

INFLUENCE D'UNE MODIFICATION DE LA REPARTITION INTRA-CELLULAIRE DES POLYAMINES SUR LA PROLIFERATION D'HEPATOCYTES TRAITES PAR LA METHYL-2 HYDROXY-9 ELLIPTICINE

VÉRONIQUE QUEMENER, JACQUES-PHILIPPE MOULINOUX

*Laboratoire d'Histologie et d'Embryologie, Faculté de Médecine,
Avenue du Pr. Léon-Bernard, 35043 Rennes-Cédex, France
et Unité de Recherche Hépatologique*

et LOÏC GIRRE*

*Laboratoire de Pharmacognosie et de Mycologie, Faculté de Pharmacie,
Avenue du Pr. Léon-Bernard, 35043 Rennes-Cédex,*

INSERM U-49, Hôpital de Pontchaillou, 35043 Rennes-Cédex, France

ABSTRACT.—2-Methyl-9-hydroxyellipticine (MHE) added to tumoral hepatocyte cultures (400 ng MHE/ml medium) is responsible for a cytostatic effect. This decrease of cellular proliferation and of DNA synthesis is accompanied by an increase of intracellular free spermidine levels. We could not attribute this result to a deviation of this polyamine metabolism. These increased concentrations of free spermidine are connected to a decrease of the amount of nuclear bound polyamines, mainly joined with the RNA fraction. Thus, the cytostatic effect observed with this drug might be related to a decrease in the amount of spermidine connected to RNA; therefore, its intercalating effect is only indirectly responsible for the cellular proliferation decrease.

Dans une étude précédente (1) nous avons observé que l'administration d'un dérivé de l'ellipticine au cours de la régénération hépatique expérimentale chez le rat s'accompagnait d'une augmentation des concentrations de polyamines dans le foie des animaux traités par cette drogue intercalante, actuellement utilisée en thérapeutique anticancéreuse (2). Contrairement aux antimétabolites utilisés en parallèle, tel que le Velbé et la colchicine, la méthoxy-9-ellipticine provoquait un accroissement des taux intracellulaires de spermidine libre à des horaires correspondant à la phase répllicative de l'ADN (1). Bien que nous disposions actuellement d'un inhibiteur spécifique suicide et irréversible de la synthèse des polyamines (3), l' α -difluorométhylornithine (α -DFMO), il est encore difficile de préciser de quelles manières interviennent les polyamines au cours des processus de prolifération (4-6) et de différenciation (7, 8). Si certains dérivés de l'ellipticine peuvent provoquer *in vitro* des cassures chromosomiques (9) pouvant, dans une certaine mesure, expliquer l'absence de répllication normale, d'autres mécanismes ne peuvent-ils être invoqués pour rendre compte de l'effet cytostatique observé (10)?

Afin de tenter de répondre à cette question, importante du fait de l'utilisation clinique des polyamines en tant que marqueurs tumoraux (11-13), nous avons utilisé en culture cellulaire un autre dérivé de l'ellipticine, la méthyl-2-hydroxy-9-ellipticine (MHE) (14). Cet ammonium quaternaire forme en effet avec l'ADN un complexe d'intercalation stabilisé par des liaisons électrostatiques, ce qui lui confère une affinité accrue pour les acides nucléiques (15). Or, un modèle moléculaire d'association polyamines/ADN a été proposé, la spermidine jouant un rôle important dans la stabilisation et la condensation de la molécule d'ADN (16). *In vivo*, polyamines et protéines non histones entreraient en compétition lors de leur fixation au niveau de certaines régions de l'ADN nucléosomique (17).

La spermidine ayant la capacité, au moins *in vitro*, de neutraliser une partie des charges négatives de l'ADN (18, 19), existe-t-il une relation entre une modification de la répartition intracellulaire de cette polyamine et l'activité antitumorale des dérivés de l'ellipticine?

MATERIEL ET METHODES

SUBSTANCES NATURELLES OU DE SYNTHÈSE UTILISÉES.—La méthyl-2-hydroxy-9-ellipticine ou MHE (Lab. Sanofi) que nous avons utilisée à la dose de 400 ng/ml de milieu de culture est un dérivé de synthèse de l'ellipticine (principe actif de diverses espèces d'*Ochrosia*, Apocynacées).

L' α -difluorométhylornithine ou DFMO (Lab. Merrell Int.) a été utilisé à diverses concentrations.

Les produits chimiques utilisés sont: milieu de culture (GIBCO); sérum de veau foetal ou SVF (Eurobio); hépés et trypsine (FLOW); 1-4 14 C-putrescine dihydrochloride-122 mCi/mmol et aqueous counting scintillant (Amersham Int.); chlorure de dansyl, hydrochloride spermine ou SM, spermidine ou SD et putrescine ou PUT (Sigma); solvants suprapur (Merck).

CULTURE CELLULAIRE.—Les cellules qui ont servi à cette étude sont issues du clone FAZA 967 (20) de l'hépatome de Reuber (21). Elles sont cultivées à 37° sous atmosphère CO₂ dans le milieu Medium 199: Eagle MEM ($\frac{1}{3}$ - $\frac{2}{3}$) SVF (1%). L'incubation de ces cellules durant 48 h en présence de 14 C-putrescine a permis de réaliser le marquage radioactif des polyamines intracellulaires synthétisées à partir de ce précurseur.

Toxicité.—L'effet cytolytique des drogues étudiées a été jugé par l'estimation des activités enzymatiques (lacticoxydohydrogénase ou LDH, transaminases ou SGOT et SGPT) dans le milieu de culture.

DÉTERMINATION DU NOMBRE ET DU VOLUME CELLULAIRE.—Le comptage ainsi que l'estimation du diamètre des cellules préalablement séparées (trypsine 0,1%) sont réalisés à l'aide du Coulter Counter (Coultronics ZBI C 1000).

DOSAGE DES POLYAMINES (PA).—La technique utilisée est une adaptation de la méthode de Mac Cormick (22). L'extraction des PA libres des cellules entières ou des cytoplasmes préalablement séparés est réalisée par l'acide perchlorique glacé sous forte agitation. Les PA sont ensuite rendues fluorescentes par dansylation. L'extrait benzénique des PA dansylées est évaporé à sec sous vide.

Les échantillons non radioactifs sont ensuite soumis à une chromatographie liquide haute performance (hplc Sopares) comme nous l'avons précédemment décrit (12).

Les échantillons radioactifs sont ensuite soumis à une chromatographie sur couche mince (1). Les PA sont repérées aux uv, puis éluées par du dioxanne: ainsi pour chaque isolement de spermine, spermidine ou putrescine, la solution dioxannique correspondante servira à la fois à la mesure de l'intensité de fluorescence à 365-520 nm au spectrofluorimètre (Jobin et Yvon) et à l'estimation de la radioactivité présente sur ces molécules (compteur S.L. Packard Instr.). Le rapport des deux valeurs ainsi obtenues à partir du même isolement chromatographique permet de déterminer l'activité spécifique de la polyamine considérée.

SÉPARATION DES NOYAUX ET DES CYTOPLASMES.—Les cellules sont agitées en présence d'un tampon à 1% de Triton X 100 dans NaCl 0,15 M, 0,02 M TRIS, 10⁻³ M EDTA, pH:7,6.

MESURE DES TAUX D'ADN.—Nous avons utilisé la technique de Münro et Fleck (23): l'acide perchlorique glacé à 2% puis des hydrolyses différentielles du culot (afin de séparer successivement les ARN et les protéines) permettent l'extraction de l'ADN: une mesure de la densité optique à 260 nm de la solution ainsi obtenue permet l'estimation du taux d'ADN.

ESTIMATION DES PA LIÉES ET LIBRES.—Les cellules préalablement incubées en présence de 1-4 14 C-Putrescine subissent l'extraction perchlorique de leurs polyamines libres. Le précipité résiduel est solubilisé par de la soude 2N. Le comptage de la radioactivité présente dans un aliquot de cette fraction permet d'estimer la quantité totale de polyamines liées et adsorbées aux macro molécules. Sur un autre aliquot le taux d'ADN est déterminé. Afin de déplacer les PA adsorbées, cette solution sodique est traitée, à plusieurs reprises, volume à volume par une solution d'acide perchlorique à 10%, contenant un mélange 0,01 M de putrescine, spermidine, et spermine. La radioactivité résiduelle du culot nucléoprotéique correspond donc essentiellement aux PA liées de façon covalente.

RESULTATS

INFLUENCE DE LA MHE SUR LA PROLIFÉRATION ET LES TAUX CELLULAIRES DE POLYAMINES.—Comme le montre le Tableau 1, la prolifération cellulaire, jugée sur le nombre de cellules ou la quantité d'ADN, est nettement réduite dès la 24^{ème} heure après administration de la MHE. Cette réduction de la prolifération ne s'accompagne jusqu'à la 96^{ème} heure après le début du traitement d'aucun signe de cytolysse jugée sur des critères morphologiques et enzymatiques (cf. Matériel et Méthodes).

Par contre, nous avons observé (Figure 1) un accroissement du diamètre des cellules dès la 24^{ème} heure après traitement.

Dans les conditions où nous nous sommes placés, la MHE a donc eu un effet cytos-

TABLEAU 1. Etude Cinétique du Nombre des Cellules et des Taux d'ADN après Traitement par la MHE ^a

Horaire	Traitement	N ^b	Taux d'ADN en µg/boîte
0 h		1,7 (Δ=0,4)	19,4 (Δ=5,2)
24 h	Témoin	4,14	35,3
	MHE ^b	3,8	19,1
48 h	Témoin	6,4	45,8
	MHE	2,6	16,2
72h	Témoin	7,2	56,4
	MHE	3,1	22,1
96 h	Témoin	7,4	54,5
	MHE	3,3	22,3

^aMHE = méthyl-2 hydroxy-9 ellipticine.^bN = Nombre de cellules en millions. (M)

ratique. Or, cet effet cytotatique s'accompagne de taux élevés de spermidine libre intracellulaire particulièrement net à la 24^{ème} heure après mise en contact des cellules avec la drogue (Figure 2); cette élévation de taux intracellulaires de spermidine, débutant dès la 12^{ème} heure (Tableau 2) pourrait être la conséquence d'un déplacement de cette polyamine du fait de l'intercalation de la MHE ou bien pourrait être la conséquence de l'influence de cette drogue sur le métabolisme des polyamines. Ce sont ces hypothèses qui ont été étudiées dans la suite de ce travail.

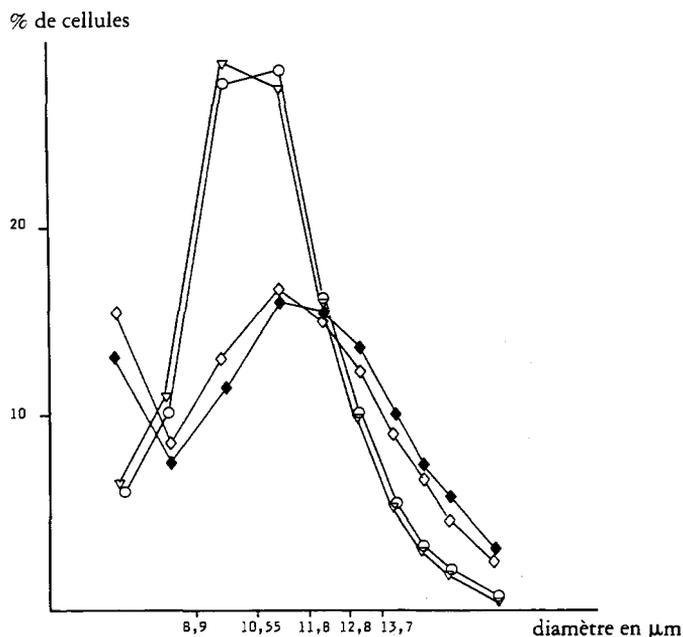


FIGURE 1. Effets de 72 h de traitement par la MHE (◇), l'αDFMO 5 mM (▽), l'association MHE-αDFMO (●) sur la taille des hépatocytes de Reuber en culture. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules par plage de diamètre. Si les diamètres des cellules témoins (○), se distribuent normalement autour d'une valeur moyenne de 9 µm, ceux des cellules traitées par la MHE s'étalent entre les valeurs plus élevées de 9 à 13,5 µm.

TABLEAU 2. Etude Cinétique des Polyamines Radioactives

Horaire	Traitement	N°	µg ADN	Put ^b en pmol/µg ADN	Put* en pmol/µg	Put* en %	SD ^c en nmol/µg ADN	SD* en nmol/µg ADN	SD en %	SM ^d en nmol/µg ADN	SM* en nmol/µg ADN	SM en %	µg ADN/M de cellules
0 h	MHE ^e	0,39	20,15	7,5	0,08	1	0,115	0,014	12,05	0,08	0,015	17,8	51,7
4 h	MHE	0,41	21,6	14	0,14	1	0,14	0,020	14,2	0,15	0,020	13,1	52
8 h	MHE	0,64	27,6	13	0,13	1	0,20	0,013	7,1	0,09	0,016	18,6	43,5
12 h	MHE	0,44	35,2	13	0,09	0,6	0,18	0,017	9,4	0,09	0,016	17,2	80
24 h	MHE	0,35	36,8	6	0,09	1,4	0,21	0,013	6,3	0,11	0,017	15,2	105,1
48 h	MHE	0,41	31,3	7	0,07	1,0	0,18	0,008	4,5	0,16	0,016	10,3	76,5
0 h	T ^f	0,39	20,15	7,5	0,08	1	0,115	0,014	12,05	0,08	0,015	17,8	51,7
4 h	T	0,34	20,2	11	0,135	1,2	0,17	0,019	10,9	0,14	0,023	16,4	60,3
8 h	T	0,62	30,1	10	0,13	1,3	0,17	0,014	8,3	0,12	0,019	16,5	48,9
12 h	T	0,95	37,6	4	0,05	1,25	0,15	0,011	7,3	0,11	0,016	15,3	39,7
24 h	T	1,1	50,7	3	0,04	1,6	0,13	0,005	4,0	0,11	0,013	11,3	47,6
48 h	T	1,4	55,9	3	0,07	2,7	0,14	0,003	2,0	0,19	0,014	7,2	39,0

^aN = Nombre de cellules en millions (M)

^bPut = putrescine, Put* = ¹⁴C-putrescine

^cSD = spermidine, SD* = ¹⁴C-spermidine

^dSM = spermine, SM* = ¹⁴C-spermine

^eMHE = méthyl-2 hydroxy-9 ellipticine

^fT = témoin

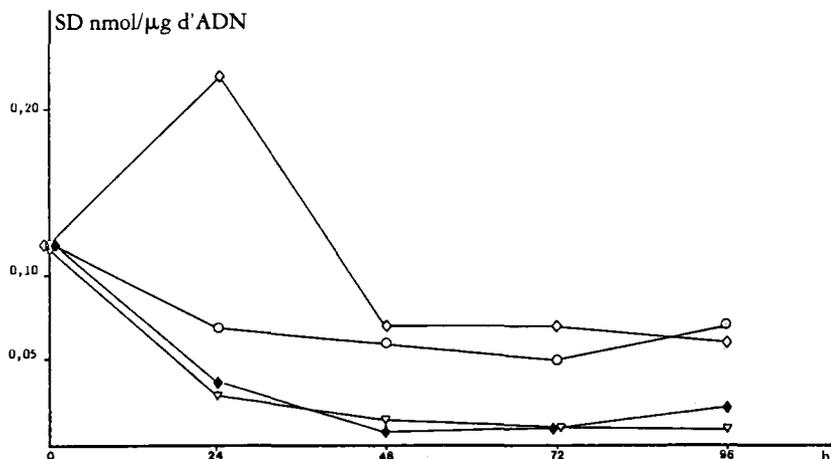


FIGURE 2. Taux de spermidine libre intracellulaire après différents horaires de traitement par la MHE (◇), l' α DFMO 5 mM (∇), l'association MHE- α DFMO (◆) et dans les cellules témoins (○). Dès la 24^{ème} heure, la MHE multiplie par 3 les valeurs de ces taux alors que l' α DFMO les réduit de moitié,

ETUDES DES MODIFICATIONS DU MÉTABOLISME DES PA EN PRÉSENCE DE MHE.—Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de cette drogue sur le catabolisme des Polyamines.

Comme le montre le Tableau 2, nous pouvons remarquer que, si les taux de Spermidine libre totale des cellules traitées par la MHE sont supérieurs à ceux cellules témoins, la ^{14}C -spermidine libre de ces cellules est également élevée et par conséquent le rapport de ces deux valeurs (Figure 3) c'est-à-dire l'activité spécifique de cette polyamine évolue parallèlement à celle des cellules témoins. Compte tenu du fait que

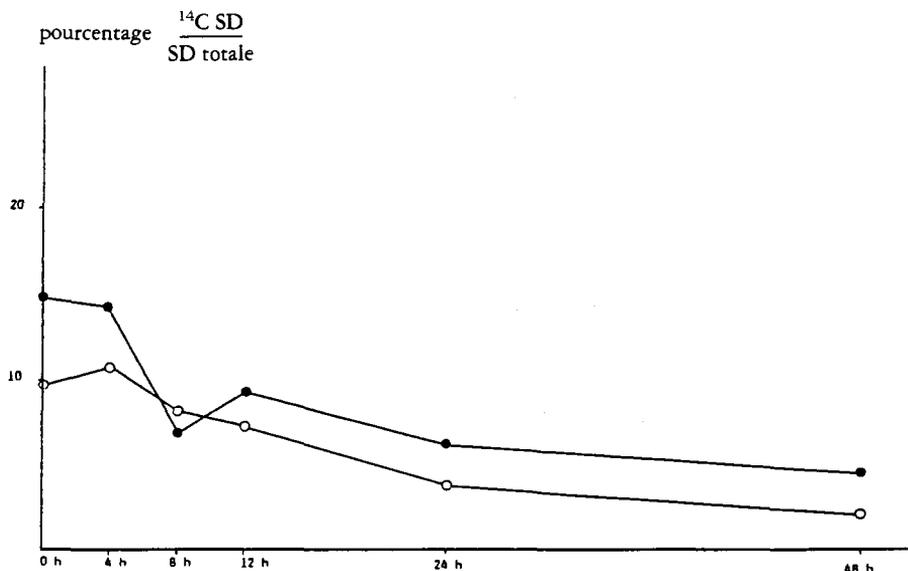


FIGURE 3. Evolution de l'activité spécifique de la spermidine libre intracellulaire au cours du traitement par la MHE (●) et dans les cellules témoins (○). Après incubation des cellules en présence de ^{14}C -putrescine, nous avons estimé les concentrations intracellulaires de ^{14}C -spermidine et de spermidine libre totale. Le rapport de ces deux valeurs, ou activité spécifique est le reflet du métabolisme de cette polyamine. Son évolution au cours des 48 premières heures est parallèle entre cellules traitées et cellules témoins.

l'excrétion de PA dans le milieu de culture est comparable que les cellules soient ou non traitées (ce que nous avons vérifié), la MHE semble ne pas intervenir au cours du catabolisme de la spermidine.

Afin d'estimer l'influence de la MHE sur l'anabolisme de la spermidine, nous l'avons associé à un inhibiteur spécifique de la synthèse des PA, l' α -DFMO.

Si, comme le montre le Tableau 3, l' α -DFMO est toxique à la concentration de 50 mM, le taux de putrescine et de spermidine, ainsi que la prolifération cellulaire sont très nettement diminués pour une concentration d' α -DFMO de 20 mM. Cet effet antiprolifératif n'étant pas recherché dans le cadre de l'association MHE- α -DFMO, nous avons choisi la concentration de 10 mM qui, tout en réduisant le taux intracellulaire de spermidine libre (plus efficace que 5 mM: Figure 2), ne présente ni toxicité, ni effet antiprolifératif (Tableau 3).

TABLEAU 3. Effet-Dose en l' α -DFMO sur les Cellules de Reuber

Dose mM	Horaire	N ^a	LDH en unités/litre par \bar{M} de Cel	SGOT unités/litre	SGPT unités/litre	SM ^b nmol/ \bar{M} de Cel	SD ^b nmol/ \bar{M} de Cel	Put ^b nmol/ \bar{M} de Cel
0 (T)	0 h	1,0				2,05	1,12	0,17
	24 h	2,5	38,4	17	4,4	1,42	1,6	0,13
	48 h	9,2	10,1	19,4	3,4	0,64	0,64	0,046
	72 h	6,8	26,3	29,8	4,9	0,72	0,5	0,08
10	0 h	1,0				2,05	1,12	0,17
	24 h	3,6	23,6	16,9	3,6	0,95	0,09	0,06
	48 h	8,8	10,6	19,5	3,6	0,64	0,04	0,024
	72 h	6,9	14,3	24,8	6,3	0,52	0,035	0,033
20	0 h	1,0				2,05	1,12	0,17
	24 h	3,6	21,8	15,8	4,0	0,97	0,05	0,012
	48 h	5,3	15,2	17,8	2,7	0,73	0,015	0,008
	72 h	5,1	19,2	20,2	3,8	0,41	0,016	0,004
50	0 h	1,0				2,05	1,12	0,17
	24 h	2,0	56,1	14,6	5,3	0,4	0,21	0,105
	48 h	1,95	76	18,3	2,4	0,23	0,11	0,108
	72 h	1,4	119	18,3	4,8	0,14	0,02	0,08

^aN: Nombre de cellules en millions (\bar{M}).

^bSM=spermine, SD=spermidine, Put=putrescine.

Comme nous le constatons Figure 4c, là encore les activités spécifiques de la spermidine dans les cellules traitées par l' α -DFMO en association ou non à la MHE évoluent de manière comparable. La spermidine totale des cellules traitées par l'association α -DFMO-MHE apparaît ainsi comme la résultante d'une part d'une augmentation de la concentration intracellulaire de spermidine due à la MHE, et d'autre part à la réduction de la synthèse de cette polyamine du fait de la présence d' α -DFMO (Figure 4a). Du fait de l'évolution comparable des activités spécifiques de la spermidine dans les cellules traitées par l'association MHE- α -DFMO (Figure 4c), de la même manière que nous avons préalablement écarté une influence de la MHE sur le catabolisme de la spermidine (Figure 3), l'augmentation de la concentration intracellulaire de spermidine libre dans les cellules traitées par cet intercalant, ne semble pas due à une réduction de l'anabolisme des PA. Cette augmentation pouvait être alors en relation avec une réduction des taux intracellulaires de spermidine liée.

MODIFICATIONS INDUITES PAR LA MHE SUR LES LIAISONS ENTRE LES POLYAMINES ET LES CONSTITUANTS CYTOPLASMIQUES ET NUCLÉAIRES.—Nous avons dans un premier temps vérifié qu'il ne s'agissait pas d'un simple déplacement

mécanique: en effet, des cellules lysées mises en contact avec de la MHE, ne présentent pas de modifications notables de leurs taux de PA libres et liées (Tableau 4). De ce fait, la MHE pourrait au cours du cycle cellulaire se localiser sur des sites physiologiquement occupés par les PA. Ceci nous paraît d'autant plus vraisemblable que, comme le montre le Tableau 5, la MHE est responsable d'une réduction de 30% des taux de PA liées aux noyaux, sans modification notable des concentrations des PA libres cytoplasmiques; l'augmentation précédemment observée de spermidine libre cellulaire (Figure 2) serait la conséquence de taux élevés de spermidine libre nucléaire.

Avant de discuter le mécanisme de l'augmentation des taux de PA libres nucléaires sous l'influence de la MHE, nous avons tenté de préciser, après fractionnement

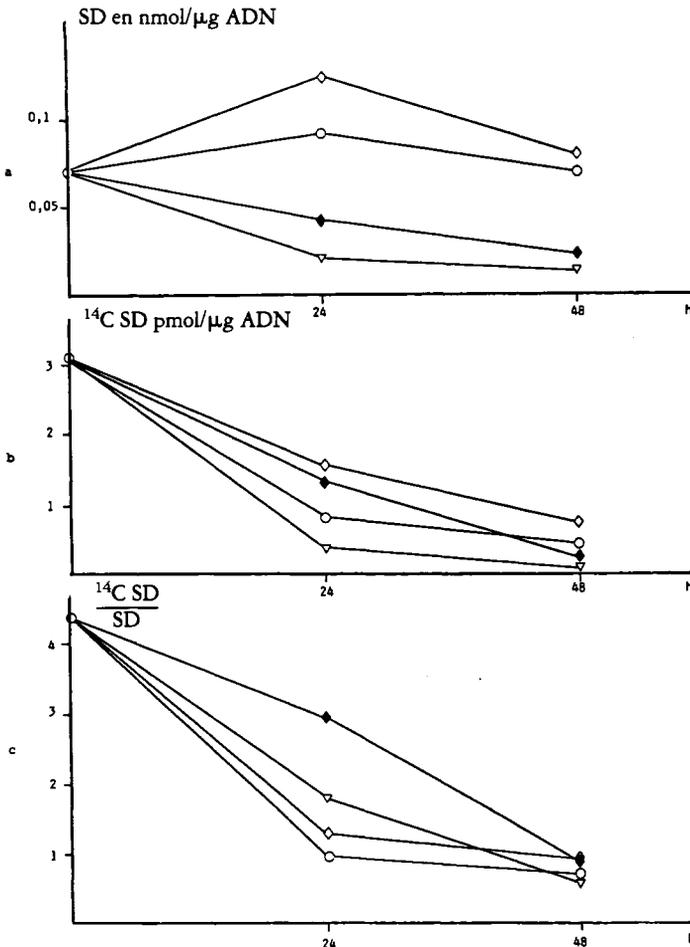


FIGURE 4. La spermidine libre totale (Figure 4a) des cellules traitées par l'association MHE- α DFMO (\bullet) semble résulter de l'augmentation de la concentration due à la MHE (\diamond) et de la réduction de sa synthèse sous l'influence de l' α DFMO 10 mM (∇). Après incubation des cellules en présence de ^{14}C -putrescine, nous avons estimé la quantité de ^{14}C -spermidine libre intracellulaire (Figure 4b), le rapport $\frac{^{14}\text{C SD}}{\text{SD}}$ ou activité spécifique (Figure 4c) évolue de manière comparable dans les cellules traitées par l' α DFMO associée ou non à la MHE. Par contre, celle des cellules traitées par la MHE seule évolue parallèlement à celle des témoins (a).

TABLEAU 4. Effets de la MHE sur Cellules Lysées

N cellules ensemencées	Traitement du culot de Cel. lysées	ADN en µg/bte	dpm culot P & N ^a par µg ADN	dpm culot P & N lavé PAF ^b par µg ADN	SM ^c totale (nmol) par µg ADN	SM ^{c*} en nmol par µg ADN	% SM*	SD ^d totale (nmol) par µg ADN	SD ^d en (nmol) par µg	% SD*	Pur ^e totale (pmol) par µg ADN	Pur ^{e*} en nmol par µg ADN	% Pur*
4,11 3,09	+MHE ^f +MHE	25,9 26,7	1115 863 m̄=989	111 87 m̄=99 (10%)	0,133 0,086	0,010 0,073	7,6 8,5 m̄=8,05 ±0,45	0,106 0,073	0,006 0,005	5,8 6,8 m̄=6,3 ±0,5	7,2 7,0	0,032 0,02	0,45 0,32 0,38 ±0,06
3,81 3,06	Témoin Témoin	22,8 26,7	1234 1068 m̄=1151	148 118 m̄=133 (11,6%)	0,136 0,133	0,012 0,011	8,6 8,3 m̄=8,45 ±0,15	0,114 0,117	0,007 0,007	6,3 6,3 m̄=6,3	13,6 7,0	0,03 0,02	0,20 0,35 m̄=0,27 ±0,07
m̄=3,52 Δ=0,45		m̄=25,52 Δ=1,6											

^aCulot P & N = Protéique et acides nucléiques.

^bPAF = Polyamines froides 0,01 M.

^cSM = spermine, SM* = ¹⁴C-spermine.

^dSD = spermidine, SD* = ¹⁴C-spermidine.

^ePur = putrescine, Pur* = ¹⁴C-putrescine.

^fMHE = méthyl-2 hydroxy-9 ellipticine.

TABLEAU 5. Influence de la MHE^a sur la Répartition des Polyamines Liées et Libres, Cytoplasmiques et Nucléaires.

Horaire et Traitement	Cytoplasme dpm (PA ^b totales)	NOYEAUX		LAVAGES (L) DES NOYEAUX/bre					NOYEAUX LAVES dpm/ μ g ADN
		ADN μ g/bre	DPM noy/bre	dpm 1er L.	dpm 2ème L	dpm 3ème L	dpm 4ème L		
0 h	8,5 10 ⁶	67,5	0,7 10 ⁵	4,2 10 ⁵	0,9 10 ⁵	6 689	1 500	693	
24 h	T	167	1,2 10 ⁵	2,7 10 ⁵	1,0 10 ⁵	5 340	900	551	
	MHE	147	1,5 10 ⁵	3,7 10 ⁵	1,3 10 ⁵	7 847	1 333	373	
48 h	T	131	1,3 10 ⁵	3,6 10 ⁵	0,8 10 ⁵	5 190	800	532	
	MHE	122	0,9 10 ⁵	2,6 10 ⁵	0,6 10 ⁵	4 756	916	384	

^aMHE = méthyl-2 hydroxy-9 ellipticine.^bPA = polyamine.^cT = témoin.

chimique (Figure 5) la nature du (des) constituant(s) (ADN, ARN, protéines) présentant une diminution de leurs taux de PA liées.

Comme nous pouvons le constater sur le Tableau 6, à 24 h, le taux de radioactivité n'est diminué qu'au niveau de la fraction ARN, et cela sans que la MHE n'ait entraîné de variations des concentrations nucléaires d'ARN (Tableau 7).

De ce fait, il est permis de penser que la réduction du marquage de l'ARN sous l'influence de la MHE est principalement due à une diminution de la quantité de spermidine associée à cet acide nucléique, ceci expliquant les augmentations de concentration intracellulaire de cette PA libre.

DISCUSSION

A la vue de ces résultats, est-il possible d'établir une relation entre la réduction de spermidine associée aux ARN et l'effet cytostatique observé en présence de MHE?

Comme c'est le cas, au moins *in vitro*, pour l'ADN (24), la spermidine est susceptible de s'associer aux ARN (Tableau 6). Ces "complexes spermidine/ARN" antérieurement décrits (16), pourraient être responsables d'une réduction de la dégradation enzymatique de ces acides nucléiques. Il est intéressant de noter que la spermidine semble également participer à la structure tertiaire des ARN_c (25): Cohen *et al.* ont effectivement montré qu'un intercalant tel que la chloroquine pouvait prendre la place de la spermidine au niveau des ARN_c (26). Du fait de ses charges polycationiques et de sa

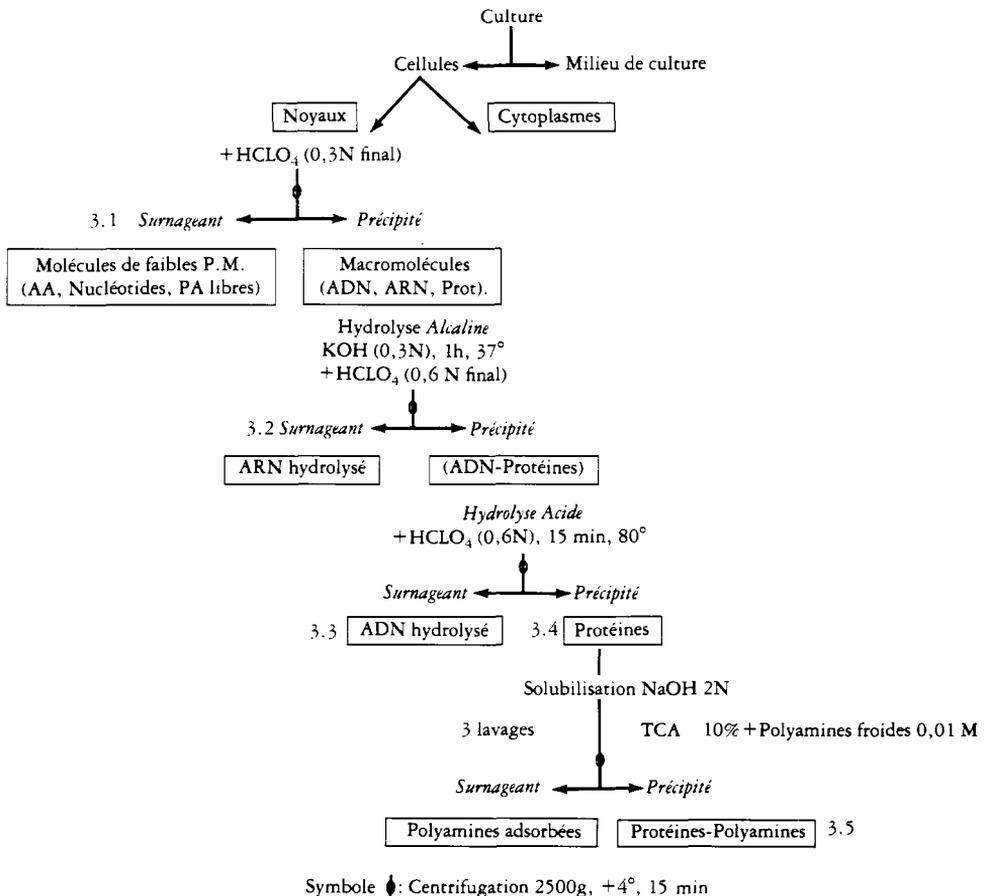


FIGURE 5. Principe du fractionnement des constituants nucléaires.

TABLEAU 6. Estimation de la Répartition de la Radioactivité au Cours du Fractionnement des Constituants Nucléaires

Horaire et traitement	$\mu\text{g}/\text{ADN}$	Fraction 3.1 dpm/ μg ADN	Fraction 3.2 (ARN hydrolysé) dpm/ μg ADN	Fraction 3.3 (ADN hydrolysé) dpm/ μg ADN	Fraction 3.4 Protéines avant lavage dpm/ μg Prot	Fraction 3.5 Protéines après lavage dpm/ μg Prot
0 h	135	0,99 10^3	70	32,95	2 293	1 524
T	207	0,83 10^3	84,6	18	1 502	879
24 h	MHE ^b	1,04 10^3	49,3	24,6	1 256	798
48 h	T	0,74 10^3	50,6	15,8	1 301	923
	MHE	0,90 10^3	55,1	21,3	1 291	1 015

^aT = témoins.^bMHE = méthyl-2 hydroxy-9 ellipticine.

TABLEAU 7. Taux d'ARN sous l'Influence d'un Traitement par la MHE: Les Concentrations de Cet Acide Nucléique Sont estimées par en Densité Optique à 260 nm de la "Fraction ARN" par μg d'ADN Présents dans la "Fraction ADN" des Mêmes Cellules.

DP 260 nm/ μg ADN	0 h	24 h	24 h
Témoins	$1,34 \cdot 10^{-3}$	$1,34 \cdot 10^{-3}$	$1,43 \cdot 10^{-3}$
Traités MHE ^a	$1,34 \cdot 10^{-3}$	$1,62 \cdot 10^{-3}$	$1,27 \cdot 10^{-3}$

^aMHE=méthyl-2 hydroxy-9 ellipticine.

structure spatiale (17, 27, 28), la spermidine aurait donc semble-t-il une affinité importante pour les acides nucléiques, qu'ils soient mono ou bicaténares.

Une constatation du même ordre peut être faite à propos de nombreuses molécules intercalantes (29, 30), y compris les carbocations ellipticiniums (15).

La spermidine et la MHE se présentant *in vivo*, comme des polycations organiques, ces deux molécules pourraient de ce fait posséder des sites de liaisons sinon identiques, du moins comparables au niveau des acides nucléiques.

Comme nous l'avons constaté, les cellules traitées par la MHE présentent des taux de spermidine libre nucléaire supérieurs à ceux des cellules témoins; cette spermidine étant radioactive, (Tableau 5) elle provient nécessairement de la ¹⁴C-putrescine introduite dans le milieu de culture durant les 48 h précédant la mise en contact des hépatocytes avec la MHE (cf. Matériel et Méthodes). La concentration nucléaire de spermidine libre étant augmentée au cours des 24 premières heures dans les cellules traitées par la MHE, et l'éventualité d'une libération mécanique à partir des structures cellulaires ayant été écartée (Tableau 4), cette polyamine pourrait être dans l'impossibilité de se localiser au niveau de ses sites de fixation habituels. La quantité de radioactivité est en particulier notablement réduite au niveau de la fraction ARN nucléaire dans les cultures traitées par la MHE (Tableau 6), et cela sans que la quantité d'ARN nucléaire ne soit notablement modifiée par l'administration d'ellipticine (Tableau 7).

Cette polyamine provenant d'une synthèse ayant eu lieu avant le traitement par la MHE, l'augmentation intranucléaire de la concentration de spermidine libre devrait être en relation avec une réduction de la quantité de spermidine préalablement liée aux composants macro-moléculaires du noyau.

Si l'on compare la quantité de radioactivité associée d'une part à l'ADN, d'autre part à la "fraction protéines nucléaires" (Tableau 6), aucune différence significative n'apparaît entre les cultures traitées et témoins.

Par contre, si l'on considère l'évolution de la quantité de radioactivité présente dans la "fraction ADN" (Figure 6), il apparaît que la réduction de spermidine liée à l'ADN à 24 et 48 h n'est pas un simple reflet de la dilution isotopique, mais évoque la possibilité d'un transfert physiologique de cette polyamine vers d'autres structures, en particulier des ARN. En effet, (Figure 6) s'il s'agissait d'une simple dilution, la diminution de la radioactivité présente dans la fraction ADN (exprimé en DPM/mcg ADN) devrait être proportionnelle au cours du temps à la quantité d'ADN présente dans les cellules (Figure 6a).

Or, comme nous pouvons le constater dans le cas des cellules témoins (Figure 6b), la réduction de la radioactivité associée à l'ADN n'est pas exactement proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans les cellules. Une certaine quantité de spermidine associée à l'ADN pourrait alors être transmise au cours de la croissance de la cellule, à la fraction ARN par exemple. La quantité de radioactivité associée à la fraction ADN 24 h après le début du traitement par la MHE étant comparable aux mêmes horaires à celle

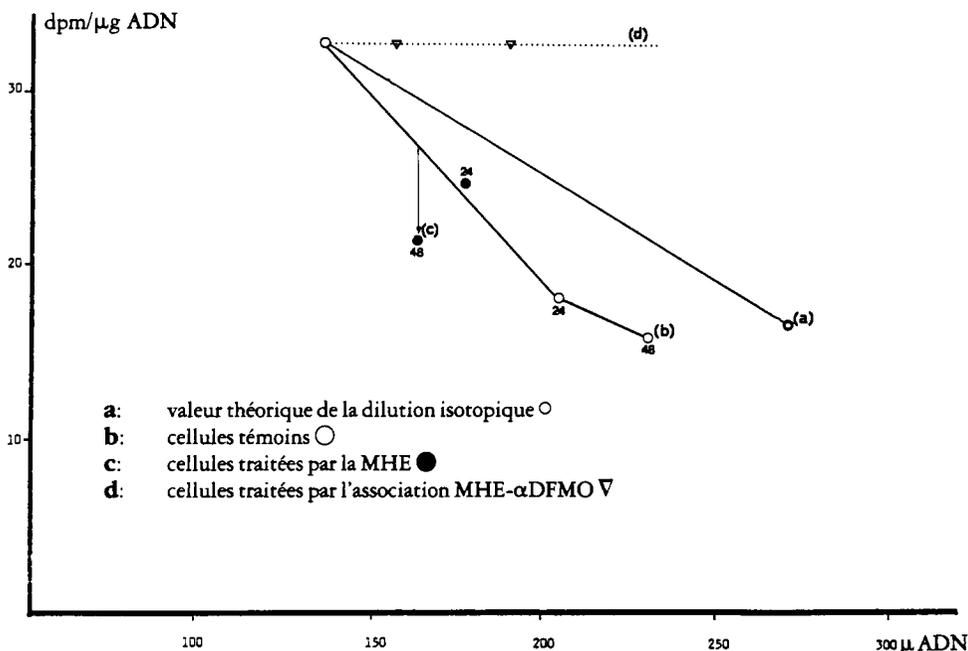


FIGURE 6. La radioactivité présente dans la fraction ADN a été exprimée en dpm/μg d'ADN et représentée en fonction de la quantité d'ADN présent dans les cellules considérées. La droite (a) représente la radioactivité que nous aurions du obtenir pour une replication de l'ADN "semi conservative" pour ses polyamines liées. Une quantité de radioactivité inférieure a été observée dans les cellules témoins (b) et dans des cellules traitées 24 et 48 h par la MHE (c).

des témoins (Figure 6), de la spermidine pourrait avoir été libérée de l'ADN. Cette polyamine étant dans l'incapacité de se fixer au niveau de la fraction ARN, du fait de l'occupation par la MHE de sites communs à ces deux molécules, la concentration de spermidine libre augmenterait dans le noyau des hépatocytes.

En dépit du fait que ces résultats n'excluent pas la possibilité d'un effet direct de la drogue sur la replication du DNA, l'effet cytotatique observé lors du traitement par la MHE pourrait en partie s'expliquer, par une réduction de la quantité de spermidine d'ordinaire associée aux ARN. Bien que présents en concentrations normales (Tableau 7), certains ARN nécessaires à la prolifération cellulaire pourraient, pour des raisons de structure spatiale anormale (26) ou de dégradation accrue (25), ne plus remplir leurs fonctions, comme par exemple la synthèse d'enzymes de réparation de l'ADN, ce qui pourrait expliquer l'accumulation des cassures chromosomiques constatées *in vitro* lors de traitement par la MHE (31,9). Ceci serait en faveur de l'effet cytotatique obtenu.

L'effet cytotatique observé dans le cas des cultures d'hépatocytes cancéreux traités par la MHE n'est pas dû au caractère malin de ces cellules. Nous avons en effet obtenu les mêmes résultats (non présentés dans cette étude) en utilisant des cultures de cellules amniotiques humaines.

Si le mécanisme que nous proposons ici se révélait généralisable à d'autres intercalants, le caractère intercalant d'une drogue pourrait n'être alors qu'une des nombreuses caractéristiques de la molécule considérée et pas nécessairement la plus efficace sur la réduction de la prolifération cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. V. Quemener et J.P. Moulinoux, *J. Nat. Prod.*, **45**, 608 (1982).
2. P. Juret, A. Tanguy, A. Girard, Y.Y. Le Talaer, J.J. Abatucci, N. Dat Xuong, J.B. Le Pecq et C. Paoletti, *La Nouvelle Presse Médicale*, **8**, 1495 (1979).

3. P. Mamont, M.C. Duchesne, S. Grove et P. Bey, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **81**, 58 (1978).
4. A. Raina, J. Jänne, B.S. Hannonen et E. Hölta, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **171**, 697 (1970).
5. D.R. Morris, *The Biochemistry of Disease*, Morris et Marton Eds., 1981, Vol. 8, p. 223.
6. G. Scalabrino et M.E. Ferioli, *Advances in Cancer Research*, **35**, 151 (1981).
7. O. Heby, *Differentiation*, **19**, 1 (1981).
8. T. Oka, J.W. Perry, T. Takemoto, T. Sakai, N. Terada et H. Inone, *Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Caldarella et al. Eds., 1981, p. 309.
9. C. Paoletti, C. Lesca, S. Cros, C. Malvy et C. Auclair, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 345 (1978).
10. N. Sales et E. Puvion, *Eur. J. Cancer.*, **18**, 291 (1982).
11. D.H. Russell, *Nature*, **233**, 144 (1971).
12. J.P. Moulinoux, V. Quemener, J.J. Larzul, M. Le Calve, A.M. Roch, L. Toujas et G.A. Quash, *Int. J. Cancer*, **34**, 277 (1984).
13. J.P. Moulinoux, V. Quemener, M. Le Calve, M. Chatel, F. Menaut, *J. Neurooncology*, **2**, 153 (1984).
14. J.B. Lepecq, C. Gosse, N. Day Xuong et C. Paoletti, *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **281** (d), 1365 (1975).
15. J.B. Lepecq, N. Dat Xuong, C. Gosse et C. Paoletti, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 5078 (1974).
16. A.M. Liquori, L. Costantino et V. Crescenzi, *J. Molec. Biol.*, **24**, 113 (1967).
17. V.A. Bloomfield et R.W. Wilson, *The Biochem. of Disease*, Morris et Marton Eds., 1981, Vol. 8, p. 183.
18. A.D. Mirzabekov et A. Rich, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, U.S.A., **76**, 1118 (1979).
19. D.R. Burton, S. Forsen et P. Reimarsson, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 1219 (1981).
20. J. Deschatrette et M.C. Weiss, *Biochimie*, **56**, 1603 (1974).
21. M.D. Reuber, *J.N.C.I.*, **26**, 891 (1961).
22. F. McCormick, *Biochem. J.*, **174**, 427 (1978).
23. H.N. Münro et A. Fleck, *Methods of Biochemical. Analysis*, Olick Ed., 1966, Vol. 14, p. 113.
24. B.N. Ames et D.I. Dubin, *J. Biol. Chem.*, **235**, 769 (1960).
25. T.P. Karpetsky, P.A. Hieter, S.S. Franck et C.C. Levy, *Molec. Cell. Biochem.*, **17**, 89 (1977).
26. S.S. Cohen, *Advances in Polyamine Research*, Campbell et al. Eds., 1978, Vol. 1, p. 1.
27. U. Raina, A.L. Rappel et S. Chiok, *Biochem. Biophys. Acta*, **138**, 200 (1967).
28. D.H. Russell, B.G.M. Durie, *Progress. in Cancer Research and Therapy.*, **8**, 89 (1978).
29. S. Neidle, *Progress in Medicinal Chemistry*, Ellis et West Eds., 1979, Vol. 16, p. 152.
30. D. Pelaprat, R. Oberlin, I. Leguen, B. Roques et J.B. le Pecq, *J. Med. Chem.*, **23**, 1330 (1980).
31. W.E. Ross, L.A. Zwelling, M.D. et K.W. Kohn, *Int. J. Rad. Oncol.*, **5**, 1221 (1979).

Received 14 May 1984