDR) se servent de dispositifs explosifs ou mécaniques pour disséminer des matières radiologiques qui peuvent provoquer une contamination radioactive. La zone touchée est assez restreinte et les expositions aux rayonnements peuvent prendre la forme d'une contamination interne aussi bien qu'externe mais les doses attendues sont trop faibles pour avoir des conséquences sanitaires.

- c) Les dispositifs nucléaires artisanaux (IND) contiennent des matières nucléaires qui peuvent provoquer des explosions nucléaires. Celles-ci peuvent entraîner des radiolésions et des brûlures thermiques étendues et faire de nombreux morts et blessés exposés à des doses élevées de rayonnement. Les conséquences d'un tel événement sont catastrophiques.

14.1.2. Événements accidentels

Une exposition aux rayonnements peut être la conséquence de plusieurs situations et notamment, de manière non limitative [326] :

- a) Les urgences liées aux réacteurs avec rupture d'éléments combustibles irradiés lors d'une perte de réfrigérant. Ces situations peuvent entraîner des doses élevées pour les travailleurs et la population qui se trouve près du site et une contamination qui expose la population des environs à de faibles doses (exemple : Tchernobyl).
- b) Des accidents de criticité peuvent se produire lorsqu'on laisse par inadvertance des quantités suffisantes de matières nucléaires spéciales subir une fission. Cela expose les personnes situées tout près de l'accident à des doses élevées (exemple : Tōkai-Mura).
- c) Les urgences liées à des sources orphelines perdues ou volées peuvent provoquer plusieurs types d'exposition différents en fonction de l'activité de la source, de la durée d'exposition et de la diffusion de la source. De telles urgences peuvent entraîner des doses à l'organisme élevées ou des expositions partielles, ainsi qu'une contamination interne ou externe (exemple : Goiânia).

14.2. HISTORIQUE

Dans un passé récent, la dosimétrie cytogénétique a été utilisée à plusieurs reprises pour évaluer les expositions aux rayonnements à la suite d'événements accidentels qui ont fait de multiples victimes (tableau 17).

TABLEAU 17. EXEMPLES D'UTILISATION DE LA DOSIMÉTRIE CYTOGÉNÉTIQUE LORS D'ACCIDENTS RADIOLOGIQUES QUI ONT FAIT DE MULTIPLES VICTIMES

Année de l'accident	Lieu de l'accident	Nombre de personnes concernées	Sujets ayant subi une analyse cytogénétique				Références
			Dicentriques	PCC	FISH	CBMN	
		> 100 000	436				[342, 343, 344]
1986	Tchernobyl (Ukraine)		1 755		97		[235, 236, 347]
						140 ^a	[259, 260, 297]
1986–1987	Lilo (Géorgie)	11	11				[247]
					4		[248]
1987	Goiânia (Brésil)	250	129				[350]
1995	Istanbul (Turquie)	21	21	10			[349]
					5	10	[158]
1998	Matkhoji (Géorgie)	nombreuses	85				[333]
		43	43				[351]
1999	Tōkai-Mura (Japon)			3			[253]
							[254]
2000	Bangkok (Thaïlande)	nombreuses	28	28			[352]
2005	Concepción (Chili)	233	45		1		[353]
2006	Dakar (Sénégal)	63	33				[354]

^a Rétrospective

Les accidents peuvent avoir des caractéristiques différentes comme un événement brutal et notoire qui fait de nombreuses victimes identifiées en un court laps de temps (exemple : Tchernobyl) ou une situation qui évolue plus lentement et dans laquelle on découvre tardivement les individus qui ont été exposés (exemple : Goiânia). Un accident peut en réalité n'affecter que quelques personnes mais faire l'objet d'une pression considérable de l'opinion publique pour étendre la dosimétrie biologique à la population environnante même s'il existe peu ou pas d'éléments matériels pour justifier cette mesure (exemple : Tōkai-Mura). En l'espèce, le laboratoire de dosimétrie biologique de l'Institut national des sciences radiologiques (NIRS) a pu déterminer les doses reçues par les 265 personnes concernées en vérifiant où elles se trouvaient au moment de l'événement et les assurer qu'elles n'avaient pas reçu de dose notable [330]. On a également évalué, en examinant les aberrations chromosomiques, la dose reçue par une cohorte de 43 personnes qui travaillaient dans une installation de traitement de l'uranium et pour lesquelles une légère exposition aux rayonnements avait été confirmée par une anthroporadiométrie pour le sodium 24.

La dosimétrie cytogénétique par analyse des dicentriques accompagnée d'une numération des leucocytes de routine constitue traditionnellement le premier examen effectué pour estimer la dose reçue à la suite d'une exposition accidentelle qui a fait de multiples victimes (voir le tableau 17). Les autres analyses cytogénétiques (FISH, PCC et CBMN) ont été

utilisées pour confirmer ces estimations mais elles ont souvent été réalisées entre plusieurs mois et plusieurs années après un accident.

14.3. RÔLE DE LA DOSIMÉTRIE BIOLOGIQUE

14.3.1. Méthodes d'évaluation de l'exposition aux rayonnements

Après un événement radiologique qui a affecté un grand nombre de personnes, le souci principal des médecins est de sauver des vies et d'apprécier les manifestations cliniques observées afin de prendre rapidement des décisions quant aux traitements à appliquer. Plusieurs techniques d'estimation de l'exposition aux rayonnements, techniques pour lesquelles des experts sont parvenus à un consensus international, peuvent être appliquées pour les expositions aiguës en début d'événement [6, 25, 322, 325–327, 329]. En fonction de la situation sur le plan radiologique et des moyens disponibles, il convient de mettre en œuvre les méthodes d'évaluation de l'exposition aux rayonnements adéquates en situation d'urgence radiologique affectant un grand nombre de personnes.

14.3.2. Principes d'intervention en dosimétrie biologique

Les principes opérationnels généraux qui concernent les premiers intervenants lors d'un accident radiologique affectant un grand nombre de personnes sont bien définis dans des publications de l'AIEA [322, 323] et sur un site Web du Ministère américain de la santé [331]. Néanmoins, la mise en œuvre d'une méthode d'évaluation de dosimétrie biologique multiparamétrique en situation d'urgence radiologique lorsqu'il y a de nombreuses victimes peut être une source de confusion importante si l'on n'a pas la possibilité de consulter des équipes d'experts [322, 323]. La figure 47 présente les éléments de la stratégie de traitement de REACT/TS et de l'AFRRI ainsi que les principes d'intervention appliqués en dosimétrie biologique multiparamétrique [329].

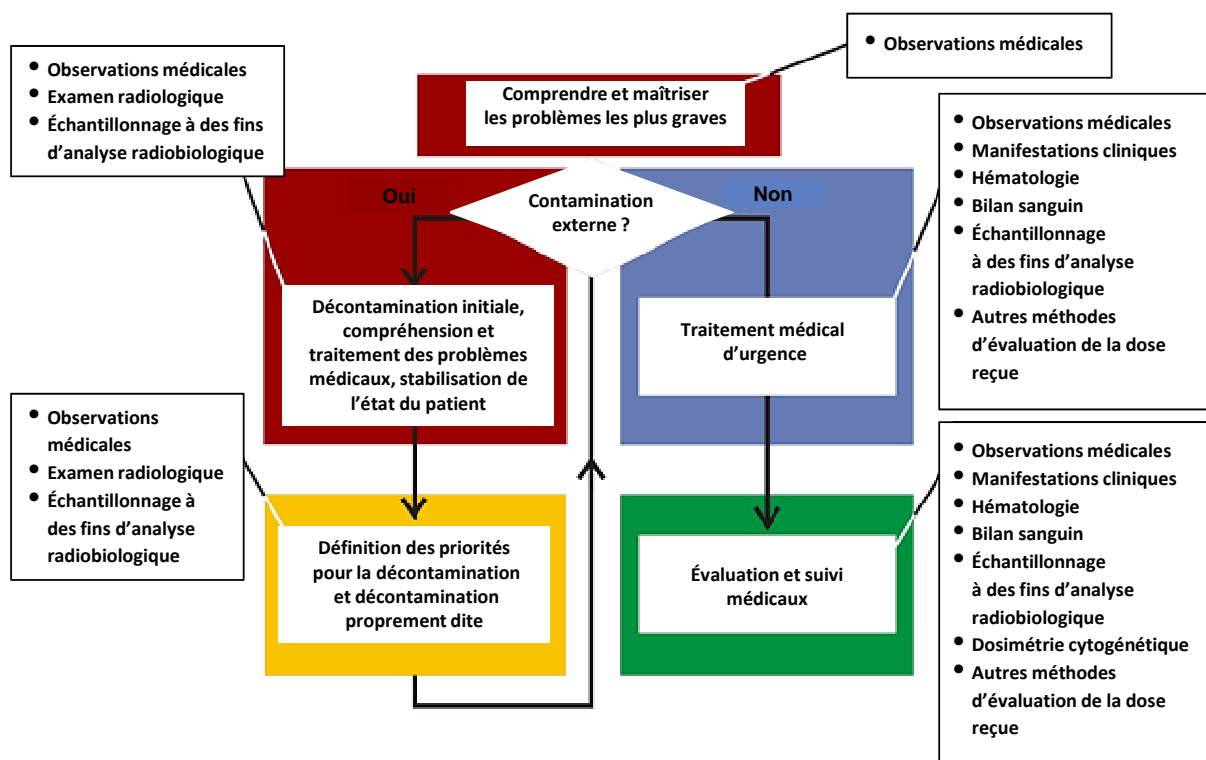


FIG. 47. Principes d'intervention en dosimétrie biologique pour la gestion d'une situation d'urgence radiologique dans laquelle des traumatismes ou des maladies doivent être soignés. Le rôle de la dosimétrie biologique est illustré pour chaque étape de l'algorithme « Traitement des patients irradiés » mis au point par REACT/TS et l'AFRRI [329].

Les méthodes actuelles d'estimation de l'exposition aux rayonnements et les techniques naissantes peuvent jouer un rôle lors des interventions qui concernent des radiolésions et des évaluations de dose. Des études de recherche et développement sont nécessaires pour pouvoir mettre au point une technique de tri diagnostique qui faciliterait l'application des principes d'intervention en dosimétrie biologique aux situations d'urgence radiologique qui affectent un grand nombre de personnes [329]. L'examen radiologique initial doit être rapide (durée maximale d'une minute), effectué à l'aide d'un appareil portatif et, dans l'idéal, comporter un test que le patient peut effectuer seul. Les examens complémentaires peuvent nécessiter plus de compétence et prendre plus de temps à réaliser (> un jour) mais leur spécificité radiologique est plus marquée.

Une fois qu'une éventuelle exposition a été détectée, il est possible de réaliser une dosimétrie biologique sur les patients afin de confirmer l'exposition suspectée et de déterminer la dose reçue. Au début d'une intervention en situation d'urgence radiologique, le premier objectif du tri cytogénétique est d'estimer rapidement la dose reçue par chaque patient afin de compléter le premier examen clinique. Même si les premières estimations de dose ne sont pas toujours extrêmement précises, le but recherché est d'attribuer rapidement une des quatre plages de dose (entre 1 et 2 grays, entre 2 et 4 grays, entre 4 et 6 grays et supérieur à 6 grays) à un patient afin de fournir sans retard au personnel médical des renseignements qui peuvent être utiles pour soigner le patient en question [4]. À ce stade, il est également possible de rejeter les faux positifs dus à des symptômes comme des

vomissements pour d'autres causes. Cette étape permet aussi de détecter les expositions partielles.

Dès que l'urgence initiale d'un tri dosimétrique rapide est passée, les patients qui ont semble-t-il reçu des doses notables peuvent subir un examen plus approfondi afin d'obtenir une estimation de dose plus précise.

Une fois que l'urgence est passée et qu'une dosimétrie plus précise a été réalisée sur les personnes considérées comme exposées, les individus qui ont reçu une dose très faible ou nulle mais qui ont encore besoin d'être rassurés continuent à être suivis. Il sera également nécessaire de procéder à des études épidémiologiques de suivi en faisant appel à d'autres techniques comme la méthode FISH.

14.3.3. Communication avec le personnel médical

La communication entre le personnel médical et les laboratoires de dosimétrie biologique est essentielle. Elle doit s'effectuer dans le respect du secret médical [3, 4]. Toute information donnée par le personnel médical qui peut aider les biodosimétristes à déterminer les priorités respectives des échantillons est extrêmement utile. Il est tout aussi essentiel que les éléments qui aideront le personnel médical à prendre des décisions concernant le traitement d'un patient soient rapidement transmis par le laboratoire de dosimétrie biologique. Cette nécessité d'une communication continue souligne l'importance d'un suivi rigoureux des échantillons pendant l'intervention qui fait suite à un événement. Il est essentiel de disposer d'un système de codage des échantillons (par exemple un LIMS, décrit dans la section 13.3) qui soit reconnu, qui dispose d'une documentation et qui permette une identification sans ambiguïté de sorte que les échantillons puissent être suivis depuis le prélèvement jusqu'au traitement, à l'analyse et au compte rendu adressé au personnel médical. Les laboratoires de cytogénétique travaillent avec des échantillons anonymisés tandis que les professionnels de santé connaissent le nom de leurs patients. Les laboratoires doivent déterminer les personnes qui auront accès à des informations du LIMS ou de documents similaires pour les communiquer au personnel médical. Ces individus devront décrypter des codes afin de transmettre les renseignements aux médecins et ne devraient donc sans doute pas participer à l'analyse des échantillons.

14.4. STRATÉGIES APPLICABLES À CE TYPE D'ÉVÉNEMENT

14.4.1. Examen à des fins de tri

On peut effectuer un examen rapide à des fins de tri pour plusieurs des analyses cytogénétiques utilisées en dosimétrie biologique. On a pu établir qu'en examinant 50 cellules (ou 30 dicentriques) pour l'analyse des dicentriques, on peut obtenir une estimation de dose à une précision suffisante pour qu'elle soit utile au personnel médical. Il a été démontré que cette technique d'examen permet d'obtenir une estimation de la dose reçue avec une précision d'un gray [332, 333]. Comparée à une analyse complète des dicentriques sur 500 ou 1 000 cellules, cette méthode de tri permet de multiplier le rendement par 20. Pour accélérer encore la vitesse d'examen, Flegal *et al.* ont mis au point une méthode dite QuickScan dans laquelle seules les lésions de chaque cellule sont comptées, sans vérifier la présence des 46 centromères. Toutefois, avec cette méthode, seules les cellules qui paraissent complètes sont examinées. Cette technique de comptage divise le temps d'examen au microscope d'un facteur supplémentaire de six [334].

Lorsqu'il y a de nombreuses victimes, la PCC est particulièrement efficace pour les expositions à des doses élevées. Il est apparu que l'analyse des anneaux après PCC est utile pour effectuer un tri des doses supérieures à 6 grays en examinant 300 cellules ayant subi

une PCC ou 50 anneaux [335]. Cette analyse présente toutefois des limites lorsque la dose est faible.

On peut également effectuer un premier tri à l'aide du test CBMN. En dosimétrie biologique classique, il est recommandé d'examiner 1 000 cellules binucléées. Il a cependant récemment été démontré qu'un comptage sur 200 cellules binucléées permet de détecter les doses supérieures à 1 gray [335]. Le temps nécessaire pour examiner 200 cellules binucléées est d'environ 15 minutes, ce qui est notablement plus court qu'une analyse des dicentriques à des fins de tri et un peu plus court que la technique QuickScan. Cette méthode présente un autre avantage : la compétence et la formation nécessaires pour examiner les cellules sont beaucoup plus limitées que pour l'analyse des dicentriques, de sorte que des opérateurs peuvent être rapidement formés s'il y a de nombreuses victimes.

14.4.2. Automatisation

L'automatisation a été examinée en détail dans la section 13. Il est certain qu'elle permet d'accroître le rendement et de libérer des personnes pour d'autres tâches nécessaires en cas d'événement affectant un grand nombre de personnes. L'automatisation peut porter sur le traitement des échantillons sanguins, sur la collecte et la détection des cellules en métaphase et sur l'analyse des dicentriques ou des micronoyaux.

14.4.3. Réseaux

De nombreux pays ont créé des laboratoires de dosimétrie cytogénétique spécialisés de référence. Depuis peu, certains de ces laboratoires ont constitué des réseaux nationaux et régionaux afin d'accroître leurs capacités d'intervention [118, 337, 338]. D'autres ont étudié leurs capacités et leurs moyens nationaux en vue de former un réseau régional [339]. Les agences de l'Organisation des Nations Unies (AIEA, OMS) qui offrent une coopération internationale en dosimétrie biologique ont également créé des réseaux de cytogénétique [340, 341] (tableau 18). Très peu de pays disposent de plus d'un laboratoire de cytogénétique dont la mission principale est d'effectuer de la dosimétrie biologique. Toutefois, il peut y avoir de nombreuses compétences en cytogénétique dans d'autres instituts de recherche, en particulier dans les services de génétique médicale des hôpitaux. Des réseaux nationaux (par ex. en France, en Corée, au Japon ou au Canada) ont mis en œuvre des accords, y compris sur la formation, en vertu desquels ces compétences peuvent être mobilisées rapidement sous la houlette d'un laboratoire de dosimétrie biologique spécialisé de référence. Le travail en réseau, qu'il s'effectue à l'échelle nationale ou internationale, nécessite une coordination de l'infrastructure logistique, de la gestion des données et des communications. Ces réseaux constituent également une excellente plate-forme pour des exercices et des comparaisons interlaboratoires qui permettent de vérifier que chaque laboratoire obtient des résultats corrects et que le réseau fonctionne de manière satisfaisante. Le recours à des réseaux de cytogénétique accroît les capacités d'évaluation de la dose à des fins de tri ou de référence par analyse cytogénétique en cas d'événement radiologique affectant un grand nombre de personnes.

TABLEAU 18. LISTE DES RÉSEAUX DE DOSIMÉTRIE BIOLOGIQUE EXISTANTS

Internationalaux	Zone	Nom		Coordonnateur	Participants (nombre ou nom)	² Examens pratiqués
		Monde entier	Réseau d'intervention et d'assistance (RANET)	AIEA	Évolue continuellement ⁴	TCD, FISH, PCC, CBMN
	Monde entier		BioDoseNet	OMS	63	TCD, FISH, PCC, CBMN
	Europe		Tri-Partite	En fonction du lieu où se produit l'événement	³ R.-U., France, Allemagne	TCD, FISH, PCC, CBMN
	Amérique latine		Réseau latino-américain de dosimétrie biologique	¹ Argentine – Autorité de réglementation nucléaire et Cuba – Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones	Argentine (2), Brésil, Chili, Cuba, Mexique, Pérou, Uruguay	² TCD, FISH, CBMN
Nationaux	Canada		<i>Cytogenetic Emergency Network</i>	Santé Canada	4 laboratoires de référence 18 laboratoires secondaires	TCD, FISH, CBMN
	Corée du Sud		Réseau coréen de dosimétrie biologique	Institut des sciences radiologiques et médicales de Corée	6	TCD, FISH, PCC, CBMN
	France		Réseau de dosimétrie biologique	Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN)	2 laboratoires du CEA et un du MNHN	TCD, FISH, PCC
	Japon		Réseau chromosome	Institut national des sciences radiologiques (NIRS)	7	TCD, PCC, FISH

¹ Les coordonnateurs, pays participants, tournent tous les deux ans.

² Le TCD est la technique utilisée à des fins de d'entraide. La PCC, la méthode FISH et le test CBMN sont appliquées dans au moins certains des réseaux partenaires.

³ Coordination conjointe.

⁴ Fait partie d'un réseau d'assistance et d'intervention plus vaste.

15. DÉMARCHES QUALITÉ ET NORMES ISO

15.1. JUSTIFICATION DES PROGRAMMES D'ASSURANCE ET DE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

La présente publication a montré qu'il n'existe pas de procédure universelle pour les examens cytogénétiques qui sont pratiqués en dosimétrie biologique. Dans les grandes lignes, les laboratoires appliquent des méthodes similaires, mais, dans le détail, il y a des différences qui peuvent influencer sur la qualité des résultats. Il est donc raisonnable d'attendre de chaque laboratoire de service qu'il mette en place une démarche qualité qui garantisse la robustesse, la précision et la reproductibilité des procédures.

Pour que la qualité des résultats d'un laboratoire de dosimétrie biologique soit assurée sur une longue durée, il faut que son processus de production repose sur des bases scientifiques solides, sur une validation des méthodes appliquées et sur une vérification des produits. Une démarche qualité complète permet de maintenir la qualité du produit fourni par un laboratoire, qu'il s'agisse d'une mesure ou d'un service. En outre, ces compétences imposent des comparaisons périodiques avec d'autres laboratoires de dosimétrie cytogénétique agréés ou d'un niveau suffisant, une stabilité constante du processus adopté par le laboratoire et une évaluation périodique du produit final afin de vérifier qu'il est conforme aux spécifications préalablement définies.

Le fait de suivre les orientations des critères exposés dans un programme interne d'assurance de la qualité, dans des évaluations périodiques menées par d'autres laboratoires et dans des procédures qualités écrites garantit une exploitation stable dans les périodes qui séparent les évaluations d'aptitude officielles.

Le programme interne d'assurance de la qualité doit définir les auto-évaluations, les caractéristiques d'un environnement de travail adéquat, les qualifications du personnel, le manuel de procédures, les appareils utilisés, l'étalonnage, la réduction des données, le dispositif d'enregistrement des données et les modalités de communication de celles-ci. Un contrôle du processus cytogénétique entre les évaluations d'aptitude permet de confirmer que les résultats sont d'une qualité reproductible. L'adoption d'une démarche qualité totale assurerait une amélioration continue des opérations effectuées.

Les tests d'aptitude permettent de vérifier périodiquement la cohérence des mesures effectuées en les comparant à celles d'autres laboratoires de dosimétrie cytogénétique agréés ou d'un niveau suffisant (cf. annexe VII) et de contrôler le laboratoire et sa capacité à vérifier sa propre aptitude à fournir des produits et/ou des services – en l'espèce des estimations de dose – de haute qualité. Le fait que les analyses soient réalisées de manière satisfaisante avec une précision préalablement définie constitue un élément essentiel de ces tests. Par ailleurs, ces mesures peuvent être utilisées pour contrôler la qualité d'un service ou produit fourni par le laboratoire. Dans le domaine particulier de la dosimétrie biologique, deux stratégies de vérification des aptitudes à réaliser des analyses peuvent être appliquées : 1) on peut envoyer des échantillons exposés *in vitro* à une dose connue pour laquelle le débit de dose et la qualité de rayonnement sont également connus au laboratoire de service à des fins d'analyse et 2) le laboratoire peut entreprendre une étude comparative interlaboratoires d'échantillons qui ont été envoyés à des laboratoires agréés ou d'un niveau suffisant à des fins d'analyse. Dans les deux cas, des analyses sont réalisées et

des comparaisons sont effectuées entre la valeur obtenue par le laboratoire et celle qui a été déterminée par le laboratoire qui le contrôle. Le laboratoire contrôlé est alors informé de la différence en pourcentage entre ces valeurs dans un rapport. En cas de contrôle direct, seules les capacités du laboratoire à effectuer des mesures sont évaluées. En revanche, lorsque le laboratoire analyse son propre produit et envoie également un aliquot au laboratoire qui le contrôle afin de confirmer les résultats obtenus et d'assurer une traçabilité explicite, ce sont les processus d'analyse du laboratoire aussi bien que ses capacités de mesure qui sont soumis à un examen.

En combinant toutes ces stratégies d'assurance de la qualité, il est possible de garantir la qualité et l'intégrité des mesures d'un laboratoire. Parmi ces stratégies, il convient de mettre particulièrement l'accent sur les programmes internes d'assurance de la qualité, sur les évaluations activement menées et approfondies réalisées sur site par des experts, sur le strict respect des critères opérationnels écrits et sur l'évaluation du laboratoire par des contrôles « en aveugle ». En effectuant toutes ces vérifications, on s'assure que les processus d'analyse respectent des objectifs de précision donnés. Même s'il est indispensable d'évaluer périodiquement les résultats finaux d'un laboratoire (à une fréquence par exemple comprise entre un et trois ans), cette périodicité peut être réduite au minimum lorsque les processus d'analyse sont maîtrisés.

Les plans d'assurance de la qualité des laboratoires de service qui effectuent de la dosimétrie biologique devraient traiter les points suivants :

- Identification et préparation des échantillons ;
- Validation des procédures ou des méthodes ;
- Mesures ;
- Réduction des données ;
- Documentation.

Le plan d'assurance de la qualité devrait contenir des actions systématiques afin de garantir, avec un niveau de confiance suffisant, qu'une mesure ou une procédure sera effectuée de manière satisfaisante.

L'Organisation internationale de normalisation (ISO) a paru offrir un cadre propice à la définition et à la rédaction d'un ensemble de règles communes dans ce domaine. Au sein de l'ISO, les normes sont élaborées suivant des principes généraux : caractère non contraignant, consensus et participation de tout le secteur d'activité concerné. De plus, chaque projet de norme est examiné par un groupe de travail constitué de spécialistes puis par les pays participants par l'intermédiaire de leur représentant national à l'ISO. Une fois publiée, une norme peut être utilisée directement ou transposée en norme nationale. La création d'un groupe de travail sur la normalisation de la dosimétrie biologique a été proposée en 1998 et acceptée par l'ISO en 1999 au sein du Comité technique 85, Énergie nucléaire, au niveau du sous-comité 2, Radioprotection. Ce groupe de travail comprend 13 spécialistes issus de 11 pays, auxquels s'ajoute un représentant de l'AIEA. La norme ISO 19238, publiée en 2004, fournit des critères de performance pour les laboratoires de service pratiquant la dosimétrie biologique par cytogénétique [3].

15.2. STRUCTURE ACTUELLE DE LA NORME ISO 19238 [3]

Dans sa forme actuelle, le document est divisé en 11 chapitres et en 4 annexes informatives.

Cette norme porte principalement sur :

- a) La confidentialité des informations personnelles s'agissant de :
 - i) La transmission d'informations confidentielles relatives au patient ou aux circonstances de la surexposition par le médecin au nom du patient (ou par le patient lui-même) au laboratoire ;
 - ii) L'anonymat des échantillons de sang et de la confidentialité des résultats et du rapport d'analyse ;
 - iii) La délégation de confidentialité au sein du laboratoire.
- b) Les risques encourus par le personnel du laboratoire durant le traitement d'un échantillon sanguin potentiellement infectant. Même si ce problème n'est pas propre à la dosimétrie biologique, il est apparu essentiel de mettre l'accent sur les exigences de sécurité microbiologique, chimique et optique minimales.
- c) La construction d'au moins une courbe d'étalonnage appropriée au sein du laboratoire de service constitue une condition essentielle pour estimer des doses. Cette courbe doit notamment être réalisée en suivant les mêmes protocoles que ceux que le laboratoire applique pour toutes les évaluations de dose. Celui-ci doit établir un compte rendu dans lequel figurent les conditions expérimentales de l'ajustement de la courbe d'étalonnage, par exemple la nature de la source et son étalonnage physique, les plages de dose et les limites de détection.
- d) Le laboratoire de service n'a pas la maîtrise de certains paramètres, comme la qualité des échantillons prélevés et leur transport mais il doit, à réception d'un échantillon, le traiter de manière judicieuse, estimer la dose reçue et établir un compte rendu qui est examiné et approuvé par un expert qualifié.
- e) Le compte rendu remis par le laboratoire doit contenir les éventuels renseignements utiles fournis par le client car ceux-ci peuvent avoir une incidence sur l'interprétation des résultats obtenus. Toutes les aberrations observées doivent être recensées et interprétées conformément aux connaissances actuelles sur les mécanismes de formation des aberrations chromosomiques radio-induites.
- f) Pour les laboratoires de service, les plans d'assurance de la qualité devraient comprendre des procédures internes afin de s'assurer de la précision et de la stabilité à long terme des performances ainsi qu'une évaluation par des pairs ou un étalonnage croisé périodique réalisé à l'aide d'un programme de référence externe. Ces plans portent sur les thèmes généraux suivants : identification et préparation des échantillons, validation des procédures ou des méthodes, mesures et appareils de mesure, interprétation des données, conservation des résultats et documentation.

15.3. APPLICATION AU TRI D'UNE POPULATION

Comme indiqué plus haut dans la section 14, le risque d'une situation d'urgence nucléaire ou radiologique affectant un grand nombre de personnes et résultant d'un accident ou d'un acte de malveillance n'est jamais nul. Après un événement de ce type, les individus concernés subissent un examen médical et sont classés en fonction d'éventuels signes prodromiques et des symptômes d'une surexposition, ainsi que des informations disponibles sur ce qu'ils ont vécu pendant la situation d'urgence. Lors de cette première phase d'intervention en situation d'urgence radiologique, il convient également d'effectuer un tri cytogénétique, c'est-à-dire de se servir des lésions chromosomiques pour évaluer approximativement et rapidement les doses reçues par les personnes en question, afin d'affiner le premier classement opéré parmi les victimes.

Cependant, ultérieurement, les cliniciens vont demander des estimations de dose plus précises pour la plage des faibles doses afin d'évaluer les risques d'effets stochastiques tardifs, mais aussi pour les doses élevées afin d'anticiper les réactions tissulaires graves. Un deuxième examen cytogénétique doit permettre d'aboutir à une estimation quantitative plus précise de la dose et également de mettre en évidence une éventuelle hétérogénéité d'exposition.

Toutefois, cet événement peut aussi dépasser les moyens du laboratoire de dosimétrie biologique de la région concernée et nécessiter l'intervention d'autres laboratoires dans le cadre d'un réseau (voir la section 14.5.3). Plusieurs laboratoires de dosimétrie biologique ont de manière indépendante et avec succès évalué rapidement des doses lors d'urgences ou d'exercices affectant un grand nombre de personnes. Leur méthode, qui reposait principalement sur l'analyse des dicentriques, comportait une planification préalable, la constitution de stocks de réactifs, un traitement simplifié des échantillons, une automatisation, des critères d'analyse et une mise en réseau avec d'autres laboratoires experts. Même si l'on applique les principes de la norme ISO 19238 [3], il convient de s'écarter quelque peu du protocole exact proposé afin de pouvoir faire face aux contraintes posées par une estimation rapide des doses reçues.

En s'appuyant sur cette expérience, une nouvelle norme, la norme ISO 21243, publiée en 2008, a défini les « Critères de performance pour les laboratoires pratiquant le tri par cytogénétique en cas d'accident radiologique ou nucléaire affectant un grand nombre de personnes. Principes généraux et application aux dicentriques » [4].

Cette norme est rédigée sous forme de procédures à adopter pour un tri par dosimétrie biologique lorsque les critères requis pour ces mesures dépendent de l'utilisation des résultats : éventuel traitement médical nécessaire, gestion de la radioprotection, conservation des données et exigences médico-légales. Certains cas seront par exemple analysés afin d'obtenir une évaluation plus précise d'expositions partielles élevées. Ensuite, la dose reçue sera estimée pour des personnes exposées à une dose inférieure au seuil des effets déterministes en appliquant les critères de la norme ISO 19238.

Le contenu de la norme ISO 21243 peut être résumé comme suit :

1) Avant l'événement, chaque laboratoire est tenu :

- a) De conserver un stock des réactifs et des autres consommables de laboratoire nécessaires ou doit être capable de s'en procurer immédiatement dans un stock local, d'État ou national ou auprès d'un fournisseur privé ;
- b) De maintenir les lignes de communication établies avec les établissements de soins locaux, d'État ou fédéraux ;
- c) De définir par écrit les responsabilités et le rôle de tous les membres du laboratoire dont les missions ont une incidence sur la qualité des travaux de dosimétrie biologique en situation d'urgence, ainsi que les relations qu'ils ont entre eux ;
- d) De connaître son débit maximal de traitement des échantillons (nombre et durée d'analyse) ;
- e) De gérer son propre programme de contrôle de la qualité et d'assurance de la qualité ;
- f) De participer, en tant que de besoin, à des programmes d'enseignement, de formation et d'exercices adéquats ;
- g) De participer périodiquement à des études comparatives interlaboratoires.

2) Durant l'événement :

- a) Le laboratoire de référence qui est chargé d'estimer les doses reçues fait appel à la collaboration des laboratoires du réseau lorsque le nombre de cas à examiner dépasse ses propres capacités.
- b) Lorsque la décision d'activer le réseau est prise, le laboratoire de référence devient le centre de communication du réseau. Il informe ses partenaires des circonstances de l'incident et ils définissent ensemble le degré de coopération nécessaire.
- c) Les analyses cytogénétiques réalisées à des fins d'estimations de dose sont prescrites par les médecins. Le choix des cas à examiner est effectué lors d'une discussion entre des personnes spécialisées dans l'estimation des doses par des méthodes cytogénétiques, les responsables d'intervention et les médecins.
- d) Le laboratoire de référence et les laboratoires du réseau étudient en détail le partage des travaux de dosimétrie biologique.
- e) Chaque individu ou médecin traitant, selon le cas, doit remettre un document écrit attestant de son consentement éclairé avant que le prélèvement de sang ne soit effectué. Il convient de veiller particulièrement au respect du caractère privé de certaines informations durant toute la durée d'un examen.
- f) Le laboratoire de référence organise les prélèvements de sang et répartit les échantillons aux laboratoires partenaires ou désigne un autre organisme compétent pour cette mission.
- g) Les résultats de l'analyse (et parfois les estimations de dose) sont examinés par au moins deux laboratoires et l'estimation de dose pour chaque personne repose sur les résultats examinés.

- h) Les laboratoires associés envoient au laboratoire de référence les données brutes, y compris les chiffres relatifs à la distribution des aberrations. Ils lui adressent également les estimations de dose, corrigées si nécessaire du fait que l'exposition a été prolongée ou de son hétérogénéité, estimations obtenues à l'aide de la courbe d'étalonnage qu'ils ont construites et qui est la plus adaptée au type de rayonnement dont il est question.
- i) Le laboratoire de référence regroupe les résultats des partenaires du réseau et agit comme centre de communication et de liaison avec les médecins.
- j) Après analyse avec le personnel médical, il peut être décidé que l'on examinera davantage de cellules chez certains patients afin de réduire l'incertitude statistique sur les estimations de dose et de mieux distinguer les différentes surexpositions inhomogènes. Cet examen complémentaire sera effectué en respectant les critères de performance qui figurent dans la norme ISO 19238.

En tenant compte de ces différentes configurations, le logigramme ci-après (Fig. 48) montre les interactions entre le laboratoire de référence, le réseau et l'équipe médicale.

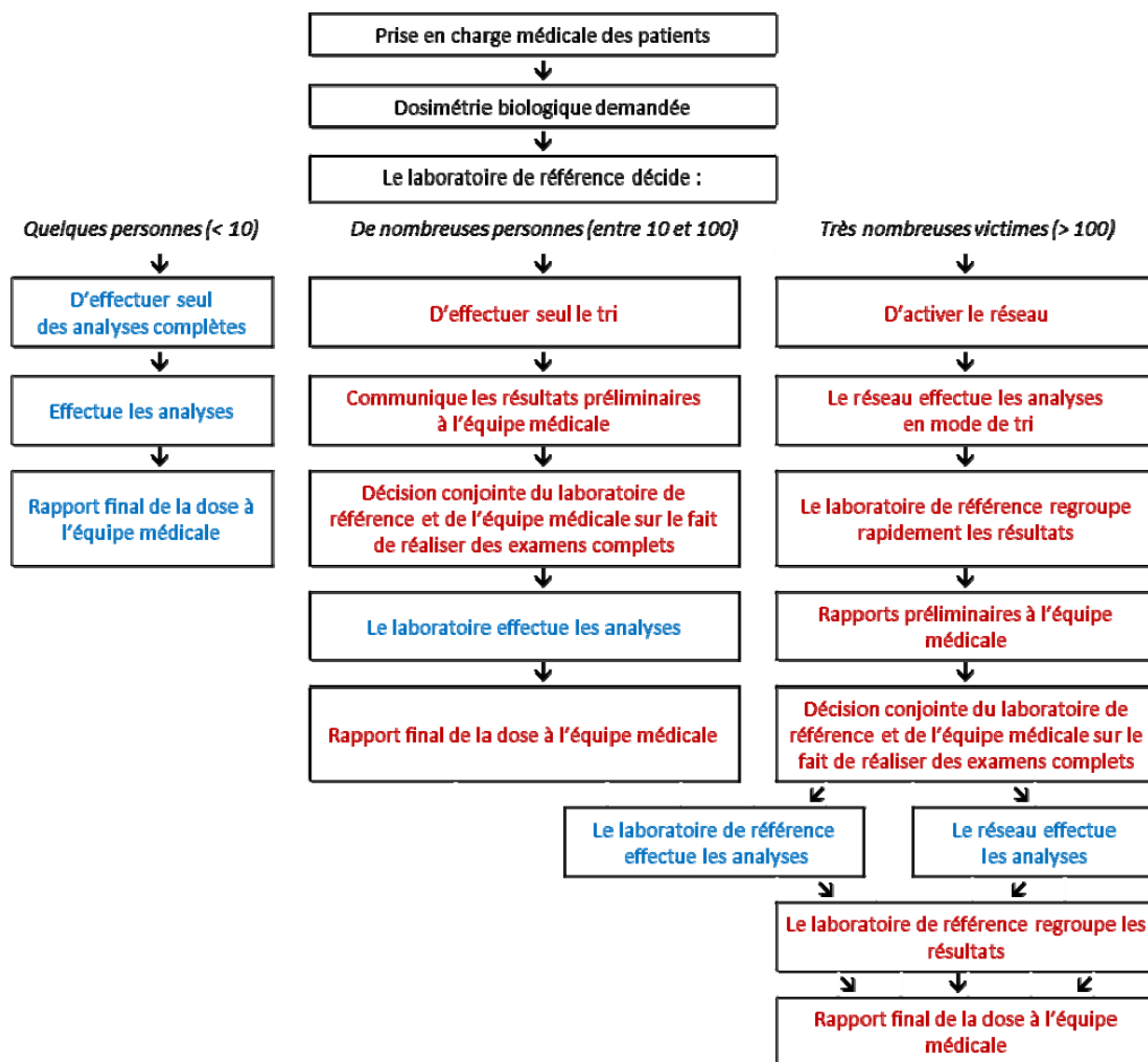


FIG. 48. Logigramme décrivant les interactions entre le laboratoire de dosimétrie biologique de référence, le réseau et l'équipe médicale, en cas d'évaluation de la dose reçue pour quelques individus (norme ISO 19238 (en bleu) [3]) ou un grand nombre de personnes (norme ISO 21243 (en rouge) [4]) (cette figure est extraite de la norme ISO 21243:2008 avec l'autorisation de l'AFNOR au nom de l'ISO. L'ISO reste titulaire du droit d'auteur sur cette figure).

16. SÉCURITÉ DU PERSONNEL DE LABORATOIRE

La sécurité biologique consiste à mettre en œuvre un certain nombre de principes, de techniques et de pratiques de confinement visant à prévenir le risque accidentel d'exposition du personnel à des agents pathogènes ou à des toxines, ou encore de libération de telles substances. Divers événements survenus ces dernières années dans le monde mettent en lumière la nécessité de protéger les laboratoires et les matières qu'ils détiennent contre un certain nombre de périls susceptibles d'entraîner des dommages pour la population, le bétail, l'agriculture ou l'environnement. Il est donc devenu nécessaire d'élargir la sécurité biologique en introduisant des mesures de sûreté biologique.

La sûreté biologique désigne la protection et le contrôle des matières biologiques précieuses au sein des laboratoires, ainsi que la responsabilisation du personnel concerné afin d'empêcher que des personnes non autorisées n'y accèdent et qu'elles ne soient perdues, volées, utilisées à mauvais escient, détournées ou délibérément libérées [355].

Pour ce qui est des laboratoires de cytogénétique, la sécurité et la sûreté biologique sont présentées en détail dans le *Manuel de sécurité biologique en laboratoire* de l'OMS et dans le document qui l'accompagne : *Biorisk Management: Laboratory biosecurity guidance*. Elles portent notamment sur la conception et l'aménagement des laboratoires, sur les appareils et équipements (c'est-à-dire les enceintes de sécurité biologique), sur des méthodes de travail qui garantissent la sécurité, sur la santé au travail et la surveillance sanitaire, sur la désinfection et la stérilisation, sur le traitement des déchets, sur l'exposition aux produits chimiques, sur la sécurité électrique et incendie, sur la radioprotection et sur la sécurisation de l'appareillage. Ces indications sont pleinement applicables et particulièrement utiles à l'exploitation d'un laboratoire de cytogénétique [355, 356].

Outre ces documents d'orientation, le personnel devrait respecter la législation ou la réglementation nationale applicable à la sécurité et à la sûreté des méthodes de travail dans les laboratoires.

On trouvera ci-après quelques points particuliers qui concernent la sécurité dans les laboratoires de cytogénétique et qui méritent d'être signalés.

16.1. INFECTIONS

Il convient de prendre des précautions systématiques lorsque l'on manipule du sang humain et tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Ils doivent être déballés et manipulés dans des enceintes de sécurité biologique utilisées, entretenues et certifiées de manière appropriée.

L'utilisation d'aiguilles, par exemple des aiguilles hypodermiques, devrait être limitée afin de réduire le risque de piqûre. Les aiguilles contaminées doivent toujours être rassemblées dans des collecteurs imperforables munis de couvercles et traitées comme des déchets infectieux. Il convient de disposer de désinfectants appropriés pour faire face à un renversement accidentel et pour décontaminer les plans de travail et les appareils une fois les échantillons traités. Tous les déchets biologiques et le matériel jetable en plastique devraient être stérilisés, par exemple par autoclavage, avant d'être éliminés. Si des déchets infectieux doivent être transportés à l'extérieur du laboratoire pour être décontaminés et éliminés, ce transport doit s'effectuer dans

des récipients hermétiquement fermés et étanches conformément à la réglementation nationale et/ou internationale, selon le cas [356].

Si un vaccin ou une anatoxine appropriés sont autorisés à la vente sur le marché local et si l'on peut s'en procurer, il faut en proposer l'administration si une évaluation adéquate du risque et l'examen clinique de la personne en cause concluent à la possibilité d'une exposition [356].

16.2. OPTIQUE

L'utilisation de lampes à ultraviolets (lampes UV) peut être nécessaire pour certains modes opératoires.

Il n'est pas obligatoire d'équiper les enceintes de sécurité biologique de lampes UV. Si toutefois on utilise de telles lampes, il faut les nettoyer fréquemment pour éliminer la poussière et les saletés qui pourraient réduire l'action germicide du rayonnement. Lorsque l'on se sert de lampes UV, celles-ci doivent être éteintes quand des personnes sont présentes dans la pièce, afin de protéger leurs yeux et leur peau contre toute exposition accidentelle [356].

Lorsque des lampes UV sont utilisées pour exposer des lames lors d'une coloration par FPG, il convient de mettre en place un blindage et des procédures de travail afin d'éviter toute irradiation directe sur la peau ou les yeux du personnel du laboratoire.

Les microscopes à fluorescence sont généralement conçus pour être intrinsèquement sûrs en utilisation normale.

16.3. SUBSTANCES CHIMIQUES

Certains produits pharmaceutiques et de chimie fine sont utilisés fréquemment dans les méthodes décrites par la présente publication. Pour plus d'informations sur les risques chimiques et sur la sécurité chimique, consulter la partie IX du *Manuel de sécurité biologique en laboratoire* de l'OMS [356, partie IX]. Celle-ci contient une liste complète de produits chimiques et décrit en détail leurs dangers et les précautions à prendre.

Lorsqu'ils sont présents dans des cultures ou servent pour effectuer une coloration, les produits chimiques et pharmaceutiques sont surtout utilisés en petits volumes et dans des dilutions qui ne présentent généralement aucun risque pour la santé. Ils sont toutefois préparés et conservés dans des solutions mères concentrées. Les principaux réactifs à surveiller et les phrases de risques associées adoptées à l'échelle internationale sont répertoriés dans le tableau 19.

Il ne faut conserver en laboratoire que la quantité de produits nécessaire pour l'usage quotidien. Les stocks doivent être entreposés dans une réserve constituée d'une pièce ou d'un bâtiment spécialement destinés à cet effet.

Les produits chimiques ne doivent pas être rangés par ordre alphabétique [356] !

TABLEAU 19. PRINCIPAUX RÉACTIFS À SURVEILLER DANS LES LABORATOIRES DE DOSIMÉTRIE BIOLOGIQUE ET PHRASES DE RISQUES ASSOCIÉES ADOPTÉES À L'ÉCHELLE INTERNATIONALE

Réactif	Phrase de risque (numéro ^a)
Acide acétique	10 ; 25
Acide chlorhydrique	34 ; 37
Acide okadaïque	23 ; 24 ; 25 ; 38
Benzylpénicilline	42 ; 43
Bromodésoxyuridine	20 ; 21 ; 22 ; 46 ; 61
Calyculine A	23 ; 24 ; 25 ; 38
Colcemid	25 ; 63
Colorant de Giemsa	20 ; 21 ; 22 ; 40 ; 41
Colorant Hoechst	23 ; 24 ; 25 ; 36 ; 37 ; 38
Cytochalasine B	26 ; 27 ; 28 ; 63
DAPI (diamidino-4,6 phénylindole-2)	36 ; 37 ; 38
DMSO (diméthylsulfoxyde)	36 ; 37 ; 38
Formamide	37 ; 38 ; 41 ; 61
Formol	23 ; 24 ; 25 ; 34 ; 40 ; 43
Héparine	36 ; 37 ; 38
Hydroxyde de baryum	20 ; 22 ; 34
Hydroxyde de sodium	35
Hypaque	42 ; 43
Méthanol	11 ; 23 ; 24 ; 25 ; 39
Orangé d'acridine	36 ; 37 ; 38
Pepsine	36 ; 37 ; 38 ; 42
Phytohémagglutinine	20 ; 21 ; 22 ; 43
Ribonucléase A	20 ; 21 ; 22 ; 38
Sulfate de streptomycine	20 ; 21 ; 22 ; 61
Xylène	10 ; 20 ; 21 ; 38

-
- ^a R10 : Inflammable
R11 : Facilement inflammable
R20 : Nocif par inhalation
R21 : Nocif par contact avec la peau
R22 : Nocif en cas d'ingestion
R23 : Toxique par inhalation
R24 : Toxique par contact avec la peau
R25 : Toxique en cas d'ingestion
R26 : Très toxique par inhalation
R27 : Très toxique par contact avec la peau
R28 : Très toxique en cas d'ingestion
R34 : Provoque des brûlures
R35 : Provoque de graves brûlures
R36 : Irritant pour les yeux
R37 : Irritant pour les voies respiratoires
R38 : Irritant pour la peau
R39 : Danger d'effets irréversibles très graves
R40 : Effet cancérogène suspecté – preuves insuffisantes
R41 : Risque de lésions oculaires graves
R42 : Peut entraîner une sensibilisation par inhalation
R43 : Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau
R46 : Peut provoquer des altérations génétiques héréditaires
R61 : Risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant
R63 : Risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant

RÉFÉRENCES

- [1] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment, Technical Reports Series No. 260, IAEA, Vienna (1986).
- [2] TURAI, I., The IAEA's co-ordinated research project on biodosimetry, 1998-2000, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **52** (2000) 1113–1116.
- [3] ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION, Radioprotection - Critères de performance pour les laboratoires de service pratiquant la dosimétrie biologique par cytogénétique, ISO 19238:2004, ISO, Genève (2004).
- [4] ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION, Radioprotection - Critères de performance pour les laboratoires pratiquant le tri par cytogénétique en cas d'accident radiologique ou nucléaire affectant un grand nombre de personnes - Principes généraux et application aux dicentriques, ISO 21243:2008, ISO, Genève (2008).
- [5] FENECH, M., et al., HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutat. Res.* **534** (2003) 65–75.
- [6] ROJAS-PALMA, C., et al. (Eds) TMT Handbook, Triage, Monitoring and Treatment of People Exposed to Ionizing Radiation Following a Malevolent Act, Lobo Media AS, Norway (2009).
- [7] BERTHO, J.M., et al., New biological indicators to evaluate and monitor radiation-induced damage: an accident case report, *Radiat. Res.* **169** (2008). 543–550.
- [8] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. A Manual, Technical Reports Series No. 405, IAEA, Vienna (2001).
- [9] HUBBLE, J.H., Photon mass attenuation and energy — Absorption coefficients from 1 keV to 20 MeV, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **33** (1982) 1269-1290.
- [10] GRAY, L.H., An ionization method for the absolute measurement of gamma-ray energy, *Proc. Soc. Lond.*, **A156** (1936) 578–596.
- [11] DENG, W., MORRISON, D.P., GALE, K.L., LUCAS, J.N., Biological dosimetry of beta-ray exposure from tritium using chromosome translocations in human lymphocytes analyzed by fluorescence in situ hybridization, *Radiat. Res.* **150** (1998) 400–405.
- [12] INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS, Quantities and Units in Radiation Protection Dosimetry, *ICRU Rep.* **51** (1993).
- [13] STRAUME, T., High-energy gamma rays in Hiroshima and Nagasaki: Implications for risk and W_R , *Health Phys.* **69** (1995) 954–956.
- [14] SCHMID, E., BAUCHINGER, M., LET dependence of dicentric yields in human lymphocytes induced by low doses of sparsely ionizing radiations and its implication for risk assessments, *Health Phys.* **74** (1998) 719–721.
- [15] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, WORLD HEALTH ORGANIZATION, Generic procedures for medical response during a nuclear or radiological emergency, EPR-MEDICAL, IAEA, Vienna (2005).
- [16] LEA, D.E., Actions of Radiation on Living Cells, 2nd edn, Cambridge University Press, Cambridge, UK (1956).

- [17] GOODHEAD, D.T., The initial physical damage produced by ionizing radiations, *Int. J. Radiat. Biol.* **56** (1989) 623–634.
- [18] EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., PURROTT, R.J., “Dicentric chromosome aberration yield in human lymphocytes and radiation quality. A resume including recent results using alpha particles”, *Microdosimetry* (Proc. 7th Symp. Harwood Academic, Oxford, 1980), Vol. 2 (BOOZ, J., EBERT, H.G., HARTFIEL, H.D., Eds), Harwood Academic Publishers, Brussels and Luxembourg (1981) 1263–1273.
- [19] COMMISSION INTERNATIONALE DE PROTECTION RADIOLOGIQUE, *Recommandations 2007 de la Commission internationale de protection radiologique*, Publication 103 de la CIPR, IRSN (2009).
- [20] NOWELL, P.C., Phytohemagglutinin — An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes, *Cancer Res.* **20** (1960) 462–466.
- [21] CARSTAIRS, K., The human small lymphocyte — its possible pluripotential quality, *Lancet* (1962) 829–832.
- [22] WUESTERMANN, P.R., CRONKITE, E.P., Physiological and pathophysiological aspects of the immune system contributing to a biomathematical model of lymphocytes, *Stem Cells* **13** Suppl. 1 (1995) S268–S275.
- [23] CHENG, C. K-W., CHAN, J., CEMBROWSKI, G.S., VAN ASSENDELFT, O.W., Complete blood count reference interval diagrams derived from NHANES III: Stratification by age, sex, and race, *Lab. Haematol.* **10** (2004) 42–53.
- [24] DAINIAK, N., WASELENKO, J.K., ARMITAGE, J.O., MacVITTEE, T.J., FARESE, A.M., The hematologist and radiation casualties, *Hematology*, **2003** (2003) 473–496.
- [25] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Diagnosis and Treatment of Radiation Injuries*, Safety Report Series No. 2, IAEA, Vienna (1998).
- [26] McLEAN, A.R., MICHIE, C.A., In vivo estimates of division and death rates of human T lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92** (1995) 3707–3711.
- [27] BOGEN, K.T., Reassessment of human peripheral T-lymphocyte life span deduced from cytogenetic and cytotoxic effects of radiation, *Int. J. Radiat. Biol.* **64** (1993) 195–204.
- [28] OBE, G., BEEK, B., DUDIN, G., The human leukocyte test system: V. DNA synthesis and mitoses in PHA-stimulated 3-day cultures, *Humangenetik* **28** (1975) 295–302.
- [29] PAULSON, J.R., LAEMMLI, U.K., The structure of histone-depleted metaphase chromosomes, *Cell* **12** (1977) 817–828.
- [30] CREMER, C., et al., Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations, *Mutat. Res.* **366** (1996) 97–116.
- [31] SCHAFFER, L.G., TOMMERUP, N. (Eds), *Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*, ISCN, Karger, Basel (2005).
- [32] MORTON, N.E., Parameters of the human genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88** (1991) 7474–7476.
- [33] CARRANO, A.V., Induction of chromosomal aberrations in human lymphocytes by X rays and fission neutrons: Dependence on cell cycle stage, *Radiat. Res.* **63** (1975) 403–421.
- [34] MÜLLER, H.J., Artificial transmutation of the gene, *Science* **66** (1927) 84–87.

- [35] PAINTER, T.S., MÜLLER, H.J., Parallel cytology and genetics of induced translocations and deletions in *Drosophila*, *J. Hered.* **20** (1929) 287–298.
- [36] SAX, K., Types and frequencies of chromosomal aberrations induced by X-rays, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **9** (1941) 93–103.
- [37] REVELL, S.H., “A new hypothesis for chromatid exchanges”, *Radiobiology* (Proc. Symp. Liège, 1954), Butterworths, London (1955) 243–253.
- [38] CHADWICK, K.H., LEENHOUTS, H.P., The rejoining of DNA double-strand breaks and a model for the formation of chromosomal rearrangements, *Int. J. Radiat. Biol.* **33** (1978) 517–529.
- [39] MOZUMDER, A., MAGEE J.L., Model of tracks of ionizing radiations for radical reaction mechanisms, *Radiat Res.* **28** (1966) 203–14.
- [40] GEORGAKILAS, A.G., Processing of DNA damage clusters in human cells: current status of knowledge, *Mol. Biosyst.*, **4** (2008) 30–35.
- [41] JAEA R&D REVIEW, Dependency of yield of DNA damage refractory to enzymatic repair on ionization and excitation density of radiation – Exploring the induction mechanism of clustered DNA damage, (2007), http://jolisfukyu.tokai-sc.jaea.go.jp/fukyu/mirai-en/2007/6_5.html
- [42] WARD, J.F., DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities, mechanisms of formation and repairability, *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **35** (1988) 95–135.
- [43] RYDBERG, B., Radiation-induced DNA damage and chromatin structure, *Acta Oncol.* **40** (2001) 682–685.
- [44] FORTINI, P., DOGLIOTTI, E., Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short and long-patch repair subpathways, *DNA Repair* **6** (2007) 398–409.
- [45] CALDECOTT, K.W., Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin, *DNA Repair* **6** (2007) 443–453.
- [46] IDE, H., et al., Repair of DNA-protein crosslink damage: Coordinated actions of nucleotide excision repair and homologous recombination, *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)* **52** (2008) 57–58.
- [47] JEGGO, P.A., LÖBRICH, M., Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability, *DNA Repair* **5** (2006) 1192–1198.
- [48] WYMAN, C., KANAAR, R., Homologous recombination: down to the wire, *Curr. Biol.* **14** (2004) R629–R631.
- [49] HEFFERIN, M.L., TOMKINSON, A.E., Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining, *DNA Repair* **4** (2005) 639–648.
- [50] ROTHKAMM, K., KRÜGER, I., THOMPSON, L.H., LÖBRICH, M., Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle, *Mol. Cell. Biol.* **23** (2003) 5706–5715.
- [51] SASAKI, M.S., Advances in the biophysical and molecular bases of radiation cytogenetics, *Int. J. Radiat. Biol.* **85** (2009) 26–47.
- [52] SAVAGE, J.R.K., Annotation: Classification and relationships of induced chromosomal structural changes, *J. Med. Genet.* **13** (1976) 103–122.
- [53] EVANS, H.J., Chromosome aberrations induced by ionizing radiations, *Int. Rev. Cytol.* **13** (1962) 221–321.
- [54] MESTRES, M., et al., Analysis of alpha-particle induced chromosome aberrations in human lymphocytes, using pan-centromeric and pan-telomeric probes, *Int. J. Radiat. Biol.* **80** (2004) 737–744.

- [55] BENKHALED, L., et al., Analysis of gamma-rays induced chromosome aberrations: a fingerprint evaluation with a combination of pan-centromeric and pan-telomeric probes, *Int. J. Radiat. Biol.* **82** (2006) 869–875.
- [56] GEBHART, E., Double minutes, cytogenetic equivalents of gene amplification in human neoplasia: a review, *Clinical and Translational Oncology* **7** (2005) 477–485.
- [57] BLOOM, A.D., NEEL, J.V., CHOI, K.W., IDA, S., CHAGNON, N., Chromosome aberrations among the Yanomama Indians, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66** (1970) 920–927.
- [58] AWA, A.A., NEEL, J.V., Cytogenetic “rogue” cells: what is their frequency, origin and evolutionary significance? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (1986) 1021–1025.
- [59] SEVAN’KAEV, A.V., et al., Rogue cells observed in children exposed to radiation from the Chernobyl accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **63** (1993) 361–367.
- [60] NEEL, J.V., AWA, A.A., KODAMA, Y., NAKANO, M., MABUCHI, K., Rogue lymphocytes among Ukrainians not exposed to radioactive fall-out from the Chernobyl accident: the possible role of this phenomenon in oncogenesis, teratogenesis and mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1992) 6973–6977.
- [61] NEEL, J.V., et al., Hypothesis: “rogue cell”-type chromosomal damage in lymphocytes is associated with infection with the JC human polyoma virus and has implications for oncopenesis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93** (1996) 2690–2695.
- [62] FOMINA, J., DARROUDI, F., BOEI, J. J., NATARAJAN, A.T., Discrimination between complete and incomplete chromosome exchanges in X-irradiated human lymphocytes using FISH with pan-centromeric and chromosome specific DNA probes in combination with telomeric PNA probe, *Int. J. Radiat. Biol.* **76** (2000) 807–813.
- [63] BUCKTON, K.E., SMITH, P.G., COURT BROWN, W.M., “The estimation of lymphocyte lifespan from studies on males treated with X-rays for ankylosing spondylitis”, *Human Radiation Cytogenetics* (Proc. Conf. Edinburgh, 1966) (EVANS, H.J., COURT BROWN, W.M., McLEAN, A.S., Eds), North-Holland, Amsterdam (1967) 106–114.
- [64] EDWARDS, A.A., et al., Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry applications, *Radiat. Prot. Dosim.* **113** (2005) 396–402.
- [65] DURAN, M., BARQUINERO, J.F., CABALLIN, M.R, RIBAS, M., BARRIOS, L., Persistence of radiation-induced chromosome aberrations in a long-term cell culture, *Radiat. Res.* **171** (2009) 425–437.
- [66] PANTELIAS, G.E., MAILLIE, H.D., A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol, *Somat. Cell. Genet.* **9** (1983) 533–547.
- [67] PANTELIAS, G.E., MAILLIE, H.D., The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry, *Radiat. Res.* **99** (1984) 140–150.
- [68] KANDA, R., HAYATA, I., LLOYD, D.C., Easy biodosimetry for high-dose radiation exposure using drug-induced, prematurely condensed chromosomes, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 441–446.

- [69] DURANTE, M., FURUSAWA, Y., GOTOH, E., A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosome analysis in biodosimetry, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 457–462.
- [70] VYAS, R.C., DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., Radiation-induced chromosomal breakage and rejoining in interphase-metaphase chromosomes of human lymphocytes, *Mutat. Res.* **249** (1991) 29–35.
- [71] PANTELIS, G.E., MAILLIE, H.D., Direct analysis of radiation induced chromosome fragments and rings in unstimulated human peripheral blood lymphocytes by means of the premature chromosome condensation technique, *Mutat. Res.* **149** (1985) 67–72.
- [72] DARROUDI, F., FOMINA, J., MEIJERS, M., NATARAJAN, A.T., Kinetics of formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes, using PCC and FISH, *Mutat. Res.* **404** (1998) 55–65.
- [73] WALDREN, C.A., JOHNSON, R.T., Analysis of interphase chromosome damage by means of premature chromosome condensation after X and UV irradiation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71** (1974) 1137–1141.
- [74] GOTOH, E., DURANTE, M., Chromosome condensation outside of mitosis: mechanisms and new tools, *J. Cell Physiol.* **209** (2006) 297–304.
- [75] BLAKELY, W.F., PRASANNA, P.G.S., KOLANKO, C.J., PYLE, M.D., MOSBROOK, D.M., LOATS, A.S., RIPPEON, T.L., LOATS, H., Application of the premature chromosome condensation assay in simulated partial-body radiation exposures: evaluation of the use of an automated metaphase-finder, *Stem Cells Suppl.* **1** (1995) S223–S230.
- [76] PRASANNA, P.G.S., ESCALADA, N.D., BLAKELY, W.F., Induction of premature chromosome condensation by a phosphatase inhibitor and a protein kinase in unstimulated human peripheral blood lymphocytes: a simple and rapid technique to study chromosome aberrations using specific whole-chromosome DNA hybridization probes for biological dosimetry, *Mutat. Res.* **466** (2000) 131–141.
- [77] PRASANNA, P.G.S., BLAKELY, W.F., “Premature chromosome condensation in human resting peripheral blood lymphocytes for chromosome aberration analysis using specific whole-chromosome DNA hybridization probes”, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 291 *Methods in Molecular Biology* (KEOHAVONG, P., GRANT, S.G., Eds), Humana Press, Totowa, NJ (2004) 49–57.
- [78] PATHAK, R., RAMAKUMAR, A., SUBRAMANIAN, U., and PRASANNA, P.G.S., Differential radio-sensitivities of human chromosomes 1 and 2 in interphase- and metaphase–spreads after ^{60}Co γ -irradiation in one human donor, *BMC Med. Phys.* **9** (2009) 1–8.
- [79] PANTELIS, G.E., ILIAKIS, G.E., SAMBANI, C.D., POLITIS, G., Biological dosimetry of absorbed radiation by C-banding of interphase chromosomes in peripheral blood lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* **63** (1993) 349–354.
- [80] LAMADRID, A.I., GARCIA, O., DELBOS, M., VOISIN, P., ROY L., PCC-ring induction in human lymphocytes exposed to gamma and neutron irradiation, *J. Radiat. Res.* **48** (2007) 1–6.
- [81] GOTOH, E., TANNO, Y., TAKAKURA, K., Simple biodosimetry method for use in cases of high-dose radiation exposure that scores the chromosome number of Giemsa-stained drug-induced prematurely condensed chromosomes (PCC), *Int. J. Radiat. Biol.* **81** (2005) 33–40.

- [82] COUNTRYMAN, P.I., HEDDLE, J.A., The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes, *Mutat. Res.* **41** (1976) 321–331.
- [83] FENECH, J., MORLEY, A.A., Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.* **147** (1985) 29–36.
- [84] FENECH, J., MORLEY, A.A., Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of *in vivo* ageing and low-dose X-irradiation, *Mutat. Res.* **161** (1986) 193–198.
- [85] VRAL, A., THIERENS, H., DE RIDDER, L., *In vitro* micronucleus-centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 61–68.
- [86] FENECH, M., Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 1084–1104.
- [87] WILLEMS, P., et al., Automated micronucleus (MN) scoring for population triage in case of large scale radiation events, *Int. J. Radiat. Biol.* **86** (2010) 2–11.
- [88] FENECH, M., The cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry, *Health Phys.* **98** (2009) 234–243.
- [89] THOMAS, P., UMEKAGI, K., FENECH, M., Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutagenesis*. **18** (2003) 187–94.
- [90] TAMURA, H., SUGIYAMA, Y., SUGAHARA, T., Changes in the number of circulating lymphocytes with chromosomal aberrations following a single exposure of the pelvis to γ -irradiation in cancer patients, *Radiat. Res.* **59** (1974) 653–657.
- [91] BREWEN, L.G., PRESTON, R.J., LITTLEFIELD, L.G., Radiation-induced human chromosome aberration yields following an accidental whole-body exposure to ^{60}Co γ -rays, *Radiat. Res.* **49** (1972) 647–656.
- [92] GRANATH, F., et al., Retrospective dose estimates in Estonian Chernobyl clean-up workers by means of FISH, *Mutat. Res.* **369** (1996) 7–12.
- [93] ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ, Guide pratique sur l'application du Règlement relatif au transport des matières infectieuses 2009-2010, WHO/HSE/EPR/2008.10, OMS, Genève (2009).
- [94] WILKINS, R.C., et al., Interlaboratory comparison of the dicentric chromosome assay for radiation biodosimetry in mass casualty events, *Radiat. Res.* **169** (2008) 551–560.
- [95] FABRY, L., LEMAIRE, M., Dose response relationships for radiation induced chromosome aberrations in human lymphocytes *in vivo* and *in vitro*, *Strahlentherapie* **162** (1986) 63–67.
- [96] LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., PROSSER, J.S., CORP, M.J., The dose response relationship obtained at constant irradiation times for the induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by cobalt-60 gamma rays, *Radiat. Environ. Biophys.* **23** (1984) 179–189.
- [97] MYSKA, J.C., et al., Arrays for Use at the Cobalt Irradiation Facility, TR97-2, Armed Forces Radiobiology Research Institute (1997), <http://www.usuhs.mil/afri/outreach/reports/pdf/TR97-2.pdf>
- [98] EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., PURROT, R.J., Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution, *Radiat. Environ. Biophys.* **16** (1979) 89–100.

- [99] RAO, C.R., CHAKRAVARTI, I.M., Some small sample tests of significance for a Poisson distribution, *Biometrics* **12** (1956) 264–282.
- [100] SAVAGE, J.R.K., Sites of radiation induced chromosome exchanges, *Curr. Top. Radiat. Res.* **6** (1970) 129–194.
- [101] LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., “Chromosome aberrations in human lymphocytes: effect of radiation quality, dose and dose rate”, *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man* (ISHIHARA, T., SASAKI, M.S., Eds), Alan R. Liss, New York (1983) 23–49.
- [102] BARQUINERO, J.F., et al., Establishment and validation of a dose-effect curve for gamma-rays by cytogenetic analysis, *Mutat. Res.* **326** (1995) 65–69.
- [103] DI GIORGIO, M., et al., Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by heavy charged particles in track segment mode, *Radiat. Prot. Dosim.* **108** (2004) 47–53.
- [104] PAPWORTH, D.G., Curve fitting by maximum likelihood, *Radiat. Bot.* **15** (1975) 127–140.
- [105] MERKLE, W., Statistical methods in regression and calibration analysis of chromosome aberration data, *Radiat. Environ. Biophys.* **21** (1983) 217–233.
- [106] LLOYD, D.C., PURROTT, R.J., REEDER, E.J., The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people, *Mutat. Res.* **72** (1980) 523–532.
- [107] SIGURDSON, A.J., et al., International study of factors affecting human chromosome translocations, *Mutat. Res.* **652** (2008) 112–121.
- [108] FENECH, M., The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutat. Res.* **285** (1993) 35–44.
- [109] PETERSON, L.E., PIRLS, Poisson iteratively reweighted least squares computer program for additive, multiplicative, power, and non-linear models, *J. Stat. Soft.* **2** (1997) 1–28.
- [110] AINSBURY, E.A., BARQUINERO J.F., Biodosimetric tools for a fast triage of people accidentally exposed to ionising radiation: statistical and computational aspects, *Ann. Ist Super Sanita*, **45** (2009) 307–12.
- [111] DEPERAS, J., et al., CABAS: a freely available PC program for fitting calibration curves in chromosome aberration dosimetry, *Radiat. Prot. Dosim.* **124** (2007) 115–123.
- [112] AINSBURY, E.A., LLOYD, D.C., Dose estimation software for radiation biodosimetry, *Hlth Phys.* **98** (2010) 290–295.
- [113] PURROTT, R.J., VULPIS, N., LLOYD, D.C., Chromosome dosimetry: The influence of culture media on the proliferation of irradiated and unirradiated human lymphocytes, *Radiat. Prot. Dosim.* **1** (1981) 203–208.
- [114] PERRY, P., WOLFF, S., New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature* **251** (1974) 156–158.
- [115] LAMBERT, B., HANSSON, K., LINDSTEN, J., STEN, M., WERELIUS, B., Bromodeoxyuridine-induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes, *Hereditas* **93** (1976) 163–174.
- [116] PROSSER, J.S., MOQUET, J.E., The effect of blood storage on differential chromosome staining of human lymphocytes, *Experientia* **39** (1983) 778–780.
- [117] HAYATA, I., KAJIMA, J., OKABE, N., Distribution of metaphases in the 1st cell-cycle for automated-system in radiation-dosimetry, *Radiat. Phys. Chem.* **39** (1992) 517–520.

- [118] WILKINSON, D.T., et al., Canadian biodosimetry capacity for response to radiation emergencies, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 1128–1132.
- [119] STRICKLIN, D., et al., An initial limited biodosimetry inter-comparison exercise: FOI and DRDC Ottawa, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 1133–1137.
- [120] PURROTT, R.J., VULPIS, N., LLOYD, D.C., The influence of incubation temperature on the rate of human lymphocyte proliferation *in vitro*, *Experientia* **37** (1981) 407–408.
- [121] MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMANN, W.J., BATTIPS, D.M., HUNGERFORD, D.A., Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood, *Exp. Cell Res.* **20** (1960) 613–616.
- [122] HUNGERFORD, D.A., Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl, *Stain Technol.* **40** (1965) 333–338.
- [123] HAYATA, I., et al., Robot system for preparing lymphocyte chromosomes, *J. Radiat. Res.* **33** Suppl. (1992) S231–S241.
- [124] McFEE, A.F., SAYER, A.M., SALOMAA, S.I., LINDHOLM, C., LITTLEFIELD, L.G., Methods for improving the yield and quality of metaphase preparations for FISH probing of human lymphocyte chromosomes, *Environ. Molecul. Mutagen.* **29** (1997) 98–104.
- [125] SASAKI, M.S., “Radiation damage and its repair in the formation of chromosome aberrations in human lymphocytes”, *Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man* (EVANS, H.J., LLOYD, D.C., Eds), Edinburgh University Press, Edinburgh 62–76 (1978).
- [126] SCOTT, D., LYONS, C.Y., Homogeneous sensitivity of human peripheral blood lymphocytes to radiation-induced chromosome damage, *Nature* **279** (1979) 756–758.
- [127] KOLIN-GERRESHEIM, J., BAUCHINGER, M., Dependence of the frequency of harlequin-stained cells on BrdU concentration in human lymphocyte cultures, *Mutat. Res.* **91** (1981) 251–254.
- [128] HAYATA, I., Removal of stainable cytoplasmic substances from cytogenetic slide preparations, *Biotechn. Histochem.* **68** (1993) 150–152.
- [129] LATT, S.A., Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **70** (1973) 3395–3399.
- [130] FERNANDES, T.S., LLOYD, D., AMARAL, A., A comparison of different cytological stains for biological dosimetry, *Int. J. Radiat. Biol.* **84** (2008) 703–711.
- [131] SAVAGE, J.R.K., PAPWORTH, D.G., Constructing a 2B calibration curve for retrospective dose reconstruction, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 69–76.
- [132] SZŁUIŃSKA, M., EDWARDS, A., LLOYD, D., Presenting statistical uncertainty on cytogenetic dose estimates, *Radiat. Prot. Dosim.* **123** (2007) 443–449.
- [133] CROW, E.L., GARDNER, R.S., Confidence intervals for the expectation of a Poisson variable, *Biometrika* **46** (1959) 441–453.
- [134] SCHENKER, N., GENTLEMAN, J.F., On judging the significance of differences by examining the overlap between confidence intervals, *Am. Stat.* **55** (2001) 182–182.
- [135] AUSTIN, P.C., HUX, J.E., A brief note on overlapping confidence intervals, *J. Vas. Surg.* (2002) 194–195.

- [136] BRAME, R.S., GROER, P.G., Bayesian methods for chromosome dosimetry following a criticality accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **104** (2003) 61–63.
- [137] VOISIN P., et al., Criticality accident dosimetry by chromosomal analysis, *Radiat. Prot. Dosim.* **110** (2004) 443–447.
- [138] DOLPHIN, G.W., “Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods”, *Handling of Radiation Accidents (Proc. Int. Symp. Vienna, 1969)*, IAEA, Vienna (1969) 215–224.
- [139] LLOYD, D.C., PURROTT, R.J., DOLPHIN, G.W., Chromosome aberration dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation, *Phys. Med. Biol.* **18** (1973) 421–431.
- [140] BARQUINERO, J.F., et al., Biological dosimetry in simulated in vitro partial irradiations, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 435–440.
- [141] VOISIN, P., et al., Mathematical methods in biological dosimetry: the 1996 Iranian accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **76** (2000) 1545–1554.
- [142] SASAKI, M.S., MIYATA, H., Biological dosimetry in atom bomb survivors, *Nature* **220** (1968) 1189–1193.
- [143] BUCKTON, K.E., HAMILTON, G.E., PATON, L., LANGLANDS, A.O., “Chromosome aberrations in irradiated ankylosing spondylitis patients”, *Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man*, Edinburgh University Press, Edinburgh (1978) 142–150.
- [144] BUCKTON, K.E., Chromosome aberrations in patients treated with X-irradiation for ankylosing spondylitis, *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man*, Alan R. Liss, New York (1983) 491–511.
- [145] AWA, A., Analysis of chromosome aberrations in atom bomb survivors for dose assessment: studies at the Radiation Effects Research Foundation from 1968–1993, *Stem Cells* **15** Suppl. 2 (1997) S163–S173.
- [146] LEA, D.E., CATCHESIDE, D.G., The mechanism of the induction by radiation of chromosome aberrations in *Tradescantia*, *J. Genet.* **44** (1942) 216–245.
- [147] BAUCHINGER, M., SCHMID, E., DRESP, J., Calculation of the dose-rate dependence of the dicentric yield after ⁶⁰Co-irradiation of human lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* **35** (1979) 229–233.
- [148] DUFRAIN, R.J., LITTLEFIELD, L.G., JOINER, E.E., FROME, E.L., “*In vitro* human cytogenetic dose-response systems”, *The Medical Basis for Radiation Accident Preparedness*, Elsevier North-Holland, Amsterdam (1980) 358–374.
- [149] AGENCE INTERNATIONALE DE L'ÉNERGIE ATOMIQUE, L'accident radiologique de Goiânia, AIEA, Vienne (1990).
- [150] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Dosimetric and Medical Aspects of the Radiological Accident in Goiânia in 1987, IAEA-TECDOC-1009, IAEA, Vienna (1998).
- [151] EUROPEAN COMMISSION, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, WORLD HEALTH ORGANIZATION, One Decade after Chernobyl — Summing up the Consequences of the Accident (Proc. Int. Conf. Vienna, 1996), IAEA, Vienna (1996).
- [152] PROSSER, J.S., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., STATHER, J.W., The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by exposure to tritiated water in vitro, *Radiat. Prot. Dosim.* **4** (1983) 21–26.

- [153] PRESTON, R.J., BREWEN, J.G., GENGOZIAN, N., Persistence of radiation-induced chromosome aberrations in marmoset and man, *Radiat. Res.* **60** (1974) 516–524.
- [154] VOISIN, P., LLOYD, D., EDWARDS, A., Chromosome aberrations scoring for biological dosimetry in a criticality accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **70** (1997) 467–470.
- [155] BASSON, J.K., HANEKOM, A.P., COETZEE, F.C., LLOYD, D.C., Health Physics Evaluation of an Accident Involving Acute Overexposure to a Radiography Source, Rep. PEL-279, Pelindaba, South Africa (1981).
- [156] STEPHAN, G., HADNAGY, W., HAMMERMAIER, C., IMHOF, U., Biologically and physically recorded doses after an accidental exposure to ^{60}Co γ -rays, *Hlth Phys.* **44** (1983) 409–411.
- [157] ISHIHARA, T., et al., Chromosome aberrations in persons accidentally exposed to ^{192}Ir gamma rays, *J. Radiat. Res.* **14** (1973) 328–335.
- [158] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, The Radiological Accident in Istanbul, IAEA, Vienna (2000).
- [159] TURAI, I., GÜNALP, B., LLOYD, D., COSSET, J.M., “Medical aspects of the radiological accident in Istanbul”, (Proc. 8th WHO/REMPAN Conf., NRPB), Oxford (2000).
- [160] LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., PROSSER, J.S., Accidental intake of tritiated water: a report of two cases, *Radiat. Prot. Dosim.* **15** (1986) 191–196.
- [161] PINKEL, D., STRAUME, T., GRAY, J.W., Cytogenetic analysis using quantitative high-sensitivity fluorescence hybridisation, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **83** (1986) 2934–2938.
- [162] GREULICH, K.M., et al., Rapid detection of radiation-induced chromosomal aberrations in lymphocytes and hematopoietic progenitor cells by mFISH, *Mutat. Res.* **452** (2000) 73–81.
- [163] MANTI, L., et al., Rearrangements in human chromosome 1 visualized by arm-specific probes in the progeny of blood lymphocytes exposed to iron ions, *Adv. Space Res.* **39** (2007) 1066–1069.
- [164] CHUDоба, I., et al., High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes, *Cytogenet. Cell Genet.* **84** (1999) 156–160.
- [165] HORSTMANN, M., DURANTE, M., JOHANNES, C., OBE, G., Chromosomal intrachanges induced by swift iron ions, *Adv. Space Res.* (2005) **35** 276–279.
- [166] BRENNER, D.J., et al., Biomarkers specific to densely-ionising (high LET) radiations, *Radiat. Prot. Dosim.* **97** (2001) 69–73.
- [167] DARROUDI, F., et al., A new tool to characterize primary cervical carcinomas: to assess hall-marks and stage specificity, *Cancer Lett.* **287** (2010) 67–74.
- [168] PRIEUR, M., et al., Acquired chromosome rearrangements in human lymphocytes: effect of ageing, *Human Genet.* **79** (1988) 147–150.
- [169] DARROUDI, F., Use of FISH translocations analyses for retrospective biological dosimetry: how stable are stable chromosome aberrations? *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 101–109.
- [170] LUCAS, J.N., et al., Rapid translocation frequency analysis in human decades after exposure to ionizing radiation, *Int. J. Radiat. Biol.* **62** (1992) 53–63.

- [171] TAWN, E.J., The non-random occurrence of exchanges involving chromosomes 7 and 14 in human lymphocytes: a prospective study of control individuals, *Mutat. Res.* **199** (1988) 215–220.
- [172] KODAMA, Y., et al., Estimation of minimal size of translocated chromosome segments detectable by fluorescence in situ hybridisation, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 35–39.
- [173] SAVAGE, J.R., TUCKER, J.D., Nomenclature systems for FISH-painted chromosome aberrations, *Mutat. Res.* **366** (1996) 153–161.
- [174] LINDHOLM, C., EDWARDS A.A., Long-term persistence of translocations in stable lymphocytes from victims of a radiological accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **80** (2004) 559–566.
- [175] TUCKER, J.D., et al., PAINT: A proposed nomenclature for structural aberrations detected by whole chromosome painting, *Mutat. Res.* **347** (1995) 21–24.
- [176] SAVAGE, J.R.K., SIMPSON, P., On the scoring of FISH painted chromosome exchange aberrations, *Mutat. Res.* **307** (1994) 345–353.
- [177] SAVAGE, J.R.K., SIMPSON, P., FISH ‘painting’ patterns resulting from complex exchanges, *Mutat. Res.* **312** (1994) 51–60.
- [178] KNEHR, S., ZITZELSBERGER, H., BAUCHINGER, M., FISH-based analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using different nomenclature systems, *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (1998) 135–141.
- [179] NATARAJAN, A.T., VYAS, R.C., DARROUDI, F., VERMEULEN, S., Frequencies of x-ray induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by in situ hybridization using chromosome-specific DNA libraries, *Int. J. Radiat. Biol.* **61** (1992) 199–203.
- [180] SIMPSON, P.J., SAVAGE, J.R.K., Dose–response curves for simple and complex chromosome aberrations induced by X-rays and detected using fluorescence in situ hybridisation, *Int. J. Radiat. Biol.* **69** (1996) 429–436.
- [181] SIMPSON, P.J., PAPWORTH, D.G., SAVAGE, J.R., X-ray-induced simple, pseudosimple and complex exchanges involving two distinctly painted chromosomes, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 11–18.
- [182] CORNFORTH, M.N., Analyzing radiation-induced complex chromosome rearrangements by combinatorial painting, *Radiat. Res.* **155** (2001) 643–659.
- [183] LUCAS, J.N., DENG, W., Views on issues in radiation biodosimetry based on chromosome translocations measured by FISH, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 77–86.
- [184] KNEHR, S., ZITZELSBERGER, H., BRASELMANN, H., NAHRSTEDT, U., BAUCHINGER, M., Chromosome analysis by fluorescence in situ hybridization: further indications for a non-DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations, *Int. J. Radiat. Biol.* **70** (1996) 385–392.
- [185] BARQUINERO, J.F., KNEHR, S., BRASELMANN, H., FIGELI, M., BAUCHINGER, M., DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization painting of all chromosomes of a human female karyotype, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 315–323.
- [186] CIGARRAN, S., et al., Relationship between the DNA content of human chromosomes and their involvement in radiation-induced structural aberrations analysed by painting, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 449–455.

- [187] WU, H., DURANTE, M., LUCAS, J.N., Relationship between radiation-induced aberrations in individual chromosomes and their DNA content: effects of interaction distance, *Int. J. Radiat. Biol.* **77** (2001) 781–786.
- [188] CORNFORTH, M.N., et al., Chromosomes are predominantly located randomly with respect to each other in interphase human cells, *J. Cell. Biol.* **159** (2002) 237–244.
- [189] WHITEHOUSE, et al., Translocation yields in peripheral blood lymphocytes from control populations, *Int. J. Radiat. Biol.* **81** (2005) 139–145.
- [190] PRESSL, S., EDWARDS, A. STEPHAN, G., The influence of age, sex and smoking habits on the background level of FISH-detected translocations, *Mutat. Res.* **442** (1999) 89–95.
- [191] RAMSEY, M.J., et al., The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutat. Res.* **338** (1995) 95–106.
- [192] BADR, F.M., HUSSAIN, F.H., Chromosomal aberrations in chronic male alcoholics, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **6** (1982) 122–129.
- [193] BURIM, R.V., et al., Clastogenic effect of ethanol in chronic and abstinent alcoholics, *Mutat. Res.* **560** (2004) 187–198.
- [194] BOTHWELL, A.M., WHITEHOUSE, C.A., TAWN, E.J., The application of FISH for chromosome aberration analysis in relation to radiation exposure, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 7–14.
- [195] TAWN, E.J., CARTMELL, C.L., The effect of smoking on the frequencies of asymmetrical and symmetrical chromosome exchanges in human lymphocytes, *Mutat. Res.* **224** (1989) 151–156.
- [196] VAN DIEMEN, P.C.M., MAASDAM, D., VERMEULEN, S., DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., Influence of smoking habits on the frequencies of structural and numerical chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes using the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique, *Mutagenesis* **10** (1995) 487–495.
- [197] TUCKER, J.D., et al., Multi-endpoint biological monitoring of phosphine workers, *Mutat. Res.* **536** (2003) 7–14.
- [198] MAENG, S.H., et al., Chromosome aberration and lipid peroxidation in chromium-exposed workers, *Biomarkers* **9** (2004) 418–434.
- [199] BESKID, O., et al., Chromosomal aberrations by fluorescence in situ hybridization (FISH) — Biomarker of exposure to carcinogenic PAHs, *Mutat. Res.* **620** (2007) 62–70.
- [200] PLUTH, J.M., RAMSEY, M.J., TUCKER, J.D., Role of maternal exposures and newborn genotypes on newborn chromosome aberration frequencies, *Mutat. Res.* **465** (2000) 101–111.
- [201] STEENLAND, K., et al., Thyroid hormones and cytogenetic outcomes in backpack sprayers using ethylenebis (dithiocarbamate) (EBDC) fungicides in Mexico, *Environ. Hlth Perspect.* **105** (1997) 1126–1130.
- [202] KIM Y.K., et al., Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms, *Pharmacogenetics* **14** (2004) 453–463.
- [203] SMITH, M.T., et al., Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene, *Cancer Res.* **58** (1998) 2176–2181.

- [204] ZHANG, L., et al., Aberrations in chromosomes associated with lymphoma and therapy-related leukemia in benzene-exposed workers, *Environ. Mol. Mutagen.* **48** (2007) 467–474.
- [205] BESKID, O., DUSEK, Z., SOLANKSY, I., SRAM, R.J., The effects of exposure to different clastogens on the pattern of chromosomal aberrations detected by FISH whole chromosome painting in occupationally exposed individuals, *Mutat. Res.* **594** (2006) 20–29.
- [206] SRAM R.J., et al., Environmental exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons-The interpretation of cytogenetic analysis by FISH, *Toxicol. Lett.* **172** (2007) 12–20.
- [207] DOHERTY, A.T., et al., Increased chromosome translocations and aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients having revision arthroplasty of the hip, *J. Bone Joint Surg.* **83** (2001) 1075–1081.
- [208] DULOUT, F.N., et al., Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes from native Andean women and children from northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water, *Mutat. Res.* **370** (1996) 151–158.
- [209] NATARAJAN, A.T., et al., ¹³⁷Cs-induced chromosome aberrations analyzed by fluorescence in situ hybridization: eight years follow up of the Goiânia radiation accident victims, *Mutat. Res.* **400** (1998) 299–312.
- [210] SAKAMOTO-HOJO, E.T., NATARAJAN, A.T., CURADO, M.P., Chromosome translocations in lymphocytes from individuals exposed to ¹³⁷Cs 7.5 years after the accident in Goiânia (Brazil), *Radiat. Prot. Dosim.* **86** (1999) 25–32.
- [211] BAUCHINGER, M., et al., Collaborative exercise on the use of FISH chromosome painting for retrospective biodosimetry of Mayak nuclear-industrial personnel, *Int. J. Radiat. Biol.* **77** (2001) 259–267.
- [212] SALASSIDIS, K., et al., Chromosome painting in highly irradiated Chernobyl victims: a follow-up study to evaluate the stability of symmetrical translocations and the influence of clonal aberrations for retrospective dose estimation, *Int. J. Radiat. Biol.* **68** (1995) 257–262.
- [213] LINDHOLM, C., TEKKELE, M., VEIDEBAUM, T., ILUS, T. SALOMAA, S., Persistence of translocations after accidental exposure to ionizing radiation, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 565–571.
- [214] LINDHOLM, C., et al., Intercomparison of translocation and dicentric frequencies between laboratories in a follow-up of the radiological accident in Estonia, *Int. J. Radiat. Biol.* **78** (2002) 883–890.
- [215] DURAN, A., et al., Suitability of FISH painting techniques for the detection of partial-body irradiations for biological dosimetry, *Radiat. Res.* **157** (2002) 461–468.
- [216] GUERRERO-CARBAJAL, Y.C., MOQUET, J.E., EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., The persistence of FISH translocations for retrospective biological dosimetry after simulated whole or partial body irradiation, *Radiat. Prot. Dosim.* **76** (1998) 159–168.
- [217] SEVAN'KAEV, A.V., et al., A cytogenetic follow-up of some highly irradiated victims of the Chernobyl accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **113** (2005) 152–161.
- [218] LINDHOLM, C., SALOMAA, S., Dose assessment of past accidental or chronic exposure using FISH chromosome painting, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 21–25.

- [219] MULLER, I., et al., Time-course of radiation-induced chromosomal aberrations in tumor patients after radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **63** (2005) 1214-1220.
- [220] XUNCLA, M., et al., Cytogenetic damage induced by radiotherapy. Evaluation of protection by amifostine and analysis of chromosome aberrations persistence, *Int. J. Radiat. Biol.* **84** (2008) 243-251.
- [221] SCHMIDBERGER, H., et al., Reciprocal translocations in patients with testicular seminoma before and after radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **50** (2001) 857-864.
- [222] GEBHART, E., NEUBAUER, S., SCHMITT, G., BIRKENHAKE, S. and DUNST, J., Use of a three-colour chromosome in situ suppression technique for the detection of past radiation exposure, *Radiat. Res.* **145** (1996) 47-52.
- [223] PALA, F.S., MOQUET, J.E., EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., *In vitro* transmission of chromosomal aberrations through mitosis in human lymphocytes, *Mutat. Res.* **474** (2001) 139-146.
- [224] GARDNER, S.N., TUCKER, J.D., The cellular lethality of radiation-induced chromosome translocations in human lymphocytes, *Radiat. Res.* **157** (2002) 539-552.
- [225] HANDE, M.P., NATARAJAN, A.T., Induction and persistence of cytogenetic damage in mouse splenocytes following whole-body X irradiation analysed by fluorescence in situ hybridization. IV. Dose response, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 441-448.
- [226] XIAO, Y., DARROUDI, F., GRIGOROVA, M., NATARAJAN, A.T., Induction and persistence of chromosomal exchanges in mouse bone marrow cells following whole-body exposure to X-rays, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 1119-1128.
- [227] ROMM, H., STEPHAN, G., Dose dependency of FISH-detected translocations in stable and unstable cells after Cs gamma irradiation of human lymphocytes *in vitro*, *Cytogenet. Genome Res.* **104** (2004) 162-167.
- [228] RODRIGUEZ, P., et al., Analysis of translocations in stable cells and their implications in retrospective biological dosimetry, *Radiat. Res.* **162** (2004) 31-38.
- [229] BAUCHINGER, M., SCHMID, E., ZITZELBERGER, H., BRASELMANN, H., AHRSTEDT, U., Radiation-induced chromosomal aberrations analyzed by two colour fluorescence in situ hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe, *Int. J. Radiat. Biol.* **64** (1993) 179-84.
- [230] FERNANDEZ, J.L., et al., X-ray biological dosimetry performed by selective painting of human chromosomes 1 and 2, *Int. J. Radiat. Biol.* **67** (1995) 295-302.
- [231] FINNON, P., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., Fluorescence in situ hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry, *Int. J. Radiat. Biol.* (1995) **68** 429-435.
- [232] HSIEH, W.A., et al., Alpha coefficient of dose-response for chromosome translocations measured by FISH in human lymphocytes exposed to chronic ⁶⁰Co gamma rays at body temperature, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 435-439.
- [233] DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., Application of FISH chromosome painting assay for dose reconstruction: State of the art and current views, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 51-58.

- [234] SALISSIDIS, K., SCHMID, E., PETER, R.U., BRASELMANN, H., BAUCHINGER, M., Dicentric and translocation analysis for retrospective dose estimation in humans exposed to ionising radiation during the Chernobyl power plant accident, *Mutat. Res.* **311** (1994) 39–48.
- [235] LLOYD, D.C., et al., “Retrospective dosimetry by chromosomal analysis”, *The Radiological Consequences of the Chernobyl Accident (Proc. Mtg Minsk, 1996)*, Rep. Eur 16544 EN, (1996) 965–973.
- [236] SNIGIRYOVA, G., BRASELMANN, H., SALASSIDIS, K., SHEVCHENKO, V., BAUCHINGER, M., Retrospective biodosimetry of Chernobyl clean-up workers using chromosome painting and conventional chromosome analysis, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 119–127.
- [237] DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., “Biological dosimetric studies in the Chernobyl radiation accident, on populations living in the contaminated areas (Gomel regions) and in Estonian clean-up workers, using FISH technique”, *The Radiological Consequences of the Chernobyl Accident (Proc. Mtg Minsk, 1996)* Eur 16544 EN, (1996) 1067–1072.
- [238] SALISSIDIS, K., et al., Analysis of symmetrical translocations for retrospective biodosimetry in radiation workers of the Mayak nuclear-industrial complex (Southern Urals) using FISH-chromosome painting, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1999) 431–439.
- [239] BAUCHINGER, M., et al., FISH-based analysis of stable translocations in a Techa river population, *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (1998) 605–612.
- [240] TUCKER, J.D., et al., Biological dosimetry of radiation workers at the Sellafield nuclear facility, *Radiat. Res.* **148** (1997) 216–226.
- [241] NAKAMURA, N., MIYAZAWA, C., SAWADA, S., AKIYAMA, M., AWA, A.A., A close correlation between spin resonance (ESR) dosimetry from tooth enamel and cytogenetic dosimetry from lymphocytes of Hiroshima atomic-bomb survivors, *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (1998) 619–627.
- [242] LLOYD, D.C., MOQUET, J.E., ORAM, S., EDWARDS, A.A., LUCAS, J.N., Accidental intake of tritiated water: A cytogenetic follow-up case on translocation stability and dose reconstruction, *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (1998) 543–547.
- [243] RAMALHO, A.T., NASCIMENTO, A.C.H., NATARAJAN, A.T., Dose assessments by cytogenetic analysis in the Goiânia (Brazil) radiation accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **25** (1988) 97–100.
- [244] STRAUME, T., et al., Novel biodosimetry methods applied to victims of the Goiânia accident, *Hlth Phys.* **60** (1991) 71–76.
- [245] STEPHAN, G., PRESSL, S., Chromosome aberrations in human lymphocytes analysed by fluorescence in situ hybridization after *in vitro* irradiation, and in radiation workers, 11 years after an accidental radiation exposure, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 293–299.
- [246] LINDHOLM, C., et al., Biodosimetry after accidental radiation exposure by conventional chromosome analysis and FISH, *Int. J. Radiat. Biol.* **70** (1996) 647–656.
- [247] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, *The Radiological Accident in Lilo*, IAEA, Vienna (2000).
- [248] ROY, L., et al., Study of the tools available in biological dosimetry to estimate the dose in cases of accidental complex overexposure to ionizing radiation: the Lilo accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **82** (2006) 39–48.

- [249] DARROUDI, F., et al., Detection of total and partial body irradiation in a monkey model: a comparative study of chromosomal aberration, micronuclei and premature chromosome condensation assays, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 207-215.
- [250] PRASANNA, P.G.S., KOLANKO, C.J., GERSTENBERG, H.M., BLAKELY, W.F., Premature chromosome condensation assay for biodosimetry: Studies with fission neutrons, *Health Phys.* **72** (1997) 594-600.
- [251] TERZOUDI, G.I., PANTELIS G.E., Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualization after exposure to ionizing radiation, *Radiat. Prot. Dosim.* **122** (2006) 513-520.
- [252] DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., "Premature chromosome condensation, a novel method for biological dosimetry", *High Levels of Natural Radiation (Proc. 10th Int. Congr. Vienna, 1993)*, IAEA, Vienna (1993) 479-485.
- [253] KANDA, R., MINAMIHISAMATSU, M., HAYATA, I., Dynamic analysis of chromosome aberrations in three victims of the Tokai-mura criticality accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **78** (2002) 857-862.
- [254] HAYATA, I., KANDA, R., MINAMIHISAMATSU, M., FURUKAWA, A., SASAKI, M.S., Cytogenetical dose estimation for 3 severely exposed cases in the JCO criticality accident in Tokai-mura, *J. Radiat. Res.* **42** Suppl. (2001) S149-S155.
- [255] ISHIGURE, N., ENDO, A., YAMAGUCHI, Y., KAWACHI, K., Calculation of the absorbed dose for the overexposed patients at the JCO criticality accident in Tokai-mura, *J. Rad. Res.* **42** Suppl. (2000) S137-S148.
- [256] BAUCHINGER, M., BRASELMANN, H., "Use of micronuclei in biological dosimetry of absorbed radiation dose", *Chromosome Aberrations — Basic and Applied Aspects*, Springer-Verlag, Berlin (1989) 202-211.
- [257] KOTELES, G.J., The human lymphocyte micronucleus assay. A review on its applicabilities in occupational and environmental medicine, *Centr. Europ. J. Occup. Environ. Med.* **2** (1996) 12-30.
- [258] FENECH, M., The *in vitro* micronucleus technique, *Mutat. Res.* **455** (2000) 81-95.
- [259] FENECH, M., PEREPETSKAYA, G., MIKHALEVICH, L., A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations — Experiences from the Chernobyl catastrophe, *Environ. Mol. Mutagen.* **30** (1997) 112-118.
- [260] MIKHALEVICH, L.S., et al., Radiation effects in lymphocytes of children living in a Chernobyl contaminated region of Belarus, *Int. J. Radiat. Biol.* **76** (2000) 1377-1385.
- [261] FUCIC, A., et al., Genomic damage in children accidentally exposed to ionizing radiation: A review of the literature, *Mutat. Res.* **658** (2008) 111-123.
- [262] KIRSCH-VOLDERS, M., FENECH, M., Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes, *Mutagenesis* **16** (2001) 51-58.
- [263] ROSEFORT, C., FAUTH, E., ZANKL, H., Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay, *Mutagenesis* **19** (2004) 277-284.
- [264] NORPPA, H., RENZI, L., LINDHOLM, C., Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-block human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization, *Mutagenesis* **8** (1993) 519-525.

- [265] HUBER, R., et al., Detection of centromeres in vinblastine- and radiation-induced micronuclei of human lymphocytes using FISH with an alpha satellite pancentromeric DNA probe, *Environ. Mol. Mutagen.* **27** (1996) 105–109.
- [266] THIERENS, H., et al., Scoring of different cytogenetic endpoints after *in vitro* low dose γ -exposure: interlaboratory comparison for biomonitoring of radiological workers, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 23–34.
- [267] PALA, F.S., et al., The effects of micronuclei with whole chromosomes on biological dose estimation, *Turk. J. Biol.* **32** (2008) 283–290.
- [268] MUELLER, W.U., RODE, A., The micronucleus assay in human lymphocytes after high radiation doses (5–15 Gy), *Mutat. Res.* **502** (2002) 47–51.
- [269] ABRAMSSON-ZETTERBERG, L., ZETTERBERG, G., BERGQVIST, M., GRAWE, J., Human cytogenetic biomonitoring using flow-cytometric analysis of micronuclei in transferring-positive immature peripheral blood reticulocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* **36** (2000) 22–31.
- [270] STOPPER, H., et al., Pilot study for comparison of reticulocyte-micronuclei with lymphocyte-micronuclei in human biomonitoring, *Toxicol. Lett.* **156** (2005) 351–360.
- [271] GRAWE, J., Evaluation of the reticulocyte micronucleus assay in patients treated with radioiodine for thyroid cancer, *Mutat. Res.* **583** (2005) 12–25.
- [272] VRAL, A., Micronuclei induced by fast neutrons versus ^{60}Co γ -rays in human peripheral blood lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* **65** (1994) 321–328.
- [273] VERHAEGEN, F., VRAL, A., Sensitivity of micronucleus induction in human lymphocytes to low LET radiation qualities: RBE and correlation of RBE and LET, *Radiat. Res.* **139** (1994) 208–213.
- [274] WUTTKE, K., MULLER, W.U., STREFFER, C., The sensitivity of the *in vitro* cytokinesis-block micronucleus assay in lymphocytes for different and combined radiation qualities, *Strahlentherapie Onkol.* **174** (1998) 262–268.
- [275] GERSEY, B., et al., Micronuclei induction in human fibroblasts exposed *in vitro* to Los Alamos high-energy neutrons, *Adv. Space Res.* **40** (2007) 1754–1757.
- [276] FENECH, M., AITKEN, C., RINALDI, J., Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults, *Carcinogenesis* **19** (1998) 1163–1171.
- [277] FENECH, M., HOLLAND, N., CHANG, W.P., ZEIGER, E., BONASSI, S., The HUMN Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans, *Mutat. Res.* **428** (1999) 271–283.
- [278] THIERENS, H., VRAL, A., DE RIDDER, L., A cytogenetic study of radiological workers: effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency, *Mutat. Res.* **360** (1996) 75–82.
- [279] THIERENS, H., et al., Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus-centromere assay, *Mutagenesis* **15** (2000) 245–249.
- [280] THIERENS, H., et al., A cytogenetic study of nuclear power plant workers using the micronucleus-centromere assay, *Mutat. Res.* **445** (1999) 105–111.
- [281] CATALAN, J., et al., Age-dependent inclusion of sex chromosomes in lymphocyte micronuclei of man, *Am. J. Hum. Genet.* **63** (1998) 1464–1472.
- [282] CARERE, A., ANTOCCIA, A., CIMINI, D., et al., Analysis of chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-block lymphocytes of 24 male subjects, *Mutagenesis* **14** (1999) 491–496.

- [283] THIERENS, H., VRAL, A., DERIDDER, L., Biological dosimetry using the micronucleus assay for lymphocytes: interindividual differences in dose-response, *Hlth Phys.* **61** (1991) 623–630.
- [284] EASTMOND, D.A., TUCKER, J.D., Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-block human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.* **13** (1989) 34–43.
- [285] LEE, T.K., et al., Micronuclei in lymphocytes of prostate cancer patients undergoing radiation therapy, *Mutat. Res.* **469** (2000) 63–70.
- [286] THIERENS, H., VRAL, A., VAN EIJKEREN, M., SPELEMAN, F., DE RIDDER, L., Micronucleus induction in peripheral blood lymphocytes of patients under radiotherapy treatment for cervical cancer or Hodgkin's disease, *Int. J. Radiat. Biol.*, **67** (1995) 529–539.
- [287] SILVA-BARBOSA, I., PEREIRA-MAGNATA, S., AMARAL, A., SOTERO, G., MELO, H.C., Dose assessment by quantification of chromosome aberrations and micronuclei in peripheral blood lymphocytes from patients exposed to gamma radiation, *Genet. Mol. Biol.* **28** (2005) 452–457.
- [288] LE ROUX, J., SLABBERT, J., SMIT, B., BLEKKENHORST, G., Assessment of the micronucleus assay as a biological dosimeter using cytokinesis-block lymphocytes from cancer patients receiving fractionated partial-body radiotherapy, *Strahlenther. Onkol.* **174** (1998) 75–81.
- [289] IARMARCOVAI, G., et al., Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis, *Mutat. Res.* **659** (2008) 274–283.
- [290] MONSIEURS, M., et al., Patient dosimetry after ¹³¹I lipiodol therapy, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **30** (2003) 554–561.
- [291] LIVINGSTON, G.K., FOSTER, A.E., ELSON, H.R., Effect of in vivo exposure to iodine-131 on the frequency and persistence of micronuclei in human lymphocytes, *J. Toxicol. Environ. Hlth* **40** (1993) 367–375.
- [292] FENECH, M., et al., Micronuclei in cytokinesis-block lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy, *Int. J. Radiat. Biol.* **57** (1990) 373–383.
- [293] DIAS, F.L., et al., Cytogenetic analysis in lymphocytes from workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **23** (2007) 228–233.
- [294] SARI-MINODIER, I., et al., Cytogenetic monitoring by use of the micronucleus assay among hospital workers exposed to low doses of ionizing radiation, *Mutat. Res.* **629** (2007) 111–121.
- [295] THIERENS, H., et al., Micronucleus assay reveals no radiation effects among nuclear power plant workers, *Hlth Phys.* **83** (2002) 178–182.
- [296] VAGLENOV, A., et al., Cytogenetic monitoring of workers from a nuclear power plant, *Centr. Eur. J. Occupation. Environ. Med.* **3** (1997) 40–47.
- [297] LIVINGSTON, G.K., et al., Radiobiological evaluation of immigrants from the vicinity of Chernobyl, *Int. J. Radiat. Biol.* **72** (1997) 703–713.
- [298] TANAKA, K., et al., Unstable-type chromosome aberrations in lymphocytes from individuals living near Semipalatinsk Test Site, *J. Radiat. Res.* **47** (2006) Suppl. A159–A164.
- [299] THIERENS, H., et al., Cytogenetic biodosimetry of an accidental exposure of a radiological worker using multiple assays, *Radiat. Prot. Dosim.* **113** (2005) 408–414.

- [300] MARTIN, P.R., BERDYCHEVSKI, R.E., SUBRAMANIAN, U., BLAKELY, W.F., PRASANNA, P.G.S., Sample tracking in an automated cytogenetic biodosimetry laboratory for radiation mass casualties, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 1119–1124.
- [301] FRIEDMAN, L.I., SEVERNS, M.L., Application of robotics in blood banking, *Vox Sang* **51** Suppl. 1 (1986) S57–S62.
- [302] HANSON, K.L., CARTWRIGHT, C.P., Evaluation of an automated liquid-handling system (Tecan Genesis RSP 100) in the Abbott LCx assay for *Chlamydia trachomatis*, *J. Clin. Microbiol.* **39** (2001) 1975–1977.
- [303] DENG, W., TSAO, S.W., LUCAS, J.N., LEUNG, C.S., CHANG, A.L., A new method for improving metaphase chromosome spreading, *Cytometry* **51** (2003) 46–51.
- [304] WEBER, J., SCHEID, W., TRAUT, H., Time saving in biological dosimetry by using the automatic metaphase finder, *Metafer2*. *Mutat. Res.* **272** (1992) 31–34.
- [305] LLOYD, D.C., “Advances in cytogenetic dosimetry”, *The Medical Basis of Radiation Accident Preparedness II: Clinical Experience and Follow Ups since 1979*, (RICKS, R. E., FRY, S. S. E., Eds), Elsevier, New York, NY (1990) 479–487.
- [306] FINNON, P., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., An assessment of the metaphase finding capability of the Cytoscan 110, *Mutation Res.* **164** (1986) 101–108.
- [307] LLOYD, D.C., “Automated aberration scoring: the requirements of an end-user”, *Automation of Cytogenetics* (LUNDSTEEN, C., PIPER, J., Eds), Springer-Verlag, Heidelberg (1989). 9–17.
- [308] LORCH, T., WITTLER, C., STEPHAN, G., BILLE, J., “An automated chromosome aberration scoring system”, *Automation of Cytogenetics* (LUNDSTEEN, C., PIPER, J., Eds), Springer-Verlag, Heidelberg (1989) 19–30.
- [309] FINNON, P., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., “Progress in automatic dicentric hunting”, *Chromosome Alterations, Origin and Significance* (OBE, G., NATARAJAN, A.T., Eds), Springer-Verlag, Heidelberg (1994) 192–202.
- [310] STEPHAN, G., “Automatische Analyse dizentrischer Chromosomen”, *Methodische Fragen beim Human Population Monitoring in der Zytogenetik* (ARNDT, D., OBE, G., Eds), MMV Verlag, München (1996).
- [311] VAURIJOUX, A., et al., Strategy for Population Triage Based on Dicentric Analysis, *Radiat. Res.* **171** (2009) 541–548.
- [312] CASTELAIN, P., et al., Automated detection of cytochalasin-B blocked binucleated lymphocytes for scoring micronuclei, *Mutagenesis* **8** (1993) 285–293.
- [313] VERHAEGEN, F., et al., Scoring of radiation-induced micronuclei in cytokinesis-block human lymphocytes by automated image analysis, *Cytometry* **17** (1994) 119–127.
- [314] SCHUNK, C., et al., New developments in automated cytogenetic imaging: unattended scoring of dicentric chromosomes, micronuclei, single cell gel electrophoresis, and fluorescence signals, *Cytogenet. Genome Res.* **104** (2004) 383–389.
- [315] VARGA, D., et al., An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis, *Mutagenesis* **19** (2004) 391–397.
- [316] DECORDIER, I., et al., Automated image analysis of cytokinesis-block micronuclei: an adapted protocol and a validated scoring procedure for biomonitoring, *Mutagenesis* **24** (2009) 85–93.

- [317] KORTHOFF, K., CAROTHERS, A.D., Test of performance of four semi-automatic metaphase-finding and karyotyping systems, *Clin. Gen.* **40** (1991) 441-451.
- [318] VROLIK, J., SLOOS, W.C., DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., TANKE, H.J., A system for fluorescence metaphase finding and scoring of chromosomal translocations visualized by in situ hybridisation, *Int. J. Radiat. Biol.* **66** (1994) 287-295.
- [319] WU, Q., SNELLINGS, J., AMORY, L., SUETENS, P., OOSTERIJNCK, A., "Model-based contour analysis in a chromosome segmentation system", *Automation of Cytogenetics*, Springer, Heidelberg (1989) 217-229.
- [320] PIPER, J., et al., Automated fluorescence metaphase finder speeds translocation scoring in FISH painted chromosomes, *Cytometry* **16** (1994) 7-16.
- [321] MASCIO, L.N., et al., Advances in the automated detection of metaphase chromosomes labelled with fluorescence dyes, *Cytometry* **33** (1998) 10-18.
- [322] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Generic procedures for medical response during a nuclear or radiological emergency, *EPR-MEDICAL IAEA*, Vienna (2005).
- [323] AGENCE INTERNATIONALE DE L'ÉNERGIE ATOMIQUE, Manuel destiné aux premiers intervenants en cas de situation d'urgence radiologique, *IAEA-EPR-PREMIERS INTERVENANTS 2006*, AIEA, Vienne (2008).
- [324] NATIONAL COUNCIL OF RADIATION PROTECTION AND MEASUREMENTS, Key elements of preparing emergency responders for nuclear and radiological terrorism, *Commentary No. 19*, Bethesda, MD (2005).
- [325] WASELENKO, J.K., et al., Medical management of the acute radiation syndrome: Recommendations of the Strategic National Stockpile Working Group, *Ann. Intern. Med.* **140** (2004) 1037-1051.
- [326] ALEXANDER, G.A., et al., BiodosEPR-2006 Meeting: Acute dosimetry consensus committee recommendations on biodosimetry applications in events involving uses of radiation by terrorists and radiation accidents, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 972-996.
- [327] FLYNN, D.F., GOANS, R.E., Nuclear terrorism: triage and medical management of radiation and combined-injury casualties, *Surg. Clin. N. Am.* **86** (2006) 601-636.
- [328] BLAKELY, W.F., WALTER, C.A., PRASANNA, P.G.S., Early-response biological dosimetry—recommended countermeasure enhancements for mass casualty radiological incidents and terrorism, *Health Phys.* **89** (2005) 494-504.
- [329] BLAKELY, W.F., Early Biodosimetry Response: Recommendations for Mass-Casualty Radiation Accidents and Terrorism (Refresher Course for the 12th International Congress of the International Radiation Protection Association, Buenos Aires, 19-24 October 2008), http://www.irpa12.org.ar/PDF/RC/RC_12_fullpaper.pdf
- [330] MURATA, H., AKASHI, M., The report of the criticality accident in a uranium conversion test plant in Tokai-mura, NIRS-M-154, National Institute of Radiation Sciences, Japan (2002).
- [331] US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Radiation Event Medical Management, <http://www.remm.nlm.gov/>
- [332] LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., MOQUET, J.E., GUERRERO-CARBAJAL, Y.C., The role of cytogenetics in early triage of radiation casualties, *Appl. Radiat. Isot.* **52** (2000) 1107-1112.

- [333] VOISIN, P., et al., The cytogenetic dosimetry of recent accidental overexposure, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)* **47** (2001) 557–564.
- [334] FLEGAL, F.N., DEVANTIER, Y., MCNAMEE, J.P., WILKINS, R.C., QuickScan dicentric chromosome analysis for radiation biodosimetry, *Hlth Phys.* **98** (2010) 276–281.
- [335] LINDHOLM, C., et al., Premature chromosome condensation (PCC) assay for dose assessment in mass casualty accidents, *Radiat. Res.* **173** (2010) 71–78.
- [336] MCNAMEE, J.P., FLEGAL, F.N., BOULAY GREENE, H., MARRO, L., WILKINS R.C., Validation of the Cytokinesis-Block Micronucleus (CBMN) assay for use as a triage biological dosimetry tool, *Radiat. Prot. Dosim.* **135** (2009) 232–242.
- [337] YOSHIDA, M.A., et al., The Chromosome Network for biodosimetry in Japan, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 1125–1127.
- [338] MILLER, S. M., et al., Canadian Cytogenetic Emergency Network (CEN) for biological dosimetry following radiological/nuclear accidents, *Int. J. Radiat. Biol.* **83** (2007) 471–477.
- [339] WOJCIK, A., LLOYD, D., ROMM, H., ROY, L., Biological dosimetry for triage of casualties in a large-scale radiological emergency: Capacity of the EU member states, *Radiat. Prot. Dosim.* **138** (2010) 397–401.
- [340] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, RANET Assistance Action Plan – Arrangements for Providing International Assistance and Sample of Assistance Action Plan, IAEA, Vienna, Austria, 2006.
- [341] BLAKELY, W.F., et al., WHO 1st consultation on the development of a global biodosimetry laboratories network for radiation emergencies (BioDoseNet), *Radiat. Res.* **171** (2009) 127–39.
- [342] SEVAN'KAEV, A.V., Results of cytogenetic studies of the consequences of the Chernobyl accident, *Radiat. Biol. Radioecol.* **40** (2000) 589–595.
- [343] MAZNIK, N.A., VINNIKOV, V.A., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., Chromosomal dosimetry for some groups of evacuees from Prypiat and Ukrainian liquidators, *Radiat. Prot. Dosim.* **74** (1997) 5–11.
- [344] SHEVCHENKO, V.A., SNIGIRYOVA, G.P., “Cytogenetic effects of the action of ionizing radiations on human population”, *Research Activities about the Radiological Consequences of the Chernobyl NPS Accident and Social Activities to Assist the Sufferers by the Accident* (IMANAKA,T., Ed.), Research Reactor Institute, Kyoto University (1998) 203–215.
- [345] SEVAN'KAEV, A.V., et al., A survey of chromosomal aberrations in lymphocytes of Chernobyl liquidators, *Radiat. Prot. Dosim.* **58** (1995) 85–91.
- [346] MAZNIK, N.A., VINNIKOV, V.A., The retrospective cytogenetic dosimetry using the results of conventional chromosomal analysis in Chernobyl clean-up workers, *Radiat. Biol. Radioecol.* **45** (2005) 700–708.
- [347] SEVAN'KAEV, A.V., et al., Novel data set for retrospective biodosimetry using both conventional and FISH chromosome analysis after high accidental overexposure, *Appl. Radiat. Isot.* **52** (2000) 1149–1152.
- [348] EDWARDS, A., et al., Biological estimates of dose to inhabitants of Belarus and Ukraine following the Chernobyl accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **111** (2004) 211–219.
- [349] KOKSAL, G., PALA, F.S., DALCI, D.O., *In vitro* dose-response curve for chromosome aberrations induced in human lymphocytes by ⁶⁰Co gamma-radiation, *Mutat. Res.* **329** (1995) 57–61.

- [350] RAMALHO, A.T., NASCIMENTO, A.C., The fate of chromosomal aberrations in ^{137}Cs -exposed individuals in the Goiânia radiation accident, *Health Phys.* **60** (1991) 67-70.
- [351] SASAKI, M.S., HAYATA, I., KAMADA, N., KODAMA, Y., KODAMA, S., Chromosome aberration analysis in persons exposed to low-level radiation from the JCO criticality accident in Tokai-mura, *J. Radiat. Res.* **42** Suppl. (2001) S107-S116.
- [352] JINARATANA, V., The Radiological Accident in Thailand, Parthenon Publishing, (2002) 283–301.
- [353] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, The Radiological Accident in Nueva Aldea, IAEA, Vienna (2009).
- [354] BERTHO, J.M., ROY, L., A rapid multiparametric method for victim triage in cases of accidental protracted irradiation or delayed analysis, *Br. J. Rad.* **82** (2009) 764–770.
- [355] WORLD HEALTH ORGANIZATION, Biorisk Management: Laboratory Biosecurity Guidance, WHO, Geneva (2006).
- [356] ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ, Manuel de sécurité biologique en laboratoire, Troisième édition, OMS, Genève (2005).
- [357] AGENCE INTERNATIONALE DE L'ÉNERGIE ATOMIQUE, Glossaire de sûreté de l'AIEA, Terminologie employée en sûreté nucléaire et en radioprotection, Édition 2007, AIEA, Vienne (2007).

Annexe I

ANALYSE DES DICENTRIQUES

La diversité des méthodes et du matériel relatifs à la culture des lymphocytes et à leur traitement qui sont couramment utilisés par les laboratoires du monde entier a été exposée et analysée et il n'existe probablement pas deux laboratoires qui appliquent exactement la même technique. La présente annexe décrit, de manière détaillée et étape par étape, une méthode fiable qui peut être utile pour certains laboratoires.

I-1. CULTURE DES LYMPHOCYTES

I-1.1. Matériel

- 1) Sang total hépariné.
- 2) Phytohémagglutinine (PHA) disponible sur le marché. Si elle est fournie lyophilisée, elle doit être reconstituée à l'aide d'une eau stérile de qualité pour analyse.
- 3) Milieu essentiel minimum (MEM) de Eagle disponible sur le marché : prêt à l'emploi, concentré 10 fois ou en poudre. Les solutions de travail sont obtenues à l'aide d'une eau stérile de qualité pour analyse. Il peut être nécessaire d'ajouter de la L-glutamine, selon les instructions du fabricant. Le pH devra être ajusté avec du bicarbonate de sodium stérile.
 - i) Il peut être nécessaire d'ajouter des antibiotiques à un milieu fabriqué à partir d'un concentré. Ajouter 1 ml de solution mère saline d'antibiotiques à 100 ml de milieu. La solution mère doit contenir 100 UI/ml de benzylpénicilline et 100 µg/ml de sulfate de streptomycine et peut être congelée.
- 4) Bromodésoxyuridine (BrdU). Ajouter 1 ml de solution mère à 100 ml de milieu. La solution mère est constituée de 6,4 mg de BrdU dissous dans 10 ml de milieu et passé à travers un filtre à membrane. Sa concentration finale dans le milieu de culture est de 15 µM. La solution mère peut être conservée pendant un mois dans l'obscurité à 4 °C ou pendant plusieurs mois à -20 °C.
- 5) Sérum fœtal de veau rendu inactif en le chauffant (à 56 °C pendant ½ heure) disponible sur le marché et congelé.
- 6) Colcemid : solution de 10 µg/ml dans une solution saline physiologique stérile. Il peut être conservé à 4 °C pendant six mois.
- 7) Récipients de culture stériles. Il existe différentes possibilités, par exemple des bouteilles en verre utilisées en bactériologie ou des récipients en plastique jetables. Leur volume doit être compris entre 15 et 20 ml.
- 8) La mise en culture doit être effectuée dans une enceinte de sécurité biologique de classe 2 sous une lumière tamisée. Pour transférer les liquides entre récipients, il convient d'utiliser des seringues jetables ou des pipettes stériles. S'il est nécessaire de faire passer du sang par une seringue hypodermique, cette opération doit être effectuée lentement et en utilisant une aiguille de gros calibre (calibre 19) afin de réduire autant que possible les tensions de cisaillement exercées sur les cellules.

I-1.2. Méthode

- 1) Verser 0,3 ml de sang hépariné dans un récipient de culture.
- 2) Rajouter 4,0 ml du milieu de culture, auquel les antibiotiques et la bromodésoxyuridine ont déjà été ajoutés.
- 3) Ajouter 0,1 ml de PHA reconstituée.
- 4) Ajouter 0,5 ml de sérum foetal de veau.
- 5) Fermer hermétiquement le couvercle.
- 6) Mélanger le contenu du récipient en l'agitant doucement.
- 7) Incuber à $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ dans l'obscurité pendant 45 heures.
- 8) Ajouter 50 μl d'une solution mère de Colcemid à la culture et agiter doucement.
- 9) Remettre dans l'incubateur pendant trois heures de plus.

I-2. FIXATION ET PRÉPARATION DES LAMES

I-2.1. Méthode

- 1) Verser le contenu du récipient de culture dans un tube à centrifuger.
- 2) Centrifuger à 200 g pendant 10 minutes (pour convertir les g en tours/mn, utiliser la formule $g = r\omega^2/981$ où r est le rayon en cm et $\omega = (2 \pi \times \text{tours/mn})/60$).
- 3) Retirer le surnageant par aspiration et remettre en suspension le culot cellulaire dans 5 à 10 ml d'une solution de chlorure de potassium à 0,075 M.
- 4) Laisser reposer à température ambiante pendant 15 à 20 minutes.
- 5) Centrifuger à nouveau à 200 g pendant 10 minutes.
- 6) Retirer le surnageant et remettre en suspension les cellules dans 5 à 10 ml de fixateur, un mélange de méthanol et d'acide acétique (3/1), préparé récemment. Le fixateur doit être ajouté lentement mais à un débit constant tandis que la solution est agitée vigoureusement, dans l'idéal en utilisant un agitateur vortex, afin d'empêcher que le culot cellulaire ne devienne un amas solide. Pour être sûr qu'un tel amas ne se forme pas, on peut se servir d'une pipette Pasteur munie d'une poire en caoutchouc afin de mélanger doucement le culot cellulaire avant d'ajouter le fixateur.
- 7) Centrifuger à nouveau.
- 8) Retirer le surnageant et remettre en suspension dans 5 à 10 ml de fixateur.
- 9) Centrifuger à nouveau.
- 10) Retirer le surnageant et remettre en suspension dans 5 à 10 ml de fixateur.
- 11) Centrifuger à nouveau.
- 12) Retirer tout le surnageant sauf 0,25 ml et remettre en suspension le culot cellulaire dans le liquide restant.
- 13) Aspirer la suspension cellulaire dans une pipette Pasteur.
- 14) Prendre une lame propre et exempte de graisse qui a été préalablement conservée au congélateur. Faire fondre le givre qui se trouve sur la lame en soufflant dessus.

- 15) Verser sur la lame une ou deux gouttes de la suspension cellulaire d'une hauteur d'au moins 10 cm.
- 16) Préparer au moins deux lames pour chaque culture.
- 17) Sécher les lames à feu doux sur une plaque chauffante.

I-3. COLORATION

I-3.1. Matériel

- 1) Colorant Hoechst 33258. Une solution mère concentrée 1 000 fois peut être diluée à 50 µg/ml, tamponnée au phosphate à un pH de 6,8 et conservée à 4 °C dans l'obscurité.
- 2) Colorant de Giemsa.
- 3) Tampon de phosphate (pH 6,8) préparé à partir de comprimés du commerce.
- 4) SSC (concentration x 2) (chlorure de sodium et citrate trisodique) : 17,53 g de chlorure de sodium et 8,82 g de citrate de sodium auxquels on ajoute de l'eau distillée jusqu'à obtenir 1,0 L de solution.
- 5) Xylène et milieu de montage DPX.
- 6) Lampe à ultraviolets ($\lambda > 310$ nm) ou lampe fluorescente.

I-3.2. Méthodes

Il convient de conserver les lames quelques jours (jusqu'à cinq) à température ambiante entre leur préparation et le début d'une coloration par FPG, alors que le colorant classique de Giemsa peut être utilisé dès que les lames sont sèches. Sinon, les lames peuvent être séchées à 37 °C et colorées par FPG le jour suivant.

Fluorescence plus Giemsa (FPG)

- 1) Verser environ 10 gouttes du colorant Hoechst (dilué une concentration de 0,5 µg/ml à partir de la solution mère) sur la lame et la recouvrir d'une lamelle.
- 2) Mettre la lame sur du papier d'aluminium et sous une lampe à ultraviolets pendant ½ heure.
- 3) Retirer la lamelle avec précaution.
- 4) Laver soigneusement la lame dans le tampon de pH 6,8.
- 5) Mettre la lame dans une SSC (concentration x 2) à 60 °C pendant 20 à 30 minutes.
- 6) Laver à l'eau distillée.
- 7) Mettre les lames dans du colorant de Giemsa – solution à 5 ou 10 % dans le tampon de pH 6,8 pendant trois minutes.
- 8) Rincer rapidement avec le tampon.
- 9) Rincer rapidement à l'eau distillée.
- 10) Sécher à l'air.
- 11) Nettoyer et fixer sous une lamelle.

Giemsa classique

- 1) Mettre la lame dans du colorant de Giemsa à 2 % dans un tampon de pH 6,8 pendant cinq minutes.
- 2) Laver au tampon.
- 3) Rincer rapidement à l'eau distillée.
- 4) Sécher à l'air.
- 5) Nettoyer et fixer sous une lamelle.

Annexe II

DÉNOMBREMENT DES TRANSLOCATIONS PAR LA MÉTHODE FISH

La méthode décrite ici fait appel à des sondes – disponibles sur le marché – marquées directement et indirectement et présente une peinture de trois paires de chromosomes dans trois couleurs différentes, tous les centromères étant peints dans une quatrième couleur et le reste des chromosomes contre-coloré. Les fabricants de produits fournissent des protocoles qui peuvent être consultés parallèlement à cette méthode.

II-1.1. Prétraitement

Laver les lames dans une PBS pendant cinq minutes à température ambiante. Les déshydrater dans des bains successifs d'éthanol (à 70, 90 et 100 %) pendant deux à cinq minutes chacun à température ambiante et sécher à l'air.

II-1.2. ARNase et traitement à la pepsine

Mélanger 445 µl d'eau, 50 µl de SSC (concentration x 20) et 5 µl d'ARNase A (10 µg/µl) (ce mélange peut être préparé à l'avance et doit être conservé à -20 °C). Pipetter 100 µl d'ARNase A pour chaque lame et recouvrir celles-ci d'une lamelle. Incuber dans une chambre humide pendant 60 minutes à 37 °C.

Laver trois fois dans une SSC (concentration x 2) (cinq minutes par lame à température ambiante). Pendant le premier lavage, retirer la lamelle. Laver ensuite dans une PBS pendant cinq minutes à température ambiante. Pour le traitement à la pepsine (0,005 % dans une solution d'acide chlorhydrique à 10 mM), préparer un mélange constitué de 50 µl de pepsine (à 10 %), de 99 ml d'eau et d'1 ml d'une solution normale d'acide chlorhydrique. Ce mélange peut être conservé à -20 °C avant d'être utilisé. Préchauffer le mélange dans un bain-marie à 37 °C, verser 100 µl de celui-ci sur chaque lame et attendre une ou deux minutes. Laver dans une PBS pendant cinq minutes à température ambiante.

Laver avec un mélange de chlorure de magnésium et d'une PBS à 50 mM (5 ml de MgCl₂ et 95 ml d'une PBS) pendant cinq minutes à température ambiante. Laver avec une solution de formol à 1 % dans un mélange MgCl₂-PBS pendant 10 minutes à température ambiante. Rincer avec une PBS pendant cinq minutes à température ambiante. Déshydrater les lames dans des bains successifs d'éthanol (à 70, 90 et 100 %) pendant 2 à 5 minutes chacun à température ambiante et sécher à l'air.

II-1.3. Protocole applicable à la méthode FISH lorsque les sondes chromosomiques sont associées à une sonde centromérique

Chauffer les sondes chromosomiques à 42 °C et bien les agiter avant de les utiliser. Verser une quantité suffisante de chaque sonde dans un tube Eppendorf contenant un tampon d'hybridation, agiter vigoureusement et centrifuger.

a) *Dénaturation*

Les sondes chromosomiques peuvent être dénaturées par incubation à 65 °C pendant 10 minutes au bain-marie. Les verser ensuite sur de la glace, attendre deux ou trois minutes, puis les mettre dans un bain-marie (à 37 °C) et les incuber pendant 60 minutes.

Lorsque l'on utilise à la fois des sondes chromosomiques et une sonde centromérique (SC), commencer par chauffer la SC et le tampon d'hybridation à 37 °C pendant 30 minutes avant que la compétition entre sondes ne s'effectue. Dénaturer la SC en l'incubant à 85 % pendant

10 minutes au bain-marie puis la verser immédiatement sur de la glace et attendre deux ou trois minutes.

Pour la méthode FISH à trois couleurs avec utilisation d'une sonde centromérique, il faut disposer de 18 à 20 µl de mélange d'hybridation par lame (c'est-à-dire que pour chacune des trois sondes chromosomiques concentrées, il faut ajouter 1,6 µl du tampon adéquat et 2 ou 3 µl de SC concentrée).

Par exemple, si les chromosomes 1, 4 et 8 sont peints : pour le chromosome 1, la sonde est marquée à la biotine, pour le 4, à la biotine et au FITC et pour le 8 au FITC, tandis que la sonde centromérique est marquée au FITC. Les couleurs obtenues sont respectivement le rouge, le jaune, le vert et le vert.

b) Préhybridation

La préhybridation des lames doit débuter environ 30 minutes avant la fin de la compétition entre sondes. Verser 100 µl de formamide à 70 % dans une SSC (concentration x 2) et une PBS à 50 mM sur chaque lame et recouvrir d'une lamelle [350 µl de formamide à 100 % déionisé (conservé à -20 °C), 50 µl d'une PBS semi-molaire (conservée à -20 °C) et 50 µl de SSC (concentration x 20)]. Le formamide doit être déionisé peu de temps avant d'être utilisé.

Dénaturer les lames à 70 °C pendant 2 minutes 30 sur une plaque chauffante. Les déshydrater dans un bain d'éthanol (conservé à -20 °C) à 70 % pendant cinq minutes, puis deux bains d'éthanol à 90 et 100 % pendant cinq minutes chacun à température ambiante. Laisser les lames sécher à l'air.

c) Hybridation

Bien mélanger toutes les sondes chromosomiques et la SC dans un tube Eppendorf. Centrifuger pendant quelques secondes puis verser 20 µl du mélange sur chaque lame, recouvrir d'une lamelle, fermer hermétiquement avec de la colle caoutchouc et laisser sécher à l'air. Les lames doivent ensuite être incubées pendant la nuit en chambre humide à 42 °C. Cette incubation peut durer jusqu'à deux jours.

Détection :

- 1) Préparer une solution de lavage de SSC (concentration x 4) contenant 0,05 % de Tween 20.
- 2) Diluer la protéine bloquante à 15 % en volume dans la solution de lavage.
- 3) Utiliser la protéine bloquante diluée pour diluer les anticorps comme suit :
 - 3.1.1 Première couche, B3 (1/500) (Texas Red Avidin).
 - 3.1.2 Deuxième couche, B4 (1/250) (antiavidine de chèvre biotynylée).
 - 3.1.3 F1 (1/200) (anti-FITC de lapin).
 - 3.1.4 Troisième couche, B3 (1/500) et F2 (IgG de chèvre anti-IGG de lapin marquée au FITC).
 - 3.1.5 F2 (1/100).
- 4) Incuber dans l'obscurité pendant 10 minutes à température ambiante, passer à la microcentrifugeuse à 11 000 g pendant 10 minutes et récupérer le surnageant.

- 5) Préchauffer les solutions suivantes à 42 °C :
 - i) La solution de lavage,
 - ii) Une SSC (concentration x 2),
 - iii) Du formamide à 50 % dans une SSC (concentration x 2),
 - iv) Une SSC à 0,1 %.
- 6) Retirer les lamelles avec précaution en mettant les lames dans un bocal de SSC (concentration x 2) chauffé.
- 7) Laver les lames dans les solutions chauffées dans l'ordre suivant :
 - i) La solution de lavage,
 - ii) La SSC (concentration x 2),
 - iii) Du formamide à 50 % dans la SSC (concentration x 2).
- 8) Verser 100 µl de la protéine bloquante diluée sur chaque face et recouvrir d'une lamelle, incubé en chambre humide pendant 15 à 20 minutes à 37 °C.
- 9) Laver les lames avec du Tween 20 à 0,05 % dans une SSC (concentration x 4) pendant deux à cinq minutes à 42 °C.
- 10) Verser 100 µl de la première couche d'anticorps sur chaque lame et recouvrir d'une lamelle. Incuber en chambre humide pendant 20 à 30 minutes à 37 °C.
- 11) Laver les lames avec du Tween 20 à 0,05 % dans une SSC (concentration x 4) trois fois (cinq minutes à chaque fois) à 42 °C.
- 12) Verser 100 µl de la deuxième couche d'anticorps sur chaque lame et recouvrir d'une lamelle. Incuber en chambre humide pendant 20 à 30 minutes à 37 °C.
- 13) Laver les lames avec du Tween 20 à 0,05 % dans une SSC (concentration x 4) trois fois (cinq minutes à chaque fois) à 42 °C.
- 14) Verser 100 µl de la troisième couche d'anticorps sur chaque lame et recouvrir d'une lamelle. Incuber en chambre humide pendant 20 à 30 minutes à 37 °C.
- 15) Laver les lames avec du Tween 20 à 0,05 % dans une SSC (concentration x 4) trois fois (cinq minutes à chaque fois) à 42 °C.
- 16) Déshydrater les lames dans des bains successifs d'éthanol (à 70, 90 et 100 %) pendant 2 à 5 minutes chacun à température ambiante.
- 17) Les laisser sécher à l'air.
- 18) Contre-colorer au DAPI (0,15 µg/ml dans un milieu de montage Vectashield), 25 µl par lame sous une lamelle.

Si aucune couleur n'est suffisamment vive, on peut, entre l'étape 15 et l'étape 16, verser à nouveau les deuxième et troisième couches en répétant les étapes 12 à 15. Si seule une couleur est pâle, on peut répéter les étapes B3, lavage et B4 pour le Texas Red et F1, lavage et F2 pour le FITC.

Annexe III

CONDENSATION PRÉMATURÉE DES CHROMOSOMES

III-1. PCC PAR FUSION EN MITOSE

Des cellules mononucléaires de sang périphérique humain sont fusionnées avec des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) en mitose en présence de polyéthylène glycol (PEG). Comme la fusion cellulaire s'effectue en seulement une heure, la chromatine des cellules sanguines mononucléaires se condense puis, peu après, la membrane de ces cellules se dissout et la chromatine se condense davantage pour former 46 ($2n = 46$) chromosomes à chromatide unique.

III-1.1. Isolation des lymphocytes du sang périphérique humain

Pour séparer les cellules mononucléaires du sang total prélevé sur anticoagulant, on peut utiliser un tube de séparation de cellules LeucoPREP ou Ficoll-Hypaque.

A. LeucoPREP

Le LeucoPREP est un tube qui contient un milieu de séparation, lequel, comme le Ficoll-Hypaque, se sert du fait que la densité des cellules mononucléaires et des plaquettes est plus faible que celle des autres constituants du sang total prélevé sur anticoagulant. La séparation s'effectue lorsque le sang est placé dans le tube sur la couche de gel et lorsque le tube est soumis à une force centrifuge précise pendant une durée déterminée. Les lavages et les centrifugations ultérieurs réduisent la quantité de plaquettes présente. Les préparations de cellules mononucléaires viables obtenues peuvent être utilisées pour une PCC.

- 1) Conserver les tubes LeucoPREP (de 10 ml) verticaux à température ambiante (18–25 °C).
- 2) Prélever du sang par ponction veineuse dans un tube hépariné.
- 3) Les constituants du sang prélevé sur de l'héparine doivent être séparés dans les deux heures qui suivent le prélèvement.
- 4) Verser du sang non dilué (8 à 10 ml) dans chaque tube LeucoPREP puis centrifuger pendant 15 minutes à 400–600 g à température ambiante.
- 5) À l'issue de la centrifugation, les cellules mononucléaires et les plaquettes se trouvent dans une couche blanche floconneuse juste en dessous de la couche de plasma. Aspirer autant de plasma que possible sans aspirer ces cellules. Recueillir la couche de cellules avec une pipette Pasteur et la verser dans un tube à centrifuger à fond conique de 10 ml muni d'un bouchon.
- 6) Remettre le culot cellulaire en suspension en le centrifugeant lentement. Ajouter du F10 (10 ml), mélanger les cellules en retournant les tubes trois ou quatre fois puis centrifuger pendant 10 minutes à 100 g.
- 7) Effectuer à nouveau l'étape 5.

B. Système gradient Ficoll-Hypaque

Le Ficoll-Paque est une solution aqueuse dont la densité s'élève à $1,077 \pm 0,001$ g/ml et qui contient 5,7 g de Ficoll 400 et 9 g de diatrizoate de sodium pour 100 ml.

- 1) Prélever du sang par ponction veineuse dans un tube hépariné.
- 2) Diluer les échantillons de sang avec le même volume d'une solution saline équilibrée.

- 3) Verser – goutte à goutte – environ 5 ml de sang dilué sur le dessus du Ficoll-Hypaque (3 ml) sans les mélanger.
- 4) Centrifuger les tubes pendant 30 minutes à 400 g à 8–10 °C.
- 5) Recueillir les lymphocytes (couche du milieu) et laver trois fois (centrifuger à 100 g pendant 10 minutes) avec 5 ml de F10 contenant 5 % de sérum fœtal de veau.

Les lymphocytes isolés peuvent être utilisés sur-le-champ pour effectuer une PCC ou congelés pour un usage ultérieur.

III–1.2. Congélation des lymphocytes isolés

Après le deuxième lavage au F10 et la centrifugation associée, remettre le culot cellulaire en suspension en le centrifugeant lentement et préparer une suspension cellulaire contenant en égales proportions, d'une part, du F10 et 40 % de sérum fœtal de veau (SFV) et, d'autre part, du F10, 40 % de SFV et 20 % de DMSO. Constituer les suspensions cellulaires de telle sorte que chaque ampoule (de 1,5 ml) contienne environ 8×10^6 lymphocytes isolés. Pour la congélation, la meilleure méthode consiste à utiliser un appareil qui peut faire baisser progressivement la température. Pour finir, conserver les ampoules congelées à -110 °C ou dans de l'azote liquide.

III–1.3. Décongélation des lymphocytes isolés

Retirer les ampoules de lymphocytes du congélateur et les placer directement dans un bain-marie (à 37 °C). Lorsque la substance a légèrement fondu, verser toute la suspension dans un tube à centrifuger (de 10 ml). Verser du RPMI et 40 % de SFV froids (4 °C) sur les suspensions de lymphocytes lentement et goutte à goutte (cela prend environ 30 minutes), puis centrifuger pendant 10 minutes à 100 g. Remettre en suspension le culot cellulaire dans 5 ml de RPMI avec 40 % de SFV. Les lymphocytes mononucléaires obtenus peuvent être utilisés pour effectuer une PCC.

III–1.4. Récupération et préparation des cellules ovariennes de hamster chinois en mitose

Les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) sont cultivées dans des flacons classiques ou roulants (de 750 ml) dans un milieu complet [F10, 15 % de sérum de veau nouveau-né et antibiotiques (pénicilline à 100 UI/ml et streptomycine à 100 µg/ml)]. On ajoute du Colcemid (à 0,1 µg/ml) aux cellules lorsqu'elles croissent à une vitesse exponentielle puis on prélève les cellules en mitose par une méthode classique de séparation sélective (agitation des flacons) quatre ou cinq heures après. Les cellules CHO peuvent également être cultivées durant plus de deux cycles cellulaires (~32 heures) dans un milieu complet supplémenté avec de la BrdU (concentration finale de 5 µM). Les cellules CHO mitotiques obtenues seront toutes colorées de manière non uniforme et présenteront des couleurs pâles après une coloration à la FPG. De ce fait, les lymphocytes qui ont subi une PCC se distingueront mieux parmi les cellules CHO en mitose.

- 1) Congélation des cellules CHO en mitose

Les cellules CHO en mitose peuvent soit être préparées et utilisées immédiatement pour être fusionnées, soit être extraites d'un stock congelé dans un milieu complet supplémenté avec du DMSO à 8 %. Les répartir en petits aliquots ($2,5 \times 10^6$ /ampoule de 1,5 ml) et les conserver à -110 °C.

2) Décongélation des cellules CHO en mitose

Sortir les ampoules de cellules CHO en mitose du congélateur et les mettre dans un bain-marie à 37 °C puis verser la suspension cellulaire dans un tube à centrifuger et ajouter 10 ml de milieu. Centrifuger pendant 10 minutes à 100 g. Retirer le surnageant, ajouter du milieu (5 ml) et laisser sur de la glace jusqu'à utilisation.

III-1.5. Préparation de la solution de polyéthylène glycol (PEG)

Verser 400 mg de PEG (MM 1450, Sigma, 40 % en m/v) dans un petit (10 ml) tube à centrifuger à fond rond et ajouter 600 µl de solution saline équilibrée de Hank (HBSS), d'une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) ou de F10 et laisser les tubes au bain-marie à 37 °C pendant 15 minutes. Il est également possible de commencer par faire fondre le PEG dans un four puis de le mélanger à la HBSS, à une PBS ou au F10.

III-1.6. Fusion des cellules

- 1) Laver une fois séparément les lymphocytes en interphase et les cellules CHO en mitose avec de la HBSS ou du F10 (10 ml). Centrifuger pendant cinq minutes à 100 g puis éliminer le surnageant. Dans un tube de culture à fond rond, mélanger les cellules en interphase et les cellules CHO en mitose (proportions : 5/1) dans 10 ml de F10 et centrifuger pendant cinq minutes à 100 g (une vitesse plus élevée peut entraîner une trop forte condensation du culot cellulaire).
- 2) Retirer le surnageant et laisser les tubes à l'envers. Faire sécher les gouttes du milieu qui subsistent en mettant les tubes à l'envers dans un portoir pour tubes à essai sur du papier essuie-tout.
- 3) Si, dans le tube, des bulles d'air se forment sur le dessus du culot cellulaire, il convient de les enlever avec une pipette Pasteur.
- 4) À l'aide d'une micropipette (de 200 µl), prélever 0,15 ml de PEG et le verser directement sur le culot cellulaire puis mettre le tube dans un portoir pour tubes à essai pendant une minute 30. Agiter le tube très doucement trois fois (à 30 secondes d'intervalle). À ce stade, le culot cellulaire doit apparaître détaché du fond du tube et former de gros amas dans la solution de PEG.
- 5) Ajouter 1,5 ou 2 ml de F10 ou d'une PBS très lentement pendant trois minutes (0,5 ml par minute). Mélanger doucement la suspension cellulaire en tapotant le tube.
- 6) Centrifuger le tube pendant cinq minutes à 100 g.
- 7) Retirer complètement le surnageant et ajouter 0,5 ml du milieu de culture (F10 et 15 % de sérum fœtal de veau). Enfin, verser 50 µl de Colcemid (concentration finale : 1 µg/ml) en tapotant doucement le tube afin de former de petits amas. Incuber le tube à essai à 37 °C pendant une heure. À ce stade, la fusion cellulaire et la PCC sont achevées.

III-1.7. Protocole de fixation

- 1) Ajouter 7 à 8 ml d'une solution hypotonique (KCl, 5,6 g/L) préalablement chauffée dans chaque tube et incuber pendant 10 minutes à 37 °C.
- 2) Centrifuger le tube pendant cinq minutes à 100 g.
- 3) Éliminer le surnageant jusqu'à 0,5 ml au-dessus du culot cellulaire. Les cellules sont fixées par 5 ml d'un mélange de méthanol et d'acide acétique (proportions : 3/1).
- 4) Centrifuger le tube pendant cinq minutes à 100 g.

- 5) Répéter les étapes 3 et 4 deux fois de plus.
- 6) À l'issue de la dernière centrifugation, éliminer le surnageant et laisser environ 0,3 ml de fixateur au-dessus du culot cellulaire. Briser ensuite le culot doucement et ajouter 0,5 ou 1 ml de fixateur tout en tapotant légèrement sur le tube.

III-1.8. Préparation des lames

À l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, déposer des cellules sur des lames préalablement nettoyées. Souffler doucement sur les préparations sous une lampe à infrarouge en observant la formation d'anneaux de Newton.

III-1.9. Protocoles de coloration

Lorsque les cellules CHO en mitose ne sont pas préalablement marquées à la BrdU, les lames peuvent être colorées avec une solution aqueuse de Giemsa (Gurr R66 amélioré) pendant cinq minutes.

Dans le cas contraire, les lames peuvent être colorées à la FPG (section 9.3). À la fin, les rincer à l'eau distillée, les laisser sécher puis les fixer sous une lamelle de 24 x 60 mm. Rappelons toutefois une remarque formulée dans la section 11.2.1.6, à savoir que cette méthode n'est généralement pas la technique de coloration privilégiée et qu'une coloration simple au Giemsa est souvent suffisante.

Pour effectuer un marquage en bandes C des chromosomes qui ont subi une PCC (pour une analyse des dicentriques), il faut traiter les lames qui viennent d'être préparées avec une solution normale d'acide chlorhydrique (HCl) pendant cinq minutes puis les laver dans du HCl de normalité 0,2 pendant cinq minutes. Sécher ensuite les lames avec de l'essuie-tout et les traiter avec une solution d'hydroxyde de baryum (à 5 %) pendant trois minutes à température ambiante. Les laver dans du HCl de normalité 0,2 pendant cinq minutes. Incuber ensuite les lames dans une SSC (concentration x 2) à 60 °C pendant 30 minutes. Laver au tampon Gurr (pH = 6,8) et colorer avec du Giemsa à 6 % pendant 30 minutes. Enfin, rincer les lames à l'eau du robinet, les laisser sécher et les fixer sous une lamelle. Le protocole proposé ici est légèrement différent de celui qui est présenté dans la section 9.3.3 mais les deux méthodes fonctionnent.

Pour détecter les translocations, on peut utiliser des sondes spécifiques d'un chromosome entier et une sonde centromérique en appliquant le même protocole que pour les cellules en métaphase (voir l'annexe II et la figure 37). Il est alors possible de détecter simultanément les dicentriques et les translocations.

III-2. PCC INDUITE CHIMIQUEMENT

III-2.1. En utilisant des lymphocytes isolés

- 1) Verser 3 ml de sang total hépariné dans un tube LeucoPREP ou Ficoll-Hypaque.
- 2) Centrifuger à 700 g pendant 15 minutes à température ambiante.
- 3) Mettre les lymphocytes isolés dans un tube à essai de 15 ml contenant 5 ml de milieu supplémenté avec 20 % de sérum fœtal de veau pour le lavage.
- 4) Centrifuger à 200–400 g pendant 10 minutes à 4 °C.
- 5) Remettre en suspension les lymphocytes dans 6 ml de milieu de culture supplémentés avec 20 % de sérum fœtal de veau et de la PHA.

- 6) Incuber à 37° C pendant 47 heures (à titre optionnel, on peut ajouter du Colcemid à une concentration de 40 ng/ml 24 heures après la mise en culture).
- 7) Ajouter de la calyculine A à une concentration finale de 50 nM dans la culture cellulaire et incuber à 37 °C pendant une heure.
- 8) Préparer une solution hypotonique chaude (37 °C) de chlorure de potassium (KCl) à 0,075 M.
- 9) Centrifuger les cellules à 200–400 g pendant 5 à 10 minutes et retirer le surnageant.
- 10) Ajouter 2 ml de KCl à 0,075 M au culot cellulaire et incuber à 37 °C pendant 20 minutes.
- 11) Ajouter 30 µL d'un mélange de méthanol et d'acide acétique (proportions : 3/1) et tapoter le tube.
- 12) Centrifuger à 200–400 g pendant 5 à 10 minutes à température ambiante.
- 13) Ajouter 1,8 ml du mélange de méthanol et d'acide acétique après avoir retiré le surnageant et verser le tout dans un tube de 2 ml.
- 14) Conserver le tube à -20 °C jusqu'à ce que l'on prépare les lames.

III-2.2. En utilisant du sang total

- 1) Verser 0,75 ml de sang total hépariné dans un tube à essai de 15 ml.
- 2) Porter à un volume total de 10 ml en ajoutant du milieu de culture supplémenté avec 20 % de sérum fœtal de veau et de la PHA.
- 3) Incuber à 37° C pendant 47 heures (à titre optionnel, on peut ajouter du Colcemid à une concentration de 40 ng/ml 24 heures après la mise en culture).
- 4) Ajouter de la calyculine A à une concentration finale de 30 nM dans la culture cellulaire et incuber à 37 °C pendant une heure.
- 5) Centrifuger à 200–400 g pendant 5 à 10 minutes à température ambiante.
- 6) Ajouter 5 ml de KCl à 0,075 M après avoir retiré le surnageant et incuber à 37 °C pendant 25 minutes.
- 7) Ajouter 30 µL d'un mélange de méthanol et d'acide acétique et tapoter le tube.
- 8) Centrifuger à 200–400 g pendant 5 à 10 minutes à température ambiante.
- 9) Ajouter 2 ml du mélange de méthanol et d'acide acétique (proportions : 3/1).
- 10) Répéter les étapes 8 et 9 jusqu'à ce que le culot cellulaire soit transparent.
- 11) Verser la suspension cellulaire dans un tube de 2 ml.
- 12) Conserver le tube à -20 °C jusqu'à ce que l'on prépare les lames.

Annexe IV

ANALYSE DES MICRONOYAUX PAR BLOCAGE DE LA CYTOKINÈSE

On trouvera ci-après un protocole classique et simple qui fonctionne bien. Il existe d'autres méthodes qui comportent plus d'étapes et nécessitent de cultiver des lymphocytes isolés [1] mais, pour la dosimétrie biologique en routine, les cultures de sang total suffisent.

IV-1. PROTOCOLE CLASSIQUE POUR L'ANALYSE DES MICRONOYAUX PAR BLOCAGE DE LA CYTOKINÈSE

- 1) L'échantillon de sang est prélevé en utilisant de l'héparine de lithium comme anticoagulant.
- 2) On ajoute généralement 0,5 ml de sang total à 4,5 ml du milieu de culture (RPMI 1640), lequel est supplémenté avec 10 à 15 % de sérum fœtal de veau rendu inactif par chauffage, de la L-glutamine et des antibiotiques. On verse 100 µL de phytohémagglutinine (par ex. de la PHA-M, Sigma, 25 mg dans 25 ml de H₂O) dans la culture cellulaire de sorte que sa concentration finale soit de 20 µg/ml.
- 3) Le sang est cultivé dans des flacons de culture cellulaire à 37 °C avec 5 % de CO₂ en atmosphère humidifiée.
- 4) On ajoute 20 µL de cytochalasine B (Cyt B) à la culture cellulaire 24 heures après la stimulation par la PHA de sorte que sa concentration finale soit de 6 µg/ml. Il s'agit de la concentration optimale pour pouvoir accumuler les cellules binucléées dans des cultures de sang total. Comme la Cyt B se dissout difficilement en solution aqueuse, il faut préparer une solution mère de Cyt B dans du diméthylsulfoxyde (5 mg de Cyt B dans 3,3 ml de DMSO), l'aliqoter et la conserver à -20 °C jusqu'à utilisation.
- 5) On arrête la culture entre 68 et 72 heures après la stimulation par la PHA. Le moment retenu pour prélever les cellules doit être choisi de telle sorte que le nombre de cellules binucléées soit maximal et que le nombre de cellules mononucléaires et multinucléées soit minimal.
- 6) Les cellules sont centrifugées doucement à 180 g pendant 10 minutes et le milieu de culture, qui surnage, est retiré.
- 7) Les cellules sont traitées avec 7 ml d'une solution hypotonique froide (4 °C) de KCl à 0,075 M afin de lyser les globules, puis centrifugées immédiatement à 180 g pendant 10 minutes.
- 8) Le surnageant est retiré et remplacé par 5 ml d'un fixateur fraîchement préparé et constitué d'un mélange de méthanol et d'acide acétique (proportions : 10/1) dilué dans le même volume d'une solution de Ringer (4,5 g de NaCl, 0,21 g de KCl et 0,12 g de CaCl₂ dans 500 ml de H₂O). En même temps que l'on ajoute le fixateur, il faut agiter les cellules afin d'éviter la formation d'amas. On centrifuge ensuite à nouveau les cellules à 180 g pendant 10 minutes.
- 9) Les cellules sont lavées avec un fixateur fraîchement préparé, changé deux ou trois fois et qui est constitué d'un mélange de méthanol et d'acide acétique (proportions : 10/1), cette fois sans solution de Ringer, jusqu'à ce que la suspension cellulaire devienne transparente.

- 10) Après avoir retiré le surnageant jusqu'à 1 cm ou moins au-dessus du culot cellulaire (en fonction de la taille de celui-ci), remettre doucement les cellules en suspension, verser le liquide sur des lames en verre propres et laisser sécher à l'air.
- 11) En cas d'analyse au microscope optique, les cellules peuvent être colorées par du Giemsa à 2–6 % (par ex. le bleu de méthylène azur éosine de Merck) tamponné à l'HEPES (0,03 M, pH 6,5) pendant 10 à 20 minutes dans l'obscurité puis rincées rapidement à l'eau et séchées à l'air. En cas d'observation au microscope à fluorescence, les cellules peuvent aussi être colorées à l'orangé d'acridine (10 µg/ml dans une solution saline de pH 6,9 tamponnée au phosphate) pendant deux ou trois secondes.

IV-2. PROTOCOLE DE COLORATION POUR L'ANALYSE DES CENTROMÈRES PRÉSENTS DANS LES MICRONOYAUX

Pour analyser les centromères présents dans les micronoyaux, on peut utiliser une sonde FISH centromérique du marché. On peut également fabriquer une sonde centromérique à l'aide d'une amplification par PCR (amorce sens : 5'-GAA GCT TAA CTC ACA GAG TTG AA-3' et amorce antisens : 5'-GCT GCA GAT CAC AAA GAA GTT TC-3') [2].

Pour une sonde du marché, le protocole d'hybridation *in situ* est le suivant :

- 1) Les lames sont préparées selon le protocole CBMN classique présenté ci-dessus (jusqu'à l'étape 10).
- 2) Déshydrater les cellules en passant les lames dans des bains successifs d'éthanol (à 70, 90 et 100 %) pendant deux minutes chacun et sécher à l'air.
- 3) Dénaturer les lames :
 - i) dénaturer la chromatine présente sur les lames en les trempant dans une SSC (concentration x 2) contenant 70 % de formamide pendant deux minutes à 70 °C ;
 - ii) plonger les lames dans de l'éthanol à 70 % glacé et les déshydrater dans des bains successifs d'éthanol (à 70, 90 et 100 %) pendant cinq minutes chacun tout en les agitant.
- 4) Dénaturer la sonde juste avant de l'utiliser :
 - i) chauffer la sonde à 37 °C pendant cinq minutes ;
 - ii) dénaturer la sonde à 85 °C pendant 10 minutes (10 µL/lame) ;
 - iii) centrifuger rapidement ;
 - iv) refroidir immédiatement sur de la glace et laisser dans l'obscurité.
- 5) Hybridation :
 - i) appliquer 10 µL de sonde sur la lame, recouvrir d'une lamelle et fixer hermétiquement avec de la colle caoutchouc.
 - ii) hybrider pendant la nuit à 37 °C dans l'obscurité en chambre humide.
- 6) Lavage posthybridation :
 - i) retirer la colle caoutchouc, plonger brièvement les lames dans du formamide à 50 % et enlever la lamelle ;
 - ii) laver les lames dans une SSC (concentration x 2) pendant cinq minutes à 37 °C ;
 - iii) laver les lames deux fois cinq minutes à 37 °C dans du formamide à 50 % ;

- iv) laver les lames dans une SSC (concentration x 2) pendant cinq minutes à 37 °C ;
 - v) laver les lames dans une solution de lavage à base de Tween (0,05 % dans une SSC de concentration x 2) pendant cinq minutes à 37 °C ;
 - vi) verser une goutte d'un produit associant du DAPI et un milieu de montage antifading sur une lamelle et poser celle-ci sur la lame.
- 7) Les lames peuvent être conservées à température ambiante dans l'obscurité ou analysées immédiatement sous un microscope à fluorescence.

IV-3 TEST CELLULAIRE DES MICRONOYAUX PAR BLOCAGE DE LA CYTOKINÈSE (CBMN Cyt) SUR DES LYMPHOCYTES ISOLÉS

Le protocole détaillé du test CBMN Cyt a été publié récemment [1]. Pour voir des photos de tous les types de cellules qui sont examinés dans le cadre de ce test, consulter Fenech *et al.* [3].

IV-4 CALCUL DE L'ERREUR SUR L'IDN POUR LE TEST CBMN

Les formules de calcul de l'IDN et de sa variance (pour le test des micronoyaux), présentées dans la section 12.4.3, sont les suivantes :

$$IDN = \frac{M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4}{N} \quad (IV-1)$$

$$\text{var}(IDN) = \sum_{i=1}^4 M_i^2 \text{var}(M_i) + 2 \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^4 M_i M_j \text{cov}(M_i, M_j) \quad (IV-2)$$

Le tableau IV-1 donne un exemple chiffré de calcul de l'IDN et de sa variance.

TABLEAU IV-1. DISTRIBUTION DES MICRONOYAUX

N	Nombre de cellules comprenant 1, 2, 3 ou 4 micronoyaux				IDN
	1	2	3	4	
500	169 ± 111,878	239 ± 124,758	48 ± 43,392	44 ± 40,128	1,934

Ce tableau indique le nombre de cellules qui comportent 1, 2, 3 ou 4 micronoyaux sur un total de 500 cellules. L'IDN est calculé à partir de la formule (IV-1) ci-dessus :

$$IDN = (169 + 2 \times 239 + 3 \times 48 + 4 \times 44) / 500 = 1,934$$

Les valeurs de la variance pour chaque paramètre sont calculées en appliquant la formule suivante :

$$\text{var}(M_i) = N(M_i / N)[1 - (M_i / N)] \quad (IV-3)$$

Par conséquent, pour M_1 :

$$\text{var}(M_1) = 500 (169 / 500) [1 - (169 / 500)] = 111,878$$

N. B. : Il convient de noter que tous les chiffres présentés ici ont été calculés dans Microsoft Excel, chaque valeur étant exacte à un grand nombre de décimales près. Toutefois, les chiffres qui figurent dans le texte ont été arrondis à la troisième décimale par commodité. Par conséquent, si l'on se sert d'une calculatrice en utilisant les valeurs indiquées, on obtiendra des résultats légèrement différents.

Pour déterminer $\text{var}(\text{IDN})$, on doit d'abord calculer la somme des carrés de chaque valeur de M_i multipliés par leur variance :

$$\sum_{i=1}^4 M_i^2 \text{var}(M_i) \quad (\text{IV-4})$$

Cependant, comme on ne peut calculer la covariance qu'à partir du nombre total de cellules avec M variant entre 1 et 4, on doit, dans la formule, remplacer M par les valeurs suivantes de M' :

TABLEAU IV-2. VALEURS CALCULÉES POUR M_i ET $\text{VAR}(M_i)$

Valeurs des M_i pour la formule (IV-2)				
N	1	2	3	4
967	$169 \pm 139,464$	$478 \pm 241,719$	$144 \pm 122,556$	$176 \pm 143,967$

Les valeurs de M ont été recalculées, de sorte que $M_1' = 1 \times 169$, $M_2' = 2 \times 239$, $M_3' = 3 \times 48$ et $M_4' = 4 \times 44$. n est égal à la somme de ces éléments :

$$n = (169 + 2 \times 239 + 3 \times 48 + 4 \times 44) = 967$$

Les valeurs de la variance sont recalculées à l'aide de la formule (IV-3) mais en utilisant les nouvelles valeurs de M_i' et de n . Ainsi :

$$\text{var}(M_2') = 967 \times (478 / 967) \times [1 - (478 / 500)] = 241,719$$

Les valeurs des M_i et des $\text{var}(M_i)$ indiquées dans le tableau IV-2 peuvent alors être utilisées pour déterminer la première partie de $\text{var}(\text{IDN})$, donnée par la formule (IV-4) :

$$\begin{aligned} & \sum_{i=1}^4 M_i^2 \text{var}(M_i) \\ &= M_1^2 \times \text{var}(M_1) + M_2^2 \times \text{var}(M_2) + M_3^2 \times \text{var}(M_3) + M_4^2 \times \text{var}(M_4) \\ &= (169^2 \times 139,464) + (478^2 \times 241,719) + (144^2 \times 122,556) + (176^2 \times 143,967) \\ &= 66\,212\,947,630 \end{aligned}$$

Ensuite, d'après la formule (IV-1), on doit déterminer la covariance de chaque couple de variables. Celle-ci se calcule en appliquant la formule suivante :

$$\text{cov}(M_i', M_j') = -np_i p_j \quad (\text{IV-5})$$

Dans cette formule, p_i et p_j représentent la probabilité d'observer le nombre de micronoyaux considéré dans les cellules binucléées. Par conséquent pour M_1 à M_4 , ces probabilités se calculent comme suit :

$$\begin{aligned} p_1 &= 169 / 967 = 0,175 \\ p_2 &= (2 \times 239) / 967 = 0,494 \\ p_3 &= (3 \times 48) / 967 = 0,149 \\ p_4 &= (4 \times 44) / 967 = 0,182 \end{aligned}$$

La covariance de M_1' et de M_2' est donc obtenue en appliquant la formule (IV-5) :

$$\text{cov}(M_1', M_2') = -967 \times 0,175 \times 0,494 = -83,539$$

Les valeurs de covariance doivent être calculées de manière similaire pour chaque couple M_i , M_j :

$$\text{cov}(M_1, M_3) = -967 \times 0,175 \times 0,149 = -25,166$$

$$\text{cov}(M_1, M_4) = -967 \times 0,175 \times 0,182 = -30,759$$

$$\text{cov}(M_2, M_3) = -967 \times 0,494 \times 0,149 = -71,181$$

$$\text{cov}(M_2, M_4) = -967 \times 0,494 \times 0,182 = -86,999$$

$$\text{cov}(M_3, M_4) = -967 \times 0,149 \times 0,182 = -26,209$$

Après quoi, il faut calculer les éléments individuels de la deuxième partie de la formule (IV-2). Par exemple, pour $i = 1$ et $j = 2$:

$$M_1 M_2 \text{ cov}(M_1, M_2) = 169 \times 478 \times (-83,539) = -6\,748\,429,704$$

De même, afin que les sommes puissent être effectuées pour i variant de 1 à 4 et j de $i + 1$ à 4 :

$$M_1 M_3 \text{ cov}(M_1, M_3) = 169 \times 144 \times (-25,166) = -612\,451,806$$

$$M_1 M_4 \text{ cov}(M_1, M_4) = 169 \times 176 \times (-30,759) = -914\,897,142$$

$$M_2 M_3 \text{ cov}(M_2, M_3) = 478 \times 144 \times (-71,181) = -4\,899\,528,670$$

$$M_2 M_4 \text{ cov}(M_2, M_4) = 478 \times 176 \times (-86,999) = -7\,319\,049,001$$

$$M_3 M_4 \text{ cov}(M_3, M_4) = 144 \times 176 \times (-26,209) = -664\,238,196$$

Une fois que tous les éléments individuels ont été calculés, ils peuvent être ajoutés en appliquant la deuxième partie de la formule (IV-2). Le total obtenu s'élève à -21 158 594,519. D'après la formule (IV-2), la variance de l'IDN vaut donc :

$$\text{var}(\text{IDN}) = 66\,212\,947,630 + 2 \times (-21\,158\,594,519) = 23\,895\,758,592$$

Pour convertir cette valeur en erreur type normalisée, afin de la présenter à côté de l'IDN, on applique la formule suivante :

$$\text{Er.T.}(\text{IDN}) = \frac{\sqrt{\text{var}(\text{IDN})}}{n} \bigg/ \frac{1}{\sqrt{n}} = \frac{\sqrt{\text{var}(\text{IDN})}}{n^{3/2}} \quad (\text{IV-6})$$

En utilisant les valeurs calculées plus haut, on obtient le résultat suivant pour l'erreur type :

$$\text{Er. T.}(\text{IDN}) = (23\,895\,758,592)^{(1/2)} / 967^{(3/2)} = 0,163$$

Par conséquent, la valeur de l'IDN obtenue à partir des résultats du tableau IV-1 s'élève à $1,934 \pm 0,163$.

Annexe V

CRITÈRES DE DÉTERMINATION DE L'INDEX MITOTIQUE

La méthode de détermination de l'indice mitotique pour l'analyse des dicentriques consiste à :

- Exclure les noyaux des cellules multinucléées, non stimulées (petits noyaux), mortes ou mourantes, ainsi que les micronoyaux ;
- Compter le nombre de noyaux des cellules mitotiques et des cellules stimulées (cellules blastiques dont le noyau est gros) et à appliquer la formule (V-1) pour calculer l'index mitotique dans les cellules stimulées.

Compte tenu de la diversité de taille des noyaux des cellules stimulées, il faut fixer une limite arbitraire entre les petits noyaux stimulés et les noyaux non stimulés. Par ailleurs, un étalement est considéré comme métaphasique même si les cellules qu'il contient sont en prophase ou en anaphase.

$$\text{Index mitotique} = \frac{(\text{Nbre métaphases}) \times 100}{\text{Nbre métaphases} + \phi \text{ blastiques}} \quad (\text{V-1})$$

Pour l'étalement présenté sur la figure V-1, l'index mitotique s'élèverait à $[3 / (3 + 12)] \times 100 = 20 \%$, même si, en général, on examine 500 cellules avant de calculer un index mitotique.

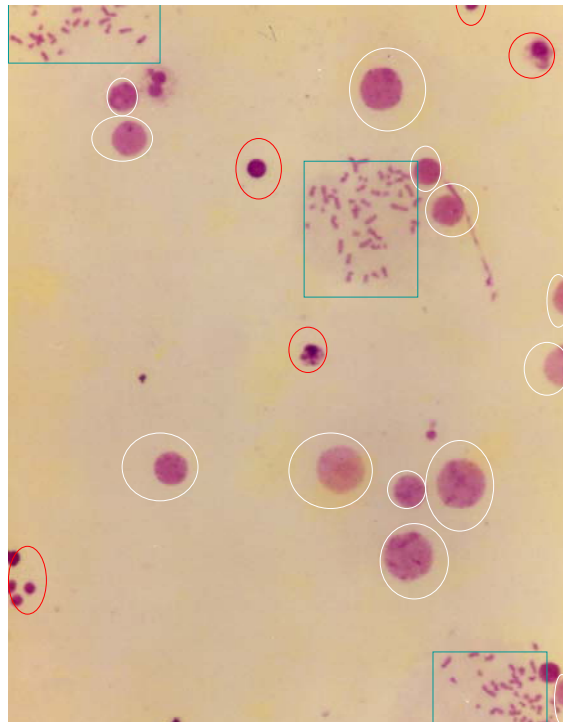


FIG. V-1. Vue à faible grossissement typique d'une lame sur laquelle ont été déposés des lymphocytes cultivés. Les cercles blancs entourent les noyaux des cellules qui ont été considérées comme blastiques, les cercles rouges correspondent aux noyaux qui ont été exclus du comptage et les rectangles signalent les étalements métaphasiques.

Annexe VI

ANALYSE STATISTIQUE

Des exemples de calcul faisant appel à des méthodes statistiques pour analyser et interpréter des résultats de dosimétrie cytogénétique ont été présentés plus haut dans la présente publication, notamment dans les sections 8 et 9. Il existe de nombreux manuels de statistiques dont certains portent spécifiquement sur les applications biologiques et biomédicales de cette discipline. La présente publication n'entend donc pas aborder ce domaine de manière très détaillée. La présente annexe inclut néanmoins une brève introduction aux tests et distributions statistiques que l'on rencontre le plus souvent en dosimétrie cytogénétique. En troisième partie, on trouvera le code d'un sous-programme qui permet d'ajuster des courbes dose-effet.

VI-1. MÉTHODES STATISTIQUES DE BASE UTILISÉES EN CYTOGÉNÉTIQUE

VI-1.1. Erreur type et écart type

L'écart type d'un ensemble de valeurs mesure simplement la dispersion moyenne (écart) de ces valeurs autour de leur moyenne. Il donne une indication sur l'ampleur de l'étalement de ces données.

L'erreur type de la moyenne (SEM) indique dans quelle mesure la moyenne d'un échantillon est susceptible de s'écarter de la vraie moyenne d'une population. Elle est équivalente à l'écart type estimé de l'erreur sur la méthode appliquée. La SEM mesure la précision avec laquelle la véritable moyenne d'une population est connue. Elle diminue lorsque la taille de l'échantillon augmente car la probabilité que la moyenne d'un échantillon soit proche de la moyenne d'une population est beaucoup plus élevée lorsque cet échantillon est gros.

VI-1.2. Valeurs p

La valeur p représente la probabilité d'obtenir un résultat au moins aussi extrême qu'une certaine valeur, en supposant que celle-ci n'était que le fruit du hasard. Par exemple, sous l'hypothèse nulle selon laquelle deux moyennes de population sont identiques, une valeur p de 0,03 représenterait une probabilité de 3 % d'observer une différence aussi grande que la différence mesurée si l'hypothèse nulle était vraie. Un échantillonnage aléatoire à partir de populations identiques se traduirait par une différence plus petite que celle qui aura été mesurée dans 97 % des expériences statistiques et plus grande que celle qui aura été mesurée dans 3 % des expériences.

Pour les tests statistiques, si p est supérieur au seuil de signification (souvent égal à 0,05) les résultats obtenus ne s'écartent pas significativement du modèle attendu et l'hypothèse nulle ne peut être rejetée. Il est important de noter que, dans l'exemple présenté ci-dessus, toute affirmation selon laquelle on est sûr à 95 % que la vraie valeur inconnue du paramètre est comprise dans l'intervalle défini par les limites de confiance signifie réellement que cet intervalle a été obtenu en suivant une procédure qui donne des résultats corrects 95 % du temps.

Pour des comparaisons multiples, la valeur p doit être modifiée comme suit : pour un nombre N d'hypothèses nulles indépendantes, la probabilité d'obtenir une ou plusieurs valeurs p inférieures à un seuil de 0,05 par hasard est égale à $100 \times (1,00 - 0,95^N)$. Le seuil nécessaire pour s'assurer que la probabilité globale de rejeter à tort une hypothèse nulle soit inférieure ou égale à 0,05 s'élève à $1,00 - 0,95^{(1/N)}$.

VI-1.3. Le test du khi²

Le test du khi² [la déviance résiduelle ou somme résiduelle des écarts au carré (khi² de Pearson)] est utilisé pour évaluer des différences statistiquement significatives entre des résultats normalement distribués. La valeur p pour le khi² (et le nombre de degrés de liberté associé) indique la probabilité que les écarts entre les résultats soient dus au hasard. Le seuil de signification est généralement fixé à 95 %, ce qui signifie que, pour un jeu de données normalement distribué, on s'attend à ce que niveau d'écart ne se soit observé que 5 % du temps.

Le test d'homogénéité du khi² permet de comparer plusieurs mesures en contrôlant l'hypothèse nulle selon laquelle les fréquences relatives des événements observés suivent la loi du khi². En cytogénétique, ce test est utilisé pour contrôler les différences entre plusieurs jeux de données, par exemple le nombre de dicentriques observées dans les cellules examinées, afin de déterminer le nombre de populations distinctes présentes dans un jeu de données.

En général, cette méthode n'est fiable que lorsque la taille de l'échantillon est supérieure à cinq. Si l'échantillon est plus petit, on peut appliquer une correction de Yates afin de diminuer l'erreur introduite par l'approximation des données sur la distribution du khi². En pratique, cette correction réduit le khi² et augmente ainsi la valeur p associée. Toutefois, elle n'est pas toujours applicable et le facteur de correction peut être trop élevé, il faut donc s'en servir avec prudence.

Dans le cas particulier d'une comparaison entre deux échantillons, on s'attend à ce que les données suivent une loi binomiale. Le χ^2 est alors calculé en utilisant l'approximation normale à la loi binomiale : il s'agit du test du χ^2 à un degré de liberté. On peut se servir d'une version binomiale du test du χ^2 pour comparer un seul jeu d'effectifs observés et attendus, par exemple le nombre de dicentriques observées dans un échantillon de sang témoin, non exposé, et le nombre de dicentriques détectées dans un échantillon exposé.

VI-1.4. Le test t

Le test t est un test d'hypothèse statistique pour lequel l'hypothèse nulle est vraie si la statistique de test est t distribuée. Ce test est pertinent pour les petits échantillons, pour lesquels la population ne peut être définie comme normalement distribuée car son écart type n'est pas connu avec certitude. Le test t tient compte de l'effet du hasard en intégrant le nombre d'échantillons. En cytogénétique, le test t est généralement utilisé pour contrôler la signification de la différence entre deux distributions de Poisson en comparant leurs moyennes afin de déterminer si les deux jeux de données sont issus de la même population. Là aussi, la valeur p sert à établir si les différences entre les échantillons sont significatives et le seuil de signification est généralement fixé à 95 %, ce qui équivaut à 0,05.

Il existe plusieurs formes différentes du test t, dont la pertinence varie en fonction des situations. Le test t pour échantillons appariés est utilisé lorsqu'il existe une dépendance directe entre les échantillons. C'est par exemple le cas lorsque le nombre de dicentriques est mesuré par deux opérateurs différents pour le même ensemble de lames. Pour ce test, la taille de l'échantillon, par exemple le nombre de cellules examinées, doit toujours être la même pour les deux échantillons. Le test t pour échantillons indépendants s'applique lorsque les échantillons ne sont pas appariés, par exemple lorsque deux opérateurs différents comptent le nombre de dicentriques pour deux ensembles de lames distincts. Dans ce cas, les tailles des échantillons peuvent être égales ou différentes. Un test t peut être unilatéral ou bilatéral. Un test unilatéral sert à déterminer si un échantillon est significativement plus grand qu'un autre. Un test bilatéral permet d'évaluer si les différences entre deux jeux de données sont significatives dans les deux directions, c'est-à-dire quant à savoir si l'échantillon un est plus grand ou plus petit que l'échantillon deux.

VI-1.5. Le test de Fisher

La loi de Fisher est une loi de probabilité continue qui est équivalente au quotient de deux lois du χ^2 . Un test de Fisher, basé sur cette loi, peut ainsi être utilisé pour comparer des données afin de vérifier si elles suivent la même loi. Le test de Fisher et le test z peuvent servir à contrôler la signification des coefficients générés par l'ajustement d'une courbe au maximum de vraisemblance. Lorsqu'il apparaît que l'ajustement n'est pas bon (par ex. à cause du résultat du test du χ^2), il convient d'appliquer le test de Fisher pour contrôler la signification des coefficients. Contrairement au test t, utilisé pour comparer des moyennes, le test de Fisher compare les variances de jeux de données. Il sert surtout pour l'analyse de la variance.

VI-1.6. Analyse de la variance

L'analyse de la variance désigne un ensemble de méthodes qui sont utilisées pour tester si des moyennes sont égales. Elle se sert de la loi de Fisher pour contrôler les différences entre trois groupes indépendants et normalement distribués ou plus en mesurant l'homogénéité des variances ou entre des mesures répétées. L'analyse de la variance évalue l'importance d'un ou plusieurs facteurs en comparant la moyenne des variables réponses à différentes valeurs de ces facteurs.

La valeur p pour chaque facteur représente la probabilité que la valeur élevée de la variance entre les groupes par rapport aux variations au sein de ceux-ci soit le fruit du hasard. Elle peut être considérée comme la probabilité qu'un échantillonnage aléatoire aboutisse à des moyennes aussi éloignées (voire plus) que celles qui ont été calculées pour l'expérience en question.

En cytogénétique, l'analyse de la variance peut être utilisée dans n'importe quelle situation lorsque l'on a besoin de comparer trois groupes ou plus ou deux facteurs ou plus. Il peut s'agir par exemple d'étudier les effets combinés du niveau des doses de rayonnement et de leur fractionnement ou d'une exposition radiologique et chimique. Ce test existe sous de nombreuses formes différentes mais la plupart des logiciels de traitement de données intègrent cette fonctionnalité et l'on trouvera plus d'informations sur cette question dans les ouvrages de statistique.

Même si, en principe, l'analyse de la variance est une méthode paramétrique qui ne peut d'ordinaire s'appliquer qu'à des variables normales, les données que l'on rencontre le plus souvent en cytogénétique suivent une loi de Poisson et sont suffisamment proches d'une distribution normale pour que cette méthode puisse être utilisée. Sinon, on peut avoir recours à l'une des nombreuses analyses non paramétriques, comme l'explique le paragraphe suivant.

VI-1.7. Tests non paramétriques

Lorsque les données ne suivent pas une loi normale, on peut appliquer un test non paramétrique. Le test de Wilcoxon est un test non paramétrique analogue au test t pour échantillons appariés. Il peut être utilisé pour comparer un ou deux jeux de données. C'est un test des rangs signés et, à ce titre, les mesures doivent être effectuées à plusieurs reprises. La statistique de test porte sur l'égalité des médianes de populations. Lorsque les échantillons sont indépendants, on peut appliquer le test de Mann-Whitney. Il s'agit d'une version non paramétrique du test t qui peut être utilisée pour contrôler si deux jeux de données indépendantes sont issus de la même distribution. Pour comparer plusieurs jeux de données, on peut se servir du test de Kruskal-Wallis, une extension du test de Mann-Whitney qui est similaire à l'analyse de la variance.

VI-2. LOIS DE PROBABILITÉ

Il existe plusieurs formes et types de lois qui peuvent être utilisées pour modéliser la probabilité d'apparition d'un événement. Il est très important de bien choisir le type de loi à appliquer afin que l'analyse des résultats soit correcte, c'est pourquoi plusieurs modèles ont été proposés et mis en œuvre pour évaluer les données cytogénétiques. On trouvera ci-après une description de certains des modèles les plus fréquemment utilisés et une analyse de leur applicabilité à la cytogénétique radiologique.

VI-2.1. Loi de Poisson

La loi de Poisson est une loi de probabilité discrète qui exprime la probabilité d'apparition d'événements aléatoires rares. Cette loi est de loin la plus connue et la plus fréquemment utilisée pour analyser des données cytogénétiques. On observe en général assez peu d'aberrations chromosomiques et Edwards *et al.* ont montré qu'il est beaucoup plus réaliste de supposer qu'elles suivent une loi de Poisson plutôt qu'une loi normale [4]. Merckle a établi que les tests qui contrôlent la qualité d'un ajustement de courbe et qui reposent sur la loi de Poisson, y compris le test du χ^2 , la variance et le test u, lesquels sont tous abordés dans la présente publication, sont applicables aux données cytogénétiques, notamment lorsque les échantillons sont grands [5]. Pour l'ajustement de courbe, il a été montré que l'on pouvait appliquer une analyse de régression à des données poissonniennes. Les méthodes d'ajustement au maximum de vraisemblance [6] ou par les moindres carrés pondérés [7] qui en résultent sont aujourd'hui utilisées presque partout pour construire des courbes d'étalonnage de la dose pour des aberrations chromosomiques comme les dicentriques ou les micronoyaux.

VI-2.2. Loi binomiale

La loi binomiale est une loi de probabilité discrète qui décrit la probabilité du nombre de résultats positifs pour une série d'expériences indépendantes, toutes n'ayant que les deux mêmes résultats possibles. Dans chaque cas, si la probabilité associée au résultat 1 s'élève à p , la probabilité correspondant au résultat 2 vaut $1 - p$. En cytogénétique, le comptage du nombre de cellules lésées, où les deux résultats « binomiaux » sont le fait que la cellule est soit lésée, soit intacte, constitue un bon exemple de données qui peuvent être modélisées par cette loi. La loi binomiale est d'ailleurs fréquemment appliquée pour calculer l'erreur type associée à la fréquence des cellules lésées.

VI-2.3. Modèle mixte de Poisson

Sasaki [8] a présenté une méthode d'analyse des données relatives aux aberrations chromosomiques pour tenter de résoudre le problème des estimations incorrectes de la dose moyenne qui résultent d'une inhomogénéité. La population de cellules est constituée d'un mélange de sous-populations, chacune étant exposée à une dose différente, laquelle provoque un nombre de lésions distinct. La répartition des dommages chromosomiques par cellule peut donc être exprimée sous forme d'un modèle mixte de Poisson et son « déploiement » permet d'obtenir les caractéristiques de distribution de la dose. Il a été démontré que ce modèle permettait d'ajuster correctement les courbes dose-effet linéaires quadratiques pour des données simulées ou réelles.

VI-2.4. Loi binomiale négative

À l'instar de la loi de Poisson, la loi binomiale négative est une loi de probabilité discrète. Toutefois, elle comporte un paramètre supplémentaire qui peut être utilisé pour représenter la surdispersion. Au fur et à mesure que le paramètre de surdispersion se rapproche de zéro, la loi binomiale négative rejoint la loi de Poisson [9]. Plusieurs auteurs l'ont substitué à la loi de

Poisson, par exemple dans une étude de 2008 sur la fréquence des translocations chez les pilotes de ligne [10].

VI-2.5. Loi de Neyman de type A

La loi de Neyman a été proposée en 1939 par Neyman. Celui-ci a créé ce nouveau type de loi pour tester les différences entre les moyennes de deux échantillons dont les variances sont différentes. Cette caractéristique la distingue d'autres tests classiques comme le test z et ou le test t, lesquels supposent que les données sont normalement distribuées, que l'écart type sur la population est respectivement connu et inconnu et pour lesquels les variances doivent être proches voire identiques. La loi de Neyman de type A tend vers une loi de Poisson généralisée lorsque la taille de l'échantillon augmente [11]. En 2008, Morand *et al.* ont publié une note technique qui présentait le logiciel NETA, lequel peut être utilisé pour calculer les limites de confiance à 95 % pour des événements qui suivent une loi de Neyman de type A [12]. Morand et ses collègues ont découvert que l'intervalle de confiance obtenu est plus petit si l'on applique une loi de Neyman que si l'on suit une loi de Poisson classique lorsque la taille de l'échantillon (nombre de cellules) est petite [12].

VI-2.6. Autres lois

La loi bêta constitue une famille de lois de probabilité continue qui sont définies sur l'intervalle 0–1 par deux paramètres de forme généralement appelés α et β . La loi de Dirichlet est une extension de la loi bêta à plus de deux paramètres. Stiratelli *et al.* [13] ont comparé les lois de Poisson et binomiale avec les lois bêta-binomiale, binomiale négative et binomiale corrélée pour des lésions chromosomiques chimio-induites. Contrairement à la loi de Poisson et à la loi binomiale simple, ces modèles ne supposent pas que les cellules réagissent indépendamment les unes des autres. Ces auteurs ont découvert que tous les modèles qui reposent sur une loi bêta permettent un meilleur ajustement des courbes que les modèles qui s'appuient sur une loi de Poisson ou bêta (d'après le test du χ^2). Pour le jeu de données dont ils disposaient, c'est avec le modèle bêta-binomial que le meilleur ajustement a été obtenu [13].

La loi log-normale a été décrite de manière formelle par Aitchison et Shen en 1980. La transformation logistique d'une distribution normale à n dimensions conduit à une distribution log-normale sur un simplexe à n dimensions. Cette loi peut être appliquée en analyse statistique lorsque, comme pour les données relatives à des aberrations chromosomiques, la classification des cas de base est soumise à une incertitude. Les auteurs citent comme exemples d'utilisation de cette loi la description et l'analyse statistique directe des données compositionnelles et probabilistes et le remplacement de la classe de Dirichlet pour l'analyse des tables de contingence multinomiales [14].

VI-3. SOUS-PROGRAMME D'AJUSTEMENT DES COURBES DOSE-EFFET

Des logiciels d'ajustement de courbes ont été présentés dans la section 8.3. Dans la présente annexe, on trouvera un exemple chiffré d'ajustement effectué en appliquant à l'un de ces logiciels, un outil basé sur R, les données relatives à une exposition au cobalt 60 qui figurent dans le tableau 4. Alors que dans CABAS et Dose estimate, cette fonction est directement disponible, dans R, une procédure doit être écrite par un mathématicien. Le sous-programme requis a été conçu (par H. Braselmann) et est présenté intégralement dans l'encadré 1 car il n'a été publié nulle part ailleurs.

Ce sous-programme comporte quatre parties. La première sert à rentrer les données observées, c'est-à-dire les doses, le nombre d'aberrations, le nombre de cellules examinées et l'indice de répartition (disp). Pour cet indice, il existe deux possibilités : soit utiliser une valeur constante pour tous les points, soit appliquer une valeur différente pour chaque dose. Dans l'exemple chiffré qui est proposé, une valeur constante de 1,0 est utilisée. L'autre solution, qui

est également présentée, consisterait à se servir des valeurs individuelles de σ^2/f qui figurent dans le tableau 4 (il convient de noter que toutes les lignes du sous-programme qui commencent par le caractère « # » sont des lignes de commentaires et ne sont pas exécutées). La deuxième partie sert à rentrer les paramètres d'optimisation : i) le coefficient de corrélation sigma, pour lequel il est recommandé de mettre la valeur un ou d'estimer ce coefficient ; ii) la pondération requise iii) la fonction mathématique à laquelle on souhaite ajuster la courbe. Pour ce paramètre, entrer « l » pour un ajustement linéaire et « lq » pour un ajustement linéaire quadratique. Les deux autres parties du sous-programme ne doivent être modifiées que par les personnes qui les ont développées. Pour le cas où l'on souhaiterait ajuster une courbe dose-effet à une fonction linéaire, les données du tableau 4 relatives à une exposition à l'hélium 4 qui seraient rentrées dans le sous-programme sont présentées après l'encadré 1. La suite du sous-programme est identique à celle qui figure dans l'encadré 1.

Pour exécuter le sous-programme, il faut télécharger le logiciel R sur le site Internet dont l'adresse figure dans la section 8.3. En utilisant une version PDF de la présente publication, copiez-collez directement le sous-programme contenu dans l'encadré 1 dans un logiciel de traitement de texte. Remplacez les données d'entrée correspondant à l'exemple pris pour le cobalt 60 par vos propres données et choisissez les options souhaitées comme « l » ou « lq ». Après avoir affiché le logiciel R sur votre écran, collez le sous-programme après le caractère >.

Le résultat obtenu figure dans l'encadré 2, où x_0 , x_1 et x_2 correspondent respectivement aux coefficients C , α et β de la formule (2), accompagnés de leur erreur type. La valeur z permet de contrôler la signification de chaque coefficient. Une probabilité (Pr) y est associée. Le résultat indique également la variance et la covariance pour chaque coefficient. On peut remarquer que les valeurs des coefficients sont identiques à celles du tableau 5 et que les valeurs de variance et de covariance sont les mêmes que celles qui figurent dans la section 9.7.3. Le logiciel R représente également les points de données et la courbe ajustée sous forme de graphique (Fig. VI-1).

ENCADRÉ 1. SOUS-PROGRAMME D'AJUSTEMENT DE COURBE APPLIQUÉ À TITRE D'EXEMPLE CHIFFRÉ AUX DONNÉES RELATIVES À UNE EXPOSITION AU COBALT 60

```
## latest changes: H. Braselmann, 2010, April 9th
##               Helmholtz Zentrum München, Department of Radiation Cytogenetics, Germany
## contact details: braselm@helmholtz-muenchen.de
## user part: data
# cobalt-60 gamma (86)
dose<-c(0,0.1,0.25,0.5,0.75,1,1.5,2,3,4,5)
ab<-c(8,14,22,55,100,109,100,103,108,103,107)
cells<-c(5000,5002,2008,2002,1832,1168,562,332,193,103,59)
disp<- 1.0
#disp<- c(1.0,1.0,1.08,0.97,1.03,1.0,1.06,1.14,0.83,0.88,1.15)
## user part: option settings
sigma<- 1      # regression sigma 1 or
#sigma<- NULL  # NULL (regression sigma estimated)
wt<- 1/disp    # weight setting, required!
model<- "lq"
#model<- "l"
# "l"        for linear or "lq" for linear quadratic
# a background value (c) is fitted in both options
#####
## execution part: changes recommended only for developpers of the script ##
#####
if (length(disp)==1) disp<- rep(disp,length(dose))
kurvendaten<-data.frame(dose,ab,cells,disp)
print(kurvendaten)
x0<-cells
x1<-cells*dose
x2<-cells*dose*dose
modelldaten<-list(x0,x1,x2,ab)
if (length(wt)==1) wt<- rep(wt,length(dose))
if (model=="lq" & sigma==1)
  result<-glm(ab ~ -1 + x0+x1+x2,family=poisson(link = "identity"), weights=wt, data=modelldaten)
if (model=="lq" & is.null(sigma))
  result<-glm(ab ~ -1 + x0+x1+x2,family=quasipoisson(link = "identity"), weights=wt, data=modelldaten)
if (model=="l" & sigma==1)
  result<-glm(ab ~ -1 + x0+x1,family=poisson(link = "identity"), weights=wt, data=modelldaten)
if (model=="l" & is.null(sigma))
  result<-glm(ab ~ -1 + x0+x1,family=quasipoisson(link = "identity"), weights=wt, data=modelldaten)
smry<-summary(result,correlation=TRUE)
#smry$coefficients
#smry$correlation
corma<-smry$correlation
bstat<-smry$coefficients
seb<-bstat[,2]
vakoma<-corma*outer(seb,seb)
vakoma<-vcov(result)
#####
## output of results ##
#####
cat("\n")
cat("Result of curve fit 'result'\n")
cat("-----\n")
print(result)
cat("\n")
cat("assumed sigma\n")
print(sigma)
cat("\n")
cat("Coefficients 'bstat'\n")
print(bstat)
cat("\n")
cat("variance-covariance matrix 'vakoma'\n")
print(vakoma)
cat("\n")
```



```

cat("correlation matrix 'corma'\n")
print(corma)
par(lwd=2)
plot(dose, ab/cells)
if (model=="lq") curve(bstat[1,1]+bstat[2,1]*x+bstat[3,1]*x*x,0,max(dose), add=TRUE)
if (model=="l") curve(bstat[1,1]+bstat[2,1]*x,0,max(dose), add=TRUE)

```

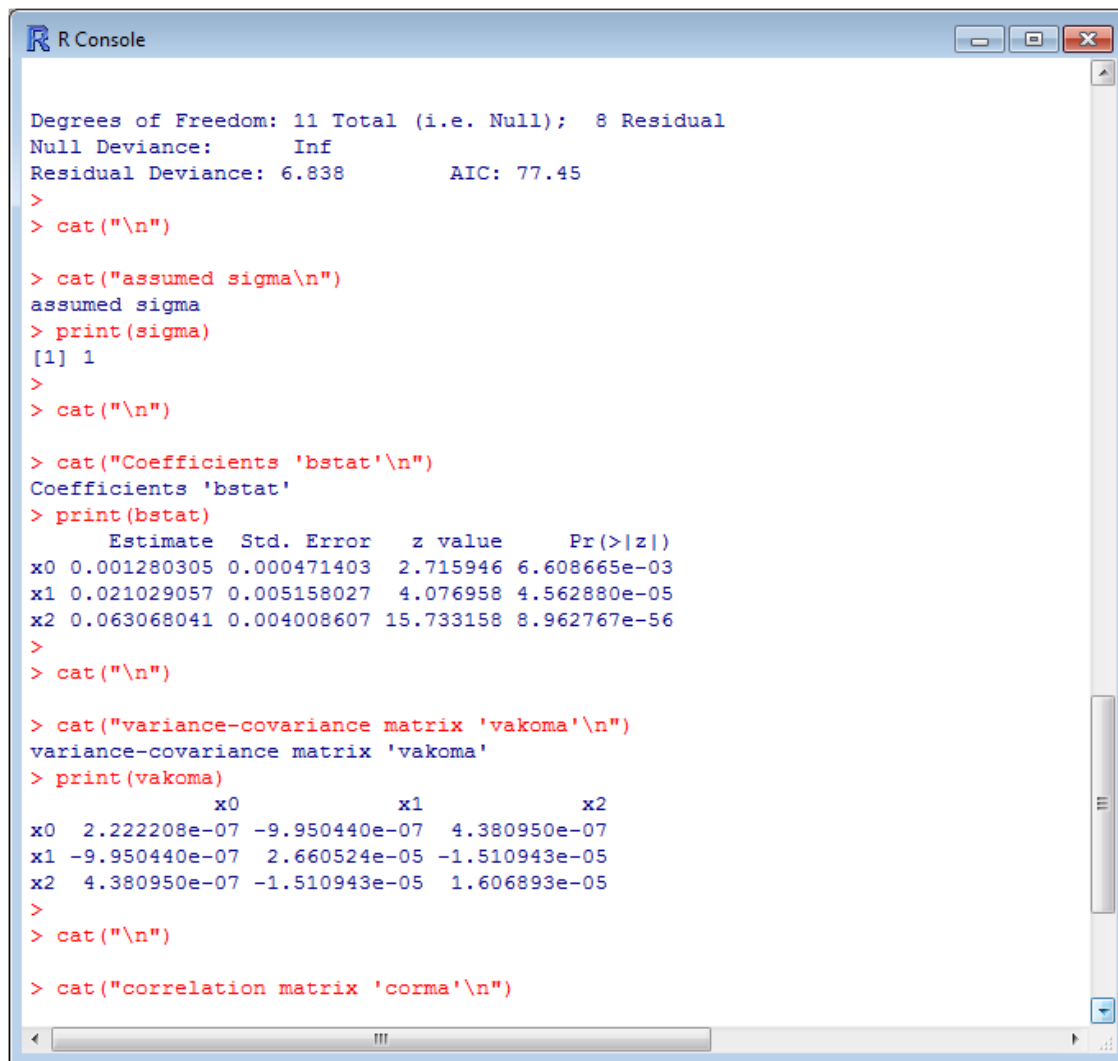
Données à rentrer pour ajuster les valeurs obtenues pour une exposition à de l'hélium 4 au modèle linéaire.

```

# 20 MeV helium  $\alpha$ - particles (87)
dose<-c(0,0.051,0.104,0.511,1.01,1.536,2.05,2.526,3.029)
ab<-c(3,19,27,199,108,96,120,148,108)
cells<-c(2000,900,1029,1136,304,142,137,144,98)
disp<- 1.19
sigma<- NULL
wt<- 1/disp
model<- "l"

```

ENCADRÉ 2. RÉSULTAT DE L'AJUSTEMENT DES DONNÉES RELATIVES À UNE EXPOSITION AU COBALT 60



```

R Console

Degrees of Freedom: 11 Total (i.e. Null);  8 Residual
Null Deviance:      Inf
Residual Deviance:  6.838      AIC: 77.45
>
> cat("\n")

> cat("assumed sigma\n")
assumed sigma
> print(sigma)
[1] 1
>
> cat("\n")

> cat("Coefficients 'bstat'\n")
Coefficients 'bstat'
> print(bstat)
      Estimate Std. Error  z value    Pr(>|z|)
x0  0.001280305  0.000471403   2.715946 6.608665e-03
x1  0.021029057  0.005158027   4.076958 4.562880e-05
x2  0.063068041  0.004008607  15.733158 8.962767e-56
>
> cat("\n")

> cat("variance-covariance matrix 'vakoma'\n")
variance-covariance matrix 'vakoma'
> print(vakoma)
      x0      x1      x2
x0  2.222208e-07 -9.950440e-07  4.380950e-07
x1 -9.950440e-07  2.660524e-05 -1.510943e-05
x2  4.380950e-07 -1.510943e-05  1.606893e-05
>
> cat("\n")

> cat("correlation matrix 'corma'\n")

```

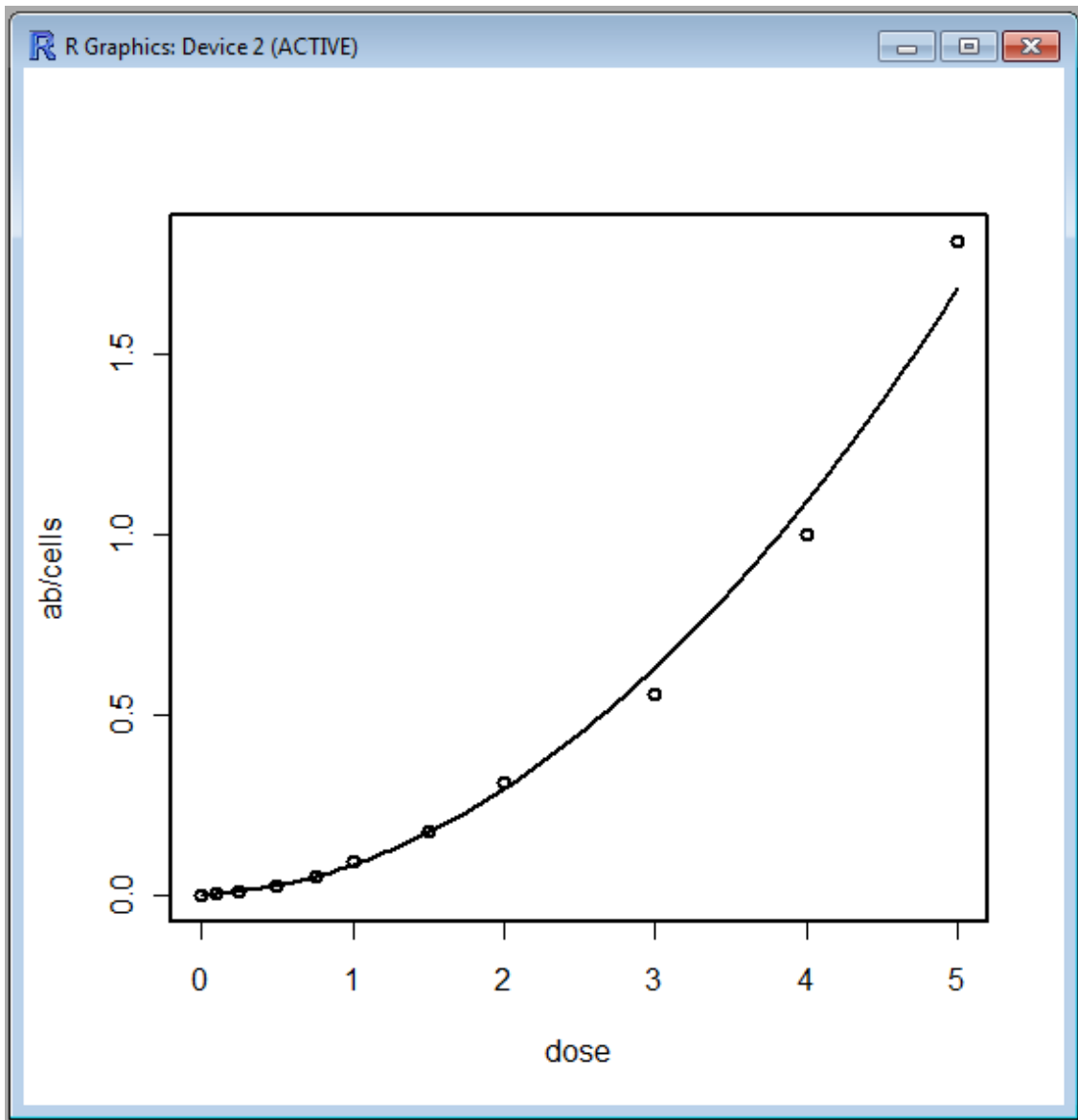


FIG. VI-1. Résultat obtenu pour les données relatives à une exposition au cobalt 60, présenté sous forme de graphique et indiquant les points de données observés et la courbe linéaire quadratique d'ajustement.

Annexe VII

EXEMPLE DE COMPARAISON INTERLABORATOIRES DESTINÉE À CONTRÔLER L'ASSURANCE DE LA QUALITÉ

La présente annexe donne un exemple de comparaison interlaboratoires internationale effectuée au sein de 14 laboratoires de dosimétrie biologique. Cette opération comportait une analyse des lames de préparations en métaphase obtenues à partir de sang qui avait été irradié *in vitro* à des doses de 0,75 et 2,5 grays par des rayons gamma émis par une source de cobalt 60. Les laboratoires participants devaient communiquer la fréquence des dicentriques qu'ils avaient obtenue et la dose estimée après avoir analysé 50 et 100 cellules (mode de tri) et après avoir analysé 500 cellules de manière classique ou s'être arrêté plus tôt si 100 dicentriques avaient été observées. Pour cette comparaison interlaboratoires, la performance de chaque laboratoire et la reproductibilité des résultats ont été évaluées en appliquant des méthodes robustes (algorithmes A et S) décrites dans les normes ISO 5725-5 et ISO 13528:2005 [15, 16].

La présente annexe ne montre, à titre d'exemple chiffré, qu'une partie des résultats de cette comparaison : ceux qui ont été obtenus après avoir analysé 500 cellules exposées à une dose de 0,75 gray. Les résultats complets figurent dans la référence [17].

Pour caractériser la performance du laboratoire, c'est le test z qui a été utilisé :

$$z = \frac{(x_i - x_{ref})}{\sqrt{(s^*)^2 + u_x^2}} \quad (\text{VII-1})$$

Pour chaque laboratoire, le test z portait sur les valeurs de fréquence des dicentriques communiquées ou sur les doses que le laboratoire avait estimées en reportant les fréquences de dicentriques observées sur sa propre courbe dose-effet déjà construite (x_i). Pour l'analyse de la fréquence des aberrations, x_{ref} était une valeur consensuelle (moyenne robuste, x^* , obtenue en appliquant l'algorithme A) et, pour l'analyse des estimations de dose, il s'agissait de la dose physique administrée. Le test z tient également compte de l'écart type robuste (s^*) calculé en suivant l'algorithme A et de l'incertitude type de la valeur consensuelle ou de référence (u_x). Lorsque ce sont les fréquences qui ont été évaluées, u_x a été calculée comme suit :

$$u_{ref} = 1,25 s^* / \sqrt{p} \quad (\text{VII-2})$$

où p représente le nombre de laboratoires participants.

S'agissant de l'estimation des doses, l'incertitude – notée u_x – associée à la mesure physique de la dose réellement délivrée aux échantillons sanguins a été considérée comme négligeable compte tenu de l'inéquation (VII-3) :

$$0,96 \leq \frac{s^*}{\sqrt{(s^*)^2 + u_x^2}} \leq 1 \quad (\text{VII-3})$$

Pour évaluer la performance d'un laboratoire, on a appliqué les critères suivants :

$ z \leq 2$	satisfaisant
$2 < z < 3$	discutable
$ z \geq 3$	insatisfaisant

Pour la fréquence des dicentriques, la valeur z obtenue pour chaque laboratoire est présentée dans la figure VII.1. En l'espèce, la moyenne robuste utilisée pour x_{ref} s'élevait à 0,05 et s^* valait 0,01. Toutes les valeurs z étaient comprises entre -1,66 et 1,21 et, d'après les critères d'acceptation, étaient jugées « satisfaisantes ».

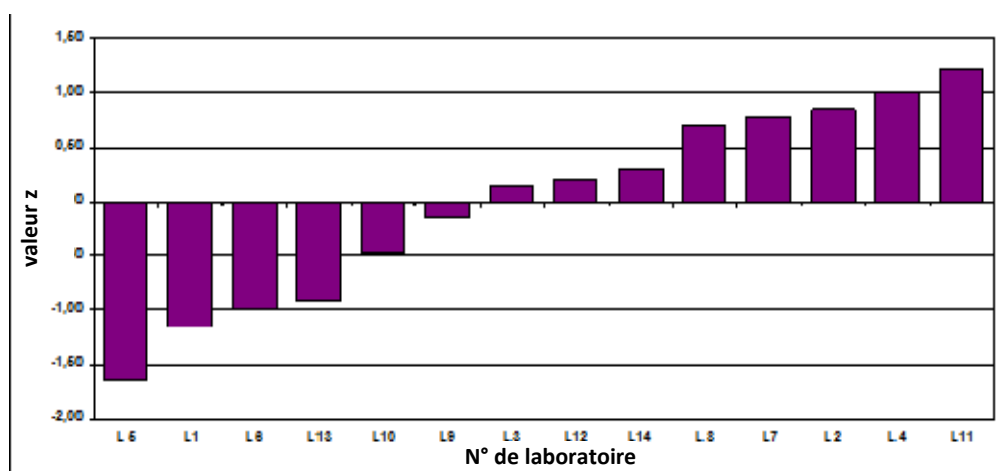


FIG. VII-1. Pour la fréquence des dicentriques, valeur z obtenue par chaque laboratoire participant.

La figure VII-2 montre l'estimation de dose communiquée par chaque laboratoire, accompagnée de son intervalle de confiance à 95 %. La ligne horizontale en trait plein représente la dose physique délivrée et les lignes en pointillés l'intervalle $1,96s^*$. Dans ce cas de figure, seul L11, qui a annoncé une dose estimée de 0,98 gray, a été considéré comme « discutable » compte tenu de sa valeur z (2,12).

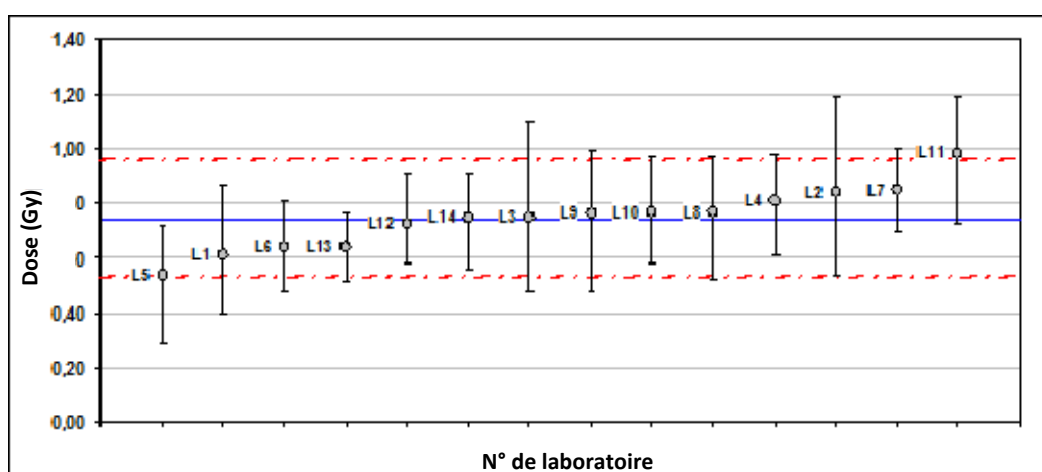


FIG. VII-2. Dose estimée par chaque laboratoire participant.

La reproductibilité de ces résultats a été évaluée à l'aide de l'écart type de reproductibilité (S_R) :

$$S_R = \sqrt{(s^*)^2 + S_r^2 \left(1 - \frac{1}{n}\right)} \quad (\text{VII-4})$$

Cette formule tient compte de la variabilité entre laboratoires par l'intermédiaire de l'écart type robuste (s^*) obtenu en appliquant l'algorithme A et de la variabilité intralaboratoire en se servant de l'écart type de répétabilité (S_r) calculé en suivant l'algorithme S. Dans la formule (VII-4), n représente le nombre de fois où chaque laboratoire participant a effectué les mesures. Dans le présent exemple, n était égal à deux. Après analyse de 500 cellules exposées à une dose de 0,75 gray, S_R valait 0,013 pour la fréquence des dicentriques et 0,116 pour la dose reçue. Pour comparer la reproductibilité de ces deux mesures, la fréquence et la dose, un coefficient de variation (CV) a été défini.

Le CV reflète la dispersion globale des résultats et est égal à S_R/x^* . Dans le présent exemple, ce coefficient s'élevait respectivement à 24,4 % et à 15,6 % pour la fréquence des dicentriques et pour la dose reçue. Ces valeurs montrent que la reproductibilité est meilleure pour la dose estimée que pour la fréquence des dicentriques.

De futures comparaisons interlaboratoires menées avec les mêmes participants permettront de déterminer si la reproductibilité peut être améliorée. Si tel n'est pas le cas, la valeur obtenue sera considérée comme la variabilité associée aux erreurs aléatoires inhérentes à la méthode appliquée.

RÉFÉRENCES POUR LES ANNEXES

- [1] FENECH, M., Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 1084–1104.
- [2] WEIER, H.G., et al., Two colour hybridization with high complexity chromosome-specific probes and a degenerate alpha satellite probe DNA allows unambiguous discrimination between symmetrical and asymmetrical translocations, *Chromosoma* **100** (1991) 371–376.
- [3] FENECH, M., et al., HUMN project: detailed description of the scoring criteria 4686 for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte 4687 cultures, *Mutat. Res.* **534** (2003) 65–75.
- [4] EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., PURROT, R.J., Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution, *Radiat. Environ. Biophys.* **16** (1979) 89–100.
- [5] MERKLE, W., Poisson goodness-of-fit tests for radiation-induced chromosome aberrations, *Int. J. Radiat. Biol.* **40** (1981) 685–692.
- [6] FROME, E.L., DUFRAIN, R.J., Maximum likelihood estimation for cytogenetic dose-response curves, *Biometrics* **42** (1986) 73–84.
- [7] PAPWORTH, D.G., SAVAGE, J.R.K., “Curve fitting by maximum likelihood”, *Radiation-Induced Chromosomal Aberrations in Tradescantia: Dose Response Curves*, *Radiat. Bot.* **15** (1975) 87–140.
- [8] SASAKI, M.S., Chromosomal biodosimetry by unfolding a mixed Poisson distribution: a generalized model, *Int. J. Radiat. Biol.* **79** (2003) 83–97.
- [9] BRAME, R.S., and GROER, P.G., Bayesian methods for chromosome dosimetry following a criticality accident. *Radiat. Prot. Dosim.* **104** (2003) 61–63.
- [10] YONG, L.C., et al., Increased frequency of chromosome translocations in airline pilots with long-term flying experience, *Occ. Environ. Med.* **66** (2008) 56–62.
- [11] NEYMAN, J., On a new class of “contagious” distribution, applicable in entomology and bacteriology, *Am. Math. Stat.* **10** (1939) 35–55.
- [12] MORAND, J., et al., Confidence limits for Neyman type A-distributed events, *Radiat. Prot. Dosim.* **128** (2008) 437–443.
- [13] STIRATELLI, R.G., MCCARTHY, K.L., SCRIBNER, H.E., Parametric approaches to the analysis of in vivo cytogenetics studies, *Environ. Mutagen.* **7** Suppl. 4 (1985) S43-S54.
- [14] AITCHISON, J., SHEN, S.M., Logistic-normal distributions: some properties and uses, *Biometrika* **67** (1980) 261–272.
- [15] ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION, Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 5 : Méthodes alternatives pour la détermination de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée, ISO 5725-5:1998, ISO, Genève (1998).
- [16] ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION, Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons interlaboratoires, ISO 13528:2005, ISO, Genève (2005).
- [17] DI GIORGIO, M., BARQUINERO, J.F., VALLERGA, M.B., RADL, A., TAJA, M.R., SEOANE, A., DE LUCA, J., STUCK OLIVEIRA, M., VALDIVIA, P., GARCIA LIMA, O., LAMADRID, A., GONZALEZ MESA, J., ROMERO AGUILERA, I., MANDINA CARDOSO, T., GUERRERO CARBAJAL, Y.C., ARCEO MALDONADO, C., ESPINOZA, M.E., MARTINEZ-LOPEZ, W., MENDEZ-ACUÑA, L., DI TOMASO, M., ROY, L., LINDHOLM, C., ROMM, H., GÜÇLÜ, I., LLOYD, D.C., Biological dosimetry intercomparison exercise: an evaluation through triage and routine mode results by robust methods. *Radiation Research* (2011, in press).

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ace	fragment acentrique
ADN	acide désoxyribonucléique
AFRRI	<i>Armed Forces Radiobiology Research Institute</i> (États-Unis)
AIEA	Agence internationale de l'énergie atomique
ARNase	ribonucléase
BER	réparation par excision de base
BrdU	bromodésoxyuridine
CABAS	logiciel de calcul des aberrations chromosomiques
CBMN	analyse des micronoyaux par blocage de la cytokinèse
CBMN Cyt	test cellulaire des micronoyaux par blocage de la cytokinèse
CCD	dispositif à couplage de charge
CDB	cassure double brin
CHO	cellule ovarienne de hamster chinois
CIPR	Commission internationale de protection radiologique
CIUR	Commission internationale des unités et mesures radiologiques
CSB	cassure simple brin
Cyt B	cytochalasine B
DAPI	diamidino-4,6 phényl-2 indole
ddl	degrés de liberté
dic	chromosome dicentrique
DMSO	diméthylsulfoxyde
DTL	dosimètre thermoluminescent
EBR	efficacité biologique relative
EDR	engin à dispersion de radioactivité
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
Er. T.	erreur type

FISH	hybridation fluorescente <i>in situ</i>
FPG	fluorescence plus Giemsa
HBSS	solution saline équilibrée de Hank
HRR	réparation par recombinaison homologue
HUMN	micronoyau humain
IDN	indice de division nucléaire
IND	dispositif nucléaire artisanal
IRSN	Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (France)
ISO	Organisation internationale de normalisation
LB	lésion de base
LIMS	système de gestion de l'information de laboratoire
M1, M2, ...	première, deuxième, ... divisions <i>in vitro</i> d'une cellule
MEM	milieu essentiel minimum
mFISH	hybridation fluorescente <i>in situ</i> multicolore
MN	micronoyau
NHEJ	religation non homologue
NER	réparation par excision de nucléotides
NIRS	Institut national des sciences radiologiques (Japon)
OMS	Organisation mondiale de la Santé
ONU	Organisation des Nations Unies
PAINT	Protocole portant sur l'identification des aberrations et sur la terminologie associée à leur classification
PAP	pontage ADN-protéines
PBS	solution saline tamponnée au phosphate
PCC	condensation prématurée des chromosomes
PCR	amplification génique
PEG	polyéthylène glycol

PHA	phytohémagglutinine
PN	pont nucléoplasmique
PRC	projet de recherche coordonnée
REAC/TS	Centre d'assistance en cas d'urgence radiologique/site de formation (États-Unis)
RED	dispositif d'exposition aux rayonnements
RICA	test rapide sur des chromosomes interphasiques
SA	site abasique
SC	sonde centromérique
SEM	erreur type de la moyenne
SI	Système international d'unités
SM	site multilésé
SSBR	réparation des cassures simple brin
SSC	solution saline de citrate de sodium
TCD	test des chromosomes dicentriques
TLE	transfert linéique d'énergie
UI	unité internationale
UV	ultraviolet

DÉFINITIONS³

aberration instable. Réarrangement chromosomique qui peut être létal pour la cellule concernée ou ses cellules filles car il entraîne une perte de matériel génétique ou une transmission déséquilibrée du patrimoine génétique lors de la mitose.

aberration stable. Réarrangement ou échange chromosomique inter ou intrachromosomique non létal et qui n'entraîne pas de perte de matériel génétique lors de la mitose.

accident*. Tout événement involontaire, y compris les fausses manœuvres, les défaillances d'équipements ou d'autres anomalies, dont les conséquences réelles ou potentielles ne sont pas négligeables du point de vue de la protection ou de la sûreté.

accident de criticité. Accident mettant en jeu la criticité.

- Habituellement, dans une installation dans laquelle sont utilisées des matières fissiles.

acide désoxyribonucléique (ADN). Molécule contenue dans les chromosomes, elle code les gènes responsables de la structure et du fonctionnement d'un organisme et permet la transmission de l'information génétique d'une génération à l'autre.

ajustement de courbe. Fait de trouver la formule mathématique qui s'adapte le mieux à une série de points de données, parfois avec d'autres contraintes, comme la pondération de l'ajustement par la fiabilité de chaque point (évaluée par l'erreur type associée au point en question) ou le fait de tenir compte d'une valeur de référence mesurée.

amplification génique (PCR). Opération qui consiste à amplifier une séquence d'ADN par voie enzymatique grâce à une réplication répétée à l'aide d'ADN polymérase.

aneugène, agent. Mutagène indirect capable d'affecter la division cellulaire et le fuseau mitotique et d'entraîner la perte ou le gain de chromosomes entiers, ce qui provoque une aneuploïdie.

anneau centrique (acentrique). Chromosome circulaire doté (dépourvu) de centromère et qui résulte d'une fusion opérée au niveau de deux points de cassure au sein d'un même chromosome.

anticoagulant. Médicament qui empêche la coagulation du sang.

becquerel (Bq)*. Unité SI d'activité, égale à une désintégration par seconde.

- Elle remplace le curie (Ci), qui n'est pas une unité SI. $1 \text{ Bq} = 27 \text{ pCi}$ ($2,7 \times 10^{-11} \text{ Ci}$) approximativement. $1 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^{10} \text{ Bq}$.

³ Ces définitions s'appliquent à la présente publication. Celles qui sont signalées par un astérisque sont extraites de la référence [357].

biais. Écart de résultats ou d'inférences par rapport à la vérité ou processus qui conduit à un tel écart.

binucléé. Comportant deux noyaux. Les cellules binucléées apparaissent à la fin de la division nucléaire et peuvent s'accumuler si l'on utilise un inhibiteur de la cytokinèse comme la cytochalasine B. Lors d'une analyse des micronoyaux par blocage de la cytokinèse, on examine ce type de cellule à la recherche des micronoyaux et des ponts nucléoplasmiques.

biomarqueur. Indicateur d'un processus biologique normal ou pathogène. En dosimétrie biologique, ils sont utilisés pour distinguer les dommages biologiques radio-induits de ceux qui sont provoqués par d'autres facteurs.

bourgeon nucléaire. Corps semblable à un micronoyau et rattaché au noyau par une fine liaison nucléoplasmique. C'est une anomalie du noyau.

5-bromodésoxyuridine (BrdU). Analogue de la thymidine pour lequel le groupe méthyle situé à la position 5' sur la thymine est remplacé par du brome. En biologie dosimétrique, la BrdU est utilisée pour marquer de manière différente l'ADN qui vient d'être synthétisé afin de repérer les cellules qui ont effectué plus d'une mitose.

caryotype. Arrangement systématique de paires de chromosomes homologues d'une cellule en fonction de leur taille, de la position du centromère et de la disposition des bandes, il est établi à partir d'une classification type.

cassure double brin (CDB). Type de lésion de l'ADN pour lequel l'ADN est complètement coupé du fait de la scission du squelette phosphodiester sur les deux brins de la double hélice au niveau du même locus ou de loci proches.

cassure simple brin (CSB). Type de lésion de l'ADN pour lequel l'ADN n'est cassé que sur l'un des brins de la double hélice.

cellule instable. Cellule qui comporte une aberration instable, par exemple une dicentrique, un anneau ou un fragment acentrique.

cellule stable. Cellule dépourvue d'aberrations instables. Elle peut être entièrement intacte ou ne contenir comme seules aberrations que des aberrations stables.

centromère. Région de constriction primaire d'un chromosome qui est visible durant la mitose et qui maintient ensemble les chromatides sœurs.

chromosome arlequin. Chromosome qui a été marqué et coloré de manière différenciée après un ajout de BrdU pendant deux cycles cellulaires. À l'issue d'une coloration adéquate, l'une des chromatides sœurs apparaît foncée et l'autre claire.

clastogène. Caractérise un agent physique ou chimique qui casse l'ADN des chromosomes, ce qui conduit à des réarrangements comme les aberrations observées en métaphase.

clusters de lésion de l'ADN. Désigne une situation où plus de deux sites sur lesquels des lésions de l'ADN ont été provoquées par un rayonnement ionisant se trouvent à moins de 20 bases de la même molécule.

colchicine/Colcemid. Composé alcaloïdique qui inhibe la formation du fuseau durant la division cellulaire. Il est utilisé pour collecter un grand nombre de cellules en métaphase en les empêchant d'atteindre l'anaphase. Le Colcemid est un analogue synthétique de la colchicine, substance naturelle d'origine végétale.

contamination*. Présence fortuite ou indésirable de substances radioactives sur des surfaces, ou dans des solides, des liquides ou des gaz (y compris dans l'organisme humain), ou processus causant cette présence.

couche leucocytaire. Couche d'un échantillon de sang prélevé sur anticoagulant qui, après centrifugation, contient la plupart des globules blancs.

courbe d'étalonnage. En dosimétrie biologique, représentation graphique ou mathématique de la relation entre la dose et l'effet obtenue grâce à une exposition *in vitro* d'échantillons de sang à des doses connues. Ces courbes sont utilisées pour déterminer, par interpolation, la dose absorbée par un individu potentiellement exposé.

covariance. Mesure de la corrélation de la variance entre deux jeux de données dépendants ou plus, c'est-à-dire de la manière dont les données varient entre elles. Elle peut être positive ou négative et indiquer une relation linéaire positive ou négative entre les jeux de données. Si les variables sont indépendantes, la covariance est nulle.

covariance des paramètres d'une courbe. Les paramètres (C, alpha et bêta) ne s'écartent pas de manière indépendante de leurs valeurs idéales (voir les entrées « écart type » et « variance ») mais avec une certaine corrélation car ils sont calculés simultanément à partir d'un même jeu de données. Cela réduit ainsi l'erreur associée aux calculs associant plusieurs paramètres, comme celui de la formule (7), à celle qui est calculée pour les variances seules. Les corrélations correspondantes peuvent également être calculées à partir des variances et des covariances (covariance divisée par la racine carrée du produit des deux variances, c'est-à-dire covariance divisée par le produit des écarts types).

cytochalasine B. Composé naturel d'origine fongique qui a la propriété unique d'inhiber la cytokinèse dans les cellules de mammifère et humaines. Il est utilisé pour l'analyse des micronoyaux par blocage de la cytokinèse.

cytogénétique. Branche de la génétique qui porte sur l'étude des chromosomes.

débit de dose. Mesure du débit auquel une énergie est transférée d'un rayonnement à une cible ; dose délivrée par unité de temps. Même si le débit de dose pourrait, en principe, être défini pour n'importe quelle unité de temps (ainsi, une dose annuelle est techniquement un débit de dose), le terme débit de dose est généralement utilisé pour de courtes périodes de temps. On parle, par exemple, de dose par seconde ou de dose par heure.

demi-vie. Temps nécessaire pour qu'un paramètre diminue de 50 % par rapport à sa valeur initiale. En dosimétrie biologique, cette notion est utilisée pour mesurer le renouvellement des lymphocytes sanguins.

dicentrique, chromosome (dic). Chromosome aberrant qui possède deux centromères et qui est issu de la réparation incorrecte de deux chromosomes cassés.

dose absorbée (D)*. Grandeur fondamentale D en dosimétrie, définie par la relation :

$$D = \frac{d\bar{\varepsilon}}{dm}$$

où :

$d\bar{\varepsilon}$ est l'énergie moyenne transmise par le rayonnement ionisant à la matière dans un élément de volume et dm la masse de matière dans l'élément de volume.

- On peut calculer l'énergie moyenne pour tout volume défini, la dose moyenne étant égale à l'énergie totale transmise dans ce volume divisée par la masse du volume.
- La dose absorbée est définie en un point ; pour la dose moyenne à un tissu ou un organe, on parle de dose à un organe.
- Unité : le gray (Gy), égal à 1 J/kg (ancienne unité : le rad).

dosimètre. Appareil qui mesure l'exposition aux rayonnements ionisants.

dosimètre OSL (à luminescence stimulée optiquement). Type particulier de dosimètre physique utilisé pour mesurer des expositions aux rayonnements ionisants.

dosimètre thermoluminescent (DTL). Type particulier de dosimètre physique utilisé pour mesurer des expositions aux rayonnements ionisants.

dosimétrie biologique. Fait d'utiliser des biomarqueurs afin de vérifier si une exposition aux rayonnements a eu lieu et d'estimer la dose absorbée.

eau tritiée. Eau dans laquelle les atomes habituels d'hydrogène ont été remplacés par du tritium, un isotope radioactif de l'hydrogène.

écart type. Mesure quantitative des variations au sein d'un échantillon de mesures effectuées sur une population, elle indique le degré d'étalement des valeurs pour un jeu de données. Lorsque les données suivent approximativement une loi normale, l'écart type d'un des paramètres de la courbe indique de combien il est probable que ce paramètre s'écarte de la vraie valeur, valeur dont on peut considérer dans l'idéal qu'elle est obtenue en effectuant la moyenne sur une large population de sujets (ou d'expériences) à partir d'un grand nombre de cellules pour chacun. Voir également l'entrée « covariance ».

effets biologiques. Ensemble des conséquences possibles d'une lésion cellulaire qui peut être due à une exposition à un agent externe, par exemple un rayonnement ionisant, sur des matières vivantes, des organismes, des tissus ou des cellules, en fonction du type et du degré de cette lésion.

effet déterministe. Effet sanitaire des rayonnements pour lequel il existe généralement un niveau de dose seuil au-dessus duquel la gravité de l'effet augmente avec la dose. Un tel effet est dit « effet déterministe grave » s'il est mortel ou risque de l'être ou s'il entraîne une lésion permanente qui diminue la qualité de vie.

effet stochastique (des rayonnements). Effet sanitaire des rayonnements dont la probabilité est proportionnelle à la dose et dont la gravité est indépendante de la dose. Les effets stochastiques peuvent être somatiques ou héréditaires et apparaissent généralement sans niveau de dose seuil. Le cancer de la thyroïde et la leucémie en sont des exemples.

efficacité biologique relative (EBR)*. Mesure relative de l'efficacité de différents types de rayonnements à provoquer un effet sanitaire précis, exprimée comme le rapport inverse des doses absorbées de deux types de rayonnements différents qui produiraient un effet biologique donné de même intensité.

enzyme. Protéine qui catalyse les réactions chimiques d'autres substances sans être elle-même détruite ou modifiée à l'issue de ces réactions.

épidémiologie. Étude de la répartition et des déterminants d'états ou d'événements sanitaires dans des populations particulières et application de cette étude à la prévention des problèmes de santé.

équilibre des particules chargées. État dans lequel le nombre de chaque type de particule chargée qui quitte un volume donné est égal au nombre de celles qui y entrent.

erreur type de la moyenne (SEM). Mesure quantitative de la différence entre un échantillon de mesures et une population qui suit approximativement une loi normale, elle indique de combien la moyenne de cet échantillon est susceptible de s'écarter de la vraie moyenne de la population. Elle permet donc de quantifier avec quelle précision cette vraie moyenne est connue.

exposition*. Action d'exposer ou fait d'être exposé à une irradiation.

Le terme exposition ne doit pas être employé comme synonyme de dose. La dose est une mesure des effets de l'exposition.

- L'exposition peut être divisée en catégories selon sa nature et sa durée (voir situations d'exposition) ou selon la source de l'exposition, les personnes exposées et/ou les circonstances dans lesquelles elles sont exposées.

exposition externe. Exposition à des rayonnements émis par une source se trouvant hors de l'organisme.

- Oppos. : exposition interne.

exposition interne. Exposition à des rayonnements émis par une source se trouvant dans l'organisme.

- Oppos. : exposition externe.

fausser. Verbe employé lorsqu'une variable (le facteur de confusion, par ex. l'âge, la consommation de tabac) « perturbe » la corrélation entre une grandeur d'influence (par ex. l'exposition à un rayonnement ionisant) et un effet (par ex. les aberrations induites) analysée dans une étude. Si les facteurs de confusion ne sont pas pris en compte, on peut croire à la présence d'une corrélation qui n'existe pas en réalité ou ne pas apercevoir une vraie corrélation.

fantôme. Objet qui absorbe et diffuse les rayons gamma et X à peu près de la même manière que les tissus de l'organisme. Il est utilisé par exemple pour mesurer des doses ou irradier des échantillons de sang afin de construire une courbe d'étalonnage dose-effet.

faux négatif. Résultat d'un examen qui indique qu'un individu n'est pas atteint alors qu'en réalité il l'est. Autrement dit, le résultat de l'examen est négatif alors que la personne est atteinte.

faux positif. Résultat d'un examen qui indique qu'un individu est atteint alors qu'en réalité il ne l'est pas. Autrement dit, le résultat de l'examen est positif alors que la personne n'est absolument pas atteinte.

fluorochrome. Molécules qui deviennent fluorescentes lorsqu'elles sont excitées à une certaine longueur d'onde. Elles sont utilisées dans les méthodes FISH pour mettre en évidence des régions chromosomiques spécifiques.

fonction G. Facteur dépendant du temps utilisé pour modifier le coefficient de la dose au carré dans la relation quadratique entre la dose et l'effet afin de tenir compte des conséquences d'une exposition prolongée.

fragment acentrique (ace). Fragment chromosomique terminal ou interstitiel de taille variable et dépourvu de centromère. Un fragment acentrique formé indépendamment d'une dicentrique, d'une tricentrique ou d'un anneau centrique est généralement appelé fragment excédentaire.

fréquence naturelle. Incidence des aberrations chromosomiques ou des micronoyaux relevée dans la population générale.

génotoxine. Agent chimique ou physique qui provoque une lésion ou une mutation du matériel génétique.

gray (Gy)*. Unité SI de kerma et de dose absorbée, égale à 1 J/kg. Il a remplacé le rad. 1 Gy = 100 rad.

groupe témoin. Groupe de cellules, d'animaux ou de sujets humains confrontés autant que possible à des conditions identiques à celles des individus exposés, sauf que le paramètre qui est étudié n'est pas appliqué.

hybridation fluorescente *in situ* (FISH). Méthode utilisée pour mettre en évidence des chromosomes ou des régions chromosomiques spécifiques en fixant des sondes d'ADN marquées par un fluorochrome sur de l'ADN chromosomique dénaturé.

FISH interphasique. Les sondes sont introduites directement dans des cellules en interphase. Cette technique permet d'observer les changements qui se sont produits à l'échelle des domaines chromosomiques.

FISH métaphasique. Les sondes sont introduites dans des chromosomes métaphasiques. Cela permet d'observer les aberrations chromosomiques.

Techniques FISH :

FISH multicolore (mFISH). mFISH utilise des sondes d'ADN qui peignent des chromosomes entiers et qui sont marquées par une combinaison unique de fluorochromes, lesquels émettent une couleur différente pour chaque chromosome humain.

pq-mFISH. Variante de mFISH qui permet de distinguer les bras d'un même chromosome.

incorporation. Pénétration d'un radionucléide dans l'organisme par inhalation, par ingestion ou à travers une peau intacte ou blessée.

index mitotique. Pourcentage de cellules en mitose à un instant donné.

indice de division nucléaire (IDN). Mesure de la vitesse moyenne d'un cycle cellulaire à partir des proportions respectives de cellules d'une population qui ont atteint chaque étape d'un cycle, normalement jusqu'à la quatrième division.

insertion. Anomalie chromosomique pour laquelle un fragment acentrique d'un chromosome a été inséré dans le bras d'un autre chromosome.

intercomparaison. Procédure utilisée pour l'assurance et le contrôle de la qualité. En dosimétrie biologique, des substances sont échangées entre laboratoires à des fins d'analyse comparative.

interphase. Phase du cycle cellulaire la plus longue, elle est comprise entre deux divisions mitotiques. C'est pendant cette phase que la cellule exerce la majorité de ses fonctions, comme la préparation à la division cellulaire.

intervalle de confiance. Intervalle associé à une variable, par exemple une fréquence, et construit en suivant une loi déterminée (par ex. une loi de Poisson) de sorte qu'il y ait une probabilité précise que cette plage contienne la vraie valeur de cette variable. Un tel intervalle (défini par ses limites de confiance inférieures et supérieures) sert donc à indiquer la fiabilité d'une estimation. La probabilité que cet intervalle contienne le paramètre en question est déterminée par le seuil de confiance ou coefficient de confiance. L'augmentation du seuil de confiance se traduit par un élargissement de l'intervalle de confiance.

inversion. Réarrangement chromosomique au cours duquel le segment d'un chromosome s'est retourné de 180° puis s'est réinséré dans le chromosome au même point de cassure. Une inversion est dite péricentrique si le segment en question comprend le centromère et paracentrique dans le cas contraire.

in vitro. Observé ou effectué dans un tube à essai.

in vivo. Observé ou effectué dans un organisme vivant.

ionisation. Processus physique au cours duquel un ou plusieurs électrons orbitaux sont éjectés d'un atome ou d'une molécule, ce qui donne à ces derniers une charge électrique (et les transforme en ions). Ce processus provoque localement un dégagement d'une grande quantité d'énergie, environ 33 eV par ionisation, ce qui est plus que suffisant pour casser une liaison chimique forte.

isotopes. Atomes du même élément chimique qui comportent le même nombre de protons et d'électrons mais des nombres de neutrons différents (même numéro atomique mais nombres de masse différents). Deux isotopes sont identiques sur le plan chimique mais présentent des caractéristiques nucléoniques distinctes.

kerma (énergie cinétique libérée par unité de masse)*. Grandeur K, définie par la relation :

$$K = \frac{dE_{tr}}{dm}$$

où :

dE_{tr} est la somme des énergies cinétiques initiales de toutes les particules ionisantes chargées libérées par des particules ionisantes non chargées dans une matière de masse dm .

- Unité : gray (Gy).
- Acronyme de « kinetic energy relaxed in matter » (énergie cinétique libérée dans la matière), ce terme est devenu nom commun (masculin).

laboratoire de service. Dans la présente publication, ce terme désigne un laboratoire spécialisé en dosimétrie biologique.

leucocyte. Terme générique qui désigne tout type de globule blanc (par ex. les lymphocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, les plasmocytes et les monocytes).

limite de détection. Dose correspondant à la fréquence la plus faible d'un marqueur de dosimétrie biologique donné qui peut être distinguée au-dessus de la fréquence naturelle avec un certain degré de confiance, normalement 95 %.

lymphocytes. Globules blancs que l'on trouve principalement dans le sang, la lymphe et les tissus lymphatiques, ce sont les cellules immunocompétentes de l'organisme et leurs précurseurs.

marquage en bandes. Technique qui permet de colorer les chromosomes de manière différenciée, le plus souvent en utilisant du colorant de Giemsa. En fonction de la méthode choisie, on observe une coloration de certaines régions chromosomiques comme les centromères (marquage en bandes C) ou de motifs caractéristiques le long des bras (marquage en bandes G). L'alternance caractéristique de bandes claires et foncées, propre à chaque paire de chromosomes, permet de les reconnaître et d'étudier leur structure.

marquage en bandes C. Voir l'entrée « marquage en bandes ».

marquage en bandes G. Voir l'entrée « marquage en bandes ».

méta-analyse. Étude dans laquelle les résultats de recherches similaires et indépendantes sur un sujet donné sont regroupés, synthétisés et évalués selon certains critères.

métaphase. Phase de la mitose du cycle cellulaire chez les eucaryotes au cours de laquelle les chromosomes se condensent jusqu'à leur longueur minimale et s'alignent au milieu de la cellule avant d'être séparés pour former deux cellules filles distinctes.

méthode à contamination poissonnienne. Analyse mathématique de la fréquence des anneaux centriques et des chromosomes dicentriques qui permet d'évaluer la dose reçue lorsque l'on soupçonne que l'exposition a été partielle. Cette méthode consiste à évaluer les doses en étudiant la répartition des dicentriques dans toutes les cellules examinées et donne des informations complémentaires sur le volume de l'organisme qui a été irradié. Voir également l'entrée « méthode du Qdr ».

méthode du Qdr. Analyse mathématique de la fréquence des anneaux centriques et des chromosomes dicentriques qui permet d'évaluer la dose reçue lorsque l'on soupçonne que l'exposition a été partielle. Cette méthode consiste à évaluer les doses en n'étudiant la répartition des dicentriques que dans les cellules lésées. Voir également l'entrée « méthode à contamination poissonnienne ».

méthode du Qpcc. Analyse mathématique identique au Qdr (voir ci-dessus) mais qui s'intéresse à la répartition des fragments chromosomiques qui ont subi une condensation prématurée.

micronoyau (MN). Type de petit noyau que l'on trouve dans les cellules où un chromosome a subi une lésion. Il résulte le plus souvent du retard pris par un chromosome entier ou par un fragment acentrique au cours de l'anaphase. Le diamètre d'un micronoyau est généralement compris entre 1/16 et 1/3 de celui des noyaux principaux d'une cellule mononucléaire ou binucléée. Les micronoyaux ont les mêmes propriétés de structure et de coloration que les noyaux.

mitogène. Réactif qui induit une prolifération des cellules.

mitose. Étape du processus de division cellulaire au cours de laquelle les chromosomes d'une cellule eucaryote se séparent en deux jeux identiques.

modèle linéaire. Modèle mathématique couramment utilisé pour décrire l'effet biologique des rayonnements et pour lequel l'effet F varie linéairement avec la dose D :

$$F = \alpha D.$$

modèle linéaire quadratique. Modèle mathématique couramment utilisé pour décrire l'effet biologique des rayonnements et pour lequel la relation entre l'effet F et la dose D est une fonction linéaire quadratique :

$$F = \alpha D + \beta D^2.$$

mutagène. Agent chimique ou physique doté de la propriété d'induire des mutations génétiques au niveau d'une séquence de base de la molécule d'ADN ou à l'échelle d'un chromosome.

mutation. Modification d'un gène par rapport à son état naturel. Peut être pathogène ou constituer une variante normale et bénigne.

neutrons de fission. Neutrons libres, généralement issus d'une fission nucléaire, réaction au cours de laquelle le noyau lourd d'un atome se scinde en deux parts à peu près égales (noyaux d'éléments plus légers) et qui s'accompagne de la libération d'une quantité relativement importante d'énergie.

neutrons rapides. Neutrons dont l'énergie est supérieure à une valeur arbitraire, en général autour de 1 MeV.

nucléide. Type d'atome caractérisé par un nombre de protons (numéro atomique) et un nombre de masse.

nucléosomes. Structures qui forment les unités de répétition fondamentales utilisées pour compacter la chromatine des chromosomes chez les eucaryotes.

PAINT (protocole portant sur l'identification des aberrations et sur la terminologie associée à leur classification). Terminologie utilisée en analyse FISH pour décrire les aberrations chromosomiques.

période ($T_{1/2}$)*.

1) Temps nécessaire pour que l'activité d'un radionucléide soit réduite de moitié par un processus de décroissance radioactive.

- Lorsqu'il est nécessaire de faire la distinction par rapport à d'autres périodes [voir 2)], il convient d'employer l'expression période radioactive.
- La période est liée à la constante de désintégration, λ , selon la relation :

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$$

2) Temps nécessaire pour qu'une quantité de matière déterminée (par exemple un radionucléide) dans un endroit déterminé soit réduite de moitié par un ou des processus déterminé(s) suivant la même loi exponentielle que la décroissance radioactive.

période biologique. Temps nécessaire pour qu'une quantité de matière dans un tissu, un organe ou une partie du corps (ou tout autre biote) soit réduite de moitié par des processus biologiques.

période effective (T_{eff}). Temps nécessaire pour que l'activité d'un radionucléide dans un endroit déterminé soit réduite de moitié par tous les processus en jeu.

$$\frac{1}{T_{eff}} = \sum_i \frac{1}{T_i}$$

où :

T_i est la période pour le processus i .

période radioactive. Temps nécessaire pour que l'activité d'un radionucléide soit réduite de moitié par un processus de décroissance radioactive.

- On utilise aussi l'expression période physique pour désigner ce concept.

pont nucléoplasmique (PN). Apparaît lorsque les centromères de chromosomes dicentriques ou les chromatides migrent vers les pôles opposés de la cellule lors de l'anaphase. Dans le test CBMN, il est possible d'observer les cellules binucléées qui comportent des PN car la cytokinèse est inhibée, de sorte que les ponts anaphasiques qui sont à l'origine des ponts nucléoplasmiques ne se cassent pas.

premiers intervenants*. Premiers membres d'un service d'urgence à intervenir sur le lieu d'une situation d'urgence.

principe de Bragg-Gray. Établit un lien entre l'ionisation produite dans une cavité remplie d'un gaz, cette cavité se trouvant à l'intérieur d'un milieu, et l'énergie absorbée dans ce milieu. L'application de ce principe à la formation des aberrations chromosomiques a pour conséquence que, le noyau d'une cellule étant très petit, l'énergie totale absorbée est uniquement due aux électrons qui traversent le noyau. Les particules secondaires peuvent donc être ignorées.

rapport des cotes. Rapport de deux cotes, calculé pour indiquer la probabilité que la dose reçue soit nulle par rapport à une dose suspectée (par exemple une valeur lue sur un dosimètre) ou mesurée par des méthodes physiques.

rayonnement à faible TLE. Voir les entrées « rayonnement à TLE élevé » et « transfert linéique d'énergie ».

rayonnement alpha. Rayonnement corpusculaire émis lors de la désintégration nucléaire de certains radionucléides. Une particule alpha est constituée de deux neutrons et de deux protons et est identique au noyau de l'atome d'hélium. Elle est facilement absorbée par quelques centimètres d'air, c'est pourquoi le principal risque de ce type de rayonnement est l'incorporation des particules.

rayonnement à TLE élevé. Rayonnement qui dépose son énergie lors d'interactions très rapprochées le long de sa trajectoire (exemple : particules alpha, neutrons). Cette distribution spatiale influe sur l'efficacité biologique relative. Voir également l'entrée « transfert linéique d'énergie (TLE) ».

rayonnement bêta. Rayonnement particulaire composé d'électrons ou de positons, il est émis lors de la désintégration nucléaire de certains radionucléides. La pénétration des particules bêta est de quelques centimètres dans l'air et est comprise entre quelques millimètres et quelques centimètres dans les tissus mous et le plastique.

rayonnement gamma. Rayonnement électromagnétique (photons) de haute fréquence (très courte longueur d'onde) émis par le noyau ou résultant de la désintégration ou de l'annihilation de particules. Les rayons gamma pénètrent dans les tissus plus profondément que les particules bêta ou alpha, mais leur transfert linéique d'énergie est plus faible. Des matériaux lourds comme le plomb ou le béton doivent être utilisés pour se protéger des rayonnements gamma.

rayonnement neutronique. Les neutrons, l'un des constituants du noyau atomique, sont des particules élémentaires électriquement neutres. Ils sont tout particulièrement libérés lors d'une fission nucléaire et leur pouvoir de pénétration est élevé.

rayonnement X. Rayonnement électromagnétique à onde courte (photons) émis soit par des électrons dont l'orbitale est éloignée du noyau, soit par des électrons qui subissent une accélération et qui provoquent l'émission d'un rayonnement de freinage. Sa longueur d'onde est plus courte que celle des rayons ultraviolets et plus longue que celle des rayons gamma. Des matériaux lourds comme le plomb doivent être utilisés pour se protéger des rayons X.

réarrangement complexe. Aberration qui fait intervenir trois cassures ou plus sur deux chromosomes ou plus et qui, de manière caractéristique, est induite par une exposition à un rayonnement à TLE élevé ou à des doses élevées d'un rayonnement dont le TLE est faible.

résonance paramagnétique électronique. Technique utilisée pour étudier les espèces chimiques caractérisées par la présence d'un ou plusieurs électrons célibataires, comme les radicaux organiques et inorganiques ou les complexes inorganiques qui comprennent un ion d'un métal de transition. Cette technique peut servir à mesurer des doses.

röntgen (R)*. Unité d'exposition, égale à $2,58 \times 10^{-4}$ C/kg (exactement).

- Remplacé par l'unité SI C/kg.

sievert (Sv)*. Unité SI de la dose équivalente et de la dose efficace, égale à 1 J/kg.

signification statistique. On parle de signification statistique lorsque le résultat d'une expérience ou d'une étude donnée s'écarte nettement du résultat attendu. La signification statistique d'un tel résultat est une estimation de la mesure dans laquelle celui-ci est « vrai », c'est-à-dire causé par autre chose que le simple hasard. En général, un écart entre les résultats observés et les résultats attendus est considéré comme significatif si la probabilité d'erreur est inférieure à 5 %.

situations d'exposition*.

exposition aiguë. Exposition reçue pendant une courte durée. Se dit habituellement d'une exposition d'une durée suffisamment courte pour que les doses qui en résultent puissent être considérées comme instantanées (par ex. inférieure à une heure).

exposition chronique. Exposition persistante. L'adjectif « chronique » se rapporte uniquement à la durée de l'exposition et non à l'intensité des doses. Cette expression s'emploie habituellement pour des expositions qui durent de longues années car elles sont dues à des radionucléides de longue période dans l'environnement. La Commission internationale de protection radiologique parle d'exposition prolongée pour décrire ce concept. Ces deux expressions sont en opposition avec exposition aiguë.

situation d'urgence*. Situation inhabituelle qui nécessite une action rapide pour atténuer un danger ou des conséquences néfastes pour la santé et la sûreté des personnes, la qualité de vie, les biens ou l'environnement. Il s'agit aussi bien de situations d'urgence nucléaire ou radiologique que de situations d'urgence classique telles que les incendies, le rejet de produits chimiques dangereux, les tempêtes ou les séismes. Sont incluses les situations dans lesquelles il est justifié d'entreprendre une action rapide pour atténuer les effets d'un danger perçu.

situation d'urgence nucléaire ou radiologique. Situation d'urgence dans laquelle la cause du danger réel ou perçu est :

- a) L'énergie résultant d'une réaction nucléaire en chaîne ou de la décroissance de produits d'une réaction en chaîne ;
 - b) Une exposition à des rayonnements.
- Les points a) et b) tendent à représenter respectivement les situations d'urgence nucléaire et radiologique. Toutefois, cette distinction n'est pas rigoureuse.

sonde centromérique. Sonde d'ADN qui marque la région centromérique de chaque chromosome.

spondylarthrite ankylosante. Arthrite inflammatoire qui affecte la colonne vertébrale et les sacro-iliaques. Il y a plusieurs décennies, on avait recours à la radiothérapie grand champ pour traiter l'inflammation de la colonne vertébrale chez les patients atteints de cette maladie.

synchronisation. Appliqué à la culture de cellules, ce terme désigne la manipulation de certaines cellules afin que celles-ci se trouvent toutes au même stade du cycle cellulaire.

télomère. Extrémité de chaque bras de chromosome, il est constitué de séquences TTAGGG répétées en tandem qui préviennent la fusion de chromosomes et la formation de dicentriques. Les séquences télomériques peuvent être perdues à chaque cycle de réplication de l'ADN ou en cas de microdélétion affectant une séquence.

test cellulaire des micronoyaux par blocage de la cytokinèse (CBMN Cyt). CMBN Cyt est une version plus poussée du test CMBN dans laquelle une plus grande diversité de biomarqueurs des lésions chromosomiques (micronoyaux, ponts nucléoplasmiques et bourgeons nucléaires contenus dans les cellules binucléées), ainsi que la mort des cellules (cellules nécrotiques et apoptotiques) et la cytostase (indice de division nucléaire basé sur les proportions de cellules mononucléaires, binucléées et multinucléées) sont mesurées. Dans ce test, les

micronoyaux et les ponts nucléoplasmiques constituent les biomarqueurs les mieux validés en dosimétrie biologique pour une exposition à des rayonnements ionisants.

traçabilité. Historique complet d'un échantillon de sang réalisé en suivant sa gestion et son stockage depuis le lieu de prélèvement ou de réception jusqu'à son élimination.

transfert linéique d'énergie (TLE) (L_{Δ})*. Défini en général comme suit :

$$L_{\Delta} = \left(\frac{dE}{d\ell} \right)_{\Delta}$$

où :

dE est l'énergie perdue sur une distance $d\ell$ et

Δ une limite supérieure applicable à l'énergie transférée en une seule collision.

- Mesure du transfert d'énergie des rayonnements à la matière exposée en fonction de la distance. Un TLE élevé indique que l'énergie est déposée sur une faible distance.
- L_{∞} (c.-à.-d. avec $\Delta = \infty$) est appelé « transfert linéique d'énergie non restreint » dans la définition du facteur de qualité.

translocation. Altération chromosomique pour laquelle un chromosome entier ou un segment de chromosome se fixe sur un autre chromosome ou sur un autre segment ou échange sa position avec l'un de ceux-ci, le chromosome hybride obtenu se scindant en deux lors de la méiose.

translocation réciproque. Échange des parties terminales entre deux chromosomes distincts.

translocation non réciproque. Translocation d'un seul segment chromosomique : pas d'échange.

tri. Processus de sélection des patients prioritaires en fonction de la gravité de leur état. Le tri cytogénétique consiste à s'appuyer sur des résultats de dosimétrie biologique pour prendre des décisions médicales.

tricentrique, chromosome. Chromosome aberrant qui possède trois centromères et qui résulte d'une fusion de parties de trois chromosomes cassés. Pour les calculs, ils sont considérés comme équivalents à deux dicentriques et sont accompagnés de deux fragments acentriques.

variance. Mesure statistique de l'écart de valeurs par rapport à une valeur centrale, elle est égale au carré de l'écart type.

PERSONNES AYANT COLLABORÉ À LA RÉDACTION ET À L'EXAMEN

Ainsbury, E.	Agence de protection de la santé (Royaume-Uni)
Barquinero, J.F.	Université autonome de Barcelone (Espagne)
Beinke, C.	Institut de radiobiologie de la Bundeswehr (Allemagne)
Blakely, W.F.	Armed Forces Radiobiology Research Institute (États-Unis d'Amérique)
Brasemann, H.	Helmholz Zentrum (Allemagne)
Buglova, E.	Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA)
Carr, Z.	Organisation mondiale de la Santé (OMS)
Di Giorgio, M.	Autoridad Regulatoria Nuclear (Argentine)
Fenech, M.	Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO) (Australie)
Garcia Lima, O.	Centre de radioprotection et d'hygiène des rayonnements (Cuba)
Kodama, Y.	Fondation pour la recherche sur les effets des rayonnements (Japon)
Lindholm, C.	Centre de radioprotection et de sûreté nucléaire (STUK) (Finlande)
Livingston, G.	Oak Ridge Associated Universities (ORAU) (États-Unis d'Amérique)
Lloyd, D.C.	Consultant (Royaume-Uni)
Maznyk, N.A.	Institut de radiologie médicale de l'ANSU (Ukraine)
Prasanna, P.G.S.	Instituts nationaux de la santé (États-Unis d'Amérique)
Previsani, N.	Organisation mondiale de la Santé (OMS)
Romm, H.	Bundesamt für Strahlenschutz (BfS) (Allemagne)
Roy, L.	Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN) (France)
Voisin, P.J.	Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN) (France)
Vral, A.	Université de Gand (Belgique)
Wilkins, R.C.	Santé Canada (Canada)
Yoshida, M.	Université de Hirosaki (Japon)

REMERCIEMENTS POUR LES COMMENTAIRES REÇUS

Azizova, T.	Institut de biophysique d'Oural méridional (Fédération de Russie)
Barrios, L.	Université autonome de Barcelone (Espagne)
Bognár, G.	Institut national de recherche en radiobiologie et hygiène des rayonnements (Hongrie)
Darroudi, F.	Centre médical de l'Université de Leyde (Pays-Bas)
Devantier, Y,	Laboratoires de Chalk River (Canada)
Espinoza Zevallos, M.	Instituto Peruano de Energía Nuclear (Pérou)
Guerrero Carbajal, Y.C.	Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (Mexique)
Güçlü, I.	Centre nucléaire de Çekmece pour la recherche et la formation (ÇNAEM) (Turquie)
Hayata, I.	Consultant (Japon)
Martínez-López , W.	Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (Uruguay)
Natarajan, A.T.	Université de la Tuscia (Italie)
Oliveira, M.	Instituto de Radioproteção e Dosimetria (Brésil)
Palitti, F.	Université de la Tuscia (Italie)
Pantelias, G.	Institut des radio-isotopes et des produits pour radiodiagnostic, Centre national de recherche scientifique Demokritos (Grèce)
Sasaki, M.S.	Université de Kyōto (Japon)
Sotnik, N.	Institut de biophysique d'Oural méridional (Fédération de Russie)
Turai, I.	Institut national de recherche en radiobiologie et hygiène des rayonnements (Hongrie)
Valdivia Pottstock, P.	Commission chilienne de l'énergie nucléaire (Chili)
Vozilova, A.	Centre de recherche en médecine radiologique de l'Oural (URCRM) (Fédération de Russie)
Wilkinson, D.	Recherche et développement pour la défense Canada (Canada)



IAEA

Agence internationale de l'énergie atomique

N° 22

Lieux de vente des publications de l'AIEA

Dans les pays suivants, vous pouvez vous procurer les publications de l'AIEA chez nos dépositaires ci-dessous ou auprès de grandes librairies. Le paiement peut être effectué en monnaie locale ou avec des coupons Unesco.

ALLEMAGNE

UNO-Verlag, Vertriebs- und Verlags GmbH, Am Hofgarten 10, 53113 Bonn
Téléphone : + 49 228 94 90 20 • Télécopie : +49 228 94 90 20 ou +49 228 94 90 222
Courriel : bestellung@uno-verlag.de • Site web : <http://www.uno-verlag.de>

AUSTRALIE

DA Information Services, 648 Whitehorse Road, MITCHAM 3132
Téléphone : +61 3 9210 7777 • Télécopie : +61 3 9210 7788
Courriel : service@dadirect.com.au • Site web : <http://www.dadirect.com.au>

BELGIQUE

Jean de Lannoy, 202 avenue du Roi, 1190 Bruxelles
Téléphone : +32 2 538 43 08 • Télécopie : +32 2 538 08 41
Courriel : jean.de.lannoy@infoboard.be • Site web : <http://www.jean-de-lannoy.be>

CANADA

Bernan Associates, 4501 Forbes Blvd, Suite 200, Lanham, MD 20706-4346, États-Unis d'Amérique
Téléphone : 1-800-865-3457 • Télécopie : 1-800-865-3450
Courriel : customercare@bernan.com • Site web : <http://www.bernan.com>

Renouf Publishing Company Ltd., 1-5369 Canotek Rd., Ottawa, Ontario, K1J 9J3
Téléphone : +613 745 2665 • Télécopie : +613 745 7660
Courriel : order.dept@renoufbooks.com • Site web : <http://www.renoufbooks.com>

CHINE

Publications de l'AIEA en chinois : China Nuclear Energy Industry Corporation, Translation Section, P.O. Box 2103, Beijing

CORÉE, RÉPUBLIQUE DE

KINS Inc., Information Business Dept. Samho Bldg. 2nd Floor, 275-1 Yang Jae-dong SeoCho-G, Seoul 137-130
Téléphone : +02 589 1740 • Télécopie : +02 589 1746 • Site web : <http://www.kins.re.kr>

ESPAGNE

Díaz de Santos, S.A., c/Juan Bravo, 3A, 28006 Madrid
Téléphone : +34 91 781 94 80 • Télécopie : +34 91 575 55 63
Courriel : compras@diazdesantos.es, carmela@diazdesantos.es, barcelona@diazdesantos.es, julio@diazdesantos.es •
Site web : <http://www.diazdesantos.es>

ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Bernan Associates, 4501 Forbes Blvd., Suite 200, Lanham, MD 20706-4346
Téléphone : 1-800-865-3457 • Télécopie : 1-800-865-3450
Courriel : customercare@bernan.com • Site web : <http://www.bernan.com>

Renouf Publishing Company Ltd., 812 Proctor Ave., Ogdensburg, NY, 13669
Téléphone : +888 551 7470 (n° vert) • Télécopie : +888 568 8546 (n° vert)
Courriel : order.dept@renoufbooks.com • Site web : <http://www.renoufbooks.com>

FINLANDE

Akateeminen Kirjakauppa, PO BOX 128 (Keskuskatu 1), 00101 Helsinki
Téléphone : +358 9 121 41 • Télécopie : +358 9 121 4450
Courriel : akatilauk@akateeminen.com • Site web : <http://www.akateeminen.com>

FRANCE

Form-Edit, 5 rue Janssen, B.P. 25, 75921 Paris Cedex 19
Téléphone : +33 1 42 01 49 49 • Télécopie : +33 1 42 01 90 90
Courriel : formedit@formedit.fr • Site web : <http://www.formedit.fr>

Lavoisier SAS, 145 rue de Provigny, 94236 Cachan Cedex
Téléphone : + 33 1 47 40 67 02 • Télécopie : +33 1 47 40 67 02
Courriel : romuald.verrier@lavoisier.fr • Site web : <http://www.lavoisier.fr>

HONGRIE

Librotrade Ltd., Book Import, P.O. Box 126, 1656 Budapest
Téléphone : +36 1 257 7777 • Télécopie : +36 1 257 7472 • Courriel : books@librotrade.hu

INDE

Allied Publishers Group, 1st Floor, Dubash House, 15, J. N. Heredia Marg, Ballard Estate, Mumbai 400 001
Téléphone : +91 22 22617926/27 • Télécopie : +91 22 22617928
Courriel : alliedpl@vsnl.com • Site web : <http://www.alliedpublishers.com>

Bookwell, 2/72, Nirankari Colony, Delhi 110009
Téléphone : +91 11 23268786, +91 11 23257264 • Télécopie : +91 11 23281315
Courriel : bookwell@vsnl.net

ITALIE

Libreria Scientifica Dott. Lucio di Biasio « AEIOU », Via Coronelli 6, 20146 Milan
Téléphone : +39 02 48 95 45 52 ou 48 95 45 62 • Télécopie : +39 02 48 95 45 48
Courriel : info@libreriaaeiou.eu • Site web : www.libreriaaeiou.eu

JAPON

Maruzen Company Ltd, 1-9-18, Kaigan, Minato-ku, Tokyo, 105-0022
Téléphone : +81 3 6367 6079 • Télécopie : +81 3 6367 6207
Courriel : journal@maruzen.co.jp • Site web : <http://www.maruzen.co.jp>

NOUVELLE-ZÉLANDE

DA Information Services, 648 Whitehorse Road, Mitcham Victoria 3132, Australie
Téléphone : +61 3 9210 7777 • Télécopie : +61 3 9210 7788
Courriel : service@dadirect.com.au • Site web : <http://www.dadirect.com.au>

ORGANISATION DES NATIONS UNIES

Dépt. I004, Bureau DC2-0853, First Avenue at 46th Street, New York, N.Y. 10017, États-Unis d'Amérique (ONU)
Téléphone : +800 253-9646 ou +212 963-8302 • Télécopie : +212 963-3489
Courriel : publications@un.org • Site web : <http://www.un.org>

PAYS-BAS

De Lindeboom Internationale Publicaties B.V., M.A. de Ruyterstraat 20A, 7482 BZ Haaksbergen
Téléphone : +31 (0) 53 5740004 • Télécopie : +31 (0) 53 5729296
Courriel : books@delindeboom.com • Site web : <http://www.delindeboom.com>

Martinus Nijhoff International, Koraalrood 50, P.O. Box 1853, 2700 CZ Zoetermeer
Téléphone : +31 793 684 400 • Télécopie : +31 793 615 698
Courriel : info@nijhoff.nl • Site web : <http://www.nijhoff.nl>

Swets and Zeitlinger b.v., P.O. Box 830, 2160 SZ Lisse
Téléphone : +31 252 435 111 • Télécopie : +31 252 415 888
Courriel : info@swets.nl • Site web : <http://www.swets.nl>

RÉPUBLIQUE TCHÈQUE

Suweco CZ, S.R.O., Klecakova 347, 180 21 Prague 9
Téléphone : +420 26603 5364 • Télécopie : +420 28482 1646
Courriel : nakup@suweco.cz • Site web : <http://www.suweco.cz>

ROYAUME-UNI

The Stationery Office Ltd, International Sales Agency, P.O. Box 29, Norwich, NR3 1 GN
Téléphone (commandes) : +44 870 600 5552 • (demandes de renseignements) : +44 207 873 8372 •
Télécopie : +44 207 873 8203
Courriel (commandes) : book.orders@tso.co.uk • (demandes de renseignements) : book.enquiries@tso.co.uk •
Site web : <http://www.tso.co.uk>

Commandes en ligne

DELTA Int. Book Wholesalers Ltd., 39 Alexandra Road, Addlestone, Surrey, KT15 2PQ
Courriel : info@profbooks.com • Site web : <http://www.profbooks.com>

Ouvrages sur l'environnement

Earthprint Ltd., P.O. Box 119, Stevenage SG1 4TP
Téléphone : +44 1438748111 • Télécopie : +44 1438748844
Courriel : orders@earthprint.com • Site web : <http://www.earthprint.com>

SLOVÉNIE

Cankarjeva Založba d.d., Kopitarjeva 2, 1512 Ljubljana
Téléphone : +386 1 432 31 44 • Télécopie : +386 1 230 14 35
Courriel : import.books@cankarjeva-z.si • Site web : <http://www.cankarjeva-z.si/uvoz>

Les commandes et demandes d'information peuvent aussi être adressées directement à :

Unité de la promotion et de la vente, Agence internationale de l'énergie atomique

Centre international de Vienne, B.P. 100, 1400 Vienne (Autriche)
Téléphone : +43 1 2600 22529 (ou 22530) • Télécopie : +43 1 2600 29302
Courriel : sales.publications@iaea.org • Site web : <http://www.iaea.org/books>

