

Place de la prolyl hydroxylase dans la synthèse du collagène de cellules KB¹

Behaviour of the prolyl hydroxylase to collagen synthesis in KB cells

J. Farjanel, P. Vallier, M. C. Ronzière et J. Frey

Laboratoire de Biochimie, U.E.R. de Médecine, 30, rue F. Gambon, F-42100 Saint-Etienne (France), et Laboratoire de Biochimie, U.E.R. de Médecine Alexis Carrel, F-69 Lyon (France), 2 octobre 1978

Summary. KB cells, which synthesized collagen at a low rate, shown a prolyl hydroxylase activity at the same rate that fibroblast. The relationship between collagen synthesis and prolyl hydroxylase activity in these cells was discussed.

Les travaux de Green et coll.² ont permis de classer les cellules en fonction du rapport entre la synthèse du collagène (ΔC) et celle des protéines (ΔP). Ce rapport est fondé sur les seules valeurs de l'hydroxyproline (Hyp) et de la proline (Pro) et s'avère, pour les cellules épidermoïdes KB d'origine tumorale, de 10 à 100 fois inférieur à celui des fibroblastes^{2,3}.

L'objet de ce travail a été de préciser, pour les cellules KB, la nature des protéines contenant l'Hyp, de mesurer l'activité prolyl hydroxylase (E.C. 1,14,11,2) cellulaire et de comparer cette activité à la concentration du contenu cellulaire en hydroxyproline macromoléculaire mesurée par le rapport Hyp/Pro.

Matériel et méthodes. Les fibroblastes de peau humaine adulte sont cultivés avec 15 ml de milieu de base de Eagle (BME Flow) en tampon bicarbonaté additionné de 10% de sérum de veau, dans des boîtes Falcon T75. Les cellules KB sont cultivées avec 20 ml de milieu à hydrolysate de caséine (Pasteur) en tampon bicarbonaté additionné de 10% de sérum de veau, dans des boîtes Falcon T75. Dans les 2 cas, les milieux de culture sont changés tous les 2 jours.

L'activité prolyl hydroxylase est mesurée en quantité limitante in vitro avec un substrat procollagénique naturel enrichi en proline ³H pour lequel on mesure la formation enzymatique d'eau ³H⁴. Les cellules sont recueillies dans le tampon tris, maleate, NaCl (25 mM, 50 mM, 50 mM), pH

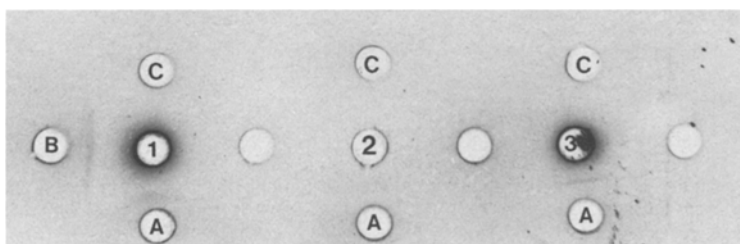


Fig. 1. Immunoprécipitation par double immunodiffusion en gel d'agarose (1,5%, pH 7,05) d'un homogénat de cellules KB à confluence depuis 3 jours. Le surnageant à 2000 g de l'homogénat de $30 \cdot 10^6$ cellules est concentré dans un volume de 1 ml par dialyse contre aquacide. Les anticorps anti C₁q proviennent de l'Institut Behring. Les anticorps anticollagène ont été préparés par immunisation de lapins avec du collagène de type I purifié à partir de peau de veau: A: immun sérum anticollagène type I; B: id dilué $\frac{1}{2}$; C: anti C₁q; 1: extrait de cellules KB; 2: milieu de culture sans sérum en contact avec les cellules pendant 48 h; 3: extrait de cellules KB cultivées en milieu sans sérum depuis 48 h.

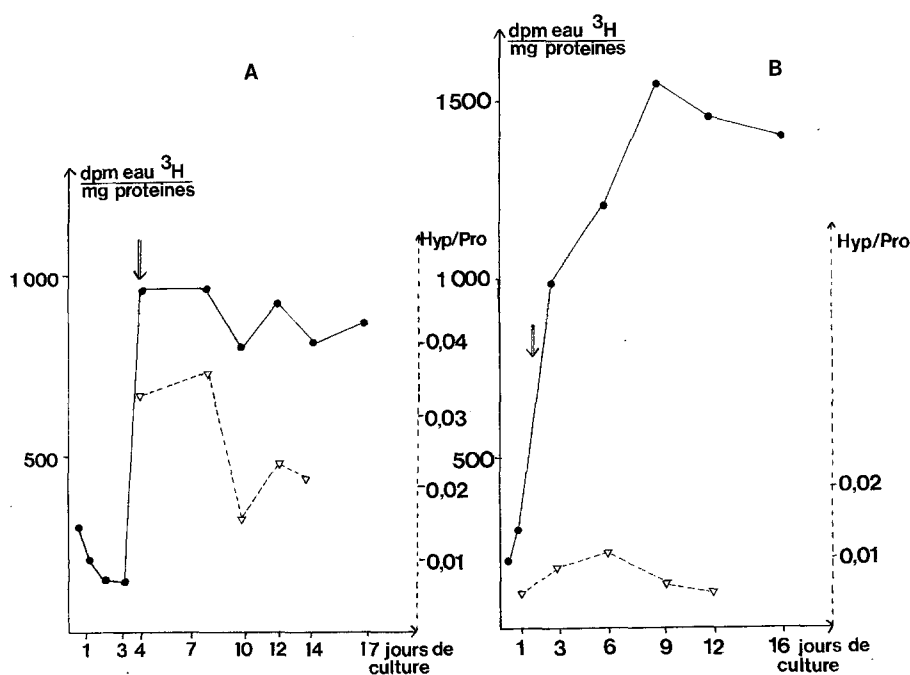


Fig. 2. Activité prolyl hydroxylase et rapport Hyp/Pro cellulaires en fonction du temps de subculture pour les cellules KB et les fibroblastes. Chaque point correspond à un échantillon obtenu à partir de 2 boîtes de culture dont les écarts d'activité spécifique ont toujours été inférieurs à 10%. A: fibroblastes de peau adulte au 17^e passage; B: cellules KB; ●—●: dpm eau ³H/mg de protéines; △—△: Hyp/pro cellulaire; ↓: confluence cellulaire.

7,1, après lavages répétés avec NaCl 9‰. Elles sont broyées au Potter de Thomas pendant 2 min en présence de Triton X100 1‰, ce qui permet de recueillir la totalité de l'activité enzymatique dans le surnageant à 2000 g.

La proline et l'hydroxyproline cellulaires sont séparées et mesurées d'après la méthode chromatographique précédemment décrite⁵. Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry.

Résultats et discussion. La figure 1 montre que les cellules KB contiennent des protéines ayant le même caractère antigénique que le collagène de type I et non la fraction C q du complément à laquelle il aurait été possible d'attribuer partie ou totalité de l'hydroxyproline présente dans ces cellules.

La figure 2 indique que les cellules KB possèdent une activité spécifique prolyl hydroxylase similaire à celle des fibroblastes quand ces activités sont mesurées avec des lots semblables de substrat procollagénique. En revanche, le rapport Hyp/Pro, qui mesure la concentration du matériel intracellulaire contenant l'hydroxyproline, est bien en accord avec le rapport AC/AP qui distingue ces 2 types de cellules et manifeste la prépondérance de la synthèse du collagène dans les fibroblastes³.

Cette activité prolyl hydroxylase relativement élevée chez les cellules KB, dont la concentration en matériel collagénique est faible, est à rapprocher des résultats de Golberg et Green⁶ ainsi que de Langness et Udenfriend⁷. Alors que l'enzyme intracellulaire est abondante, son substrat pour-

rait être soit synthétisé en faible quantité, soit inaccessible du fait de la compartimentation cellulaire, ou bien les conditions de milieu à l'intérieur des cellules d'origine tumorale pourraient être défavorables à la réaction enzymatique.

Le tableau complète ce caractère de disparité entre activité de la prolyl hydroxylase et synthèse du collagène dans les cellules KB en montrant qu'aux différents temps d'une subculture notés sur la figure 2, la concentration du matériel collagénique intracellulaire est corrélée avec l'activité prolyl hydroxylase chez les fibroblastes mais pas chez les cellules KB. 4 paramètres pourraient rendre compte de cette différence: la perméabilité de la membrane cellulaire à la proline extracellulaire, l'activité prolyl hydroxylase, la concentration du procollagène, la vitesse de sécrétion du matériel collagénique hydroxylé.

Conclusion. Les cellules épidermoïdes KB synthétisent du collagène bien qu'en faible quantité. L'activité de la prolyl hydroxylase, enzyme marqueur essentiel au collagène, ne semble pas ici le facteur limitant dans la synthèse du collagène. L'observation du comportement particulier de ces cellules met l'accent sur la complexité des mécanismes régulateurs de la synthèse du collagène dont l'expression quantitative est une des caractéristiques cellulaires.

Calcul d'une corrélation linéaire entre la prolyl hydroxylase et le rapport Hyp/Pro

| Cellules | r | t calculé | t 0,05 |
|--------------------------------------|--------|-----------|--------|
| Fibroblastes de peau humaine (17° P) | 0,8618 | 3,399 | 2,776 |
| Cellules KB | 0,1861 | 0,328 | 3,182 |

La corrélation est établie pour différents temps d'une même subculture.

- 1 Ce travail a bénéficié d'une aide du CNRS (AI n° 031218 et RCP n° 08533) et de l'U.E.R. de Biologie Humaine de l'Université de Lyon.
- 2 H. Green, B. Golberg et G.J. Todaro, *Nature* 212, 631 (1966).
- 3 M. Prunieras, J. Frey, L. Gazzolo et C. Delescluse, *Bull. Soc. fr. Derm. Syph.* 76, 20 (1969).
- 4 J. Farjanel, A. Chamson et J. Frey, *Biochim. biophys. Res. Commun.* 78, 202 (1977).
- 5 J. Farjanel, L. Pichat, M. Audinot, C. Perier et J. Frey, *Biochimie* 58, 269 (1976).
- 6 B. Golberg et H. Green, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 59, 1110 (1968).
- 7 U. Langness et S. Udenfriend, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 71, 50 (1974).

Release of nonspecific esterases from the roots of *Vicia faba* L.

P. Frossard and G. Voss

Botanisches Institut der Universität, Schönbeinstrasse 6, CH-4056 Basel (Switzerland), 10 August 1978

Summary. Roots of *Vicia faba* L. immersed in a buffer solution were found to release esterases into the environment. The substrate α -naphthylacetate was taken up by the roots and degraded, the hydrolysis products being released back into the surrounding medium.

In a previous study, the activity of non-specific esterases in various parts of young, developing seedlings of *Vicia faba* was investigated¹. Since a pronounced maximum of enzyme activity was found in root tips, the question arose whether the unknown natural substrates are localized within the plant itself, or, at least in part, in its soil environment. The present study was conducted to investigate some of these aspects.

Materials and methods. Seedlings of *Vicia faba* L. were grown as previously described¹. Only 8-day-old plants were used for the experiments, since the activity of esterases in root tips was highest at this age.

Release of esterases: The roots of 3 intact plants were immersed to a depth of 1 cm in small test tubes containing 4 ml of Sörensen phosphate buffer (pH 7.2). After various time intervals, the plants were removed, and 0.1 ml of

an ethanolic solution of α -naphthylacetate was added to the buffer (final concentration of α -naphthylacetate: 2.5×10^{-4} M). The mixture was then incubated at 32°C for 10 min, and finally mixed with 0.5 ml of reagent solution (40–50 mg Diazoblue B in 5 ml of distilled water and 10 ml

Influence of substrate on esterase release from the roots

| Substrate concentration | Absorbance | Replicates |
|-------------------------|------------|------------|
| 0 | 0.0233 | 6 |
| 10 ⁻⁵ M | 0.0316 | 3 |
| 2 · 10 ⁻⁵ M | 0.025 | 3 |
| 10 ⁻⁴ M | 0.0566 | 3 |
| 2 · 10 ⁻⁴ M | 0.1266 | 3 |
| 10 ⁻³ M | 0.436 | 3 |