

347

AM

Colloque International sur les EFFETS BIOLOGIQUES DIFFERES
DES RAYONNEMENTS IONISANTS

Vienne (Autriche)

13-17 Mars 1978

IAEA-SM-- 224/805

ETUDE EXPERIMENTALE DE L'ACTION COMBINEE DE LA FUMEE
DE CIGARETTES ET DU DEPOT ACTIF DU RADON-222.

J. CHAMEAUD⁺ R. PERRAUD⁺ J. CHRETIEN⁺⁺ R. MASSE⁺⁺⁺ J. LAFUMA⁺⁺⁺

⁺ COGEMA - URANIUM NATUREL - SERVICE MEDICAL DU TRAVAIL - Laboratoire de
Pathologie Expérimentale - B.P. n° 1 - 87 640 RAZES

⁺⁺ CLINIQUE DE PNEUMO-PHTISIOLOGIE - HOPITAL LAËNNEC - 42, Rue de Sèvres
75 007 PARIS

⁺⁺⁺ INSTITUT DE PROTECTION ET DE SURETE NUCLEAIRE- DEPARTEMENT DE PROTECTION
SECTION DE PATHOLOGIE ET DE TOXICOLOGIE EXPERIMENTALE -B.P. n° 6
92 260 FONTENAY AUX ROSES

RESUME.

Les études précédentes sur l'action cancérogène des dérivés du Radon-222 ont permis de connaître avec précision les relations qui existent pour chaque dose de Radon, entre celle-ci et les fréquences et les temps de latence des cancers pulmonaires.

- 100 rats ont été soumis un mois et demi à une dose totale de 3.600 W.L.M. Cette valeur a été choisie car elle correspond à l'apparition de 30% de cancers.

- 50 de ces animaux ont ensuite inhalé de la fumée de cigarettes à raison de 50 séances de 10 minutes par semaine, le temps total de ces inhalations a été de 350 heures réparties sur environ six mois.

- Dans le groupe Radon sur 50 rats, on a observé 17 animaux porteurs de cancers pulmonaires.

- Dans le groupe Radon+Tabac (50 rats) on a observé 32 cancers, et de plus les tumeurs dans ce groupe étaient beaucoup plus volumineuses, multifocales et invasives.

- Les animaux soumis à la fumée de cigarettes seule n'ont jamais montré de cancers du poumon.

- L'effet co-facteur du tabac est donc vérifié expérimentalement bien que, chez le rat, la fumée de cigarettes inhalée seule ne soit pas cancérogène.

-:-:-

En exposant des rats à des inhalations de Radon-222 et de ses produits de filiation nous avons, au cours d'expériences précédentes, provoqué chez ces animaux l'apparition de cancers du poumon. Ils apportaient la preuve expérimentale de l'effet cancérogène de ce gaz.(1)(2).

L'essentiel de nos travaux fut par la suite consacré à l'étude de la relation dose-effet. Les nombreuses et diverses expériences réalisées dans ce but nous ont permis d'observer et de contrôler l'évolution d'environ 500 tumeurs pulmonaires malignes. Elles nous ont également appris à bien maîtriser cette technique de cancérisation. celle-ci permet notamment, de prévoir avec certitude la fréquence et le temps de latence moyen des cancers qui apparaîtront dans une population de rats pour une exposition donnée (3).

Les résultats obtenus ont montré, d'autre part, que ce modèle échappe à certaines des critiques habituellement formulées à l'encontre de l'expérimentation animale. Les cancers du poumon induits de cette façon apparaissent en effet chez des animaux qui n'en font pratiquement jamais spontanément, ils sont histologiquement comparables aux cancers humains, et leur fréquence d'apparition en fonction de l'exposition se superpose à celle qui ressort des enquêtes épidémiologiques sur les cancers du poumon des mineurs d'uranium (4). Ce dernier point mérite d'être souligné, car il est exceptionnel de pouvoir, à partir de données précises concernant la relation dose-effet, comparer une expérimentation animale à une enquête épidémiologique humaine.

La simplicité et la sûreté de la méthode, la validité du modèle nous ont conduits à envisager différentes sortes d'études et en particulier celle de l'effet co-carcinogène des polluants inhalés. Nous savons, en effet, que pour induire un cancer du poumon chez le rat il faut lui faire subir avec le radon et ses produits de filiation en inhalation, une agression cumulée, par gramme de poumon, égale à celle qui est susceptible de provoquer un cancer chez l'homme, et cela pendant la même fraction de vie (5). Une telle agression est bien tolérée car le radon est un gaz rare dépourvu de toxicité chimique. Cette toxicité interdit par contre un protocole expérimental analogue pour d'autres polluants. Il faudrait, en effet, les administrer dans des conditions entraînant une intoxication aigüe et la mort de l'animal interviendrait bien avant que le cancer n'apparaisse. Il semble donc a priori très difficile, sinon impossible, de démontrer expérimentalement l'effet cancérogène d'un polluant chimique. En le faisant, par contre, inhaler à concentration sub-toxique à des animaux exposés aussi à une dose déterminée de radon avec son dépôt actif on pourra au moins apprécier

son action co-carcinogène. Celle-ci, d'ailleurs, est peut-être essentielle. Il suffira pour cela de comparer quantitativement et qualitativement les cancers ainsi obtenus à ceux qui sont attendus chez des rats inhalant uniquement la même dose de radon avec son dépôt actif.

Nous avons choisi la fumée de cigarettes dans cette première expérience parce que si sa relation avec le cancer est indiscutablement démontrée par l'épidémiologie elle n'a pas encore été clairement confirmée par l'expérimentation animale (6). Enfin parce que dans le cadre de la prévention (7) des mineurs d'uranium il est important de préciser le rôle de ce cofacteur.

MATERIEL ET METHODE.

Les inhalations de radon et de ses descendants ont eu lieu dans une installation permettant d'exposer un grand nombre d'animaux. Les chambres d'inhalation et le mécanisme de l'appareil ont précédemment été décrits (8).

Deux lots de 50 rats SPRAGUE DAWLEY SPF, répartis en cage de dix ont inhalé dès l'âge de trois mois du radon à l'équilibre avec ses descendants à la concentration de 3000 WL durant 34 séances de 6 heures à raison de 4 séances nocturnes par semaine. L'exposition cumulée a été de 3900 WLM, le pourcentage de cancers du poumon pour une telle dose était environ de 30%.

Pour l'inhalation de la fumée de cigarette, un système simple a été choisi, la boîte à fumée. D'un volume de 500 litres, elle a permis d'exposer ensemble les 50 rats constituant un des lots inhalant du radon. La production de fumée de cigarettes y est assurée par la combustion simultanée de 9 "gauloises bleues". Les cigarettes sont disposées sur un fume-cigarettes communiquant avec la boîte. La combustion est entretenue dès que les cigarettes sont allumées, et l'aspiration de la fumée assurée par une légère dépression créée dans la boîte au moyen d'une pompe à vide. A la fin de chaque séance une ventilation renouvelle l'atmosphère de l'enceinte en air frais.

La concentration de fumée (9 cigarettes pour 500 litres) a été choisie de telle sorte que les animaux puissent, sans que leur comportement et leur état général s'en ressentent, être soumis à 10 séances d'inhalation de 15 minutes dans une journée, c'est à dire au maximum de fumée pendant le maximum de temps. Nous avons pour atteindre ce but procédé par tâtonnement en exposant préalablement quelques rats à des concentrations diverses. C'est ainsi que cinq d'entre eux avaient bien toléré un total de 500 heures d'inhalation, dans les mêmes conditions. Il est important de noter à ce sujet qu'il n'avait été constaté, à la suite de cette exposition, au niveau de leurs poumons que des modifications des structures bronchioloalvéolaires à type de métaplasie sans aucune lésion maligne (9).

Les rats ont, ici, été soumis pendant 1 an à 6 à 10 séances d'inhalation de 10 à 15 minutes par jour, 4 fois par semaine durant 176 journées, ce qui fait un total de 352 heures. Pendant les deux premiers mois les rats inhalent la fumée le jour et le radon la nuit.

Cinq rats, 2 fumeurs et 3 non fumeurs ne purent être utilisés. Tous les autres, qu'ils soient morts naturellement ou sacrifiés à cause d'un amaigrissement rapide et d'un mauvais état général furent autopsiés et examinés dans de bonnes conditions et selon le même protocole:

- Tous les organes sont systématiquement examinés et conservés lorsqu'ils présentent la moindre anomalie. Les poumons prélevés après perfusion en place du système circulatoire pulmonaire avec du sérum physiologique afin d'en chasser le sang, sont dans un premier temps examinés très soigneusement. L'examen macroscopique s'est avéré très important car il donne une idée de la taille de la tumeur, de sa localisation, mais de plus, une palpation fine du poumon, associée à une vitro-pression sur négatoscope permet de déceler les tumeurs les plus petites. L'examen histologique, pratiqué par la suite, le confirme.

Après fixation, les poumons sont coupés de haut en bas transversalement dans un plan frontal en deux parties égales, chacune de ces deux parties est incluse à la paraffine et ensuite systématiquement coupée dans le même sens en coupes de 20 ou de 5 microns. Cette méthode permet le dépistage de la moindre anomalie, même avant coloration. Les coupes de 5 microns retenues sont étalées et colorées à l'hémalum, phloxine, vert alcian, safran.

Afin de pouvoir faire des comparaisons simples et précises, les lésions observées ont été rangées selon une classification dérivée de la classification T.N.M. (10)

- To Absence de tumeur
- T1 Présence d'une tumeur de diamètre inférieur à 2 mm.
- T2 Présence d'une tumeur de diamètre compris entre 2 et 5 mm.
- T3 Présence d'une tumeur de diamètre compris entre 5 et 10 mm.
- T4 Présence d'une tumeur de diamètre supérieur à 10 mm.
- Po Pas d'extension à la plèvre. - P1 Extension à la plèvre
- No Pas d'atteinte ganglionnaire.
- N1 Extension ganglionnaire.
- Mo Pas de métastase.
- M1 Métastase en dehors de la cavité thoracique.
- M2 Métastases intrapulmonaires ou présence de plusieurs tumeurs au niveau des poumons.
- M3 Association de M1 et de M2.

On a ainsi obtenu pour chaque pièce histologique une formule (Ex.: T4 P1 N1 Mo) permettant un classement et des comparaisons statistiques simples.

TABLEAU 1

	Cancers	T1	T2	T3	T4	P1	N1	M1	M2	M3
Radon	17	2	4	5	6	10	1	0	4	0
Radon + Fumée	34	2	4	6	22	20	7	0	16	1

RESULTATS.

Nous savions que les inhalations de radon et de ses produits de filiation étaient toujours très bien tolérées; l'inhalation de la fumée de cigarettes surajoutée n'a pas modifié, dans nos conditions expérimentales, le comportement des animaux dont l'état général est resté excellent pendant la durée de l'expérimentation. La durée de vie moyenne des fumeurs a même été plus longue que celle des non fumeurs.

L'examen des poumons a révélé par contre des différences très significatives entre les deux groupes. Tous les poumons des fumeurs ont montré de très nombreuses lésions d'importance variable souvent au contact des dépôts de goudron allant de la lésion cellulaire isolée à l'adénomatose. Ces lésions bénignes étaient beaucoup plus rares chez les non fumeurs.

Alors que 17 tumeurs pulmonaires malignes apparaissaient chez les animaux analysés ayant uniquement inhalé du radon et ses descendants, soit environ le pourcentage que nous attendions pour un tel niveau d'exposition - 36% - 34 rats fumeurs, soit 71% des animaux analysés étaient atteints de cancers du poumon, plus importants et plus invasifs. On compte ainsi 62% de T4 chez les fumeurs et 41% chez les autres, respectivement 21% et 6% de métastases ganglionnaires (N1); enfin une métastase à distance chez les fumeurs (M3), aucune chez les non fumeurs. De plus, la multiplicité des lésions malignes paraissant du même âge dans un même poumon, est plus fréquente chez les fumeurs (35% de M2) que chez les rats inhalant du radon (9% de M2).

La fumée de tabac ne paraît pas avoir d'influence sensible sur le temps de latence ni sur le type histologique qui a été comparable dans les deux groupes - environ 75% d'épidermoïdes, 20% d'adénocarcinomes, quelques bronchiolo-alvéolaires et indifférenciés.

DISCUSSION.

Malgré l'intensité de l'agression, l'expérience a été menée à son terme dans de bonnes conditions. L'état général des animaux est resté bon et comparable dans les deux groupes. L'inhalation de fumée n'a pas favorisé les infections pulmonaires ni augmenté la mortalité, ce qui tendrait à prouver que les inhalations de radon ne fragilisent pas les animaux. C'est un point très important car cette évolution favorable est indispensable à l'interprétation correcte des résultats.

L'effet cocarcinogène de la fumée de cigarettes a été très clairement démontré, sur le plan quantitatif puisqu'il double le nombre de rats cancéreux et multiplie les lésions malignes dans les poumons, de même sur le plan qualitatif les cancers obtenus étant plus invasifs.

Dans cette expérience où seul le poumon a été significativement irradié, nous n'avons pas constaté chez les fumeurs de fréquence anormale de cancer des autres organes, contrairement à ce qu'on avait observé dans une expérience où la fumée de cigarettes était associée à une inhalation de nitrate d'américium (11).

Il est assez difficile de savoir à combien de cigarettes consommées par un homme correspond l'inhalation de fumée à laquelle les rats ont été soumis. La seule donnée que l'on possède est le taux de l'oxycarbonémie sanguine des animaux - 0,60% -.

Dans nos conditions expérimentales il est évident qu'il n'y a pas d'addition des risques entre le radon et la fumée de cigarettes car chez un même nombre d'animaux qui n'ont inhalé que de la fumée de cigarettes nous n'avons jamais observé la moindre lésion maligne.

CONCLUSION.

Les constatations précédentes nous paraissent intéressantes à un double point de vue.

Elles mettent en évidence l'action co-carcinogène de la fumée de cigarette.

Elles vont dans le sens des données épidémiologiques. Celles qui concernent les mineurs d'uranium où les facteurs carcinogènes sont les mêmes. Les autres, où, même si le radon n'intervient pas, l'effet du tabac sur l'extériorisation du cancer peut n'être que celui d'un cofacteur, puisqu'il est toujours associé à un ou plusieurs polluants.

Elles apportent une nouvelle preuve de la validité de ce modèle animal qui devrait permettre d'aborder des sujets tels que, par exemple, la nocivité comparée des différents composants de la fumée de tabac, les relations dose-effet, l'efficacité biologique des filtres, mais aussi l'étude des effets cocarcinogènes d'autres polluants chimiques ou physiques.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) CHAMEAUD J., PERRAUD R., LAFUMA J., MASSE R. - Cancers du poumon expérimentaux provoqués chez le rat par des inhalations de radon.- C.R.Acad. Sci. PARIS Sér. D.273 (1971) 2388.
- (2) PERRAUD R., CHAMEAUD J., LAFUMA J., MASSE R., CHRETIEN J. - Cancers broncho-pulmonaires expérimentaux du rat par inhalation de radon. Comparaison avec les aspects histologiques des cancers humains. Journal Français de Médecine et Chirurgie Thoraciques - Tome XXVI, n° 1, 1972, p. 25 à 41 - Editions DOIN.
- (3) CHAMEAUD J., PERRAUD R., LAFUMA J., MASSE R., PRADEL J.- Lesions and lung cancers induced in rats by inhaled radon-222 at various equilibriums with radon daughters. Experimental lung cancer, carcinogenesis and Bioassays. (KARBE E., PARK J. Eds) Springer-Verlag, BERLIN (1974) 411.
- (4) CHAMEAUD J., PERRAUD R., MASSE R., NENOT J.C., LAFUMA J. - Cancers du poumon provoqués chez le rat par le radon et ses descendants à diverses concentrations - Biological and environmental effects of Low-level radiation - Vol. II - I.A.E.A., VIENNA, 1976 (223-228).
- (5) LAFUMA J., MASSE R. METIVIER H., NOLIBE D., FRITSCH P., NENOT J.C., MORIN M., SKUPINSKI W., CHAMEAUD J., PERRAUD R., CHRETIEN J. - Etude expérimentale des polluants radioactifs inhalés - Données actuelles Inventaire lésionnel - Validité du modèle animal - Relations dose-effet - Coll. INSERM 18-19 Janvier 1974 - Vol. 29 -pp.307 - 324.
- (6) CHRETIEN J., HIRSCH A., THIEBLEMENT M. - Pathologie respiratoire du tabac - L'expérimentation animale dans le monde, Objectifs et méthodologie.- MASSON et Cie, Editeurs.
- (7) ARCHER V.E., WAGONER J.K., LUNDIN F.E. - Jr.(1973) - Uranium mining and cigarette smoking effects of man - Journal of Occupational medicine, 15, N° 3
- (8) BLONDEAU E., DUPORT P., FRANCOIS Y., MADELEINE G. - Ensemble d'étude expérimentale du cancer pulmonaire chez le rat par irradiation - C.E.A. (FRANCE) Rappt. STEPPA B.P. n° 1 - 87640 RAZES (1973).
- (9) CHRETIEN J., CHAMEAUD J., NOLIBE D., FRITSCH P., PERRAUD R. et LAFUMA J. - Etude du comportement du macrophage alvéolaire chez le rat soumis à une inhalation tabagique prolongée. - Rev. Franç. Mal. Resp. 2 suppl. 1 - 148-152 - 1974
- (10) RELAUT P., MERLIER M. - La codification T.N.M. appliquée aux cancers broncho-pulmonaires opérés.- Revue Française des Maladies Respiratoires - Tome 3 - N°1 - Janvier 1975

- (11) MORIN M., MASSE R., NENOT J.C., METIVIER H., NOLIBE D., PONCY J.L.
LAFUMA J.
Etude expérimentale des différents effets observés après inhalation
de radioéléments émetteurs alpha.
IV° Congrès international de l'I.R.P.A. - Vol. 4 - p. 1321-1327
(1977) - Paris -