

ACTION PARADOXALE D'UN RADIOPROTECTEUR SUR LA MITOSE ET LES CHROMOSOMES, *IN VITRO*

M. DELREZ* et H. FIRKET

Université de Liège, Laboratoire d'Anatomie Pathologique,
1, rue des Bonnes Villes, Liège, Belgium

(Received 21 March 1968; accepted 25 April 1968)

Abstract—The effect of increasing doses (0.27 to 35.2 mM) of β -mercaptoethylamine (cysteamine) on the mitotic index and the chromosomes has been studied in cultures of Chinese Hamster fibroblasts. Seven separate experiments have given consistent results. At 1.1 mM concentration, cysteamine induces chromatid breaks 2 hr after the end of a 60 min treatment. With the same dose, the mitotic index is reduced for several hours after the treatment. However, with a doubled dose, mitotic index and mean number of chromatid breaks are the same as in control cultures. At higher doses (8.8–35.2 mM), these modifications reappear but they are less statistically significant. The results are discussed in relation to the hypothesis of a reversible formation of mixed disulfides with proteins.

DE NOMBREUSES modifications ont été observées sous l'action des radioprotecteurs sulfhydrylés et nous ignorons, parmi ces effets, lesquels sont en rapport direct avec le pouvoir protecteur.

Des études antérieures en culture de tissus ont montré que les substances à groupe thiol, telles que la cystéine, la cystéamine (β -mercaptoéthylamine), le β -mercaptoéthanol et l'A.E.T. (β -aminoéthylisothiourée), ont le pouvoir d'inhiber la survie de clones,¹ de réduire la croissance cellulaire²⁻⁴ et de diminuer les index mitotiques,⁵⁻⁷ tout en inhibant la synthèse de l'ADN.⁷ Ces substances présentent, en outre, sur divers autres matériels cellulaires, des actions imitant celles des radiations.⁸⁻¹⁴

Désirant rechercher la possibilité de diminuer le nombre des cassures chromosomiques induites par l'irradiation de cellules de Mammifères *in vitro*, nous nous sommes intéressés d'abord aux effets des radioprotecteurs sulfhydrylés seuls, lorsqu'ils sont appliqués pendant le temps nécessaire à protéger des cultures. Comme la cystéamine peut perturber les mitoses et induire des cassures chromosomiques,¹² il fallait déterminer la dose maximale ne produisant pas ces effets radiomimétiques dans nos conditions de travail. Nous avons donc testé l'action d'une gamme de doses, pendant un temps court, en étudiant particulièrement les cassures de chromosomes et l'évolution des mitoses dans les heures qui suivent l'application de la cystéamine. Nos résultats ont fait l'objet d'une note préliminaire.¹⁵

MATERIEL ET METHODES

Souche cellulaire: Nous utilisons des fibroblastes de Hamster chinois dont la souche provient d'un clone (A/3H) isolé en 1965 par D. M. Robinson (Harwell). Le nombre diploïde de chromosomes est actuellement de 22 à 23. Le cycle cellulaire

* Chercheur agréé de l'Institut Interuniversitaire des Sciences Nucléaires.

est en moyenne de 14 heures se répartissant ainsi: $G_1 = 5-6$ heures, $S = 6$ heures, $G_2 = 2-3$ heures.¹⁶

Cultures: Les cellules sont cultivées régulièrement à 37°C, dans des flacons carrés et en présence d'air. Elles sont transférées chaque semaine par trypsinisation. Le milieu de culture se compose comme suit:

Milieu T.C. 199	75 %
Milieu N.C.T.C. 109	8 %
M.E.M. vitamines (100 fois concentré)	1 %
L-glutamine (14,6 mg/ml)	1 %
Sérum de veau	15 %

Le milieu contient, en outre, 300 U.I. de Pénicilline G sodique (R.I.T.) et 0,15 mg de sulfate de Streptomycine (R.I.T.) par ml.

Pour les expériences, des boîtes de Petri (diamètre 6 cm) contenant une lamelle couvre-objet sontensemencées par 5 ml de suspension cellulaire à 25.000 cellules/ml. Ces boîtes sont incubées à 37°C pendant 2 jours. Le milieu est en équilibre avec de l'air additionné de 5% de CO₂ et saturé en vapeur d'eau.

Cystéamine: Le chlorhydrate de cystéamine est préparé par réduction électrolytique d'une solution de cystamine (Labaz). Il est conservé au maximum 48 heures, en solution acide, à 4°C. La solution est neutralisée et diluée dans du milieu T.C. 199 au moment de l'emploi. D'une expérience à l'autre, le pH du milieu varie de 7,7 à 7,55. Dans une même série, il est constant, à 0,1 unité de pH près, quelle que soit la concentration de cystéamine. L'incubation pendant une heure ne le modifie pratiquement pas.

Les concentrations étudiées sont de 0,03125 à 4,0 mg/ml, soit 0,27 à 35,2 mM. La cystéamine est laissée au contact des cellules pendant 60 min. à 37°C. Le milieu est alors remplacé par le milieu habituel préchauffé. Mis à part le traitement par cystéamine, les cultures témoins subissent exactement les mêmes manipulations.

Préparations cytologiques: Les lamelles destinées à l'étude des chromosomes sont soumises à l'action d'un milieu hypotonique après aspiration du milieu de culture, on ajoute 1,5 ml de B.S.S. qui est ensuite lentement dilué au 1/5^e par addition d'eau bidistillée. Après 15 min. de contact avec le milieu hypotonique, les cellules sont fixées au mélange de Carnoy. Elles sont séchées à l'air pendant 24 heures, colorées au Giemsa concentré (1/6) pendant 15 min. puis séchées à l'air et montées au baume.

Pour chaque modalité, 50 plaques équatoriales sont sélectionnées à partir de plusieurs lamelles qui ont subi le même traitement. La sélection ne tient compte que des impératifs de lecture. On note, pour chacune de ces mitoses, le nombre de chromosomes, le nombre de cassures chromatidiennes (comptées comme une cassure) et le nombre de cassures chromosomiques (comptées comme 2 cassures).

Les lamelles destinées aux comptes de mitoses sont fixées au Carnoy, colorées à l'hémalum de Carazzi, séchées, puis montées. Les index mitotiques sont comptés sur mille cellules réparties en plusieurs lamelles. Les différentes phases mitotiques sont notées et leurs pourcentages respectifs calculés.

RESULTATS

Chromosomes

Après les 60 min. de contact avec la cystéamine, les cultures sont maintenues 2

heures à l'étuve, puis soumises à l'action du milieu hypotonique. Les cellules en mitose étudiées ont donc subi l'action de la substance en fin de S ou en G₂.

Deux expériences séparées complètes ont été réalisées et ont donné des résultats similaires. Ceux de l'une d'elles sont réunis dans le Tableau 1. Il en ressort que la cystéamine peut produire des cassures chromosomiques dans ces conditions. Le nombre de cassures induites n'est pas proportionnel à la dose reçue. En effet, une dose faible (0,125 mg/ml) augmente de façon significative le nombre de cassures de chromosomes par rapport aux témoins. Quand la dose est doublée (0,250 mg/ml), le nombre de cassures est ramené à celui des préparations témoins. Aux doses supérieures (0,5 et 1,0 mg/ml), ce nombre s'élève à nouveau mais de façon statistiquement moins significative.

TABLEAU 1.

Dose de cystéam. mg/ml	Nombre de chromo- somes étudiés	% de mitoses présentant des cassures	Cassures chroma- tidiennes	Cassures chromo- somiques	Nombre total des cassures	Cassures pour 1000 chromo- somes	Cassures par cellules	Probabilité d'identité avec la population témoin
0	1221	32	13	6	25	20,4	0,50	
0,125	1278	56	38	4	46	35,9	0,92	0,05 > P > 0,025
0,250	1190	32	13	4	21	17,6	0,42	0,7 > P > 0,6
0,500	1178	48	34	5	44	37,3	0,88	0,1 > P > 0,05
1,000	1215	38	21	8	37	30,4	0,74	0,25 > P > 0,20

Cassures des chromosomes sous l'action de différentes doses de cystéamine. Etude de 50 mitoses pour chaque dose.

Le nombre des cassures chromosomiques (cassures des 2 chromatides au même endroit) ne varie pratiquement pas. C'est le nombre des cassures chromatidiennes (cassures simples) qui est modifié. De plus, le pourcentage de cellules lésées, c'est-à-dire présentant au moins une cassure, évolue dans le même sens que le nombre des cassures chromatidiennes. Cependant, le nombre moyen de celles-ci par cellule lésée est également plus élevé pour la dose de 0,125 mg/ml.

Mitoses

Au cours de 3 expériences séparées, les effets de la cystéamine ont également été étudiés sur le pourcentage des mitoses et la répartition des phases mitotiques.

Des doses de cystéamine de 0,03125 à 4,0 mg/ml ont été appliquées durant 60 min. Les cellules furent fixées après une incubation supplémentaire de 2 heures en milieu normal, de façon à étudier les mitoses de cellules soumises à l'action de la substance en fin de S ou en G₂.

Les 3 expériences ont donné des résultats concordants dont un exemple est repris dans la Fig. 1. On y observe une baisse de l'index mitotique à la dose de 0,125 mg/ml, modification statistiquement significative ($P < 0,001$). Aux doses supérieures, le pourcentage de mitoses revient à des valeurs normales. En même temps qu'une réduction de l'index mitotique, la dose critique produit une augmentation relative importante des prophases. La répartition des phases tend à se normaliser aux doses de 0,25 à 1,0 mg/ml. Aux doses plus élevées, cette répartition est à nouveau plus perturbée.

BP—K

Dans une expérience dont les résultats ne sont pas repris ici, nous avons en outre assisté à une augmentation relative des anaphases et des télophases pour les doses supérieures à 0,5 mg/ml.

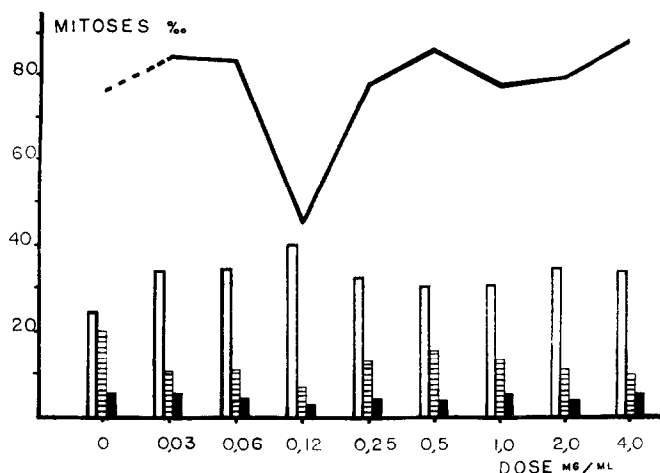


FIG. 1. Evolution de l'index mitotique et de la répartition des phases de la mitose en fonction de la dose de cystéamine. Prophases: colonne claire, métaphases: colonne hachurée, phases terminales: colonne foncée. La hauteur de chaque colonne est proportionnelle au pourcentage de la phase considérée.

Nous avons également suivi l'évolution des index mitotiques au cours du temps. Cette étude a été effectuée pour 2 doses de cystéamine (0,125 et 0,250 mg/ml). Des cultures témoins sont fixées au début de l'expérience. La substance est laissée au contact des cellules pendant 60 min, après lesquelles le milieu est remplacé par le milieu habituel. Des échantillons de cultures ayant reçu chacune des 2 doses sont fixés toutes les heures à partir du moment de l'application de la cystéamine. Les résultats sont donnés dans la Fig. 2. On voit que, dès la fin de l'application de la cystéamine, le pourcentage de mitoses diminue et revient à la normale vers la 4^e-5^e heure. La dose toxique de 0,125 mg/ml déprime plus fort l'index mitotique que la dose double. A la dose critique, on assiste à une diminution des prophases plus précoce que celle des autres phases.

La FIG. 3 compare l'action de doses croissantes de cystéamine sur les cassures de chromosomes et les mitoses dans des cultures réalisées pratiquement en même temps. Elle montre également l'effet toxique beaucoup plus marqué d'une dose de 0,125 mg/ml.

DISCUSSION

Nos résultats montrent deux actions parallèles de la cystéamine en culture de tissus. Aux mêmes doses, elle accroît dans les heures qui suivent son application, le nombre de cassures chromatidiennes et elle déprime le pourcentage de cellules en division.

Un effet analogue sur des chromosomes de végétaux a déjà été décrit brièvement par Horvat et Gilles,¹² tandis que les expériences sur matériel animal, en culture, ne font

guère état que de métaphases anormales.⁶ Cependant, d'autres protecteurs soufrés agissent sur les chromosomes. L'A.E.T., par exemple, peut produire des ponts anaphasiques dans l'intestin de souris⁹ et la cystéine entraîne l'apparition de micronoyaux dans l'épithélium du cristallin, signe de cassures chromosomiques à la mitose précédente.⁸

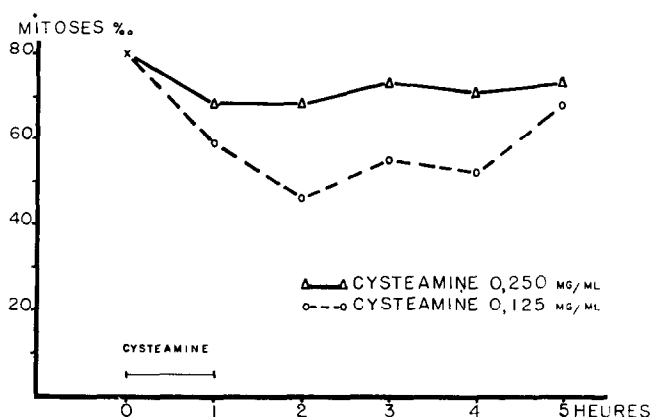


FIG. 2. Evolution de l'index mitotique dans les heures suivant un traitement de 1 heure par 2 doses de cystéamine.

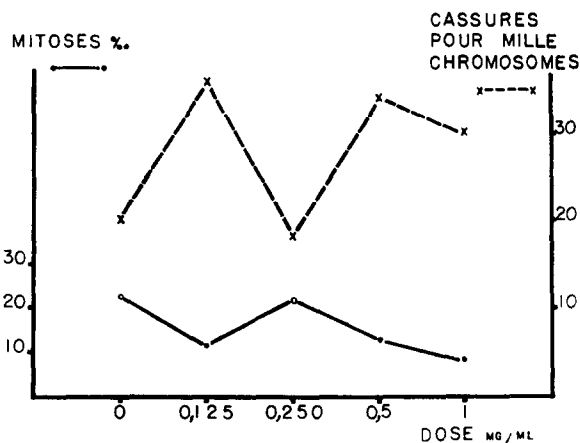


FIG. 3. Effet de la cystéamine sur l'index mitotique et le nombre de cassures des chromosomes en fonction de la dose.

Dans toutes nos expériences, nous avons toujours observé un effet paradoxal de dose. Des doses de 0,0625 à 0,125 mg/ml se sont révélées plus actives que des doses plus élevées (0,25 à 0,50 mg/ml). Un phénomène parallèle a déjà été décrit par Vos *et al.*¹ Ceux-ci ont observé une diminution de la survie de cellules de rein humain après application pendant 20 min. d'une dose de 0,2 à 2 mM (0,0154 à 0,154 mg/ml) tandis que des doses plus élevées n'avaient pas d'action. Les auteurs qui ont étudié l'action de la cystéamine sur la mitose font état d'une diminution des index mitotiques et

d'une réduction de la croissance des cultures de tissus.²⁻⁶ Certains insistent sur les anomalies de la cytodierèse.^{2, 6} Cependant, ces études portaient soit sur des doses plus élevées, soit sur des traitements beaucoup plus prolongés que les nôtres. Aucun auteur n'a travaillé dans des conditions suffisamment proches, en ce qui concerne dose et délai, pour observer un effet paradoxal semblable à celui que nous mettons en évidence.

L'explication la plus simple d'une telle action serait une modification du pH produite par la cystéamine à dose plus élevée, modification qui pourrait réduire sa toxicité. Dans nos cultures, cette explication ne joue certainement pas car la différence de pH du milieu, observée quand on augmente la dose, est trop faible pour jouer un rôle. D'ailleurs, le milieu contient du bicarbonate de soude et est en équilibre avec une phase gazeuse enrichie en CO₂ de sorte que toute variation du pH est automatiquement corrigée.

Pour expliquer la diminution des cassures chromatidiennes aux doses plus élevées, nous suggérons dans une note préliminaire¹⁵ que la cystéamine pourrait ralentir l'entrée en mitose et permettre ainsi aux mécanismes réparateurs de l'ADN d'agir plus longtemps. Les expériences actuelles montrent clairement que, quand la cystéamine agit sur les mitoses, c'est aux mêmes doses que sur les chromosomes. Cette hypothèse n'est donc pas valable.

Vos *et al.*¹ ont émis l'hypothèse que la toxicité observée à faible dose viendrait de la libération de produits d'oxydation toxiques.

Quel que soit le mécanisme en cause, il faut admettre cependant que la cystéamine agit sur deux phénomènes différents avec des seuils d'action successifs. Eldjarn et Pihl¹⁷ ont proposé l'hypothèse qu'elle agit sur les protéines à groupe thiol pour produire des disulfures mixtes. On peut se demander si la formation de ces disulfures mixtes n'est pas responsable de l'action toxique observée, par la mise hors service de certaines substances essentielles au métabolisme. Dans cette perspective, un excès de cystéamine amènerait la rupture des ponts S-S et la régénération des protéines en cause. Un tel phénomène s'observe, par exemple, quand on traite certaines substances sulfhydrylées essentielles telles la phosphoglyceraldéhydedéshydrogénase ou le coenzyme A par la cystéamine.^{18, 19}

La radioprotection obtenue avec la cystéamine serait-elle liée à sa toxicité paradoxale ? Vos *et al.*¹ n'ont pas observé ce phénomène avec la cystamine, le disulfure correspondant, qui, dans leurs conditions, n'est pas protecteur. Par contre, il faut souligner que les doses de cystéamine qui protègent le mieux sont plus élevées que celle où se manifeste l'effet toxique, dans les tests de survie de cultures¹ et dans des expériences personnelles en cours sur les cassures de chromosomes produites par irradiation.

RESUME

L'action de doses croissantes (0,27 à 35,2 mM) de cystéamine a été étudiée sur le taux des mitoses et les chromosomes de fibroblastes de Hamster chinois en culture. Sept expériences indépendantes ont donné des résultats concordants. A la dose de 1,1, mM, la cystéamine induit des cassures chromatidiennes 2 heures après la fin d'un traitement de 60 min. A la même dose, le taux des mitoses est réduit pendant plusieurs heures après le traitement. A une dose deux fois plus élevée, l'index mitotique et le nombre moyen de cassures chromatidiennes sont comparables à ceux des cultures témoins. Aux doses plus élevées (8,8 à 35,2 mM), les modifications réapparaissent

mais de façon statistiquement moins significative. Ces résultats sont discutés notamment en fonction de l'hypothèse de la formation réversible de disulfures mixtes.

Ce texte était envoyé quand nous avons eu connaissance d'un article récent de Vergroessen, Budke et Vos [*Int. J. Radiat. Biol.* **13**, 77, (1967)] qui confirme et étend leurs observations antérieures. Ils considèrent que la toxicité semble causée par une "réaction intracellulaire irréversible d'un produit d'oxydation spécifique du thiol avec un constituant cellulaire."

Remerciements—Nous tenons à remercier le Pr. J. Lecomte pour une discussion utile et le Dr. P. Lelièvre qui nous fournit très aimablement la cystéamine.

REFERENCES

1. O. VOS, L. BUDKE et A. J. VERGROESEN, *Int. J. Radiat. Biol.* **5**, 543 (1962).
2. S. CHEVREMONT et M. CHEVREMONT, *C.r. Séanc. Soc. Biol.* **147**, 164 (1953).
3. A. J. THERKELSEN, *Biochem. Pharmac.* **8**, 269 (1961).
4. R. EKER et A. PIHL, *Radiat. Res.* **21**, 165 (1964).
5. P. OFTEDAL, R. OFTEBRO et R. EKER, *Nature, Lond.* **181**, 344 (1958).
6. A. J. THERKELSEN, *Acta path. microbiol. scand.* **42**, 201 (1958).
7. R. BASLEER et S. CHEVREMONT-COMHAIRE, *Bull. Acad. r. Méd. Belg.* **25**, 709 (1960).
8. A. PIRIE et L. G. LAJTHA, *Nature, Lond.* **184**, 1125 (1959).
9. J. R. MAISIN et J. MOUTSCHEN, *Exp. Cell Res.* **21**, 347 (1960).
10. F. HORVAT, *Agricultura* **9**, 501 (1961).
11. F. HORVAT, *Agricultura* **10**, 169 (1962).
12. F. HORVAT et A. GILLES, *Bull. Acad. r. Belg. Cl. Sci.* **48**, 1315 (1962).
13. R. GOUTIER, L. BAUGNET-MAHIEU et M. SEMAL, *Arch. intern. Physiol. Biochem.* **71**, 130 (1963).
14. H. A. B. SIMONS et E. M. DAVIS, *Int. J. Radiat. Biol.* **10**, 343 (1966).
15. M. DELREZ, *C.r. hebdom. Séanc. Acad. Sci. Paris* **266**, 253 (1968).
16. J. H. TAYLOR, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**, 455 (1960).
17. L. ELDJARN et A. PIHL, *J. biol. Chem.* **223**, 341 (1956).
18. P. LELIEVRE, *C.r. Séanc. Soc. Biol.* **153**, 1879 (1959).
19. P. LELIEVRE, *C.r. Séanc. Soc. Biol.* **154**, 1890 (1960).