

Effet de l'ATP sur l'incorporation d'un DNA-H³ exogène dans les cellules HeLa en culture

La pénétration de DNA hautement polymérisé a attiré l'attention de plusieurs laboratoires depuis quelques années et les cellules en culture se sont révélées dès le début comme un matériel d'étude particulièrement approprié pour l'approche de ce phénomène¹⁻⁹.

Ainsi BORENFREUND³ a observé dans le cas des cellules HeLa que l'incorporation de DNA-H³ (obtenu de *Pneumococcus* et de leucocytes humains), suivie par autoradiographie augmentait avec le temps et que pour les premières heures le pourcentage de cellules marquées était relativement faible.

Plus récemment ADAMS⁸ toujours sur les cellules HeLa a étudié l'absorption de DNA par le cytoplasme à l'aide de l'auramine O et a démontré que pour des temps de contact avec la solution de DNA de 6 h minimum, l'incorporation intéressait à peu près 6% des cellules.

Une série d'expériences préliminaires d'incorporation de DNA-H³ hautement polymérisé dans des cellules HeLa, nous a montré que pour des temps courts, de l'ordre de 10-15 min, un certain marquage était détecté par autoradiographie au niveau des noyaux¹⁰.

GROPP¹¹ a observé récemment, chez les cellules HeLa, l'action de l'ATP sur l'activation de la pinocytose.

Il était dès lors particulièrement intéressant d'examiner la relation pouvant exister entre l'activation de la pinocytose et l'incorporation de DNA dans des cellules HeLa en culture.

Matériel et méthode. Les expériences ont été effectuées sur des cultures de cellules HeLa maintenues à 36°C en boîtes de Roux bouchées. Le milieu utilisé était composé de 0,5% d'hydrolysate de lactalbumine et 10% de serum de veau dans du liquide de Hanks.

L'ATP (Adenosine-5'-triphosphoric acid, disodium dihydrogen salt, B.D.H.) à raison de 2 mg/ml est dissous dans du liquide de Hanks au moment même de l'expérience. On le laisse agir pendant 15 min puis les cellules sont mises en contact, pour une durée de 10 min, avec une solution de DNA-H³ d'*Escherichia coli*, hautement polymérisé (extrait selon MARMUR¹²), à la concentration de 150 µg/ml et ayant une activité spécifique de $2,2 \cdot 10^6$ dpm/µg. Ensuite les cellules sont lavées plusieurs fois dans du liquide de Hanks, additionné de DNA froid de thymus de veau (900 µg/ml), puis dans une solution de DNase (0,1 mg/ml en Hanks) et à nouveau rincées dans du liquide de Hanks. Après fixation en alcool-acide acétique (3:1), elles sont traitées par l'acide perchlorique à 2% pendant 20 min à 4°C.

L'autoradiographie est réalisée par la méthode du «dipping» selon CARO¹³ avec l'émulsion L₄ de Ilford. Après un temps d'exposition de 3 semaines, les préparations autoradiographiques développées sont colorées à l'hématoxyline-éosine.

Résultats et discussion. Les résultats montrent une différence très nette pour ce qui concerne le marquage entre cellules traitées à l'ATP et cellules témoin (Figures 1 et 2).

On constate (Tableau) que le nombre total de cellules marquées après incubation en présence de DNA-H³ est pratiquement le même pour les cellules traitées à l'ATP (64,3%) que pour celles non traitées (55,4%).

Chez les cellules activées l'incorporation du marqueur paraît de loin plus importante. Nous avons distingué deux classes de cellules: une à marquage fort (plus de 60 grains par noyau) et une à marquage faible (moins de 60 grains par noyau).

La première classe comprend 42% de cellules activées et 1% seulement de cellules témoin. La seconde comprend

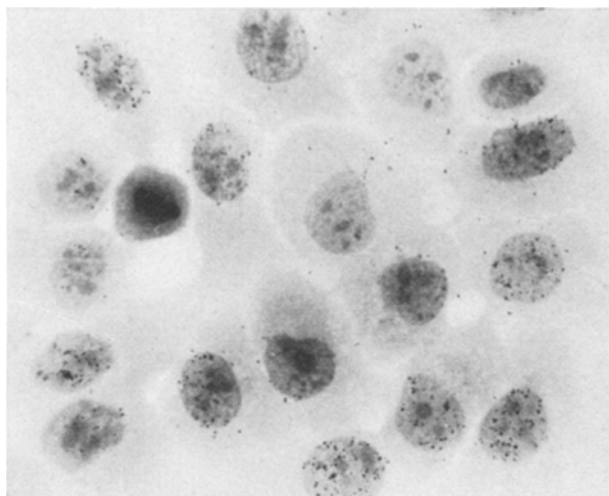


Fig. 1. Autoradiographie de cellules HeLa incubées pendant 10 min en présence d'une solution de DNA-H³ (*E. coli*), à la concentration de 150 µg/ml à haute activité spécifique ($2,2 \cdot 10^6$ dpm/µg) (Témoins).

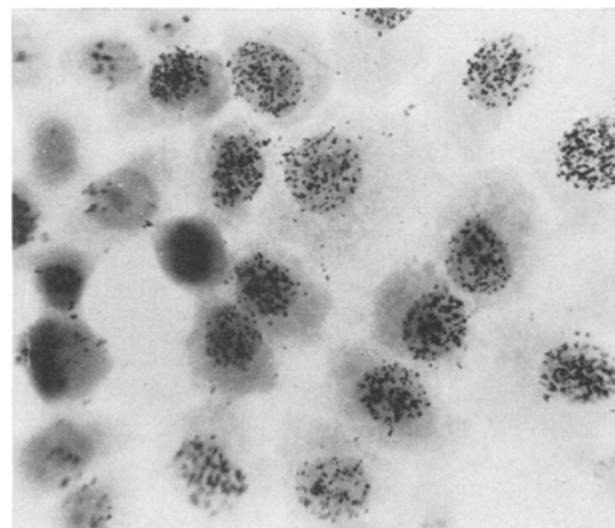


Fig. 2. Autoradiographie de cellules HeLa traitées avec une solution d'ATP (2 mg/ml) puis mises en contact avec une solution de DNA-H³ (*E. coli*), dans les mêmes conditions que la Figure 1 (Activées).

- ¹ S. M. GARTLER, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 3, 127 (1960).
- ² M. R. CHORAZY, H. H. BALDWIN, et R. K. BOUTWELL, *Fed. Proc. Am. Soc. exp. Biol.* 19, 307 (1960).
- ³ E. BORENFREUND et A. BENDICH, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 81 (1961).
- ⁴ K. G. BENSCHE et D. W. KING, *Science* 133, 381 (1961).
- ⁵ T. WILCZOK, *Neoplasma* 9, 369 (1962).
- ⁶ C. COCITO, A. PRINZIE, et P. DE SOMER, *Experientia* 18, 218 (1962).
- ⁷ S. MEIZEL et E. R. M. KAY, *Biochim. biophys. Acta* 103, 431 (1965).
- ⁸ J. E. ADAMS, W. E. MARTIN et C. M. POMERAT, *Tex. Rep. Biol. Med.* 23, 191 (1965).
- ⁹ L. LEDOUX, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Ed., J. N. DAVIDSON et W. E. COHN; Academic Press, New York 1965), vol. 4, p. 231.
- ¹⁰ M. C. LONI, observations non publiées.
- ¹¹ A. GROPP, *Cinematicography in Cell Biology* (Ed., G. C. ROSE; Academic Press, New York 1963), pt. III, p. 279.
- ¹² J. MARMUR, *J. mol. Biol.* 3, 208 (1961).
- ¹³ L. G. CARO et R. P. VAN TUBERGEN, *J. Cell Biol.* 15, 173 (1962).

21% de cellules activées et 54% de cellules témoin. Ces observations semblent montrer que l'ATP accélère le processus d'absorption du DNA-H³ exogène.

Ces résultats de même que les expériences de ADAMS⁸ et les travaux de GROPP¹¹ sur l'effet de l'ATP semblent appuyer l'hypothèse d'une relation étroite entre pinocytose et absorption du DNA¹⁴.

	Cellules activées*	Cellules témoin
Fort marquage ($n > 60$)	42,7%	1%
Faible marquage ($n < 60$)	21,6%	54,4%
	64,3%	55,4%

* Plus de 800 cellules ont été examinées pour chaque cas. n = nombre de grains par noyau. Un marquage inférieur à 10 grains par cellule n'a pas été pris en considération.

Summary. Cultures of HeLa cells treated with ATP show an increased uptake of DNA-H³ for a short period of treatment. In the light of GROPP's findings on pinocytosis activation, it is tempting to suppose that the stimulation of DNA-uptake by ATP is mediated through an activity of the latter on pinocytosis.

M. C. LONI

Section de Biochimie Cellulaire, Département de Radiobiologie, C.E.N.-S.C.K., Mol (Belgique), June 21, 1966.

¹⁴ Tous nos remerciements vont au Dr A. BILLAU et à Mademoiselle F. CORNETTE (Rega Institut, Louvain) qui nous ont procuré les cellules HeLa utilisées dans ces expériences et à Mr. P. CHARLES (Département de Radiobiologie, C.E.N.-S.C.K., Mol) pour le DNA-H³. Travail effectué dans le cadre du contrat Euratom-CEN N° 053-64-3 BIOB.

Enhancement of Oxidation Products of Lipids in Liver Mitochondria of Whole-Body Irradiated Rats

There have been many reports on the early and mostly reversible damage of the structural and morphological integrity of rat liver mitochondria after whole-body X-irradiation. The observed changes appear very early, are of transient character, and are soon reconstituted up to the pre-irradiation level. The irradiated mitochondria still keep their repair ability. Thus the significant depression in total mitochondrial count per liver was observed very early in post-irradiation and returned to the normal level within 6 h and kept the normal range through 48 h post-irradiation¹. Similarly the increased rate of oxidative phosphorylation was restored to the normal level 24 h after whole-body irradiation². The elevated lability of isolated mitochondria is demonstrated by swelling, lysis, and disintegration. From this point of view, the observed correlation between swelling, lysis and mitochondrial lipid peroxidation³⁻⁵ is very interesting. It is very probable that the primary cause of mitochondrial disintegration is the peroxidation of unsaturated fatty acids, which are present in the mitochondria in a relatively high concentration and form the special functional component of phospholipid-protein complex of mitochondrial membranes and crista.

According to the well-known toxic effects of peroxides, their higher solubility and their many inhibitory properties to various enzymes, it is possible to suppose an important role in primary radiation changes⁶.

We have estimated the effect of whole-body X-irradiation on the oxidation products of lipid mitochondria at various time intervals after exposure to 1400 r (Macrophos 250, 235 kV, 14 mA, 0.5 mm Cu, 1 mm Al, dose rate 70 r/min). The groups of male rats weighing 160–180 g were irradiated and killed at time intervals of 0, 3, 6, 12, 24 and 48 h after the irradiation. For 12 h before they were killed, the animals were left without food. The isolation of mitochondria was performed according to

HOGEBROOM⁷, and the final suspension was washed twice with isotonic NaCl (0.15 M NaCl + 0.02 M Tris pH 7.4). The concentration of the mitochondrial suspension was done at a protein content (bovine albumin – Mann) of 1 mg/ml of final mitochondrial suspension. Protein was determined by the biuret method⁸. Lipid peroxide was measured by the thiobarbituric acid colour test (TBA₅₂₅) after aerobic incubation in a Dubnoff shaker in the following manner: an amount of 4 ml mitochondrial suspension was put into a flask of about 25 mm diameter and incubated at 37°C and simultaneously shaken. At time intervals of 15, 30, 60, 120, and 180 min, a sample of 0.5 ml was taken for TBA colour reaction in the following solution: 0.5 ml of incubated suspension + 0.5 ml isotonic saline + 1 ml 5% TCA + 1 ml 1% TBA. The mixture was heated for 10 min in a boiling water bath, cooled, centrifuged, and the clear supernatant directly measured (spectrophotometer CF 4 SB Optica, 525 nm).

The following observations were made. At zero time interval after the whole-body irradiation, the amount of TBA chromogen in mitochondria was elevated. The enhancement was statistically significant up to 6 h after irradiation; after this period the level returned to normal control value (Figure 1).

The production of TBA chromogen is linear, depending on the incubation time. The initial values after 15 min

¹ P. P. NOYES and R. E. SMITH, *Expl Cell Res.* 16, 15 (1959).

² J. C. HALL, A. L. GOLDSTEIN, and B. P. SONNENBLICK, *J. biol. Chem.* 238, 1137 (1963).

³ F. E. HUNTER, J. WEINSTEIN, A. A. SCOTT, and A. K. SCHNEIDER, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 17, 456 (1963).

⁴ A. A. SCOTT and F. E. HUNTER, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 17, 461 (1963).

⁵ F. E. HUNTER, A. SCOTT, P. E. HOFFSTEN, J. M. GEBICKI, J. WEINSTEIN, and A. SCHNEIDER, *J. biol. Chem.* 239, 614 (1964).

⁶ E. D. WILLS, *Biochem. Pharmacol.* 7, 7 (1961).

⁷ G. H. HOGEBROOM, in *Methods in Enzymology* (Ed. S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN; Academic Press, New York 1955).

⁸ E. E. JACOBS and M. JACOB, *J. biol. Chem.* 223, 147 (1956).