

Synthèse *in vitro* d' α Foeto protéine (α FP) par le foie humain cancéreux en culture (*)

par S. QUELIN (**), M. RIOCHE (***), Y. BRESSON (****)
et R. MASSEYEFF (****)

RESUME

Des cultures sont faites à partir de fragments hépatiques provenant de malades atteints de cancer primitif du foie (CPF). Certaines produisent de l' α FP; la synthèse de novo de la protéine est démontrée par incorporation d'acides aminés radioactifs et analyse auto-radioimmunologique des milieux de culture.

L' α FP, constituant spécifique du sérum fœtal, disparaît après la naissance [(4), (16)]; sa réapparition chez l'adulte signale, le plus souvent, l'existence d'un cancer hépatocellulaire [(15), (14), (8)] et sa mise en évidence dans le sérum est couramment utilisée pour le diagnostic de la maladie (11).

La preuve directe que la synthèse de l' α FP est bien le fait de la cellule hépatique, fœtale ou néoplasique, peut être apportée par l'étude de sa localisation en immunofluorescence ainsi que l'ont montré GITLIN (5), GOUSSEV et collab. (6), PURTILO et collab. (12). Par ailleurs, ABELEV (2), IRLIN (10) et HULL (9), utilisant des cultures de foies tumoraux de rat, souris et singe, observent que les cellules hépatiques animales sont capables de synthétiser l' α FP *in vitro*.

Nous nous sommes proposés d'entreprendre des cultures prolongées de foies humains cancéreux, dans le but de préciser la nature des cellules productrices d' α FP et les facteurs pouvant influencer sur sa sécrétion.

METHODES

I. Matériel - Cultures

Ceux-ci ont fait l'objet d'une précédente communication (13).

II. Recherche de l' α FP

Les milieux de culture prélevés 1 ou 2 fois par semaine sont filtrés, dialysés puis concentrés sous vide à 4° C: les échantillons sont analysés par analyse immuno-électrophorétique et double diffusion en gélose à l'aide d'un antisérum spécifique anti- α FP selon le procédé de DECKERS et ABELEV (3) en utilisant comme témoins des sérums avec et sans α FP et un milieu de culture vierge.

III. Incorporation d'acides aminés radioactifs. Immunoautoradiographie

Nous avons utilisé la méthode d'Hochwald et collab. (7). On ajoute à un milieu de culture

(*) Paru *in*: C.R. Acad. Sci., Paris, 1972, 274 sér. D (5): 768-771. Reproduit avec l'aimable autorisation de Gauthier-Villars, éditeur de cette revue.

(**) Faculté de Médecine de Dakar, Laboratoires de Biochimie et Physique Médicale.

(***) I.E.M.V.T., Laboratoire National de l'Élevage et de Recherches Vétérinaires, Service des Cultures de Tissus, B.P. n° 2057, Dakar.

(****) Ecole Nationale de Médecine de Nice, Laboratoires d'Immunologie et de Biochimie, 06-Nice, Alpes-Maritimes.

sans lysine ni leucine ces mêmes acides aminés marqués au ^{14}C à la dose de 1 à 2 $\mu\text{Ci/ml}$. L'incorporation de ces acides aminés dans les protéines est vérifiée par autoradiographie des plaques d'immunodiffusion à l'aide de film « Kodak Tri X Pan-4194 » 320 ASA.

Résultats : Ils sont résumés dans le tableau I.

Trois essais nous semblent d'un intérêt particulier :

1. N° 6 : prélevées chez un malade $\alpha\text{FP}+$, les cellules sont ensemencées séparément dans deux milieux, à 30 p. 100 de sérum humain :

— milieu 1 : Hank's balanced salt solution + 0,5 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine + 0,1 d'extrait de levure (Yeastolate Difco) + 1 mg/p. 100 de dipyridamol;

— milieu 2 : minimum Essentiel de Eagle + 1 mg/p. 100 de dipyridamol.

TABLEAU I

25 échantillons mis en culture	→	18 cultures réussies ↗ ↘	11 cultures à croissance faible :	→	Toutes sont $\alpha\text{FP}-$ bien que 9 proviennent de malades $\alpha\text{FP}+$
			7 cultures à croissance active :	↗ ↘	6 $\alpha\text{FP}+$ provenant toutes de malades $\alpha\text{FP}+$ 1 $\alpha\text{FP}-$ provenant d'un malade à sérum très faiblement $\alpha\text{FP}+$

Nous constatons que dans le milieu 1, la croissance des cellules est très active et se prolonge un mois alors qu'elle est faible et fugace dans le milieu 2; Le tableau II montre, de plus, un parallélisme étroit entre la production d' αFP et la multiplication cellulaire.

2. N° 26 : malade dont le sérum contient des traces d' αFP ; malgré une multiplication intense des cellules pendant un mois et demi, l' αFP n'est jamais décelée dans les milieux de culture.

3. N° 31 : malade à sérum $\alpha\text{FP}+$ ayant subi une hépatectomie partielle. A partir du lobe excisé, sont effectuées séparément :

— des cultures d'explants de foie non cancéreux (prélevés loin de la tumeur);

— des cultures d'explants cancéreux.

Les cultures d'explants cancéreux synthétisant l' αFP pendant un mois et demi alors que les autres n'en produisent à aucun moment.

Dans cet essai, la synthèse *de novo* de l' αFP est démontrée par incorporation d'acides aminés radioactifs. En outre, des essais préliminaires faits selon la même technique montrent que les cellules cancéreuses synthétisent d'autres protéines dont certaines ont été identifiées (albumine, transferrine, fibrinogène).

TABLEAU N° II

Essai n° 6 : activité de la culture et production d' αFP .

Nombre de jours de culture	M i l i e u I		M i l i e u II	
	Multiplication cellulaire*	Production d' αFP **	Multiplication cellulaire	Production d' αFP
6	Importante	+++ *	Faible	++
11	-	+++	-	+
16	-	+++	Nulle	-
19	Moyenne	++	-	-
25	-	++		
27	Faible	+		
36	Nulle	-		

(*) Appréciée d'après l'augmentation apparente de la densité cellulaire.

(**) +++ : Précipitation intense; ++ : Précipitation nette; + : Précipitation faible; - : Absence de précipitation; toutes conditions étant égales par ailleurs.

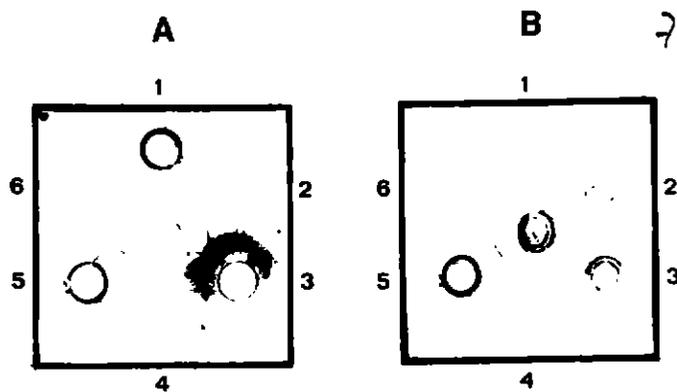


Fig. 1. — Incorporation d'acides aminés marqués au ^{14}C . Immunodiffusion double en gel d'agarose : A. Lame colorée au Noir Amide; B. Autoradiographie de la même lame. Trou central : sérum de lapin anti α FœtoProtéine humaine; Trou 1 : sérum humain normal adulte; Trous 2, 4, 6 : sérum d'un malade atteint de CPF contenant de l' α FœtoProtéine; Trou 5 : milieu de culture CPF 31 (culture en présence d'acides aminés marqués); Trou 3 : milieu de culture CPF 31 (culture sans acides aminés marqués).

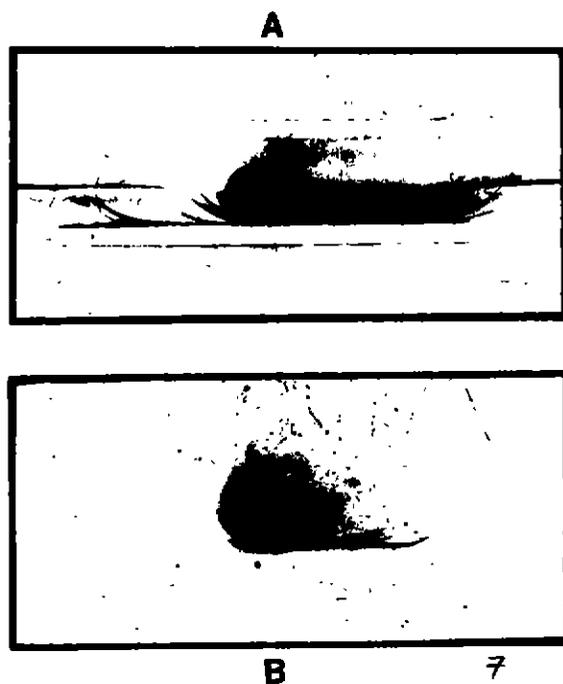


Fig. 2. — Incorporation d'acides aminés marqués au ^{14}C . Analyse immunoélectrophorétique en gel d'agarose : A. Lame colorée au Noir Amide; B. Autoradiographie de la même lame. Trou central : milieu de culture CPF 31 (avec acides aminés marqués); Réservoir supérieur : sérum de lapin anti α Fœto-Protéine humaine; Réservoir inférieur : sérum de cheval anti-protéines sériques humaines.

DISCUSSION

1. Réalité de la culture d'hépatocytes cancéreux

Comme cela a été évoqué dans notre précédent article (13), certains critères morphologiques (cellules multinucléées, polymorphisme) et l'aspect général des cultures (prolifération en amas, auto-aggrégation spontanée des cellules) tendent à prouver que les cellules cultivées sont bien cancéreuses. Leur capacité de synthétiser l' α FP peut être considérée comme une preuve de leur nature hépatocytaire. En effet, à la suite d'expériences de transplantation *in vivo*, ou d'études en immunofluorescence, la majorité des auteurs admettent que l' α FP est synthétisé par la cellule hépatique fœtale ou tumorale et non par des cellules hématopoïétiques.

2. Synthèse de novo de l' α FP

Outre la mise en évidence d' α FP radioactive dans les milieux de culture, après incorporation d'acides aminés radioactifs, deux arguments nous autorisent à conclure qu'il y a synthèse *de novo* :

a) Proportionnalité, lorsque la sécrétion a lieu, entre l'intensité de la multiplication cellulaire et la quantité d' α FP produite.

b) Synthèse se prolongeant plusieurs semaines.

3. Facteurs qui gouvernent la synthèse d' α FP au niveau cellulaire

D'après nos expériences, seuls les hépatocytes cancéreux provenant de malades à sérum riche en α FP synthétisent cette protéine *in vitro*.

Ces études confirment les conclusions de travaux antérieurs, selon lesquelles la corréla-

tion entre cancérisation et présence d' α FP n'est pas absolue. En effet, certains CPF n'élaborent pas d' α FP sérique; dans le foie d'un malade à sérum α FP+, tous les nodules ne sont pas sécréteurs, enfin, dans les nodules sécréteurs, toutes les cellules ne sécrètent pas en même temps. Peut-on conclure que la capacité de synthèse de l' α FP est génétiquement transmise par les cellules? Ce caractère ne serait pas modifié par la culture et correspondrait à une altération de l'expression génétique.

Ces essais ne permettent pas de trancher entre l'hypothèse d'une dérepression portant sur des cellules déjà différenciées et celle qui suppose que, le phénomène de cancérisation porte sur des cellules souches n'ayant pas encore perdu leur capacité de synthèse de l' α FP [(1), (17)]. Il est difficile de savoir si la synthèse plus ou moins active d' α FP *in vitro* résulte d'une production maximale de la protéine par un nombre limité de cellules ou d'une synthèse modulée sur l'ensemble des cellules. Des études en immunofluorescence pourraient nous renseigner à ce sujet.

L'origine des cellules et l'intensité de leur multiplication paraissent les deux facteurs majeurs déterminant la synthèse d' α FP.

Remerciements

M. le Professeur M. Sankale, doyen de la Faculté de Médecine de Dakar, M. le Professeur M. Gruet, MM. les Docteurs Bernard, Robin, Derrien, Hôpital principal, M. le Docteur I. Seck, Faculté de Médecine et M.M. Jacquesson, Hôpital Le Dantec nous ont fourni les prélèvements nécessaires. Le sérum humain a été fourni par M. le Professeur Linhard, directeur du Centre de Transfusion. Nous sommes redevables au CEA pour la fourniture gracieuse d'acides aminés marqués.

SUMMARY

Synthesis *in vitro* of α Foeto protein (α FP) by cultivated cancerous human liver

Cultures are made from hepatic fragments of patients affected with liver primitive cancer. Some of them produce α FP; the protein synthesis *de novo* is proved by incorporation of radio-active amino-acids and autoradiological analysis of culture media.

RESUMEN

**Síntesis *in vitro* de α Feto proteína (α FP)
por el hígado humano canceroso en cultivo**

Se hicieron cultivos a partir de fragmentos hepáticos provenientes de enfermos atacados por un cáncer primitivo del hígado. Algunos producen α FP; la síntesis *de novo* de la proteína está probada por incorporación de ácidos aminados radioactivos y análisis autoradiométrico de los medios de cultivo.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABELEV (G. I.). *Cancer Res.*, 1968, **28**: 1344.
2. ABELEV (G. I.) et BAKIROV (R.). *Vopr. Med. Khim.*, 1967, **13**: 378.
3. DECKERS (C.) et ABELEV (G. I.) in PEETERS (H.). *Protides of the biological fluids*. Amsterdam, Elsevier, 1962, **10**: 312.
4. GITLIN (D.), BOESMAN (M.). *J. Clin. Invest.*, 1966, **45**: 1826.
5. GITLIN (D.), KITZES (J.) et BOESMAN (M.). *Nature*, 1967, **215**: 534.
6. GOUSSEV (A. I.), ENGELHARDT (N. V.), MASSEYEFF (R.), CAMAIN (R.) et BASTERIS (B.). *Int. J. Cancer*, 1971, **7**: 207.
7. HOCHWALD (G. M.), THORBECKE (G. J.) et ASOFKY (R.). *J. Exp. Med.*, 1961, **114**: 459.
8. HULL (E. W.), CARBONE (P. P.), GITLIN (D.), O'GARA (R. W.), KELLY (M. G.). *J. Nat. Cancer Inst.*, 1969, **12**: 1035.
9. HULL (E. W.), O'GARA (R. W.), SMITH (C. F.) et CARBONE (P. P.). *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 1969, **10**: 41.
10. IRLIN (I. S.), PEROVA (S. D.) et ABELEV (G. I.). *Int. J. Cancer*, 1966, **1**: 337.
11. O'CONNOR (G. T.), TATARINOV (Y. S.), ABELEV (G. I.) et URIEL (J.). *Cancer*, 1970, **25**: 1091.
12. PURTILO (D. T.) et YUNIS (E. J.). *Fed. Proc.*, 1971, **30**: 634.
13. RIOCHE (M.), QUELIN (S.), SECK (I.), JACQUESSON (M.), BASTERIS (B.), MASSEYEFF (R.). *C. R. Acad. Sci., Paris*, 1970, 271, sér. D.: 1148.
14. STANISLAWSKI-BIRENCWAJG (M.), URIEL (J.), GRABAR (P.). *Cancer Res.*, 1967, **27**: 1990.
15. TATARINOV (Y. S.). *Vopr. Med. Khim.*, 1964, **10**: 90.
16. TATARINOV (Y. S.), AFANASYEVA (A.). *Bull. Exp. Biol. Med.*, 1965, **59**: 65.
17. URIEL (J.). *Pathol. Biol.*, 1969, **17**: 877.