



HAL
open science

Rôle de l'ornithine décarboxylase dans le processus de cancérogénèse épigénétique : induction et modulation de son activité au cours de la transformation cellulaire

Sophie Robert

► To cite this version:

Sophie Robert. Rôle de l'ornithine décarboxylase dans le processus de cancérogénèse épigénétique : induction et modulation de son activité au cours de la transformation cellulaire. Ecotoxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1991. Français. NNT : 1991METZ003S . tel-01775926

HAL Id: tel-01775926

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775926v1>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

VB 72793

S/M3
91/3
3^{ee}y

Université de Metz

Thèse pour le Doctorat en Sciences

Spécialité : Toxicologie de l'Environnement

présentée par

Sophie ROBERT

| BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ | |
|--------------------------------------|------------|
| N° inv | 1991 006 S |
| Cote | S/M3 91/3 |
| Loc | Magasin |

**Rôle de l'Ornithine Décarboxylase dans le processus
de cancérogénèse épigénétique. Induction et
modulation de son activité au cours de la
transformation cellulaire.**

Soutenue le 19 Avril 1991

Commission d'Examen

Directeur de Recherche

Mr. I. CHOUROULINKOV

Rapporteur

Mme P. VASSEUR

Rapporteur

Mr. J.M. JOUANY

Membre Invité

Mr. G. NGUYEN-BA

The difficulty lies, not in the new ideas, but in escaping the old ones, which ramify, for those brought up as most of us have been, into every corner of our minds.

Rudyard Kipling, 1865-1936

Ce travail a été effectué avec la contribution financière du Ministère de l'Environnement et de l'Association Paul Neumann.

Je témoigne mes remerciements les plus profonds aux responsables de ces deux organismes.

Monsieur le Docteur I. Chouroulinkov, Directeur du Laboratoire de Cancérogénèse Expérimentale et Toxicologie Génétique (CNRS, Villejuif) a accepté de m'accueillir dans son laboratoire et de suivre mon travail. Qu'il trouve ici le témoignage de mon attachement et de ma profonde reconnaissance, pour les conseils avisés qu'il m'a prodigué et surtout pour son optimisme même dans les moments les plus difficiles.

C'est avec grand plaisir que je remercie Madame P. Vasseur, Professeur de Toxicologie et Directeur du Centre des Sciences de l'Environnement, d'avoir accepté d'être mon rapporteur : Vos conseils et vos encouragements m'ont été très précieux tout au long de ces années et je vous remercie sincèrement pour m'avoir donné goût à la Toxicologie.

Trouvez ici l'expression de ma gratitude et de mes amitiés.

Je remercie Monsieur J.M. Jouany, Professeur de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie de Rouen, qui me fait l'honneur et le plaisir de faire parti de ce jury, et d'accepter la charge de rapporteur malgré ces nombreuses responsabilités. Veuillez croire à ma grande reconnaissance.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Docteur G. Nguyen-Ba, Chargé de Recherches au CNRS (Villejuif) pour l'appui tant amical que technique et intellectuel qu'il m'a prodigué au cours de ces deux années passées sur le cas 'ODC'.

Je remercie Madame le Docteur C. Lasne, Chargée de Recherches au CNRS (Villejuif), pour m'avoir initié à la transformation cellulaire, et surtout pour son amitié et ses encouragements quotidiens.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance et mon amitié à

- Madame Monique Maillot qui s'est chargée de la dactylographie. Son dynamisme et sa constante bonne humeur ont facilité la représentation graphique de cette thèse.*
- Monsieur Dominique Mouchy qui a assumé la reprographie de cette thèse, tant sur le plan technique qu'esthétique.*
- Monsieur Jacques Cocquelin pour avoir réalisé de façon très soignée l'ensemble des graphes !*

Enfin, je ne saurais oublier de remercier toute ma famille et ami(e)s, qui de près ou de loin, m'ont soutenu moralement et notamment Carine, Lucia, Rana avec lesquelles nous avons continué à donner vie au 'labo'.

SOMMAIRE

| | Pages |
|--|-------|
| LISTE DES ABREVIATIONS | |
| INTRODUCTION | |
| I - Etude in vivo de la cancérogénèse cutanée : effet du promoteur TPA | |
| 1.1. - La cancérogénèse en 2 phases : Initiation et promotion. | 2 |
| 1.2. - 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate (TPA). | 4 |
| 1.3. - Effets induits par le TPA sur la peau de souris. | 6 |
| II - Les polyamines | 9 |
| III - L'ornithine décarboxylase | |
| 3.1 - Caractéristiques biochimiques. | 11 |
| 3.2 - Effets sur la croissance cellulaire. | 12 |
| 3.3 - Effets sur la différenciation cellulaire. | 12 |
| 3.4 - Caractéristiques de l'ODC au niveau moléculaire. | 14 |
| IV - La transformation cellulaire | 15 |
| MATERIEL ET METHODES | |
| A - MATERIEL | |
| I - Préparation et culture de cellules épithéliales de poumon embryonnaire de rat | |
| 1.1 - Isolement des 2 lignées de cellules épithéliales. | 19 |
| 1.2 - Maintien des cellules en culture. | 21 |

| | |
|---|----|
| II - Isolement et maintien en culture de cellules primaires d'embryons de hamster syrien (SHE) | |
| 2.1 - Obtention des cellules SHE. | 21 |
| 2.2 - Maintien des cellules en culture. | 22 |
| III - Recherche des mycoplasmes | 22 |
| IV - Milieux et tampons | |
| 4.1 - Milieux de culture. | 23 |
| 4.2 - Solution et tampons utilisés pour les 2 types de culture cellulaire. | 23 |
| 4.3 - Le sérum de veau embryonnaire. | 23 |
| V - Les produits chimiques | |
| 5.1 - Le TPA ou ester de phorbol. | 24 |
| 5.2 - Le Benzo(a)pyrène ou BaP. | 24 |
| 5.3 - Les anti-inflammatoires. | |
| 5.3.1 - La dexaméthasone. | 25 |
| 5.3.2 - L'acide nordihydroguaiarétique (NDGA). | 26 |
| 5.3.3 - L'indométacine. | 26 |
| 5.4 - Les inhibiteurs de l'expression et de la traduction génique. | |
| 5.4.1 - L'actinomycine D. | 26 |
| 5.4.2 - La cycloheximide. | 27 |
| 5.5 - Les inhibiteurs de protéases. | |
| 5.5.1 - E64. | 27 |
| 5.5.2 - Aprotinine. | 28 |

B - METHODES

I - Mesure de l'activité ODC

| | |
|---|----|
| 1.1 - Traitement des cellules épithéliales de poumon embryonnaire de rat. | 29 |
| 1.2 - Mise au point du protocole de traitement des cellules SHE. | 29 |
| 1.3 - Mesure de l'activité ODC <i>in vitro</i> . | 30 |

| | |
|--|----|
| II - Essai de transformation cellulaire des SHE | |
| 2.1 - Introduction. | 31 |
| 2.2 - Protocole expérimental. | 31 |
| 2.3 - Choix du milieu utilisé pour le test de transformation. | 32 |
| 2.4 - Mesure de l'activité ODC sur les cellules SHE au cours du test de transformation. | 33 |
| III - Etude de l'interaction des enzymes protéolytiques sur l'activité ODC. | |
| 3.1 - Etude de l'activité des cystéines protéases. | |
| 3.1.1 - Traitement des cellules épithéliales. | 33 |
| 3.1.2 - Dosage biochimique des cathepsines L, B et H. | |
| a) Principe | 34 |
| b) Technique | 35 |
| 3.2 - Etude de l'activité des sérine-protéases. | |
| 3.2.1 - Traitement des cellules Ctr, BPe et SHE. | 35 |
| 3.2.2 - Electrophorèse sur gel de gélatine et révélation de l'activité enzymatique : zymogramme. | |
| a) Principe de l'électrophorèse zonale en tampons discontinus. | 36 |
| b) Technique | 37 |
| IV - Traitement et étude de l'expression du gène ODC | |
| 4.1 - Protocole d'extraction de l'ARN. | 39 |
| 4.2 - Northern-blot. | 40 |
| 4.3 - Hybridation. | 41 |
| 4.4 - Autoradiographie. | 41 |

RESULTATS

1ère Partie : **Etude de l'induction de l'activité ODC par le TPA**

| | |
|--|----|
| 1 - Etude de l'induction de l'activité ODC dans les 2 lignées de cellules épithéliales, Ctr et BPe. | |
| 1.1 - Cinétique d'induction de l'ODC par le TPA. | 43 |
| 1.2 - Modulation de l'ODC par un inhibiteur irréversible, le DFMO. | 45 |

| | |
|--|----|
| 1.3 - Détermination de l'activité ODC après traitement multiple par le TPA. | 47 |
| 1.4 - Action successive du benzo(a)pyrène et du TPA : modèle initiation-promotion. | 48 |
| 1.5 - Induction de l'activité ODC dans les cellules Ctr et BPe synchronisées | 50 |
| 2 - Etude de l'induction de l'activité ODC dans les cellules SHE | |
| 2.1 - Détermination des conditions de culture et de traitement des cellules SHE. | 52 |
| 2.2 - Cinétique d'induction de l'ODC par le TPA. | 54 |
| <u>2ème Partie</u> : Modulation par des substances xénobiotiques de l'activité ODC induite par le TPA | |
| 1 - Modulation de l'activité ODC induite par le TPA | |
| 1 - Action des anti-inflammatoires non stéroïdiens sur les cellules épithéliales. | |
| 1.1. - Indométacine. | 56 |
| 1.2. - NDGA. | 57 |
| 2 - Etude d'un anti-inflammatoire stéroïdien, la dexaméthasone | |
| 2.1 - Effet de la DXME sur l'activité ODC induite dans les cellules épithéliales. | 59 |
| 2.2 - Effet de la DXME sur l'activité ODC induite dans les cellules SHE. | 60 |
| 3 - Effets de l'Actinomycine D et de la cycloheximide sur l'activité ODC induite par le TPA dans les cellules épithéliales. | |
| 3.1 - Etude d'un inhibiteur de la synthèse de l'ARN l'actinomycine D. | 61 |
| 3.2 - Etude d'un inhibiteur de la synthèse protéique, la cycloheximide. | 64 |
| 4 - Action de la Dexaméthasone sur la stabilité de l'ODC cytoplasmique | 68 |

3ème Partie : Etude de l'action des enzymes protéolytiques sur la modulation de l'ODC

- 1 - Dosage biochimique des cathepsines L, B et H, et modulation de l'ODC par un inhibiteur spécifique le E64.** 70
- 2 - Analyse des sérine-protéases par zymogramme et action d'inhibiteurs spécifiques.**
 - 2.1 - Etude de l'effet du TPA et de la dexaméthasone sur les sérine-protéases. 74
 - 2.2 - Etude des inhibiteurs de protéases dans la modulation de l'activité ODC. 79

4ème Partie : Etude moléculaire de l'expression du gène codant pour l'ODC.

- 1 - Induction de l'ODC-ARN messenger dans les cellules épithéliales.** 83
- 2 - Induction de l'ODC-ARNm dans les cellules embryonnaires de hamster syrien (SHE).** 84
- 3 - Etude de l'expression du gène ODC après traitement par un inhibiteur de sérine-protéases, l'Aprotinine.** 85

5ème Partie : Cinétique de l'activité ODC au cours de la transformation cellulaire

- 1 - Induction de l'ODC et sensibilité des cellules SHE au TPA.** 91
 - 2 - Recherche de l'activité ODC au cours des différentes étapes de la transformation cellulaire.** 92
- DISCUSSION 95
- CONCLUSION 107
- BIBLIOGRAPHIE 108
- ANNEXES 119

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|-----------------|---|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ARN | Acide ribonucléique |
| BaP | Benzo(a)pyrène |
| Bp | paire de bases |
| BSA | Sérum albumine bovine |
| CDTA | Trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N' tétraacétique acide |
| DFMO | α -difluorométhylornithine |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| DPM | Désintégration par minute |
| DTT | Dithiothreitol |
| DXME | Déxaméthasone |
| EDTA | Sel de sodium de l'acide éthylène diaminotétracétique |
| Hoeschst 33258 | Trichlorure 2-[2-(4-hydroxyphényl)-6-benzimidazole] -6-(1-méthyl-4-piperazyl)-benzimidazole. |
| Kbq | kilobecquerel |
| ODC | Ornithine décarboxylase |
| PA | Polyamines |
| PBS | Phosphate buffered saline = tampon phosphate |
| PCA | Acide perchlorique |
| PHA | Hydrocarbure polycyclique aromatique |
| PKC | Protéine Kinase C |
| rpm | Rotation par minute |
| SDS | Sodium dodecyl hydrogénosulfate |
| SEV | Sérum embryonnaire de veau |
| SSC | Standard saline citrate (tampon citrate de sodium) |
| TCA | Acide trichloracétique |
| TPA | 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate |
| Z-phe-Arg NHMec | Benzyloxycarbonyl-L-Phe-L-Arg-7-(4-méthyl) coumaryl-amide |
| Z-Arg-Arg NHMec | Benzyloxycarbonyl-L-Arg-L-Arg-7-(4-méthyl) coumaryl-amide |

INTRODUCTION

La production sans cesse croissante de produits chimiques à usages industriel, alimentaire et thérapeutique pose avec acuité le problème de la pollution de l'environnement et surtout de leur incidence sur la santé de l'homme. De très nombreuses études ont été mises en oeuvre pour déterminer la toxicité de ces produits chimiques et détecter leur éventuel pouvoir mutagène et cancérigène. Alors que la compréhension du mécanisme d'action des cancérigènes génotoxiques a bien progressé à l'aide des nombreux tests de mutagenèse, peu de données existent sur l'action des cancérigènes non génotoxiques. Ces substances agiraient de façon indirecte sur l'ADN, mais des perturbations au niveau cytoplasmique et membranaire seraient primordiales. Actuellement, il existe peu de méthodes à court terme pour détecter et répertorier de façon rigoureuse ces cancérigènes et il est impossible de savoir si ces substances peuvent représenter une source de danger potentiel pour la santé humaine.

Une des principales modifications biochimiques intervenant dans le processus épigénétique de la cancérogenèse est l'action des substances non génotoxiques sur les polyamines. Ces molécules jouent un rôle fondamental dans la croissance et la différenciation cellulaire, et leur biosynthèse est contrôlée par une enzyme-clé, l'ornithine décarboxylase (ODC). L'application topique de l'ester de phorbol (TPA) cancérogène épigénétique, entraîne régulièrement sur la peau de souris : réaction inflammatoire dermique et stimulation de l'ODC dans les cellules cibles épidermiques et à plus long terme formation de tumeurs. Il est également démontré que l'ODC épidermique est modulé par des substances tels que des anti-inflammatoires et le traitement par de tels composés inhibe la formation tumorale.

L'ornithine décarboxylase a donc été considérée comme un marqueur biochimique de la transformation tumorale des cellules cibles. Mais son mécanisme d'induction par le cancérogène TPA et surtout sa modulation par des substances xénobiotiques nécessitent encore des études plus approfondies.

En contre-partie, une meilleure compréhension du mécanisme d'action du TPA pourrait aider à la mise au point de tests biochimiques permettant de détecter les cancérigènes épigénétiques de notre environnement.

Pour mieux connaître le mécanisme d'action spécifique de l'ester de phorbol sur les cellules cibles en dehors de toute interaction des cellules environnantes, nous avons étudié ce mécanisme sur des modèles *in vitro* constitués par des cellules épithéliales et des cellules de type fibroblastique, proches de l'état normal ainsi qu'à différentes étapes de transformation.

Sur ces modèles, nous avons déterminé les modifications survenant dans l'induction de l'ornithine décarboxylase intra-cellulaire. Une part importante du travail sera consacrée à l'étude de la régulation de l'ODC tant au niveau génomique que cytoplasmique.

I - ETUDE IN VIVO DE LA CANCEROGENESE CUTANEE : EFFET DU PROMOTEUR TPA.

1.1 - La cancérogénèse en deux phases : Initiation et Promotion

La première relation entre une substance chimique et le développement d'une tumeur fut rapportée en 1775 par un médecin londonien sir Perceval Pott qui a signalé la fréquence du cancer du scrotum chez les ramoneurs. C'était le premier cancer professionnel et le premier cancer à cause chimique. En effet le développement de ce cancer était attribué à l'irritation de la région par des vêtements imprégnés de suie et de goudron (Redmond, D.E., 1970). Plus tard, de nouveaux cas de cancers cutanés furent signalés chez les ouvriers manipulant le goudron de houille, l'huile de paraffine ainsi que l'huile de coupe dans plusieurs régions de France (Thony, C. et Thony, J., 1970).

Ces observations de cancers cutanés chimio-induits ne furent confirmées qu'au début du siècle par les premières expérimentations de cancérogénèse animale réalisées par Yamagiwa et Ichikawa (1915) qui réussirent à induire des tumeurs en badigeonnant les oreilles de lapin avec du goudron de houille. Ces études furent poursuivies par Kennaway et son école en 1924 qui isolèrent la partie la plus active du goudron de houille : les hydrocarbures polycycliques aromatiques (PHA). Cette équipe identifia et synthétisa le composé le plus actif, le benzo(a)pyrène, produit très largement utilisé depuis dans les études fondamentales de cancérogénèse chimique.

Un des faits importants liés à la cancérogénèse cutanée expérimentale est le concept de la cancérisation en 2 étapes. L'existence de ces 2 phases fut mise en évidence par les expériences de Deelman (1923), qui consistaient à traiter par du goudron de houille la peau de souris préalablement lésée par scarification. Il constata que les tumeurs cutanées se développaient de préférence autour ou sur les cicatrices. En 1939 Twort, J.M. and Twort, C.C., réussirent à induire des tumeurs avec l'acide oléique sur la peau de souris prétraitées avec du benzo(a)pyrène (BaP). Ces résultats furent confirmés sur le lapin et la souris par d'autres auteurs qui ont appliqué dans une première phase le BaP, suivi dans une seconde phase plus longue par du BaP ou du goudron de houille ou enfin, par de l'huile de croton (Berenblum., 1941 ; Rous et Kid., 1941). D'autres études de cancérogénèse en deux

étapes furent également réalisées sur d'autres tissus notamment le foie, la thyroïde ou la vessie de rat (Chouroulinkov., 1978). Friedwald et Rous (1944) postulèrent que "la cancérogénèse se compose d'un processus d'initiation, responsable de la conversion des cellules normales en cellules tumorales latentes et d'un processus de promotion par lequel ces cellules tumorales latentes se développent en tumeur".

Mais le concept de la cancérogénèse chimique en 2 phases fut décrit par Berenblum en 1941. Il montra qu'un traitement séquentiel de la peau de souris avec du BaP (à faible et unique dose) et de l'huile de croton (en traitement répétitif) produisait une forte augmentation des tumeurs cutanées et un raccourcissement du délai d'apparition, alors que les deux produits seuls étaient peu actifs. Cette conception de la cancérogénèse chimique en 2 phases en fonction du temps d'application peut être schématisée dans le tableau ci-dessous :

| Initiation | Promotion | | Initiation | Résultats |
|------------|-----------|---------|------------|-----------|
| | immédiate | tardive | | |
| + | - | | - | - |
| + | **** | | - | tumeurs |
| + | | **** | - | tumeurs |
| - | **** | | - | - |
| - | **** | | + | - |

+ : initiation par le benzo(a)pyrène à une dose trop faible pour induire des tumeurs.

* : promotion (huile de croton) : applications multiples à long terme.

Selon ce schéma, il est nécessaire que la promotion suive l'initiation, des tumeurs pouvant être obtenues même si la promotion a lieu plusieurs mois après l'initiation.

Les propriétés des initiateurs et des promoteurs ont été inventoriées comme suit :

| | <u>Initiateurs</u> | <u>Promoteurs</u> |
|------------------|----------------------------------|--|
| - peuvent être : | - cancérogènes à forte dose | - non cancérogènes |
| - sont : | - mutagènes | - non mutagènes |
| | - une application unique | - applications multiples et à long terme |
| | - pas de dose seuil | - dose seuil probable |
| | - forment des adduits avec l'ADN | - ne forment pas d'adduits avec l'ADN |
| | - effet génotoxique | - effet non génotoxique |

- Les initiateurs (tels que BaP, DMBA, uréthane) induisent des lésions cellulaires permanentes, additives, non détectables phénotypiquement, et transmissibles d'une cellule à l'autre. La théorie classique veut que l'initiation soit la création d'une lésion primaire au niveau moléculaire et de façon irréversible, c'est-à-dire que l'initiation est liée à l'action génétoxique des agents (effets non exprimés mais transmissibles) (Chouroulinkov., 1978).

- Les promoteurs : (tels que le TPA, l'huile de croton, l'acide iodoacétique, l'anthraline, l'acide laurique...), sont des substances qui par leur action prolongée, contribuent à l'expression de l'état initié des cellules sous forme de tumeurs visibles. La réversibilité du phénomène est fortement dépendante de la dose et de la fréquence du traitement (Chouroulinkov et al., 1989). Les promoteurs sont des agents non génotoxiques.

Ce concept d'initiation-promotion de la cancérogénèse chimique a prédominé pendant plusieurs années ; avec les progrès réalisés dans les domaines de la biochimie et de la biologie moléculaire, une autre conception du mécanisme de la cancérogénèse est apparue, notamment pour comprendre le mécanisme d'induction des tumeurs par des substances chimiques non génotoxiques.

Des études récentes ont clairement démontré que des composés mutagènes n'ont pas toujours d'effet initiateur et ne favorisent pas la cancérogénèse cutanée en 2 phases (Chouroulinkov., 1990). En sens inverse, des substances classées auparavant dans les promoteurs peuvent induire à elles seules, la formation de papillomes et d'épithéliomas. Ces substances cancérogènes ne provoquent pas directement d'altérations sur l'ADN susceptibles d'entraîner des modifications génétiques de la cellule. Leur action pourrait s'exercer sur la membrane et le cytoplasme cellulaire autant au niveau des cellules cibles qu'à l'encontre de certaines catégories de cellules environnantes (Nguyen-Ba et al., 1988), c'est-à-dire qu'elles exerceraient leurs effets par l'intermédiaire d'un mécanisme épigénétique (Weisburger et Williams., 1982 ; Weinstein., 1988). Ceci devrait entraîner par la suite une perturbation importante du fonctionnement des gènes, soit par stimulation, répression ou dérégulation.

Parmi les substances cancérogènes non génotoxiques, un ester de phorbol, le 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate ou TPA, a été celui le plus utilisé pour l'étude du mécanisme épigénétique de la cancérogénèse.

1.2 - 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate (TPA).

A partir de l'essence de croton, extraite des graines de *Croton tiglium* (Euphorbiacée), Flaschentrager (1930) isole un composé de formule $C_{20}H_{28}O_6$, renfermant un noyau diterpène cyclique et des groupements hydroxydes qu'il a appelé phorbol. Alors que le phorbol lui-même est inactif, ses diesters possèdent un

pouvoir cancérigène. Parmi ceux-ci, le plus actif est le 12-0-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate ou TPA, formé par estérification de l'hydroxyle en 12 par l'acide myristique et de l'hydroxyle en 13 par l'acide acétique (figure 1).

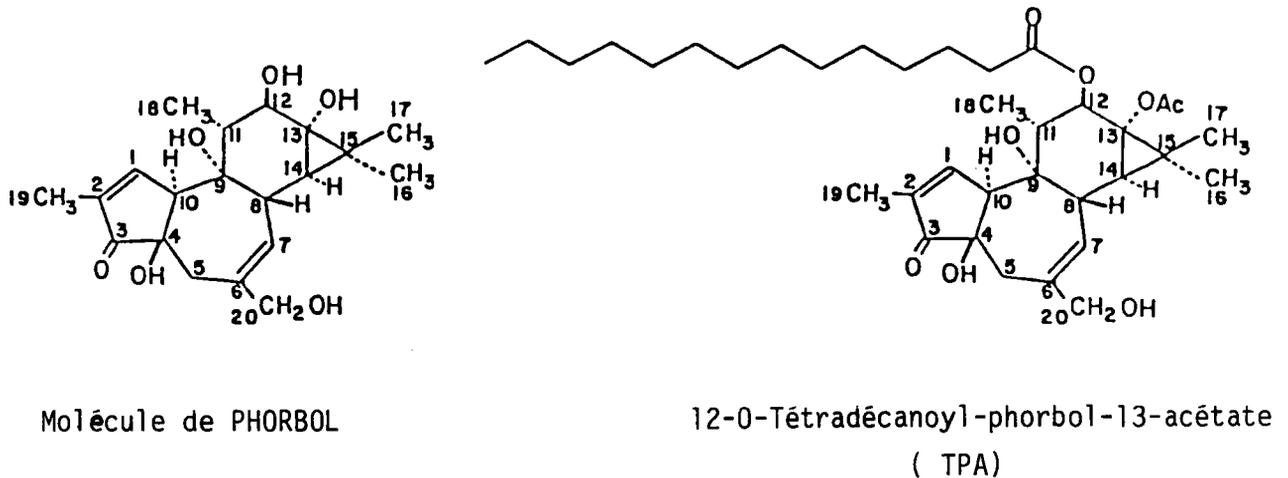


Figure n°1

Le TPA n'a pas d'effet mutagène (négatif par le test d'Ames, Weinstein., 1980) mais a une action irritante sur la peau. Il peut être un cancérigène complet, car il induit des tumeurs malignes chez la souris (Chouroulinkov et Lazar., 1974).

Certaines modifications structurales, telles qu'une liaison éther en 13, un radical déoxy ou chloro en 20, l'ouverture du noyau cyclopropane, le passage en configuration alpha de l'hydroxyle en 4 ou la méthylation de ce dernier, diminuent considérablement l'activité cancérigène des diesters de phorbol (Rochette-Egly., 1978).

A partir de ce modèle simplifié d'induction de tumeurs cutanées *in vivo*, se sont développées toutes les méthodes multidisciplinaires ayant pour objectif commun la compréhension du mécanisme d'induction du cancer par des substances chimiques. Ce sont les études anatomopathologiques, la recherche des modifications biochimiques notamment dans les fonctions enzymatiques du cytoplasme, et plus récemment avec le développement de la biologie moléculaire, le fonctionnement et l'expression des gènes dans le noyau.

Bien que les mécanismes exacts de la cancérigénèse par les esters de phorbol ne soient pas encore connus, des réponses spécifiquement cellulaires et biochimiques (Di Giovanni et al., 1988) ont pu être associées avec leur action tumorigène sur la peau de souris. On a pu entre autre observer des altérations au

niveau de la membrane plasmique, l'induction de nombreuses protéines enzymatiques telle que la protéine kinase C, l'ornithine décarboxylase en relation avec la synthèse des polyamines ou bien l'induction de différentes activités protéasiques (Tableau 1).

TABLEAU 1 : Effets épigénétiques des cancérrogènes de type promoteur (Chouroulinkov., 1987).

- * **Effets morpho-pathologiques** :
 - irritation (réaction inflammatoire)
 - hyperplasie épidermique
 - Tumeurs bénignes
 - Tumeurs malignes

- * **Effets biochimiques sur** :

| | | |
|--|---|---------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> - Synthèse des polyamines - Synthèse ADN, ARN et protéines - Synthèse des phospholipides membranaires - Synthèse des médiateurs inflammatoires (prostaglandines) | } | Stimulation |
| <ul style="list-style-type: none"> - Formation probable de radicaux libres ou d'oxygène actif | | |
| <ul style="list-style-type: none"> - Activités enzymatiques <ul style="list-style-type: none"> . Protéine Kinase C . Ornithine décarboxylase . Phospholipase A₂ . Protéases . Superoxyde dismutase (SOD) . Catalase | } | Stimulation de l'activité |
| | } | Diminution |

- * Amplification ou inhibition des gènes
- * Activation des gènes "silencieux"
- * Altérations de la structure et des fonctions membranaires
 - Communication cellulaire
 - perméabilité
 - transport etc...

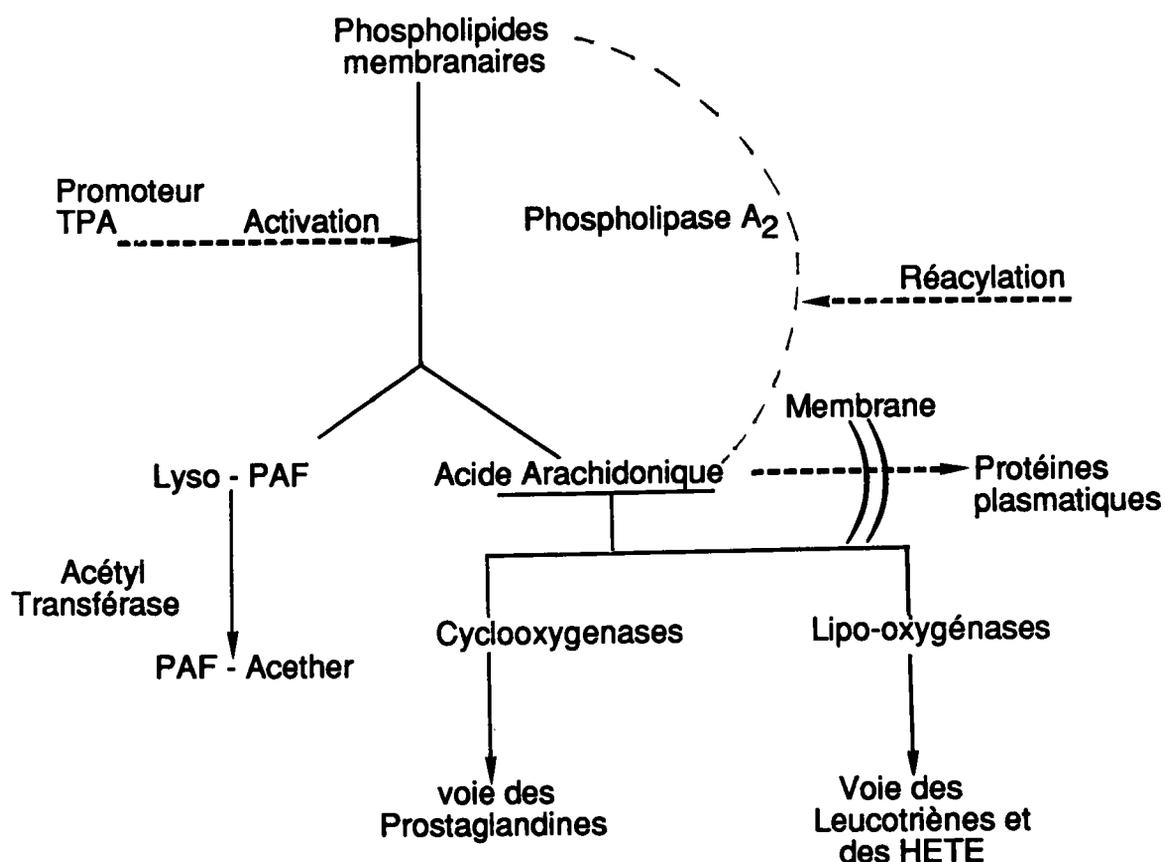
1.3 - Effets induits par le TPA sur la peau de souris.

L'application topique de TPA sur la peau de souris provoque rapidement une réaction inflammatoire (essentiellement localisée dans le derme), une stimulation de l'activité ornithine décarboxylase suivie par une augmentation du taux des

polyamines et après un court délai, l'apparition d'une hyperplasie par multiplication active des cellules épidermiques (Sasakawa et al., 1985 ; Weinstein., 1988).

La réaction inflammatoire est caractérisée par une infiltration oedémateuse, l'apparition de leucocytes dans les vaisseaux congestionnés et l'infiltration de polynucléaires dans le tissu conjonctif. Une des principales manifestations du TPA sur les membranes cellulaires est l'activation du métabolisme des phospholipides. Les phospholipides interviennent au niveau des propriétés physico-chimiques des membranes cellulaires ; ils sont également les précurseurs de nombreux messagers intra et inter-cellulaires qui sont impliqués dans des phénomènes aussi différents que la réponse aux stimulations hormonales, l'inflammation et l'agrégation plaquettaire (Béréziat et al., 1988) (Figure 2).

Figure 2 : Mobilisation et métabolisme de l'acide arachidonique.
Effet stimulant du TPA



Le TPA provoque un relargage de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires (Weinstein., 1980). L'activation de la phospholipase A_2 (PLA_2) (EC-3-1-1-4) par le TPA, conduit à l'hydrolyse de la liaison ester en position 2 du

phosphoglycéride. Ceci entraîne une cascade de réactions enzymatiques conduisant à la synthèse des acides gras médiateurs de l'inflammation (Weinstein., 1980 ; Dodet., 1989). Schématiquement, ce sont :

- les prostaglandines, par la voie des cyclooxygénases : les prostaglandines affectent plusieurs enzymes-clé, telles que les ATPases, protéine-kinases, cyclases et phosphodiesterases. Les prostaglandines pourraient exercer une fonction régulatrice sur la croissance épithéliale, la kératinisation et stimuler la formation de collagène (Nguyen-Ba et al., 1988).

- les leucotriènes par la voie des lipoxygénases : les leucotriènes sont impliqués dans les réactions allergiques. Le mélange de leucotriènes (C₄, D₄, E₄) est connu en allergologie sous le nom de "Slow Reacting Substance of Anaphylaxis" (SRS-A) qui provoque une constriction importante et durable des voies respiratoires (Flower, R., 1979).

Il existe une troisième voie de biosynthèse des médiateurs lipidiques de l'inflammation, qui aboutit au PAF ou Platelet Activating Factor.

Des études antérieures ont également montré que la proportion de tumeurs pouvait diminuer sur des souris traitées à long terme par du TPA quand un anti-inflammatoire (ex : dexaméthasone) était associé au traitement (Belman et Troll., 1972 ; Nguyen-Ba et al., 1989). A court-terme, en parallèle avec cette inhibition de l'inflammation dermique, les auteurs ont observé une diminution de l'activité ODC dans le compartiment épidermique.

Une série d'études a été réalisée dans notre laboratoire pour tenter de corrélérer l'intensité de l'inflammation dûe au TPA et la stimulation de l'activité ODC dans les cellules épidermiques : les effets de différents inhibiteurs sur la synthèse des facteurs inflammatoires ont été étudiés.

Les résultats ont montré clairement que :

- l'inhibition de l'inflammation dermique conduit également à une baisse de l'activité ODC (Nguyen-Ba et al., 1988) c'est-à-dire que l'emploi d'inhibiteurs spécifiques de la synthèse des facteurs inflammatoires a une conséquence directe sur la réponse des cellules épidermiques.

- l'efficacité protectrice des anti-inflammatoires étudiés (dexaméthasone, indométacine, NDGA (cf. chapitre Matériel et Méthodes) est fonction du stade de prolifération cellulaire.

Les événements qui corrèlent le mieux l'action promotrice du TPA sur la peau de souris sont donc : l'induction de l'hyperplasie épidermique, la réponse inflammatoire dans le derme et l'induction de l'activité ODC dans l'épiderme suivie par une augmentation de la synthèse des polyamines. Après induction de l'activité ODC dans les cellules, une élévation du taux de putrescine se produit suivie par une augmentation de la synthèse de l'ADN correspondant à une augmentation de l'index

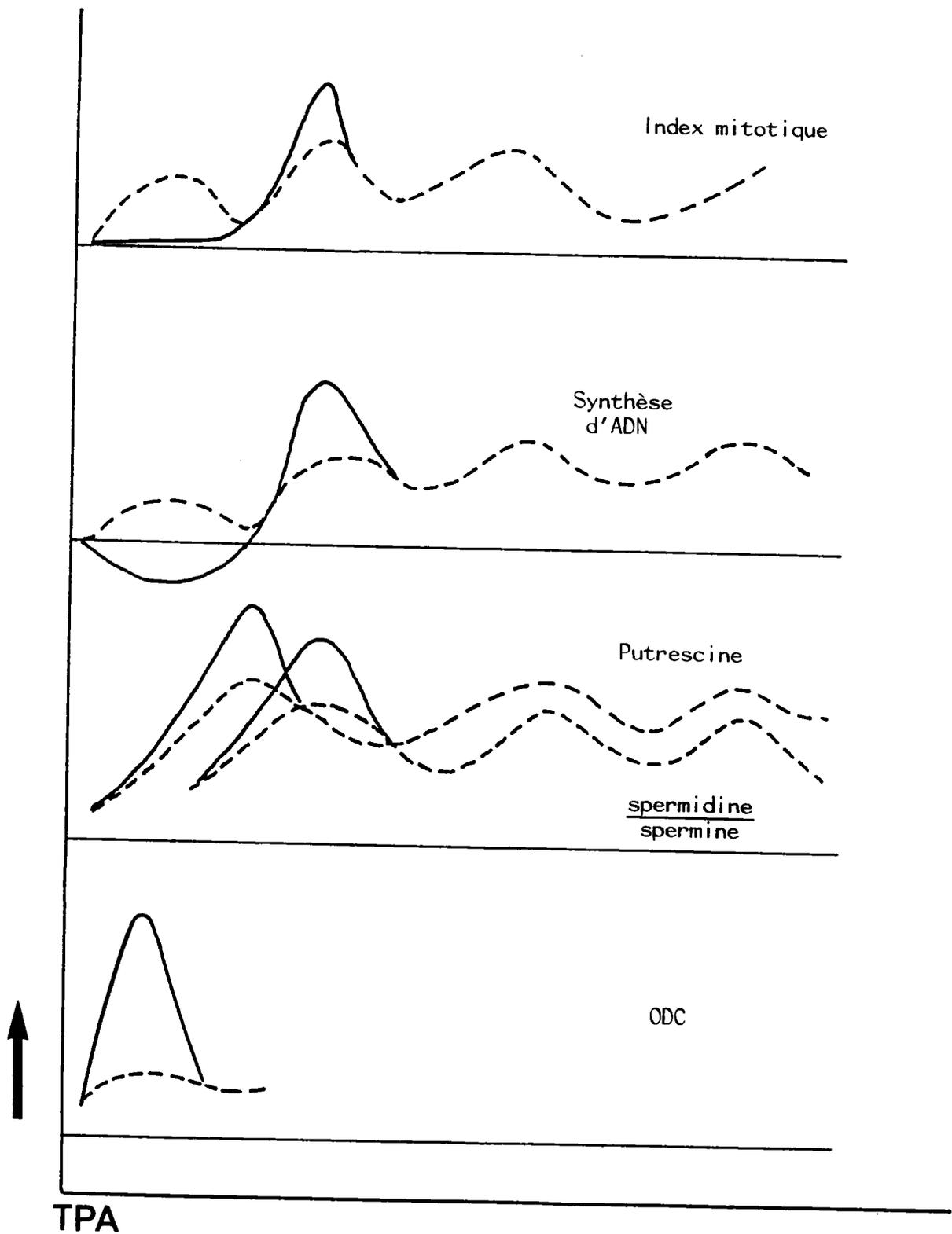


Figure 3 - Séquences d'action du TPA dans les cellules épidermiques après induction de l'ODC. (D'après Astrup et Boutwell, 1982).

- (-----) Epiderme normal
- (——) Epiderme traité par le TPA

mitotique (figure 3). L'étude de l'induction de l'activité ODC est donc importante, elle peut être considérée comme un événement essentiel de la promotion tumorale sur la peau de souris (Sasakawa et al., 1985).

II - LES POLYAMINES (PA).

Les polyamines sont des molécules aliphatiques non protéiques, polycationiques, largement distribuées dans tous les organismes vivants (bactéries, virus, levures, plantes supérieures et animaux), (Scalabrino et Férioli, 1981). La majeure partie de leurs effets pourrait être due à leur nature polybasique : celle-ci leur confère une forte affinité pour tous les composés et structures cellulaires à charges négatives (Jänne et al., 1978).

Les principaux précurseurs des polyamines sont la L-ornithine et la S-adénosyl-L-méthionine (Figure 4). Il existe également des voies secondaires pouvant mener à leur formation, notamment l'hydrolyse de la L-arginine conduisant à la formation de L-ornithine et d'urée (Heby, 1981 ; Scalabrino et Férioli., 1981). La putrescine, précurseur de la spermidine et de la spermine est formée par décarboxylation directe de la L-ornithine. Cette réaction est catalysée par l'ornithine décarboxylase, (EC : 4-1-1-17 ou ODC) qui constitue l'enzyme-clé dans le contrôle de la synthèse des polyamines.

Généralement les procaryotes ont un taux plus élevé en putrescine qu'en spermidine et une absence de spermine. Les eucaryotes par contre, possèdent de fortes concentrations en spermidine et spermine, mais peu de putrescine (Heby, 1981). Les polyamines jouent un rôle important dans la croissance et la différenciation cellulaire et une interférence dans leur biosynthèse peut perturber le stade de différenciation (Heby., 1981). Ainsi des corrélations entre les mécanismes d'action des PA *in vitro* / *in vivo* ont pu être réalisées. Des déplétions complètes en PA ont été obtenues sur des procaryotes (*E. Coli*) et plus difficilement sur eucaryotes (uniquement sur les plus inférieurs : ascomycetes, *Aspergillus nidulans* et *Neurospora crasse* et levures, *Saccharomyces cerevisiae*). Tous ces micro-organismes nécessitaient des PA à un taux normal pour croître (Heby., 1981). Une autre série d'expériences réalisées par l'équipe d'Oka (Pegg and Coll., 1982) a montré que la spermidine était nécessaire pour la synthèse des protéines du lait (caséine et alpha-lactalbumine) dans une culture de glandes mammaires. D'autres études (Williams-Asham., 1972 ; Jänne et al., 1978) ont montré que le développement post-natal et le vieillissement semblent être caractérisés par une diminution graduelle de l'activité des enzymes impliquées dans la biosynthèse des PA. Ces changements se reflètent dans le rapport molaire spermidine/spermine dont le taux élevé est indicateur d'un tissu en pleine croissance, quelles que soient les causes de celle-ci.

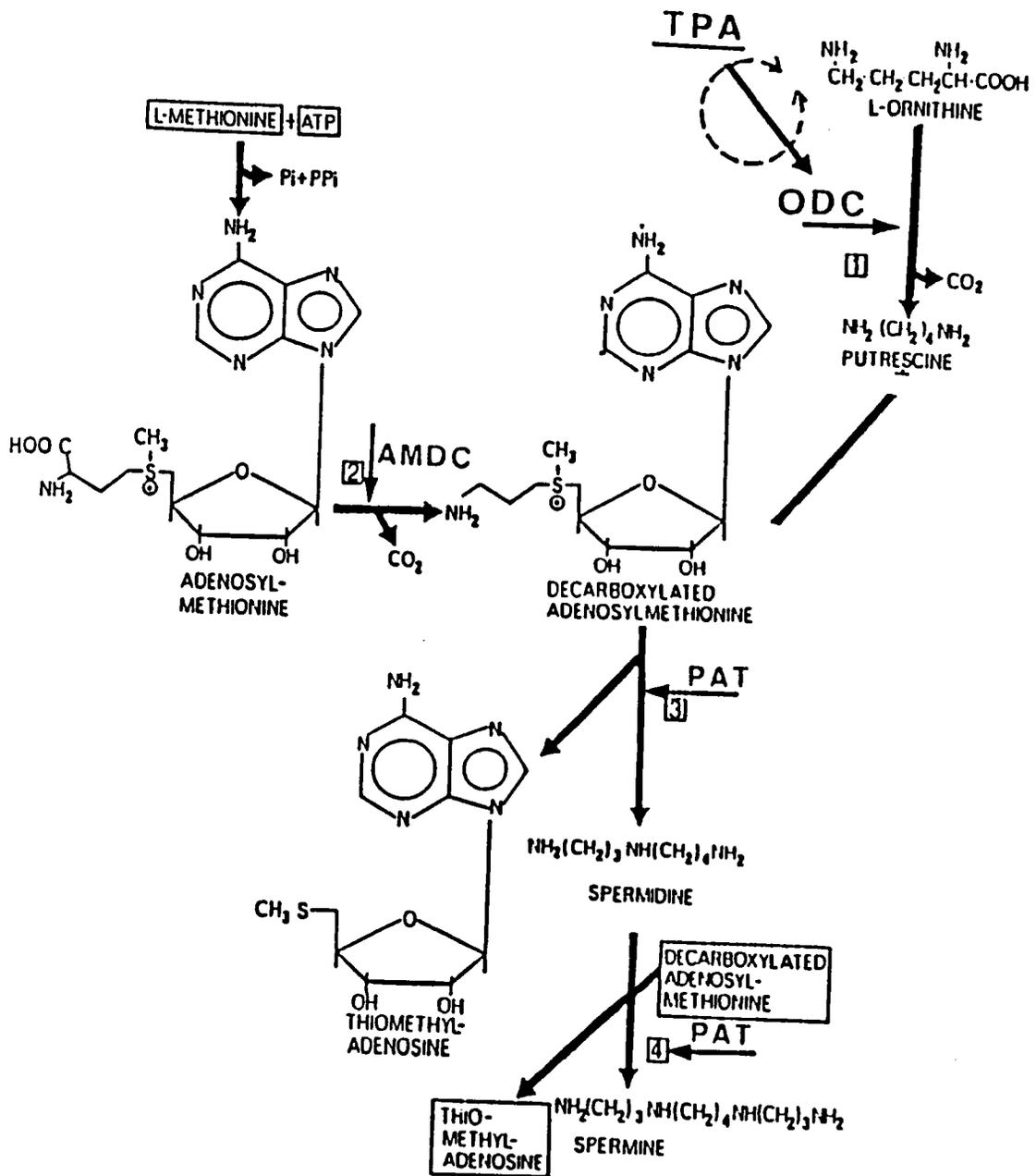


Figure 4 - Représentation du point d'action du TPA dans la chaîne de biosynthèse des polyamines.

Les premières corrélations effectuées entre la synthèse et l'accumulation des PA dans les cellules néoplasiques et la cancérogénèse furent établies dans des cellules de carcinomes d'ascite d'Erlich se développant dans la cavité péritonéale de souris (Jänne et al., 1978). Des modifications *in vivo* et *in vitro* du métabolisme des polyamines ont également pu être mises en évidence dans des tissus par l'action de cancérogènes chimiques (Scalabrino et Férioli., 1981 ; Nguyen-Ba et al., 1988).

Le fait que le taux de polyamines augmente de façon significative dans les cas de tumeurs a conduit à une recherche importante dans ce domaine pour tenter d'utiliser ces molécules comme marqueurs biochimiques d'un bouleversement de la croissance cellulaire. Mais les polyamines sont difficilement utilisables pour un test de détection car leur taux est aussi élevé dans certains tissus normaux (moelle osseuse, muqueuse intestinale, pancréas....) et la contribution des tissus néoplasiques au pool total des polyamines serait trop faible pour permettre une détection précoce d'un cancer (Jänne et al., 1978). C'est dans le but d'une élucidation des mécanismes de régulation de la synthèse des polyamines que l'étude de l'ornithine décarboxylase (ODC) enzyme-clé dans cette biosynthèse, a été retenue.

L'élucidation des mécanismes de la stimulation de l'activité ODC et de sa modulation intracellulaire est extrêmement importante, non seulement pour comprendre cette régulation de la biosynthèse des polyamines, mais également pour obtenir des informations fondamentales sur l'initiation des mécanismes de multiplication cellulaire normale et pathologique.

III - L'ORNITHINE DECARBOXYLASE (ODC)

L'ornithine décarboxylase (ODC ; EC 4-1-1-17) catalysant la formation de putrescine apparaît comme l'enzyme-clé dans la biosynthèse des polyamines. Cette enzyme a été largement étudiée depuis 1968, date à laquelle 2 laboratoires américains démontraient son activité dans le foie de rat, et surtout la rapide induction de son activité après hépatectomie partielle (Jänne., J. 1988).

La seconde grande découverte fut réalisée par Russel et Snyder en 1969 (Scalabrino et Férioli., 1981 ; Jänne et Alhonen-Hongisto., 1988) qui trouvèrent que l'enzyme possédait une demie-vie extrêmement courte, de 10-30 minutes. Dans la plupart des tissus, l'induction de l'activité ODC par des agents exogènes devrait correspondre non pas à une activation enzymatique mais surtout à une synthèse accrue de la protéine enzymatique.

Dans le domaine de la cancérologie expérimentale, après application d'agents tumoraux comme le TPA sur la peau de souris, une des premières réponses

biochimiques est une forte augmentation du taux d'ODC, suivi par l'accumulation des polyamines dans les cellules épidermiques (Astrup et al., 1982 ; Coffino et al., 1988 ; Nguyen-Ba et al., 1988). Par la suite, des études *in vivo* ont démontré que l'induction de l'ODC était un des événements essentiels dans les processus de promotion tumorale ; deux types d'expériences ont notamment été réalisés en utilisant des analogues du TPA et/ou des concentrations variables de TPA. Une corrélation a pu ainsi être établie entre l'induction de l'activité ODC et l'incidence des tumeurs (Magun et al., 1982 ; Takigawa et al., 1985).

L'ODC devient ainsi le sujet de nombreuses recherches tant biochimiques que moléculaires, par son implication dans la synthèse des polyamines, dans les processus de croissance et de différenciation cellulaire, et aussi par son importance dans les maladies hyperprolifératives.

3.1. - Caractéristiques biochimiques

L'Ornithine décarboxylase présente une activité spécifique pour le substrat L-ornithine. Comme la plupart des enzymes décarboxylases, l'activité ODC nécessite la présence de phosphate de pyridoxal comme cofacteur, mais également l'apport des groupements thiols tel que le dithiothréitol ; en l'absence de ces composés, l'enzyme peut se polymériser et perdre toute activité (Scalabrino et Férioli., 1981 ; Pegg, A.E., 1988).

L'ODC a été isolé à partir de nombreux microorganismes, de foie de rat, de veau et également de rein de rat et de souris traités par des androgènes (Morgan, D.M.L., 1987 ; Van Kranen et al., 1987). A partir de foie de rat, Kitani et Fujisawa (1983) ont purifié l'ODC et montré que l'enzyme peut exister sous deux formes : un polymère à 145 000 d ou un monomère à 54 000 d selon une faible ou une forte concentration saline, en fonction du protocole d'extraction.

Le point isoélectrique est à pH 5.7 en présence de 8 M d'urée ; le pH optimal pour l'activité se situe autour de la neutralité ; la constante de Michaelis pour la L-ornithine est approximativement $K_m = 6.10^{-5}$ M.

L'ODC est une enzyme largement distribuée dans tous les tissus de mammifères, l'activité basale est relativement faible avec peut-être une exception pour la prostate (Scalabrino et Férioli., 1981). La plus grande partie de son activité est localisée dans le cytosol, et seule une faible fraction peut être détectée dans certains organites cellulaires et dans le noyau (Morgan, D.M.L., 1987).

Dans la plupart des organes adultes étudiés, l'activité ODC a pu être modulée *in vivo* par de nombreux stimuli tels que les hormones (Scalabrino et Férioli., 1981 ; Nguyen-Ba et al., 1988) ; lorsque la dexaméthasone (stéroïde de synthèse) est appliquée sur la peau de souris préalablement traitée par le TPA, nous observons à la fois une inhibition de la réaction inflammatoire dans le derme et une inhibition de

l'ODC épidermique (Nguyen-Ba et al., 1989). Très fréquemment, des évènements similaires ont été ainsi obtenus avec des agents non-hormonaux stimulant la croissance et/ou la différenciation cellulaires.

L'induction de l'ODC intracellulaire par des facteurs de croissance a pu être confirmée *in vitro*. Une stimulation de l'activité ODC peut-être obtenue par addition croissante de sérum dans le milieu (Nguyen-Ba et al., 1991), ou par renouvellement du milieu (Gilmour et O'Brien., 1985).

De nombreuses expériences ont donc été réalisées par la suite pour déterminer et évaluer les conséquences biologiques d'une inhibition de l'ornithine décarboxylase.

3.2. - Effets sur la croissance cellulaire.

L'emploi d'un inhibiteur (substrat-suicide) de l'ODC, l' α -difluoro-méthyl-ornithine (DFMO) et plus récemment du (2R, 5R)-6-heptyne-2,5-diamine (RR - MAP) (Jänne et al., 1988 ; Kahana, C., 1988), a permis de déterminer les relations existant entre le taux de polyamines intracellulaires et la croissance cellulaire. Il est apparu que les cellules pouvaient survivre à une déplétion en polyamines jusqu'à un certain seuil, sans toutefois se diviser.

Diverses expériences ont montré que les additions de 0.2, 0.5, 1 et 2 % de DFMO dans l'eau de boisson de souris une journée avant l'application topique de TPA (10 nmoles), inhibent l'induction de l'activité ODC de 90 à 97 %. Dans les mêmes conditions, les taux de putrescine et de spermidine retombent au taux basal (Takigawa et al., 1985).

3.3. - Effets sur la différenciation cellulaire.

De nombreux auteurs ont suggéré l'action possible des polyamines dans les mécanismes de différenciation. Il est assez difficile du point de vue expérimental d'établir une corrélation de cause à effet entre le taux de polyamines et l'initiation de la différenciation cellulaire; De nombreux modèles expérimentaux ont été élaborés, en se basant principalement sur les conséquences de l'inhibition de l'ODC par différents agents. Il est apparu qu'il y avait des réponses différentes selon les types cellulaires étudiés *in vitro* :

- Généralement l'inhibition de synthèse des polyamines se traduit par une inhibition de la différenciation ; avec la lignée cellulaire 3T3-L1, le maintien du taux de polyamines à un niveau suffisant permet la différenciation de ces cellules fibroblastiques en cellules adipeuses (Jänne et al., 1988).
- Par contre dans les cellules hématopoïétiques, l'induction de la différenciation ne se réalise qu'après inhibition de la synthèse des PA dans ces cellules (Jänne and Alhonen-Hongisto, 1988). Il semble donc que les effets divergents, stimulation ou

inhibition, exercés par les inhibiteurs de l'ODC dépendent de la sensibilité et de la fonction du type cellulaire vis à vis de l'inhibiteur employé.

En cancérogénèse expérimentale *in vivo*, on a pu voir que l'application de TPA sur la peau de souris provoque une réaction inflammatoire dans le derme et une hyperplasie dans l'épiderme. Ces réactions hyperplasiques peuvent évoluer ensuite vers la formation de papillomes et d'épithéliomas. Le DFMO appliqué sur la peau de souris (2 heures avant ou jusqu'à 3 heures après l'application de TPA) inhibe l'induction de l'activité ODC et la formation des papillomes (Takigawa et al., 1985).

Des études préliminaires réalisées par Astrup et Boutwell (1982) ont montré qu'il y avait une plus forte activité ODC dans les papillomes et carcinomes que dans un épiderme normal de souris.

L'étude à visée thérapeutique de l'ODC, et en particulier des inhibiteurs, concerne plus des cas de croissance cellulaire excessive. Les inhibiteurs de l'ODC ont donc été largement testés *in vivo* pour la prévention du cancer et contre les maladies hyperprolifératives comme le psoriasis (Jänne et Alhonen-Hongisto., 1988).

De nombreuses études expérimentales ont été réalisées sur des tumeurs telles que EMT6 (sarcome mammaire murin) dont le développement se trouve retardé de 80 % par 3 % de DFMO dans l'eau de boisson, une inhibition de croissance comparable à celle obtenue avec la cyclophosphamide. Des études ont également montré que le DFMO utilisé à long terme plus d'un an, est d'autant plus actif sur des xénogreffes d'épithélioma pulmonaire humain à petites cellules, que les tumeurs sont de faibles poids (Jänne et Alhonen-Hongisto., 1988).

La combinaison d'inhibiteurs de l'ODC avec des agents antiprolifératifs, n'a pas démontré d'effets vraiment tangibles. En comparaison avec le DFMO, des essais pharmacologiques ont été réalisés avec des analogues de la putrescine, spermidine et spermine, et ceux-ci ont la propriété de faire baisser le taux de polyamines intracellulaires (Porter et al., 1987).

Une autre voie d'étude intéressant l'ODC a été les maladies hyperprolifératives où les PA se trouvent directement impliquées. Certaines études expérimentales ont donné de bons résultats, mais les cas cliniques restent rares ; l'injection intradermique de DFMO dans des lésions psoriasiques a montré une déplétion en putrescine et spermidine. Mais généralement, l'utilisation des inhibiteurs de la biosynthèse des PA est délicate car ces produits ont un faible pouvoir de pénétration à travers la peau (Jänne et Alhonen-Hongisto., 1988).

Après une période de recherches sur les variations de l'activité d'ODC, il est rapidement apparu à la lumière des résultats que selon les types cellulaires, il fallait déterminer le mécanisme de modulation de l'ODC. Le but était de préciser si la régulation de l'ODC se faisait : soit au niveau de la transcription du gène ODC en RNAm, soit au niveau de la traduction du RNAm en protéine enzymatique.

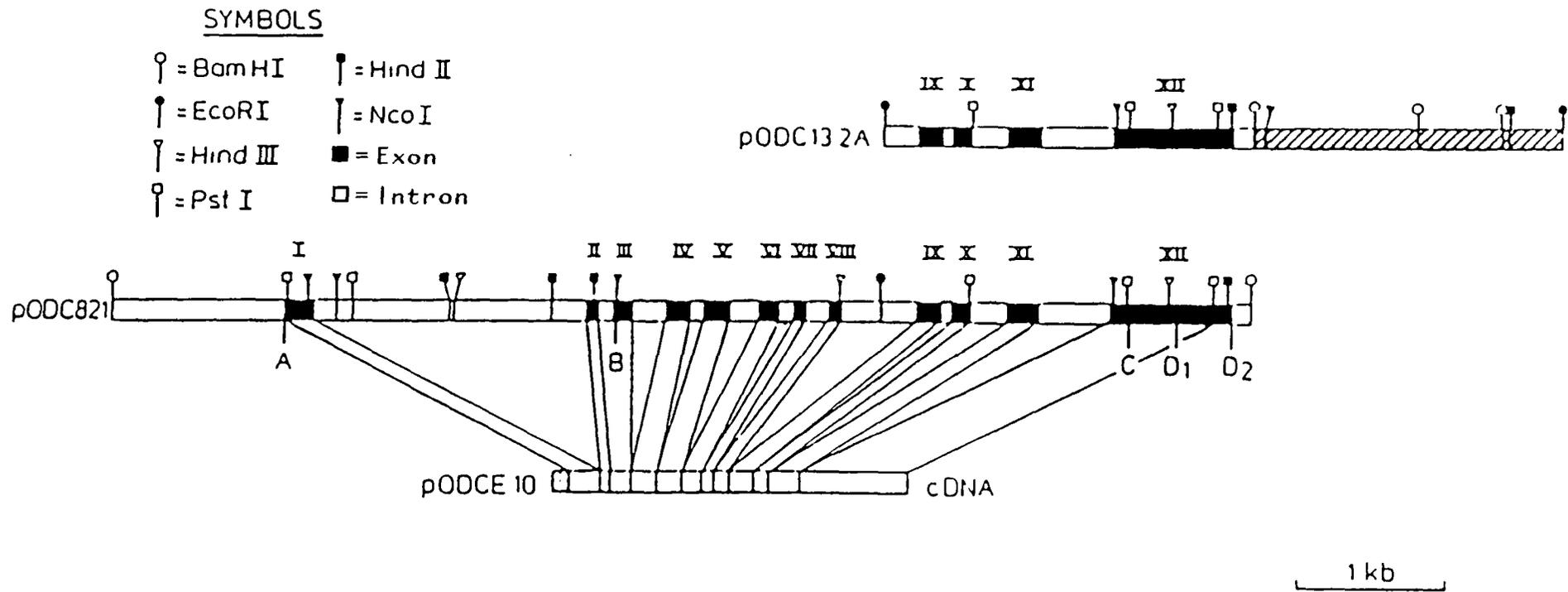


Figure 5 - Représentation du gène ODC et du clone pODCE 10

3.4. - Caractéristiques de l'ODC au niveau moléculaire

Pour étudier les mécanismes moléculaires de l'induction de l'ODC et ses relations avec la promotion tumorale et la croissance cellulaire, il était nécessaire de cloner et connaître les séquences du gène ODC. Dans un premier temps, plusieurs auteurs ont isolé à partir des cellules rénales de souris traitées par un androgène, des séquences nucléotidiques correspondant au gène codant pour l'ODC (Brabant et al., 1988 ; Coffino et al., 1988). De nombreux travaux ont été publiés par la suite, détaillant les propriétés fonctionnelles du gène ODC dans les cellules de souris, hamster, homme et chez le rat (Coffino et al., 1988 ; Van Kranen et al., 1987).

Le gène ODC a été isolé à partir de l'ADN de foie de rat. La totalité de ce gène est localisée dans un fragment Bam HI de 7776 bp. Il est constitué de 12 exons séparés par 11 introns (Figure 5). Les exons I et II, plus 33 paires de bases de l'exon III, codent pour la région 5' non exprimée de l'ARNm de rat. L'ODC est codée par le reste de l'exon III et tous les autres exons de IV à XI, plus les 142 premières paires de bases de l'exon XII. L'exon XII contient deux signaux alternatifs de polyadénylation (AATAAA) séparés par 387 bp. Comme cela a été démontré par analyse de Northern-blot (Van Kranen et al., 1987), ces 2 signaux conditionnent la synthèse de deux types d'ODC-ARNm différents, de 2.0 et 2.4 Kb.

Pour vérifier que le gène ODC isolé est fonctionnel, l'insert Bam HI est cloné dans le plasmide pSV2 néo et transfecté dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary, lignée C55.7) déficientes en ODC. Dans ces conditions, les cellules présentent une activité ODC plusieurs fois supérieures au contrôle. Ces résultats démontrent que le gène ODC cloné est parfaitement fonctionnel (Van Steeg et al., 1990).

Le premier triplet de bases codant pour la traduction, ATG, est numéroté en position 1 dans la séquence nucléotidique. Le point de départ exact de la traduction (tsp) est situé en position G-303 dans le gène ODC (Van Kranen et al., 1987).

De nombreux sites de régulation ont été identifiés dans la région promotrice 5' du gène ainsi que dans le premier intron. Parmi les principaux, on y trouve les sites pour les récepteurs AP-1 et AP-2 (récepteurs du TPA), le site de réponse à l'AMPc et un site de régulation par les glucocorticoïdes. Par analogie avec les séquences nucléotidiques déjà publiées, les auteurs (Wen et al., 1989 ; Van Steeg et al., 1990) ont trouvé des séquences correspondant aux sites de liaison pour AP1 et AP2 dans l'intron I. Ces sites sont supposés être impliqués dans le signal de transcription en réponse à l'action du TPA. Mais des travaux récents d'étude du fonctionnement du gène semblent montrer que ces sites ne seraient pas actifs et que les éléments nucléotidiques impliqués dans l'induction de l'ODC ou du RNAm par le TPA seraient localisés dans d'autres endroits (Van Steeg et al., 1990).

Le site impliqué dans la régulation de l'activité ODC et du taux d'ARNm par les glucocorticoïdes est un hexanucléotide TGTTCT, spécifique du gène ODC de rat ; il est situé dans le premier intron (Yamamoto, K.R., 1985 ; Ringold, R.M., 1985). En général, les auteurs pensent que ce site nucléotidique serait impliqué dans l'action stimulatrice exercée par un glucocorticoïde sur la cellule. Mais nous ne savons pas dans quelle mesure, ce même site pourrait intervenir dans une action inhibitrice exercée par des corticoïdes sur d'autres fonctions cellulaires (Guertin et al., 1983 ; Arya et al., 1984 ; Krudsen et al., 1987).

L'étude de l'ODC-ARNm reflète le fonctionnement du gène dans différents types cellulaires, et sa modulation peut varier selon les traitements effectués par des substances exogènes. L'ODC-ARNm contient une région 5' non traduite, riche en nucléotides GC. Cette partie pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la synthèse de la protéine enzymatique ODC. Van Steeg et al. (1990) ont montré par des expériences de traduction *in vitro* : - que l'ODC-ARNm intact est peu actif sur la synthèse des protéines. - que par contre l'enlèvement de 172 nucléotides à l'extrémité 5' UTR conduit à une traduction plus importante. Mais dans le contrôle feed-back de l'ODC par les polyamines, la présence de cette partie 5' UTR n'interfère pas. Seule la partie codante de l'ARNm pour la protéine ODC intervient dans cette inhibition de l'ODC par les polyamines.

L'ODC peut se mesurer au niveau des cellules tumorales, l'induction de son activité étant plus forte. Il serait très intéressant de pouvoir suivre l'évolution de cette enzyme en tant que marqueur biochimique dans les processus de transformation cellulaire *in vitro*.

IV - LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

Comme nous avons pu le préciser précédemment, le concept de la cancérogénèse chimique en 2 phases a essentiellement été développé *in vivo* sur la peau de souris. Pour expliquer le mode d'action des cancérogènes et le mécanisme de transformation des cellules, il est bien vite apparu nécessaire de développer des méthodes d'études *in vitro*.

Les travaux les plus importants ont été réalisés par Earle et Coll., aux Etats-Unis entre 1938 et 1943 qui ont obtenu la transformation de fibroblastes de derme de souris C3H traitée par le 3-méthylcholanthrène. Des souris isologues ont ensuite été inoculées soit avec un lot de cellules traitées, soit avec un lot témoin; Ce fut un demi-succès, les auteurs ayant obtenu des tumeurs dans les deux cas. C'est en 1963 que Berwald et Sachs ont publié les premiers travaux concernant la transformation morphologique des cellules embryonnaires de hamster Syrien par des agents

chimiques; En 1969, Chen et Heidelberger ont obtenu la transformation morphologique de cellules d'une lignée établie à partir de prostate de souris C3H, les cellules C3H10T1/2. Enfin en 1979, Kakunaga et Coll., publiaient les premiers résultats obtenus avec la lignée de cellules Balb/3T3 établie à partir d'embryons de souris Balb/c.

Le système de culture cellulaire *in vitro* est largement utilisé pour étudier les effets de transformations des substances, car il présente 4 avantages (Chouroulinkov et Lasne, 1976) :

- relative simplicité de la méthode et de la cible comparée à l'animal.
- Reproduction de la méthode de cancérogénèse chimique en 2 étapes.
- Elaboration de tests rapides et fiables pour une évaluation de l'activité cancérogène des agents chimiques.
- Modèle économique, il est l'intermédiaire entre les tests de mutagénèse et les tests de cancérogénèse à long terme *in vivo*.

Il faut toutefois préciser que le critère de transformation *in vitro* n'est pas toujours en corrélation avec la tumorigénicité *in vivo*. Le terme de transformation s'applique à toutes les modifications (considérées individuellement) qu'une cellule montre de façon spontanée ou après traitement (Chouroulinkov., 1987). Les critères de transformation cellulaire sont de nature morphologique (cytologique) ou de comportement, (biologique) :

| <u>Critères morphologiques ou cytologiques</u> | <u>Critères biologiques ou de comportement</u> |
|--|---|
| a) dédifférenciation morphologique | a) établissement de lignée continue ou acquisition de la pérennité |
| b) noyau volumineux (contour irrégulier) | b) croissance accélérée (cycle mitotique raccourci) |
| c) rapport nucléo-cytoplasmique élevé | c) densité de saturation augmentée |
| d) cytoplasme très basophile | d) efficacité de clonage augmentée |
| e) mitochondries peu nombreuses | e) formation de colonies anormales |
| f) glycocalyx épaissi | f) formation de foyers (dits de transformation) |
| g) mitoses fréquentes et anormales | g) formation de colonies en milieu semi-solide |
| h) caryotypes anormaux | h) formation de tumeurs après passage <i>in vivo</i> (acquisition du potentiel tumorigène). |

Seuls les essais de transformation morphologique sur les cellules SHE (cellules embryonnaires de hamster Syrien), C3H10T1/2 et Balb/3T3 sont utilisés au niveau international : ils ont fait l'objet d'études inter-laboratoires dans le but de les améliorer et de les valider. L'emploi des "tests de transformation cellulaire" malgré leur imperfection (Tableau 2) est jusqu'à présent le plus apte à détecter si une substance est inactive ou présentant un potentiel cancérigène, génotoxique, ou épigénétique (non-génotoxique).

Pour se rapprocher de la situation *in vivo* lors de l'induction des tumeurs cutanées par l'ester de phorbol, nous avons étudié dans notre travail l'action spécifique du TPA sur l'induction d'ornithine décarboxylase (ODC) dans les cellules cibles proches de l'état normal mais aussi à différentes étapes de transformation. La régulation de l'ODC est à rechercher tant au niveau génomique que dans le cytoplasme ; en effet cette modulation de l'ODC peut s'effectuer soit par la présence de substances xénobiotiques, soit par une interaction des enzymes protéolytiques intra-cellulaires.

Dans une première partie, nous avons étudié le mécanisme d'action spécifique du TPA sur l'ODC dans des modèles *in vitro*, étude de l'expression du gène ODC en comparaison avec l'activité enzymatique dans le cytoplasme. Nous avons retenu comme modèles deux lignées de cellules épithéliales de rat, lignée témoin n'ayant subi aucun traitement et lignée traitée par le BaP ; nous avons également utilisé des cellules embryonnaires de hamster à prédominance fibroblastiques (SHE).

En dehors de toute interaction des cellules environnantes, nous avons pu étudier dans une seconde partie, les mécanismes de régulation de l'activité ODC par des substances exogènes telles que les anti-inflammatoires et plus particulièrement l'action de la dexaméthasone. Les résultats obtenus nous ont conduit à rechercher dans une 3ème partie la régulation intracellulaire de l'action du TPA par des enzymes protéolytiques. Deux types de protéases ont été analysés : les cathepsines et les sérine-protéases. En sens inverse, nous avons étudié la réponse cellulaire en présence d'inhibiteurs spécifiques de protéases.

En application des connaissances acquises, nous avons recherché dans une 4ème partie une corrélation pouvant exister entre les différentes étapes de transformation phénotypiques des cellules SHE et les modifications du mécanisme de régulation de l'ODC.

TABLEAU 2 : Comparaison des propriétés de différents systèmes de transformation de cellules de mammifères

Cellules embryonnaires de hamster syrien (SHE)

Lignée de cellules embryonnaires de souris (C3H10T1/2)

Lignée de cellules embryonnaires de souris (BalB/3T3)

Avantages

- Cellules diploïdes non différenciées
- Essai rapide (8 jours)
- Activité métabolique maintenue
- Transformation spontanée très rare
- Emploi d'antibiotiques

- Essai quantitatif
- Classification des foyers relativement aisée
- Amplification des effets

- Essai sensible
- Essai quantitatif
- Emploi d'antibiotiques
- Traitement en suspension possible
- Amplification des effets

Inconvénients

- Transformation morphologique dépendant du SEV
- Fréquence de transformation basse
- Souvent absence d'un effet-dose
- Classification subjective des colonies

- Cellules aneuploïdes, anormales
- Pouvoir métabolisant réduit
- Transformation dépendant du SEV
- Essai peu sensible
- Transformation spontanée aux passages éloignés
- Expérimentation longue (6 sem.)
- Absence d'antibiotiques

- Cellules aneuploïdes, anormales
- Analyse subjective des foyers
- Formation de foyers dépendante du SEV
- Transformation spontanée aux passages éloignés
- Expérimentation longue (30 jours)

MATERIEL ET METHODES

A / MATERIEL

I - PREPARATION ET CULTURE DE CELLULES EPITHELIALES DE POUMON EMBRYONNAIRE DE RAT.

I.1 - Isolement des 2 lignées de cellules épithéliales

Les cellules épithéliales ont été préparées au laboratoire à partir de cultures d'explants pulmonaires d'embryons de rats Wistar âgés de 15 jours, selon la technique décrite par Michiels (1977). Après 16 jours de culture organotypique en milieu liquide, les explants sont prélevés et dissociés à la collagénase (0.02 %). Les cellules sont alors mises en culture dans un milieu DMEM H21 (GIBCO) additionné de 10 % de sérum embryonnaire de veau et des antibiotiques usuels dans une étuve à 37°C, 10 % de CO₂.

Ces cellules épithéliales constituent la lignée témoin, (Ctr). Une seconde lignée cellulaire (BPe) de morphologie différente, a été également obtenue à partir d'explants pulmonaires, mais qui ont été traités pendant 16 jours par un hydrocarbure polycyclique, le BaP (5 µg/ml) ; les cellules sont ensuite dissociées et mises en culture dans les mêmes conditions que précédemment. Le temps de doublement de ces 2 lignées est de 22-23 heures.

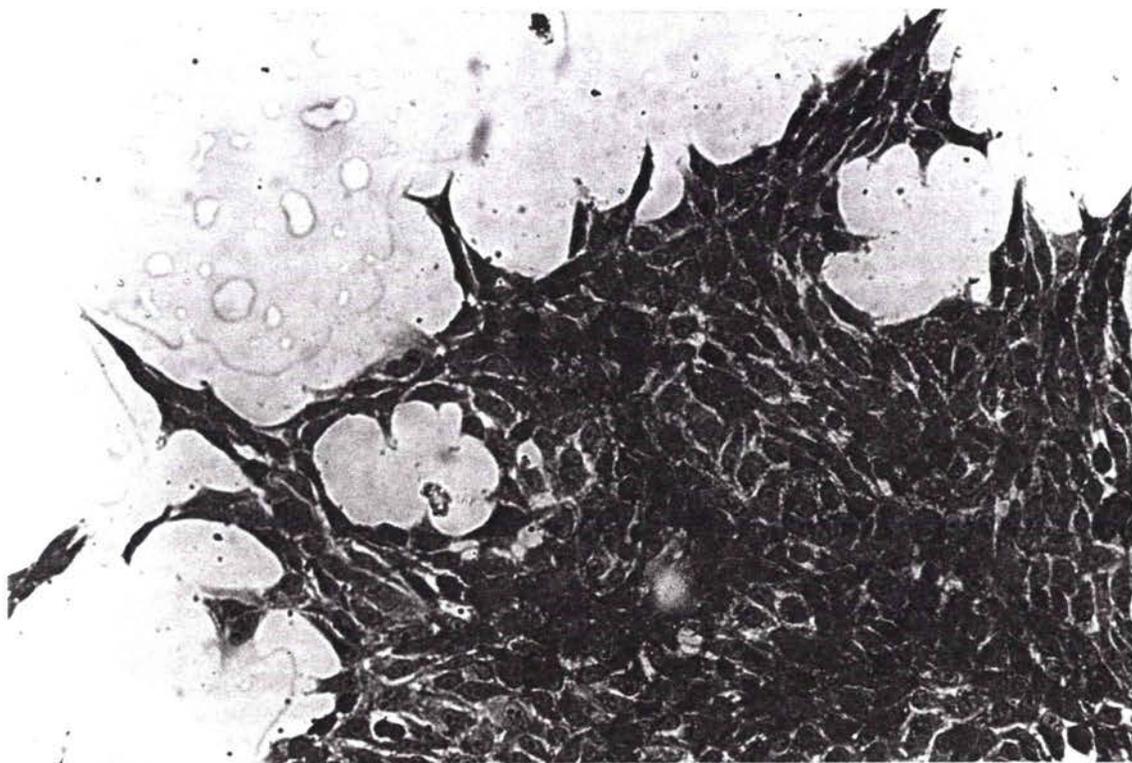
Le poumon maintenu sous forme d'explants dans un milieu défini démontre une prédominance du tissu épithélial et une réduction du tissu conjonctif (Michiels., 1981). Après dissociation de ces explants, un mélange épithélio-fibroblastique persiste pendant les premiers passages avec toutefois une prédominance épithéliale (passage 5 : 85 % de cellules épithéliales). Ce n'est qu'au 15^{ème} passage qu'une culture épithéliale pure est obtenue. Ces cellules se présentent sous un aspect allongé (photographie 1A) alors que les cellules épithéliales traitées ont un aspect polygonal (photographie 1B).

Le caractère épithélial de ces cellules a été contrôlé par réactions immunologiques :

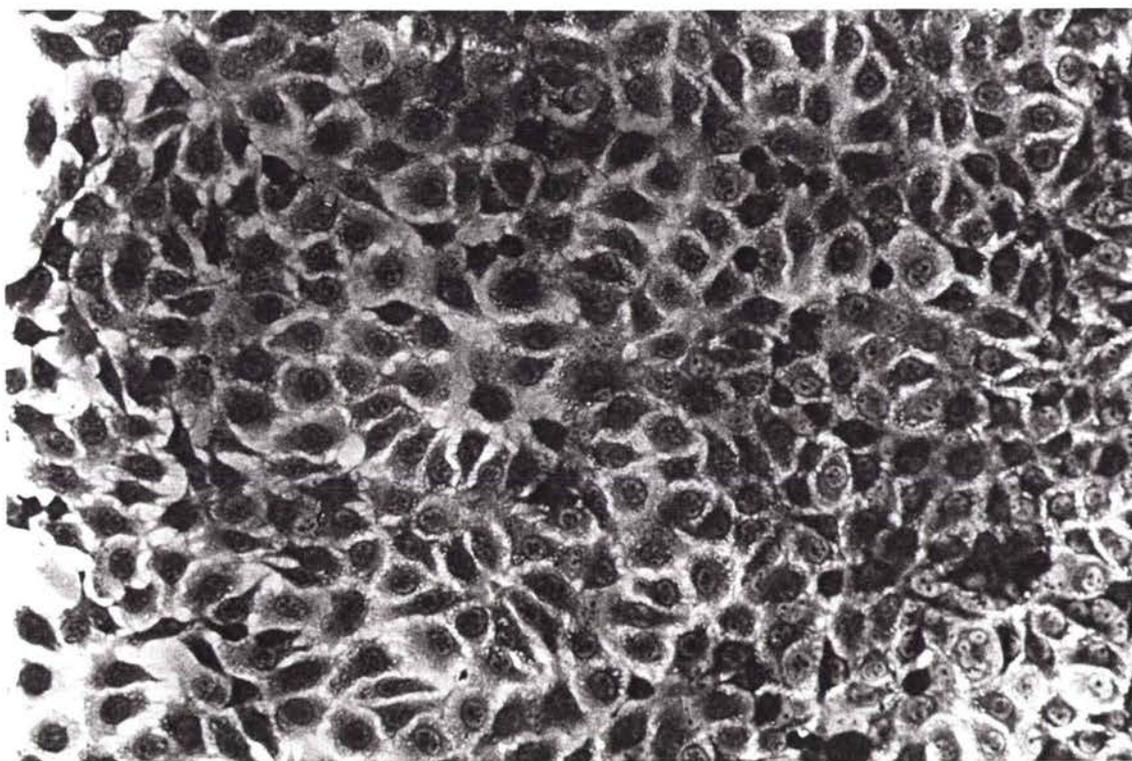
- test d'immunofluorescence indirecte avec anticorps antikératine.
- absence de réactions avec anticorps antivimentine.

Le potentiel tumorigène a été évalué *in vivo*, par injection intrapéritonéale d'une suspension cellulaire chez le rat. La lignée BPe donne 100 % de tumeurs dès le 5^{ème} passage 12 semaines après l'injection, contre 50 % de tumeurs seulement au 21^{ème} passage avec 33 semaines de délai, pour la lignée témoin.

PHOTOGRAPHIE 1 - Aspect morphologique des cellules épithéliales Ctr et BPe.



1 A : Cellules témoin Ctr après 4 jours de culture DMEM H21 + 10 % de sérum.



1 B : Cellules BPe, 4 jours de culture dans les mêmes conditions.

1.2 - Maintien des cellules en culture

Les 2 lignées cellulaires (Ctr et BPe) sont maintenues en culture dans du milieu MEM H21, complété avec :

10 % de SEV

1000 U/ml de pénicilline

50 µg/ml de streptomycine

2.5 µg/ml d'amphotéricine

4 mM de L-glutamine sont également ajoutés. Le maintien de la lignée se fait par repiquage hebdomadaire (dissociation par la trypsine à 0.25 % dans du PBS) à raison de 25.000 cellules par boîte de Pétri Falcon 100 mm de diamètre.

II - ISOLEMENT ET MAINTIEN EN CULTURE DE CELLULES PRIMAIRES D'EMBRYONS DE HAMSTER SYRIEN (SHE).

2.1 - Obtention des cellules SHE

Il s'agit de cultures de cellules diploïdes (21 paires d'autosomes + 1 paire d'hétérosomes) d'embryons de hamster Syrien. Ces cellules ont l'avantage d'avoir conservé certaines propriétés de l'animal d'origine, à savoir la capacité de métaboliser certains cancérrogènes (PHA), propriété qu'ont perdu les lignées établies. Les cellules SHE ont généralement un taux de transformation spontanée très bas.

Il existe toutefois certains inconvénients :

- Les cellules SHE ont une efficacité de clonage faible, ce qui nécessite l'emploi d'une couche de cellules irradiées lors d'un test de transformation.

- Il faut maintenir un stock de cellules primaires présélectionnées car leur capacité d'activation métabolique diminue avec les passages.

. Procédé d'obtention des cellules SHE :

Des femelles âgées de 2 mois et demi - 3 mois sont accouplées 24 heures avec un mâle de 3-4 mois. Le premier jour de gestation correspond au retrait du mâle.

1/ Après anesthésie à l'éther, des femelles au 12ème-13ème jour de gestation sont saignées à blanc et les embryons prélevés stérilement.

2/ Après 2 lavages au PBS, les parties différenciées de l'embryon (yeux, coeur et viscères) sont retirées.

3/ Les embryons sont ensuite découpés en fragments très fins.

4/ Addition de 35 ml de trypsine 0.25 % chauffée à 37°C et l'ensemble est mis en agitation 10 min. à 37°C dans un erlenmeyer avec un barreau magnétique.

5/ Le surnageant de la première digestion est éliminé.

6/ Ajouter 100 ml de trypsine sur le premier culot. Remettre en agitation 15 min. à 37°C.

7/ Récupérer le surnageant par filtration sur gaze stérile pour éliminer les petits fragments ou agglomérats cellulaires.

7/ Inactiver ce surnageant avec du SEV et centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min.

8/ Procédure identique pour le troisième surnageant.

9/ Les culots des surnageants 2 et 3 sont remis en suspension dans du milieu additionné de sérum et mixés ensemble.

10/ Après dénombrement des cellules SHE (à l'aide d'une cellule de Neubauer), celles-ci sontensemencées à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules/boîte de pétri de 100 mm de diamètre.

11/ 48 heures après, les cellules sont trypsinisées et congelées ($2.5 - 5 \cdot 10^6$ cellules/ampoule) dans du milieu H16 + 10 % SEV + 10 % DMSO, par paliers successifs dans l'azote liquide (DiPaolo, 1980).

Les cellules embryonnaires constituent un mélange de différents types cellulaires non différenciés à dominante fibroblastique.

2.2 - Maintien des cellules en culture

Au moment de l'emploi, les cellules sont décongelées et cultivées dans du milieu D-MEM H16 + 10 % SEV. Le milieu est changé entre 6 et 8 heures après décongélation pour éliminer toute trace de cryoprotecteur. L'entretien de la culture SHE se fait par repiquages successifs, après dissociation des cellules par une solution de trypsine 0.25 % pendant 3-6 minutes à 37°C pour la détermination de l'activité ODC.

III - RECHERCHE DES MYCOPLASMES

Les mycoplasmes sont des microorganismes infectant les cultures cellulaires. Leur détection précoce est recommandée car leur multiplication au sein d'une culture est rapide. De plus, ils résistent à des centrifugations de 2.500 rpm de 30 min et passent à travers des filtres membranaires de 0.22 μm . La recherche des

mycoplasmes est effectuée tous les 4 passages des cellules épithéliales, selon la technique de RUSSEL (1975) modifiée par CHEN (1977).

Les cellules sontensemencées sur lamelles stériles (18 x 18 mm). La réaction s'effectue sur une culture non confluente, soit 72 heures après la mise en culture. Les cellules sont traitées avec le fixateur de Carnoy (1 volume acide acétique - 3 volumes de méthanol), puis lavées et incubées avec le bis-benzimide (Hoescht 3358 à 0.1 mg/ml de PBS) pendant 30 min à 37°C. Les lamelles sont ensuite lavées à l'eau distillée, montées et examinées avec un microscope Leitz à fluorescence. L'analyse de nos observations n'a jamais révélé la présence de mycoplasmes.

IV - MILIEUX ET TAMPONS

4.1 - Milieu de culture

4.1.1. - **Milieu H21**

C'est un milieu de Eagle modifié par Dulbecco (D-MEM H21) avec une concentration en glucose de 4500 mg/l. Ce milieu est utilisé au cours des expériences et de l'entretien des 2 lignées de cellules épithéliales de poumon.

* Composition du milieu donnée en annexe.

4.2.2. - **Milieu H16**

Il s'agit du même milieu que précédemment mais avec une concentration en glucose de 1000 mg/l. Ce milieu est utilisé pour l'entretien des cultures SHE.

4.2 - Tampons

Les compositions des tampons phosphate (PBS) et trypsine sont données en annexe.

4.3 - Le sérum de veau embryonnaire (SEV)

Le sérum est un composant essentiel des milieux de culture et contient une quantité importante et variée d'hormones, d'acides gras, de protéines, de sucres et d'éléments sous forme de traces. La qualité, le type et la concentration de sérum peuvent affecter les différentes propriétés des cellules cultivées, telle que l'efficacité de clonage, la durée de vie *in vitro*, le taux d'expression de la transformation morphologique *in vitro* etc...(Boone et al., 1974 ; Schuman et al., 1979).

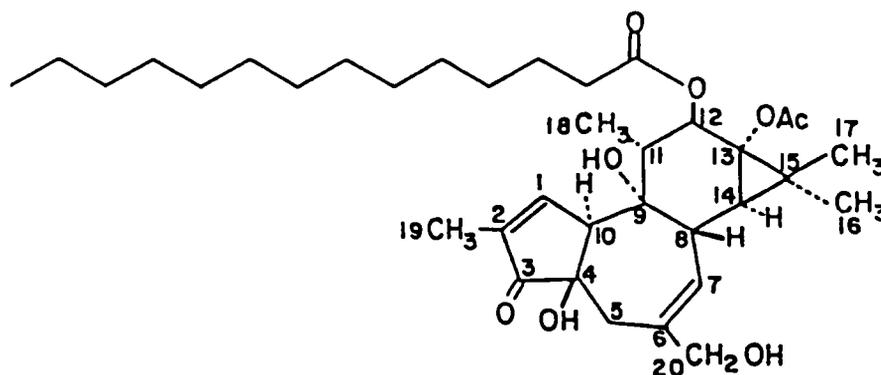
Pour pallier à ces désavantages, nous avons testé et utilisé du sérum (toujours décomplémenté à 56°C pendant 30 min) avec un milieu H16 pH 6,7 pour le test de transformation des cellules SHE (Zisson et al., 1988 ; Leboeuf et al., 1989), pH qui favorise au maximum l'efficacité de clonage quel que soit le lot de cellules SHE et quel que soit le sérum.

V - LES PRODUITS CHIMIQUES

5.1 - Le TPA ou ester de phorbol

TPA ou 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate

Formule chimique :



PM : 616,8

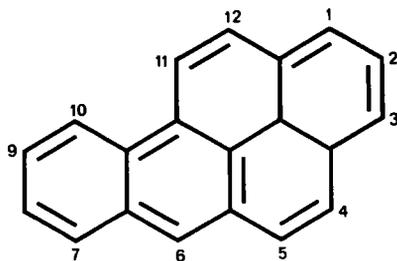
Caractères physico-chimiques

se présente sous forme de corps gras
soluble dans l'acétone ou dans le DMSO.

5.2 - Le Benzo(a)pyrène ou BaP

C'est un hydrocarbure polycyclique aromatique dérivé du pyrène, sur lequel un noyau benzémique est accolé en position 3,4.

Formule chimique : $C_{20}H_{12}$



PM : 252,32

Propriétés physico-chimiques

- . se présente sous forme de paillettes jaunes pâles
- . soluble dans le benzène, avec émission d'une fluorescence bleue ou violette
- . solubilité également dans l'acétone, le toluène, le xylène et le DMSO
- . point de fusion : 176,5 - 117,5°C
- . point d'ébullition : 475°C/760 mm
- . densité : 1,351.

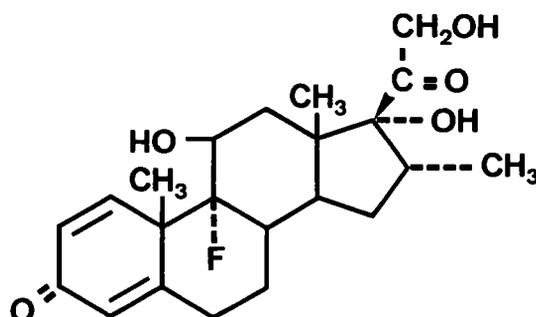
5.3 - Les anti-inflammatoires

5.3.1 - La dexaméthasone

La dexaméthasone (ou DXME) est un stéroïde de synthèse, utilisé en clinique comme médicament anti-inflammatoire (anti-phospholipase A_2).

Formule chimique : $C_{22}H_{29}FO_5$

9 α -fluoro-16 α -méthylprédnisone



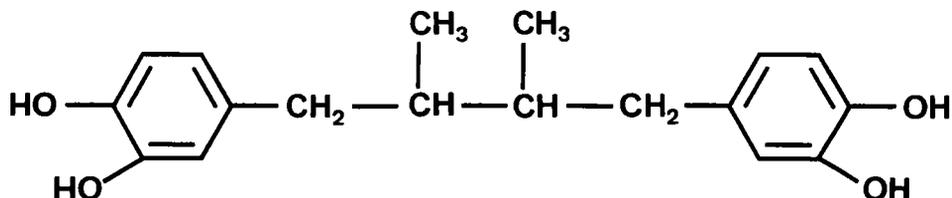
PM : 434,5

Propriétés physico-chimiques

soluble dans l'acétone, l'éthanol et le chloroforme.

5.3.2. - L'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) (antilipooxygénase)
 NDGA ou 4,4'-(2,3-diméthyltétraméthylène) dipyrocatéchol

Formule chimique : $C_{18}H_{22}O_4$



PM : 302,36

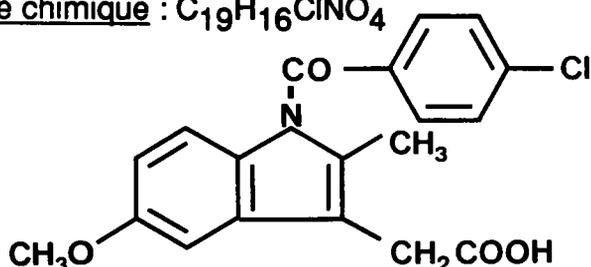
Propriétés physico-chimiques

. soluble dans l'éthanol, le méthanol, l'éther, l'acétone, le glycérol.

5.3.3. - L'indométacine (anticyclooxygénase)

Indométacine ou 1-(p-chlorobenzoyl)-5-méthoxy-2-méthylindole-3-acide acétique.

Formule chimique : $C_{19}H_{16}ClNO_4$



PM : 357,81

Propriétés physico-chimiques

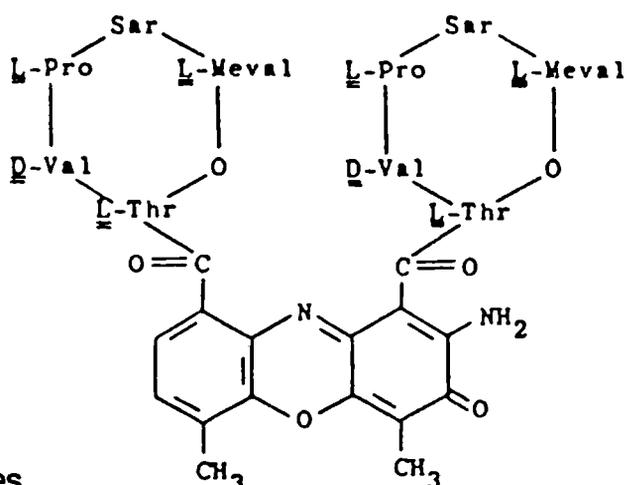
. soluble dans l'éthanol, l'éther, l'acétone.

5.4 - Les inhibiteurs de l'expression et de la traduction génique

5.4.1. - L'actinomycine D (inhibiteur de synthèse des ARN)

Substance antibiotique appartenant au groupe des actinomycines produites par divers streptomycètes.

Formule chimique : $C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$



PM : 1255,47

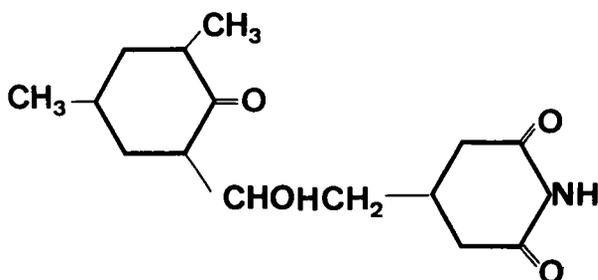
Propriétés physico-chimiques

Soluble dans l'alcool, le glycérol, l'eau + le glycérol.

5.4.2 - **La cycloheximide** (inhibiteur de synthèse des protéines)

Cycloheximide ou (3-[2-(3,5-diméthyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxyethyl] glutarimide.

Formule chimique : $C_{15}H_{23}NO_4$



PM : 281,34

Propriétés physico-chimiques

. soluble dans chloroforme, éther, acétone, méthanol, éthanol.

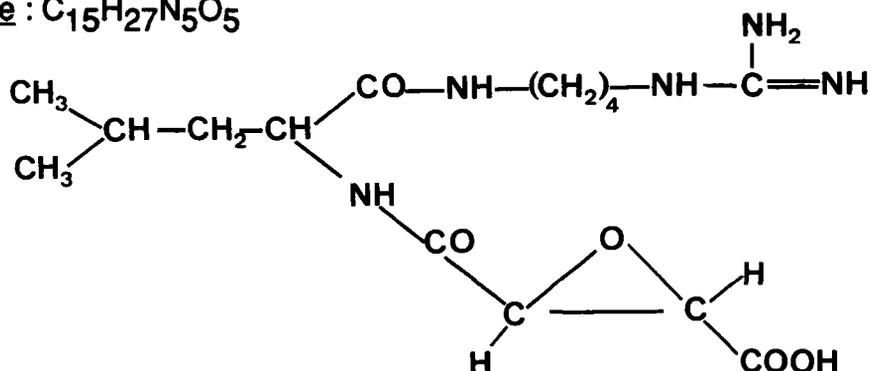
5.5. - Les inhibiteurs de protéases

5.5.1. - **E₆₄**

E₆₄ ou L-3-carboxy-trans-2,3-époxy succinyl-L-leucylamido (4-guanidino) butane.

C'est un inhibiteur des cystéines protéases (cathepsines).

Formule chimique : $C_{15}H_{27}N_5O_5$



PM : 357,4

Propriétés physico-chimiques

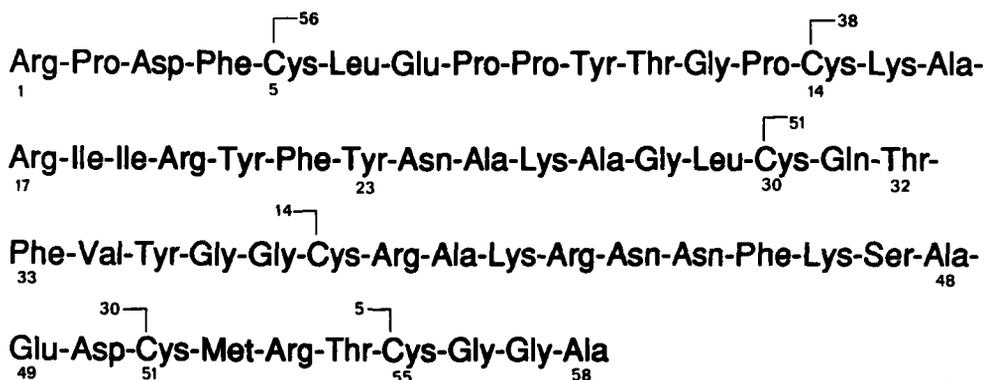
- . sous forme cristallisée
- . soluble dans l'eau, l'acide acétique et le DMSO
- . se combine de façon équimolaire et irréversible

5.5.2. - Aprotinine

L'aprotinine est une simple chaîne de polypeptides contenant 58 acides aminés de séquences connues.

C'est un inhibiteur des sérines-protéases d'origine protéique (inhibiteur de Kunitz du pancréas de boeuf).

Formule chimique : $C_{284}H_{432}N_{84}O_{79}S_7$



PM : 6511,83

propriétés physico-chimiques

- . soluble directement dans le milieu.

B - METHODES

I - MESURE DE L'ACTIVITE ODC

1.1 - Traitement des cellules épithéliales de poumon embryonnaire de rat.

Les cellules épithéliales sontensemencées dans des boîtes 12 puits Costar^R, à raison de 10.000 cellules/ml. Le traitement débute 72 heures après, quand les cellules sont proches de la confluence. Pendant la durée du traitement, le sérum de veau foetal (SEV) est remplacé par de l'albumine sérique bovine (BSA) (0.1 % dans le milieu H21) car l'effet propre du SEV (facteurs et hormones stimulant le métabolisme et la division cellulaire) peut gêner la détermination des effets induits par les activateurs ou inhibiteurs de l'ODC testés (Schuman et al., 1979 ; Maurer, 1982).

Protocole : - Chaque puits est lavé 2 fois avec du PBS

- puis addition de 2 ml de milieu 0.1 % BSA + le ou les produits chimiques à tester.
- la concentration en solvant acétone n'excède jamais 0.2 %
- après le temps de traitement de 4 heures (étuve 37°C - 10 % CO₂), les puits sont soigneusement lavés au PBS et les boîtes Costar^R congelées à -80°C pour les études biochimiques ultérieures.

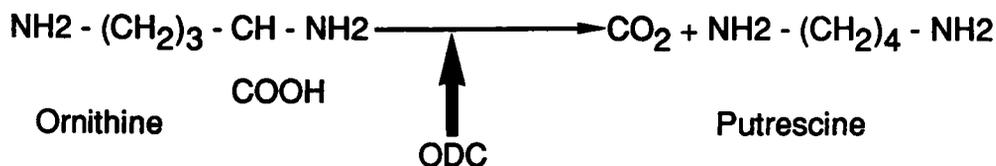
1.2 - Mise au point du protocole de traitement des cellules SHE

Les cellules SHE, de passage 1 et 2 (O'Brien, 1976) sontensemencées dans les boîtes Costar^R à raison de 20.000 cellules/ml. Le traitement débute quand les cellules ont atteint la confluence. Après avoir déterminé le milieu et la concentration de sérum nécessaire aux cellules SHE pour un dosage correct de l'activité ODC, nous avons choisi comme milieu de traitement : DMEM H16 modifié à pH 6,7 plus 5 % SEV.

Protocole de traitement : Le protocole est identique à celui des cellules épithéliales de poumon, hormis le milieu et le temps de traitement de 5 heures, temps optimal à la révélation de l'expression de l'activité ODC.

1.3 - Mesure de l'activité ODC *in vitro*

Le dosage de l'activité ornithine décarboxylase (ODC) se fait par mesure du taux de CO₂ dégagé (¹⁴C-CO₂), après clivage de l'ornithine-substrat (Lichti et al., 1983).



Il s'agit donc de piéger et de quantifier le CO₂ dégagé lors de cette réaction.

Mode opératoire

Les manipulations ont lieu dans la glace jusqu'au déclenchement de la réaction enzymatique à 37°C. Les cellules sont traitées avec le mélange suivant :

| | concentration finale | volume µl | concentration de la solution de départ |
|-----------------------------------|----------------------|-----------|--|
| eau distillée | | 200 | |
| Tris HCl pH = 7,5 | 50 mM | 50 | 400 mM |
| Pyridoxal phosphate | 40 µM | 50 | 320 µM |
| Dithiothréitol | 2,5 mM | 50 | 20 mM |
| Ornithine + (¹⁴ C)Orn | 0,4 mM | 50 | 3,2 mM |

La concentration en ¹⁴C-L-ornithine est de 0.1 µCi (3.7 KBq).

La boîte Costar^R-12 puits est ensuite recouverte d'un parafilm perforé au niveau de chaque puits sur lequel est déposé un filtre de cellulose (GF/C Whatman) imprégné de 50 µl KOH-2N, pour piéger le CO₂ dégagé lors de la réaction enzymatique. Un second parafilm est ajouté de façon à fermer hermétiquement la boîte. L'incubation s'effectue dans un bain-marie à 37°C avec agitation pendant 60 min. La réaction est ensuite stoppée par injection de 50 µl d'acide perchlorique 2N par puits, suivie d'une nouvelle incubation à 37°C, 60 min pour permettre l'adsorption totale de CO₂.

La radioactivité incorporée dans chaque filtre est mesurée par scintillation liquide au spectromètre Beckman. Les protéines des cellules sont dissoutes par 50 µl

de NaOH 5N par puits. Leur quantité est déterminée en présence de bleu de Coomassie, selon la méthode de Bradford (1976). L'activité ODC est alors exprimée en nmoles de CO₂ relarguées par mg de protéine en 60 minutes.

II - ESSAI DE TRANSFORMATION CELLULAIRE DES SHE.

2.1 - Introduction

Berwald et Sachs (1963, 1965) ont été les premiers à utiliser les cellules embryonnaires de hamster Syrien (SHE) comme modèle d'étude de la transformation morphologique après traitement par des hydrocarbures polycycliques. Cette technique permet de mettre en évidence la capacité d'un produit chimique à induire la formation de colonies morphologiquement transformées, indiquant un potentiel cancérigène (Huberman et Sachs, 1966 ; DiPaolo, 1969). Enfin les travaux de Pienta et al., (1977) sur la congélation et le stockage des cellules ont facilité et favorisé l'utilisation de ces tests de transformation cellulaire.

Seules les cultures primaires susceptibles d'être transformées sous l'action d'un cancérigène (contrôle systématique par le BaP, Poiley et al., 1979) et dont le taux de transformation spontanée est faible, sont conservées par congélation dans l'azote liquide.

2.2 - Protocole expérimental

C'est un test court d'une durée de 8-9 jours, utilisant des cellules embryonnaires en culture primaire ou secondaire ayant un taux de transformation très bas. Les cellules sontensemencées sur une couche de cellules appelée couche nourricière.

Cette dernière est obtenue en irradiant les cellules (DiPaolo et coll., 1969 ; Heidelberg, 1969) ou en les traitant à la mitomycine C (MMC). L'irradiation des cellules par les rayons X (ou par MMC) a pour but d'arrêter l'activité mitotique des cellules sans toutefois inhiber leur métabolisme, dont les produits vont permettre aux cellules-cibles de se multiplier et de former des colonies. La procédure utilisée concernant l'adjonction des substances est celle développée par DiPaolo (1980) et modifié par Lu (1988).

Technique : 200 cellules SHE sont ensemencées par boîte de Pétri de 60 mm de diamètre dans 5 ml de milieu complet (H16 modifié pH 6,7 + SEV 15 %) et

mélangées avec 40.000 cellules SHE irradiées (5-6000 Rads : 50.60 G) constituant la couche nourricière. Le test de transformation s'effectue à 37°C et 10 % CO₂. Le protocole diffère selon que la substance est testée comme cancérigène complet, initiateur ou promoteur (Figure 6).

Effet initiateur

La substance à tester est ajoutée 24 heures après l'ensemencement et laissée en contact 24 heures. Le milieu contenant la substance initiateur est enlevé et renouvelé par du milieu neuf contenant le promoteur connu, TPA. 4 jours après, une seconde addition de TPA est faite, sans changement de milieu. Au 8ème jour, les boîtes sont fixées à l'éthanol (10 min) et colorées au Giemsa 10 % (20 min).

Effet promoteur

24 heures après l'ensemencement, les cellules sont traitées avec un initiateur connu, le BaP (à faible dose, non transformante). Le lendemain, le milieu est remplacé par du milieu neuf contenant le produit à tester comme promoteur.

4 jours après, une deuxième dose du produit à tester est ajoutée sans renouvellement du milieu. La coloration des boîtes est effectuée au 8ème jour de culture.

Effet transformant complet

La substance est mise dans les boîtes, 24 heures après l'ensemencement puis laissée en contact avec les cellules jusqu'au 5ème jour, puis le milieu est renouvelé jusqu'à la fixation et coloration. Dans tous les cas, la concentration maximale en solvant est de 0.5 % (acétone, DMSO).

2.3 - Choix du milieu utilisé lors de la transformation

Leboeuf et Kerchaert (1986, 1987, 1988) ont récemment montré que le choix d'un milieu H16 modifié à pH 6.7 c'est à dire dont le taux en bicarbonate de sodium a été abaissé à 750 mg/l, favorisait une efficacité de transformation plus élevée pour les témoins positifs qu'à pH 7.4. Les travaux de Tu et al. (1990) ont également démontré que dans ces conditions d'étude avec un milieu à pH 6.7, le nombre de lots de sérum testés en préliminaire et qui se révélait positif pour l'efficacité de clonage était plus élevé qu'à pH 7.4.

Nous avons donc commandé un milieu DMEM-H16 modifié à pH 6.7 (composition en annexe) et avons réalisé toutes les expériences de transformation (J0 à J8) et d'ODC sur SHE dans ces conditions de culture.

2.4 - Mesure de l'activité ODC sur les cellules SHE au cours du test de transformation.

Les cellules SHE ont étéensemencées classiquement comme pour un test de transformation. Le test est effectué à différents jours de la transformation : les boîtes sont rincées 2 fois avec du tampon PBS puis congelées à -80°C jusqu'au jour du dosage.

Les cellules sont ensuite décollées à l'aide d'un rubber-policeman dans 50 µl de Tris-HCl. L'ensemble est prélevé et déposé dans une boîte costar 12 puits pour faciliter le dosage.

1 boîte de pétriensemencée et traitée correspond à un puits de la boîte de dosage. Celui-ci est le même que pour le dosage direct d'ODC dans les boîtes costar^R 12 puits (paragraphe 1.3).

III - ETUDE DE L'INTERACTION DES ENZYMES PROTEOLYTIQUES SUR L'ACTIVITE ODC.

3.1 - Etude de l'activité des cystéines protéases

3.1.1. - Traitement des cellules épithéliales

Les cellules épithéliales Ctr et BPe sontensemencées à raison de 120.000 cellules par boîte de Pétri de 10 ml. Lorsque les cellules ont atteint la confluence, celles-ci sont traitées selon le protocole suivant :

1. Enlever le milieu et rincer avec un milieu H21 à 0.1 % de BSA.
2. Ajouter ensuite 6 ml de milieu H21 + 0.1 % BSA contenant le produit chimique étudié :

Série 1 : témoin acétone

Série 2 : TPA (0.025 µg/ml)

Série 3 : DXME (5.5 µg/ml)

Série 4 : TPA + (DXME) t0

Série 5 : TPA + (DXME) t3

3. Remettre les boîtes à l'étuve à 37°C, 10 % CO₂ pendant toute la durée de l'expérience (4 heures).

Après les 4 heures de traitement, on prépare les cellules pour le dosage des cathepsines :

- 1ère partie :**
- 1) prélèvement des 5 ml de milieu dans un tube plastique
 - 2) puis centrifugation à 3500 tours/min, 15-20 minutes à 4°C
 - 3) prélever le surnageant (en notant le volume)
 - 4) congeler et lyophiliser

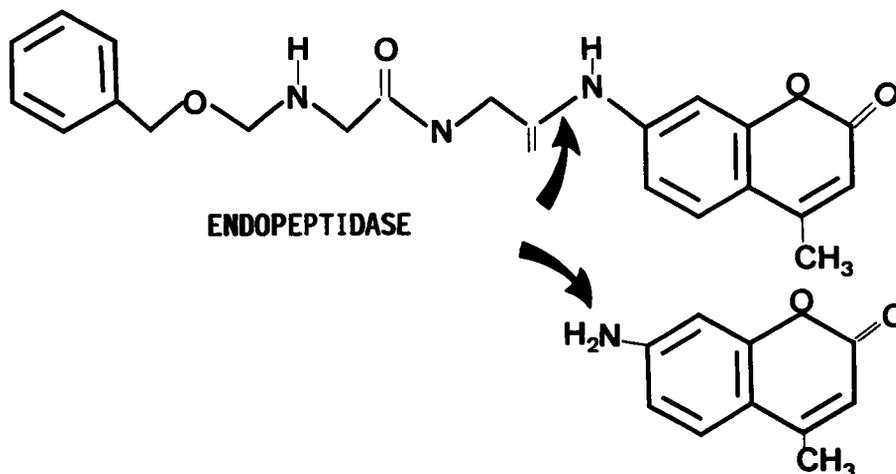
2ème partie : - Aspirer le 1 ml de milieu restant.

- ajouter 1 ml de sérum physiologique
- décoller les cellules avec un rubber-policeman
- ajouter de nouveau 1 ml de sérum physiologique
- prélever ces 2 ml dans un tube plastique
- rincer la boîte avec 2 ml de sérum et les ajouter aux précédant 2 ml
- ajouter un même volume d'une solution à 0.2 % de Triton X-100
- mélanger avec une pipette environ une vingtaine de fois la solution
- congeler 5 min à -20°C
- décongeler et centrifuger à 3500 tours/min, 15-20 min à 4°C
- prélever le surnageant, en notant son volume
- concentrer l'enzyme dans la solution par congélation et lyophilisation

III.1.2 - Dosage biochimique des cathepsines L, B et H

a) Principe

L'action des cathepsines sur des substrats type amino-méthyl-coumarinylamides provoque la libération de groupements fluorescents dans le milieu réactionnel :



Ces groupements fluorescents possèdent une longueur d'onde d'excitation de $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$ et d'émission $\lambda_{em} : 433 \text{ nm}$. On enregistre alors l'intensité de la fluorescence en fonction du temps à 30°C, ce qui permet de déterminer l'activité

éventuelle d'une cathepsine et sa spécificité selon le traitement subi par les cellules, et le substrat utilisé lors du déclenchement de la réaction enzymatique (Pagano et al., 1986).

b) Technique

On mesure l'activité des cathepsines L, B et H dans le lysat et dans le milieu de culture préalablement lyophilisés, des cellules épithéliales Ctr et BPE.

- Protocole :**
1. addition de 1/10^e d'eau distillée par volume de lyophilisation mesurée préalablement
 2. ajouter ensuite 50 µl de cette suspension dans 440 µl de tampon phosphate pH 6.0 ou pH 6.8 selon la cathepsine recherchée
 3. puis 10 µl de substrat (9 mM)
 4. incuber dans une étuve à 37°C
 5. stopper la réaction avec 250 µl de TCA 3 % + 250 µl tampon acétate de sodium 0.1 M, pH 4.3
 6. diluer au 1/100^{ème} pour effectuer la lecture au spectrofluorimètre (λ_{ex} : 347 nm - λ_{em} : 440 nm). La dilution se réalise dans du Brij 0.1 %.

La composition des tampons est donnée en annexe.

Les substrats pour les dosages des cathepsines sont les suivants :

- Zphe Arg NHMec à pH 6.00 pour l'expression de la cathepsine L
- Z Arg Arg NHMec, pH 6.00 pour la cathepsine B
- Arg NHMEc à pH 6.80 pour la révélation de l'activité de la cathepsine H

3.2 - Etude de l'activité des sérines protéases

3.2.1.- Traitement des cellules

Les cellules (épithéliales Ctr, BPe et SHE) sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 10 ml et traitées à confluence.

Protocole suivi :

- ôter le milieu
- rincer avec du milieu à 0.1 % en BSA (pour les cellules épithéliales et 0.5 % en BSA pour les cellules SHE).
- addition de 4 ml de milieu + différentes substances à la concentration désirée
- durée du traitement : 4 heures pour les cellules épithéliales
5 heures pour les cellules SHE

Préparation des cellules :

- congeler à -80°C les 4 ml de milieu par boîte de Pétri
- laver les boîtes avec du PBS 2-3 ml
- gratter les cellules avec un rubber-policeman dans 1,5 ml de tampon Tris-HCL 50 mM, pH 7.4
- agiter et congeler les cellules à -20°C pendant 15 minutes
- après décongélation, centrifuger à 3500 tours/min pendant 20 minutes à 4°C
- récupérer le surnageant (fraction cytosolique)
- traiter ensuite le culot avec 200 µl d'un mélange tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 + 0.1 % Triton X-100
- agiter pendant 1 minute
- congeler 15 minutes à -20°C
- centrifugation à 3500 tours/20 minutes à 4°C
- congélation du surnageant (fraction particulaire)

3.2.2 - Electrophorèse sur gel de gélatine et révélation de l'activité enzymatique : zymogramme

a) Principe de l'électrophorèse zonale en tampons discontinus

L'électrophorèse en système discontinu permet de concentrer les protéines préalablement diluées dans l'échantillon en des zones extrêmement fines avant que celles-ci ne soient séparées en fonction de leur charge nette et de leur taille dans le gel résolutif. Le système électrophorétique comprend plusieurs tampons et un gel de stacking en amont du gel résolutif ; la matrice inerte dans laquelle les protéines migrent est composée d'un gel de polyacrylamide fortement réticulé.

L'addition d'un surfactant polyanionique comme le SDS entrant dans la composition des gels, fait que les protéines du mélange se comporteront comme des anions. Le SDS se lie aux régions hydrophobes de la molécule protéique provoquant son déroulement en chaînes polypeptidiques, ou la libérant de son association avec d'autres molécules protéiques ou lipidiques. Toutes les protéines ont donc la même charge nette et migrent vers l'électrode positive quand on applique une tension. Le seul critère de séparation sera donc la taille des protéines qui migrent et se séparent sous forme de fines bandes en fonction de leur densité de charge.

Le zymogramme est une électrophorèse discontinue dans laquelle le substrat (gélatine ou caséine) est inclus dans le gel résolutif pour permettre l'expression des protéines enzymatiques. Après incubation en présence de CaCl_2 , l'activité protéolytique se traduit par des plages de lyse du substrat. Après coloration et

séchage du gel et photographie en couleur, nous mesurons par densitométrie la surface et l'intensité des plages d'hydrolyse du substrat.

b) Technique

1) Constitution du gel de résolution

| | pour une plaque de 45 ml |
|--|--------------------------------------|
| . acrylamide 30 % | 11 ml |
| Bis acrylamide 1 % | |
| . tampon Tris 1,5 M pH 8.8 | 11.25 ml |
| . glycérol SDS | 9 ml |
| . Gélatine (dissolution 15 min dans l'étuve à 56°C) | 5.4 mg dans 7.56 ml H ₂ O |
| . SDS 2 % | 0.9 ml |
| . TEMED | 32.4 µl |

Dégazage de l'ensemble de la solution

| | |
|--|--------|
| . persulfate d'ammonium à 25 % (préparation extemporanée) | 240 µl |
|--|--------|

Couler le gel et ajouter un film d'eau bidistillée pour aplanir la surface. Le temps de polymérisation est d'environ 1h. - 1h.30 à température ambiante (20°C).

2) Stacking gel

| | pour une plaque 15 ml |
|------------------------------|-----------------------|
| . acrylamide 30 % | 5.25 ml |
| Bis acrylamide 1 % | |
| . tampon Tris 1M, pH 6.8 | 5.25 ml |
| . SDS 2 % | 150 µl |
| . H ₂ O distillée | 5.4 ml |
| . TEMED | 9 µl |

Dégazer le mélange

| | |
|--------------------------------|-------|
| . persulfate d'ammonium à 25 % | 45 µl |
|--------------------------------|-------|

Couler le gel après avoir retiré le film d'eau bidistillée et glisser le peigne (épaisseur 1.5 mm - 15 dents). Temps de polymérisation : 1 heure.

3) Tampon d'incubation pour échantillon

- . tampon Tris 1M, pH 6.8 2 ml
- . SDS 10 % 2 ml solution mère se
- . glycérol 100 % 2 ml conservant à 4°C
- . bleu de bromophénol à 0.4 % 2 ml

Prélever 40 µl de la solution tampon d'incubation plus 50 µl d'échantillon (particulaire ou cytosolique), bien mélanger et déposer les 90 µl dans un puits.

- . Prévoir un puit pour le "standard" : 20 µl de marqueur "Amersham"
+ 20 µl sol. tampon d'incubation

4) Tampon d'électrophorèse, pH 8.3

- . tampon Tris 0.025 M 30.3 grammes
- . glycine 0.192 M 144.4 grammes
- . SDS 0.1 % 10 grammes

qsp 1000 ml eau bidistillée

Amener à pH 8.3 et diluer au 1/10e cette solution lors de l'emploi. Cette solution est utilisée pour la migration du courant dans la cuve d'électrophorèse.

- . laisser migrer le gel une nuit à 40 volts.

5) Solution de lavage

24 heures après, on stoppe l'électrophorèse et on procède au lavage du gel par une solution de Triton X-100 à 2.5 %, pendant 1 heure avec agitation légère. Le lavage a pour but d'enlever le SDS qui est à la longue dénaturant.

6) Tampon d'incubation n° 2

- . tampon Tris 0.1 M 6.05 grammes
- . CaCl₂ 10 mM 0.73 grammes

qsp 500 ml, pH 7.4

- . ôter la solution de lavage et ajouter le tampon d'incubation
- . laisser 48 heures à 37°C, sans agitation. Ce deuxième tampon a pour rôle de révéler l'expression de l'activité enzymatique.

7) Coloration

- . bleu de coomassie 0.5 %
- . acide acétique 10 %
- . propanol-2 30 %
- . colorer pendant 30 à 40 min. à température ambiante, sans agitation.

8) Décoloration

- . acide acétique 75 ml
- . méthanol 50 ml
- qsp 1000 ml
- . laisser 48 heures à température ambiante. Le gel se conserve ensuite indéfiniment.

Le bleu de coomassie colore l'ensemble du gel en bleu en se fixant aux protéines (gélatine). L'incubation à pH 7.4 permet la détection des protéases par hydrolyse des gélatines réparties dans le gel. Les bandes blanches révélées correspondent à la surface de lyse.

IV - TRAITEMENT ET ETUDE DE L'EXPRESSION DU GENE ODC

Pour faciliter l'analyse de l'induction de l'ARN messager du gène ODC par les techniques de biologie moléculaire, les cellules sont soumises au préalable à des conditions de culture restreinte. Pour cela, la concentration du sérum du milieu est ramenée à 0.5 % pendant 18 heures ; ensuite le traitement par le cancérogène se fait dans le milieu DMEM-H21 0.1 % BSA pour les cellules épithéliales et DMEM-H16 5 % sérum pour les cellules SHE.

Les cellules sont alors grattées dans 2 x 1 ml PBS, centrifugées à 1000 tours/min pendant 10 min. Les culots sont ensuite congelés à -80°C.

4.1 - Protocole d'extraction de l'ARN

Toutes les solutions (annexe) et les tubes eppendorfs sont filtrés ou autoclavés pour être exempts de toutes traces de RNase. Il est donc impératif de manipuler avec des gants et de travailler dans la glace.

Le protocole d'extraction de l'ARN utilisé est une modification de celui mis au point par Birboim (1988).

- 1 - Addition de 400 µl de solution RES sur le culot cellulaire. Remettre en suspension et déposer dans un eppendorf + 40 µl d'une solution de protéinase K (1 mg/ml) vortexer et mettre au bain-marie 50°C pendant 30 min.
- 2 - puis ajouter 27 µl d'une solution NaAc 3M + 933 µl d'éthanol 95 % froid. vortexer et mettre au congélateur -20°C, 20 min.
- 3 - Centrifuger ensuite 10 min. à 4°C
- 4 - Enlever complètement le surnageant. Ajouter 450 µl de solution RES +

- 25 µl de protéinase K (1 mg/ml). Remettre au bain-marie 50°C 30 min.
- 5 - Ajouter 50 µl d'un mélange phénol/chloroforme/isoamyl (25v/24v/1v, pH 8). Vortexer et centrifuger 2 min.
 - 6 - On obtient 2 phases. Prélever la première phase (phase aqueuse) et déposer l'ependorf dans la glace.
 - 7 - Ajouter 50 µl d'une solution RES sur ce qui reste dans le premier tube. Vortexer et centrifuger 2 minutes.
 - 8 - De nouveau 2 phases : prélever la phase du dessus et l'ajouter au premier prélèvement.
 - 9 - sur le mélange de ces 2 phases : ajouter 50 µl d'un mélange chloroforme/isoamyl. Centrifuger de nouveau 2 min.
 - 10 - obtention de 2 phases : prélever la phase aqueuse et la mettre dans un nouvel eppendorf. Ajouter 3.75 µl d'acide acétique 2M et 0.5 ml LiCl/Ethanol Vortexer et mettre à précipiter dans la glace (0°C) le RNA pendant 1 nuit.
 - 11 - Centrifuger ensuite pendant 2 min - 13 rpm x 10000 - 4°C . ôter complètement le surnageant (contamination d'ADN)
 - 12 - Ajouter 100 µl de CCS sur chaque culot et remettre en suspension plusieurs fois à la pipette.
 - 13 - Précipiter de nouveau avec 5 µl de NaAc 3M + 300 µl d'éthanol 95 % froid. Vortexer et mettre à -20°C pendant 10 minutes minimum.
 - 14 - Centrifuger 10 minutes à 13 x 1000 rpm à 4°C. Enlever le surnageant. Ajouter 300 µl d'éthanol 70 % froid. Vortexer et centrifuger à froid 5 minutes.
 - 15 - Enlever le surnageant et sécher les culots dans un bain d'éthanol/glace 10 min.
 - 16 - Ajouter 25 µl de solution TE. Attendre 2 à 3 min. et remettre en suspension. Vortexer.
 - 17 - Ajouter 50 µl d'une solution "Urea Layer Mix" dans un nouvel eppendorf + 5 µl d'échantillon ; faire un témoin avec 5 µl de RNA pur. Déposer sur un gel 1 % agarose dans du tampon borate + bromure d'éthidium. Migration 1 heure 70 volts. Ce gel permet de contrôler l'intégrité de notre RNA.

4.2 - Northern blot

- 1 - Préparer un gel 1 % agarose dans du tampon Borate. Autoclaver l'ensemble pour qu'il soit exempt de RNase.

- 2 - Déposer un mélange 10 µl extrait RNA + 10 µl "urea layer mix". Prévoir un contrôle RNA pur.
- 3 - Mettre à migrer 2 heures - 74 volts (60 mA)
- 4 - Après migration, préparer 2 feuilles de papier Whatman déposées sur le support d'un 2ème système d'électrophorèse. Les extrémités des 2 feuilles plongent dans une solution 20 SSC. Le gel de migration est déposé sur le papier Whatman. Déposer ensuite un filtre Hybond N⁺ tout contre le gel en chassant bien l'air. Puis ajouter un ensemble de feuilles Whatman et un poids pour qu'il y ait le maximum de contact, c'est à dire pour faciliter le transfert entre le filtre et le gel durant la nuit à température ambiante.

4.3 - Hybridation

- 1 - Prélever le filtre Hybond N⁺ et le mettre à incuber dans une solution 0.05 N NaOH - 5 min.
- 2 - Ensuite rincer le filtre dans une solution 2 SSC pendant 5-10 minutes.
- 3 - Préparer une solution de "préhybridation" :
 - 1 M NaCl
 - 1 % SDS
 - 10 % Dextran SulfateAjouter 100 µg/ml d'ADN froid de sperme de hareng. Mettre le filtre Hybond N⁺ dans cette solution et incuber au bain marie 65°C pendant 15 minutes minimum.
- 4 - L'hybridation se fait pendant une nuit à 65°C avec agitation en présence d'une sonde cADN marquée au ³²phosphore. La sonde cADN est ajoutée directement dans la solution de préhybridation où se trouve le filtre. La sonde cADN-³²P a été préparée par nos soins à partir d'un fragment de 937 bp provenant du gène ODC cloné à partir de cellules rénales de rat (Van Kranen, 1987).

4.4 - Autoradiographie

- 1 - Après incubation avec la sonde marquée, rincer 2 fois le filtre Hybond N⁺ avec du tampon 2 SSC.
- 2 - Ajouter ensuite du tampon 2 SSC - 0.1 % SDS. Remettre en agitation pendant 30 min à 65°C.
- 3 - Rincer une seconde fois le filtre avec ce même tampon, de nouveau 30 min.

4 - Placer ensuite le filtre sur une plaque pour révélation.

Au bout de 30 minutes, grâce à un système performant Phosphore Image, (Biosystem-Applied) on peut déjà avoir une image du blot.

L'autoradiographie continue pendant 24 heures. La plaque pour révélation permettra ainsi de quantifier l'ODC-ARNm produit par les cellules soumises aux différents traitements chimiques.

5 - Le filtre est placé sur un film photographique et l'ensemble est conservé dans un boîtier à -70°C pendant quelques jours.

RESULTATS

1ère Partie : Etude de l'induction de l'activité ODC par le TPA.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, l'application topique de TPA sur la peau de souris entraîne régulièrement une stimulation de l'ODC dans les cellules cibles épidermiques, une réaction inflammatoire dermique, et à plus long terme la formation de tumeurs.

Pour se rapprocher des conditions expérimentales, nous avons étudié l'action spécifique du TPA sur l'induction d'ornithine décarboxylase dans des cellules proches de l'état normal (cellules épithéliales Ctr) mais aussi à une étape avancée de transformation (cellules traitées par le benzo(a)pyrène BPe).

1 - Etude de l'induction de l'activité ODC dans les 2 lignées de cellules épithéliales, Ctr et BPe.

1.1 - Cinétique d'induction de l'ODC par le TPA

Les conditions de traitement des cellules Ctr et BPe ont été précédemment déterminées dans notre laboratoire. Il est apparu que le TPA à la dose testée classiquement *in vitro* (0.16 μ M soit 0.1 μ g/ml) s'est révélé beaucoup trop toxique pour les cellules épithéliales. De plus le traitement des cellules 10 % de sérum dans le milieu a fait apparaître non seulement une forte stimulation de l'activité ODC mais également une grande variabilité des résultats inter-expérimentaux. Nous avons donc :

- substitué le sérum par 0.1 % de BSA et
- utilisé le TPA à la concentration de $4 \cdot 10^{-8}$ M soit 0,025 μ g/ml

Les premières expériences (fig. 7) montrent que $4 \cdot 10^{-8}$ M (0,025 μ g/ml) de TPA dans un milieu contenant 0.1 % BSA-DMEM H21, est la concentration optimale pour induire une augmentation de l'activité ODC sans interférence avec des effets toxiques. On peut constater que le taux ODC induit par le TPA est nettement plus important chez les cellules témoins Ctr. Cette activité augmente de 4 fois par rapport au taux basal après 4 heures de traitement, et de 7 fois après 6 heures.

Chez les cellules traitées BPe transformées, l'induction d'ODC est plus faible : 2 fois supérieure au taux basal après 4 heures de traitement et 4,5 fois au bout de 6 heures.

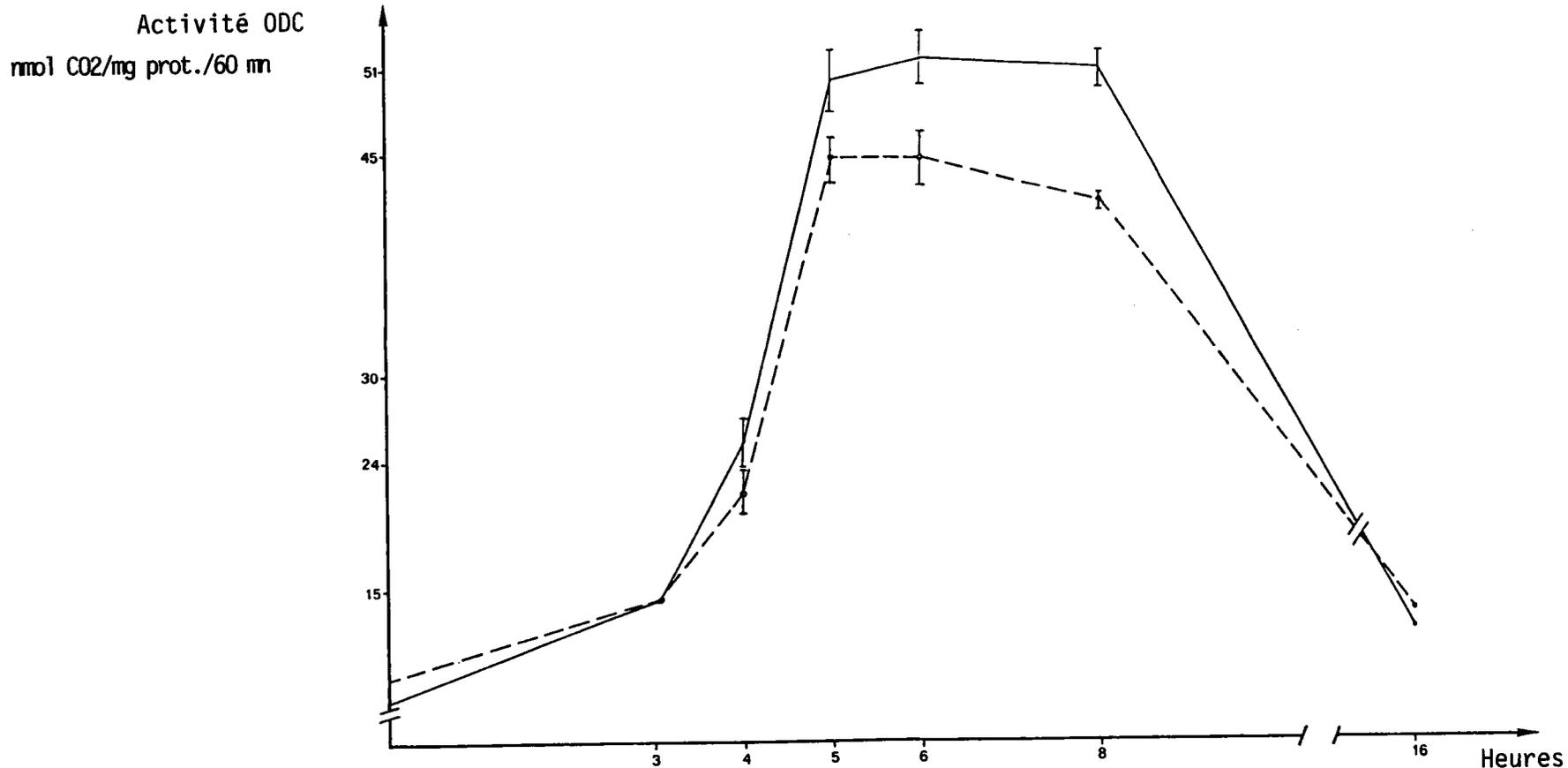


Figure 7 - Cinétique d'induction de l'ODC par le TPA dans les 2 lignées de cellules épithéliales Ctr et BPe.

Les cellules sont traitées par $4 \cdot 10^{-8}$ M de TPA à différents temps d'incubation. A la fin de l'expérience, les cellules sont rincées au PBS puis congelées à -80°C jusqu'au dosage de l'ODC.

Moyenne de 2 expériences réalisées en triplicata.

Globalement, on peut constater que l'induction d'ODC représente déjà 2 fois le taux basal après 2 heures de traitement, atteint un plateau entre 6 et 8 heures, et revient au taux basal au bout de 16 heures de traitement.

A la vue de ces résultats, nous avons donc choisi comme durée de traitement $t = 4$ heures, temps suffisant pour obtenir une induction mesurable de l'activité ODC dans les cellules épithéliales pulmonaires.

Après avoir contrôlé que nos cellules étaient sensibles à l'action du TPA, nous avons également vérifié les changements dans l'activité ODC de nos 2 lignées cellulaires Ctr et BPe à l'aide d'un inhibiteur de l'ODC, le DFMO.

1.2 - Modulation de l'ODC par un inhibiteur irréversible, le DFMO.

Nous avons réalisé une série d'expériences avec le DFMO, (α -difluorométhyl-ornithine). Ce produit agit comme substrat-suicide de l'enzyme (Takigawa et al., 1982) et permet de contrôler l'activité ODC de nos 2 lignées de cellules épithéliales, Ctr et BPe.

Après avoir déterminé la dose de DFMO efficace ($1.25 \cdot 10^{-5}$ M), l'inhibiteur a été testé seul, en association simultanée avec le TPA (t_0) ou en traitement différé de 3 heures (t_3). A la fin, les boîtes de cellules sont toujours soigneusement lavées au PBS pour enlever toute trace de DFMO.

L'ODC synthétisée par les cellules Ctr apparaît être sensible à l'action du DFMO, α -difluorométhyl-ornithine. On constate qu'après 4 heures de traitement (Tableau 3), le DFMO inhibe de 50 % l'activité ODC par rapport au taux basal-acétone (4.17 contre 7.37 nmol CO₂/mg prot./60 mn). Il en est de même lorsque le DFMO est ajouté au TPA : simultanément (t_0), l'inhibiteur diminue d'environ 40 % l'induction de l'ODC par le TPA ; cette inhibition est d'environ 20 % (21.80 : 25.57 nmol CO₂/mg prot./60 mn) lorsqu'il n'y a qu'une heure de contact du DFMO avec les cellules. L'inhibition de l'ODC par le DFMO par rapport au taux basal-acétone est d'autant plus forte que le produit a été en contact plus longtemps avec les cellules ; entre 4 et 6 heures, les proportions sont les suivantes : 4.17 : 7.37 et 2.80 : 8.85 nmol CO₂/mg prot./60 mn.

Les cellules BPe sont beaucoup plus sensibles à l'action du DFMO puisque l'inhibition de l'ODC est de 80 % par rapport au taux basal acétone après 4 heures de traitement, et cette inhibition reste similaire après 6 heures de traitement.

On retrouve également une diminution de l'activité ODC lorsque le DFMO est ajouté simultanément (t_0) ou différé de 3 heures (t_3) par rapport au TPA.

TABLEAU 3 : Inhibition de l'ODC par un substrat-suicide, le DFMO dans les cellules épithéliales Ctr et BPe

| Lignée cellulaire | Temps de traitement | Traitement | Activité ODC nmolCO ₂ /mgprot /60 mn | Facteur de variation | |
|----------------------------|---------------------|------------------------------|---|----------------------|------|
| Ctr | 4 h. | Acétone | 7.37 ± 0.8 | 1 | |
| | | DFMO 1.25 10 ⁻⁵ M | 4.17 | 0.57 | |
| | | TPA 4 10 ⁻⁸ M | 25.57 ± 1.7 | <u>3.47</u> | |
| | | TPA + DFMO, t0 | 15.17 ± 0.37 | 2 | |
| | | TPA + DFMO, t3 | 21.80 ± 0.86 | 2.87 | |
| | 6 h. | Acétone | 8.85 ± 1.0 | 1.2 | |
| | | DFMO | 2.80 ± 0.7 | 0.4 | |
| | | TPA | 52.10 ± 1.9 | <u>7.4</u> | |
| | BPe | 4 h. | Acétone | 10.05 ± 1.0 | 1 |
| | | | DFMO 1.25 10 ⁻⁵ M | 2.5 | 0.25 |
| TPA + 4.10 ⁻⁸ M | | | 22.30 ± 1.6 | <u>2.2</u> | |
| TPA + DFMO, t0 | | | 5.6 ± 0.12 | 0.56 | |
| TPA + DFMO, t3 | | | 15.6 ± 2.25 | 1.55 | |
| 6 h | | Acétone | 10.80 ± 0.9 | 1 | |
| | | DFMO | 2.90 ± 0.6 | 0.3 | |
| | | TPA | 45.60 ± 1.8 | <u>4.5</u> | |

Les cellules épithéliales sont traitées pendant 4 et 6 heures avec du TPA (0.025 µg/ml). Le DFMO est ajouté dans le milieu simultanément (t0) ou différé de 3 heures par rapport à l'ester de phorbol (t3).

Les résultats de l'activité ODC (exprimée en nmoles de CO₂ par mg de protéines après 60 mn d'incubation) représentent la moyenne de 3 expériences en triplicata (M ± SD).

1.3 - Détermination de l'activité ODC après traitement multiple par le TPA

Comme nous l'avons rapporté précédemment dans l'introduction, *in vivo*, le TPA est toujours utilisé de façon prolongée avec de multiples traitements. De façon similaire, nous avons étudié *in vitro* l'action du TPA en traitements répétés sur les cellules épithéliales Ctr et BPe.

Les cellules épithéliales ont été traitées dans un premier temps avec du TPA pendant 2 heures. Puis le milieu a été changé et remplacé par du milieu DMEM H21 10 % SEV pendant 24 ou 48 heures, temps de latence entre le premier et le second traitement par le TPA (ou par l'acétone) pour une durée de 5 heures (milieu 0.1 % BSA). L'intervalle de temps retenu, 24 ou 48 heures, correspond à peu près à un multiple du temps de doublement des cellules Ctr et BPe, qui est de 22-23 heures. Le Tableau 4 nous montre : (1) que pour les cellules Ctr, le 1er traitement par le TPA conduit à une forte stimulation de l'activité ODC : 5.8 fois plus importante que le taux basal acétone. Par contre, lorsque les cellules ont été prétraitées par le TPA et qu'elles reçoivent un second traitement à 24 heures d'intervalle, on observe une diminution de 25 % de l'activité ODC dans les cellules épithéliales témoins Ctr (31.70 contre 42.25 nmoles CO₂/mg prot./60 mn). Cette diminution d'activité ODC n'est plus que de 15 % lorsque l'intervalle de temps séparant les 2 traitements par le TPA est de 48 heures.

(2) que les cellules BPe sont également sensibles à l'action du TPA en premier traitement : l'activité ODC est stimulée 3.6 fois plus que le taux basal acétone. De même lorsque les cellules reçoivent un premier traitement de TPA puis un second à 24 ou 48 heures d'intervalles, la diminution de l'activité ODC est également observée et représente environ 50 % par rapport au témoin TPA (14.70 et 15 nmoles contre 29.90 nmoles de CO₂/mg prot./60 mn).

Le traitement répété par le TPA provoque une désensibilisation des cellules vis à vis du cancérigène. Ce phénomène de modulation régressive sera pris en considération dans nos expériences cellulaires.

TABLEAU 4 - Modulation régressive de l'activité ODC après traitement multiple par le TPA, dans les cellules épithéliales Ctr et BPe.

| Lignée cellulaire | 1er traitement 0 h. | 2ème traitement 24 h. 48 h | activité ODC nmoles CO ₂ /mg protéine/60 mn | Facteur de variation | |
|-------------------|------------------------|------------------------------------|--|-------------------------|------------|
| Cellules Ctr | 1. Acétone | Acétone | 7.20 ± 0.8 | 1 | |
| | 2. Acétone | TPA | 42.25 ± 1.7 | <u>5.8</u> | |
| | 3. TPA | Acétone | 8.40 ± 0.8 | 1.1 | |
| | 4. TPA | TPA | 31.70 ± 1.5 | <u>4.4</u> | |
| | 5. Acétone | | Acétone | 6.90 ± 0.6 | 1 |
| | 6. Acétone | | TPA | 36.60 ± 0.9 | <u>5.3</u> |
| | 7. TPA | | Acétone | 7.00 ± 0.7 | 1 |
| | 8. TPA | | TPA | 31.30 ± 1.6 | <u>4.5</u> |
| | | | | | |
| Cellules BPe | 1. Acétone | Acétone | 8.10 ± 0.7 | 1 | |
| | 2. Acétone | TPA | 29.20 ± 1.8 | <u>3.6</u> | |
| | 3. TPA | Acétone | 8.70 ± 1.0 | 1 | |
| | 4. TPA | TPA | 14.70 ± 1.4 | <u>1.8</u> | |
| | 5. Acétone | | Acétone | 7.90 ± 0.8 | 1 |
| | 6. Acétone | | TPA | 27.70 ± 1.4 | <u>3.5</u> |
| | 7. TPA | | Acétone | 7.70 ± 0.6 | 1 |
| | | TPA | 15.00 ± 1.7 | <u>1.9</u> | |

. TPA à la concentration de $4 \cdot 10^{-8}$ M dans le milieu DMEM H21 - 0.1 % BSA.

Après 2 heures du 1er traitement, le milieu est changé ; le second traitement a lieu 24 heures ou 48 heures après et le TPA est laissé en contact avec les cellules pendant 5 heures.

Les résultats de l'activité ODC représentent la moyenne de 4 expériences en triplicata.

1.4 - Action successive du Benzo(a)pyrène et du TPA : modèle initiation-promotion

Pour simuler *in vitro* le test de cancérogénèse en deux étapes : initiation - promotion, nous avons étudié l'action successive en 2 étapes de l'hydrocarbure benzo(a)pyrène et du TPA sur les cellules épithéliales proches de la normale, Ctr.

Après avoir déterminé la dose de BaP non toxique pour les cellules Ctr, le BaP a été ajouté dans le milieu à différents temps avant le traitement par le TPA. Les

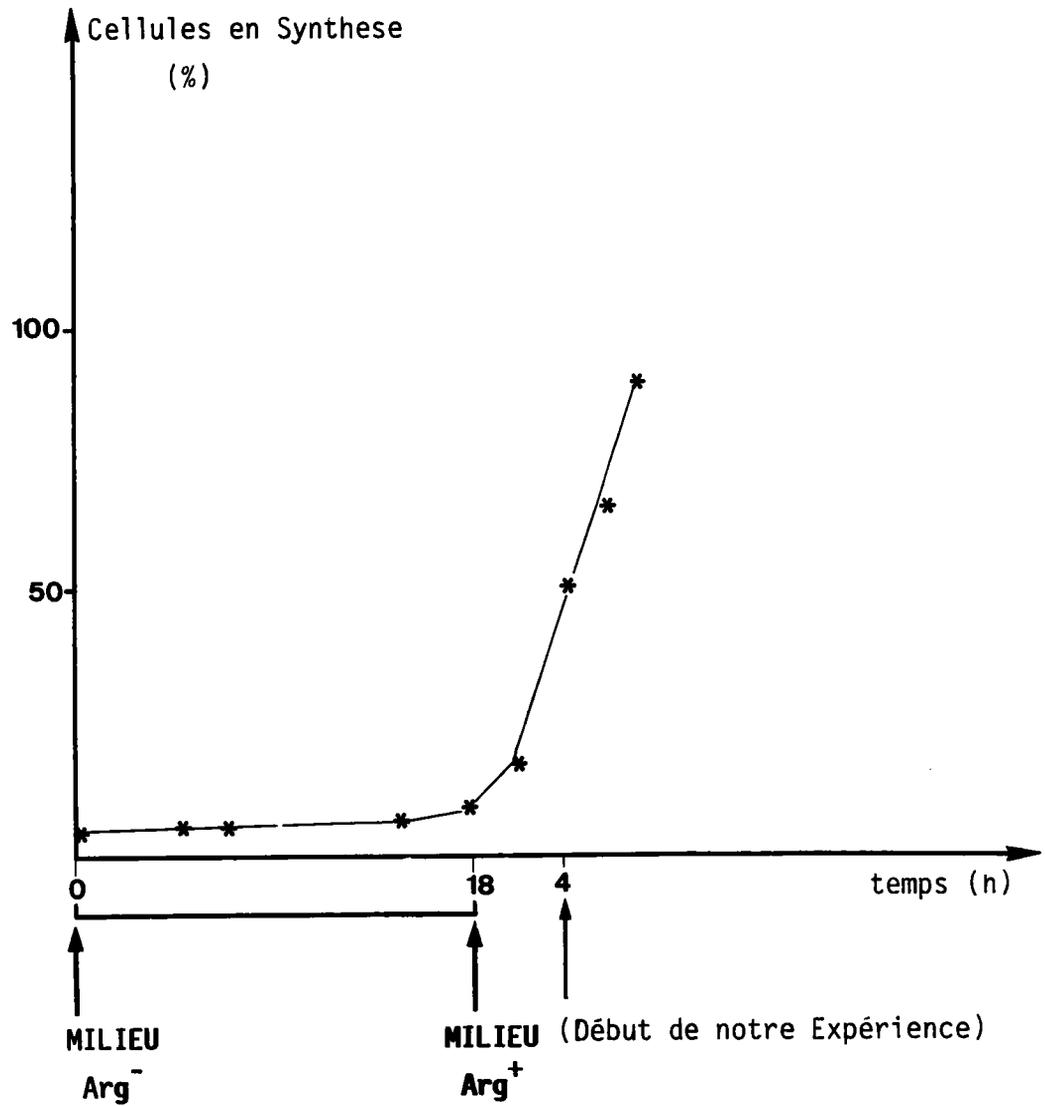


Figure n°8 : Pourcentage de cellules en synthèse après 18 heures de carence en arginine et un déblocage de la synthèse répliquative par addition d'arginine. (D'après Gentil et al., 1976).

résultats du tableau 5 montrent que si le BaP est employé seul ou peu de temps avant le TPA, nous observons peu de modification dans l'activité ODC (moyenne de 450 nmol CO₂/mg prot./60 mn). Plusieurs travaux ont démontré que les métabolites du BaP forment des adduits dans l'ADN, il semblerait que dans ce traitement à court-terme les métabolites du BaP n'ont pas d'effet sur le gène ODC puisque le taux basal ODC ne change pas et que le gène est toujours stimuable par le TPA.

A long terme, nous avons traité les cellules pendant 20 heures avec du BaP suivi par un traitement avec du TPA pendant 4 heures (tableau 6).

On constate que lorsque le BaP est ajouté pendant 20 heures, quelle que soit la concentration (1 ou 2 µg/ml), il y a diminution de l'activité ODC basale. Par contre, en présence du TPA, la stimulation redevient équivalente au groupe non traité par le BaP (environ 140 nmol CO₂/mg prot./60 mn). Il y a donc inhibition du gène ODC par les métabolites du BaP. Mais le gène conserve toutefois son intégrité puisqu'il reste stimuable par le TPA : il n'y aurait pas dénaturation du gène ODC par le BaP.

TABLEAU 5 : Action successive du Benzo(a)pyrène et du TPA sur l'induction d'ODC dans les cellules épithéliales Ctr. Action à court-terme.

| Traitement des cellules épithéliales Ctr | | Activité ODC |
|---|---------|--------------------------------------|
| ----- | | nmol CO ₂ /mg prot./60 mn |
| 4 heures | | |
| | Acétone | 55.49 ± 1.59 |
| | TPA | 435.62 ± 10.62 |
| | BaP | 53.36 |
| BaP t0 | TPA | 406.96 ± 17.68 |
| BaP t-1 | TPA | 442.45 ± 18.95 |
| BaP t-2 | TPA | 470.5 |
| BaP t-3 | TPA | 595.5 ± 11.5 |

Le BaP est ajouté préalablement dans les cultures de cellules épithéliales pendant 1, 2 ou 3 heures. Les cellules Ctr sont ensuite rincées pour ôter toute trace de BaP avant le traitement par le BaP. Dans le groupe t0, le BaP est ajouté simultanément au TPA.

Moyenne des résultats de deux expériences en duplicata (M + SD)

TABLEAU 6 : Action successive du Benzo(a)pyrène et du TPA sur l'induction d'ODC dans les cellules épithéliales Ctr. Action à long-terme.

| Traitement préalable pendant 20 heures | Traitement pendant 5 heures | Activité ODC nmol CO ₂ /mg prot./60 mn. |
|--|-----------------------------|--|
| Milieu | Acétone | 50.30 ± 4.8 |
| Milieu | TPA | 147.28 |
| ----- | | |
| BaP 1 µg/ml | Acétone | 19.66 ± 1.24 |
| BaP 1 µg/ml | TPA | 147.21 |
| ----- | | |
| BaP 2 µg/ml | Acétone | 24.75 |
| BaP 2 µg/ml | TPA | 142 ± 1.75 |

Le BaP est ajouté aux cellules pendant 20 heures dans du milieu DMEM-H21 à 10 % SEV. Le traitement par le TPA est effectué pendant 5 heures dans un milieu DMEM-H21 à 0.1 % BSA. Les cellules sont ensuite soigneusement rincées avec du PBS et congelées à -80°C jusqu'au dosage de l'ODC.

Moyenne des résultats de deux expériences en triplicata (M ± SD).

1.5 - Induction de l'activité ODC dans les cellules Ctr et BPe synchronisées

Les expériences préliminaires réalisées avec le TPA ont montré que le taux d'induction de l'ODC était nettement plus important chez les cellules épithéliales témoins Ctr (taux 4 fois supérieur à celui du témoin acétone) que pour les cellules BPe (rapport 2 : 1) (résultats du paragraphe 1.1). Sachant que l'activité ODC est liée à la synthèse de l'ADN, nous nous sommes posés la question de savoir si cette différence du taux d'ODC entre les 2 types cellulaires ne serait pas liée à une phase différente dans le cycle cellulaire.

Pour vérifier notre hypothèse, nous avons cultivé les cellules dans un milieu déficient en arginine pendant 18 heures ; c'est le temps nécessaire pour l'épuisement complet de l'arginine intracellulaire et pour que les cellules se trouvent à la même phase de division (G₀), correspondant au phénomène de synchronisation de croissance (figure 8).

Les cellules sont ensuite traitées selon le protocole classique dans du milieu DMEM-H21 à 0.1 % de BSA. Le traitement avec le TPA (4.10⁻⁸ M) a lieu exactement

pendant la phase S de la division cellulaire, c'est-à-dire 4 heures après avoir ajouté du milieu avec arginine.

Les résultats (Tableau 7) montrent clairement que le taux d'induction de l'ODC par le TPA est toujours important, à peu près 4 fois le taux d'ODC basal-acétone dans les cellules Ctr (136 : 42 nmol CO₂/mg prot./60 mn). Par contre, pour les cellules BPe, l'ODC induite par le TPA est toujours plus faible, à peine 2 fois supérieure au taux basal (16.65 : 10.55 nmol CO₂/mg prot./60 mn).

La réponse au TPA entre les 2 lignées cellulaires est donc de 4 fois supérieure par rapport au taux basal-acétone pour les cellules Ctr, et de 2 fois pour les cellules BPe. Cette différence observée avec les cellules synchronisées est la même que lorsque nous avons réalisé nos expériences d'induction de l'ODC par le TPA, sans synchronisation préalable (paragraphe 1).

Cette différence de réponse de l'ODC au TPA entre les 2 lignées épithéliales pourrait être due alors soit à une différence dans l'activation du gène ODC (phase transcriptionnelle) soit à une régulation de l'ODC au niveau cytoplasmique (étape post-transcriptionnelle).

TABLEAU 7 : Induction de l'activité ODC par le TPA après synchronisation des cellules Ctr et BPE.

| Lignée cellulaire | Traitement | Activité ODC nmol CO ₂ /mg prot./60 mn | facteur de variation |
|-------------------|--------------------------|--|----------------------|
| Ctr | Acétone | 42.03 + 6.09 | 1 |
| | TPA 4.10 ⁻⁸ M | 136.03 + 7.81 | <u>3.24</u> |
| BPe | Acétone | 10.55 + 0.86 | 1 |
| | TPA 4.10 ⁻⁸ M | 16.65 + 1.40 | <u>1.58</u> |

Après 18 heures de culture en milieu déficient en arginine et 4 heures après la remise du milieu arginine-plus, les cellules sont traitées avec le TPA (4.10⁻⁸ M) dans le milieu DMEM-H21 à 0.1 % BSA. La réaction est stoppée au bout de 4 heures. Les résultats de l'activité ODC représentent la moyenne de 2 expériences en triplicata.

Nos premiers résultats mettent en évidence la sensibilité de nos 2 lignées de cellules épithéliales à l'action de l'ester de phorbol. Les cellules épithéliales témoins (Ctr) et traitées (BPe) présentent un taux d'induction ODC relativement constant par rapport au taux basal, même après plusieurs passages hebdomadaires.

Du point de vue quantitatif, la différence du taux d'induction de l'ODC entre les 2 lignées, 4 : 1 chez les témoins et 2 : 1 chez les cellules transformées, semblent indiquer que les cellules témoins Ctr sont nettement plus sensibles à l'action du TPA.

Pour approfondir cette question, l'étude de l'expression du gène ODC a été réalisée sur ces 2 lignées cellulaires dans le but de déterminer s'il y avait un taux d'ARN messager différent entre elles. Pour faciliter l'exposé, nous avons regroupé les résultats dans une 4ème partie, intitulée étude moléculaire de l'expression du gène codant pour l'ODC.

Les expériences que nous avons réalisées selon une adaptation du schéma de traitement *in vivo* : traitements répétés des cellules témoins par le TPA ou traitement préalable de ces cellules par le BaP puis par le TPA, ne peuvent reproduire exactement les résultats obtenus *in vivo* sur la peau de souris. Ceci démontre l'intérêt d'étudier en parallèle l'action du cancérogène TPA sur 2 lignées de cellules parentales, l'une témoin proche de l'état normal et l'autre à un stade plus avancé de la transformation.

2 - Etude de l'induction de l'activité ODC dans les cellules SHE.

2.1 - Détermination des conditions de culture et de traitement des cellules SHE.

Nous avons testé dans un premier temps, le TPA sur les cellules SHE dans les mêmes conditions décrites précédemment, à savoir un milieu à 0.1 % BSA - DMEM H16.

Ces conditions de cultures se sont avérées inadéquates car nous avons pu observer un état de souffrance des cellules, voire même de décollement, et obtenir des résultats très variables entre 3 puits d'un même traitement.

Nous avons donc testé un milieu DMEM H16 avec une concentration de sérum à 1 % et 5 % (tableau 8) et 2 concentrations de TPA ($4 \cdot 10^{-8}$ M) comme pour les cellules épithéliales, et ($16 \cdot 10^{-8}$ M) dose généralement étudiée en tant qu'effet promoteur dans le test de transformation sur SHE.

N'ayant pas obtenu de grande différence entre 4 et $16 \cdot 10^{-8}$ M, nous avons privilégié la dose de $16 \cdot 10^{-8}$ M de TPA testé avec un milieu DMEM-H16 à 5 % de sérum, pour être le plus proche possible des conditions de traitement utilisées lors

d'un test de transformation cellulaire. Bien que le facteur d'induction de l'ODC par rapport au témoin soit plus important dans un milieu à 1 % de sérum (4.6) que 5 % (2.9), nous avons retenu ce dernier car c'est dans ce milieu que les cellules conservaient leur aspect fibroblastique et n'apparaissaient pas souffrantes.

Pour nous rapprocher le plus possible des conditions de culture lors des tests de transformation, des expériences ont été réalisées avec un milieu D-MEM H16 modifié à pH 6.7 (tableau 9).

Tout comme dans le cas du sérum, nous avons retenu le milieu à pH 6.7 qui donne des valeurs plus élevées et plus régulières pour l'activité ODC, permettant ainsi de mieux appréhender toute modification de l'activité ODC par une substance chimique.

TABLEAU 8 : Etude du rôle de la concentration en sérum du milieu DMEM H16 - pH 7.2 sur l'activité ODC dans les cellules SHE

| Traitement | concentration en sérum | |
|--------------------|------------------------|-------|
| | 1 % | 5 % |
| Acétone | 1.12 | 4.16 |
| TPA 4.10^{-8} M | 4.18 | 10.74 |
| TPA 16.10^{-8} M | 5.13 | 11.73 |

Les résultats exprimés en nomoles de CO_2 /mg protéines/60 mn, représentant la moyenne d'une expérience en triplicate.

TABLEAU 9 : Influence du pH du milieu sur l'activité ODC dans les cellules SHE

| Traitement | DMEM H16 | |
|--------------------|-------------------|-----------------|
| | pH 6.7 | pH 7.2 |
| Acétone | 25.14 ± 5.39 | 3.16 ± 0.55 |
| TPA 16.10^{-8} M | 48.71 ± 12.02 | 9.65 ± 1.68 |

Résultats exprimés en nmoles de CO_2 /mg protéines/60 mn représentant la moyenne de 2 expériences en triplicate.

Le protocole de traitement retenu pour les cellules SHE pour la mesure de l'activité ODC est donc le suivant :

- traitement des cellules SHE à confluence.
- Milieu DMEM-H16 modifié à pH 6.7
- 5 % de sérum
- Concentration en TPA : 16.10^{-8} M (= 0.1 µg/ml)

2.2. - Cinétique d'induction de l'ODC par le TPA

Lorsque le promoteur tumoral TPA est ajouté aux cultures confluentes de cellules SHE de passage précoce, à la concentration finale de 16.10^{-8} M, l'activité ODC augmente rapidement atteignant un pic 5 heures après le début de l'incubation (figure 9). Ce taux est 2 fois supérieur au taux basal. Contrairement aux cellules épithéliales, il n'y a pas de phase plateau : l'activité ODC décroît très rapidement.

Nous avons donc retenu $t = 5$ heures comme temps d'incubation du TPA avec les cellules SHE, temps nécessaire et suffisant pour bien mesurer l'activité ODC. Il faut noter que ce temps de 5 heures est à peu près le même que pour le taux maximal d'ODC induit par le TPA sur les cellules épidermiques *in vivo*.

Les résultats obtenus sur les cellules SHE cultivées à confluence mettent en évidence la sensibilité de ces cellules à l'action du TPA dans nos conditions expérimentales. L'induction de l'ODC est nettement supérieure et plus constante avec le milieu de culture à pH 6.7. Avec ce milieu, l'activité ODC cytoplasmique est 2 fois plus élevée sous l'action de 16.10^{-8} M de TPA, qu'à pH 7.2.

Nous avons étudié dans les mêmes conditions l'expression du gène ODC dans les cellules SHE, avec ou sans présence de TPA. Pour faciliter l'exposé, les résultats sont rapportés dans la 4ème partie concernant la biologie moléculaire.

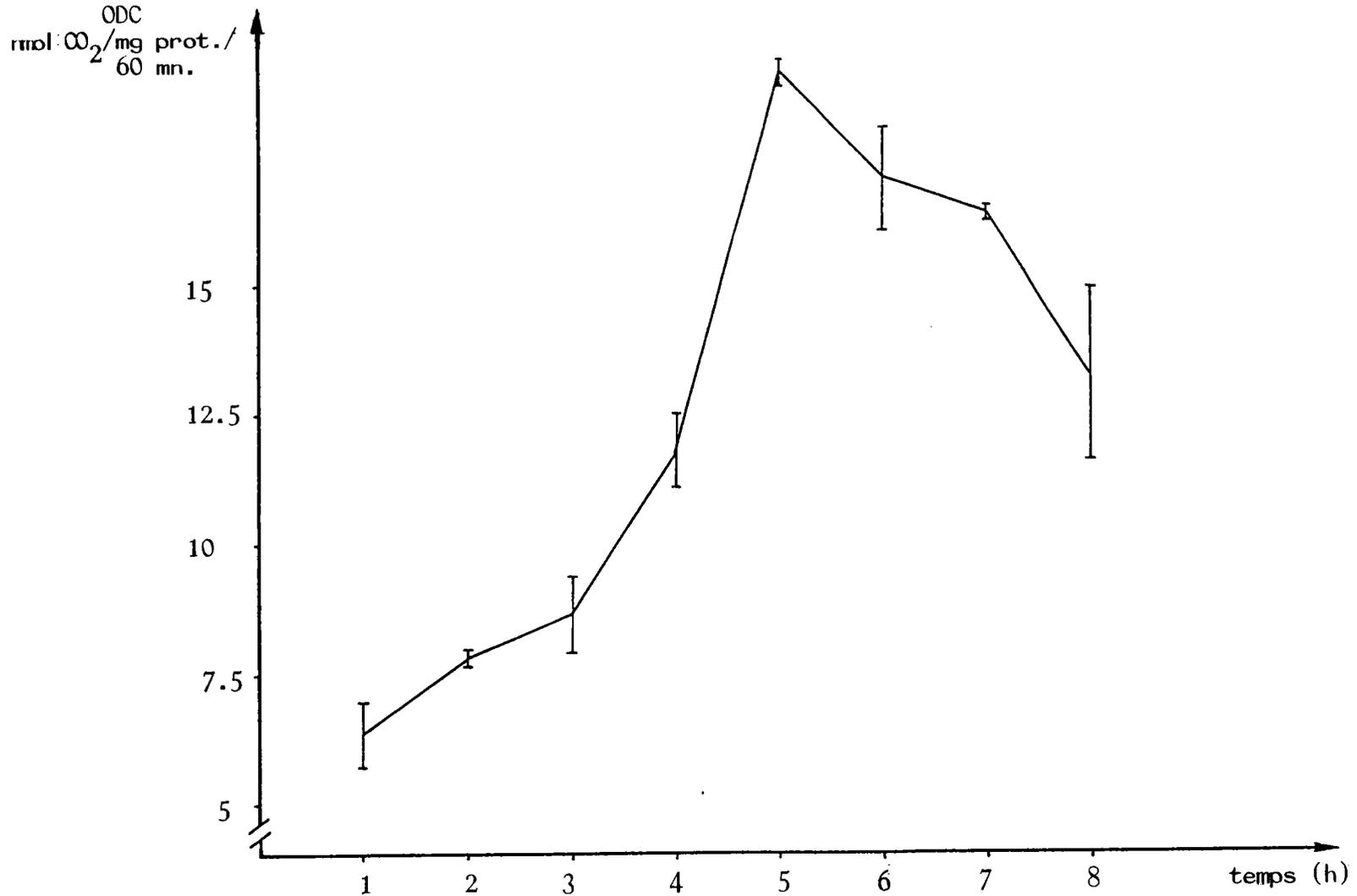


Figure 9 - Cinétique d'induction de l'activité ODC par le TPA dans les cellules SHE

Le TPA ($16 \cdot 10^{-8}$ M) est ajouté au milieu de culture au temps t_0 ; la réaction est arrêtée après différents temps d'incubation et l'activité ODC déterminée. Moyenne de 2 expériences en triplicata.

2ème Partie : Modulation par des substances xénobiotiques de l'activité ODC induite par le TPA.

Les études réalisées *in vivo* (Nguyen-Ba., 1988) ont montré que l'application d'anti-inflammatoires modulaient l'ODC induite par le TPA dans le compartiment épidermique. Nous avons réalisé une série d'expériences *in vitro* pour déterminer si ces anti-inflammatoires agissaient directement sur les cellules cibles épidermiques ou de façon indirecte par suite de l'inhibition de la réaction inflammatoire.

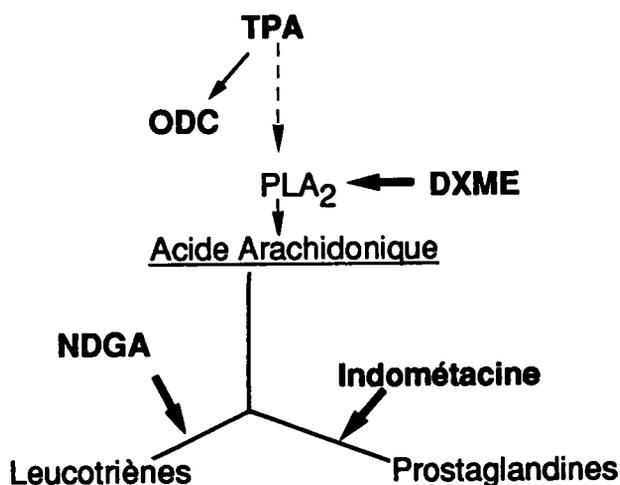


Schéma d'interaction cellulaire : Hypothèse de recherche.

1 - Action des anti-inflammatoires non stéroïdiens sur les cellules épithéliales.

1.1. - Indométacine.

L'indométacine, inhibiteur de la synthèse des prostaglandines, a été utilisée à des doses croissantes jusqu'à $4 \cdot 10^{-5}$ M (Tableau 10).

Le TPA stimule toujours l'activité ODC dans les cellules Ctr : 31.9/8.4 taux basal acétone. L'addition d'indométacine dans la culture cellulaire Ctr ne modifie en rien son activité ODC. De même lorsque l'anti-inflammatoire est ajouté simultanément (t0) ou différé de 3 heures (t3) au TPA, on ne retrouve que l'effet inducteur du TPA (moyenne des valeurs observées : 26.8 (à t0) et 31 (à t3) nmoles CO₂/mg prot./60 mn).

Il en est de même pour les cellules BPe : les cellules répondent bien à l'action du TPA puisque le taux d'induction d'ODC est 2 fois supérieure à celui de l'acétone, comme nous l'avons trouvé dans les expériences précédentes. L'adjonction d'indométacine (t0 ou t3) ne modifie en rien l'activité ODC induite par le TPA dans les cellules cibles *in vitro*.

L'indométacine n'a pas montré d'action directe sur les cellules épithéliales *in vitro* ; par contre *in vivo*, l'indométacine inhibe la réaction inflammatoire dans le derme et protège efficacement les cellules épidermiques contre l'effet inducteur du TPA.

TABLEAU 10 : Action des anti-inflammatoires sur l'ODC induit par le TPA dans les cellules épithéliales : étude avec l'indométacine.

| Cellules | Traitement | Activité ODC nmol/CO ₂ /mg/prot/60mn | Facteur variation |
|----------|-----------------------------|--|----------------------|
| Ctr | Acétone | 8.4 ± 0.8 | 1 |
| | Indom. 4.10 ⁻⁵ M | 8.0 ± 0.4 | 1 |
| | TPA 4.10 ⁻⁸ M | 31.9 ± 2.5 | <u>3.8</u> |
| | TPA + Indom., t0 | 26.8 ± 4.0 | 3.2 |
| | TPA + Indom., t3 | 31.0 ± 4.1 | 3.7 |
| BPe | Acétone | 7.9 ± 0.5 | 1 |
| | Indom.4.10 ⁻⁵ M | 7.8 ± 0.9 | 1 |
| | TPA 4.10 ⁻⁸ M | 17.4 ± 3.2 | <u>2.2</u> |
| | TPA + Indom., t0 | 16.0 ± 3.0 | 2.0 |
| | TPA + Indom., t3 | 16.6 ± 2.5 | 2.1 |

Les cellules témoins (Ctr) et traitées par le BaP (BPe) sont traitées par le TPA pendant 4 h. ; l'indométacine est ajoutée en même temps que le TPA (t0) ou 3 h. après le TPA (t3) ; l'incubation est arrêtée à la quatrième heure. Moyenne de 2 expériences en triplicata (M ± SE).

1.2. - NDGA.

Contrairement aux résultats publiés *in vivo*, l'acide nordihydroguaiarétique, NDGA, (inhibiteur de la synthèse des leucotriènes) peut diminuer le taux basal d'ODC avec une dose relativement faible de 2.10⁻⁵ M dans les 2 lignées cellulaires (Tableau 11) : diminution de 50 % dans les cellules Ctr et BPe. Dans ces expériences les cellules Ctr et BPe sont toujours sensibles à l'action du TPA (stimulation de 4 et 2 fois supérieures au taux basal acétone, respectivement) mais le NDGA peut inhiber l'induction d'ODC : utilisé simultanément avec le TPA à t0, le NDGA fait baisser ce taux ODC de 70 % dans les 2 lignées cellulaires (9.4 contre 31.8 nmoles CO₂/mg prot./60 mn pour les Ctr). Ajouté seulement 1 heure avant la fin

de l'expérience, c'est à dire après 3 heures de traitement par le TPA, l'inhibition est encore de 30 % (4.8 contre 15.9 nmoles CO₂/mg prot./60 mn pour les Ctr).

En sens inverse, le NDGA est très actif *in vitro* et inhibe l'induction de l'ODC par le TPA dans les cellules épithéliales. Mais cet effet protecteur ne se retrouve que partiellement *in vivo* le NDGA étant peu efficace contre l'inflammation ; le taux d'induction de l'ODC reste élevé dans les cellules épidermiques.

TABLEAU 11 : Effet modulateur de l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) sur l'ODC induit par le TPA dans les cellules épithéliales.

| Cellules | Traitement | Activité ODC nmol/CO ₂ /mg/prot/60mn | Facteur variation |
|----------|----------------------------|--|----------------------|
| Ctr | Acétone | 8.3 ± 0.7 | 1 |
| | NDGA 2.10 ⁻⁵ M | 4.1 ± 1.2 | 0.5 |
| | TPA 4.10 ⁻⁸ M | 31.8 ± 1.8 | <u>3.8</u> |
| | TPA + NDGA, t ₀ | 9.4 ± 0.9 | <u>1.1</u> |
| | TPA + NDGA, t ₃ | 22.1 ± 2.0 | 2.6 |
| BPe | Acétone | 7.8 ± 0.4 | 1 |
| | NDGA 2.10 ⁻⁵ M | 3.2 ± 0.6 | 0.4 |
| | TPA 4.10 ⁻⁸ M | 15.9 ± 2.3 | <u>2.0</u> |
| | TPA + NDGA, t ₀ | 4.8 ± 1.6 | <u>0.6</u> |
| | TPA + NDGA, t ₃ | 11.2 ± 2.1 | 1.4 |

Traitement des cellules témoins (Ctr) et traitées (BPe) pendant 4 h. par le TPA ; le NDGA est ajouté en même temps que le TPA (t₀) ou 3 h après le TPA (t₃). L'incubation est arrêtée à la quatrième heure, l'état des cellules est vérifié au microscope inversé avant dosage de l'ODC. Moyenne de 2 expériences en triplicata (M ± SE).

La confrontation des résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* avec des anti-inflammatoires apporte une preuve supplémentaire du rôle de la réaction inflammatoire dans la modulation de l'ODC dans les cellules cibles.

Les résultats précédents montrent bien que l'action de ces anti-inflammatoires n'est pas effective au niveau des cellules épithéliales *in vivo*. Leur efficacité sur la

modulation de l'ODC est dépendante de leur action sur les cellules inflammatoires. Cela va donc dans le sens d'une interaction entre les cellules inflammatoires et les cellules épidermiques lors du traitement par TPA, probablement par l'intermédiaire des acides gras médiateurs de l'inflammation.

| | Action inflammatoire | Inhibition de l'ODC <i>in vivo</i> <i>in vitro</i> | | Modulation de l'ODC <i>in vivo</i> |
|--------------|----------------------|---|-----|------------------------------------|
| Indométacine | +++ | +++ | - | effet des prostaglandines |
| NDGA | + - | + - | +++ | absence d'effet des leucotriène |

2 - Etude d'un anti-inflammatoire stéroïdien, la dexaméthasone.

Lors du traitement répété par le TPA, la réaction inflammatoire devient intense, l'épiderme hyperplasique et le taux d'ODC augmente. Cependant sous l'action d'un corticoïde, la dexaméthasone, l'inflammation peut être bloquée, l'hyperplasie retardée, mais les cellules épidermiques restent encore très sensibles à l'action du TPA : un autre traitement par le TPA provoque une stimulation intense de l'ODC. Pour se rapprocher de la situation *in vivo* nous avons recherché si la DXME possédait un effet protecteur également *in vitro* et tenter de déterminer à quel niveau se situait son mécanisme d'action.

2.1. - Effet de la DXME sur l'activité ODC induite dans les cellules épithéliales Ctr et BPe .

La dexaméthasone (anti-inflammatoire agissant au niveau de la phospholipase A2) a été testée à la dose de $1.25 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (= 5.5 µg/ml), dose ne provoquant pas d'effet toxique et inhibant légèrement l'ODC basal dans les 2 lignées épithéliales (figure 10 et Tableau 12).

L'induction de l'ODC par le TPA est plus importante dans cette expérience : les cellules Ctr et BPe se sont montrées beaucoup plus sensibles puisque le facteur de variation est de 5 contre 4 habituellement pour les Ctr, et de 3 contre 2 pour les BPe.

Lorsque la DXME est ajoutée simultanément au TPA (t0), elle inhibe d'environ 50 % l'induction de l'ODC par rapport au TPA seul, dans les 2 lignées épithéliales considérées (ex : 14.30 contre 34.65 nmoles CO₂/mg prot./60 mn). Lorsque le glucocorticoïde est ajouté après 3 heures de traitement par le TPA (t3), on observe

un effet différent : il y a stimulation de l'activité ODC, dépassant celle obtenue avec le TPA seul (38.75 contre 34.65 nmoles CO₂/mg prot./60 mn) pour les cellules Ctr. La stimulation de l'activité ODC est égale ou légèrement supérieure à celle du TPA seul en ce qui concerne les cellules BPe.

Nous constatons donc que selon le temps d'application, la dexaméthasone inhibe ou stimule l'ODC induite par le TPA.

Nous avons répété cette expérience sur les cellules SHE pour savoir si nous avons obtenu un effet propre aux cellules épithéliales ou non.

2.2 - Effet de la DXME sur l'activité ODC induite dans les cellules SHE.

La DXME à la dose effective de 11 µg/ml ($2.5 \cdot 10^{-5}$ M) (figure 11 et Tableau 12) conduit aux mêmes résultats que précédemment.

Ajoutée simultanément au TPA (t₀), elle inhibe de 70 % par rapport au TPA seul, l'induction de l'activité ODC : 4.63 contre 14.45 nmoles CO₂/mg prot./60 mn.

A t₃, nous observons une légère stimulation : 15.17 contre 14.45 nmoles CO₂/mg prot./60 mn. Il y a donc également une action différente de la DXME selon le temps d'application.

Pour mieux situer le site d'action de la DXME, selon le temps de traitement, c'est à dire soit au niveau de la transcription soit de la traduction, nous avons étudié selon le même protocole expérimental, l'action du TPA en présence d'un inhibiteur de synthèse de l'ARN, l'actinomycine D, et d'un inhibiteur de la synthèse des protéines la cycloheximide.

TABLEAU 12 : Effet de la dexaméthasone sur l'ODC induit par le TPA dans les cellules épithéliales et SHE.

| Cellules | Traitement | Activité ODC nmol/CO ₂ /mg/prot/60mn | Facteur variation |
|----------|------------------------------|--|----------------------|
| Ctr | Acétone | 6.80 ± 1.0 | 1 |
| | DXME 1.25 10 ⁻⁵ M | 5.60 ± 0.25 | 0.8 |
| | TPA 4.10 ⁻⁸ M | 34.65 ± 3.75 | <u>5.1</u> |
| | TPA + DXME, t0 | 14.30 ± 3.25 | 2.1 |
| | TPA + DXME, t2 | 28.60 ± 2.75 | 4.2 |
| | TPA + DXME, t3 | 38.75 ± 3.0 | <u>5.7</u> |
| BPe | Acétone | 7.40 | 1 |
| | DXME 1.25 10 ⁻⁵ M | 7.15 ± 0.21 | 1 |
| | TPA 4.10 ⁻⁸ M | 28.85 ± 2.85 | <u>3.89</u> |
| | TPA + DXME, t0 | 17.29 ± 1.88 | 2.3 |
| | TPA + DXME, t2 | 23.70 ± 2.12 | 3.2 |
| | TPA + DXME, t3 | 29.08 ± 2.24 | <u>3.93</u> |
| SHE | Acétone | 4.61 | 1 |
| | DXME 2.5 10 ⁻⁵ M | 2.16 ± 0.24 | 0.47 |
| | TPA 16.10 ⁻⁸ M | 14.45 ± 0.21 | <u>3.13</u> |
| | TPA + DXME, t0 | 4.63 ± 0.38 | 1.00 |
| | TPA + DXME, t3 | 15.17 ± 1.65 | <u>3.29</u> |

Les cellules épithéliales Ctr et BPe sont traitées par le TPA pendant 4 heures ; les cellules SHE pendant 5 heures. La dexaméthasone est ajoutée simultanément (t0) ou 3 heures après le TPA (t3). Moyenne de 2 expériences en triplicata (M ± SE).

3- Effets de l'Actinomycine D et de la cycloheximide sur l'activité ODC induite par le TPA dans les cellules épithéliales.

3.1. - Etude d'un inhibiteur de la synthèse de l'ARN, l'actinomycine D.

Les cellules épithéliales ont été traitées selon le même schéma que pour la DXME ; l'actinomycine D, à la dose de 2.10⁻³ mg/ml (= concentration optimale en association avec le TPA) a été testée simultanément avec le TPA (temps t = 0) ou différée de 3 heures par rapport au promoteur (temps t3).

Les résultats obtenus (figures 12 et 13) se rapprochent de ceux obtenus précédemment avec la DXME pour les 2 types de cellules épithéliales Ctr et BPe : nous obtenons de nouveau une action divergente : l'actinomycine D ajoutée

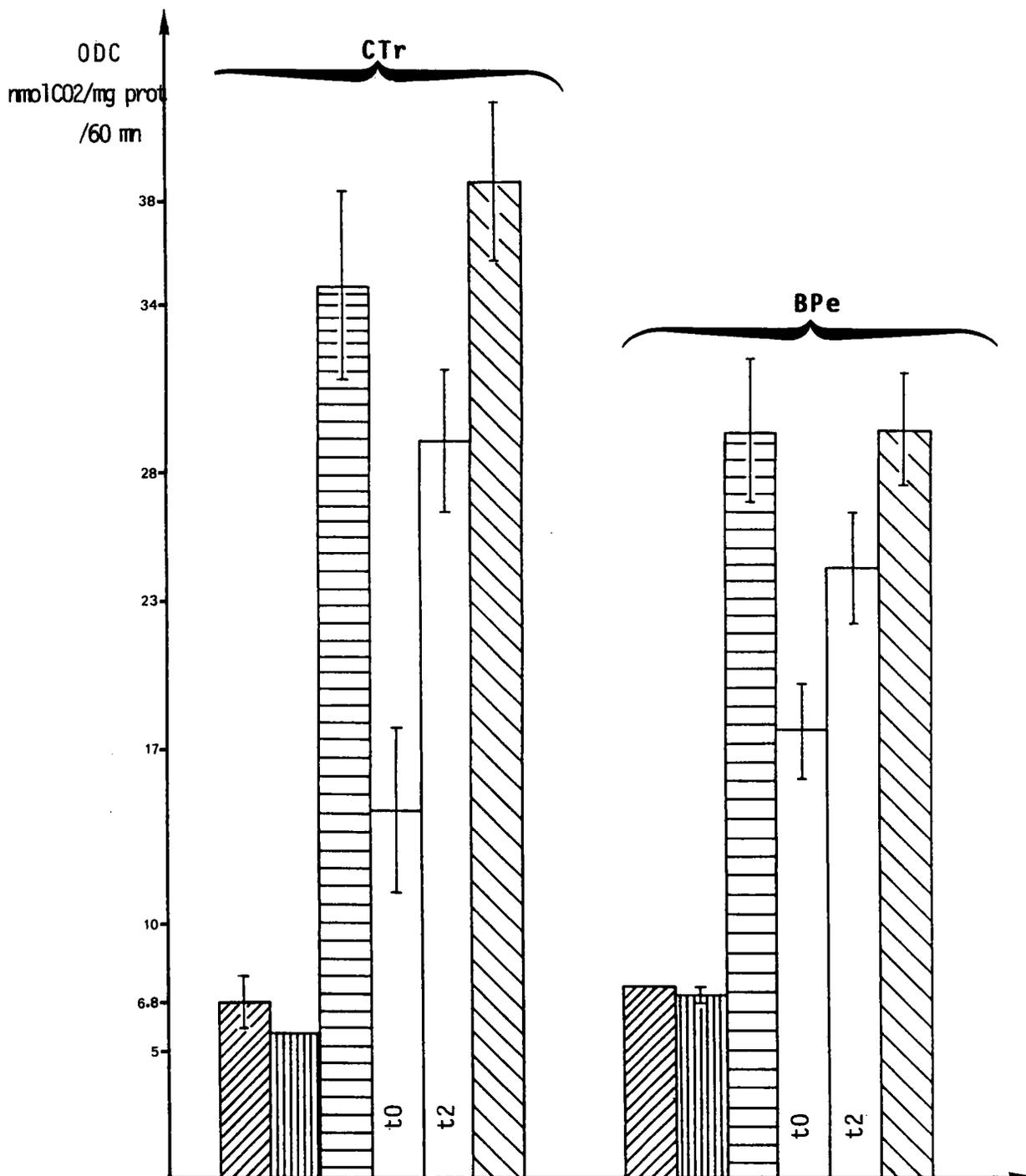


Figure 10 - Etude de la modulation de l'activité ODC par la DXME sur les cellules épithéliales Ctr et BPe.

Les cellules sont traitées pendant 4 heures par : l'acétone (▨), le TPA 4.10⁻⁸ M (▤) et la DXME 1.25.10⁻⁵ M (▥).

La DXME est également ajoutée simultanément au TPA (t0) ou en différée de 2 heures (t2) ou 3 heures (t3, ▧) par rapport au TPA.

Moyenne de 2 expériences réalisées en triplicata (M ± SD)

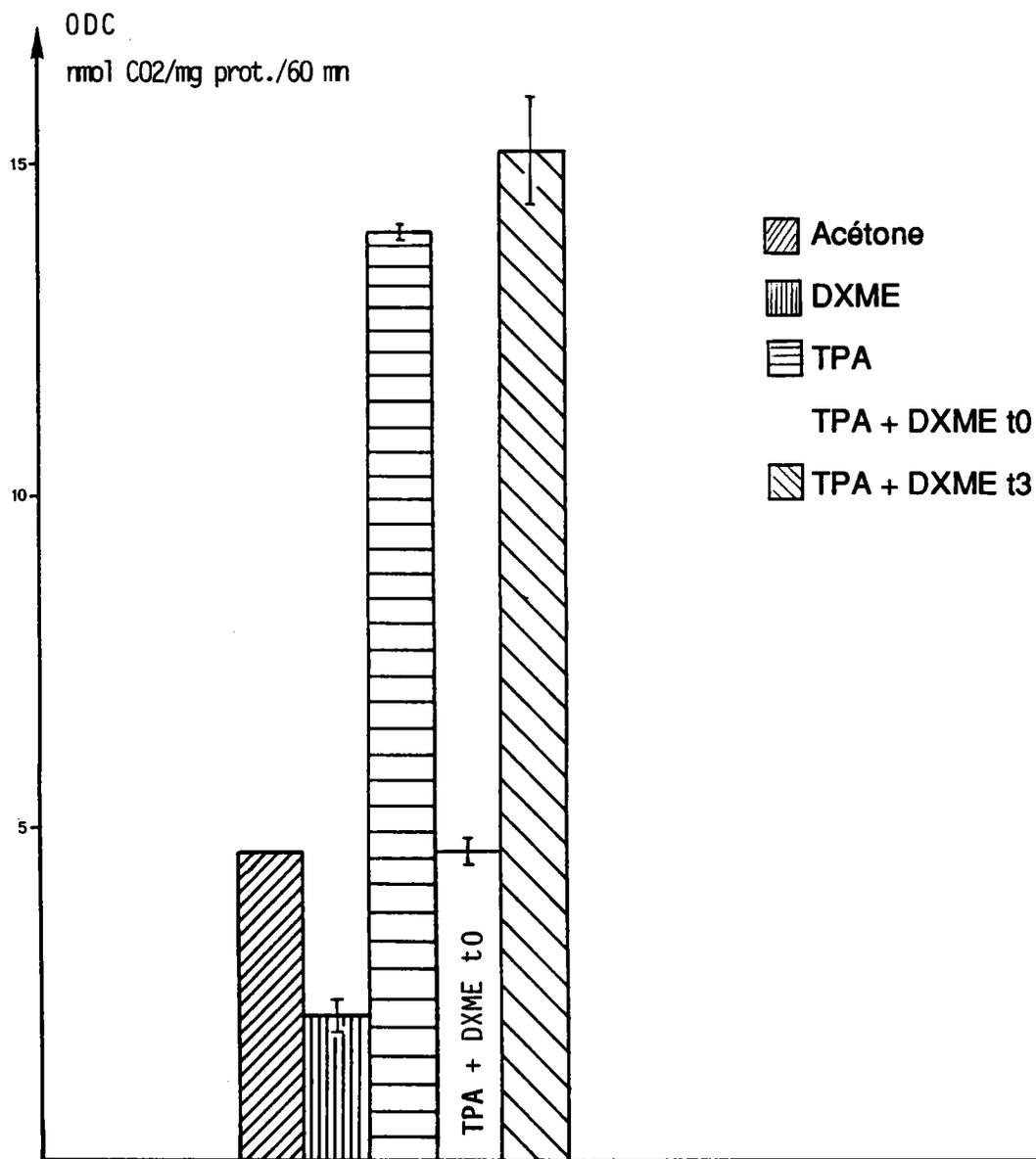


Figure 11 - Effet de la DXME sur l'activité ODC induite par le TPA dans les cellules SHE.

Les cellules SHE sont traitées par le TPA (0-16 μ M) pendant 5 heures. La dexaméthasone est ajoutée simultanément (t0) 5 heures de contact ou différée de 3 heures (t3) par rapport au TPA.

Moyenne de 2 expériences en triplicata ($M \pm SD$).

simultanément au TPA inhibe l'induction de l'ODC par le TPA, environ 30 % dans les 2 lignées cellulaires (ex : 21 contre 30 nmoles CO₂/mg prot./60 mn pour les Ctr).

A t3, c'est à dire 3 heures après l'action du TPA, l'actinomycine D en contact pendant 1 heure avec les cellules est capable de stimuler de nouveau l'ODC (34 contre 30 nmoles CO₂/mg prot/60 mn pour les Ctr).

3.2. - Etude d'un inhibiteur de la synthèse protéique, la cycloheximide.

La cycloheximide, à la dose testée de 2.5 10⁻³ mg/ml bloque l'induction de l'activité ODC par le TPA, ajoutée simultanément (t0) ou 3 heures après (t3). Les résultats obtenus sont similaires pour les 2 lignées de cellules épithéliales (Tableau 13). A t0, après 4 heures de contact avec les cellules, la cycloheximide inhibe la synthèse de l'enzyme ODC (80 % par rapport à l'action du TPA seul). A t3, c'est à dire après seulement 1 heure de contact avec les cellules, l'inhibition est moins forte, mais encore effective (1.16 contre 2.74 nmoles CO₂/mg prot/60 mn, soit environ 60 % d'inhibition par rapport au TPA seul pour les cellules Ctr). Les mêmes proportions d'inhibition par la cycloheximide ont été obtenus avec les cellules BPe.

A la différence de l'actinomycine D, l'effet inhibiteur de la cycloheximide est continu et proportionnel au temps de contact avec les cellules. L'inhibition moins forte de l'activité ODC à t3 par rapport à t0 s'explique par le fait que le TPA a pu stimuler le gène ODC et donc la production de l'ARNm puis de protéines ODC pendant 3 heures, avant que la cycloheximide ne bloque la traduction de ARNm en ODC.

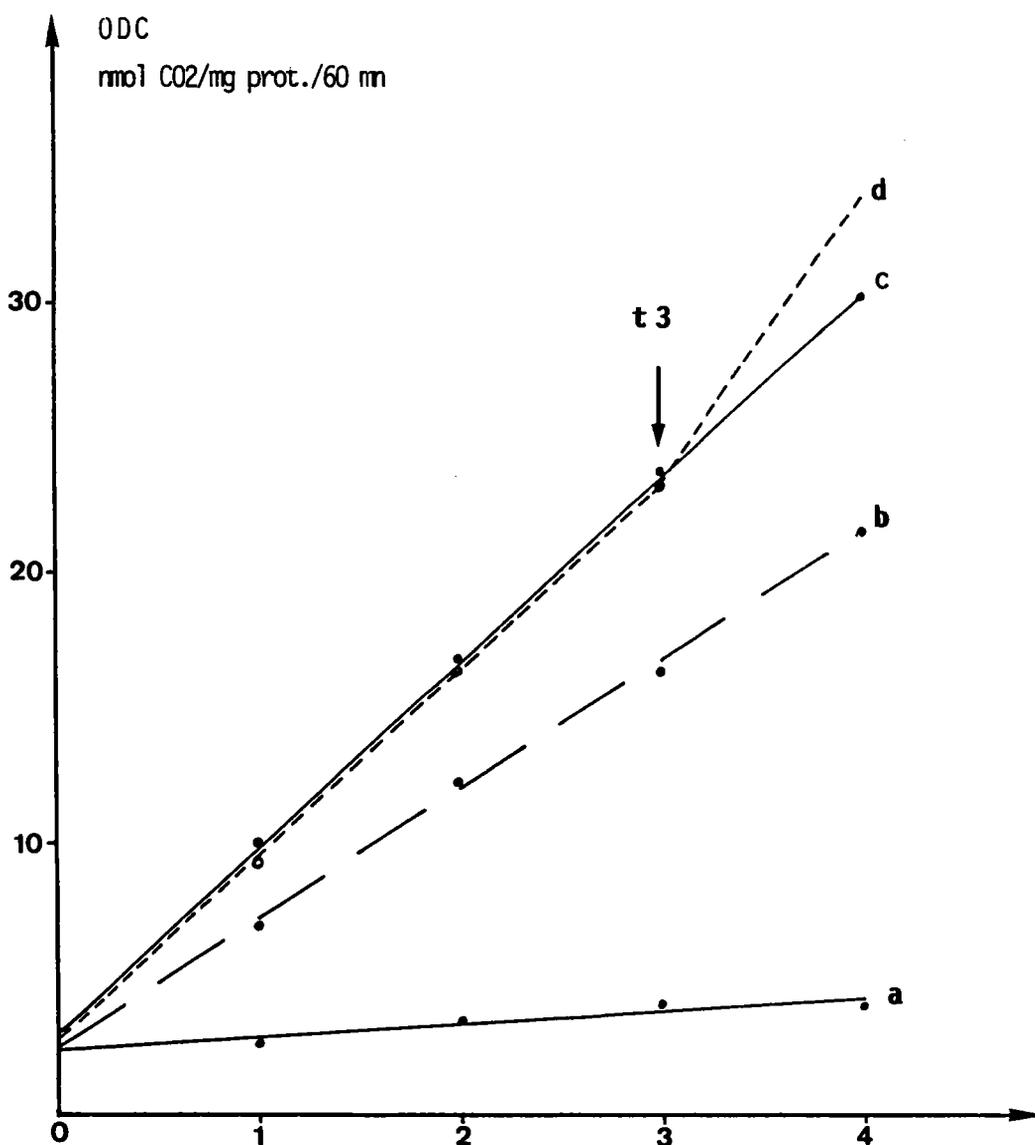


Figure 12 - Etude de l'Actinomycine D sur l'activité ODC induite par le TPA dans les cellules épithéliales Ctr.

Les cellules sont traitées pendant 4 heures avec du TPA $4 \cdot 10^{-8} M$ (c). L'actinomycine D est ajoutée simultanément (b, 4 heures de contact), ou différée de 3 heures (d) par rapport au TPA.

(a) taux basal acétone. Moyenne de 2 expériences.

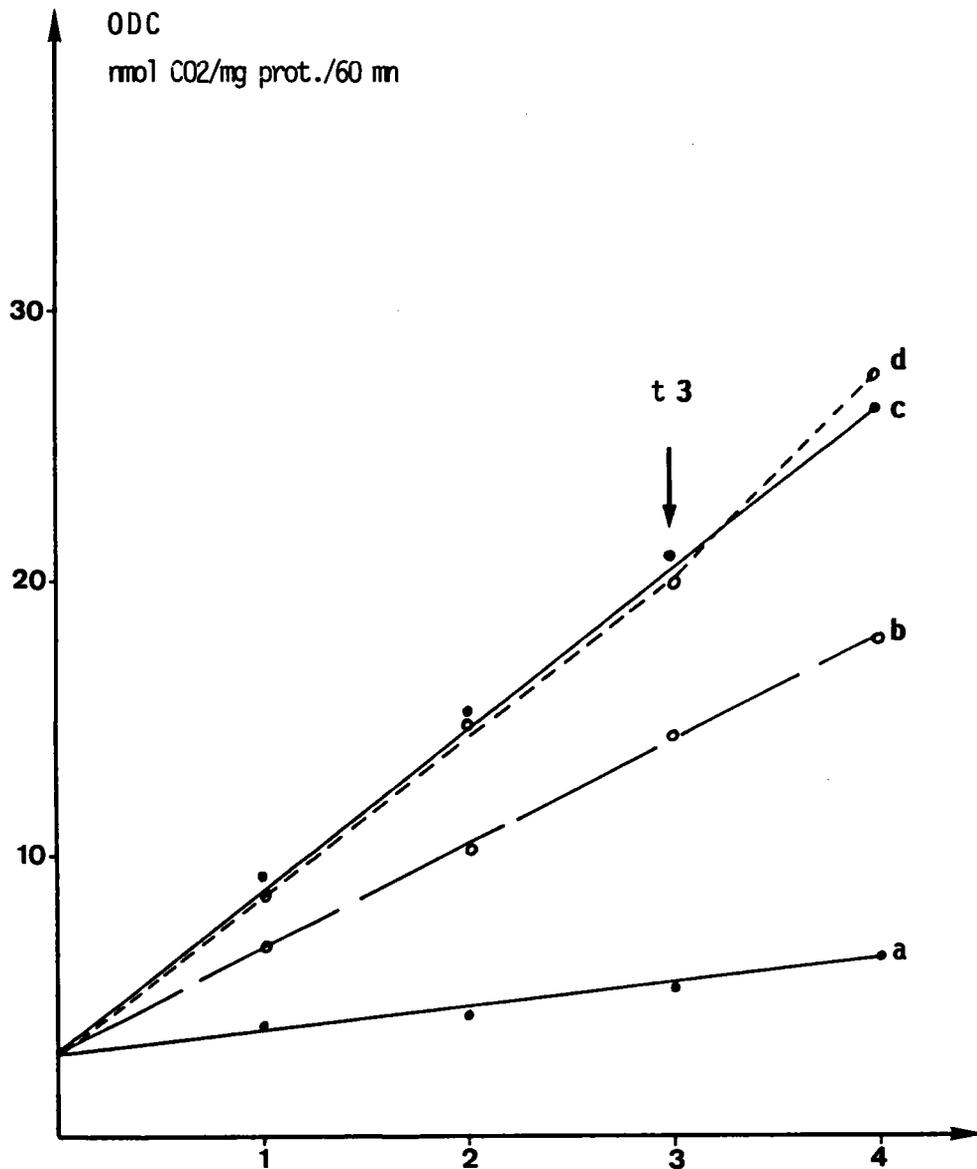


Figure 13 - Etude de l'actinomycine D sur l'activité ODC induite par le TPA dans les cellules épithéliales BPe.

Les cellules sont traitées pendant 4 heures avec du TPA $4 \cdot 10^{-8}$ M (c). L'actinomycine D est ajoutée simultanément (b, 4 heures de contact) ou différée de 3 heures (d) par rapport au TPA. (a) taux basal acétone. Moyenne de 2 expériences.

TABLEAU 13 : Effet modulateur d'un inhibiteur de la synthèse protéique, la cycloheximide sur l'ODC induit par le TPA dans les cellules épithéliales.

| Cellules | Traitement | Activité ODC nmol/CO ₂ /mg/prot/60mn | Facteur variation |
|----------|--------------------------|--|----------------------|
| Ctr | Acétone | 19.40 + 0.85 | 1 |
| | Cycloheximide | 4.00 + 0.29 | 0.21 |
| | TPA 4.10 ⁻⁸ M | 53.17 + 5.96 | <u>2.74</u> |
| | TPA + Cyclohex., t0 | 3.21 + 0.09 | 0.16 |
| | TPA + Cyclohex., t3 | 22.57 + 2.50 | <u>1.16</u> |
| BPe | Acétone | 8.95 + 0.69 | 1 |
| | Cycloheximide | 2.28 + 0.18 | 0.25 |
| | TPA 4.10 ⁻⁸ M | 11.25 + 2.75 | <u>1.26</u> |
| | TPA + Cyclohex., t0 | 1.83 + 0.09 | 0.21 |
| | TPA + Cyclohex., t3 | 5.14 + 0.62 | <u>0.58</u> |

Traitement des cellules témoins (Ctr) et transformées (BPe) pendant 4 heures par le TPA ; la cycloheximide est ajoutée simultanément au TPA (t0) ou 3 heures après (t3). L'incubation est arrêtée à la quatrième heure, l'état des cellules est vérifié au microscope inversé avant dosage de l'ODC. Moyenne de 2 expériences en triplicata (M + SE).

La comparaison des résultats obtenus avec la dexaméthasone et l'actinomycine D laisserait supposer que ces produits ajoutés simultanément au TPA (t0) inhibent l'expression du gène ODC et la synthèse d'ODC cytoplasmique. Ceci ne se vérifie plus au temps t3 où la DXME stimule d'ODC (effet stimulant). Cet effet différent signifie que la dexaméthasone aurait un autre point d'action en plus du blocage de la transcription du gène ODC (tout comme l'actinomycine D, inhibiteur de l'expression des gènes en bloquant la synthèse de l'ARN).

Comme les résultats obtenus avec la cycloheximide diffèrent de ceux obtenus avec la DXME, cela pourrait signifier que cette dernière n'agit pas directement sur la synthèse de l'enzyme ODC. Nous avons donc été amenés à vérifier dans un premier temps le rôle de la dexaméthasone sur la stabilité de la protéine enzymatique ODC.

4 - Action de la dexaméthasone sur la stabilité de l'ODC cytoplasmique.

Nous avons traité les cellules Ctr et BPe pendant 3 heures avec du TPA puis renouvelé le milieu des puits avec du milieu frais ou contenant de la dexaméthasone pendant 1 heure. Comme nous pouvons le constater sur la figure n° 14, le changement de milieu entraîne une diminution du taux d'activité ODC par rapport à celui obtenu avec le TPA au bout de 3 heures chez les cellules Ctr. Après renouvellement du milieu, il n'y a plus de stimulation du gène ODC par le TPA (le taux d'ODC-ARNm et de protéine enzymatique sont déjà constitués), par contre les protéases présentes dans le cytoplasme vont être activées pour ramener l'enzyme ODC vers son taux basal. Quand on ajoute de la dexaméthasone en plus du changement de milieu, nous avons peu de différence entre le taux d'ODC obtenu à 4 heures et celui existant juste après 3 heures de traitement par le TPA. Les résultats corroborent notre hypothèse à savoir que la dexaméthasone agirait au niveau des protéases, bloque leur activité protéolytique et empêche la diminution de l'ODC par rapport à celle obtenue lors d'un changement de milieu.

Par contre chez les cellules épithéliales transformées BPe, peu de différence a été observée entre le taux d'ODC stimulé par le TPA dans le milieu avec ou sans dexaméthasone. Ceci pourrait correspondre à une activité protéasique moins intense dans ces cellules.

La dexaméthasone montre un effet inhibiteur sur l'ODC aussi bien *in vitro* sur des cellules épithéliales (Ctr et BPe) et embryonnaires de hamster (SHE) que *in vivo* sur des cellules épidermiques.

Lors du traitement simultané des cellules par le TPA et la DXME, cette dernière inhiberait dès le début l'expression du gène ODC, bloquant ainsi l'activité de l'ODC cytoplasmique. Le même effet a pu être obtenu avec l'actinomycine D.

Ce schéma d'inhibition directe ne s'applique plus quand la DXME est utilisée 3 heures après le TPA : il y a stimulation à cette étape de l'ODC. Nous avons cherché à vérifier l'hypothèse que cette régulation de l'ODC par la DXME fasse intervenir une activité protéasique au niveau post-transcriptionnel.

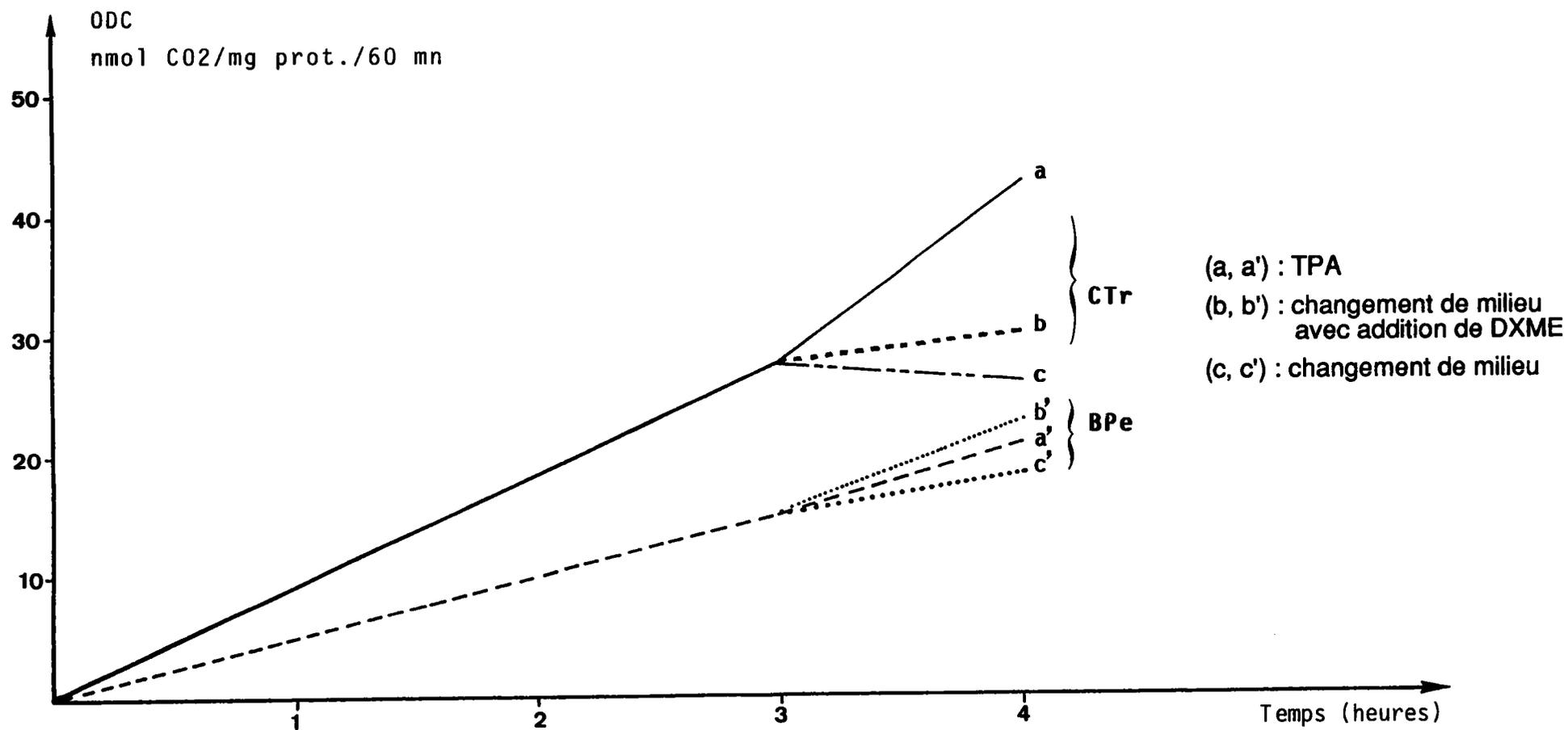


Figure 14 - Action de la DXME sur la stabilité de l'ODC cytoplasmique dans les cellules épithéliales Ctr et BPe.

3 heures après l'action du TPA, le milieu est ôté dans le groupe (b, b') et renouvelé par du milieu + DXME ; dans le groupe (c, c') seul le milieu est changé. 1 heure après, la réaction est arrêtée.

3ème Partie : Etude de l'action des enzymes protéolytiques sur la modulation de l'ODC

Les enzymes protéolytiques ou protéases, bien qu'elles soient nécessaires physiologiquement, peuvent devenir extrêmement nocives lorsqu'elles échappent au contrôle de l'organisme.

De nombreuses études (Sloane, 1984 ; Keppler, 1988) ont signalé l'existence de cystéine-protéases dans des tissus malins. Les cystéines protéases (EC 3.4 - 22) forment un groupe très vaste d'enzymes protéolytiques dont les plus étudiées sont les cathepsines L, B et H, toutes d'origine lysosomiale.

La première hypothèse que nous avons émise est que l'ODC induite par le TPA pourrait être régulée par ces cathepsines.

Nous avons donc étudié les variations du taux de cathepsines L, B et H dans les cellules épithéliales témoins Ctr après traitement par le TPA.

1 - Dosage biochimique des cathepsines L, B et H et modulation de l'ODC par un inhibiteur spécifique le E64.

Après différents temps de traitement des cellules Ctr par le TPA, les cathepsines L, B et H ont été séparées et dosées au spectrofluorimètre. Le tableau 14 montre dans un premier temps que l'activité des cathepsines L et B décroît d'environ 50 % lorsque les cellules sont traitées par le TPA pendant 2 heures, nous retrouvons ensuite un taux proche de celle du témoin après 8 heures de traitement. La cathepsine H par contre n'est que légèrement inhibée par le TPA quelle que soit la durée du traitement. Quand on traite les cellules avec la dexaméthasone, on constate qu'il y a inhibition des cathepsines L et B (environ 30 % de perte d'activité) mais que la DXME aurait un effet stimulant sur la cathepsine H. L'ensemble de ces effets se retrouve dans les traitements simultanés du TPA et de la DXME (tableau 15). Les cathepsines L et B sont inhibées par la combinaison de ces 2 substances à t0 et t3. Par contre, ajoutée simultanément au TPA, la DXME élimine l'effet inhibiteur du TPA sur la cathepsine H.

Nous avons également testé le E64, inhibiteur spécifique des cystéines-protéases (Barrett et al., 1982) sur les cellules épithéliales Ctr. On peut constater (tableau 14) qu'il inhibe uniquement l'activité enzymatique (80 % d'inhibition) des cathepsines L et B. Le E64 n'a aucun effet sur la cathepsine H (activité égale à celle du témoin acétone).

En relation avec l'activité ODC, le E64 a été testé à des doses croissantes afin de déterminer la dose non toxique sur les cellules épithéliales témoins - Ctr (figure

15). Quelle que soit la dose testée de E64 (de 1 à 5 µg/ml), aucun effet inhibiteur ou stimulateur n'a été observé par rapport à l'induction de l'activité ODC par le TPA.

En comparant le tableau 14 (mesure du pourcentage d'activité des cathepsines L, B et H) et la figure 15 (taux d'ODC cytoplasmique sous l'action de E64) on peut constater que : (1) il n'y a aucune augmentation de l'activité ODC cytoplasmique après traitement par le E64, alors qu'il est supposé bloquer les cystéines-protéases et donc d'éviter toute protéolyse de la protéine ODC. Or d'après le tableau 14, on constate que le E64 est actif sur les cathepsines L et B puisqu'il y a inhibition de leur activité d'environ 80 % par rapport au témoin.

(2) De même, lorsque nous traitons les cellules avec la DXME, simultanément (t0) ou différée de 3 h. (t3) par rapport au TPA, nous n'avons pas obtenu une diminution plus importante de l'activité des cathepsines L et B, que celle obtenue avec le TPA seul (ex. : 5.32 contre 4.17 nmole substrat dégradé/mg prot./60 mn à t3 pour la cathepsine L).

Or à t3, nous avons toujours mesuré une stimulation de l'activité ODC cytoplasmique sous l'action conjuguée de la dexaméthasone et du TPA (revoir tableau 12).

Le fait qu'il n'y ait aucune corrélation entre l'induction de l'activité ODC et l'inhibition de l'activité protéasique nous laisse supposer que les cystéine-protéases ne sont pas impliquées dans la régulation de l'ODC cytoplasmique.

Nous avons donc été amenés à rechercher l'interaction d'un autre groupe de protéases plus répandu dans la cellule, les sérine-protéases encore appelées multicatalytique-protéases, sur la modulation de l'ODC.

TABLEAU 14 : Dosage de l'activité des cathepsines L, B et H dans la lignée de cellules épithéliales témoins Ctr.

| temps de traitement des cellules | Cathepsines | | |
|----------------------------------|-------------|--------|--------|
| | L | B | H |
| Acétone 4 h. | 100 | 100 | 100 |
| TPA 2 h | 43.97 | 51.4 | 83.93 |
| 4 h | 74.03 | 76.66 | 67.68 |
| 6 h | 56.15 | 61.84 | 84.89 |
| 8 h | 90.73 | 100.29 | 97.51 |
| DXME 4 h | 63.13 | 69.92 | 137.41 |
| E64 4 h | 15.01 | 26.04 | 107.13 |

Après traitement par le TPA à différents temps, par la DXME ou par le E64, les cellules sont prélevées, les enzymes extraites par du tampon tris-triton X-100 et soumises au dosage biochimique. Résultats exprimés en pourcentage par rapport au témoin acétone.

(TPA : 0.025 µg/ml ; DXME : 5.5 µg/ml ; E64 : 5 µg/ml)

TABLEAU 15 : Etude de l'action de la dexaméthasone et du TPA sur l'activité des cathepsines L, B et H des cellules épithéliales témoins Ctr.

| traitement des cellules : 4 h. | Cathepsines | | |
|--------------------------------|-------------|-------|-------|
| | L | B | H |
| Acétone | 10.37 | 11.85 | 24.63 |
| TPA | 4.17 | 5.28 | 15.97 |
| TPA + DXME t0 | 5.15 | 5.59 | 24.85 |
| TPA + DXME t3 | 5.32 | 6.94 | 11.78 |

Les cellules sont prélevées après traitement et le dosage est réalisé sur les enzymes L, B et H extraites de la fraction cytosolique. Résultats exprimés en nmol de substrat dégradé/mg prot./60 mn.

(TPA : 0.025 µg/ml ; DXME : 5.5 µg/ml)

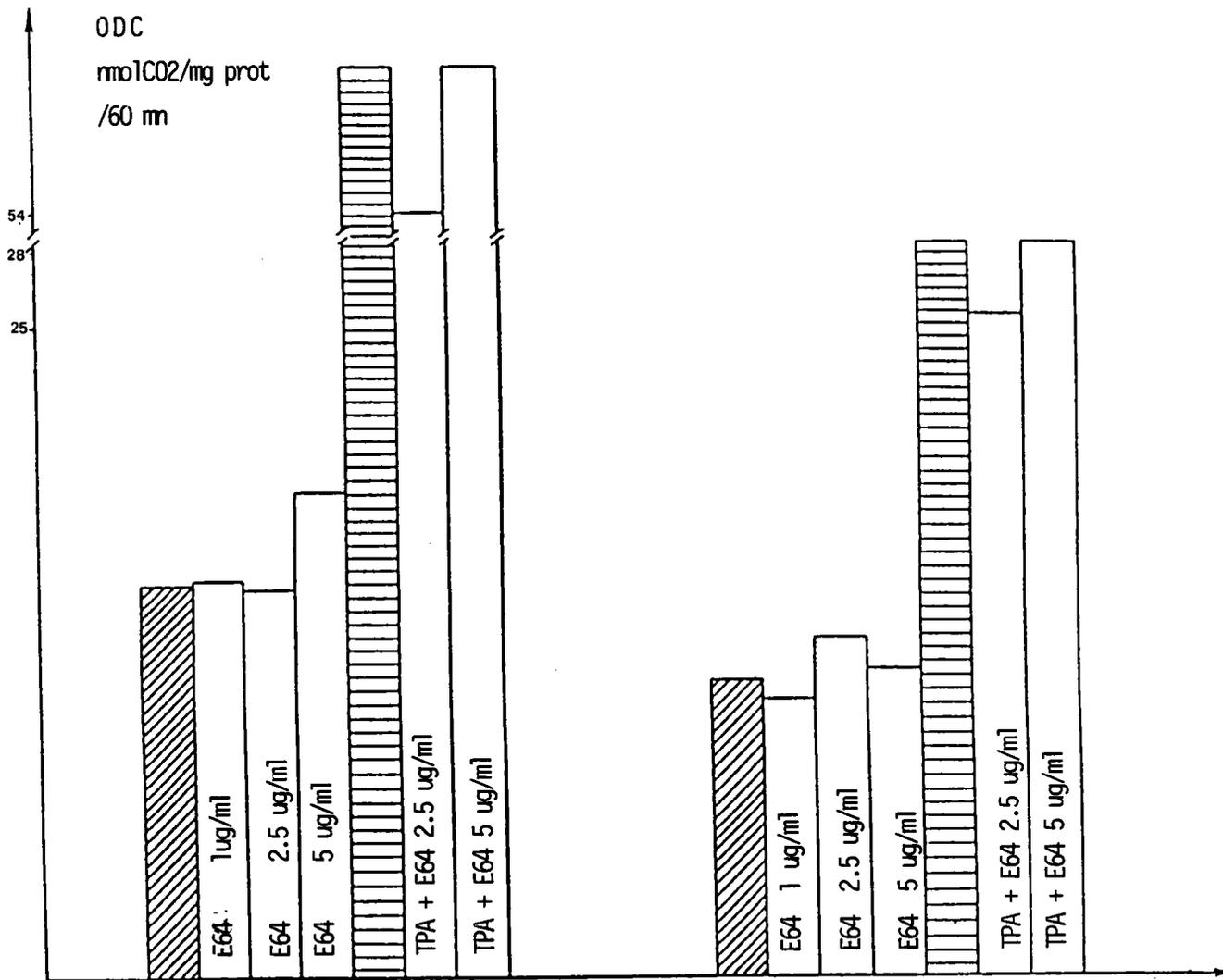


Figure 15 - Modulation de l'activité ODC induite par le TPA par un inhibiteur de protéases le E64. Etude comparée sur les cellules épithéliales Ctr et BPe.

Le E64 est ajouté seul ou simultanément au TPA (t₀) dans les cultures de cellules épithéliales.

L'action du E64 sur l'induction de l'ODC par le TPA se retrouve dans les mêmes proportions dans les cellules témoins Ctr que dans les cellules traitées BPe.

▨ témoin acétone

▨ traitement par le TPA ($4 \cdot 10^{-8}$ M) pendant 4 heures.

2 - Analyse des sérine-protéases par zymogramme et action d'inhibiteurs spécifiques.

2.1. - Etude de l'effet du TPA et de la dexaméthasone sur les sérine-protéases.

Par la méthode d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide additionné de substrat-gélatine (zymogramme) nous avons étudié la stimulation ou l'inhibition de l'activité protéolytique des sérine-protéases dans les cellules épithéliales Ctr et BPe (photos n°2 et 3). A l'aide d'un programme informatique approprié, nous avons pu réaliser une étude quantitative des plages de lyse obtenues par l'action des enzymes protéolytiques sur le gel de gélatine (figure n° 16).

Comme nous le voyons sur la photo n° 2 (fraction particulière) nous avons obtenu des plages de lyse d'intensité très faibles pour les cellules Ctr et quasi-inexistantes pour les cellules BPe. Nous avons donc analysé en détail le zymogramme de la fraction cytosolique, riche en protéases.

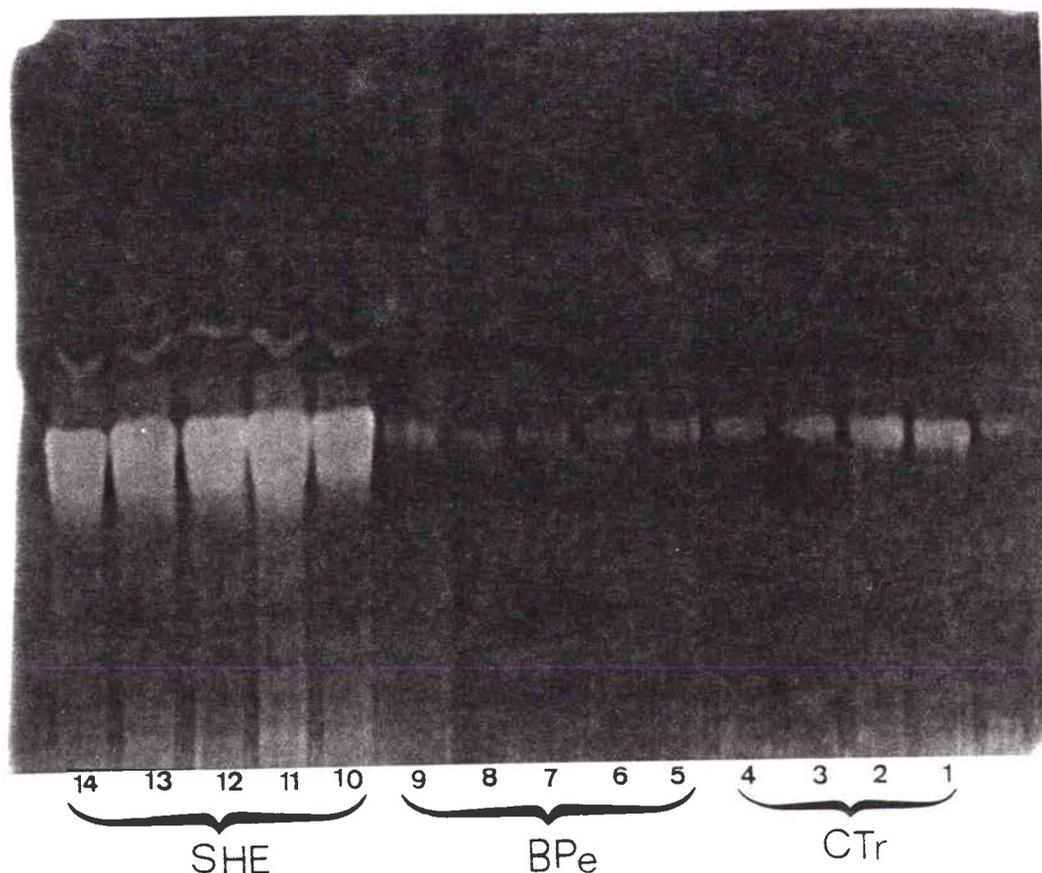
En ce qui concerne les cellules épithéliales Ctr, nous pouvons constater à la fois sur la photographie 2 et la figure 16 que le traitement des cellules par le TPA provoque une stimulation des enzymes protéolytiques, ceci se traduit par une plage de lyse très importante par rapport au témoin acétone (% activité protéolytique : 150). Le traitement par la DXME simultanément au TPA et même en différé de 3 heures ne donne qu'une plage de lyse à peu près égale à celle du témoin (pourcentage activité protéolytique : 90-95) tandis que la DXME seule conduit à une inhibition de 50 % de l'activité des sérine-protéases. La DXME semble bien inhiber l'action des protéases comme nous l'avions émis en hypothèse. En revanche sur les cellules transformées BPe, nous observons peu de différence entre les plages de lyse quel que soit le traitement subi préalablement par les cellules, même par le TPA seul. Il semble que les cellules BPe se comportent différemment par rapport aux cellules témoins Ctr. Il serait possible que dans les cellules BPe, les protéases soient également moins sensibles à l'action de la DXME et/ou du TPA. Il est également possible comme dans le cas des cellules cancéreuses, que l'activité protéasique soit plus intense chez les BPe que chez les témoins ; dans ce cas, les protéases seraient utilisées en grande partie. Il ne resterait qu'un taux de protéases résiduelles faible et donc de faibles plages de lyse.

Nous avons réalisé le même type d'analyse sur zymogramme avec les cellules SHE traitées par la DXME et/ou le TPA.

Comme nous pouvons le voir sur la figure n° 17, l'activité protéolytique (fraction cytosolique) est également détectable mais avec peu de variations entre les différents traitements subis par les cellules SHE. Notamment nous observons une

Photographie 2 : Zymogramme représentant la stimulation des sérine-protéases par le TPA et leur inhibition par la DXME.

Extrait des fractions particulaires des cellules SHE, Be et Ctr.



1, 5, 10 : Acétone

2, 6, 11 : Action du TPA

3, 7, 13 : Action combinée TPA + DXME t0

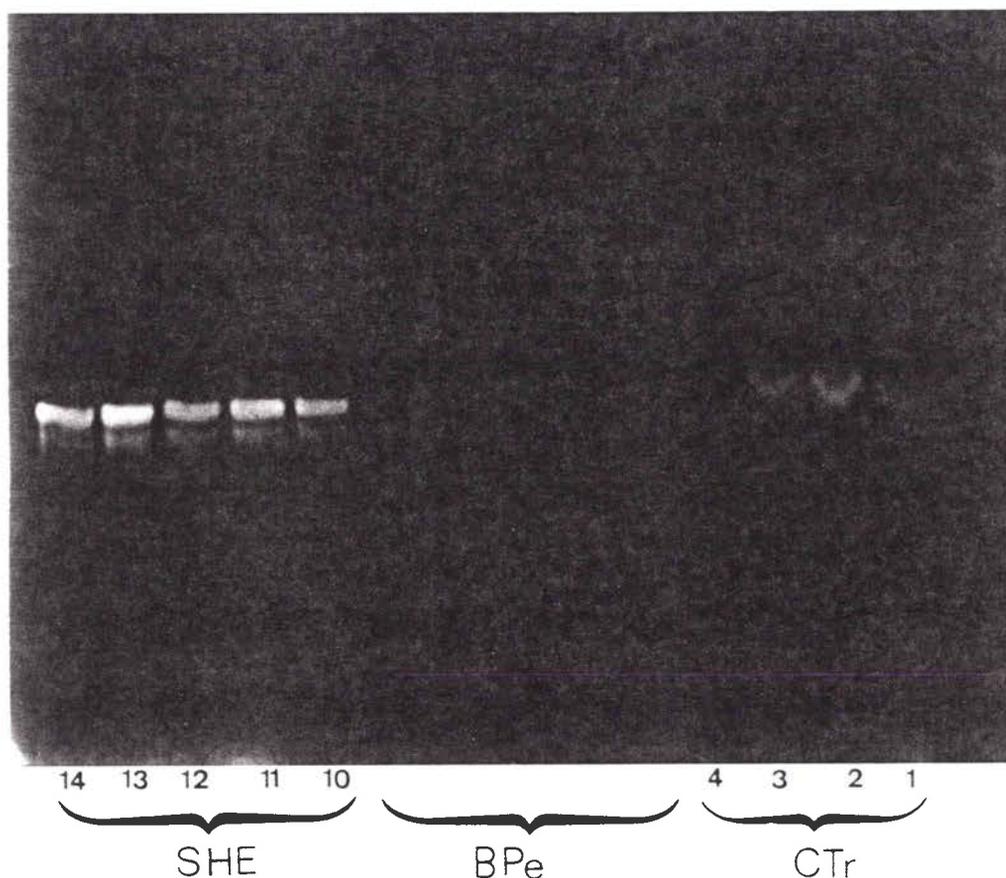
4, 8, 12 : Action différée de 3 heures de la DXME par rapport au TPA

9, 14 : Effet de la DXME

Les cellules ont été traitées par le TPA et la dexaméthasone, pendant 4 heures pour les cellules Ctr et BPe, ou 5 heures pour les SHE. Les extraits de fraction particulaire sont déposés sur gel de polyacrylamide additionné de gélatine comme substrat des sérine-protéases.

Photographie 3 : Zymogramme représentant la stimulation des sérine-protéases par le TPA et leur inhibition par la DXME.

Extrait des fractions cytosoliques des cellules SHE, Be et Ctr.



- 1, 5, 10 : Acétone
- 2, 6, 11 : Action du TPA
- 3, 7, 13 : Action combinée TPA + DXME t0
- 4, 8, 12 : Action différée de 3 heures de la DXME par rapport au TPA
- 9, 14 : Effet de la DXME

Les cellules ont été traitées par le TPA et la dexaméthasone, pendant 4 heures pour les cellules Ctr et BPe, ou 5 heures pour les SHE. Les extraits de fraction cytosolique sont déposés sur gel de polyacrylamide additionné de gélatine comme substrat des sérine-protéases.

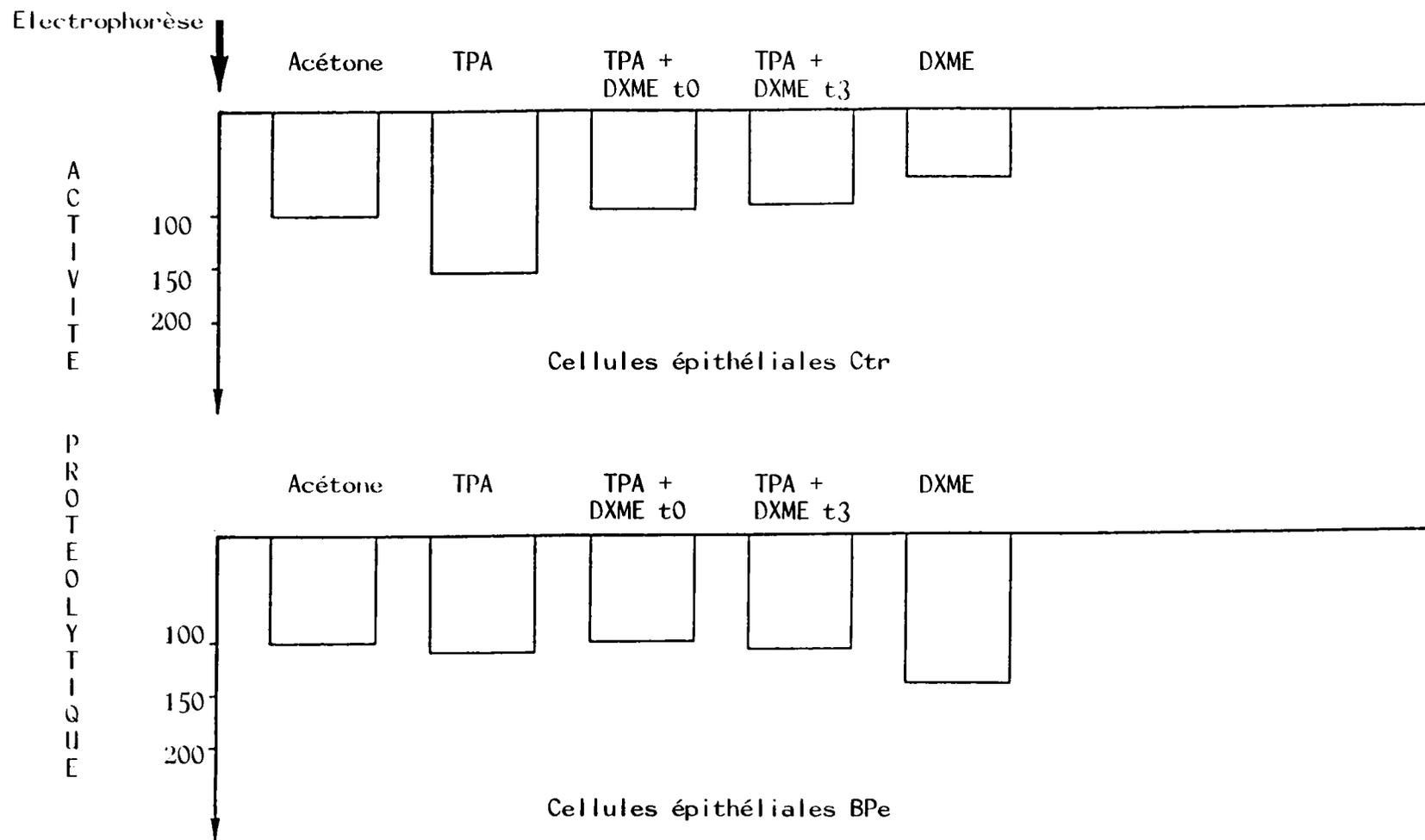


Figure 16 - Représentation graphique de l'activité des sérine-protéases sur le substrat-gélatine déterminée par zymogramme dans les cellules épithéliales Ctr et BPe.

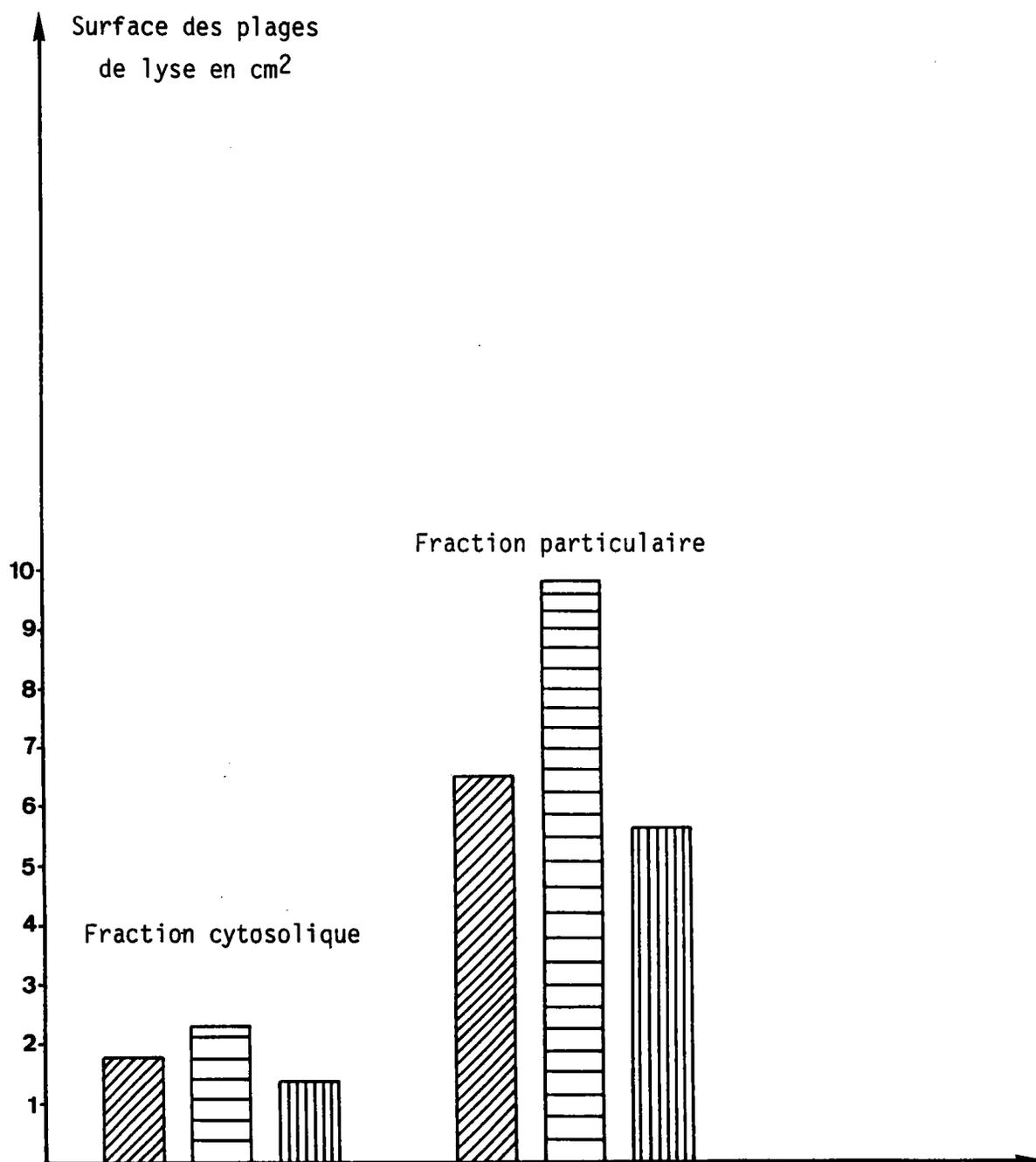


Figure 17 - Analyse des sérine-protéases par électrophorèse sur gel de gélatine dans les cellules SHE.

Activité protéolytique estimée proportionnellement à la surface des plages de lyse du substrat gélatine sur le zymogramme.

- ▨ témoin acétone
- ▤ Action du TPA (0.16 µM)
- ▥ Action de la DXME (2.5.10⁻⁵ M)

faible stimulation des protéases par le TPA (30 %) par rapport à celle du taux basal ; il est possible que nous ne mesurons que les protéases résiduelles, leur activité catalytique étant forte au niveau de l'ODC. On constate également que la dexaméthasone conserve toujours son effet inhibiteur sur l'activité protéasique ($1.36 \text{ cm}^2/1.72 \text{ cm}^2$ pour le taux basal, soit 20 % d'inhibition). Par contre, pour la fraction particulaire on détecte une très forte activité protéasique, 2.5 à 3 fois supérieure à celle mesurée pour la fraction cytosolique. Le TPA stimule de 50 % environ cette activité protéolytique. La DXME inhibe toujours cette activité des protéases d'environ 15 %.

A la différence des cellules épithéliales Ctr et BPe, l'activité protéasique est beaucoup plus importante dans la fraction particulaire chez les SHE que dans la fraction cytosolique.

2.2 - Etude des inhibiteurs de protéases dans la modulation de l'activité ODC.

Dans la mesure où la stabilité de l'enzyme ODC peut dépendre de l'action protéolytique des sérine-protéases, nous avons étudié dans nos systèmes cellulaires, les variations de l'activité ODC après blocage de ces protéases par des inhibiteurs spécifiques.

Plusieurs études (Troll, 1976 ; Rossman et Troll., 1980) ont montré qu'un certain nombre de substances se comportent comme des inhibiteurs de protéases au contact de l'enzyme : TLCK (Tosyl-L-lysine-Chlorométhyl Kétone), PMSF (Phénylméthyl-sulfonylfluoride) et TPCK (N-Tosyl-L-phénylalanine-chlorométhyl kétone).

Nous avons testé ces 3 inhibiteurs sur les cellules épithéliales témoins-Ctr. Comme on peut le voir dans notre tableau 16, le TLCK et PMSF ne modifient pas l'activité ODC induite par le TPA. Ils ne semblent pas avoir d'effet sur les protéases dans les cellules, sinon nous devrions obtenir un taux d'ODC plus élevé. L'autre explication possible est que ces produits chimiques ne pénètrent pas ou, pénètrent mal dans la cellule. Au contraire pour le TPCK, nous avons obtenu un effet inhibiteur sur l'activité ODC. Il serait possible que le TPCK agisse sur le gène ODC et bloque la synthèse d'ARN messenger, comme cela a été constaté pour d'autres inhibiteurs de protéases (Communication personnelle de H. Van Steeg).

Nous avons donc testé un 4ème inhibiteur de nature protéique cette fois, l'aprotinine (tableau 17) sur les cellules épithéliales Ctr, et également sur les cellules SHE.

L'aprotinine a été testée à la dose de 12 µg/ml ($1.9 \cdot 10^{-9}$ M) sur les cellules épithéliales témoins Ctr, et de 6 µg/ml ($9.2 \cdot 10^{-10}$ M) sur les SHE, doses non toxiques lorsque l'aprotinine est ajoutée simultanément au TPA.

Chez les cellules Ctr : on constate que l'addition d'aprotinine simultanément au TPA ne provoque qu'une faible augmentation d'ODC. A t3, il y a augmentation d'environ 40 % de l'activité ODC par rapport au TPA. L'aprotinine bloquerait donc les protéases cytoplasmiques ce qui pourrait expliquer cette augmentation d'ODC.

Chez les cellules SHE, à t0 il y a inhibition de l'activité ODC tandis qu'il y a une légère stimulation à t3.

A la vue de ces résultats (peu ou pas de stimulation d'ODC à t0 et stimulation de l'ODC à t3), on peut se demander si l'aprotinine est un inhibiteur assez spécifique des sérine-protéases. Il serait possible que dans le cytoplasme des cellules, l'inhibition des sérine-protéases soit assez fugace ou alors que l'aprotinine interfère aussi sur l'expression du gène ODC.

TABLEAU 16 : Modulation de l'activité ODC par trois inhibiteurs de protéases, TLCK, TPCK et PMSF sur les cellules épithéliales témoins-Ctr.

| Traitement (durée 4 heures) | Activité ODC nmol CO ₂ /mg prot./60 mn. | Facteur de variation |
|--------------------------------|---|-------------------------|
| Acétone | 18.43 ± 1.08 | 1 |
| TLCK 50 10 ⁻⁶ M | 20.04 | 1.09 |
| TPA 4.10 ⁻⁸ M | 70.35 ± 2.41 | 3.82 |
| TPA + TLCK t0 | 63.36 ± 3.96 | 3.44 |
| TPA + TLCK t3 | 71.39 ± 2.98 | 3.88 |
| Acétone | 14.83 ± 0.28 | 1 |
| PMSF 100 10 ⁻⁶ M | 14.13 | 0.95 |
| TPA + 4.10 ⁻⁸ M | 56.99 ± 0.25 | 3.84 |
| TPA + PSMF t0 | 54.21 ± 1.94 | 3.66 |
| TPA + PMSF t3 | 56.91 | 3.84 |
| Acétone | 15.97 ± 0.049 | 1 |
| TPCK 50 10 ⁻⁶ M | 11.08 | 0.70 |
| TPA 4.10 ⁻⁸ M | 62.69 ± 1.86 | 3.93 |
| TPA + TPCK t0 | 13.15 ± 1.33 | 0.83 |
| TPA + TPCK t3 | 22.09 ± 0.50 | 1.38 |

Les cellules ont été traitées pendant 4 heures dans du milieu DMEM-H21 à 0.1 % de BSA.

Moyenne d'une expérience réalisée en triplicata.

TABEAU 17 : Etude d'un inhibiteur spécifique des sérine-protéases, l'aprotinine, sur l'activité ODC.

| Lignée cellulaire | Temps de traitement | Traitement | Activité ODC nmol CO ₂ /mg prot./60 mn | Facteur de variation |
|-------------------|---------------------|------------------------------------|--|----------------------|
| Ctr | 4 h. | Acétone | 12.61 + 1.67 | 1 |
| | | Aprotinine 1.9.10 ⁻⁷ M | 12.47 + 1.59 | 1 |
| | | TPA 4.10 ⁻⁸ M | 66.11 + 6.13 | 5.3 |
| | | TPA + Aprot. t0 | 73.48 + 8.57 | 5.82 |
| | | TPA + Aprot. t3 | 94.31 + 0.67 | 7.48 |
| SHE | 5 h. | Acétone | 16.75 + 0.59 | 1 |
| | | Aprotinine 9.2.10 ⁻¹⁰ M | 14.12 + 1.23 | 0.85 |
| | | TPA 16.10 ⁻⁸ M | 30.94 + 0.41 | 1.85 |
| | | TPA + Aprot. t0 | 21.44 + 1.85 | 1.28 |
| | | TPA + Aprot. t3 | 32.00 + 1.68 | 1.91 |

Les cellules Ctr sont traitées pendant 4 heures dans du milieu DMEM-H21 à 0.1 % BSA tandis que les SHE sont traitées pendant 5 heures dans du milieu DMEM-H16 modifié à pH 6.7 à 5 % SEV. Résultats exprimés en nmol CO₂/mg protéine/60mn.

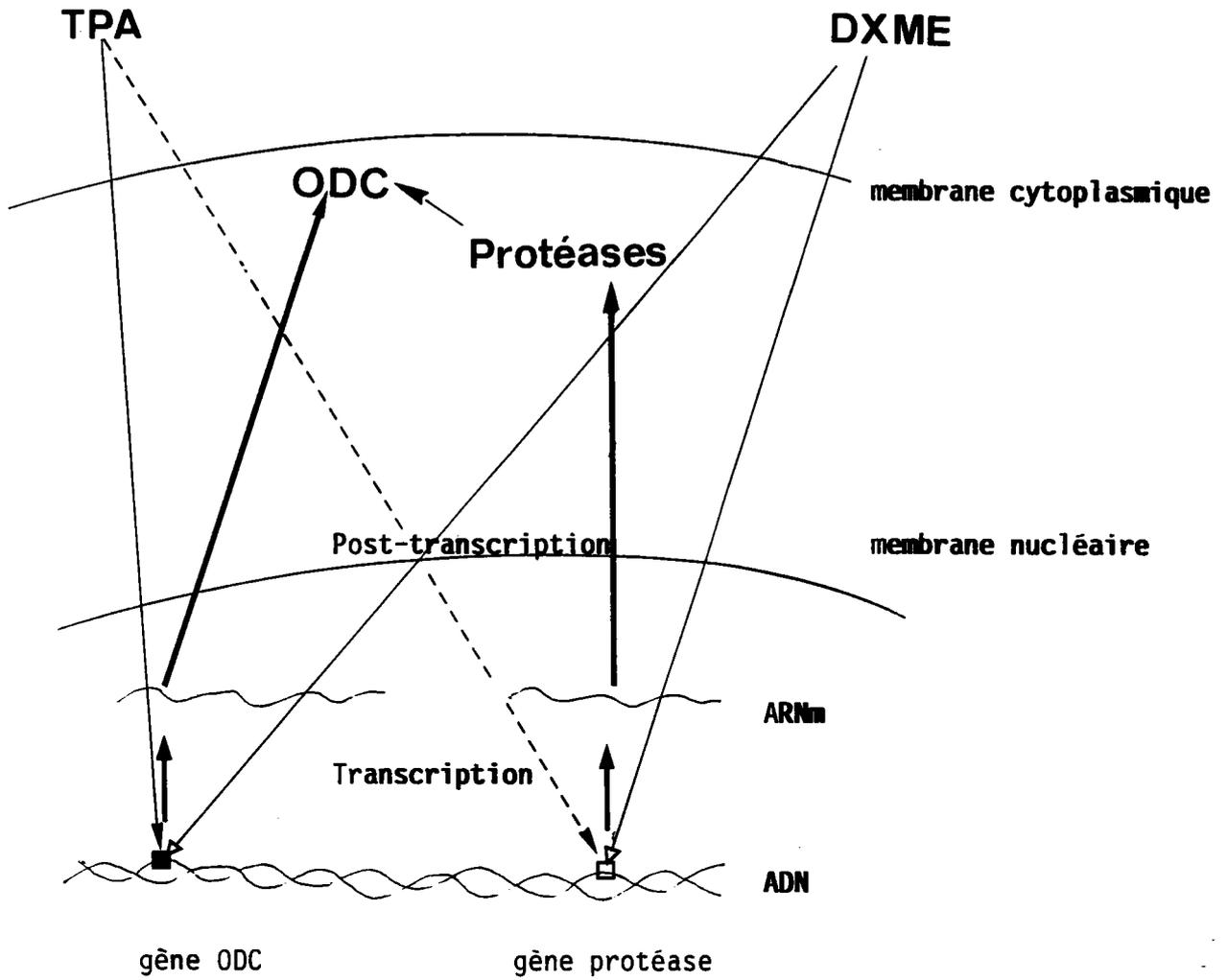
Moyenne de 2 expériences réalisées en triplicata

L'ensemble de nos résultats sur l'étude de l'action des enzymes protéolytiques sur la régulation de l'ODC, nous a permis de montrer que

- (1) les enzymes lysosomiales n'intervenaient pas : aucune corrélation n'a pu être trouvée entre l'inhibition de ces enzymes et la modulation de l'activité ODC cytoplasmique.
- (2) Il semblerait que les sérine-protéases soient impliquées dans cette régulation de l'ODC et que la DXME jouerait un rôle au niveau de ces enzymes protéolytiques.
- (3) Pour mieux cerner le rôle joué par ces sérine-protéases nous avons donc utilisé des inhibiteurs de sérine-protéases.

Ces produits devraient agir au niveau du compartiment cytoplasmique. Mais comme nous avons pu le montrer avec l'aprotinine, un des inhibiteurs les plus spécifiques existant actuellement, la substance devrait agir aussi au niveau du compartiment nucléaire.

Nous avons donc vérifié dans le chapitre suivant si l'aprotinine avait seulement une action au niveau cytoplasmique, ou s'il existait un effet secondaire au niveau du gène ODC.



**Figure n° 18 : Schéma de l'action du TPA et de la DXME :
Hypothèse de recherche**

4ème Partie : Etude moléculaire de l'expression du gène codant pour l'ODC.

Comme nous avons pu le voir avec les résultats précédents, l'activité basale ODC cytoplasmique est relativement stable dans les 2 lignées de cellules épithéliales témoins (Ctr) et traitées (BPe) ; ces cellules sont très sensibles à l'action du TPA, notamment pour la lignée Ctr : la stimulation représente déjà 4 fois le taux basal, après 4 heures d'incubation. Par contre, les cellules BPe semblent moins sensibles à l'action du TPA dans les mêmes conditions de traitement ; l'induction de l'ODC correspond seulement à 2 fois la valeur initiale.

Cette différence observée dans le taux d'ODC entre les cellules Ctr et BPe, pourrait être spécifique de l'ODC cytoplasmique, ou bien être une conséquence de la réponse du gène codant pour la synthèse de l'enzyme ODC.

Plusieurs travaux ont démontré que le TPA se liait aux peptides AP1 et AP2 dans le cytoplasme ; grâce à cette liaison, le cancérigène peut passer dans le compartiment nucléaire et se fixer sur les éléments régulateurs du gène ODC. L'expression de ce gène correspond à un taux de synthèse de l'ARN messenger. En principe ce taux d'ARNm commande la synthèse de la protéine enzymatique ODC ; mais dans des conditions expérimentales, une modulation post-transcriptionnelle peut se produire et modifier l'activité ODC cytoplasmique (Figure 18).

Nous avons été amenés à voir s'il y avait une différence dans l'expression du gène codant pour l'ODC dans les 2 lignées de cellules épithéliales Ctr et BPe à travers le niveau d'induction de l'ARNm. Après avoir séparé l'ARN de nos cellules, nous avons analysé par la méthode de Northern blot le taux d'ARNm induit par le TPA dans ces 2 lignées cellulaires.

1 - Induction de l'ODC-ARN messenger dans les cellules épithéliales.

L'analyse du Northern-blot (après exposition du filtre d'hybridation pendant 4 jours) montre clairement une accumulation dans les 2 lignées cellulaires des deux sortes d'ODC-ARNm stables, respectivement 2.1 et 2.4 Kb (photo 4). Après quantification des ARN messagers radioactifs par l'appareil phosphorimager, les résultats (photo 5 et tableau 18) indiquent que - Pour les cellules témoins Ctr, le taux d'ARNm après induction par le TPA est 6 fois supérieur à celui du taux basal (0.572 contre 0.093).

- Les proportions d'induction de l'ODC-ARNm sont de 3 contre 1 pour les cellules BPe (1.70 contre 0.51).

On peut constater que sous l'action du TPA, le taux d'induction de l'ODC-ARNm est proportionnellement 2 fois plus élevé dans les cellules témoins que dans

les cellules BPe (facteurs de variation 6.1 contre 3.3 respectivement). Cette différence est semblable à celle observée pour l'ODC cytoplasmique entre les cellules Ctr et BPe.

Lorsque les cellules Ctr sont traitées par la dexaméthasone, le taux d'ARNm est plus faible par rapport au témoin acétone :

- en application simultanée avec le TPA (t0), la DXME inhibe l'induction de l'ARN messenger ; le facteur de variation par rapport au taux basal est de 3:1 contre 6:1 pour le TPA seul.
- à t3, l'inhibition existe toujours, mais moins forte qu'au temps t0 ; en tout cas, ce taux est toujours inférieur à celui observé avec le TPA seul.

Cette inhibition exercée par la DXME seule et en traitement simultané (t0) avec le TPA reflète l'inhibition observée au niveau du taux d'induction de l'ODC cytoplasmique. Par contre pour le temps t3 (1 heure de contact), nous observons encore une inhibition quoique plus faible que celle obtenue à t0 (le facteur de variation du taux d'ARNm reste à 3.9 contre 3.1 ; ces résultats sont toujours inférieurs à l'induction de l'ARNm par le TPA seul). Ces résultats ne reflètent pas ce que nous observons au niveau cytoplasmique, à savoir un taux d'ODC au temps t3 supérieur à celui obtenu par le TPA seul. Le même phénomène est observé pour les cellules BPe : la DXME en association avec le TPA (t0 et t3) diminue le taux d'ODC-ARNm induit par le TPA. Or dans ces cellules, l'activité ODC cytoplasmique diminue seulement au temps t0 ; par contre à t3, elle est équivalente à celle induite par le TPA seul.

Dans tous les cas nous pouvons remarquer que la DXME agit bien sur le gène ODC avec un effet inhibiteur. Mais la différence d'effets entre l'inhibition de l'ODC-ARNm par la dexaméthasone au temps t3 et la stimulation de l'ODC cytoplasmique à t3 laisse supposer qu'il y aurait une régulation de l'activité ODC au stade post-transcriptionnel, probablement au niveau cytoplasmique.

2 - Induction de l'ODC-ARNm dans les cellules embryonnaires de hamster syrien (SHE).

Nous avons réalisé cette expérience dans le but de vérifier si la sonde cDNA préparée à partir de cellules de rat pourrait hybrider avec le gène ODC de hamster syrien. Nous avons aussi étudié l'expression du gène codant pour l'ODC dans les cellules SHE, pour savoir si nous retrouvions une différence d'induction de l'ARNm par rapport à celle de l'ODC cytoplasmique comme dans le cas des cellules épithéliales.

Il ressort nettement d'après les résultats du tableau 19, que le TPA stimule fortement l'induction de l'ARNm dans les cellules SHE. Proportionnellement, le taux d'induction de l'ODC-ARNm est plus important que celui de l'activité ODC (3:1 et 2:1 par rapport au taux basal respectivement).

La DXME inhibe également cette induction, comme dans le cas des cellules épithéliales. Cette diminution d'induction de l'ODC-ARNm est plus importante à t0 (traitement simultanée avec le TPA) qu'à t3 (différée de 3 heures par rapport au TPA).

Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux observés pour l'ODC cytoplasmique, à savoir une stimulation de l'activité ODC cytoplasmique par la DXME, ajoutée 3 heures après le TPA. Cela laisse supposer de nouveau qu'une modulation de la protéine enzymatique ODC aurait lieu au niveau post-transcriptionnel.

Avec la sonde cDNA préparée à partir de cellules de rat, l'hybridation a été effective avec le gène ODC des cellules de hamster.

3 - Etude de l'expression du gène ODC après traitement par un inhibiteur de sérine-protéases, l'Aprotinine.

Très souvent les inhibiteurs de protéases peuvent interférer dans le compartiment nucléaire et inhiber l'expression d'un certain nombre de gènes.

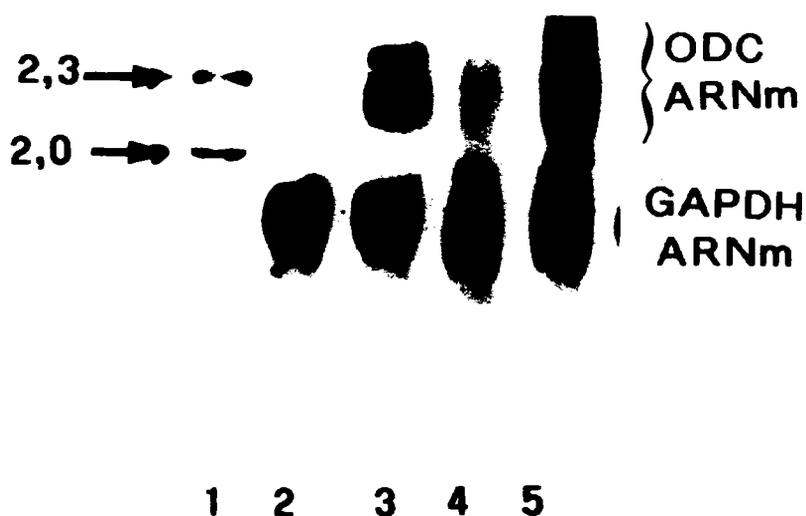
A la suite des résultats particuliers obtenus au niveau de l'ODC cytoplasmique, nous avons réalisé une étude dans le but de vérifier si l'aprotinine n'interférait pas sur l'expression du gène ODC (photographie n° 5).

Après quantification de l'ARNm radioactif (tableau 20), on constate que l'aprotinine seule diminue le taux de l'ODC-ARNm. L'addition d'aprotinine en même temps que le TPA ou différée de 3 heures inhibe légèrement l'action du TPA sur l'ODC-ARNm (2.9 et 3.1 contre 3.3 respectivement).

L'action de l'aprotinine n'est donc pas seulement limité au compartiment cytoplasmique. Elle peut aussi interférer dans le compartiment nucléaire et exercer un effet inhibiteur sur l'expression du gène ODC.

Photographie 4

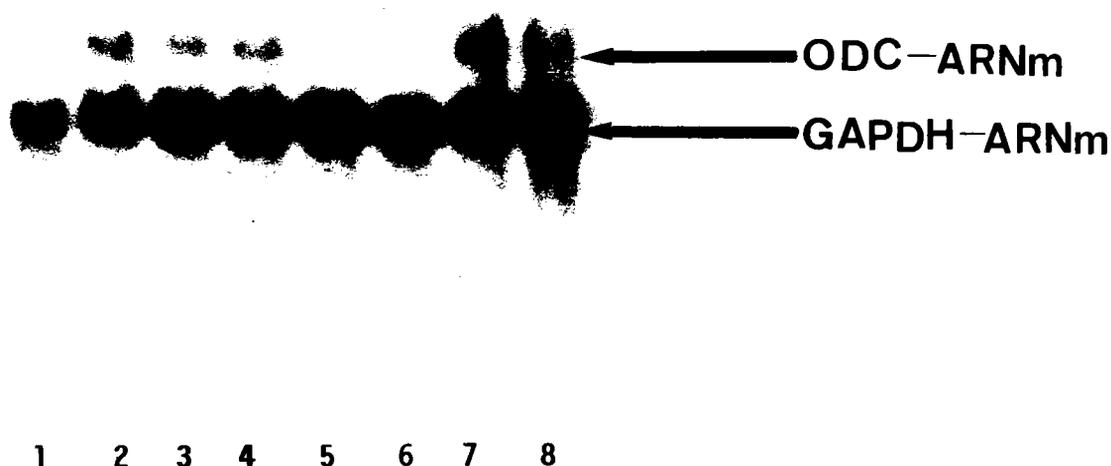
Analyse par Northern-blot de la transcription du gène ODC dans les cellules épithéliales témoins et transformées : accumulation de l'ODC - ARNm basal et en présence de TPA.



- Cellules témoins (Ctr) et transformées (BPe) cultivées dans un milieu appauvri en sérum (0.5 %) pendant 18 heures avant l'expérience. Traitement par le TPA pendant 4 heures. Lavage et extraction de l'ARN pour l'analyse par Northern-blot.
- Sonde ODC utilisée : cDNA, 930 bp, fragment Hind III radio-marquée au ^{32}P .
- Marqueurs : fragment 2,0 et 2,3 Kb de lambda Hind III
- colonnes : 1 = marqueur
 - 2 = BPe traitées avec le solvant acétone
 - 3 = BPe traitées avec du TPA
 - 4 = Ctr traitées avec acétone
 - 5 = Ctr traitées avec TPA
- gène GAPDH utilisé comme témoin interne. Deux types d'ODC - ARNm sont hybridés : 2.1 et 2.4 Kb, GAPDH - ARNm à 1.3 Kb.

Photographie 5

Analyse par Northern-blot de la transcription du gène ODC dans les cellules épithéliales témoins Ctr : stimulation de l'ODC - ARNm par le TPA. Effet inhibiteur de la DXME. Action de l'aprotinine.



- Les conditions de culture et de traitement sont identiques à celle décrite précédemment (photographie 4).

- sonde ODC utilisée : cDNA, 930 bp, fragment Hind III radio-marquée au ^{32}P .

- Traitement reçu par les cellules Ctr :

- 1 - Acétone
- 2 - TPA
- 3 - TPA + DXME, t0
- 4 - TPA + DXME, t3
- 5 - DXME
- 6 - Aprotinine
- 7 - TPA + Aprot., t0
- 8 - TPA + Aprot., t3

- gène GAPDH utilisé comme témoin interne Deux types d'ODC - ARNm sont hybridés : 2.1 et 2.4 Kb, GAPDH - ARNm à 1.3 Kb.

Tableau 18 : Analyse de la transcription du gène ODC dans les cellules épithéliales témoins (Ctr) et traitées (BPe) : analyse quantitative de l'ODC-ARN messenger.

| Lignée cellulaire | Traitement | ODC ARNm radioactif | Taux d'ARNm après correction | Facteur de variation |
|-------------------|-----------------------|---------------------|------------------------------|----------------------|
| Ctr | Acétone | 11.847 | 0.093 | 1 |
| | TPA 4.10^{-8} M | 97.741 | 0.572 | <u>6.1</u> |
| | TPA + DXME, t0 | 78.402 | 0.289 | 3.1 |
| | TPA + DXME, t3 | 80.238 | 0.364 | <u>3.9</u> |
| | DXME $1.25.10^{-5}$ M | 9.159 | 0.033 | 0.4 |
| ----- | | | | |
| BPe | Acétone | 12.784 | 0.51 | 1 |
| | TPA 4.10^{-8} M | 57.565 | 0.170 | <u>3.3</u> |
| | TPA + DXME, t0 | 10.932 | 0.76 | 1.5 |
| | TPA + DXME, t3 | 25.953 | 1.19 | <u>2.3</u> |
| | DXME $1.25.10^{-5}$ M | 2.966 | 0.28 | 0.5 |

Les cellules témoins (Ctr) et transformées (BPe) sont traitées pendant 4 heures par le TPA. La DXME est également ajoutée simultanément au TPA (t0) ou différée de 3 heures par rapport au TPA (t3) ; les taux d'ODC-ARNm sont ensuite mesurés. Par référence à l'autoradiogramme, les zones correspondant à l'ODC-ARNm et GAPDH-ARNm sont prélevées sur le filtre et la radioactivité mesurée : l'évaluation est effectuée après correction du bruit de fond et tenant compte de l'ARNm du témoin GADPH.

Tableau 19 : Analyse de la transcription du gène ODC dans les cellules SHE :
analyse quantitative de l'ODC-ARN messenger

| Lignée cellulaire | Traitement | ODC ARNm radioactif | Taux d'ARNm après correction | Facteur de variation |
|-------------------|----------------------|---------------------|------------------------------|----------------------|
| | Acétone | 15.622 | 0.071 | 1 |
| | TPA 16.10^{-8} M | 51.015 | 0.226 | <u>3.2</u> |
| SHE | TPA + DXME, t0 | 28.821 | 0.158 | 2.2 |
| | TPA + DXME, t3 | 46.924 | 0.202 | <u>2.8</u> |
| | DXME $2.5.10^{-5}$ M | 8.524 | 0.054 | 0.7 |

Les cellules SHE sont traitées pendant 5 heures avec du TPA. La DXME est également ajoutée simultanément au TPA (t0) ou en différée de 3 heures (t3) par rapport au TPA ; les taux ARNm sont ensuite mesurés. Par référence à l'autoradiogramme, les zones correspondant à l'ODC-ARNm et GADPH-ARNm sont prélevées sur le filtre et la radioactivité mesurée : l'évaluation est effectuée après correction du bruit de fond et tenant compte de l'ARNm du témoin GADPH.

Tableau 20 : Analyse de la transcription du gène ODC dans les cellules épithéliales Ctr et BPe : analyse quantitative de l'ODC-ARNM

| Lignée cellulaire | Traitement | ODC ARNm radioactif | Taux d'ARNm après correction | Facteur de variation |
|-------------------|------------------------|---------------------|------------------------------|----------------------|
| Ctr | Acétone | 11.847 | 0.093 | 1 |
| | TPA 4.10^{-8} M | 97.741 | 0.572 | <u>6.1</u> |
| | TPA + Aprot. t0 | 77.333 | 0.281 | 3.0 |
| | TPA + Aprot. t3 | 136.167 | 0.510 | <u>5.5</u> |
| | Aprot. $1.9.10^{-7}$ M | 10.743 | 0.044 | 0.5 |
| ----- | | | | |
| BPe | Acétone | 12.784 | 0.51 | 1 |
| | TPA 4.10^{-8} M | 57.565 | 1.70 | <u>3.3</u> |
| | TPA + Aprot. t0 | 20.238 | 1.47 | 2.9 |
| | TPA + Aprot. t3 | 42.881 | 1.59 | <u>3.1</u> |
| | Aprot. $1.9.10^{-7}$ M | 5.718 | 0.45 | 0.9 |

Les cellules témoins (Ctr) et transformées (BPe) sont traitées pendant 4 heures par le TPA. L'aprotinine est également ajoutée simultanément au TPA (t0) ou différée de 3 heures par rapport au TPA (t3) ; les taux d'ODC-ARNm sont ensuite mesurés. Par référence à l'autoradiogramme, les zones correspondant à l'ODC-ARNm et GAPDH-ARNm sont prélevées sur le filtre et la radioactivité mesurée : l'évaluation est effectuée après correction du bruit de fond et tenant compte de l'ARNm du témoin GADPH.

5ème Partie : Cinétique de l'activité ODC au cours de la transformation cellulaire.

L'utilisation du test de transformation sur cellules SHE permet de suivre dans des conditions expérimentales précises, la formation de colonies transformées.

Nous avons voulu vérifier aux différentes étapes de la transformation cellulaire : le taux d'ODC intracellulaire et la réponse de la cellule sous l'action du TPA.

1 - Induction de l'ODC et sensibilité des cellules SHE au TPA.

Pour simuler les mêmes conditions que celles utilisées dans le test de transformation, les cellules SHE ont étéensemencées dans une boîte costar-12 puits dans un milieu DMEM-16 réduit en bicarbonate, pH 6.7.

Au 5ème jour, les cellules des 6 derniers puits sont ensuite traitées avec du TPA (0.16 μM) pour induire la transformation morphologique des cellules. Au 8ème jour de culture, nous avons traité l'ensemble des cellules par le TPA pour mesurer le taux d'induction de l'ODC.

Les résultats du tableau 21 montrent que le taux basal est légèrement inférieur à celui du témoin (milieu-acétone), lorsque les cellules ont reçu un premier traitement par le TPA (J5). Par contre le fait d'avoir 2 traitements par le TPA sur les cellules SHE n'augmentent pas leur sensibilité : au 8ème jour les cellules restent stimulables par le TPA (facteur de variation ~ 8) par rapport au taux basal acétone. Après traitement par le TPA à J5, le taux basal ODC à J8 est inférieur à celui obtenu dans les cellules non traitées (2.36 contre 3.62 nmol $\text{CO}_2/\text{mg prot.}/60 \text{ mn}$).

Sous l'action d'un 2ème traitement par le TPA, l'induction de l'ODC est réelle ; en valeurs absolues, elle reste cependant inférieure au taux ODC obtenu après un premier traitement par le TPA (16.73 contre 19.52 nmol $\text{CO}_2/\text{mg prot.}/60 \text{ mn}$).

A la vue des résultats obtenus, nous avons cherché à reproduire les conditions de culture des cellules SHE avec une couche nourricière, conditions identiques à celles utilisées dans un test de transformation cellulaire.

TABLEAU 21 : Induction de l'ODC et sensibilité des cellules SHE au TPA.

| Traitement au 5ème jour de culture | Traitement (pendant 5 heures) au 8ème jour de culture. |
|------------------------------------|--|
| Milieu | Acétone : 3.62 |
| Milieu | TPA : 19.52 |
| ----- | |
| TPA | Acétone : 2.36 |
| TPA | TPA : 16.73 |

Les résultats sont exprimés en nmol CO₂/mg prot./60 mn. Moyenne des résultats d'une expérience réalisée en triplicata (M + SD).

2 - Recherche de l'activité ODC au cours des différentes étapes de la transformation cellulaire.

Le dosage ODC a été réalisé à différents jours du test de transformation, après avoir détaché les cellules des boîtes de Pétri-5 ml à l'aide d'un rubber-policeman.

L'addition de TPA au 2ème jour (J2) entraîne une diminution de trois-quart (12.5/3.2) de l'activité ODC basale, qui va en s'accroissant à J8 (tableau 22). La même diminution s'observe dans la série "initiation + promotion" (BaP + TPA) à J8.

Nous avons poursuivi nos investigations en nous basant sur le dosage ODC au 5ème jour (J5), où le taux ODC est suffisant pour l'étude de l'action du TPA et des substances chimiques. Nous avons étudié l'induction de l'ODC sur des cellules SHEensemencées comme pour un test de transformation jusqu'à J5 avec une couche nourricière. A la fin, les cellules sont prélevées et l'activité ODC mesurée dans les mêmes conditions que précédemment.

Les résultats sur l'induction de l'ODC par le TPA et sa régulation par la DXME pendant 5 heures (tableau 23) sont similaires à ceux que nous avons obtenus précédemment lors de l'étude de l'ODC sur SHE sans couche nourricière.

Pour la première série témoin (Acétone J1) : l'action du TPA sur l'ODC est très importante 12 fois supérieure à l'acétone et l'addition de DXME au TPA inhibe de 40 pourcent l'activité ODC par rapport au TPA seul.

Pour la série TPA (J2) le taux basal ODC est semblable à celui de la série témoin (1.14 nmoles CO₂/mg prot./60 mn) alors que l'ODC est fortement stimulée

lorsque les cellules sont traitées de nouveau par le TPA à J5 (taux 22 fois supérieure à l'acétone). Par contre la DXME inhibe complètement l'action du TPA sur l'ODC : il n'y a plus d'activité ODC enregistrée.

Pour la série "BaP + TPA" l'addition de TPA stimule toujours l'ODC de 7 fois, tandis que la DXME diminue cette stimulation de l'activité ODC due au TPA.

On constate que le taux basal est plus faible que celui de l'expérience sans couche nourricière (valeurs enregistrées : 1.13). Mais les cellules restent toujours sensibles à l'action du TPA avec une forte induction de l'activité ODC, dans tous les cas de traitement ("BaP + TPA", TPA).

TABLEAU 22 : Taux basal d'ODC mesuré au cours d'un test de transformation cellulaire sur SHE

| Traitement | J2 | J5 | J8 |
|------------|----|------|-----|
| Acétone | 11 | 12.5 | 13 |
| TPA | - | 3.2 | 2.5 |
| BaP + TPA | - | 12.5 | 6.0 |
| BaP | 16 | | |

Résultats exprimés en nmol CO₂/mg prot./60 mn. Les cellules ont étéensemencées dans une boîte de pétri 5 ml à J0. Le protocole de traitement suivi a été celui du test de transformation ; J1 = addition de la substance initiatrice BaP (1 µg/ml) ; J2, J5 = addition du promoteur TPA (0.1 µg/ml). A J2, J5 ou J8, le milieu est ôté et les cellules soigneusement rincées avec du PBS et congelées à -80°C jusqu'au dosage ODC.

TABLEAU 23 : Modulation de l'ODC par la DXME dans les cellules SHE au cours d'un essai de transformation.

| J1 | J2 | J5 + 5 heures de traitement | |
|---------|-----|-----------------------------|-------|
| Acétone | | Acétone : | 1.13 |
| | | TPA : | 13.23 |
| | | TPA + DXME : | 8.25 |
| ----- | | | |
| | TPA | Acétone : | 1.14 |
| | | TPA : | 22.23 |
| | | TPA + DXME : | 0.29 |
| ----- | | | |
| BaP | TPA | Acétone : | 1.35 |
| | | TPA : | 9.46 |
| | | TPA + DXME : | 3.44 |

Résultats exprimés en nmol CO₂/mg prot./60 mn. Les cellules SHE sont traitées selon le protocole de transformation : addition du BaP comme initiateur à J1 et du promoteur TPA à J2. A J5, un second traitement par le TPA seul ou associé à la DXME est réalisé dans du milieu DMEM-H16 modifié à pH 6.7 et à 5 % de sérum, pendant 5 heures. A la fin de l'expérience les cellules sont soigneusement rincées au PBS et congelées jusqu'au dosage de l'ODC.

A l'aide de nos résultats, nous avons pu constater que les cellules SHE restent sensibles à l'induction de l'ODC par le cancérigène, au cours des différentes étapes de transformation. Mais suivant le traitement préalablement reçu, TPA ou BaP, les cellules répondent alors différemment au second traitement par le TPA. Dans la série d'expérience sans couche nourricière, nous avons observé une diminution de l'induction de l'ODC par le TPA. Par contre dans l'expérience avec couche nourricière, nous avons une forte stimulation de l'ODC par le TPA (le taux ODC résiduel de la couche nourricière avoisine 0.1 nmol CO₂/mg prot./60 mn à J2, J5 et J8).

Dans le test de transformation des cellules SHE, nous obtenons généralement 10 % de colonies transformées par le TPA, au 8ème jour. Ce nombre serait insuffisant pour permettre de détecter les variations possibles du taux d'induction de l'ODC.

DISCUSSION

L'objectif de l'étude des cancérogènes chimiques est la caractérisation des fonctions cellulaires associés à l'évolution d'une cellule normale vers la cellule cancéreuse. Parmi les cancérogènes connus, un certain nombre d'entre eux n'agit pas par un effet génotoxique ; un mécanisme épigénétique serait alors fortement impliqué dans leur action transformante.

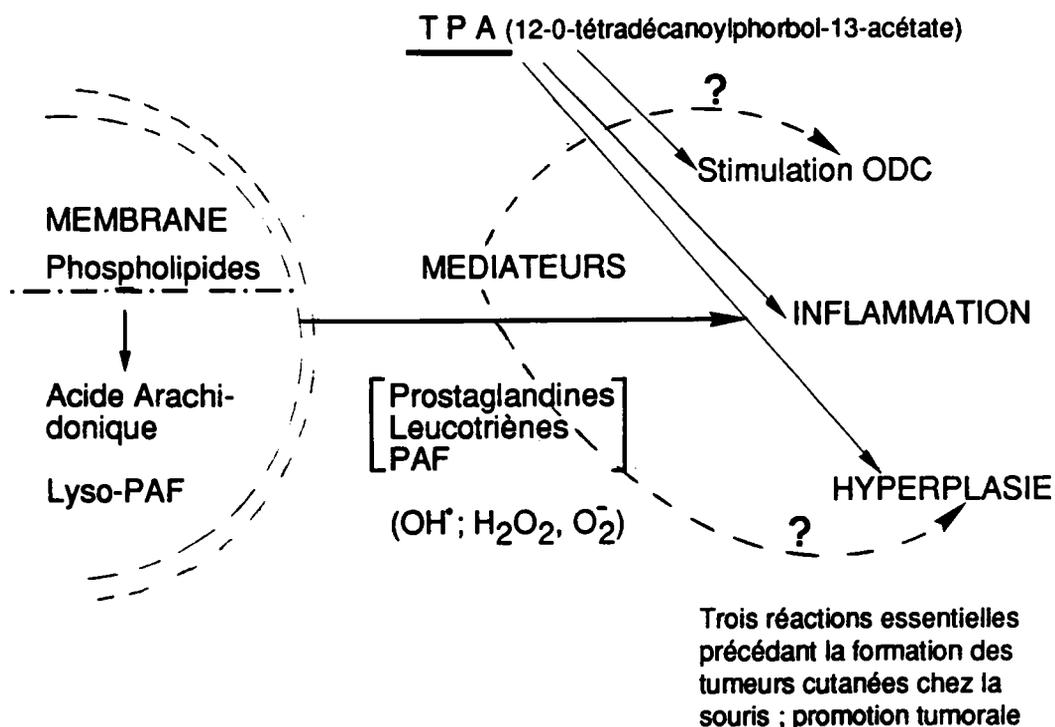
Des études à long-terme sur des souris traitées par le TPA, ont révélé une induction de l'ornithine décarboxylase (ODC) dans les cellules épidermiques; Simultanément, une réaction inflammatoire se développe dans le compartiment dermique suivie d'une réaction hyperplasique de l'épiderme. Toutes ces modifications sont réversibles mais s'aggravent lors de traitements répétés par le TPA. Cependant l'incidence des tumeurs cutanées diminue quand un anti-inflammatoire est associé avec le TPA. L'intensité de la réaction inflammatoire et l'hyperplasie ont alors été étudié en comparaison avec la stimulation de l'activité ODC dans les cellules.

Pour mieux comprendre la réaction spécifique des cellules cibles à l'action du TPA sans interférence des facteurs inflammatoires, nous avons étudié l'effet de ce cancérogène *in vitro* sur des modèles de cellules épithéliales de Rat et des cellules embryonnaires de Hamster syrien.

Les objectifs que nous nous sommes alors définis ont été :

(1) d'explorer l'action du TPA aux différentes étapes de transformation de la cellule au niveau moléculaire par l'expression du gène ODC et dans le cytoplasme à travers l'activité de l'enzyme ODC.

(2) de connaître le niveau d'action des médiateurs de l'inflammation selon le schéma ci-dessous :



Quelle serait l'action des médiateurs de l'inflammation sur l'induction de l'activité d'Ornithine Décarboxylase (ODC) et sur l'évolution de l'hyperplasie épidermique ?

(3) A la vue des résultats, nous devons déterminer l'importance de la régulation post-transcriptionnelle de l'ODC et le rôle des enzymes protéolytiques.

Réponses spécifiques des modèles cellulaires choisie à l'action du TPA.

Nos études ont été réalisées *in vitro* sur 2 lignées de cellules épithéliales issues de poumon embryonnaire de rat. Avec ces 2 lignées, nous disposons de 2 stades évolutifs de transformation ; les cellules épithéliales témoins Ctr représentent une lignée proche de la normale alors que les cellules traitées par le benzo(a)pyrène, BPe représentent une étape déjà avancée dans le processus de transformation.

L'autre modèle cellulaire retenu a été les cellules diploïdes de Hamster syrien SHE, utilisées aux tous premiers passages. Ces cellules nous rapprochent encore plus des cellules normales. De plus, ces cellules conservent leur capacité de métaboliser les substances cancérigènes par rapport à d'autres modèles cellulaires tels que les cellules 3T3. Les méthodes d'induction de la transformation phénotypique des SHE étant relativement bien codifiées, ceci peut nous permettre de suivre étape par étape les modifications biochimiques survenant au cours de ce processus de transformation.

Nos premiers résultats sur l'induction d'ODC par le TPA dans les cellules épithéliales Ctr et BPe ont démontré l'intérêt de ce modèle. Ces cellules sont d'un emploi facile, se multipliant rapidement et dans des conditions de cultures relativement simples comparées aux cultures de cellules épidermiques (Sasakawa et al., 1985 ; Yamamoto et al., 1987). Nous avons pu éviter l'interférence des facteurs de croissance et minimiser l'emploi du sérum de veau embryonnaire décomplémenté, qui sont connus pour affecter l'induction de l'ODC (Yuspa., 1985). L'emploi de sérum décomplémenté est à minimiser à cause de l'intervention possible des facteurs de croissance, mais aussi des inhibiteurs de protéases ; nous exposerons plus loin l'importance de l'action des enzymes protéolytiques dans les fonctions cellulaires.

De plus, les cellules épithéliales se sont révélées très sensibles à l'action du TPA. Les cellules Ctr répondent par une très forte augmentation de l'ODC, 4 fois supérieure au taux basal après 4 heures de traitement ; les cellules BPe ne sont pas aussi sensibles car le taux d'induction n'est que 2 fois le taux basal pour un même temps de traitement. Mais globalement, ces cellules Ctr et BPe sont très sensibles à l'action du TPA avec des taux d'ODC avoisinant les 10 nmol CO₂/mg de protéines/60 mn contre 5 nmol CO₂ pour les cellules épidermiques (Sasakawa et al., 1985) et 0.5

nmol CO₂/mg de protéines/60 mn pour les cellules CHO-C55-7 transfectées avec pSV2 neo (Van Steeg et al., 1990).

Nos résultats d'induction d'ODC par le TPA dans les cellules épithéliales ont montré une sensibilité supérieure des cellules témoins Ctr par rapport aux cellules BPe. Nous nous sommes alors posés la question de savoir si cette différence était limitée au compartiment cytoplasmique ou s'il y avait une modification de l'expression du gène ODC survenue au cours de la transformation.

Nous avons donc examiné les effets du TPA sur l'expression du gène ODC dans les cellules épithéliales pour découvrir les éventuelles différences dans la régulation du gène ODC. Dans le compartiment nucléaire, l'expression du gène ODC varie également avec la lignée cellulaire : forte stimulation de l'ARNm (ODC-ARNm) dans les cellules Ctr (6 fois le taux basal) et stimulation plus faible dans les cellules BPe (3 fois le taux basal).

Les études de fixation du TPA sur la membrane cellulaire ont assimilé les molécules de protéine kinase C (PKC) aux sites de fixation (récepteurs) du cancérigène. Le nombre de ces sites et leur affinité au TPA peuvent varier suivant les conditions de traitement de la cellule (Castagna et al., 1982 ; Thomas et al., 1987). Des études antérieures effectuées au laboratoire n'ont pas mis en évidence de modification dans le mode de fixation du TPA entre les cellules témoins Ctr et les cellules traitées BPe. La différence observée dans l'induction de l'ODC par le TPA dans les 2 lignées cellulaires serait inhérente à une différence dans l'expression du gène ODC. Il semble donc, que l'expression du gène ODC, soit différente selon la lignée cellulaire considérée.

L'analyse moléculaire du gène ODC a montré qu'il y avait une différence dans le taux d'induction de l'ODC-ARNm par le TPA, dans les 2 lignées cellulaires. La lignée témoin Ctr a un taux d'induction d'ARNm plus élevée que la lignée traitée BPe.

Cette différence dans le taux d'induction d'ODC-ARNm entre les 2 lignées se traduit par une même différence dans le taux d'ODC cytoplasmique. Le tableau récapitulatif ci-dessous montre encore que dans chacune des lignées, le taux d'induction de l'ARNm est plus élevé comparée au taux d'induction de l'ODC enzymatique. Pour la lignée Ctr, l'augmentation d'ODC-ARNm est 6 fois supérieure au taux basal alors que l'augmentation d'ODC-enzyme n'est que de 4 fois par rapport au taux basal. Cette même différence, à proportions égales, se retrouve dans les cellules BPe.

Tableau récapitulatif : ODC-ARNm et ODC cytoplasmique.

| | <u>Taux ODC-ARNm</u> | | <u>ODC cytoplasmique</u> | |
|-----|----------------------|---------|--------------------------|---------|
| | Trait. TPA | Acétone | Trait. TPA | Acétone |
| Ctr | 6 | 1 | 4 | 1 |
| BPe | 3 | 1 | 2 | 1 |

La stabilité de l'ODC-ARNm pourrait être différente d'une lignée à l'autre, mais des expériences de contrôle réalisées avec l'actinomycine D, n'ont pas montré une différence de stabilité de l'ARNm dans les 2 lignées cellulaires. De la même manière, les travaux de Gilmour et O'Brien (1989) réalisées avec l'actinomycine D, sur cellules SHE témoins et transformées n'ont montré aucune différence dans la demi-vie de l'ODC-ARNm après stimulation par le TPA. Cette même équipe a également vérifié si l'induction de cet ODC-ARNm nécessitait la synthèse d'une protéine. Pour cela, ils ont bloqué la synthèse protéique par la cycloheximide : l'induction de l'ODC-ARNm est indépendante de la synthèse protéique.

Nous n'avons pas d'explication pour la différence d'induction de l'ODC-ARNm entre les cellules Ctr et BPe. Nous pouvons supposer que les cellules BPe, traitées par le BaP au départ, ont subi une modification au niveau génomique, sachant que le BaP est génotoxique. Nous pouvons également supposer que le traitement préalable par le BaP a provoqué une modification du mécanisme de l'expression du gène ODC. Cette hypothèse a également été émise par Mc Conlogue et al., (1986). Enfin cette différence d'induction pourrait également provenir d'une vitesse de métabolisation du TPA variable selon les cellules. Toutefois, des études plus approfondies sont nécessaires pour bien comprendre le mécanisme d'action du TPA dans ces 2 lignées.

Nos résultats ont mis en évidence que la différence d'activité ODC-cytoplasmique entre les 2 lignées était consécutive à une différence du taux d'induction de l'ODC-ARNm, après traitement par le TPA. Nous avons également observé un taux d'ODC-ARNm proportionnellement supérieur au taux d'induction de l'ODC cytoplasmique, pour une même lignée cellulaire. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'en plus de l'expression du gène ODC, nous devons tenir compte d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnel. Nous discuterons en détail de ce mécanisme qui serait liée à une intervention des enzymes protéolytiques.

Le TPA stimule également l'induction d'ODC dans les cellules de hamster SHE, mais ce degré d'induction varie avec les conditions de culture notamment des différences de pH. A pH 7.2 nos valeurs sont en concordance avec les résultats publiés par O'Brien et Diamond (1977), Gilmour et al., (1985) ; mais les valeurs obtenues sont relativement faibles et les écarts sont importants entre les différentes expériences. A pH 6.7 les valeurs de l'ODC sont plus importantes : 20 nmol CO₂/mg prot./mn contre 9 nmol CO₂ à pH 7.2. En outre, le taux d'induction de l'ODC est très régulier. Les expériences réalisées par Rush et al., (1990) ont montré que le pH du milieu pouvait abaisser le pH intracellulaire, ce qui permettrait alors une meilleure stabilité de la protéine ODC à pH 6,7. Ceci pourrait favoriser une régulation différente de l'ODC par les enzymes protéolytiques. Des études portant sur les cystéines-protéases ont montré par exemple, que les cathepsines B, L et H sont plus actives à pH acide et que leur activité se trouve neutralisée à pH 7.00 (Keppler., 1988). Par contre, les sérine-protéases sont plus actives à pH 7.4 (voir résultats 3ème partie, zymogramme).

D'après nos résultats, il est apparu qu'il y avait une forte activité des sérine-protéases dans les cellules SHE. Le fait de baisser le pH du milieu, et donc le pH intra-cellulaire conduirait peut-être à une diminution de leur activité.

Dans les mêmes conditions de pH acide, l'analyse moléculaire montre également une forte stimulation du gène ODC par le TPA (le taux d'induction d'ODC-ARNm est supérieur au taux basal). Nous retrouvons de nouveau un taux d'induction ARNm supérieur au taux d'induction de l'ODC cytoplasmique. La comparaison des ARNm montre les mêmes types d'ARNm de 2.1 et 2.6 Kb dans les cellules épithéliales et cellules SHE (photographie n° 4). Gilmour et al., (1987) et Van Kranen et al., (1987) ont confirmé ce résultat en ayant obtenu les mêmes ARNm dans leur modèle cellulaire, cellules SHE et lignée transformée de SHE.

O'Brien et Diamond (1977) ont trouvé une sensibilité différente dans les cellules SHE témoins et les lignées de SHE transformées avec une supériorité du taux d'induction d'ODC dans les cellules transformées (2 contre 1). Ce résultat est différent de ce que nous avons observé avec les cellules Ctr et BPe. Toutefois, il est difficile de pouvoir comparer nos résultats par rapport à ceux de O'Brien dans la mesure où les auteurs ont utilisé deux modèles cellulaires totalement différent : une lignée établie de cellules SHE transformées (du passage 22 à 40) et des cellules témoins SHE de passage précoce (1er ou 2ème).

Lors de la cancérogénèse expérimentale *in vivo* le TPA est utilisé de façon répétitive et prolongée. Pour se rapprocher de ce modèle nous avons traité les cellules Ctr et BPe par du TPA à intervalle de 24 ou 48 heures. Ces résultats se

rapprochent de ceux obtenus par Solanki et Slaga (1982) Chida et Kuroki (1983) travaillant sur des cellules épidermiques; Ces auteurs ont démontré par incorporation de molécule marquée qu'il y avait une diminution du nombre total des récepteurs du TPA. Le mécanisme de cette diminution n'est pas élucidée. Il serait possible que le TPA stimule par l'intermédiaire de la protéine-AP1, l'expression des gènes codant pour les protéases (Lee et al., 1987). Ces protéases à leur tour pourraient agir au niveau des récepteurs protéiques du TPA et les dénaturer : d'où une baisse de l'ODC au second traitement par le TPA. Cette modulation régressive diminue lorsque nous laissons un intervalle de temps plus long entre les 2 traitements. C'est donc, un phénomène réversible. Il se peut qu'après un intervalle de temps assez long, l'action protéolytique diminue et les récepteurs sont de nouveau synthétisés. En effet *in vivo* il a été démontré que l'augmentation de l'intervalle de temps entre les applications de TPA sur la peau de souris conduit à une diminution de l'incidence des tumeurs.

In vivo dans le modèle de cancérogénèse en 2 étapes : Initiation et promotion, l'hydrocarbure Benzo(a)pyrène est utilisé à faible dose pendant une courte période suivi ensuite de l'application du TPA. Nous avons reproduit *in vitro* ce modèle de traitements successifs sur des cellules témoins Ctr : d'abord le BaP puis le TPA. Avec le BaP seul nous avons une baisse de 50 % du taux basal d'ODC. Plusieurs travaux, Alexandrov et al., (1990) ont démontré que les métabolites du BaP forment des adduits dans l'ADN. Ceci pourrait expliquer la diminution de l'activité ODC basale dans les cellules épithéliales Ctr, par suite d'une inhibition du fonctionnement du gène ODC par ces adduits. Mais l'application du TPA stimule de nouveau l'ODC. La valeur d'ODC est égale à celle obtenue avec le traitement par le TPA seul. Si nous évaluons en pourcentage, l'induction d'ODC par rapport au taux basal, le traitement successif BaP-TPA donne un taux d'induction beaucoup plus élevé que le TPA seul (147 contre 20 nmol CO₂/mg prot./60 mn et 147 contre 50 nmol CO₂/mg prot./60 mn, respectivement). Mais il n'y aurait pas dénaturation du gène ODC par les adduits du BaP car l'application en 2ème temps du TPA stimule fortement l'ODC. Weisburger et Williams (1982) ont émis l'hypothèse que l'action des métabolites des cancérogènes génotoxiques pourraient suivre une voie épigénétique. Des travaux réalisés au laboratoire (Chouroulinkov., 1990) ont montré que lors de la cancérogénèse en 2 étapes, l'action initiatrice du BaP peut-être inhibée par la dexaméthasone et empêcher la formation de tumeurs cutanées.

Des études plus approfondies pourraient aider à préciser le lieu d'action du traitement successif BaP-TPA, soit au niveau du gène ODC, soit par une régulation post-transcriptionnelle.

Les systèmes de cellules épithéliales (témoins et transformées) et de cellules de hamster plus proche de la normale sont donc très utiles pour la détermination des mécanismes d'action du cancérigène TPA. Ce sont des modèles sensibles, faciles à mettre en oeuvre pour suivre la réponse du gène ODC, l'activité de l'enzyme dans le cytoplasme et suivre de près la régulation post-transcriptionnelle.

Etude *in vitro* de la modulation de l'action du TPA.

Nous avons indiqué dans l'introduction que l'induction de l'ODC dans les cellules épidermiques et la formation de tumeurs cutanées peuvent être diminuées par l'action des anti inflammatoires. Nous avons alors étudié *in vitro*, les effets de l'inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique sur l'ODC intra-cellulaire.

L'indométacine, inhibiteur de la synthèse des prostaglandines (anti-cyclooxygénase), n'interfère pas sur l'induction de l'ODC dans nos cellules épithéliales *in vitro*. Ceci est différent des expériences réalisées *in vivo* où l'induction de l'ODC par le TPA est inhibée par l'indométacine. Il serait possible que *in vivo* sur la peau de souris, l'indométacine intervienne sur les cellules cibles épidermiques par l'intermédiaire des cellules inflammatoires dermiques, par inhibition des prostaglandines.

Au contraire, l'inhibiteur des lipoxygénases, le NDGA inhibe l'ODC *in vitro*. Mais cet effet ne se retrouve pas *in vivo* car le produit ne peut inhiber la réaction inflammatoire (voir tableau récapitulatif ci-dessous).

Les mêmes effets de l'indométacine et du NDGA ont été décrits par Verma et al. (1980) et Yamamoto et al., (1987) sur des cellules épidermiques de souris en cultures.

| | Action anti-inflammatoire | Inhibition ODC <i>in vivo</i> | Inhibition ODC <i>in vitro</i> | Modulation de l'ODC <i>in vivo</i> |
|--------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| Indométacine | +++ | +++ | - | intervention des prostaglandines |
| NDGA | + - | + - | +++ | absence d'effet des leucotriènes |

Les résultats obtenus *in vitro* avec l'indométacine et le NDGA apportent donc une preuve supplémentaire de l'interaction de la réaction inflammatoire dermique dans la modulation de l'ODC de l'épiderme, lors du traitement de la peau de souris par le TPA. D'ailleurs, il a été démontré que l'intensité de la réaction inflammatoire

est en relation directe avec l'incidence des tumeurs cutanées induite par les promoteurs ou les cancérigènes non génotoxiques.

Le 3ème inhibiteur de l'inflammation que nous avons retenu est la dexaméthasone. C'est un des anti-inflammatoires les plus puissants. Il agit au niveau de la phospholipase A₂ et empêche la mobilisation de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires (Hirata et al., 1980). *In vivo*, ce stéroïde montre un effet anti-tumoral des plus importants (Belman et Troll., 1972).

Les précédentes expériences réalisées *in vivo* dans notre laboratoire ont démontré l'action anti-inflammatoire de la DXME et un effet inhibiteur sur l'ODC (Nguyen-Ba, 1989). Nos études ont montré que la DXME agissait également sur l'activité ODC dans nos modèles cellulaires. Ajoutée seule, la DXME fait baisser le taux basal ODC. Ajoutée simultanément au TPA (t0), la DXME inhibe l'induction de l'ODC dans les 3 types cellulaires testés Ctr, BPe et SHE. Cette inhibition serait due au fait que la DXME après combinaison avec son récepteur protéique présente une affinité pour des séquences d'ADN (Flower et Blackwell., 1979). Les travaux de Guertin et al., (1983), Compton et al., (1987) et Gladhang et al., (1989) ont montré que selon les types cellulaires, la DXME peut conduire à l'inhibition de certains gènes mais aussi à la stimulation d'autres gènes, notamment les gènes des nucléases entraînant une dénaturation de l'ADN.

La comparaison des résultats d'inhibition de l'ODC par l'actinomycine D (inhibiteur de la transcription) et ceux obtenus avec la DXME, nous montre que la DXME devrait inhiber l'expression du gène ODC bloquant ainsi la synthèse de l'ODC cytoplasmique. Ceci est confirmé par les résultats obtenus après analyse par Northern-blot qui nous montre que dans les 3 types cellulaires, la DXME inhibe fortement le taux d'ODC ARNm. Ceci est en accord avec les travaux de Gilmour et al., (1989) qui ont démontré l'inhibition du gène ODC par l'actinomycine D sur cellules SHE. Mais les résultats obtenus lorsque la DXME est ajoutée 3 heures après le TPA (t3) ne montrent plus de concordance entre l'induction de l'ODC cytoplasmique et le taux d'ODC-ARNm, (voir le tableau ci-dessous).

| | Taux d'ODC-ARN messenger | Activité ODC-cytoplasmique |
|----------------|--------------------------|----------------------------|
| Acétone | + | + |
| DXME | + | + |
| TPA | ++++ | ++++ |
| TPA + DXME, t0 | ++ | ++ |
| TPA + DXME, t3 | +++ | <u>+++++</u> |

Nous constatons une diminution du taux d'ODC-ARNm par action de la DXME à t3, c'est à dire après 1 heure de contact avec les cellules, alors que l'activité ODC cytoplasmique n'est pas inhibée. Elle est même stimulée, dépassant légèrement l'induction par le TPA seul. Hirvonen et al. (1988) ont constaté que la diminution de l'activité ODC dans le thymus de rat due à la DXME ne s'explique pas par une diminution proportionnelle du taux d'ARNm. Hayashi (1988) ayant constaté la même différence de stimulation entre l'ARNm et l'ODC cytoplasmique a émis l'hypothèse qu'il devait y avoir implication d'un mécanisme post-transcriptionnel de régulation.

Cette hypothèse de régulation post-transcriptionnelle par l'action des protéases permet d'expliquer l'augmentation de l'ODC-cytoplasmique après 1 heure de contact de la DXME avec les cellules (t3). Nous avons donc recherché l'action des enzymes protéolytiques intervenant dans cette régulation.

Nos résultats d'analyse des enzymes protéolytiques ont révélé que ce n'étaient pas les cathepsines L, B et H qui étaient impliquées dans la régulation de l'ODC, puisque toute inhibition des cathepsines ne se traduisait pas par une augmentation de l'activité ODC. Iik et al. (1985), Yokota et al., (1986a ; 1986b) et Taylor et al., (1987) ont montré que les cathepsines L, B et H n'étaient pas réparties de façon homogène à travers un tissu donné. Il apparaît également que ces cathepsines doivent avoir des fonctions bien précises selon le type de cellules dans laquelle elles se trouvent exprimées (San Segundo et al., 1986). Il se peut que dans nos cellules épithéliales, les cathepsines soient des enzymes peu exprimées. De plus, nous nous sommes heurtés à la différence d'inhibition des cystéine-protéases par le E64. En effet, nous n'avons obtenu qu'une inhibition des cathepsines L et B et une stimulation sur la H. Barrett (1982) a montré que le E64 était spécifique de toutes les cystéines protéases ; il agit de façon très rapide sur les cathepsines L et B mais beaucoup plus lentement sur la H. Il faudrait donc avoir un inhibiteur beaucoup plus

spécifique (Shoji-Kasaï et al., 1988) pour pouvoir déterminer de façon plus précise si les cathepsines pourraient intervenir dans une éventuelle régulation post-transcriptionnelle.

Par contre, notre étude sur les sérine-protéases s'est révélée positive. En effet, le traitement des cellules Ctr par le TPA a provoqué une forte activité protéolytique (1.5 fois supérieure à celle du témoin acétone). Nous avons observé une inhibition de 50 % de l'activité protéolytique par rapport au témoin lorsque les cellules ont été prétraitées par la DXME. En traitement avec le TPA (t0) ou (t3), la DXME conduit toujours à une inhibition des plages de lyse. Dans ce cas, la DXME contre-carre l'effet stimulant du TPA sur les protéases. Ceci pourrait expliquer ce que nous avons observé au niveau de l'ODC cytoplasmique à t3 ; pendant 3 heures le TPA stimule le gène ODC mais également les protéases : on mesure donc une résiduelle [ODC protéine synthétisée - protéolyse]. Par contre, à t3, la DXME va bloquer à la fois la synthèse des protéases et de l'ODC. Une partie de la protéine ODC a déjà été synthétisée et le pool d'ODC ne sera plus régulé par les protéases. On obtient donc un taux d'ODC cytoplasmique supérieure à celui obtenu après traitement par le TPA seul.

En ce qui concerne les cellules BPe, nous avons observé peu de différence dans l'activité protéolytique cellulaire quelque soit le traitement reçu (TPA, DXME, acétone). Ceci nous fait suggérer qu'il y aurait peut-être au départ une activité protéasique intense dans ces cellules. Sloane (1984) rappelle que dans de nombreux cas de cellules cancéreuses l'activité protéasique est très élevée par rapport à la normale. Ceci toujours en accord avec notre hypothèse : la DXME bloque l'activité protéolytique. Mais en traitement différé par rapport au TPA (t3) le peu d'effet bloquant exercé par la DXME sur l'activité protéolytique permet d'avoir un taux ODC cytoplasmique légèrement plus élevée que pour le TPA seul. Par contre, en ce qui concerne les cellules SHE, nous avons observé une activité protéasique très intense dans la fraction particulaire, alors que chez les cellules Ctr et BPe, l'activité se localise dans la fraction cytosolique soluble. Or les expériences avec les cellules SHE ont été réalisées comme décrites précédemment, à pH 6.7. Cette acidité se retrouve également dans le milieu intra-cellulaire (Rush et al., 1990). Se pourrait-il que cette acidité agisse sur la rétention des protéases dans des particules, ou bien que cette rétention soit une particularité de ce type cellulaire ? Dans ce modèle cellulaire, on constate également que le TPA stimule fortement l'activité protéasique (environ 30 % /témoin acétone) et que la DXME inhibe cette activité enzymatique (20 %). Nous avons retrouvé la même relation inverse entre l'inhibition des protéases par la DXME au temps t3 du traitement alors que l'ODC est stimulée après ce traitement.

Toujours dans le cadre de notre hypothèse, à savoir que la DXME agirait sur les protéases et modifiant ainsi la régulation post-transcriptionnelle, nous avons étudié l'action de différents inhibiteurs des sérine-protéases pour démontrer que la stabilité de l'enzyme ODC pourrait dépendre de l'action protéolytique des sérine-protéases.

Nous avons utilisé 3 inhibiteurs synthétiques (TLCK, TPCK, PMSF), largement utilisés dans la recherche (Rossman et Troll., 1980). Or nous n'avons pas obtenu d'inhibition des protéases par le TLCK et PMSF car le taux d'ODC cytoplasmique enregistré était semblable à celui obtenu après un traitement par le TPA seul. Au contraire, pour le TPCK nous avons même obtenu un effet inhibiteur sur l'activité ODC. Mais il faut savoir que les auteurs ont toujours utilisé ces substances en dosage biochimique direct (en tampon acellulaire). La difficulté de toutes ces substances est de savoir si elles pénètrent suffisamment dans la cellule pour pouvoir être actives (Pasternack et al., 1983) et si elles sont spécifiques. Seul un inhibiteur d'origine protéique, l'Aprotinine, s'est révélé, efficace ; L'adjonction de cet inhibiteur protéasique 3 heures après un traitement par le TPA a conduit à une stimulation de l'activité d'ODC cytoplasmique dans les cellules Ctr et SHE.

Or notre étude par Northern blot a révélée que l'aprotinine avait un effet inhibiteur sur le gène ODC avec inhibition du taux d'ARNm. Ajoutée simultanément ou différée de 3 heures par rapport au TPA, l'aprotinine peut inhiber légèrement l'induction du taux d'ODC-ARNm et contre-carrer l'activité stimulatrice du TPA sur l'ODC. Notre problème actuel est de trouver un inhibiteur spécifique des sérine-protéases et qui n'agisse que dans le compartiment cytoplasmique.

Comme nous l'avons rappelé plus haut, plusieurs auteurs ont suspecté une régulation post-transcriptionnelle par une activité protéolytique. L'emploi de la DXME à des temps différents après le TPA, nous a permis d'amplifier le phénomène et apporte des précisions supplémentaires sur le mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'ODC par des enzymes protéasiques. Il apparait très clairement que les protéases sont stimulées par le cancérigène TPA mais qu'elles sont également modulées par des substances xénobiotiques, telles que la DXME.

In vivo, Boutwell (1974) a émis l'hypothèse qu'une des principales fonctions des promoteurs tumoraux est de produire une répression ou l'activation de certains gènes qui serait un des mécanismes épigénétiques par lesquels agirait le TPA. Rossman et Troll en 1980 ont également émis l'hypothèse que l'inhibition de la tumorigénèse par des anti-inflammatoires devait être le résultat d'une inhibition des protéases ou de l'induction d'un inhibiteur de protéases par la DXME.

Des études récentes ont montré que l'activation de la protéine kinase C (PKC) semblait être une étape initiale dans la transcription du gène ODC dans les cellules épidermiques de souris nouveau-nés (Enkvetchakul et al., 1989). Yamada et al., (1988) ont également montré qu'un inhibiteur de la PKC, la staurosporine, provoquait une inhibition de l'ODC et de la promotion tumorale induite par le TPA dans la peau de souris. Mais il a également obtenu une stimulation de l'ODC selon le temps d'application de la staurosporine par rapport au TPA. Cette différence de réponse est identique à celle que nous avons obtenu avec la DXME.

Il est donc difficile de relier l'effet différent de la staurosporine (inhibition ou stimulation de l'ODC) à son seul effet inhibiteur de la PKC. Cette différence de réponse semblable à celle obtenue avec le TPA et la DXME, laisserait supposer que la staurosporine puisse agir également sur les protéases comme la DXME.

Dans une 3ème partie, nous avons essayé de corréler les modifications du taux d'ODC et l'apparition du phénotype transformé au cours d'une étude de transformation des cellules SHE.

Nous avons suivi le taux d'ODC dans les cellules SHE à différents jours de culture (J2, J5 et J8). Nous avons pu constater que l'activité ODC diminuait au cours du temps dans la série traitée par le TPA (J5 : 3.2 et J8 : 2.5 nmol CO₂/mg prot./60 mn) alors que le taux d'ODC reste constant dans la série témoin acétone (J2 : 11 ; J5 : 12.5 et J8 : 13 nmol CO₂/mg prot./60 mn). Mais il est important de remarquer que pour la série "BaP + TPA", la première application de TPA (J2) ne conduit pas à une baisse de l'activité ODC lorsque nous l'avons mesuré à J5 (même valeur que pour le témoin acétone 12.5 nmol CO₂/mg prot./60 mn). Par contre, le second traitement par le TPA à J5 (selon le protocole du test de transformation) provoque une diminution de l'activité ODC au 8ème jour du test (6.0 contre 13 nmol CO₂/mg prot./60 mn pour le témoin acétone). Mais lorsque nous traitons les cellules par le TPA pendant 5 heures à J5, nous obtenons une très forte stimulation de l'ODC dans la série promotion (22 contre 13 nmol CO₂/mg prot./60 mn dans la série témoin acétone). Il semblerait donc qu'à ce stade J5, les cellules soient très sensibles à l'action stimulatrice du TPA sur l'ODC. C'est peut-être entre J5 et J8 que se situerait une des étapes cruciales où les cellules subissent d'importantes modifications avec perturbation dans la régulation de l'ODC. Des recherches sont encore nécessaires pour clarifier ce mécanisme de super-induction de l'ODC au temps J5 après un premier traitement par le TPA à J2.

CONCLUSION GENERALE

L'ensemble de nos travaux ont montré l'intérêt d'avoir des modèles cellulaires dans l'étude du mécanisme d'action du TPA. Ceci permet d'éviter toute interaction des cellules environnantes et de déterminer l'effet propre du cancérogène épigénétique TPA sur les cellules cibles. Nos trois modèles cellulaires se sont révélés sensibles à l'action du TPA avec une induction forte et régulière de l'Ornithine décarboxylase. Ce phénomène est apparu réversible quelque temps après l'arrêt de tout traitement. Il est apparu qu'il y avait une différence de sensibilité au TPA, entre les cellules témoins (Ctr) et les cellules traitées par le BaP, (BPe) avec un taux d'induction plus élevé dans les témoins. Nos études de biologie moléculaire ont révélé qu'il y avait bien induction du gène ODC mais que cette induction variait avec les étapes de transformation cellulaire, l'induction étant plus faible dans les cellules traitées BPe, et la différence d'expression du gène se retrouvant dans la différence d'induction d'ODC cytoplasmique.

Les résultats obtenus *in vitro* avec les anti-inflammatoires non stéroïdiens apportent une preuve supplémentaire qu'il y a effectivement interaction entre les cellules inflammatoires dermiques et la réponse ODC des cellules épidermiques, à l'action du TPA. Notre étude plus approfondie avec le stéroïde dexaméthasone, anti-inflammatoire et antipromoteur connu, a montré qu'il existait une régulation post-transcriptionnelle, par l'intermédiaire des enzymes protéolytiques. Cet aspect est très important car toute action protéasique peut être modulée à la fois par le cancérogène TPA, par des substances xénobiotiques (DXME, inhibiteurs de protéases) mais également selon l'étape de transformation des cellules avec prédominance des sérine-protéases dans les cellules témoins Ctr par rapport aux cellules transformées.

Les renseignements que nous avons obtenus sur l'action du TPA entre les cellules témoins et des cellules déjà transformées, nous incitent à étudier l'action du TPA sur l'ODC et le mécanisme de sa modulation tout au long du processus de transformation cellulaire. Avec le système de transformation des cellules SHE, méthode déjà établie, nous pouvons suivre l'évolution d'une cellule proche de la normale jusqu'à son étape transformée. Le but serait de pouvoir localiser les perturbations de l'ODC et sa modulation lors de l'étape décisive du passage de la cellule de l'état normal vers la transformation irréversible.

BIBLIOGRAPHIE

- Alexandrov, K., Rojas, M., Goldberg, M., Camus, A.M. and Bartsh, H.
A new sensitive fluorometric assay for the metabolism of (-)-7,8,
dihydroxy-7,8-dihydrogenzo(a)pyrene by human air follicles.
Carcinogenesis, **11**, 2157-2161, 1990.
- Arya, S.K., Wong-Staal, F. and Gallo, R.
Dexamethasone-mediated inhibition of human T cell growth factor and
 γ -interferon messenger RNA.
The Journal of Immunology, **133**, 273-276, 1984.
- Astrup, E. and Boutwell, R.K.
Ornithine decarboxylase activity in chemically induced mouse skin papillomas.
Carcinogenesis, **3**, n° 3, 303-308, 1982.
- Barrett, A.J., Kembhari, A.A., Brown, M.A., Kirschke, H., Knight, C.G.,
Tamaï, M. and Hanada, K.
L-*trans*-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its
analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins L, B
and H.
Biochem. J., **201**, 189-198, 1982.
- Belman, S. and Troll, W.
The inhibition of croton oil-promoted mouse skin tumorigenesis by steroid
hormones.
Cancer Research, **32**, 450-454, 1972.
- Berenblum, I.
Carcinogenesis as a biological problem.
North Holland Co, Amsterdam, 1974.
- Béréziat, G., Chambez, J., Colard, O. and Wolf, C.
Les multiples fonctions des phospholipides cellulaires.
Medecine.Science, **4**, n° 1, 1988.
- Berwald, Y. and Sachs, L.
"In vitro" cell transformation with chemical carcinogens.
Nature (London), **200**, 1182-1184, 1963.
- Berwald, Y. and Sachs, L.
"In vitro" cell transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic
hydrocarbones.
J. Nat. Cancer Inst., **35**, 641-661, 1965.
- Birnboïm, H.C.
Rapid extraction of high molecular weight RNA from cultured cells and
granulocytes for Northern analysis.
Nucleic Acids Res., **16** (4), 1487-1497, 1988.
- Boles, T.C. and Hogan, M.E.
Site-specific carcinogen binding to DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci., **81**, 5623-5627, 1984.
- Boone, C.W., Mantel, N., Caruso, T.D. Jr., Kazam, E. and Stevenson, R.E.
Quality control studies on fetal bovine serum used in tissue culture.
In vitro, **7**, 174-189, 1974.

- Boutwell, R.K.
The function and mechanisms of promoters of carcinogenesis.
CRC, Crit. Rev. Toxicol., **2**, 419-442, 1974.
- Brabant, M., McColongue, L., Van Daalen Wetters, T. and Coffino, P.
Mouse ornithine decarboxylase gene : cloning, structure and expression.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA. **85**, 2200-2204, 1988.
- Bradford, M.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem., **72**, 248-254, 1976.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.
Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters.
J. Biol. Chem., **257**, 7847-7851, 1982.
- Chen, Y. and Heidelberger, C.
Quantitative studies on the malignant transformation of mouse prostate cells by carcinogenic hydrocarbons "in vitro".
Int. J. Cancer, **4**, 166-178, 1969.
- Chen, T.R.
In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoeschst-33258.
Strain. Exp. Cell Res., **104**, 255, 1977.
- Chida, K. and Kuroki, T.
Presence of specific binding sites for phorbol ester tumor promoters in human epidermal and dermal cells in culture but lack of down regulation in epidermal cells.
Cancer Research, **43**, 3638-3642, 1983.
- Chouroulinkov, I. et Lazar, P.
Action cancérigène et cocancérigène du 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate (TPA) sur la peau de souris.
C.R. Acad. Sci., Paris, **278**, série D, 3027-3030, 1974.
- Chouroulinkov, I. and Lasne, C.
Two stage (initiation-Promotion) carcinogenesis in vivo and in vitro.
Bulletin du cancer, **65**, n° 3, 1978.
- Chouroulinkov, I.
Cancérogénèse et mutagénèse expérimentales.
Annales des Mines, 1-6, Juillet/Août 1978.
- Chouroulinkov, I.
Enseignement au DEA de Toxicologie.
Université Paris VII, 1987.
- Chouroulinkov, I., Lasne, C., Lowry, R., Wahrendorf, J., Becher, H., Day, N.E. and Yamasaki, H.
Dose and frequency effect in mouse skin tumor promotion.
Cancer Research, **49**, 1964-1969, April 15, 1989.

- Chouroulinkov, I.
Genetics effects of environmental chemicals commission of the European Communities,
19th Meeting - Espoo, Finlande 6-9 Juin 1990., Chap. VIII-1 à 21.
- Coffino, P. and Lichuan Chen, E.
Nucleotide sequence of the mouse ornithine decarboxylase gene.
Nucleic Acids Research, **16**, n° 6, 2731-2732, 1988.
- Compton, M.M. and Cidlowski, J.A.
Identification of a flucocorticoïd-induced nuclease in thymocytes.
The J. Biol. Chem., **262**, 17, 8288-8292, 1987.
- Deelman, H.T.
Quelques remarques sur le cancer expérimental du goudron.
A - La méthode de scarification B - Les recherches chimiques sur le goudron.
Bull. Cancer, **21**, 220-226, 1923.
- DiGiovanni, J., Kruszewski, F., Coombs, M.M., Bhatt, T.S. and Pereshk, A.
Structure-activity relationships for epidermal ornithine decarboxylase induction and skin tumor promotion by anthrones.
Carcinogenesis, **9**, n° 8, 1437-1443, 1988.
- Di Paolo, J.A., Donovan, P. and Nelson, R.L.
Quantitative studies of *in vitro* transformation by chemical carcinogens.
J. Natl. Cancer Inst., **42**, 867-876, 1969.
- Di Paolo, J.A.
Quantitative *in vitro* transformation of Syrian golden hamster embryo cells with the use of frozen stored cells.
J. N. C. L., **64**, n° 6, June 1980.
- Dodet, B.
Stratégies anti-inflammatoires.
Biofutur, 25-37, Septembre 1989.
- Earle, W.R.
Production of malignancy "in vitro". IV - The mouse fibroblasts cultures and changes seen in the living cells.
J. Natl. Cancer Inst., **4**, 165-212, 1943.
- Enkvetchakul, B., Merrill, Jr. A.H. and Birt, D.F.
Inhibition of the induction of ornithine decarboxylase activity by 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate in mouse skin by sphingosine sulfate.
Carcinogenesis, **10** n° 2, 379-381, 1989.
- Flaschentrager, B.
Z. Angew. Chem., **43**, 1011-1012, 1930.
- Flower, R.J. and Blackwell, G.J.
Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation.
Nature, **278**, 29 March 1979.
- Friedwald, W.F. and Rous, P.
The initiating and promoting elements in tumor production : analysis of the effects of tar, benzo(a)pyrene and methyl-cholanthrene on rabbit skin.
J. Exp. Med., **80**, 101-125, 1944.

- Gentil, A., Lasne, C. and Chouroulinkov, I.
Corrélation entre l'induction de lésions réparables des acides nucléiques de fibroblastes par des hydrocarbures polycycliques et leurs dérivés et la transformation qu'ils induisent.
Colloques Internationaux du CNRS - N° 256, Cancérogénèse chimique, 1976.
- Gilmour, S.K., Avdalovic, N., Madara, T. and O'Brien, T.G.
Induction of ornithine decarboxylase by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in hamster fibroblasts.
The Journal of Biological Chemistry, **260**, n° 30, 16439-16444, 1985.
- Gilmour, S.K., Verma, A.K., Madara, T. and O'Brien, T.
Regulation of ornithine decarboxylase gene expression in mouse epidermis and epidermal tumors during two-stage tumorigenesis.
Cancer Research, **47**, 1221-1225, 1987.
- Gilmour, S.K. and O'Brien, T.G.
Regulation of ornithine decarboxylase gene expression in normal and transformed hamster embryo fibroblasts following stimulation by TPA 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
Carcinogenesis, **10** n° 1, 157-162, 1989.
- Gladhang, I.P. and Christoffersen, T.
n-butyrate and dexamethasone synergistically modulate the surface expression of epidermal growth factor receptors in cultured rat hepatocytes.
FEBS Letters, **243** n° 1, 21-24, 1989.
- Guertin, M., Baril, P., Bartkowiak, J., Anderson, A. and Belanger, L.
Rapid suppression of α 1-fetoprotein gene transcription by dexamethasone in developing rat liver.
Biochemistry, **22**, 4296-4302, 1983.
- Hayashi, S.
Multiple mechanisms for the regulation of mammalian ornithine decarboxylase.
International encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics.
Ornithine decarboxylase : Biology, Enzymology and Molecular genetics.
Editors ; Skin-ichi Hayashi, Pergamon Press, Chap. IV, pp 35-46, 1988.
- Heby, O.
Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation
Differentiation, **19**, 1-20, 1981.
- Heidelberger, C.
Quantitative studies on hydrocarbon carcinogenesis *in vitro*.
The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry
The Israël Academy of Sciences and Humanities, Jérusalem, 1969, 45-58.
- Hirata, F., Schiffmann, E., Venkatasubramanian, K., Salomon, D. and Axelrod, J.
A phospholipase A2 inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **77**, n°5, 2533-2536, 1980.

- Hirvonen, A., Imnonen, T., Leinonen, P., Alhonen-Hongisto, L., Jänne, O.A. and Jänne, J.
Effect of dexamethasone on the activity and expression of "ODC" in rat liver and thymus.
Biochimica Biophysica Acta, **950**, 229-233, 1988
- Huberman, E. and Sachs, L.
Cell susceptibility to transformation and cytotoxicity by the carcinogenic hydrocarbons benzo(a)pyrene.
Proc. Natl. Acad. Sci., **56**, 1123-129, 1966.
- Ii, K., Hizawa, K., Kominami, E., Bando, Y. and Katunuma, N.
Different immunolocalizations of cathepsins B, H and L in the liver.
J. Histochem. Cytochem., **33**, 1173-1175, 1985.
- Jänne, J., Pösö, H. and Raina, A.
Polyamines in rapid growth and cancer.
Biochemica and Biophysica Acta, **473**, 241-293, 1978.
- Jänne, J.
Ornithine decarboxylase : Historical overview.
International Encyclopedia of pharmacology and Therapeutics
Ornithine decarboxylase : Biology, Enzymology and Molecular genetics
Editors : Shin-Ichi Hayashi, Pergamon Press, Chap I, pp 1-4, 1988.
- Jänne, J. and Alhonen-Hongisto, L.
Inhibitors of ornithine decarboxylase : Biochemistry and Applications.
International encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics.
Ornithine decarboxylase : Biology, enzymology and Molecular genetics.
Editors : Shin-Ichi Hayashi, Pergamon Press, Chap VI, pp 59-77, 1988.
- Kahana, C.
Molecular genetics of mammalian ornithine decarboxylase.
International encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics.
Ornithine decarboxylase : Biology, enzymology and Molecular genetics.
Editors : Shin-Ichi Hayashi, Pergamon Press, Chap XI, pp 127-131, 1988.
- Kennaway, E.L.
The identification of a carcinogenic compound in coal-tar.
Brit. Med. J., **11**, 749-752, 1955.
- Keppler, D.
Etude chez l'homme d'une cathepsine B particulière aux cancers.
Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI, 1988.
- Kiriakidis, D.A., Flamigni, F., Pawlak, J.W. and Canellakis, E.S.
Mode of interaction of ornithine decarboxylase with antienzyme and α -difluoromethylornithine.
Biochem. Pharmacol., **33**, 1575-1578, 1984.
- Kitani, T. and Fujisawa, H.
Purification and properties of ornithine decarboxylase from rat liver.
The Journal of Biological Chemistry, **258** , n° 1, 235-239, 1983.

- Knudsen, P.J., Dinarello, C.A. and Strom, T.B.
Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin 1 in U 937 cells.
The Journal of Immunology, **139**, 4129-4134, 1987.
- Leboeuf R. A. and Kerckaert, G.A.
The induction of transformed-like morphology and enhanced growth in Syrian hamster embryo cells grown at acidic pH.
Carcinogenesis, **7**, n° 9, 1431-1440, 1986.
- Leboeuf, R.A. and Kerckaert, G.A.
Enhanced morphological transformation of early passage Syrian hamster embryo cells cultured in medium with a reduced bicarbonate concentration and pH.
Carcinogenesis, **8**, n° 5, 689-697, 1987.
- Lee, W., Mitchell, P. and Tjian, R.
Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements
Cell, **49**, 741-752, 1987.
- Litchi, U. and Gottesman, M.
Genetic evidence that a phorbol ester tumor promoter stimulated ornithine decarboxylase activity by a pathway that is independent of cyclic AMP-dependent protein kinases in CHO cells.
J. Cell Physiol., **113**, 433-439, 1983.
- Lu, Y.P.
Application d'une méthode orthogonale à l'étude de la cancérogénèse chimique en deux phases sur cellules in vitro.
Thèse de Doctorat, Paris V, 1988.
- McConlogue, L., Dana, L.S. and Coffino, P.
Multiple mechanisms are responsible for altered expression of ornithine decarboxylase in overproducing variant cells.
Molecular and cellular Biology, **6**, 2865-2871, 1986.
- Magun, B.E. and Bowden, G.T.
Effects of phorbol ester tumor promoters on the binding, processing, and biological activity of epidermal growth factor.
Mechanisms of Tumor Promotion, Vol III, Tumor promotion and carcinogenesis *in vitro*. Thomas J. Slaga. Chap. IV, pp. 125-141, 1982.
- Maurer, H.R.
Towards chemically-defined serum-free media for mammalian cell culture.
Chapter 2 in : Animal cell culture, a practical approach
edited by R.I. Freshney. IRL Press, 1982.
- Michiels, F.
Evolution en culture organotypique du poumon embryonnaire de rat, normal ou traité par du benzo(a)pyrène ou du condensat de fumée de cigarette.
Thèse de Doctorat, Paris VI, 1977.
- Michiels, F., Duverger, A. and Chouroulinkov, I.
Correlation between preneoplastic lesions in rat embryo lung treated with BaP or CSC in organ culture and tumour production in vivo.
Carcinogenesis, **2**, n° 9, 885-896, 1981.

- Morgan, D.M.L.
Polyamines
Essays in Biochemistry, **23**, 83-115, 1987.
- Nguyen-Ba, G., Chouroulinkov, I. et Truhaut, R.
Mécanisme épigénétique de la promotion tumorale. Interrelation entre l'inflammation et l'activité d'ornithine décarboxylase induites *in vivo* par le cancérogène 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate.
C.R. Acad. Sci., Paris, **307**, série III, 229-234, 1988.
- Nguyen-Ba, G., Chouroulinkov, I.
Epidermal cell proliferation and modulation of the protective potency of dexamethasone against phorbol ester-induced ornithine décarboxylase activity.
Carcinogenesis, **10**, n° 4, 793-796, 1989.
- Nguyen-Ba, G., Robert, S., Lasne, C., Chouroulinkov, I., Van Kreijl, C.F., Van Steeg, H. and Truhaut, R.
Action spécifique de l'ester de phorbol, cancérogène non génotoxique, sur l'induction de l'activité et de la transcription du gène d'ornithine décarboxylase dans les cellules épithéliales témoins et transformées. Effet modulateur des anti-inflammatoires., sous presse, C.R. Acad. Sci., 1991.
- O'Brien, T.G.
The induction of ornithine decarboxylase as an early, possibly, obligatory, event in mouse skin carcinogenesis.
Cancer Research, **36**, 2644-2653, 1976.
- O'Brien, T.G. and Diamond, L.
Ornithine decarboxylase induction and DNA synthesis in hamster embryo cell cultures treated with tumor-promoting phorbol diesters.
Cancer Research, **37**, 3895-3900, 1977.
- Pagano, M. and Engler, R.
Inhibition of human liver cathepsin B, H and L by the human α_2 cystéine protéinase inhibitor.
In : V. Turk (Ed.), Cystéine Protéinases and their Inhibitors, pp 31-42.
Berlin, New-York : Walter de Gruyter and Co., 1986.
- Pasternack, M.S., Sitkovsky, M.V. and Eisen, H.N.
The site of action of N- α -Tosyl-L-Lysyl-Chloromethyl-Ketone (TLCK) on cloned cytotoxic lymphocytes.
The Journal of immunology, **131**, 2477-2483, 1983.
- Pegg, A. and Mc Cann, P.P.
Polyamines metabolism and function.
An. J. Physiol. **243** (Cell Physiol 12) : C 212-C 221, 1982.
- Pegg, A.E.
Characteristics of ornithine decarboxylase from various sources.
International encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics.
Ornithine decarboxylase : Biology, enzymology and Molecular genetics.
Editors : Shin-ichi Hayashi, Pergamon Press, Chap III, pp 21-28, 1988.

- Pienta, R.J., Poiley, J.A. and Lebherz, W.B.
Morphological transformation of early passage golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable in vitro bioassay for identifying diverse carcinogens.
Int. J. Cancer, **19**, 642-655, 1977.
- Poiley, J.A., Raineri, R. and Pienta, R.J.
Use of hamster hepatocytes to metabolize carcinogens in an *in vitro* bioassay.
J. Natl. Cancer Inst., **63**, 519-524, 1979.
- Porter, C.W., Mc Manis, J., Casero, R.A. and Bergeron, R.J.
Relative abilities of bis(ethyl) derivatives of putrescine, spermidine and psermine to regulate polyamine biosynthesis and inhibit L1210 leukemica cell growth.
Cancer Res., **47**, 2821-2825, 1987.
- Redmond, D.E.
N. Engl. J. Med., **282**, 18, 1970.
- Ringold, G.M.
Steroid hormone regulation of gene expression.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., **25**, 529-566, 1985
- Rochette-Egly, C.
Contribution à l'étude des altérations membranaires induites par un promoteur de tumeurs, le 12-0-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate dans les cellules embryonnaires de rat en culture secondaire.
Thèse de Doctorat, Paris VI, 1978.
- Rose-John, S., Fürstenberger, G., Krieg, P., Besemfelder, E., Rincke, G. and Marks, F.
Differential effects of phorbol esters on *c-fos* and *c-myc* and ornithine decarboxylase gene expression in mouse skin *in vivo*.
Carcinogenesis, **9**, 831-835, 1988.
- Rossman, T.G. and Troll, W.
Protease inhibitors in carcinogenesis : Possibly sites of action.
In Carcinogenesis, vol. 5. Modifiers of chemical, (Ed. Slaga)
chap. 5, pp 127-143, 1980.
- Rous, P. and Kidd, J.G.
Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states. A study of tar tumors in rabbit.
J. Exp. Med., **73**, 365-389, 1941.
- Ruch, R.J., Klaunig, J.E., Kerkaert, G.A. and Leboeuf, R.A.
Modification of gap junctional intercellular communication by changes in extracellular pH in syrian hamster embryo cells.
Carcinogenesis, **11**, n° 6, 909-913, 1990.
- Russel, W.C., Newman, C. and Williamson, D.H.
A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells injected with neoplasma and viruses.
Nature, **253**, 461-462, 1975.

- San Segundo, B., Chan, S.J. and Steiner, D.F.
Differences in cathepsin B mRNA levels in rat tissues suggest specialized functions.
FEBS Letters, **201**, 251-256, 1986.
- Sasakawa, N., Ishii, K., Yamamoto, S. and Kato, R.
Induction of ornithine decarboxylase activity by 1-oleoyl-2-acetyl-Glycerol in isolated mouse epidermal cells.
Biochemical and Biophysical Research Communication, **128**, n° 2, 913-920, 1985
- Scalabrino, G. and Ferioli, M.E.
Polyamines in mammalian tumors.
Advances in Cancer Research, **35**, 151-268, 1981.
- Schuman, R.F., Pienta, R.J., Poiley, J.A. and Lebherz, W.B.
Effect of fetal bovine serum on 3-methylcholanthrene induced transformation of hamster cells in vitro.
In vitro, **15**, n° 9, 730-735, 1979.
- Shoji-Kasai, Y., Senshu, M., Iwashita, S. and Imahori, K.
Thiol protease-specific inhibitor E-64 arrests human epidermoid carcinoma A431 cells at mitotic metaphase.
Proc. Natl. Acad. Sci., **85**, 146-150, 1988.
- Sloane, B.F. and Honn, K.V.
Cysteine proteinases and metastasis.
Cancer Metastasis Rev., **3**, 249-263, 1984.
- Solanki, V. and Slaga, T.J.
The down-modulation of receptors for phorbol ester tumor promoter in primary epidermal cells.
Carcinogenesis, **3**, n° 9, 993-998, 1982.
- Takigawa, M., Verma, A.K., Simsiman, R.C. and Boutwell, R.K.
Polyamine biosynthesis and skin tumor promotion : Inhibition of 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate-promoted mouse skin tumor formation by the irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, α -difluoromethylornithine.
Biochemical and Biophysical Research Communications, **105**, 969-976, 1982.
- Takigawa, M., Boutwell, R.K. and Verma, A.K.
Evidence that an elevated level of ornithine decarboxylase may be essential to tumor promotion by phorbol esters.
Polyamines : Basic and clinical, pp.1-8, Imahori et al. (Eds), 1985.
- Taylor, M.A.J., Almond, R.E. and Etherington, D.J.
The immunohistochemical location of cathepsin L in rabbit skeletal muscle.
Histochemistry, **86**, 379-383, 1987.
- Thomas, P.T., Gopalakrishna, R. and Anderson, W.B.
Hormone and tumor promoter induced activation or membrane association of protein-kinase C in intact cells.
Methods in Enzymology, **141**, 399-411, 1987.

- Thony, C. et Thony, J.
Le cancer du décolleté. Enquête clinique et épidémiologique. Prévention
Centre de Médecine du travail de Cluses (Haute-Savoie)
Rapport 175 pages, 1970.
- Troll, W.
Blocking tumor promotion by proteases inhibitors.
In : Fundamentals of Cancer Prevention. Edited by P.N. Magee et al.,
pp 41-53, University of Tokyo Press, 1976.
- Tu, A., Hollowell, W., Pallotta, S., Sivak, A., Lubet, R.A., Curren, R.D.,
Avery, M.D., Jones, C., Sedita, B.A., Huberman, E., Tennant, R., Spolding, J. and
Kouri, R.A.
An interlaboratory comparison of transformation in Syrian hamster embryo
cells with model and coded chemicals.
Environmental Mutagenesis, **8**, 77-98, 1986.
- Tu, A., Juodawkis, A. and Lamb, K.
Different growth factor requirements of syrian hamster embryo cell
populations.
81 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research,
May 23-26, 1990.
- Twort, J.M. and Twort, C.C.
Comparative activity of some carcinogenic hydrocarbons.
Amer J. Cancer, **35**, 80-85, 1939.
- Van Kranen, H.J., Van de Zonde, L., Van Kreijl, C.F., Bisschop, A. and Wieringa, B.
Cloning and nucleotide sequence of rat ornithine decarboxylase cDNA.
Gene, **60**, 145-155, 1987.
- Van Steeg, J., Van Oostrom, C.T.M., Hodemaekers, H.M. and Van Kreijl, C.F.
Cloning and functional analysis of the rat ornithine decarboxylase-encoding
gene.
sous presse, Gene, 1990.
- Van Steeg, H., Van Oostrom, C.T.M., Hodemaekers, H.M., Peters, L. and
Thomas, A.A.M.
The 5'untranslated region of rat ornithine decarboxylase mRNA is a
polyamine-independent and potent inhibitor of in vitro translation.
sous presse, J.B.C., 1990.
- Verma, A.K., Ashendel, C.L. and Boutwell, R.K.
Inhibition by prostaglandin synthesis inhibitors of the induction of epidermal
ornithine decarboxylase activity, the accumulation of prostaglandins, and
tumor promotion caused by 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate.
Cancer Res., **40**, 308-315, 1980.
- Weinstein, I.B.
Evaluating substances for promotion, cofactor effects and synergy in the
carcinogenic process.
Journal of Environmental pathology and toxicology, **3**, 89-101, 1980.
- Weinstein, I.B.
The origine of human cancer : Molecular mechanisms of carcinogenesis and
their implications for cancer prevention and treatment.
Cancer Research, **48**, 4135-4143, 1988.

- Weisburger, J.H. and Williams, G.M.
 Classification of carcinogens as genotoxic and epigenetic as basis for improved toxicologic bioassay methods.
 In environmental mutagens and carcinogens
 Editors Sugimura, T., Kondo, S. Takebe, H., University of Tokyo Press, pp. 283-294, 1982.
- Wen, L., Huang, J.K. and Blacishear, P.J.
 Rat ornithine decarboxylase gene nucleotide sequence, potential regulatory recents and comparasion to the mouse gene.
 The Journal of Biological Chemistry, **264**, n° 15, issue of May 25, pp 9016-9021, 1989.
- Williams-Ashman, H.G., Jänne, J., Coppoc, G.L., Geroch, M.E., Schenone, A.
 New aspects of polyamine biosynthesis in eukaryotic organisms.
 In : Weber (Ed.) Advances in enzyme regulation, Vol. 10. Pergamon Press, Oxford, p. 225, 1972.
- Yamada, S., Hirota, K., Childa, K. and Kuroki, T.
 Inhibition of phorbol ester-caused induction of ornithine decarboxylase and tumor promotion in mouse skin by staurosporine, a potent inhibitor of protein kinase C.
 Biochemical Biophysical Research Communications, **157**, 9-15, 1988.
- Yamagiwa, K. and Ichikawa, K.
 Experimental study of the pathogenesis of carcinoma.
 J. Cancer Res., **3**, 1-21, 1918.
- Yamamoto, S., Sasakowa, N., Kiyoto, I., Nakadate, T. and Kato, R.
 The induction of ornithine decarboxylase caused by 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) in isolated epidermal cells is inhibited by lypoxygenases inhibitors byt not by cyclooxygenases inhibitors.
 European Journal of Pharmacology, **144**, 101-103, 1987.
- Yokota, S., Tsuji, H. and Kato, K.
 Immunocytochemical localization of cathepsin B in rat kidney.
 I. Light microscopic study using the indirect immunoenzyme technique.
 J. Histochem. Cytochem., **34**, 891-897, 1986a.
- Yokota, S., Tsuji, H. and Kato, K.
 Immunocytochemical localization of cathespin H in rat kidney.
 Histochemistry, **85**, 223-230, 1986b.
- Yuspa, H.Y.
 Methods for the use of epidermal cell culture to study chemical carcinogenesis. In methods in skin research. Edited by D. Skerrow and C.J. Skerrow, Chap. 8, pp 213-245, 1985.
- Zisson, C.R., Siwik, A. and Tu, A.
 Improved transformation response of Syrian Hamster embryo cells in pH 6.7 medium.
 79th Annual meeting of the AACR, 25-28 Mai, 1988, New Orleans, USA.

ANNEXES

Annexe 1 : Milieux et tampons pour la culture cellulaire

1 - Milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM-H21) pH 7.4

| Composants | mg/l |
|--|--------|
| NaCl | 6400,0 |
| KCl | 400,0 |
| CaCl ₂ (anhyd) | 200,0 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 200,0 |
| NaH ₂ PO ₄ H ₂ O | 124,0 |
| Glucose | 1000,0 |
| Fe (NO ₃) ₃ 9H ₂ O | 0,1 |
| L-arginine HCl | 84,0 |
| L-valine | 94,0 |
| Glycine | 30,0 |
| L-serine | 42,0 |
| L-cystéine | 48,0 |
| L-tyrosine | 72,0 |
| choline Cl | 4,0 |
| Nicotinamide | 4,0 |
| D-Ca Pantathenate | 4,0 |
| L-histidine H ₂ O | 42,0 |
| L-isoleucine | 105,0 |
| L-leucine | 105,0 |
| L-lysine HCl | 146,0 |
| L-méthionine | 30,0 |
| L-tryptophane | 66,0 |
| L-thréonine | 95,0 |
| L-tryptophane | 16,0 |
| Pyridoxal HCl | 4,0 |
| Thiamine HCl | 4,0 |
| Riboflavine | 0,4 |
| Acide Folique | 4,0 |
| I-inositol | 7,2 |
| L-glutamine | 580,0 |
| Rouge de phénol | 15,0 |
| NaHCO ₃ | 3700,0 |

Référence Gibco n° 074-2100

2- Milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM-H16) pH 7.4

Il s'agit du même milieu que précédemment mais avec une concentration en glucose de 1000 mg/l (référence Gibco 074-1600)

3 - Milieu de Eagle modifié par Dulbecco pH 6.7

| Amino-acides | mg/l |
|------------------------------|------|
| L-arginine HCl | 84 |
| L-cystine | 48 |
| L-glutamine | 584 |
| Glycocolle | 30 |
| L-histidine H ₂ O | 42 |
| L-isoleucine | 105 |
| L-leucine | 105 |
| L-lysine HCl | 146 |
| L-méthionine | 30 |
| L-phénylalanine | 66 |
| L-sérine | 42 |
| L-thréonine | 95 |
| L-tryptophane | 16 |
| L-tyrosine | 72 |
| L-valine | 94 |
| Pyruvate-Na | 110 |
| | |
| Vitamines | mg/l |
| Acide folique | 4,0 |
| Choline chlorure | 4,0 |
| I-Inositol | 7,2 |
| Nicotinamide | 4,0 |
| D-Ca-pantothénate | 4,0 |
| Pyridoxal HCl | 4,0 |
| Riboflavine | 0,4 |
| Thiamine | 4,0 |

| Sels et autres composants | mg/l |
|--|------|
| KCl | 400 |
| CaCl ₂ | 200 |
| NaCl | 6400 |
| NaHCO ₃ | 750 |
| NaH ₂ PO ₄ H ₂ O | 124 |
| Fe (NO ₃) ₃ 9H ₂ O | 0,1 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 200 |
| D-glucose | 1000 |
| Rouge de phénol | 5 |

Référence : ce milieu a été réalisé sur demande auprès de la maison Eurobio

4 - Solution de PBS sans calcium ni magnésium

| Composants | g/5 litres eau bidistillée |
|----------------------------------|----------------------------|
| NaCl | 40,00 |
| KCl | 1,00 |
| NA ₂ HPO ₄ | 5,75 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,00 |

5 - Solution de trypsine 0.25 % pH 7.00

| Composants | g/5 litres eau bidistillée |
|----------------------------------|----------------------------|
| NaCl | 40,00 |
| KCl | 1,00 |
| NA ₂ HPO ₄ | 14,50 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,00 |
| Trypsine | 12,50 |

Annexe 2 : Composition des tampons pour le dosage biochimique des cathepsines.**1/ Tampon phosphate 0.1 M pH 6.8, 2 mM EDTA - 1 mM DTT**

| | |
|---|----------|
| KH_2PO_4 | 3,4 g. |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ | 8,95 g. |
| EDTA | 0,416 g. |
| DTT | 0,071 g. |

qsp 500 ml (conservation au froid pendant 1 mois)

2/ Tampon phosphate 0.1 M pH 6.0

| | |
|---|-----------|
| KH_2PO_4 | 6 g. |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ | 2,15 g. |
| EDTA | 0,416 g. |
| DTT | 0,0771 g. |

qsp 500 ml (conservation au froid pendant 1 mois)

3/ Tampon acétate de sodium 0.1 M pH 4.3

100 ml d'une solution acétate de sodium 1 M qsp 1 litre
ou 13.608 g d'acétate de sodium pour 1 litre d'eau bidistillée.
ajuster le pH avec de l'acide acétique.

Annexe 3 : Tampons pour extraction du RNA et Northern-Blot**1 - RES**

0.5 M LiCl PM 42.39
 1 M urée PM 60.06
 0.02 M sodium Citrate PM 294.10 qsp 97.5 ml Eau bidistillée
 2.5 mM CDTA PM 346.3

Filtrer la solution sur 0.45 μ M et ajouter 2.5 ml de SDS 10 % (concentration finale 0.25 %) sous la hotte.

2 - CCS

1 mM NaCl
 1 mM CDTA qsp 247.5 ml eau bidistillée pH 6.8

Filtrer sur 0.45 μ M et ajouter 2.5 mM SDS 10 % (concentration finale 0.1 %).

3 - LiCl/Ethanol

5 M LiCl dissoudre dans l'eau

Autoclaver la solution

Ajouter ensuite 3 volume LiCl + 2 volumes 95 % éthanol.

4 - Tris - EDTA (TE)

1 M Tris
 0.5 M EDTA pH 8.00 et autoclaver

5 - Solution Phénol/Chloroforme

10 gr cristaux Phénol/10 ml chloroforme.

Conservation à température ambiante, à l'abri de la lumière.

6 - Urea Layer Mix

8 M urée
 10 % saccharose Il faut autoclaver
 0.05 % orange G préalablement ces solutions
 0.1 % SSC

7 - Tampon Borate pour électrophorèse

89 mM Tris base
 89 mM acide borique pH 8.3
 2.5 mM EDTA

avec bromure d'éthyidium

8 - Tampon 2 x SSC (Standard Saline Citrate)

0.03 M citrate trisodique
 0.3 M chlorure de sodium pH 7.0

qsp 1000 ml (conservation à température ambiante, en flacon ambré).

Annexe 4 : Références des produits utilisés :*** Pour l'activité ODC**

Actinomycine D : Sigma n° A 1410
 Aprotinine : Sigma n° A 1153
 Benzo(a)pyrène : Sigma n° B 1760
 Cycloheximide : Sigma n° C 6255
 E64 : Boehringer-Mannheim n° 874 523
 Indométacine : Sigma n° I 7378
 NDGA : Sigma n° N 5630
 Ornithine : Sigma n° O 2375
¹⁴C-L-ornithine : amersham n° CFA 491
 TLCK : Sigma n° T 7254
 TPCK : Sigma n° T 4376
 TPA : LC-Services corporation/USA n° 617-938-1700

*** Pour les cathepsines**

Triton X-100 : Merck n° 11869
 Zphe-Arg - NHMec : Sigma n° C 9521
 Z-Arg-Arg-NHMec : Bachem I. 1135
 Arg-NHMec : Sigma n° A 2027

*** Pour l'électrophorèse sur gel de gélatine**

tous les produits utilisés sont des produits BIORAD pour électrophorèse
 "Marqueur" : RAIMBOW™ Protein Molecular weight Markers :
 Amersham code RPN 756

*** Pour l'extraction du RNA et le Northern blot**

CDTA (trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N' tetraacétic acid) :
 sigma n° D 1383
 Membrane nylon de transfert : Amersham n° RPN 303B
 Papier Whatman pour chromatographie n° 303 0917
 Protéinase K (extraite de *Tritirachium album*) :
 Boehringer Mannheim n° 745-723
 ADN (extrait de sperme de hareng) : Sigma n° D 2251
 Film photographique : Amersham hyper -film MP code RPN 6.

RESUME

L'application topique de l'ester de phorbol TPA, cancérigène non génotoxique, entraîne régulièrement sur la peau de souris dans l'ordre chronologique suivant : une stimulation de l'activité ODC, une réaction inflammatoire dermique et hypodermique, une hyperplasie épidermique et enfin, à plus long terme la formation de tumeurs. Nous nous sommes intéressés à la stimulation de l'activité ODC par le TPA, un des événements le plus précoce. Pour éviter l'interférence des autres composants cellulaires de l'organisme, nous avons choisi comme modèles : 2 lignées de cellules épithéliales, cellules non traitées Ctr, et cellules prétraitées avec le BaP, BPe, et des cellules embryonnaires de Hamster syrien (SHE). Nous avons observé une stimulation de l'ODC par le TPA, plus forte dans les cellules Ctr que dans les cellules BPe. Cette différence a été aussi constaté au niveau moléculaire.

La différence d'activité ODC cytoplasmique entre les 2 lignées est consécutive à une différence du taux d'induction de l'ODC-ARNm. Nous avons également remarqué que le taux d'induction ODC-ARNm par le TPA était nettement supérieur à la stimulation d'ODC cytoplasmique enregistré, quelque soit les cellules considérées : Ctr, BPe et SHE.

L'emploi d'anti-inflammatoires non stéroïdiens nous a permis de démontrer une interaction réelle entre les compartiments dermique (inflammation) et épidermique (ODC). Par l'intermédiaire d'un troisième anti-inflammatoire, stéroïdien cette fois, la dexaméthasone, nous avons pu mettre en évidence qu'il existait une régulation post-transcriptionnelle de l'ODC cytoplasmique dans les 3 types cellulaires étudiés. Cette régulation post-transcriptionnelle est essentiellement réalisée par les sérine-protéases. Leur action protéolytique est très importante et se trouve à la fois modulée par le TPA, des xénobiotiques et l'étape de transformation cellulaire.

Dans la 3ème partie de notre travail, nous avons cherché à établir les corrélations pouvant exister entre les variations du taux d'ODC et l'apparition du phénotype transformé. Il semblerait que l'étape crucial vers la transformation irréversible se situe après le 5ème jour, date à partir de laquelle les cellules SHE sont très sensibles à l'action du TPA.

L'ensemble de notre travail nous a permis d'analyser un des mécanismes épigénétiques de l'induction d'ODC par le TPA et sa régulation cytoplasmique par l'intermédiaire des enzymes protéolytiques.

**Mots-clé : Mécanisme épigénétique - 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate -
Omithine décarboxylase - Régulation - Protéases -
Transformation cellulaire.**