



HAL
open science

Utilisation de cellules épithéliales hépatiques pour l'étude de la promotion tumorale in vitro

P. Martel, Catherine C. Chaumontet, V. François, G. Pascal

► **To cite this version:**

P. Martel, Catherine C. Chaumontet, V. François, G. Pascal. Utilisation de cellules épithéliales hépatiques pour l'étude de la promotion tumorale in vitro. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1989, 20 (2), pp.228-229. hal-00901877

HAL Id: hal-00901877

<https://hal.science/hal-00901877>

Submitted on 11 May 2020

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.

conduit à l'isolement du premier oncogène en 1976 (Stéhelin *et al.*, 1976), le gène *src* dont le produit a été identifié par Collet et Erickson (1978) : il s'agit d'une protéine kinase (p60 *v-src*) qui phosphoryle préférentiellement les résidus tyrosine des protéines cellulaires, en particulier les protéines du cytosquelette et les enzymes de la glycosylation. L'utilisation de plusieurs types de cellules en culture et l'isolement de différents mutants dont le gène *v-src* est modifié permet de révéler l'effet pléiotrope de ce gène, effet qui est une caractéristique du fonctionnement de la plupart des oncogènes viraux. Pessac et Calothy (1974) ont découvert que les virus sauvages de sarcomes aviaires sont capables d'induire la multiplication et la transformation de cellules de neurorétine d'oiseau. L'analyse de plusieurs mutants possédant un gène *src* altéré montre que la multiplication des cellules de neurorétine est un phénomène indépendant de la transformation cellulaire. La protéine p60 *v-src*, produit du gène *src*, possède donc différents domaines fonctionnels : l'extrémité C-terminale, responsable de l'activité kinase et l'extrémité N-terminale permettant l'interaction de la p60 *v-src* avec la membrane plasmique sont nécessaires à la transformation cellulaire alors que ces régions ne sont pas requises pour l'induction de la multiplication. Les oncogènes viraux présentent aussi une caractéristique essentielle : ils sont capables d'agir en synergie et de coopérer pour transformer les cellules. Le rétrovirus MH-2 renfermant deux oncogènes *v-myc* et *v-mil* constitue un modèle intéressant pour illustrer ce phénomène. Il est en effet capable de transformer les cellules de neurorétine *in vitro* ainsi que d'induire leur prolifération. L'isolement de mutants ne portant que le gène *v-myc* montre que ceux-ci sont incapables d'induire la multiplication et la transformation de ces cellules. Au contraire, l'étude d'un mutant spontané portant le gène *v-mil* indique qu'il est capable d'entraîner leur prolifération avec la même efficacité que le virus sauvage MH-2 sans toutefois transformer ces cellules. Depuis 1976, l'étude de différents modèles de tumeurs viro-induites a ainsi conduit à la caractérisation d'une vingtaine d'oncogènes viraux et de leurs équivalents cellulaires dont il reste à déterminer le rôle dans le contrôle de la croissance ou de la différenciation cellulaire.

Références

Collett M.S. & Erickson R.L. (1978) Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus *src* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2021-2024

Pessac B. & Calothy G. (1974) Transformation of chick embryo neuroretinal cells by Rous sarcoma virus *in vitro* : induction of cell proliferation. *Science* 185, 709-710

Stéhelin D., Guntaka R.V., Varmus H.E. & Bishop J.M. (1976) Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. *J. Mol. Biol.* 101, 349-365

Utilisation de cellules épithéliales hépatiques pour l'étude de la promotion tumorale *in vitro*. P. Martel, C. Chaumontet, V. François et G. Pascal (*INRA, Laboratoire des Sciences de la Consommation, 78350 Jouy-en-Josas, France*)

Le processus de cancérogénèse peut être décomposé schématiquement en deux phases : la phase d'initiation correspond à une modification du génome par une substance mutagène (ou cancérogène vrai). La phase de promotion tumorale qui intervient après l'initiation favorise l'apparition des tumeurs, ce qui se traduit par une augmentation de leur incidence et de leur vitesse de formation. Les mécanismes d'action des promoteurs de tumeurs sont encore fort mal connus. Ils se situent probablement aux niveaux épigénétique (modulation de l'expression de certains gènes) ou membranaire (inhibition des jonctions communicantes). La plupart des expériences de promotion tumorale sont menées *in vivo*, et mettent en œuvre des protocoles souvent complexes dans le but de réduire le délai d'apparition des tumeurs. Ainsi, il existe un réel besoin de modèles *in vitro* permettant l'étude plus précise des mécanismes cellulaires et moléculaires de la promotion tumorale, ainsi que la détection rapide des substances potentiellement promotrices. Afin d'étudier l'action promotrice de tumeurs de composés présents dans l'alimentation, ayant pour cible le foie, nous avons entrepris de développer un modèle *in vitro*. La nécessité de travailler en culture à long terme nous a conduit à utiliser comme matériel cellulaire des lignées de cellules épithéliales hépatiques de rat. Notre modèle comporte deux étapes : l'initiation, *in vivo*, est réalisée par injection intrapéritonéale d'un hépatocarcinogène à une dizaine de rats nouveaux-nés. La promotion tumorale, *in vitro*, résulte de l'adjonction régulière et prolongée des promoteurs dans le milieu de culture des cellules épithéliales hépatiques. Bien que décrits dans la littérature (Williams *et al.*, 1971),

les protocoles d'isolement des lignées de cellules épithéliales hépatiques sont délicats à mettre en œuvre et ne garantissent pas l'obtention à coup sûr de lignées pures. C'est en utilisant et en adaptant les conditions opératoires décrites par Chessebeuf *et al.* (1974), trypsination fractionnée en milieu sans calcium ni magnésium, et en ayant recours ou non à un milieu sans sérum (Chessebeuf et Padieu, 1984), que nous avons pu préparer une quinzaine de lignées épithéliales. Progressivement, nous avons pu réduire à quelques semaines, c'est-à-dire 2-3 repiquages, le temps nécessaire à la sélection des cellules épithéliales, grâce à des collages répétitifs, et au grattage ou à l'aspiration des fibroblastes indésirables. L'une des lignées, issue d'animaux initiés par l'acétylaminofluorène (30 mg/kg), fait l'objet d'une étude de transformation *in vitro*. Les promoteurs étudiés sont deux anti oxygènes phénoliques utilisés comme additifs alimentaires, le BHT et le BHA, ainsi que le phénobarbital, pris comme promoteur de référence. Dès les premiers jours d'incubation, le BHA 10^{-4} M induit une augmentation de l'activité γ -glutamyl-transpeptidase (γ -GT) au sein de la population cellulaire. Le même effet n'est observé qu'après environ 10 semaines pour le phénobarbital 10^{-3} M, et à plus de 15 semaines pour le BHT 3×10^{-5} M. A ce stade, l'induction de la γ -GT semble encore réversible.

Références

- Chessebeuf M. & Padieu P. (1984) Rat liver epithelial cell cultures in serum-free medium : primary cultures and derived cell lines expressing differentiated functions. *In vitro* 20, 780-795
- Chessebeuf M., Olsson A., Bournot P., Desgrès J., Guiguet M., Maume G., Maume B.F., Périssel B. & Padieu P. (1974) Long-term cell culture of rat liver epithelial cells retaining some hepatic functions. *Biochimie* 56, 1365-1379
- Williams G., Weisburger E.K. & Weisburger J.H. (1971) Isolation and long-term cell culture of epithelial-like cells from rat liver. *Exp. Cell Res.* 69, 106-112

Hépatocytes isolés de rat et profils métaboliques d'une amine hétérocyclique. J. Tulliez (INRA, Laboratoire des Xénobiotiques, BP 3, 31931 Toulouse Cedex, France)

La 2-amino-3-méthylimidazo [4,5-*f*] quinoline (IQ) appartient à la famille des amines hétérocycliques mutagènes identifiées dans les pyrolysats de protéines et les aliments cuisinés. Il a été montré qu'elle était cancérigène chez la souris et le rat, provoquant des adénocarci-

nomes hépatiques et intestinaux (Ohgaki *et al.*, 1984; Takayama *et al.*, 1984).

D'une manière générale, il a pu être mis en évidence que les systèmes enzymatiques de biotransformation étaient capables d'engendrer des métabolites *N*-hydroxylés susceptibles de former des adduits avec l'ADN.

Le devenir métabolique de l'IQ a été étudié chez le rat au moyen de la molécule marquée au tritium (Sjodin *et al.*, 1984; Tureski *et al.*, 1986; Peleran *et al.*, 1987) et jusqu'à maintenant les résultats se résument à l'identification de : 1) IQ sous forme *N*-acétylée, 3-*N*-déméthylée et *N*-sulfamate dans les urines; 2) *N*-sulfamate dans les fèces.

Les profils métaboliques urinaire et biliaire complets ont été obtenus par des analyses mettant en œuvre la technique de radio CLHP. Les métabolites majeurs ainsi que des métabolites non identifiés ont pu être séparés.

Plus de 90% de la radioactivité totale des urines, de la bile ont pu être extraits et séparés en plusieurs pics. La radioactivité urinaire est répartie en 8 pics principaux, parmi lesquels l'IQ et les formes *N*-acétyl et 3-*N*-déméthyl correspondent à des pics mineurs. Le profil biliaire ne présente pas d'IQ inchangé ni sous forme *N*-acétyl ou 3-*N*-déméthyl. Cinq autres métabolites y sont observés, qui correspondent à ceux obtenus dans les urines.

Compte tenu des quantités retrouvées aussi bien dans la bile que les urines, il n'était pas possible de procéder à l'identification des nouvelles formes séparées. Celle-ci a été envisagée par le biais de la production de métabolites par les hépatocytes isolés de rat (méthode de Seglen).

A partir des hépatocytes, il a été établi un profil présentant à la fois les métabolites urinaires et biliaires, la proportion relative de chacun étant très différente de celle observée *in vivo*.

Par ailleurs, l'effet de la durée de l'incubation sur la production des métabolites a été étudiée, certains voyant leur taux de formation se stabiliser au bout de 2 à 3 h, tandis que d'autres continuent à se former à la même vitesse durant 6 h. Les essais d'extraction et de purification à partir du milieu d'incubation des hépatocytes ont montré la présence de substances interférentes en quantités beaucoup plus faibles que dans les extraits urinaires ou biliaires. Dès lors il paraît possible de préparer des quantités suffisantes (quelques centaines de microgrammes) de métabolites purifiés afin de procéder à leur identification formelle.