

# Rayonnements, Cancérisation humaine et Radiorésistance Ionizing radiation, Human Carcinogenesis and Radioresistance

Monique Vuillaume et Eric Quéinnec

URA 686 CNRS, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, Paris, France, Cedex 05.

## RESUME

Les espèces activées de l'oxygène sont mises en cause dans de nombreux phénomènes inflammatoires, dans la transformation cellulaire et la carcinogénèse. Toutes les expériences qui ont étudié : (i) leur influence directe; (ii) ou indirecte *in vivo*, et/ou, sur culture de cellules se sont révélées positives.

*A contrario*, les réactions, ou les produits, qui diminuent le taux de ces espèces activées, soit directement, soit indirectement par une augmentation des activités SOD, catalase, et peroxydase, limitent les anomalies énoncées ci-dessus. C'est le cas du domaine "2" (porteur du cuivre) de l'hémocyanine du scorpion (i) qui possède les trois activités de défense cellulaire, (ii) dont les activités oxyphorique, SOD, catalase et peroxydase résistent à au moins 4000 Gy, et qui de ce fait, participe à la radiorésistance exceptionnelle de cet animal.

## ABSTRACT

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and free radicals are correlated with inflammatory diseases, cellular transformation and carcinogenesis. Experiments studying their direct or indirect influence (*in vivo*, and/or, in cell cultures were still positive.

In the contrary, reactions or products, which decrease level(s) of free radicals/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (i) directly, (ii) indirectly by an increase of SOD, catalase and peroxydase activities zeroed the above described phenomena. It is the case of the domain number 2 (that contains copper) of the Scorpion's blood pigment (hemocyanin), (i) which possesses SOD-, catalase- and peroxydase-like properties, resistant, at least, at 4000Gy, furthermore explaining the especially high radioresistance of scorpions.

## INTRODUCTION

La majeure partie de l'oxygène respiré est consommée durant la phosphorylation oxydative des mitochondries. Cependant 8 à 10% échappent dans un métabolisme normal, à la réduction totale à 4 électrons (H<sub>2</sub>O). Les radicaux libres (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, OH<sup>•</sup>) et les molécules d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ainsi obtenus sont potentiellement très toxiques pour la cellules. D'autres réactions biologiques normales conduisent également à la production, dans le cytosol, les mitochondries et près du DNA, de ces espèces activées .O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, OH<sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont également produites par l'action des radiations ionisantes naturelles ou artificielles qui selon l'énergie distribuée conduisent à une radiolyse totale ou partielle de l'H<sub>2</sub>O. Des systèmes enzymatiques présents dans les cellules/tissus peuvent minimiser leurs dommages (1-5) : ce sont les peroxydases, les catalases et les superoxydes dismutases. Ces

enzymes ne fonctionnent plus lorsque le taux de leurs substrats respectifs excède leur capacité enzymatique. et ne pourront assurer qu'un service réduit en cas de débordement pathologique.

D'où l'intérêt de travailler sur des systèmes cellulaires, et/ou, pathologies humaines bien définies, où la production/ accumulation anarchique d'une ou plusieurs de ces différentes espèces est soupçonnée. Parmi quelques exemples, je citerai certains de nos propres travaux qui ont mis en évidence certaines des relations pouvant intervenir entre différents systèmes défaillants, (DNA repair, activité catalase anormale) et les tentatives de réparation spontanées par le biais d'une augmentation de l'activité d'une autre enzyme (par exemple l'activité glutathion peroxydase). Cette présentation n'est évidemment pas exhaustive et ne choisit que certains exemples portant sur certaines étapes de la cancérogénèse humaine. En contre partie, je citerai brièvement un exemple de radiorésistance naturelle exceptionnelle, l'hémocyanine du scorpion) pour laquelle nous avons mis en évidence, aussi bien dans la protéine purifiée que dans ses sous-unités (monomères et domaines 75 et 50 KDa) des activités de type SOD, catalase et peroxydase, résistant à au moins 4000 Gy .

## RESULTATS

I) AGENTS EXTERNES /CONDITIONS produisant des espèces activées de l'oxygène .L'oxygène hyperbare, les peroxydations lipidiques, les intermédiaires quinoniques, des mimétiques des réactions de type-Fenton, des modifications dans le transport des électrons le long de la chaîne des cytochromes, des réactions redox en présence de métaux, des molécules chimiques utilisées dans les traitements des obésités, la fumée de cigarette, les extraits de cafés, les radiations ionisantes ( UV, X,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  , électrons) sont tous générateurs des espèces activées de l'oxygène.(6)

## II) EFFETS DES RADICAUX LIBRES ET DE L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7-25)

Les premiers effets remarquables l'ont été sur les chromosomes/DNA. Je citerai aussi, les corrélations naturelles qui existent entre la carcinogénèse humaine , les dommages du DNA et les maladies héréditaires radiations-ionisantes dépendantes que sont *Xeroderma pigmentosum*, *Ataxia telangiectasia* , le Syndrome de Bloom, l'anémie de Fanconi, le syndrome de Cockayne .Les effets des espèces activées de l'oxygène et de leur protection par addition de SOD, et/ou catalases,et/ou, peroxydases, ont été étudiés sur des cultures de cellules, sur des organes *in toto* ,( duodénum de rat)(9) etc....Dans tous les cas, un effet inhibiteur de la "transformation " a été constaté lorsque les systèmes enzymatiques cités ci-dessus pouvaient fonctionner normalement; des coupures sur les DNA et jusqu'à la formation de tumeurs cancéreuses dans le cas contraire. Parmi les maladies génétiques non radiations dépendantes, on peut citer la trisomie 21; en effet, Sinet *et al* ont, en 1975,(12) montré que les fibroblastes, lymphocytes et monocytes de ces malades produisent une overdose de CuZnSOD . Cela a été considéré comme une des origines possible de l'accroissement de stress oxydatifs conduisant aux nombreuses anomalies métaboliques qui atteignent ces malades (rappelons que les mongoliens font un taux anormalement élevé de leucémies).

Le fait que l'activité catalase (i) ne s'effondre pas ; (ii) que l'activité glutathion peroxydase augmente dans un bon nombre de composés sanguins, paraît cependant assez peu compatible avec cette théorie.

Les relations entre "production de radicaux libres, de peroxyde d'hydrogène et d'oxygène singulet" ont été également envisagées dans bon nombre de cas.(15). Nous mêmes avons démontré qu'une maladie génétique récessive et autosomale, (16-17) UV-dépendante, *Xeroderma pigmentosum*, est caractérisé par une chute très précoce et progressive de l'activité catalase de la peau : de 20% dès l'âge de 6 mois et sans signe clinique d'apparition de la maladie, à 95% au moment de la formation des premières tumeurs cancéreuses (dès l'âge de 2-3 ans). Ce phénomène s'accompagne, après irradiation UV des extraits acellulaires, d'une augmentation par 2-3 du taux normal de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Un traitement externe avec de la catalase de mammifère gèle l'évolution de la maladie.(18-19).

Forts de ces résultats établis sur des malades et leur famille après un suivi de 6 ans, nous avons voulu savoir si cette chute de l'activité catalase était caractéristique :

(1) de la peau, et/ou, des ses fibroblastes et kératinocytes en culture de XP, d'autres maladies génétiques sensibles aux radiations ionisantes (*Ataxia telangiectasia*, syndrome de Bloom ...); (20-22)

(2) d'autres systèmes de même origine embryonnaire, mais non-radiations dépendants (cancers du col de l'utérus, du vagin et de la vulve) contaminés ou non par Papillomavirus; (23)

(3) de fibroblastes et kératinocytes en culture, transformés par différents virus à DNA; (24)

(4) de cancers d'origines inflammatoires (vessie, maladie de Lapeyronie).

Dans tous les cas nous avons trouvé une diminution très précoce (même dans les cellules en culture d'origine embryonnaire) de cette activité (70-95%) et une augmentation très marquée de la quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formée (2-3 fois la normale) après irradiation UV. Un point remarquable est qu'il n'y a pas de parallélisme entre l'effondrement de l'activité catalase et le degré de possibilité de réparation du DNA. Par contre, il paraît y avoir :

(a) **synergie** entre les % de diminution de ces deux activités, la précocité d'apparition de la maladie et le pronostic de survie, mais, de toutes façon

(b) **cancérisation**, seulement un plus tard dans la vie de l'individu lorsque seule l'activité catalase est diminuée;

### III) ENZYMES DE DEFENSE ET RADIORESISTANCE. (25-26)

Une pigment transporteur d'oxygène, l'hémocyanine de scorpion, est depuis longtemps mis en cause dans la radiorésistance exceptionnelle de cet animal. Nous avons montré que cette protéine multimérique, à Cu<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> de 2.10<sup>6</sup> Da de PM, ainsi que ses sous-unités possèdent : une **activité de type catalase, une activité de type SOD** qu'elles conservent même après irradiation de 4000 Gy.

L'étude moléculaire de l'hémocyanine dans le cadre de la radioprotection a été abordée par le biais des travaux actuels sur les séquences d'hémocyanines d'Arthropodes:

a) la réalisation d'une sonde spécifique au(x) gène(s) hémocyanine a demandé la recherche d'une séquence conservée dans les différentes sous-unités protéiques. La séquence: **His-His-Trp-His-Trp-His** remplit ces caractéristiques et semble, de plus, impliquée dans la structure du site actif. Une séquence de DNA complémentaire au mRNA a donc été synthétisée afin de servir de sonde pour rechercher le messenger de l'hémocyanine.

b) La purification des RNA messagers et leur hybridation avec la sonde oligonucléotidique spécifique, a permis de déterminer la taille du (ou des) messenger (s) de l'hémocyanine Le cDNA correspondant à l'hémocyanine a été cloné. Son expression dans des systèmes eucaryotes devrait permettre :

1) l'étude de la "réparation" éventuelle des systèmes déficitaires cités ci-dessus par un fragment de petit poids moléculaire,

2) ainsi que de l'éventuel transfert de la radiorésistance de l'hémocyanine à différents systèmes cellulaires.

## CONCLUSIONS

Les produits de réduction de l'oxygène obtenus aussi bien au cours du métabolisme normal que lors de réactions pathologiques paraissent entrer très activement en jeu dans la mise en place de la transformation cellulaire, et/ou de la cancérisation. En contre partie, la radiorésistance naturelle du scorpion qui est de plus de 1000 fois supérieure à celle de l'Homme est en majeure partie portée par son pigment sanguin natif (l'hémocyanine, protéine de 2.10<sup>6</sup> KDa) et ses sous-unités (75 et 53 KDa) qui possèdent tous des activités de type catalase, SOD et peroxydase, dépendant du Cu<sup>2+</sup> dans le site actif du domaine 2; Ces activités résistent à au moins 4000 Gy. L'obtention en grandes quantités de ,

## REFERENCES

1. Mc Cord, J.M., and Fridovitch, I., 1969, J.Biol. Chem., 244, 6049-6057
2. Frew, J.E., and Jones, P. 1984, Adv. Inorg. and Bioinorg. Mechanisms, 3, 175-212
3. Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. 1979. Physiol. Rev., 59, 527-605
4. Chaudière, J., Gérard, D., 1988, Dosage de l'activité glutathion peroxydase , dans "biologie des Lipides chez l'Homme"
5. Flohé, L. 1989. The selenium glutathion peroxidase. dans "Glutathion" Dolphin et al edit., 644-731
6. Vuillaume, M., 1987, Mutation Res., 186, 43-72
7. Cerutti, P.A. 1985. Science, 227, 375-381
8. Wong, H.W., Elwell, J.H., Oberley, L.W. 1989, Cell, 58, 923-931
9. Ito, A, Watanabe, H., Naito, M., Kawashima, K. 1984. Gann, 75, 17-21
10. Imlay, J.A. and Linn, S. 1989. Science, 240, 1302-1309
11. Sinet, P.M., Michelson, A.M., Bazin, J., Lejeune, J. 1975. Biochem. Biophys. Res Comm., 67, 910-915
12. Zimmerman, R. and Cerutti, P. 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 2085-2087
13. Liotti, F.S., Bodo, A.R., Menghini, M. Bruschi, G. 1987. Intern. J Cancer, 40, 354-357

14. Fuchs, J., Huflejt, M.E., and Packer, L. 1989. Photochem. Photobiol., 50, 739-744
15. Kawanashi, S., Inoue, S., Yamamoto, K. 1989. Humana Press, 21, 367-372
16. Dodet, B. 1991, Biofutur, mai 1991, 23-34
17. Cleaver, J.E., and Bootsma, D. 1975. Ann. Rev. Genet., 9, 19-38.
18. Vuillaume, M., Decroix, Y., Calvayrac, R., Vallot R. and Best-Belpomme, M. 1983. C. R. Acad. Sci. Paris, 296, 845-850.
19. Vuillaume, M., Calvayrac, R., Decroix, Y., Goyffon, M., and Best-Belpomme, M. 1983. Nuclear General Review, 6, 465-472.
20. Vuillaume, M., Calvayrac, R., Best-Belpomme, M., Tarroux, P., Hubert, M., Decroix Y., and Sarasin, A. 1986. Cancer Res., 46, 538-544.
21. Vuillaume, M., Lafont, R., Jouve, H., Hubert, M., Calvayrac R., and Best-Belpomme, M. 1989. Bioelectrochem. Bioenergetics., 19, 541-556.
22. Vuillaume, M., Best-Belpomme, M., Lafont, R., Hubert, M., Decroix Y., and Sarasin, A. 1989. Carcinogenesis, 10, 1375-1381.
23. Vuillaume, M., Decroix, Y., Calvayrac, R., Truc, J.B., Paniel, B.J., Vincens, P., Tarroux P., and Poitout, P., 1991. International J. Gynecol. Pathol., sous presse.
24. Rabilloud, T., Asselineau, D., Miquel, C., Calvayrac, R., Darmon M., and Vuillaume M. 1990. Intern. J. Cancer, 45, 952-956.
25. Huyart, N., Calvayrac, R., Goyffon, M., and Vuillaume, M. 1983. Comp. Biochem. Physiol., 76B, 153-159.
26. Vuillaume, M., Ducancel, F., Rabilloud, T., and Goyffon, M. 1988. Comp. Biochem. Physiol., 92B, 17-23.
27. Quéinnec, E., Gardés-Albert, M., Goyffon, M., Ferradini, C. and Vuillaume, M. 1990, Biochim. Biophys. Acta, 1041, 153-159
28. Quéinnec, E., Gardés-Albert, M., Ducancel, F., Goyffon, M., Ferradini, C. and Vuillaume, M. 1991. J. Biophys. JECR 1990.
29. Quéinnec, E. 1991. Activités anti-oxydantes de l'hémocyanine du scorpion *Androctonus australis*. Thèse de Doctorat d'Université, Paris VI, 12 avril 1991.

#### REMERCIEMENTS.

Le travail sur le rôle de l'hémocyanine dans la radiorésistance du Scorpion a été subventionné par EDF-Radioprotection, France, et La Société Française de Radioprotection