

# UTILISATION DU TAUX DES POLYAMINES DANS L'ETUDE DE L'ACTIVITE ANTITUMORALE DE SUBSTANCES NATURELLES; EMPLOI DE LA REGENERATION HEPATIQUE COMME MODELE D'ETUDE

V. QUEMENER, J.-PH. MOULINOUX

*Laboratoire d'Histologie-Embryologie de l'Université de RENNES  
Faculté de Médecine, Av. Léon-Bernard, 35043 RENNES-Cédex (FRANCE)*

et L. GIRRE\*

*Laboratoire de Pharmacognosie-Mycologie de l'Université de RENNES  
Faculté de Pharmacie, Av. Léon-Bernard, 35043 RENNES-Cédex (FRANCE)*

**ABSTRACT.**—The effect of antitumor drugs has been considered according to *in vivo* variations of the polyamine levels.

The experimental model of cellular proliferation is not a tumoral process but a hepatic regeneration in partially hepatectomized normal rats. This study consists of the treatment of regenerating animals with antiproliferative, therefore antitumor natural drugs, such as colchicine, vincalucoblastine, and 9-methoxy-ellipticine. Tissular free polyamines (putrescine, spermidine, spermine) in the livers of the animals are estimated.

Important rate fluctuations are observed and are related, first, to regeneration time, thus to cellular cycle, and, second, to the presumed effect of these natural drugs.

Such a study would, first show the antiproliferative activity of an unknown drug and, second, indicate its mechanism.

Depuis quelques années, un certain nombre de travaux expérimentaux et d'observations cliniques suggèrent l'existence d'une relation entre la prolifération cellulaire normale ou néoplasique et la production de polyamines (putrescine, spermidine, spermine) dans ces tissus.

C'est en 1971 que Diane H. Russell (1-2) a montré pour la première fois l'intérêt du dosage des polyamines comme marqueur tumoral dans l'urine de patients atteints de cancer. En effet, l'excrétion urinaire de polyamines libres est parfois très augmentée dans le cas de certaines hémopathies malignes (3).

Le sérum de patients cancéreux, qu'il s'agisse ou non de tumeurs solides, présente également des fluctuations importantes des taux de polyamines (4) difficiles à interpréter actuellement, du fait de l'existence vraisemblable de compartiments sanguins intercommunicants au niveau desquels se répartissent les polyamines.

De plus, la seule augmentation des taux de polyamines libres dans le sérum n'est pas un indice spécifique de la présence d'un cancer. Dans certains cas, on constate en effet des augmentations des taux des polyamines sériques ou urinaires chez des patients atteints de psoriasis (5-6), mucoviscidose (7), lupus érythémateux disséminé (8), insuffisance rénale chronique (9-10), ainsi qu'au cours de la gestation (11).

Si les polyamines libres, dosées dans divers liquides biologiques de l'organisme, ne sont pas uniquement le reflet de l'existence d'une prolifération cellulaire maligne (12), leur biosynthèse tissulaire est par contre en étroite relation avec le cycle cellulaire (13); les taux de polyamines peuvent être alors un certain reflet de la prolifération cellulaire.

Si tel est le cas, il est permis d'envisager dans l'avenir que des dosages de polyamines effectués chez des patients traités par des drogues à activité antitumorale puissent permettre d'apprécier de manière peut-être plus rapide l'efficacité du protocole thérapeutique mis en oeuvre.

Sur un autre plan, et ceci nous concerne plus particulièrement, nous étudions actuellement la possibilité d'utiliser ces dosages de polyamines dans des cultures

cellulaires, comme test d'activité anti-tumorale d'extraits végétaux et de substances naturelles.

Ces applications sont cependant subordonnées à la connaissance des mécanismes intimes de l'élévation des concentrations cellulaires de polyamines, liés à l'activité d'enzymes à l'origine de leur biosynthèse (14) (ornithine décarboxylase, spermidine—et spermine synthétase) ou de leur dégradation (15) (diamine-oxydase, polyamine-oxydase).

Cet article aborde, sous l'angle des variations des taux de polyamines, le mécanisme d'action des drogues anticancéreuses, "in vivo".

Depuis les premiers travaux de Janne (16), l'augmentation très nette des concentrations de polyamines hépatiques constitue l'un des faits marquants de la régénération hépatique expérimentale chez le rat. L'accroissement de ces taux semble dû à une synthèse accrue d'ornithine décarboxylase (O.D.C.) qui est responsable de la production de putrescine, elle-même à l'origine d'une accumulation de spermidine et de spermine hépatique; cette accumulation de polyamines serait également, dans une certaine mesure, en rapport avec des modifications de leur catabolisme et plus particulièrement des variations de l'activité de la diamine oxydase (D.A.O.) (17) et de la polyamine oxydase (P.A.O.) (18).

Compte tenu du fait qu'au décours d'une hépatectomie partielle, le profil évolutif des polyamines du foie en régénération apparaît constant, nous avons tenté de répondre à la question suivante: Les modifications des taux de polyamines hépatiques, chez un animal en régénération expérimentale traité par une drogue à activité antitumorale, sont-elles une des caractéristiques de la famille à laquelle appartient la drogue considérée?

## MATERIEL ET METHODES

**SUBSTANCES NATURELLES UTILISÉES ET MODALITÉS DE LEUR ADMINISTRATION.**—Les substances utilisées sont la colchicine, la vincalécoblastine et la méthoxy-9-ellipticine. Ces principes actifs sont injectés en I.P. selon le protocole suivant: prétraitement horaire variable selon la pharmacocinétique du produit; traitement au moment de l'hépatectomie; traitement en phase de régénération selon la pharmacocinétique du produit.

**Colchicine:** [Principe actif de *Colchicum autumnale* (Liliacée)]. Nous avons utilisé les ampoules injectables de Colchicinos, commercialisées par les Laboratoires Houdé.

La Colchicine est injectée à la dose de 0,5 ml d'une solution à 0,21 mg/ml de colchicine, soit 0,55 mg/kg.

Nous avons procédé à trois injections de cette dose selon l'horaire suivant: à 12 h avant; à 0 h; à 24 h après l'hépatectomie.

**Vincalécoblastine:** [Principe actif de *Catharanthus roseus* G. Don, (Apocynacée)].

Nous avons utilisé la poudre de sulfate de vinblastine pour soluté injectable, commercialisée par les laboratoires Lilly sous le nom de Velbé.

Le sulfate de vinblastine est injecté à la dose de 0,6 ml d'une solution à 0,1 mg/ml.

Nous avons procédé à trois injections de 0,3 mg/kg chacune selon l'horaire suivant: à 8 h avant, à 0 h, à 16 h après l'hépatectomie.

**Méthoxy-9-Ellipticine:** [Principe actif de diverses espèces d'*Ochrosia*, (Apocynacées)].

Nous avons utilisé la poudre de lactate de méthoxy-9-ellipticine (obtenue par synthèse).

La méthoxy-9-ellipticine étant active à des doses 10 fois plus faibles que le dérivé non méthylé (7), nous avons procédé à trois injections de 5 mg/kg (8) selon l'horaire suivant: à 12 h avant; à 0 h; à 24 h après l'hépatectomie.

**ANIMAUX UTILISÉS ET MODALITÉS DES PRÉLÈVEMENTS DE FOIE.**—Nous avons utilisé des rats mâles, de souche Wistar, d'un poids moyen de 200 g. Les témoins (30 rats) reçoivent du sérum physiologique à la place de la substance naturelle expérimentée.

Afin d'avoir des groupes de 5 données, nous avons utilisé 150 rats en tout. Ces rats ont été hépatectomisés partiellement (19), traités par les principes actifs à étudier, puis sacrifiés à la guillotine à 0 h, 3 h, 6 h, 10 h, 24 h après l'hépatectomies.

Les hépatectomies ont été accomplies sous anesthésie à l'éther, à horaires variables, et les sacrifices, à horaire fixe (16 h toujours), afin d'éviter une éventuelle intervention du rythme nyctéméral.

**EXTRACTION ET TAUX DES POLYAMINES.**—Nous avons dosé uniquement les polyamines libres tissulaires (20) dans le foie des animaux en expérience. Les foies des animaux sacrifiés sont prélevés en totalité et congelés.

Après décongélation, 1 g de foie est homogénéisé à froid en présence d'acide perchlorique à 10 pour 100.

Le broyat est agité 30 secondes et déposé à +4° pendant 1 heure. Il est centrifugé 20 minutes à 4 500 tours/min. Le surnageant peut être congelé.

Un aliquot de 400 ml de cet extrait perchlorique est utilisé pour le dosage.

La dansylation est réalisée en ajoutant à cet extrait 400 mcl de chlorure de dansyl (Sigma) à 20 mg/ml d'acétone et en laissant ce mélange une nuit à température ambiante, dans le noir et sous un léger courant d'air.

L'extraction des polyamines dansylées est réalisée par 200 mcl de benzène. 40 mcl de cet extrait sont soumis à une chromatographie sur couche mince de silice dans le mélange cyclohexane-acétate d'éthyle (50:50) pendant 1 heure.

On repère la spermine, la spermidine et la putrescine aux uv à 366 nm. Le taux de spermine et de spermidine est mesuré par lecture de la fluorescence avec le photodensitomètre enregistreur Vernon. Quant à la putrescine, elle est solubilisée dans 3 ml de dioxane et son taux est mesuré par lecture de la fluorescence avec un spectrofluorimètre (excitation à 365 nm, lecture à 520 nm).

Les résultats obtenus en mcg/ml sont transcrits en nM de polyamine/g de foie.

APPRECIATION DES RÉSULTATS.—Pour chaque drogue étudiée, et à chaque horaire d'étude, nous avons 5 données concernant le taux de putrescine, de spermidine et de spermine. Une moyenne des taux de ces substances ainsi que les écart-types pour chacun des groupes sont présentés dans le tableau 1.

Afin de comparer ces résultats, horaire par horaire, mais aussi drogue à drogue ou drogue par rapport aux témoins, nous avons choisi d'utiliser le test de Mahn et Whitney (21) car il s'agit d'un test statistique non paramétrique pouvant donc s'appliquer aux groupes de valeurs que nous avons obtenu et qui ne constituent pas forcément des distributions dites "normales".

Ce test nous renseignera sur la significativité des différences observées entre nos groupes de résultats.

## RESULTATS ET DISCUSSION

LE CYCLE CELLULAIRE EN RÉGÉNÉRATION HÉPATIQUE.—En régénération hépatique chez le rat, les durées des différentes phases du cycle cellulaire sont modifiées par rapport à un cycle hépatocytaire normal.

Bien que le synchronisme de ces cellules en régénération ne soit pas parfait, on peut considérer globalement que jusqu'à la 10<sup>e</sup> heure de régénération la majorité des hépatocytes est en phase G<sub>0</sub> G<sub>1</sub>, que l'horaire 10 h correspond à la phase S et que les phases G<sub>2</sub>+M se situent entre la 20<sup>e</sup> et la 24<sup>e</sup> heure; la phase M durant 1 h aux alentours de la 23<sup>e</sup> heure.

LES TAUX DE POLYAMINES EN RÉGÉNÉRATION HÉPATIQUE.—D'une étude antérieure réalisée par nous (22) dans les conditions qui viennent d'être précisées, il apparaît que le taux de putrescine atteint un maximum vers 6 heures puis retrouve en 96 heures sa valeur initiale.

Le taux de spermidine augmente tout au long des 4 jours de l'expérience, tandis que la concentration de spermine atteint un maximum vers la 10<sup>e</sup> heure puis retrouve sa valeur initiale en 24 heures.

VARIATIONS DU TAUX DES POLYAMINES EN FONCTION DES PRINCIPES ACTIFS ET DU TEMPS DE RÉGÉNÉRATION.—Les résultats sont notés dans le tableau 1.

TABLEAU 1. Variations du taux des polyamines (en nanomoles par gramme de foie) en fonction des substances étudiées et du temps de régénération.

Polyamine	Substance étudiée	Temps de régénération	Taux moyen	Ecart type
PUTRESCINE.....	Témoin (sérum physiologique)	0 h	667	145
		3 h	1306	494
		6 h	812	135
		10 h	301	157
		24 h	107	14
		48 h	218	30
	Colchicine	0 h	710	436
		3 h	428	303
		6 h	319	131
		10 h	1281	223
		24 h	1646	732
		48 h	77	65
	Sulfate de Vinblastine	0 h	461	182
		3 h	248	187
		6 h	623	182
		10 h	638	273
		24 h	265	58
		48 h	844	696

TABLE 1. *Continued*

Polyamine	Substance étudiée	Temps de régénération	Taux moyen	Ecart type
	Lactate de Methoxy-9-Ellipticine	0 h	0	0
		3 h	148	50
		6 h	737	325
		10 h	712	185
		24 h	121	62
		48 h	74	21
SPERMIDINE.....	Témoin	0 h	388	163
		3 h	534	287
		6 h	713	281
		10 h	400	107
		24 h	1264	147
		48 h	1487	175
	Colchicine	0 h	557	133
		3 h	356	133
		6 h	461	145
		10 h	667	37
		24 h	541	173
		48 h	864	388
	Sulfate de Vinblastine	0 h	296	77
		3 h	408	113
		6 h	441	154
		10 h	389	341
		24 h	847	49
		48 h	1022	360
	Lactate de methoxy-9-Ellipticine	0 h	634	55
		3 h	189	83
6 h		922	193	
10 h		1324	295	
24 h		1710	462	
48 h		1157	161	
SPERMINE.....	Témoin	0 h	195	84
		3 h	392	182
		6 h	483	256
		10 h	313	71
		24 h	690	126
		48 h	516	110
	Colchicine	0 h	429	144
		3 h	312	118
		6 h	328	114
		10 h	595	48
		24 h	326	82
		48 h	224	130
	Sulfate de Vinblastine	0 h	231	87
		3 h	333	101
		6 h	339	171
		10 h	333	305
		24 h	490	76
		48 h	373	209
	Lactate de Methoxy-9-Ellipticine	0 h	560	103
		3 h	138	59
6 h		878	161	
10 h		807	157	
24 h		684	183	
48 h		509	91	

EVALUATION DES DIFFÉRENCES SIGNIFICATIVES D'ACTIVITÉ DES PRINCIPES ACTIFS PAR LE TEST DE MAHN ET WHITNEY.—Les résultats en fonction des horaires sont notés dans le tableau 2.

OBSERVATION DES RÉSULTATS.—Les résultats de ces tests montrent que l'activité de ces principes actifs est globalement différente.

TABLEAU 2. Différences significatives d'activité des substances étudiées.  
Résultats du test de Mahn et Withney.

Polyamine	Substance de référence	Substance étudiée	Temps de régénération montrant une différence significative d'activité, d'après le calcul de la variance du U de ce test.
Putrescine.....	Sérum Physiologique	Colchicine	—, 3 h, 6 h, 10 h, 24 h, 48 h
		Sulfate de Vinblastine	—, 3 h, —, 10 h, 24 h, —
		Lactate de méthoxy-9-Ellipticine	0 h, 3 h, —, 10 h, —, 48 h
	Lactate de méthoxy-9-Ellipticine	Colchicine	0 h, —, 6 h, 10 h, 24 h, —
		Sulfate de Vinblastine	0 h, —, —, —, 24 h, 48 h
	Colchicine	Sulfate de Vinblastine	—, —, 6 h, 10 h, 24 h, 48 h
Spermidine.....	Sérum Physiologique	Colchicine	—, —, —, 10 h, 24 h, 48 h
		Sulfate de Vinblastine	—, —, —, —, 24 h, —
		Lactate de méthoxy-9-Ellipticine	0 h, 3 h, —, 10 h, —, 48 h
	Lactate de méthoxy-9-Ellipticine	Colchicine	—, 3 h, 6 h, 10 h, 24 h, —
		Sulfate de Vinblastine	0 h, 3 h, 6 h, 10 h, 24 h, —
	Colchicine	Sulfate de Vinblastine	0 h, —, —, —, 24 h, —
Spermine.....	Sérum Physiologique	Colchicine	0 h, —, —, 10 h, 24 h, 48 h
		Sulfate de Vinblastine	—, —, —, —, —, —
		Lactate de méthoxy-9-Ellipticine	0 h, 3 h, 6 h, 10 h, —, —
	Lactate de méthoxy-9-Ellipticine	Colchicine	—, 3 h, 6 h, 10 h, 24 h, —
		Sulfate de Vinblastine	0 h, 3 h, 6 h, 10 h, 24 h, —
	Colchicine	Sulfate de Vinblastine	0 h, —, —, —, 24 h, —

Les substances étudiées n'agissent pas aux mêmes horaires sur les mêmes constantes biologiques.

Leur mécanisme d'action étant différent sur le cycle cellulaire, leur effet sur les taux de polyamines marqueurs de ce cycle cellulaire sont également différents.

Afin de rendre plus nette la notion de modification des variations des polyamines et l'équilibre qu'elles subissent entre elles, nous avons réalisé des courbes de variation relative (figure 1: colchicine; figure 2: Velbé; figure 3: Ellipticine) représentant le pourcentage de variation de la putrescine (P), de la spermidine (D) et de la spermine (M) par rapport au taux de cette même constante après

injection de sérum physiologique, en fonction du temps de régénération après hépatectomie.

$$y = \frac{\text{moyenne du lot traité}}{\text{moyenne du lot témoin}} ; \quad y > 1 \rightarrow \text{augmentation}$$

$$y < 1 \rightarrow \text{diminution.}$$

D'après la courbe de la figure 1, la colchicine, poison du fuseau, augmente le taux de spermine dans un foie interphasique prétraité et diminue le taux de putrescine à la 3è heure de régénération ainsi qu'à la 6è heure.

A la 10è heure, on observe une nette augmentation des 3 polyamines et plus particulièrement de la putrescine, très fortement augmentée.

A la 24è heure de régénération, le taux de putrescine est toujours élevé mais les taux de spermidine et de spermine sont bas.

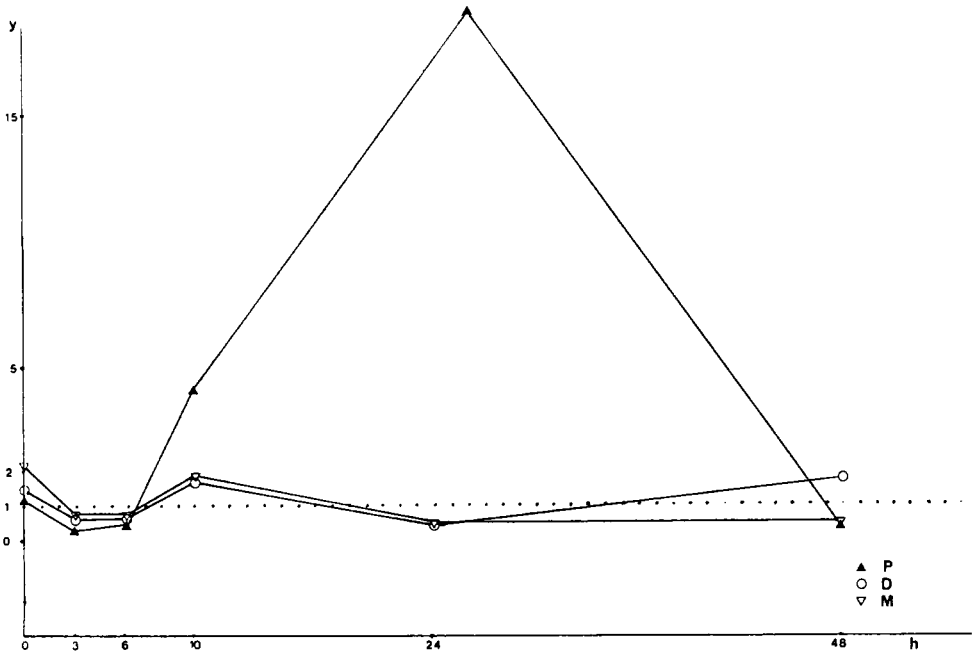


FIGURE 1: COLCHICINE  
Variations relatives des taux hépatiques de spermine (M), spermidine (D), putrescine (P) après traitement à la colchicine de rats hépatectomisés.

$$y: \frac{\text{moyenne du lot traité}}{\text{moyenne du lot témoin}}$$

D'après la figure 2, le sulfate de vinblastine modifie peu les taux des grosses molécules de polyamines jusqu'à la 10è heure de régénération, horaire où le taux de putrescine est par contre augmenté. Par contre, à la 24è heure, le taux de spermidine est bas alors que celui de putrescine est élevé comme dans le cas de la colchicine.

D'après la figure 3, le lactate de méthoxy-9-ellipticine, drogue intercalante, agit en prétraitement sur le foie interphasique en augmentant les taux de spermidine et de spermine et en faisant disparaître totalement la putrescine de ces cellules. A la 3è heure de régénération, les 3 polyamines sont très diminuées. A la 10è heure, la spermidine surtout, la spermine et la putrescine sont augmentées et reviennent à une valeur normale à la 24è heure.

De plus, le tableau 2 indique que le taux de putrescine en régénération

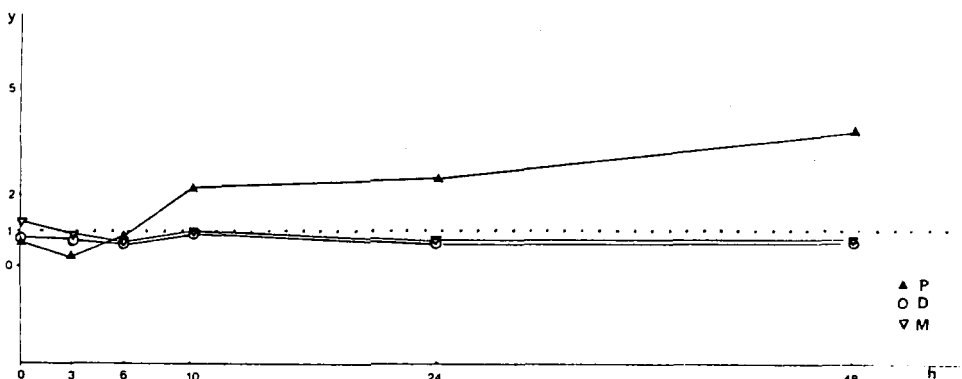


FIGURE 2: VELBE

Variations relatives des taux hépatiques de spermine (M), spermidine (D), putrescine (P) après traitement au Velbé de rats hépatectomisés.

$$y: \frac{\text{moyenne du lot traité}}{\text{moyenne du lot témoin}}$$

hépatique est très modifié par injection de colchicine, que le lactate de methoxy-9-ellipticine a un effet très différent des autres substances étudiées sur la spermidine et la spermine, enfin, que l'activité du sulfate de vinblastine sur le taux de spermine n'est pas significativement différente de celle du sérum physiologique.

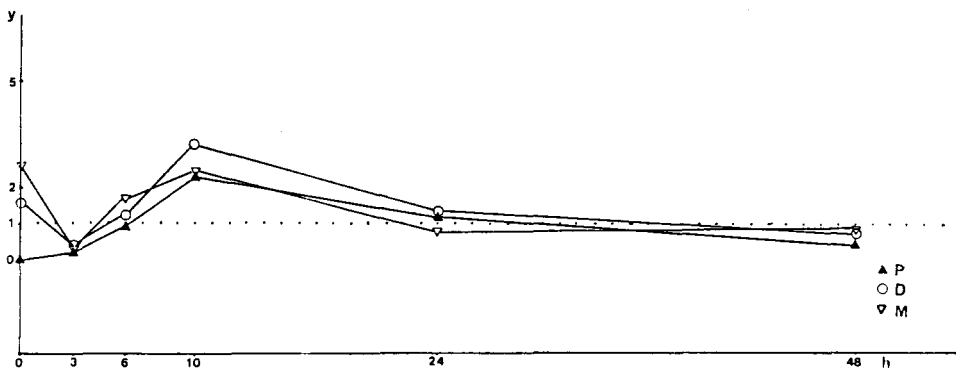


FIGURE 3: ELLIPTICINE

Variations relatives des taux hépatiques de spermine (M), spermidine (D), putrescine (P) après traitement à l'ellipticine de rats hépatectomisés.

$$y: \frac{\text{moyenne du lot traité}}{\text{moyenne du lot témoin}}$$

De cette observation des résultats, il ressort que ces drogues de mécanisme d'action différent agissent bien différemment sur les taux intra-hépatocytaires des polyamines.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.—A la vue des résultats obtenus la question se pose de savoir si les évolutions des taux des polyamines hépatiques d'animaux en régénération, traités par des drogues à activité anticancéreuse permettent de préciser la famille d'appartenance de ces dernières (antimitotique, intercalant, etc. . . .) et si par voie de conséquence, un tel modèle peut aider à suspecter ou à préciser l'activité anticancéreuse de certaines drogues mal connues ou difficiles à classer.

A.—Lorsque l'on considère les drogues à action principalement *antimitotique*,

comme la colchicine ou le Velbé, de nettes fluctuations apparaissent à partir de la 10<sup>e</sup> heure de régénération, donc plus tardivement que lors d'un traitement avec une substance intercalante (ellipticine). L'administration de colchicine comme de Velbé est responsable d'une nette augmentation de la concentration de putrescine hépatique qui persiste à la 24<sup>e</sup> heure après intervention. Cette présence de putrescine à un taux supérieur à celui d'animaux témoins non traités mais partiellement hépatectomisés est-elle en relation avec l'existence de cellules ne pouvant terminer leur division, de cellules bloquées en métaphase?

Les taux de putrescine hépatique d'animaux traités par l'ellipticine étant proches de ceux des témoins, cette possibilité ne doit pas être écartée. Si l'on admet qu'au cours de la régénération hépatique le devenir principal de la putrescine est sa transformation essentiellement en spermidine, puis éventuellement en spermine, il est tentant de penser que cette transformation ne se fait pas lors d'un traitement antimétabolique. Bien au contraire, nous constatons une diminution de la spermine et de la spermidine (24<sup>e</sup> h) contrastant avec une augmentation de la putrescine pouvant être la résultante d'une activité polyamine oxydasique. L'existence d'un taux élevé de putrescine à la 24<sup>e</sup> heure de régénération pourrait être alors un élément en faveur de l'activité antimétabolique.

B.—L'administration d'une drogue *intercalante* comme l'ellipticine, à un animal partiellement hépatectomisé ou non, modifie de manière fort différente les concentrations de polyamines hépatiques.

a) Au cours de la régénération et plus particulièrement lors de la réplication (phase S, 10<sup>e</sup> heure), une drogue intercalante comme l'ellipticine induit des taux élevés des trois polyamines hépatiques. Sans écarter les influences possibles de celle-ci sur des systèmes enzymatiques comme l'ODC, la DAO ou la PAO, un effet intercalant semble hautement probable: si les polyamines au cours d'une réplication normale, sont capables de stabiliser les hélices d'ADN normal nouvellement formées l'intercalation de carbocations ellipticinium ne crée-t-elle pas un encombrement stéréochimique empêchant l'association polyamines-ADN, avec pour conséquence une augmentation des concentrations cellulaires en polyamines libres?

b) En dehors de tout processus régénératif, un traitement à l'ellipticine entraîne une disparition presque complète de la putrescine hépatique, une potentialisation des taux de spermidine et de spermine, ce qui pourrait peut-être s'expliquer par une libération de polyamines normalement associées à l'ADN; la putrescine étant le substrat préférentiel de la DAO (23) elle serait rapidement catabolisée.

En conclusion, ces résultats permettent de penser:

- d'une part que l'augmentation du nombre de principes actifs essayés au cours de la régénération hépatique devrait permettre, à la vue de l'évolution des taux de polyamines hépatiques, de préciser dans une certaine mesure le mode d'action de la molécule utilisée.
- d'autre part que si les polyamines doivent servir de marqueurs tumoraux, la connaissance de la qualité du traitement appliqué au malade sera vraisemblablement un paramètre nécessaire à l'interprétation des résultats.

Received 10 February 1982

#### BIBLIOGRAPHIE

1. D. H. Russell, C. C. Levy, S. C. Schimpff and I. A. Hawk, *Cancer Res.*, **31**, 1555 (1971).
2. D. H. Russell, *Nature*, **233**, 144 (1971).
3. B. G. M. Durie, S. E. Salmon and D. H. Russell, *Cancer Res.*, **37**, 214 (1977).
4. J. Janne, H. Poso and A. Raina, *Biochim. Biophys. Acta*, **473**, 241 (1978).
5. M. Proctor, H. Fletcher, J. Shukla and O. Rennert, *J. Invest. Dermatol.*, **65**, 409 (1975).
6. P. Bohlen, J. Grove, M. F. Beya, J. Koch-Weser, M. H. Henry and E. Grosshans, *Eur. J. Clin. Invest.*, **8**, 215 (1978).
7. O. Rennert, J. Frias and D. Lapointe, "Fundamental problems of cystic fibrosis and related diseases", J. A. Mangos and R. C. Talamor, Eds., Intercontinental Medical Book, New York, N. Y., 1973, p. 41.



8. H. Puri, R. A. Campbell, V. Puri, M. H. Harner, Y. B. Talwalkar, J. F. Musgrave, F. Bartos, D. Bartos and B. Loggan, "Advances in polyamine research", vol. II, R. A. Campbell, Y. B. Talwalkar, D. Bartos, F. Bartos, J. Musgrave, M. Harner, H. Puri, D. Grettie, A. M. Dolney and B. Loggan, Eds., Raven Press, New York, N. Y., 1978, p. 359.
9. R. A. Campbell, Y. Talwalkar, D. Bartos, F. Bartos, J. Musgrave, M. Harner, H. Puri, D. Grettie, A. M. Dolney and B. Loggan, "Advances in polyamine research", vol. II, R. A. Campbell, Y. B. Talwalkar, D. Bartos, F. Bartos, J. Musgrave, M. Harner, H. Puri, D. Grettie, A. M. Dolney and B. Loggan, Eds., Raven Press, New York, N. Y., 1978, p. 319.
10. J.-Ph. Moulinoux, P. Le Pogamp, V. Quemener, M. Le Calve, V. Joyeux and D. Chevet, *Life Sci.*, **29**, 955 (1981).
11. D. H. Russell, H. R. Giles, C. D. Christian and J. L. Campbell, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **132**, 649 (1978).
12. G. A. Quash and A. M. Roch, *Ann. Biol. Clin.*, **37**, 317 (1979).
13. O. Heby and G. Andersson, "Polyamines in biomedical research", J. M. Gaugas, Ed. Wilen-Interscience Publication, New York, N. Y., 1980, p. 17.
14. O. Heby, *Differentiation*, **19**, 1 (1981).
15. G. A. Quash, T. Keolouangkhot, L. Gazzolo, H. Ripoll and S. Saez, *Biochem. J.*, **177**, 275 (1979).
16. J. Janne, *Acta Physiol. Scand., Suppl.*, **300**, 6 (1967).
17. A. Perin, A. Sessa and M. A. Desiderio, "Advances in polyamine research", Vol. III, C. M. Caldarera, V. Zappi and V. Bachrach, Eds., Raven Press, New York, N. Y., 1981, p. 397.
18. E. Hollta, *Biochemistry*, **16**, 91 (1977).
19. G. M. Higgins and R. M. Anderson, *Arch. Pathology*, **12**, 186 (1931).
20. F. McCormick, *Biochem. J.*, **174** (1978).
21. D. Schwartz, "Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des Biologistes", S. Schwart 2, ed, Flammarion, 1963, p. 246.
22. J.-Ph. Moulinoux, Y. Chambon and V. Quemener, *C.R. Soc. Biol.*, **174**, 58 (1980).
23. T. E. Barman, "Enzyme Book" vol. I, T. E. Barman, ed., Springer-Verlag, New York, N. Y., 1969, p. 181.