

UNIVERSITE PAUL SABATIER
(TOULOUSE III)

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

rapport de stage

Maître de stage : M^r le Professeur Ph. COURRIERE

**Effet cytotoxique des produits FeFLNT₄ , ZnFLNT₄ & FeFLNT₄La
sur des cellules humaines tumorales**

Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales

Certificat de biochimie spécialisée

Travail effectué au laboratoire de culture cellulaire du Centre Claudius Régaud
Avec la coopération d' Anne -Marie JULIA
par C. PEZE
du 21/06 au 28/07 1993

I. INTRODUCTION.

L'objet de cette manipulation a été l'étude de la cytotoxicité de produits mis au point à l' Institut de Recherche et de Traitement des Eléments Naturels (IRTEN) dirigé par le Dr Assoun.

Cette étude a été réalisée sur deux lignées cellulaires tumorales humaines : A549 & MCF7.

II. METHODES ET DOSAGES .

* Milieu de culture.

Il s'agit d'un milieu RPMI 1640 de chez GIBCO BRL additionné de 5 ou 10 % de sérum de veau foetal (SVF) stérile provenant de chez TechGen.

—Composition.

Acides aminés : arginine(HCl), asparagine, acide aspartique, cystéine(HCl), glutamine, acide glutamique, glycine, histidine, hydroxyproline, isoleucine, leucine, méthionine, lysine(HCl), phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tryptophane, tyrosine (sel disodique) et valine.

Vitamines : biotine, pantothénate de calcium D, chlorure de choline, acide folique, i-inositol, nicotinamide, acide para-aminobenzoïque, pyridoxine (HCl), riboflavine, thiamine (HCl), vitamine B₁₂.

Sels inorganiques : $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KCl, MgSO_4 (anhydre), NaCl, Na_2HPO_4 (anhydre).

Autres composants : D-Glucose, Glutathion (réduit), rouge de phénol.

—Obtention.

La dissolution de la poudre RPMI 1640 à raison de 10,4 g/l est réalisée dans de l'eau ultrapure puis ajout du Na_2CO_3 à raison de 2g/l.

Il faut ensuite ajuster le pH à 7,4 à l'aide d'HCl 1N, il ne reste plus alors qu'à effectuer une filtration stérilisante sur filtres Nalgene 0,2µm et à rajouter le sérum SVF stérile.

—Conservation.

Le milieu est conservé au congélateur ou au réfrigérateur lors de l'utilisation.

* Cellules.

—MCF7.

Ce sont des cellules de carcinome mammaire humain.

—A 549.

Ce sont des cellules issues d'un carcinome pulmonaire humain.

* Méthode de culture.

—Repiquage.

- . aspiration du vieux milieu de culture
- . lavage des cellules par 2 ml de PBS
- . décollement des cellules par action de la trypsine/EDTA en solution à 0,05% de chez Séromed : 1 ml au contact pendant 30 s
- aspiration de la trypsine
- 3 minutes de durée d'action
- . neutralisation de la trypsine par ajout de 2 ml de milieu de culture (protéines du sérum bloquent l'enzyme)
- . passage au Coulter afin de déterminer le volume à prélever pour ensementer avec 400.000 cellules.
- . prélèvement du volume requis et ajout de 5 ml de milieu
- . incubation en atmosphère humide à 5% de CO₂ et à 37°C.

Les cellules A 549 sont en général repiquées deux fois par semaine, le rouge de phénol contenu dans le milieu est un repère : il vire du rouge au jaune au fur et à mesure que le milieu s'acidifie.

La culture a lieu dans des flacons Nunclon T25 (25 cm²) de chez Nunc InterMed.

— Culture sur plaque 96 puits.

Effectuée sur plaques Nunclon, elle est identique à la culture sur T25.

Chaque puit contient 200 µl de milieu, le nombre de cellules ensemencées dans chaque puit sera étalonné pour chaque lignée cellulaire.

— Culture sur une plaque 6 puits.

La culture est pratiquée sur plaque Nunclon, chaque puit étant de 12,5 cm².

Elle est identique à celle effectuée sur flacon T25.

* Etablissement des courbes de croissance des lignées cellulaires.

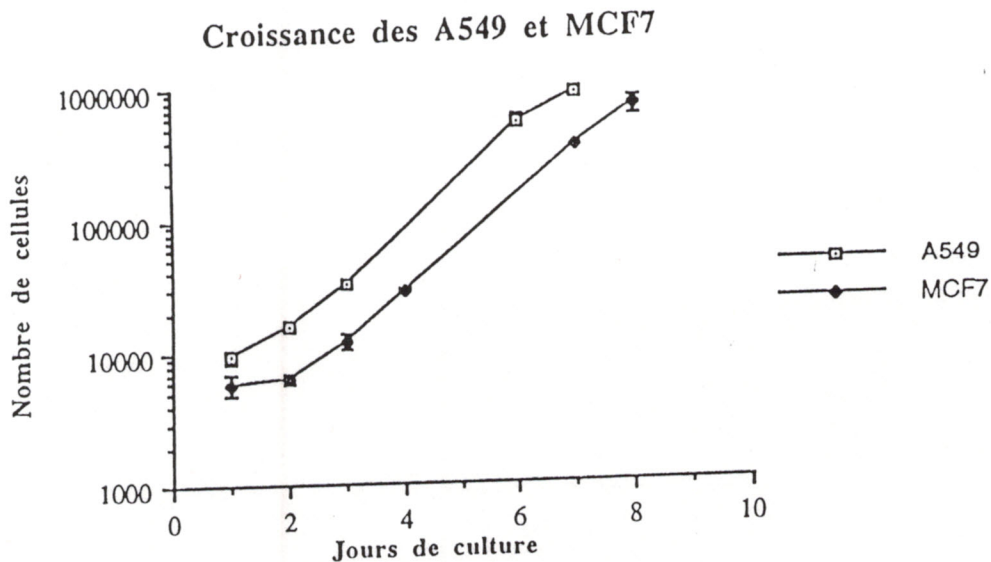
Elle est réalisée par culture sur plaques 6 puits à partir d'un ensemencement initial de 10000 cellules par puits

Deux plaques sont ensemencées par un même type cellulaire ,chaque jour le nombre de cellules est évalué en double.

Le temps de doublement est déterminé par la formule:

$$D = (\ln t_x * 3,3219 - \ln t_y * 3,3219) / (x - y)$$

issue de la publication parue dans Methods in enzymology vol. 58 p150



Pour le calcul du temps de doublement il faut nous placer dans une zone linéaire de la courbe ,soit :

_ pour A549 entre 48 et 72 heures, ce qui donne un temps de doublement de 22 Heures environ.

_ pour MCF7 entre 48 et 72 heures , ce qui donne un temps de doublement de 27 heures environ.

Le temps de latence pour démarrer la croissance de ces deux lignées est de 24 heures.

On attendra donc 24 heures après l'ensemencement avant d'effectuer tout test sur les lignées.

Il est nécessaire de déterminer le temps de doublement de chaque lignée car le test SRB nécessite une culture sur trois temps de doublement.

Nous avons utilisé un test non clonogénique consistant en la coloration des protéines cellulaires par la sulforhodamine B (SRB).
La SRB est un colorant anionique avec un groupement sulfonique qui se lie électrostatiquement aux résidus basiques des acides aminés des protéines dans des conditions acides.

Ce colorant est extrait des cellules et solubilisé par une base pour être mesuré optiquement.

Cette technique est parue dans le Journal of the National Cancer Institute , Vol. 82, No 13 p1107-1112 ,July 4 1990 : 'New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening ' par Skehan & coll..

α. Ensemencement des cellules.

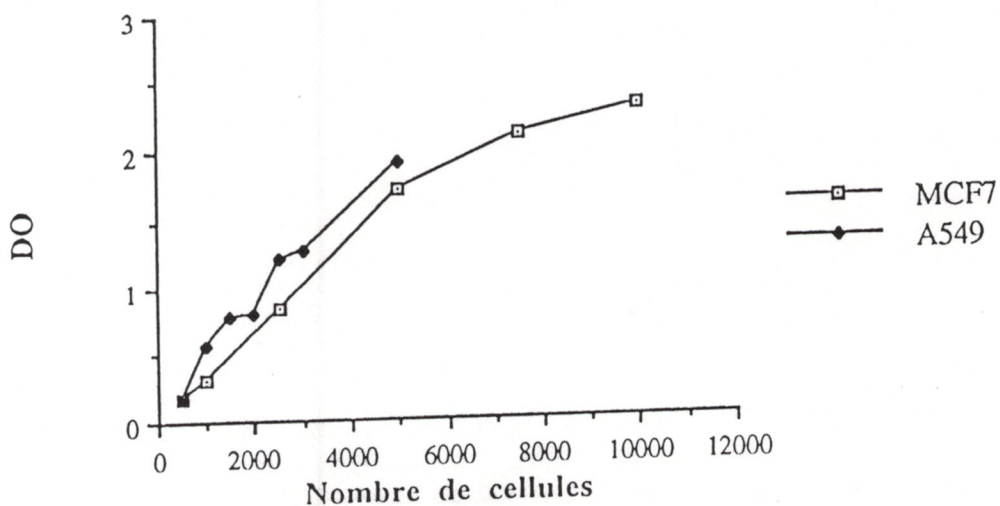
Il est effectué dans 150 ou 200 μ l de milieu RPMI 5% SVF par puit ,afin de diminuer la quantité de protéines dans le milieu , minimisant ainsi le risque d'interférences .

Le traitement aura lieu 24 heures après et la coloration SRB après trois temps de doublement.

Le nombre de cellules à ensemenecer par puits sera étalonné en fonction de la lignée utilisée afin d'obtenir une DO maxi de 1.

Une plaque avec différentes concentrations cellulaires est ensemencée, ceci afin de choisir la quantité de cellules par puit optimale avec cette technique.

Détermination du niveau d'ensemencement pour le test SRB



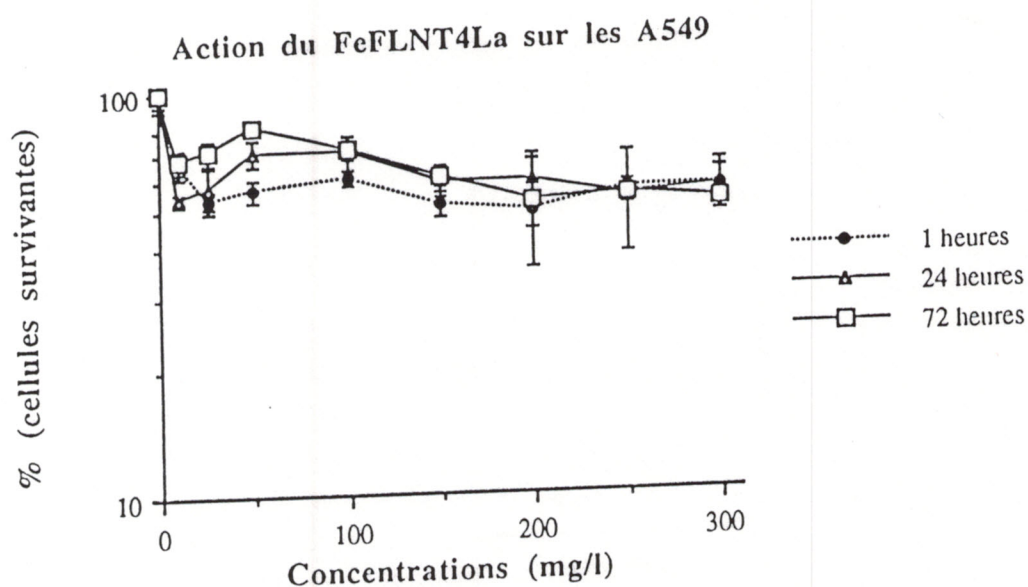
Nous ensemencerons donc les plaques à raison de 3000 cellules par puits.

III RESULTATS.

1. FeFLNT₄La.

Ce produit a été ajouté aux plaques préalablementensemencées depuis 24 heures ,la dilution du produit est laissée en contact 1 ,24 ou 72 heures puis est enlevé et remplacé par 150 µl de milieu frais.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules survivantes calculé par rapport aux cellules témoins traitées identiquement mais ne recevant pas de produit. Chaque manipulation a été réalisée en triplicate , à chaque fois la valeur obtenue pour une concentration donnée est issue de la moyenne de six puits. L'effet du FeFLNT₄La est observé sur les courbes de survie cellulaire suivantes :



β . Traitement

Au plaques ensemencées depuis 24 heures 50 µl de différentes dilutions du produit par puit sont donc ajoutées.

Ces dilutions sont réalisées dans le même RPMI 5% SVF que lors de l'ensemencement.

Les produits sont rendus stériles par filtration à travers un disque Minisart NML de 0,2 µm provenant de chez Sartorius.

Les produits nous ont été fournis à des concentrations de 493 mg/l pour le FeFLNT₄, 521 mg/l pour le FeFLNT₄La et 600 mg/l pour le ZnFLNT₄.

La gamme de concentrations réalisée va de 10 à 350 mg/l.

γ . Fixation des cellules.

Doit être effectuée après 72h d'incubation :

- ajouter 50 µl de TCA 50% à 0°C
- incuber 1h à 4°C
- vider le milieu dans l'évier
- rincer la plaque cinq fois sous l'eau du robinet
- sécher à l'air

δ . Coloration par le SRB (colorant anionique).

- ajouter 50 µl de SRB à 0,4% dans de l'acide acétique à 1%
- incuber 30 mn à température ambiante
- laver rapidement à l'acide acétique, et ce 4 fois
- sécher à l'air (ou ventilateur)
- ajouter 150 µl de Tris base 10 mM (pH 10,5)
- agiter 5mn sur agitateur
- lecture de la DO à 540 nm

ε . Solutions.

Toutes ces quantités sont nécessaires au dosage d'une plaque.

- TCA 50% (acide trichloracétique).

Dissoudre 5g de TCA dans de l'eau distillée, qsp 10 ml, à 4°C.

- SRB 0,4%.

0,04 g de sulforhodamine B Sigma S9012 dans de l'acide acétique à

1%, qsp 10 ml.

- Tris base 10 mM.

121,1 mg de tri (hydroxyméthyl)aminométhane non tamponné dans

de l'eau distillée, qsp 100 ml.

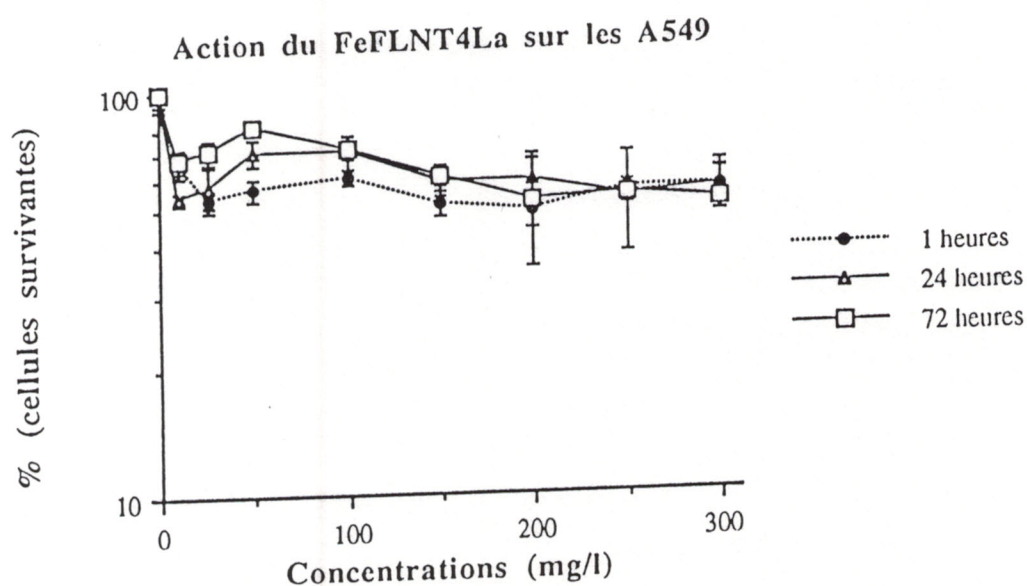
Ajout NaOH 5N pour amener le pH à 10,5.

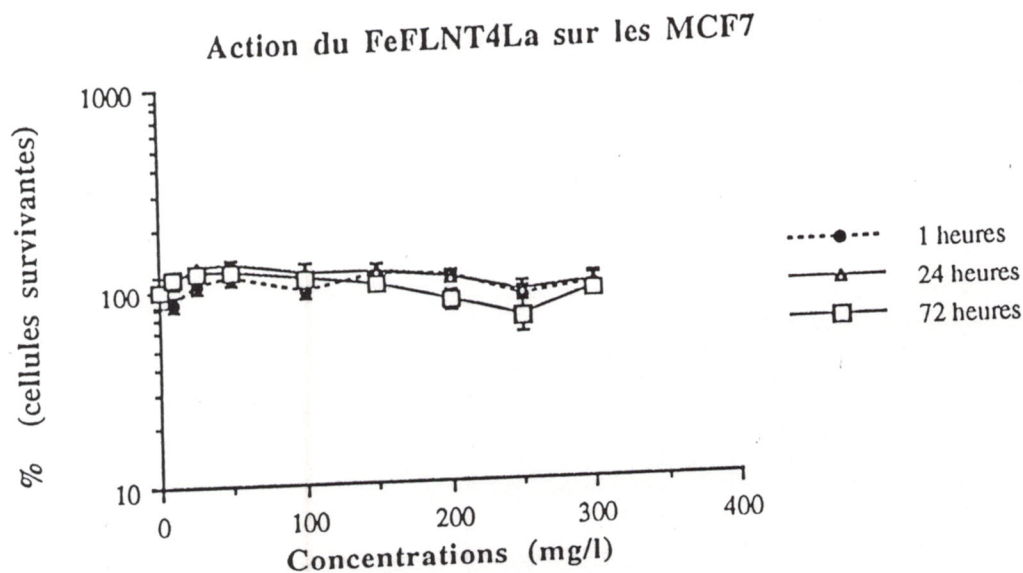
III RESULTATS.

1.FeFLNT₄La.

Ce produit a été ajouté aux plaques préalablement ensemencées depuis 24 heures ,la dilution du produit est laissée en contact 1 ,24 ou 72 heures puis est enlevé et remplacé par 150 μ l de milieu frais.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules survivantes calculé par rapport aux cellules témoins traitées identiquement mais ne recevant pas de produit. Chaque manipulation a été réalisée en triplicate , à chaque fois la valeur obtenue pour une concentration donnée est issue de la moyenne de six puits. L'effet du FeFLNT₄La est observé sur les courbes de survie cellulaire suivantes :



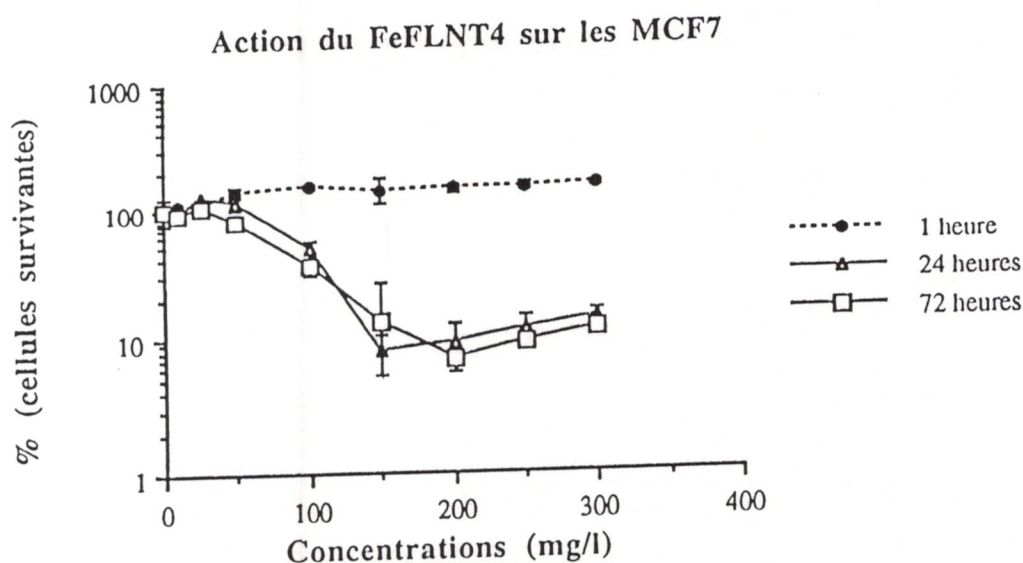
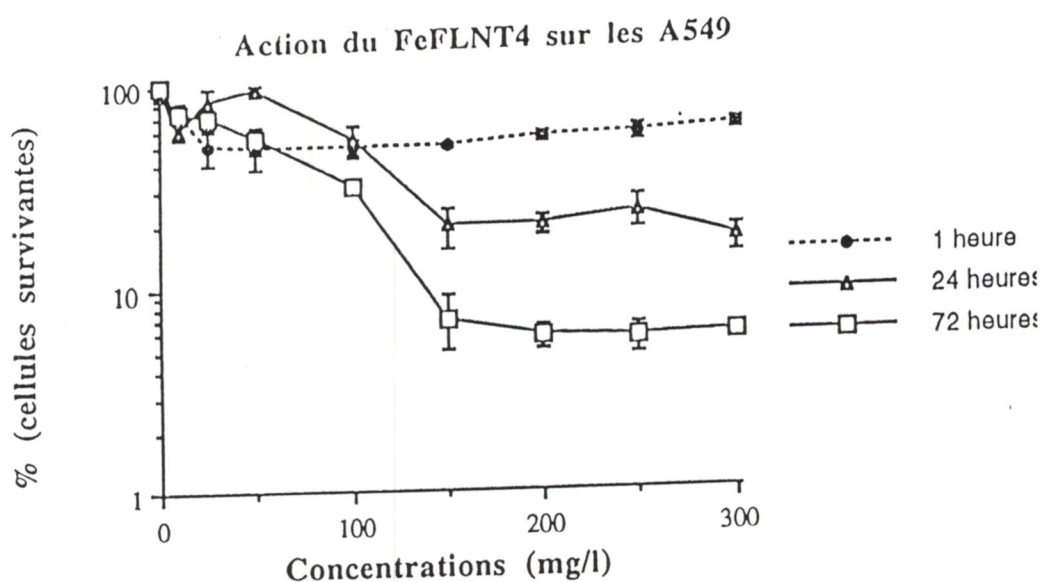


Il semble donc que ce produit ,le FeFLNT4La, n'ait aucune activité cytotoxique notable à l'égard de la lignée d'adénocarcinome mammaire (MCF7), à faible concentration il induirait une stimulation de la croissance de ces cellules .

En ce qui concerne les A549 une diminution de la survie cellulaire (30% de baisse en moyenne quel que soit le temps d'incubation) est observée pour de faibles concentrations de FeFLNT4La : l'effet cytotoxique n'est pas dose dépendant.

2. FeFLNT4.

La technique utilisée est identique à la précédente , les courbes de survie cellulaire sont les suivantes :



En ce qui concerne les A549 l'activité moyenne du FeFLNT4 est croissante en fonction du temps d'incubation.

Les courbes obtenues permettent de déterminer l'index de cytotoxicité 50% (IC50=concentration pour laquelle 50 % de la population cellulaire survit).

Les IC50 de la population A549 sont de 75 & 110 mg/l pour 72 & 24 heures d'incubation respectivement.

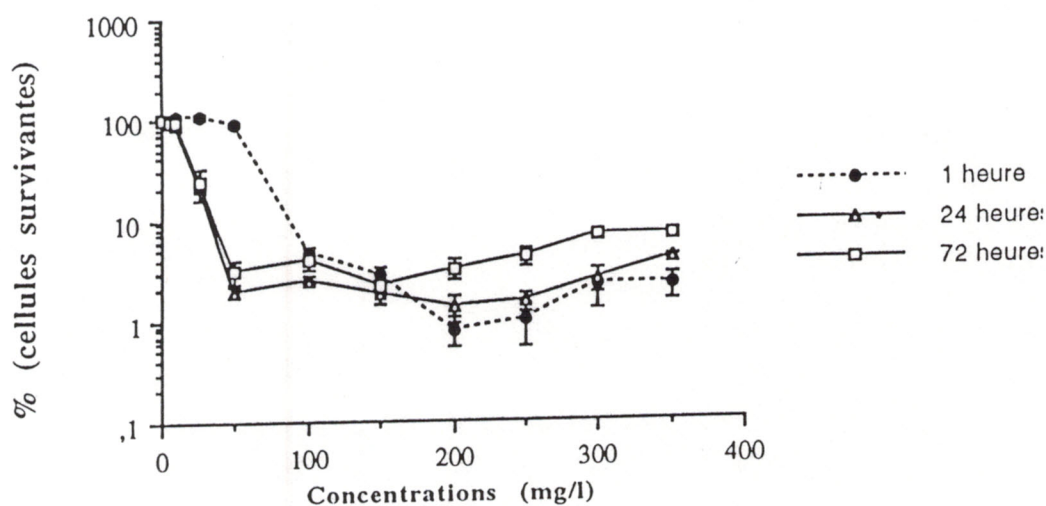
Au delà d'une concentration de 150 mg/l aucune augmentation de l'effet cytotoxique n'est obtenue, quelle que soient les conditions de traitement des cellules.

L'activité du FeFLNT₄ sur la lignée MCF7 est équivalente en ce qui concerne les temps d'incubation 24 & 72 heures (IC₅₀ 100 mg/l dans les deux cas). Aucune cytotoxicité n'est remarquée après une incubation d'une heure.

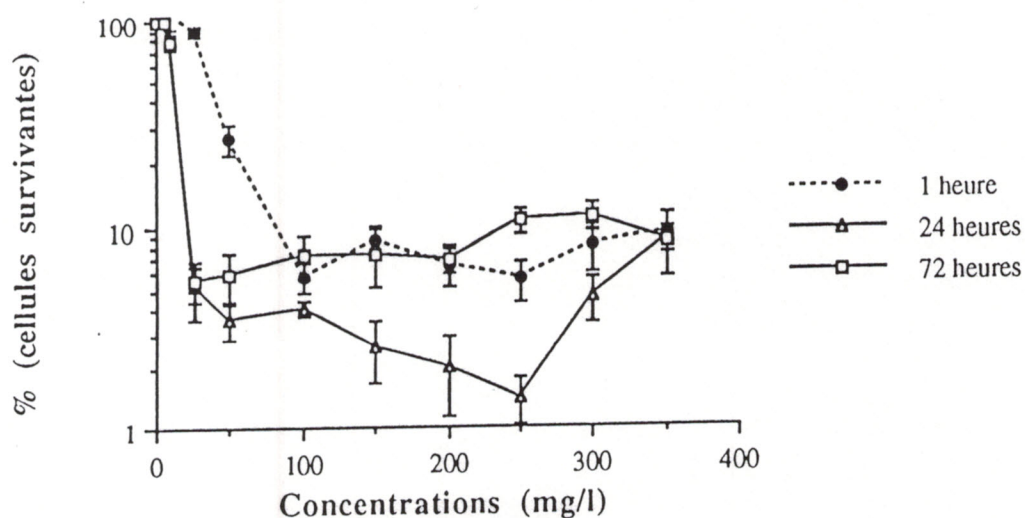
3. ZnFLNT₄.

La technique utilisée est identique à la précédente ,voici les courbes de survie cellulaire :

Action du ZnFLNT₄ sur A549



Action du ZnFLNT₄ sur les MCF7



Pour les A549 le ZnFLNT4 a une action pratiquement identique dans les hautes concentrations quelle que soit la durée d'incubation.

L'addition de produit au delà de 100 mg/l n'augmente pas la cytotoxicité.

Par contre à faible concentration on peut observer une cytotoxicité beaucoup plus intense avec une incubation de 24 ou 72 heures. Les IC50 sont de 75, 25 & 20 mg/l respectivement pour 1, 24 & 72 heures d'incubation.

De même pour les MCF7 le produit à faible concentration est plus actif dans un temps d'incubation de 24 ou 72 heures par rapport à 1 heure.

Comme pour les A549 au delà d'une concentration en produit de 100 mg/l , l'augmentation de cytotoxicité est peu évaluable.

IV CONCLUSION.

Index de cytotoxicité 50% des produits testés sur les deux lignées cellulaires , en fonction du temps d'incubation (IC50 exprimée en mg/l).

Incubation	FeFLNT ₄ La	FeFLNT ₄	ZnFLNT ₄	FeFLNT ₄ La	FeFLNT ₄	ZnFLNT ₄
1 heure	ND	ND	75 mg/l	ND	ND	50 mg/l
24 heures	ND	110 mg/l	25 mg/l	ND	100 mg/l	15 mg/l
72 heures	ND	75 mg/l	20 mg/l	ND	100 mg/l	15 mg/l
A 5 4 9				M C F 7		

ND (Non Déterminé) quand il a été impossible de déterminer une IC50.

Les produits testés peuvent être classés suivant leur activité cytotoxique sur les lignées cellulaires :

$ZnFLNT_4 > FeFLNT_4 > FeFLNT_4La$

Une augmentation du temps d'incubation de 1 heure à 24 heures augmente considérablement la cytotoxicité des produits.

L'augmentation de ce temps d'incubation n'est pas liée à celui de la cytotoxicité.

L'activité des produits semble similaire sur les deux lignées cellulaires testées : adénocarcinomes pulmonaire et mammaire humains.

L'étude sur des cellules humaines normales type fibroblastes de peau n'a pu être réalisée car le test n'est pas adaptable à ces cellules.

I. Introduction	1
II Méthodes et dosages	1
* Milieu de culture	
* Cellules	2
* Méthodes de culture	
* Etablissement des courbes de croissance	3
* Test de cytotoxicité	6
III Résultats.....	6
1 FeFLNT4La	
2 FeFLNT4	7
3 ZnFLNT4	9
IV Conclusion	11

Je tiens ici à remercier le Pr. Ph. COURRIERE pour m'avoir confié cette étude réalisé avec l'IRTEN du Dr ASSOUN que je tiens aussi à remercier.

Je n'oublierai pas Anne-Marie qui m'a appris à manipuler et m'a judicieusement conseillé ,toujours au bon moment ainsi que tout le 3ème étage pour son accueil très chaleureux (merci Marie-Jo , Sylvie , Corinne , Suzanne , Alyssar , Etienne , André etc.....)