

*ETUDE COMPARATIVE DE LA
CYTOTOXICITE DE*

*FESO₄ (Fer Sulfate) / Fe (OH)₂ – Fe(OH)₃ Fer
Hydrate*

*Et Cuivre Gluconate / Cuivre Hydrate
Cu (OH)₂*

Directeur de l'étude : M.F. HARMAND (1991)

LABORATOIRE : LEMI « LABORATOIRE D'EVALUATION DES MATERIELS IMPLANTABLES »

Technopole Montesquieu – 33650 MARTILLAC

Cytotoxicité comparée FeSO_4 (Fer Sulfate) / $\text{FeOH}_2\text{-Fe(OH)}_3$ (Fer Hydrate)

1. PRINCIPE DE L'ETUDE

On teste la cytotoxicité (nombre de cellules vivante et nombre de cellules mortes) après une incubation de 72 heures au contact avec des cellules Balb 3T3 ensemencées à sous confluence, et les dilutions suivantes 95,10, 1, 0.1, 0.01 et 0.001% de chacune des solutions-mères fournies (100 $\mu\text{g/ml}$).

2. MATERIEL ET METHODES

a. La culture cellulaire

Des plaquettes multipuits (24 puits de 15,5 mm de diamètre) sont ensemencées avec des cellules Balb 3T3 (60^{ème} passage) à raison de 53000 cellules par puits (soit environ 28000 cellules/cm²) et cultivées pendant 24 heures en milieu de culture complet (500 μg d'IMDM supplémenté par 5% de sérum de Veau fœtal (SVF) en atmosphère humide contenant 5% de CO_2 à 37°C.

b. Préparation des solutions

Les solutions mères de FeSO_4 et Fe(OH)_3 à 100 mg/litre (ou 100 $\mu\text{g/ml}$) sont diluées à :

- 95% Solution mère 9.5 Vol
- SVF 0.5 Vol

Puis à 10, 1, 0.1, 0.01 et 0.001 % avec du milieu de culture complet (IMDM contenant 5% de SVF).

Nous avons donc des solutions contenant 95,10, 1, 0.1, 0.01 et 0.001 $\mu\text{g/ml}$ de FeSO_4 et Fe(OH)_3 . Le pH de chaque solution a été mesuré (cf tableau 1).

c. L'étude de cytotoxicité

Le milieu de culture des puits de culture préparés (voir a) a été enlevé et remplacé par les différentes dilutions de chacun des deux Fe, à raison de 6 puits par dilution et par produit.

On laisse incuber 72 heures au contact de la couche cellulaire à 37°C en atmosphère contenant 5% de CO_2 .

A la fin de la période d'incubation le milieu de culture est prélevé dans chaque puits et l'étude de la viabilité cellulaire réalisée par le « test au bleu Trypan » (procédure LEMI n°13.6) : 300 µg d'une solution de trypsine activée (0,1 % (p/v) dans du Hank's sans Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺) sont mis au contact de la couche cellulaire jusqu'au décollement total des cellules. On ajoute alors 300 µg d'une solution de bleu Trypan (0,2 % (p/v) dans du NaCl 0.15 M) et on laisse incuber deux minutes. Puis sous le microscope, en cellule de Malassez, on compte les cellules vivantes (non colorées) et les cellules mortes (colorées).

3. RESULTATS

a. Remarque concernant l'aspect des produits

- **Fe (OH)₃** : Présence d'un dépôt au fond du flacon, signalé par le fournisseur. Après agitation, on obtient un produit trouble de couleur orangée, pH 6,88.
- **FeSO₄** : Présence d'un dépôt au fond du flacon, moins important que celui observé pour Fe(OH)₃. Après agitation, le produit est légèrement trouble de couleur jaune pâle, pH 3,5.

b. Etude du pH des solutions-mères au contact des cellules

Le **tableau 1** présente ces résultats.

Le pH des solutions réalisées à partir de Fe (OH)₃ est en permanence voisin de la neutralité et ne doit pas poser de problèmes. Pour des solutions réalisées à partir de FeSO₄ seule la solution à 95 µg/ml est légèrement acide pH 6,3.

c. Etude de la cytotoxicité

Le **tableau 2** présente l'évaluation des cellules vivantes (nombre de cellules/cm²) après un contact de 72 heures avec les différentes solutions tandis que le **tableau 3** présente le nombre de cellules mortes.

Mesure du pH des différentes solutions

µg/ml	0	0,001	0,01	0,1	1	10	95	Solution mère 100
Fe (OH) ₃	7,48	7,58	7,54	7,63	7,62	7,58	7,50	6,88
Fe SO ₄	7,48	7,51	7,60	7,62	7,54	7,50	6,30	3,50

Tableau 1

- La dilution à 95 µg/ml contient la solution mère additionnée de 5% de SVF
- Les autres dilutions ont été réalisées avec le milieu de culture IMDM contenant 5% de SVF.

**Comptage des cellules vivantes
(Nombre de cellules/cm²)**

µg/ml							
	0	0,001	0,01	0,1	1	10	95
Fe (OH)₃	205000	190000	150000	205000	75000	70000	70000
	185000	200000	180000	220000	100000	18000	15750
	190000	185000	210000	175000	120000	23750	57500
	170000	125000	230000	185000	140000	35625	7500
	200000	220000	205000	165000	90000	18125	5000
	150000	200000	182000	280000	110000	30000	4000
Moyenne	183300±20400	186700±29700	192800±25600	205000±38200	105800±20900	32600±17900	26600±26700
Fe SO₄		182000	252000	174000	200000	100000	500
		168000	204000	222000	170000	160000	250
		189000	138000	174000	220000	165000	250
		300000	186000	168000	275000	130000	0
		274800	192000	210000	225000	135000	0
		234000	174000	168000	159000	100000	250
Moyenne	158100±34000	224600±49300	191000±34200	186000±21600	208200±38400	131700±2600	210±180

Tableau 2

**Comptage des cellules mortes
(Nombre de cellules/cm²)**

µg/ml							
	0	0,001	0,01	0,1	1	10	95
Fe (OH)₃	4250	50	1000	1000	3750	2500	500
	3500	750	500	750	2500	3000	5500
	750	3500	750	1250	1500	4000	250
	250	250	500	1000	1250	1500	1250
	3000	500	250	1250	1000	500	1750
	3250	2500	250	250	1250	2500	8500
Moyenne		1330±1220	540±270	915±345	1790±1035	2335±1105	2960±3025
Fe SO₄	1800	1800	1200	2100	3000	3000	31250
	2400	900	4200	1500	3500	2500	26250
	2400	3000	3600	1800	1000	750	37000
	3900	6600	1500	900	1250	1500	33750
	2700	21000	1200	2700	3250	1200	16250
	600	1200	1200	3600	1500	1500	27500
Moyenne	2400±1315	3950±2860	2150±1255	2100±865	2250±1020	1740±770	28665±6625

Tableau 3

i. Action de FeSO₄ (M=152)

Les doses de 0.001 ; 0.01 ; 0.1 et 1 µg FeSO₄/ml ou 0.00037 ; 0.0037 et 0.037 et 0.37µg Fe / ml n'ont pas d'action.

- Pas de stimulation d'inhibition significative de la prolifération cellulaire
- Pas de mort cellulaire augmentée significativement par rapport au témoin.

La dose de 10 µg FeSO/ml ou encore 3.7 µg Fe/ml diminue de 27% (P<0.001) la vitesse de prolifération cellulaires sans augmentation du taux de cellules mortes. On est donc en présence d'un effet cytotatique moyen.

La dose de 95 µg FeSO₄/ml ou encore de 35 µg Fe/ml agit différemment : toutes les cellulesensemencées sont mortes. On est donc en présence d'un effet cytotatique intense et global.

ii. Action de Fe (OH)₃/ml (M=107)

Les doses de 0.001 ; 0.01 ; 0.1 µg Fe (OH)₃/ml ou 0,00052 ; 0.0052 ; 0.052 µg Fe/ml n'ont pas d'action.

La dose de 1 µg Fe (OH)₃/ml ou 0.52 µg Fe/ml diminue de 43% (P<0.001) la vitesse de prolifération cellulaire sans modifier le taux de cellules mortes. On est en présence d'un effet cytotatique moyen.

Les doses de 10 et 100 µg Fe (OH)₃/ml ou 5.2 et 52 µg Fe/ml inhibent totalement la prolifération cellulaire puisqu'on est à la densité de départ, sans provoquer de mort cellulaire. C'est en effet cytotatique pur et intense.

iii. Etude comparative Fe (OH)₃ et Fe-Sulfate

Les résultats comparatifs sont présentés dans le **tableau 4**.

Pour les concentrations en **(Fe)** < 0.05 µg/ml (0.05mg/litre, aucun effet cytotatique ou de mort cellulaire n'est observable que l'on soit en présence de Fe Sulfate ou Fe 3+.

Pour des concentrations (Fe) < 5 µg/ML (5mg/l), les deux formes de Fe se comportent différemment :

- **Le Fe-Sulfate** est moyennement cytotatique pour 3,7 µg/ml, tandis que le Fe 3+ est lui aussi moyennement cytotatique pour une dilution dix fois moindre environ.
- Par contre pour une dilution très voisine (5,2 µg/ml) le Fe 3+ bloque totalement la prolifération cellulaire sans provoquer de mort cellulaire.

Il est intéressant de noter que le Fe-Sulfate tue toutes les cellules pour 37 µg/ml (37mg/litre) tandis que le Fe 3+ n'agit pas sur la viabilité cellulaire pour 52 µg/ml (52mg/litre) tout en étant cytotatique.

µg Fe SO₄/ml	0,001	0,01	0,1	1	10	100
µg Fe/ml	0,00037	0,0037	0,037	0,37	3,7	37
Effet cytotatique*	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	27 P<0,001	Pas de cellules
Mortalité cellulaire*	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	100 P<0,001
µg Fe/ml(OH)₃/ml	0,001	0,01	0,1	1	10	100
µg Fe/ml	0,00052	0,0052	0,052	0,52	5,2	52
Effet cytotatique*	N.S.	N.S.	N.S.	43 P<0,001	100 P<0,001	100 P<0,001
Mortalité cellulaire*	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Tableau 4

*% calculé par rapport au témoin

EN RESUME

En ce qui concerne la viabilité cellulaire, le Fer 3+ à 52 mg/litre n'exerce aucun effet cytotoxique tandis que le Fe-Sulfate tue toutes les cellules pour une concentration voisine de 37 mg/litre.

En ce qui concerne la prolifération cellulaire, le Fe 3+ bloque totalement cette prolifération pour 5,2 mg/litre, tandis que le Fe-Sulfate la bloque partiellement pour une dose voisine 3.7 mg/litre, c'est-à-dire exerce un effet cytotatique moindre. L'effet cytotatique apparait pour une dilution logarithmique de plus pour le Fe (OH)₃ et est dose-dépendant.

EN CONCLUSION

Si l'on considère que la cytotoxicité de base est définie par deux composantes :

- La viabilité cellulaire : effet léthal
- La prolifération cellulaire : effet cytotatique

On peut conclure que le Fe³⁺ est moins cytotoxique que le Fe-Sulfate car ne produisant aux concentrations utilisées aucun effet léthal.

Cependant, il exerce un effet cytotatique hautement significatif pour des doses dix fois moins importantes que le Fe-Sulfate : 0,52 µg Fe/ml au lieu de 3,7 µg Fe/ml, ce qui ne permet pas de conclure à une non cytotoxicité totale pour des doses égales ou supérieures à 0,52 µg Fe/ml.

Cytotoxicité comparée Cuivre Gluconate / Cuivre Hydrate

Directeur de l'étude : M.F. HARMAND (1989)

LABORATOIRE : INSERM U 306

146 Rue LEO SAINAT – 33076 BORDEAUX

Nous avons choisi de réaliser cette étude à l'aide de deux lignées cellulaires :

- La lignée HeLa, lignée issue d'un épithélioma de l'utérus humain
- Des ostéoblastes, issus d'os spongieux humain

Afin de voir l'action du Cu sur une lignée néoplasique humaine, et une lignée différenciée humaine.

Nous avons étudié l'action de 5 doses de chacune des formes Cu, sur la viabilité et la prolifération cellulaire, après 72 heures de contact.

1. MATERIEL ET METHODES :

a. Les cultures cellulaires :

- HeLa au 18^{ème} passage
- Ostéoblastes humains issus d'os iliaque (homme – 35 ans) – 3^{ième} passage.

b. Les doses utilisées :

Sachant que la quantité des fluides d'un individu de 65 kg est d'environ 15 litres, et que la dose per os journalière est de 700 µg de Cu, nous pouvons considérer que la dose correspondante « in vitro » est de l'ordre de 46,6 ng/ml.

Nous avons donc choisies 5 doses pour réaliser ce travail à des solutions mères fournies : 0,5 ; 5 ; 50 ; 500 et 1000 ng/ml de culture.

La solution mère de gluconate de cuivre était stérile. La solution mère d'hydrate de cuivre a été stérilisée aux rayons (Mrad).

Le protocole :

Les cellules HeLa sontensemencées à la densité cellulaire de 95000 cellules/cm² soit à sous confluence dans des puits de culture de 15,5 mm de diamètre. Lorsque l'attachement est complet (24 heures), les cellules sont mises en présence de différentes dilutions de Gluconate de Cuivre et d'Hydrate de Cuivre (0 soit le témoin : 0,5 ; 5 ; 50 ; 500 et 1000 ng/ml) à raison de 5 puits par dose.

72 heures après, les cellules vivantes attachées au fond des puits de culture sont détachées à la trypsine (0,2 % (p/v) dans du Hanks sans Ca⁺⁺ et sans Mg⁺⁺) et comptées dans un hemocytomètre.

Les ostéoblastes sontensemencées à la densité cellulaire de 35000 cellules/cm² soit à sous confluence. Le protocole ensuite identique au précédent.

Expression des résultats :

La moyenne de 5 mesure réalisées elles-mêmes en triple exemplaires est calculée et associée à l'écart type correspondant.

2. RESULTATS :

a. Lignée cellulaire HeLa :

- Gluconate de cuive : les doses 5, 50, 500 et 1000 ng/ml ne sont ni cytotoxiques (aucune mort cellulaire n'a été mise en évidence), ni cytostatiques (aucune inhibition statistiquement significative de la croissance cellulaire).
- La dose de 0.5 ng/ml a induit un résultat un peu surprenant. Elle n'est pas cytotoxique mais légèrement cytostatique (-18% $P < 0,05$).
- Hydrate de Cuivre : Les doses de 0.5 ; 5 ; 50 ; 500 ng/ml ne sont ni cytotoxiques, ni cytostatiques. Les différences observées ne sont pas statistiquement significatives.
-
- La dose de 1000 ng / ml est légèrement cytostatique (-14%) mais le résultat est peu significatif ($P < 0,10$).

b. Ostéoblastes humains :

- Gluconate de Cuivre : Les doses : 0,5 ; 5 ; 50 ; 500 ng/ml ne sont pas cytotoxiques mais légèrement cytostatiques, encore que statistiquement à la limite du significatif.
- La dose de 1000 g/ml est sans effet.
- Hydrate de Cuivre : Les doses 0,5 ; 5 ; 50 ng/ml ne sont ni cytotoxiques, ni cytostatiques :
- Les doses 500 et 1000 ng/ml ne sont pas cytotoxiques mais induisent un effet légèrement cytostatique : -18 % ($P < 0,05$) et -12% ($P < 0,05$) respectivement.

3. DISCUSSION :

La lignée cellulaire HeLa réagit de manière totalement opposée aux deux préparations de l'oligoélément Cu. Le Gluconate de Cuivre induit une légère inhibition de la prolifération cellulaire (-18%) pour la dose la plus faible (0,5 ng/ml) utilisée, tandis que l'hydrate de Cuivre induit une légère inhibition de la prolifération cellulaire (-14%) pour la dose la plus forte (1000 ng/ml) utilisée.

Les autres doses n'ont aucun effet ni cytotoxique, ni cytostatique.

La lignée d'ostéoblastes humains reproduit avec une plus grande sensibilité et donc une plus grande intensité, les résultats obtenus avec la lignée HeLa ; là aussi les effets sont opposés puisque pour le Gluconate de Cuivre, les doses de 0.5 à 500 ng/ml sont légèrement cytostatiques, tandis que pour l'hydrate de Cuivre, ce sont les doses de 500 et 1000 ng/ml qui sont légèrement cytostatiques.

Les deux composées contenant l'oligoélément Cu agissent certainement de manière totalement différente sur le métabolisme des deux types cellulaires utilisés. Une étude à plus long terme permettrait sans doute de mieux comprendre ces mécanismes.

Cependant l'action cytostatique observée est très légère et à la limite du significatif.

Nombre de cellules/cm²

Ostéoblastes humains

Dose ng/ml	0	0,5	5	50	500	1000
Gluconate de Cuivre	41900±4100	33400±2000	29400±3800	36000±8200	31300±5700	41100±2500
Hydrate de Cuivre	41300±2000	37000±3400	42000±2700	39000±2900	34000±1700	36300±2100

Tableau 1

Nombre de cellules/cm²

Ligne cellulaire HeLa

Dose ng/ml	0	0,5	5	50	500	1000
Gluconate de Cuivre	124000±12000	101000±6700	117000±12000	131000±5600	117000±12000	128000±10000
Hydrate de Cuivre	124500±17000	108000±21500	115500±14000	103500±12000	127000±23000	106500±2600

Tableau 2

CONCLUSION :

Nous ne pouvons conclure que dans les conditions de l'expérimentation, le Gluconate de Cuivre et l'hydrate de Cuivre ne sont ni cytotoxiques, ni cytostatiques, pour les doses étudiées encadrant la dose physiologique théorique de 50ng/ml.