Recherches
sur les facteurs de radiosensibilité
de *Paramecium aurelia*
vis-à-vis
des radiations ionisantes naturelles (*)

F. CROUTE, J. P. SOLEILHAVOUP, N. GROS et H. PLANEL (**)

(Manuscrit reçu le 24 février 1976)

RÉSUMÉ

Des recherches antérieures ont démontré que l'activité prolifératrice de *Paramecium aurelia* est liée au niveau de l'irradiation ionisante naturelle; elle est, en effet, ralentie sous radioprotection (enceintes de plomb) et, inversement, exagérée sous l'effet de très faibles débits de dose d'irradiation chronique par ^{60}Co . Les recherches présentées ici montrent que l'on peut isoler des souches cellulaires ne présentant pas de variation de leur croissance en fonction des variations du niveau de l'irradiation naturelle; elles sont dites « radorésistantes ». Celles qui présentent, par contre, la réponse précédemment décrites sont dites « radiosensibles ». Ces caractères de radiosensibilité ou de radorésistance se maintiennent dans le temps jusqu'à 9 mois après l'isolement des souches. Il a par ailleurs été montré que, dans le cas des souches radiosensibles, le phénomène de l'autogamie influence la réponse cellulaire à l'irradiation : celle-ci est, en effet, nulle le jour de l'autogamie et n'atteint sa valeur maximale que 8 jours environ après l'autogamie. Il est enfin prouvé que l'activité catalasique des Paramécies est plus élevée que celle des autres catégories cellulaires étudiées jusqu'ici. Cette grande richesse en catalase, qui paraît varier avec l'âge des cultures après autogamie, pourrait jouer un rôle dans la radiosensibilité des Paramécies vis-à-vis des radiations ionisantes naturelles.

ABSTRACT

Previous results have demonstrated that the proliferative activity of *Paramecium aurelia* is linked to the level of natural ionizing radiations since this activity is decreased under radiation protection (lead cell) and increased under chronic

(*) Communication présentée au Séminaire de Radiobiologie, organisé par la Société Française de Radioprotection, Fontenay-aux-Roses, 29-30 avril 1975.

(**) Laboratoire de Biologie médicale, Faculté de Médecine Purpan, Université Paul-Sabatier, 31000 Toulouse.

exposure to very low doses of ^{60}Co gamma rays. The results of this investigation indicate that cell sensitivity to background radiations can vary: cells without any growth variation in spite of variations in natural irradiation levels can be isolated; they are called "radioresistant" in opposition to "radiosensitive" cells which present the other response. These characters are being retained for 9 months after the strains have been isolated. On the other hand, in the case of radiosensitive strains, it has been demonstrated that autogamy affected the cell response to background irradiation; no response at all occurred on the very day when autogamy took place, but it reached a maximum level 8 days approximatively after autogamy. Moreover, it has been proved that the catalase activity of *Paramecium aurelia* is higher than those already studied in other cell varieties. This great amount of catalase, which seems to vary with the age of cultures after autogamy, could act on *Paramecium* sensitivity to very low radiation doses.

Des recherches antérieures ont permis de mettre en évidence une influence des radiations ionisantes naturelles sur des organismes vivants. Celle-ci se traduit par un effet d'activation sur la multiplication d'organismes unicellulaires ainsi que sur le développement d'organismes métazoaires.

L'effet du rayonnement de base, étudié chez la Paramécie, est plus précisément démontré par les faits suivants :

- des cultures développées soit à l'intérieur de chambres de plomb [1], soit sous 200 m de couverture rocheuse dans le laboratoire souterrain du C.N.R.S. à Moulis [2, 3], présentent une diminution de leur cinétique de prolifération;

- cet effet ne peut être attribué à un effet cytotoxique de l'atmosphère ambiante, ni à une irradiation des cultures par des radioéléments éventuellement présents dans les parois de la protection [4];

- le rétablissement d'un niveau d'irradiation, proche de celui de l'irradiation naturelle, dans les dispositifs de protection, s'accompagne d'un retour à la normale de l'activité prolifératrice cellulaire [5];

- de faibles doses de rayonnement gamma du ^{60}Co , administrées en dehors de tout dispositif de protection, exercent inversement un effet de stimulation [6-8].

Par ailleurs, ces recherches devaient montrer l'existence de variations de la réponse vis-à-vis de la radioprotection. Celles-ci ont été observées, suivant les expériences, à l'échelle individuelle ou à l'échelle des populations. Ces faits d'observation, déjà décrits en radiobiologie pour de fortes doses de radiations, nous ont conduits à rechercher l'existence possible de facteurs génétiques du contrôle de la radiosensibilité vis-à-vis de très faibles doses de rayonnement.

D'autre part, on sait que *Paramecium aurelia* fait fréquemment l'objet d'un phénomène de reproduction particulier, appelé autogamie. Celle-ci se caractérise par d'importants remaniements nucléaires aboutissant à des organismes homozygotes pour tous les gènes. L'autogamie s'accompagne également d'une structure diploïde du macronucléus.

Compte tenu des données classiques concernant le rôle de la polyploïdie dans la radiosensibilité cellulaire, il apparaît ainsi logique de rechercher d'éventuelles modifications du comportement de la Paramécie au cours de l'autogamie.

On sait, enfin, que la radiosensibilité cellulaire dépend de facteurs enzymatiques. Parmi ceux-ci, la catalase semble jouer un rôle important puisqu'elle provoque la décomposition de l'eau oxygénée et des peroxydes organiques qui apparaissent sous l'action des radiations ionisantes. Ce rôle de la catalase doit être plus particulièrement marqué chez des organismes vivant en milieu aqueux comme la Paramécie, où les modifications par radiolyse du milieu ambiant peuvent s'ajouter à celles du milieu intracellulaire.

C'est en se basant sur ces considérations que nous avons étudié l'activité catalasique de la Paramécie et que nous avons cherché à préciser l'existence éventuelle de modifications de l'activité enzymatique au cours de l'autogamie.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES GÉNÉRALES

1) Nous avons utilisé une souche de *Paramecium aurelia* (variété 4, mating type VII, Sonneborn) cultivée dans une infusion de « scotch grass » bactérisée avec *Aerobacter aerogenes*.

Les cultures expérimentales sont choisies en fonction de la date de l'autogamie. Celle-ci est induite en soumettant les Paramécies à un jeûne de 24 h obtenu par non-renouvellement du milieu de culture [4]. L'apparition de l'autogamie est mise en évidence par la fragmentation du macronucléus après coloration par le mélange fast-green carmin acétique.

2) Les expériences de radioprotection ont été réalisées, soit dans une chambre à parois de plomb épaisses de 10 cm, soit dans le laboratoire souterrain du C.N.R.S. de Moulis (Ariège). Dans ce dernier cas, à la couverture rocheuse épaisse de 200 m environ, a été associée une protection supplémentaire de 5 cm de plomb.

L'effet de la radioprotection de ces dispositifs a été mesuré par spectrographie gamma réalisée à l'aide d'un compteur à scintillation. Ces études ont montré que le nombre d'impulsions horaires est diminué d'un facteur 20 pour les énergies comprises entre 0 et 3 MeV dans les deux dispositifs expérimentaux.

3) Pour toutes les expériences, les conditions expérimentales au voisinage des cultures ont été maintenues identiques, en particulier le confinement, l'éclairage et la température réglée à $27^{\circ}\text{C} \pm 0,1$.

4) Les critères d'étude ont été la cinétique de croissance de population et la durée du cycle cellulaire :

— l'étude des cinétiques de croissance a été effectuée par numération cellulaire du 2^e au 5^e jour. Chaque mesure, réalisée au Coulter Counter, a porté sur 20 cultures témoins et 20 cultures radioprotégées;

— l'étude de la durée du cycle cellulaire a été réalisée à partir de cultures en phase exponentielle de croissance. 30 cellules en début de plasmodiérèse sont isolées; dès la fin de la division, les cellules sœurs sont placées individuellement en salières, en présence de milieu bactérisé. Les cultures sont observées à intervalles réguliers afin de déterminer le moment de la 2^e division. Chaque expérience a comporté deux lots de 30 cellules sœurs.

FIG. 1. — Protocole expérimental pour l'obtention de cultures plus ou moins éloignées de l'autogamie.

5) Détermination de l'activité catalasique.

Les déterminations d'activité catalasique ont été effectuées après élimination des bactéries présentes dans le milieu de culture à l'aide de deux centrifugations de 30 min, respectivement à 4 000 et 2 000 g [9].

Le dosage de l'activité catalasique a été effectué sur homogénat selon la méthode de SINHA [10], après lecture de la densité optique par spectrophotométrie. L'activité catalasique a été calculée selon la formule

$$\text{activité catalasique} = \frac{K_0 \cdot 10^3}{N}$$

K_0 étant la constante de vitesse de la réaction au temps 0, et N la concentration en protéine exprimée en milligrammes par centimètre cube.

P. AURELIA 4 VII S

FIG. 2. — Influence de l'autogamie sur la sensibilité cellulaire vis-à-vis de la radioprotection.

Les déterminations d'activité catalasique ont été faites dans une première série d'expériences sur des cultures stock et, dans une deuxième série, sur des cultures présentant des pourcentages variables de cellules autogames.

RÉSULTATS

I. *L'influence de l'autogamie sur la réponse cellulaire à la radioprotection*

Le principe de l'expérience est résumé dans la figure 1. Des clones de *Paramecies* sont entretenus en silières avec renouvellement quotidien du milieu de culture. Dans ces conditions nutritionnelles favorables, la croissance cellulaire est maintenue en phase exponentielle et le phénomène d'autogamie ne peut pas apparaître. Simultanément, l'autogamie est induite à intervalles réguliers sur certaines cultures; les cellules autogames sont ensuite entretenues en tubes à essai, avec renouvellement quotidien de milieu afin d'éviter l'apparition d'une deuxième autogamie.

Comme le montre la figure 2, la radioprotection s'accompagne d'un ralentissement de croissance important et toujours hautement significatif pour les cultures étudiées 30 jours après l'autogamie.

FIG. 3. — Schéma d'isolement et de contrôle des souches « sensibles » et « résistantes ».

Un effet de même ordre, mais moins prononcé, s'observe pour les cultures utilisées 5 jours après l'autogamie.

FIG. 4. — Différences de comportement des souches « sensibles » ou « résistantes » vis-à-vis de la radioprotection.

A, aucune autogamie ne s'est produite entre l'isolement et le test de contrôle; B, plusieurs autogamies se sont produites entre l'isolement et le test de contrôle vis-à-vis de la radioprotection.

Par contre, on n'observe plus de variation significative de croissance sous radioprotection si les cultures utilisées sont autogames au premier jour de l'expérience.

II. Mise en évidence de souches cellulaires de sensibilité différente vis-à-vis de la radioprotection

Des expériences de radioprotection effectuées au laboratoire de Moulis sur trois cycles successifs [11], selon une technique mise au point antérieurement, ont permis d'isoler des cellules ayant présenté, soit des cycles très allongés (cellules radiosensibles), soit des cycles de durée sensiblement normale (cellules radorésistantes) (fig. 3).

Après repiquage, les clones ainsi isolés ont été testés à intervalles réguliers par étude de leur comportement sous radioprotection (chambres de plomb aux parois épaisses de 10 cm). Ce contrôle a été poursuivi, pour certaines cultures, pendant 9 mois.

Comme le montre la figure 4, les souches considérées comme radiosensibles présentent un allongement de la durée de leur cycle cellulaire sous radioprotection.

FIG. 5. — Activité catalasique de *Paramecium aurelia*.

A gauche, activité enzymatique de cultures stocks; à droite, activité enzymatique de cultures de Paramécies (après élimination des Bactéries) comportant des pourcentages variés de cellules autogames.

Inversement, les souches considérées comme radorésistantes ne montrent pas, dans les mêmes conditions expérimentales, de modification significative de la durée du cycle cellulaire.

Ces différences de comportement, présentes dès l'isolement des clones, se sont poursuivies sur une période maximale de 9 mois.

III. Mise en évidence d'une activité catalasique chez *Paramecium aurelia*

1) L'activité catalasique, exprimée en $K \cdot 10^3/N$ et étudiée sur des cultures stocks après sonication des cellules, est de 163 ± 5 pour les cultures mixtes (Paramécies et Bactéries), de 51 ± 6 pour les cultures pures de Bactéries (après élimination des Paramécies) et de 232 ± 4 pour les cultures pures de Paramécies (après élimination des Bactéries) (fig. 5).

2) Les activités catalasiques de cultures stocks après détermination de la richesse en cellules autogames et élimination des bactéries, sont de :

— 388 ± 22 pour des cultures comportant de 0 à 20 p. cent de cellules autogames;

— 242 ± 14 pour des cultures comportant de 20 à 60 p. cent de cellules autogames;

— 175 ± 12 pour des cultures comportant de 60 à 100 p. cent de cellules autogames.

DISCUSSION

Les faits que nous venons de rapporter montrent que l'autogamie est suivie de modifications importantes de la radiosensibilité cellulaire vis-à-vis des radiations ionisantes naturelles.

La radiosensibilité cellulaire disparaît momentanément au cours de l'autogamie; elle retrouve secondairement une valeur considérée comme normale, ainsi qu'en témoignent les effets de la radioprotection dans les jours qui suivent l'autogamie.

Ces variations de radiosensibilité s'ajoutent ainsi aux modifications physiologiques qu'entraîne la conjugaison ou l'autogamie chez les Paramécies [12].

Bien qu'il ne soit pas encore possible de préciser l'origine de ces fluctuations, on peut toutefois penser que les remaniements du micronucléus et du macronucléus peuvent intervenir dans ce phénomène. En effet, les modifications du génome peuvent s'accompagner, chez de nombreuses espèces, de variations de la radiosensibilité [13, 14]. Or, l'autogamie provoque l'apparition d'un état diploïde pour le macronucléus, bientôt suivi d'un retour à une polypléidie élevée. Cependant, le fait que la polypléidie du macronucléus se rétablisse avant le retour à un état stable de la radiosensibilité conduit à penser que d'autres facteurs, comme des variations de la régulation génétique, peuvent être à l'origine des modifications de la radiosensibilité cellulaire.

L'existence de facteurs génétiques du contrôle de la sensibilité cellulaire vis-à-vis de l'irradiation de base apparaît d'ailleurs démontrée par la possibilité d'isoler et d'entretenir, pendant de longues périodes, des souches radiosensibles ou radorésistantes.

D'autre part, les recherches que nous avons rapportées ont permis de mettre en évidence une importante activité catalasique de la Paramécie, confirmant ainsi l'hypothèse de GIESE [15]. L'activité enzymatique des Para-

mécies apparaît particulièrement élevée; elle est largement supérieure à celle des Bactéries utilisées dans nos cultures; elle est également supérieure à celle des levures ou des érythrocytes [10].

Il est possible que cette activité catalasique puisse intervenir sur la réponse des Paramécies vis-à-vis de l'irradiation de base. La diminution simultanée d'activité enzymatique et de radiosensibilité au moment de l'autogamie est un argument en faveur de cette hypothèse.

On pourrait penser, dans ces conditions, et comme première hypothèse de travail, que cette forte activité catalasique permet à la Paramécie de décomposer des peroxydes développés sous l'influence de l'irradiation ionisante naturelle, cette dégradation entraînant elle-même une libération d'oxygène moléculaire et, en conséquence, une activation du métabolisme cellulaire et de l'activité prolifératrice. En fait, d'autres mécanismes doivent être également envisagés et c'est ainsi que des expériences en cours cherchent à étudier des modifications éventuelles de la perméabilité cellulaire sous l'influence de ces très faibles doses de rayonnements ionisants.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PLANEL H., SOLEILHAVOUP J. P., TIXADOR R. Recherches sur l'action des radiations ionisantes naturelles sur la croissance d'êtres unicellulaires. *C. R. Acad. Sc.*, 1965, **260**, 3770-3772.
- [2] PLANEL H., SOLEILHAVOUP J. P., COTTIN F., TIXADOR R., RICHAILLEY G. Recherches sur l'action biologique de l'irradiation naturelle : étude de la croissance de *Paramecium aurelia* et *Paramecium caudatum* en laboratoire souterrain. *C. R. Acad. Sc.*, 1969, **269**, 1697-1700.
- [3] RICHAILLEY G. Action biologique des radiations ionisantes naturelles : étude de la multiplication de la paramécie en laboratoire souterrain. *Thèse Doctorat ès Sciences de Spécialité*, Toulouse, 1972.
- [4] TIXADOR R. Mise en évidence d'un effet biologique de l'irradiation naturelle. *Thèse Doctorat ès Sciences d'État*, Toulouse, 1970.
- [5] PLANEL H., SOLEILHAVOUP J. P., BLANC D., FONTAN J., TIXADOR R. Essai de démonstration expérimentale de l'activité biologique des radiations ionisantes naturelles. *C. R. Acad. Sc.*, 1966, **262**, 2767-2770.
- [6] PLANEL H., BRU A., SOLEILHAVOUP J. P., TIXADOR R. Effets de très faibles doses de radiations ionisantes naturelles sur la multiplication de *Paramecium aurelia*. *C. R. Acad. Sc.*, 1967, **264**, 2945-2948.
- [7] CARATERO C. Contribution à l'étude de l'influence de la radioactivité naturelle et de très faibles doses de radiations gamma sur la multiplication cellulaire. *Thèse Doctorat ès Sciences de Spécialité*, Toulouse, 1968.
- [8] PLANEL H., BLANC D., SOLEILHAVOUP J. P., FONTAN J., TIXADOR R. Mise en évidence d'effets biologiques dus à de très faibles irradiations. *Radioprotection*, 1968, 647-661.
- [9] GROS N., PLANEL H. Activité catalasique chez *Paramecium aurelia*. *C. R. Soc. Biol.*, 1975, **169**, 238.
- [10] SINHA A. K. Colorimetric assay of catalase. *Anal. Biochem.*, U.S.A., 1972, **47**, 389-394.

- [11] CROUTE F., BLANQUET Y., TIXADOR R., SOLEILHAVOUP J. P. Influence d'une radioprotection prolongée sur la durée de cycles cellulaires successifs chez *Paramecium aurelia*. *C. R. Soc. Biol.*, 1972, **166**, 1170-1173.
- [12] SONNEBORN T. M. The relation of autogamy to senescence and rejuvenescence in *Paramecium aurelia*. *J. Protozool.*, 1954, **1**, 38-53.
- [13] LATARJET R., EPHRUSSI B. Courbes de survie de Levures haploïdes et diploïdes aux rayons X. *C. R. Acad. Sc.*, 1969, **269**, 306-310.
- [14] DAVIES D. R., EVANS H. J. The role of genetic damage in radiations induced cell lethality. *Adv. Rad. Biol.*, 1966, **2**, 243-253.
- [15] GIESE A. C. Effects of radiation upon protozoa. *Research in protozoology* (CHEN T. T., Ed.), 1972, **2**, 269.