

BIOLOGIE CELLULAIRE. — *Transformation des cellules KB induite par la showdomycine.* Note (*) de M. Mirko Beljanski, M^{me} Christiane Bonissol et M^{lle} Pua Kona, présentée par M. Pierre Lépine.

Une partie de la population des cellules KB cultivées *in vitro* survit en présence de showdomycine et acquiert de nouvelles propriétés dont certaines s'expriment par la modification importante du rapport des nucléotides des ARN ribosomiques, ARN 18 S en particulier.

L'effet antitumoral et antibactérien de la showdomycine (Sho) ⁽¹⁾ qui, par sa structure ⁽²⁾ ressemble à la pseudouridine et à l'uridine, a été décrit pour la première fois en 1964. Chez les bactéries, l'un de nous ⁽³⁾ a montré que cet antibiotique provoque la synthèse de plusieurs types d'ARN qui ne sont pas complémentaires de l'ADN. Ainsi les mutants d'*E. coli* ⁽³⁾ ou d'*Agrobacterium tumefaciens* ⁽⁴⁾, résistants à la showdomycine, synthétisent des ARN qui contiennent des nucléotides à bases puriques en excès par rapport aux nucléotides pyrimidiques. La présence de ces ARN modifiés se traduit par une altération importante des protéines ribosomiques et de certaines enzymes ⁽³⁾.

Nous décrivons ici certaines altérations observées chez les cellules KB après traitement par la showdomycine.

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES. — 1. *Cultures cellulaires.* — Les cellules proviennent de la lignée KB. Elles ont été clonées au laboratoire et entretenues dans le milieu à l'hydrolysate de caséine auquel a été ajouté 10 % de sérum de poulain. Le stock, dédoublé une fois par semaine par trypsination, est cultivé sans antibiotique. L'absence de mycoplasmes est contrôlée régulièrement.

2. *Marquage et isolement des ARN.* — Les cellules ont été incubées pendant 24 h dans du milieu frais contenant du ³²P (1 mC pour 6 ml de milieu). Les cellules détachées à l'aide de la trypsine sont centrifugées et lavées (solution saline de Earle), puis le culot remis en suspension (environ 2 à 4 × 10⁶ cellules) dans 2 ml de tampon acétate 0,05 M de pH 5,1 contenant 3 mg de pronase. L'addition de lauryl sulfate (concentration finale 2 %) produit une lyse rapide des cellules. Le mélange est laissé 1 h à 37 °C avant d'être dilué 5 fois avec le tampon acétate.

Les ARN (cytoplasmiques et nucléaires) ont été alors isolés à l'aide de phénol ⁽³⁾ et leur intégrité vérifiée avant analyse des nucléotides.

3. *Séparation des ARN par électrophorèse sur gel d'acrylamide.* — Les ARN totaux marqués au ³²P (ou non marqués) ont été séparés sur gel d'acrylamide (3,2 %) comme décrit ⁽⁵⁾. Les bandes constituées d'ARN ont été détectées sur gel à l'aide d'un dispositif adapté au spectrophotomètre enregistreur « Cary » ⁽⁵⁾.

4. *Analyse des nucléotides des ARN.* — Chaque type d'ARN parfaitement séparé sur gel d'acrylamide est hydrolysé (gel découpé et mis en présence de KOH 0,5 à 1,0 N) pendant 18 h à 37 °C. La totalité des nucléotides ³²P peut ainsi être récupérée et analysée sur colonne de « Dowex ». Toutes les autres méthodes essayées conduisaient à des pertes variant de 25 à 30 %.

II. RÉSULTATS. — 1. *Traitement des cellules KB par la showdomycine.* — Les cellules ont été incubées à 37 °C en présence de showdomycine : 100, 50, 20, 10 et 5 µg/ml de milieu. Après 24 h d'incubation en présence de 100 µg de Sho/par millilitre toutes les cellules sont mortes (vérification par coloration à l'érythrosine B et repiquage).

Par contre parmi les cellules incubées en présence de 50 et 20 µg de Sho/par millilitre, 0,1 et 1 % des cellules respectivement étaient attachées au verre malgré un effet toxique important qui s'est traduit par la formation de nombreuses grappes de cellules rondes (qui éventuellement se détachent du verre) et par l'aspect étoilé des cellules étalées. 48 h après, une partie des cellules semble récupérer, et 3 jours après, apparaissent quelques figures de mitose. Si l'on prolonge le traitement pendant 8 jours, l'effet toxique est toujours présent, mais quelques îlots de cellules se développent et reprennent l'aspect habituel des cellules épithéliales. Après 8 jours, nous avons replacé ces cellules dans du milieu normal sans antibiotique, et en 3 semaines elles ont retrouvé une croissance pratiquement identique aux cellules KB d'origine. Nous avons alors entretenu séparément cette nouvelle lignée cellulaire, dite KB-Sho, et la cultivons depuis 6 mois dans du milieu normal.

Après 3 mois, nous avons replacé les cellules KB-Sho en présence de la showdomycine à la concentration toxique de 20 µg/ml. Alors que les cellules KB ont été détruites à 99 % après un contact de 24 h, les cellules KB-Sho ont continué à se multiplier normalement. Nous avons cependant observé l'apparition de quelques groupes de cellules rondes. Il est donc possible que la propriété de résistance des cellules Kb-Sho à la showdomycine ne s'étende pas à l'entière population de cellules KB-Sho.

Enfin la présence de 10 µg de showdomycine provoque le même effet toxique mais de façon moins étendue. A 5 µg/ml aucun effet n'a été observé.

TABLEAU

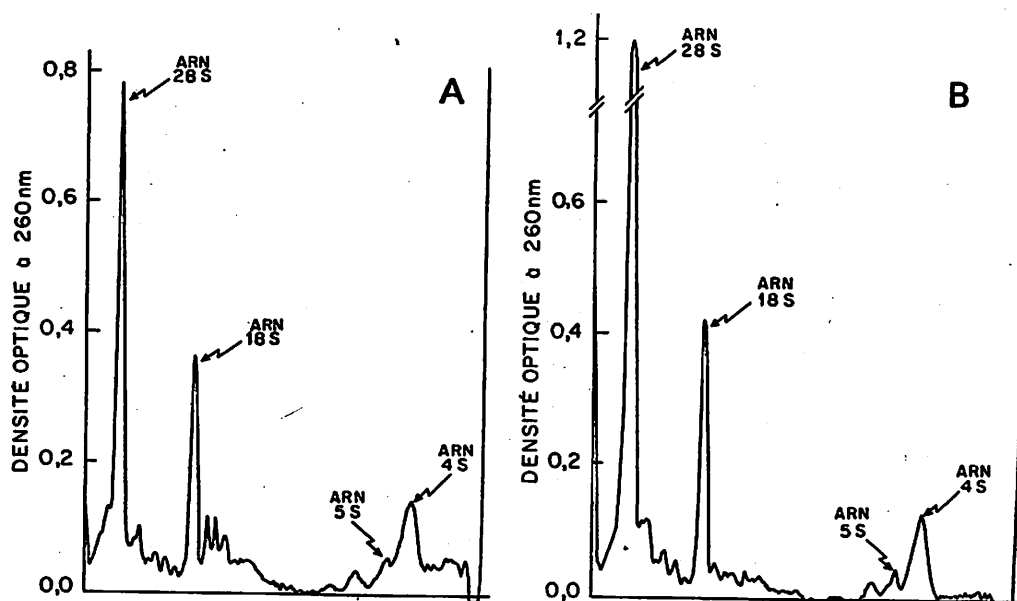
Composition en nucléotides des ARN isolés à partir des cellules KB et KB-Sho

Nucléotides (bases)	ARN 28 S (*)		ARN 18 S (*)		ARN 4 S (± 5 S) (*)	
	KB	KB-Sho	KB	KB-Sho	KB	KB-Sho
A	17,8	23,4	22,8	28,6	22,0	22,5
G	34,6	30,8	30,4	33,0	29,8	28,5
C	28,8	27,3	26,8	23,4	28,2	27,0
U	18,6	18,5	20,0	14,8	20,0	22,0
G + A/C + U ..	1,10	1,49	1,12	1,64	1,07	1,06
G + C/A + U ..	1,75	1,39	1,34	1,31	1,35	1,30
A/U	0,96	1,27	1,12	1,92	1,08	1,00

(*) Moles pour 100 moles de nucléotides-³²P analysés.

2. *Analyse quantitative et qualitative des ARN.* — La figure montre le profil densitométrique des ARN ribosomiques et de l'ARN 4 S (± 5 S) séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide. On constate que le rapport de densité (pic) de l'ARN

28 S/ARN 18 S des cellules témoins diffère de celui de ces ARN isolés des cellules KB-Sho. L'analyse des nucléotides montre que le rapport des bases de l'ARN 28 S ($G + A/C + U = 1,49$) et surtout celui de l'ARN 18 S ($G + A/C + U = 1,64$) diffère nettement de celui des ARN correspondants chez les cellules témoins ($G + A/C + U = 1,12$). Par contre l'ARN 4 S (± 5 S) ne semble apparemment pas modifié (tableau). Dans les ARN ribosomiques, les nucléotides à bases puriques excèdent largement les nucléotides pyrimidiques. Il est remarquable que le rapport A/U soit de 1,12 chez les ARN des cellules témoins alors que ce rapport est de 1,92 chez les cellules transformées par la showdomycine. Ces résultats montrent que les ARN ribosomiques ont subi des modifications profondes sans qu'il soit encore possible d'éliminer une éventuelle contamination des ARN modifiés par un ARN particulier (ARN « messenger », par exemple).



Profil densitométrique des ARN après séparation par électrophorèse sur gel d'acrylamide. A. Cellules KB ; B. Cellules KB-Sho

III. DISCUSSION. — Après traitement des cellules de la lignée KB avec différentes concentrations de showdomycine, nous avons obtenu malgré l'effet toxique de l'antibiotique une population de cellules « résistantes » à cet antibiotique (KB-Sho) qui, après repiquage en milieu normal, se sont multipliées activement et ne peuvent apparemment pas être différenciées des cellules d'origine par leur aspect morphologique ou par leur vitesse de croissance.

Cependant ces cellules Kb-Sho produisent certains ARN profondément modifiés. Il est intéressant de souligner les différences quantitatives et qualitatives entre l'ARN 28 S et l'ARN 18 S synthétisés par les cellules résistantes à la showdomycine. Tout se passe comme si la cellule, pour se défendre, synthétise certains ARN modifiés.

Le phénomène observé chez les bactéries *E. coli* mutantes, Sho-résistantes, à

savoir la synthèse d'ARN modifiés sans altération apparente de la croissance à 37 °C et de la morphologie des bactéries (5), est donc retrouvé chez les cellules KB-Sho.

Il est remarquable que, après 6 mois de culture *in vitro* des cellules KB-Sho dans un milieu normal, sans antibiotique, nous ayons retrouvé chez ces cellules l'altération de l'ARN 18 S en particulier. En étudiant la résistance de cellules de reins de porc à la puromycine, Harris (6) a observé que l'état résistant de certaines cellules cultivées en présence de l'antibiotique, persistait pendant plusieurs générations après retrait de l'antibiotique ; mais il n'a pu associer ce caractère de mutant à une altération du génome.

Nous recherchons actuellement les manifestations de cette transformation par l'étude parallèle de différentes propriétés des cellules KB et des cellules KB transformées.

(*) Séance du 24 avril 1972.

(1) H. NISHIMURA et coll., *The Journal of antibiotics*, 17, Série A, 1964, p. 149.

(2) K. R. DARNALL et coll., *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 57, 1967, p. 548.

(3) M. BELJANSKI, M^{me} M. BELJANSKI et P. BOURGAREL, *Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.*, 68, 1971, p. 491.

(4) L. LEGOFF, *Comptes rendus*, 273, Série D, 1971, p. 1757.

(5) M. BELJANSKI, P. BOURGAREL et M^{me} M. BELJANSKI, *Ann. Inst. Pasteur*, 118, 1970, p. 253-276.

(6) M. HARRIS, *J. Nat. Cancer Inst.*, 38, 1967, p. 185-192.

Institut Pasteur,
28, rue du Docteur-Roux, 75-Paris, 15^e.