

UNIVERSITE DE LIMOGES
Faculté de Pharmacie

ANNEE 1992

THESE N° 53

**Intérêt de l'albumine comme facteur
protéique dans les milieux de culture
définis**
**Application à la croissance cellulaire de
cellules cancéreuses mammaires MCF7
en lignée continue**

THESE

pour le

Diplôme d'Etat en Pharmacie

présenté et soutenu publiquement le 25 Novembre 1992

par

Isabelle DESPERT

née le 19 Février 1968 à Aubusson

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur NICOLAS..... Président
Monsieur le Professeur HABRIOUX Juge
Monsieur PAUFIQUE..... Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur **RABY**
- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur **GHESTEM** (1er Assesseur)
Monsieur **DREYFUSS**, Maître de Conférences (2ème Assesseur)

PERSONNEL ENSEIGNANT

* PROFESSEUR DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Microbiologie
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie
LEFORT DES YLOUSES Daniel	Pharmacie galénique
NICOLAS Jean Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
OUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A mes grand-parents,

à qui je dédie ce travail, qu'il soit pour eux le
témoignage de mon amour et la concrétisation des
sacrifices accomplis tout au long de ces années
d'étude.

A mes parents.

A ma soeur Christelle et Philippe

A Laurent,

pour ses encouragements et sa constante présence.

Que ce travail soit le témoignage de tout mon amour.

A toute ma famille.

A tous mes amis.

A notre Président de thèse,

Monsieur le Professeur NICOLAS,

Nous vous remercions de l'aide que vous nous avez
apporté en nous accueillant au sein de votre
laboratoire.

Nous vous sommes sincèrement reconnaissant d'avoir
accepté de juger notre travail.

A Monsieur le Professeur HABRIOUX,

Nous vous remercions de la gentillesse, de l'infinie disponibilité et des précieux conseils qui ont permis la réalisation et l'accomplissement de ce travail.

Trouvez dans ces quelques mots l'expression de notre profonde reconnaissance et le témoignage de notre amitié.

A Monsieur Paufique,

qui a permis l'élaboration de ce travail.

Nous vous remercions de votre aide technique et
d'avoir accepté de juger notre travail.

A Madame Elisabeth DURANDIERE-TANTER

Nous regrettons que vous n'ayez pu assister à cette soutenance.

Je vous remercie par ailleurs de m'avoir accueilli au sein de votre officine durant 3 étés consécutifs et de m'avoir prodigué de précieux conseils quant à mon futur travail d'officinal.

A Messieurs GIRAUD et NOIZAT,

Vous m'avez fait le plaisir de m'accueillir au sein de votre officine, au cours des stages de formation respectifs de 1^{ère} et 6^{ème} année pour parfaire mon métier de pharmacien.

A Madame Odile LOURADOUR-BLEU,

qui m'a permis d'approfondir mes connaissances tout en poursuivant mes études. Que cette thèse soit le témoignage de mon amitié et de ma reconnaissance.

A tout le personnel du service de virologie du
Laboratoire Départemental, pour son aide au cours de
nos manipulations, et tout particulièrement à
Geneviève DUBOST pour son amabilité, son
dévouement et ses conseils au cours de l'élaboration de
ce travail.

A Laurence BRUNET et Pierre GERMAIN,
pour notre collaboration mutuelle et leurs
encouragements.

A Susana FERREIRA,
pour sa gentillesse, son infinie disponibilité et son aide
technique.

**Intérêt de l'albumine comme facteur
protéique dans les milieux de culture
définis**

**Application à la croissance cellulaire de
cellules cancéreuses mammaires MCF7
en lignée continue**

PLAN

1ère partie :
LA CULTURE CELLULAIRE

I - Introduction

II - Les milieux de culture

2ème partie :
TRAVAUX EXPERIMENTAUX

MATERIELS ET METHODES

I - Cultures cellulaires

II - Conditions de travail - Stérilité

III - Préparation du milieu de culture

IV - Supplémentation du milieu de culture

V - Entretien de la souche MCF7

1- Préparation de la solution saline tamponnée au phosphate - EDTA : STP -
EDTA

2 - Préparation de la solution trypsine - EDTA (0,05 % - 0,02 %)

3 - Décollement des cellules MCF7

VI - Congélation des cellules MCF7

1 - Milieu de congélation

2 - Méthode de congélation

VII - Décongélation des cellules MCF7

VIII - Comptage des cellules

IX - Dosage de l'ADN

1 - Méthode au bromure d'éthidium

a - Principe

b - Les réactifs

c - Dosage de l'ADN

d - Gamme étalon

2 - Méthode du DAPI

a - Principe

b - Les réactifs

c - Dosage de l'ADN

d - Courbe étalon

RESULTATS

I - Croissance cellulaire en fonction de l'origine du sérum de veau

II - Croissance cellulaire en présence d'albumine

1 - Comparaison albumine pure - albumine grasse

2 - Comparaison albumine pure - sérum de veau foetal

III - Croissance cellulaire en fonction des différents facteurs

1 - Influence de l'albumine, insuline, transferrine, estradiol

2 - Influence du rouge de phénol

IV - Croissance cellulaire en fonction des différentes protéines

V - Croissance cellulaire en fonction de l'origine de l'albumine

VI - Croissance cellulaire en fonction de la concentration d'albumine pure

VII - Electrophorèse

DISCUSSION

I - Variabilité des sérums

II - Influence des facteurs

III - Variabilité de l'albumine

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES

ERRATA

Page 68 Figure 10 :

Lire : Concentration en B.S.A. (10mg/ml)

Page 76 Ligne 21

Lire "...limite la production de peroxydes et donc permet par conséquent la prolifération des cellules ..."

Page 63 Tableau x

Lire Globulines

1ère partie

LA CULTURE CELLULAIRE

I - Introduction

Depuis les travaux de GEY en 1933, aboutissant à l'accroissement de cellules tumorales *in vitro*, les techniques et les méthodes de cultures cellulaires se sont considérablement accrues et améliorées.

Elles ont permis de réaliser d'importants progrès aux niveaux biologique et médical, d'accroître nos connaissances sur les phénomènes physiologiques propres à la cellule tels que division, différenciation, vieillissement.

Elles permettent également en pharmacotoxicologie, d'étudier l'effet de médicaments sur la cellule et donc ainsi de développer le mécanisme d'action de certaines substances, mais aussi, d'établir le diagnostic de maladies telles que les anomalies génétiques en pré au postnatal, et de connaître l'expression cellulaire de certaines pathologies.

Enfin, la biopharmacie ou la production de différents produits à usage thérapeutique (hormone de croissance, insuline, interféron...), par les cellules animales en culture, entraîne un développement considérable des méthodes de culture et favorise leur essor.

Pour cela, il est donc nécessaire d'élaborer un milieu de culture, capable de reproduire aussi fidèlement que possible, *in vitro*, les conditions d'environnement que la cellule trouve *in vivo*. En effet, les cellules doivent être capables non seulement de se diviser, de se différencier mais aussi d'exprimer *in vitro* leurs métabolismes et fonctions spécifiques.

Ces milieux doivent donc être à la fois, vecteurs d'éléments nutritifs, et contribuer au maintien des constantes physico-chimiques afin que les cellules

retrouvent leurs conditions de vie *in vivo* et qu'elles puissent ainsi exprimer toutes leurs fonctions cellulaires.

II - Les milieux de culture (ADOLPHE M. 1988)

Ce sont d'abord des milieux de culture simples, tels que la lymphe ou le liquide d'ascite, qui ont été employés au stade précurseur de la culture cellulaire.

Puis une meilleure connaissance des différents facteurs responsables du maintien des fonctions cellulaires a permis l'évolution de la composition des milieux, et ceci grâce aux travaux d'Alexis CARREL et de BAKER.

Ainsi, on ajoute tout d'abord des substances énergétiques, telles que l'hydrolysate de caséine, des peptones, des vitamines à des solutions salines, en proportions variables, c'est la naissance **des milieux dits synthétiques**.

La composition de ces différents milieux varie selon les besoins des cellules étudiées mais aussi selon les auteurs : EAGLE, PARKER ou HAM présentent des milieux de composition variable mais somme toute, un certain nombre d'éléments essentiels reste constant (minéraux, métaux, glucose, acides aminés, vitamines).

Cependant, ces milieux dits "milieux de base", assurent seulement la survie des cellules *in vitro* . La prolifération et l'expression des différentes fonctions cellulaires en culture, nécessitent l'addition d'une certaine concentration de **sérum**, au milieu synthétique de base, ceci dans des proportions allant de 2 à 20 %.

On utilise des sérums d'origine humaine ou animale, d'individus jeunes, sachant que l'effet cytoestimulant global du sérum est inversement proportionnel à l'âge du donneur. Les plus fréquemment retrouvés sont : le sérum de veau, le sérum de veau nouveau-né, le sérum de veau foetal.

Les sérums sont des mélanges de composition extrêmement complexe qui contiennent des molécules intervenant sur l'adhérence et l'étalement des cellules à leur support, la morphologie cellulaire, la capacité proliférative, l'efficacité de

clonage, la différenciation, la transformation. Le déclenchement de la division cellulaire n'est possible qu'en présence d'un certain nombre de facteurs mitogènes, le plus souvent fournis par le sérum. Ces différents éléments ont un effet synergique cytoestimulant sur la croissance globale des cellules en culture.

Toutefois, la présence de sérum peut être un inconvénient, un facteur limitant lors de certains travaux.

En effet :

- les sérums d'animaux peuvent être contaminés par des virus, des bactériophages ou des mycoplasmes qui perturbent le métabolisme des cellules en culture ;

- les concentrations d'hormones et de facteurs de croissance, instables selon les lots à l'intérieur d'une même race de donneur, font varier le pouvoir prolifératif du sérum, et gênent par ailleurs les études de la régularisation des métabolismes en abaissant le nombre de récepteurs spécifiques de surface ;

- le sérum semble jouer un rôle dans la dédifférenciation cellulaire, lors de la culture à long terme.

De plus, l'approvisionnement en sérum revient à un prix relativement onéreux.

Devant toutes ces constatations et la faible reproductibilité de certains résultats, les chercheurs ont évolué vers la mise au point de milieux dépourvus de sérum, enrichis en facteurs rigoureusement contrôlés. Ces milieux synthétiques sans sérum sont appelés **milieux définis**.

Pour cela, différents constituants définis sont additionnés au milieu synthétique de base : il s'agit d'hormones, de facteurs de croissance, de protéines de transport, de facteurs d'attachement et de facteurs divers (Tableau I).

Tableau I : Divers constituants d'un milieu défini (FROGER B. et ADOLPHE M. 1988)

<i>Hormones et facteurs de croissance*</i>	
Insuline	0,1 – 10 µg/ml
Hydrocortisone	3 – 30 ng/ml
Progestérone	3 – 30 ng/ml
Estradiol	3 – 370 ng/ml
Hormone de croissance	50 – 500 ng/ml
Somatomédine	1 – 50 ng/ml
Hormone parathyroïde	1 ng/ml
EGF	1 – 100 ng/ml
FGF	1 – 100 ng/ml
NGF	1 – 10 ng/ml
PDGF	1 – 10 ng/ml
<i>Protéines de transport</i>	
Transferrine	0,5 – 100 µg/ml
Albumine sérique bovine	1 mg/ml
<i>Facteurs d'attachement</i>	
Fibronectine	2 – 10 µg/ml
Poly-L-lysine	0,1 mg/ml
<i>Facteurs nutritifs divers de bas PM</i>	
Sélénium	5 ng/ml
Putrescine	10 ng/ml
Acide ascorbique	10 µg/ml

* Les concentrations données dans ce tableau à titre d'exemple sont à adapter au type cellulaire. Il est également important de tenir compte du degré de pureté des substances choisies.

Bien sûr, l'addition de ces substances varie en fonction des exigences du type cellulaire et de sa sensibilité aux différents éléments (Tableau II).

**Tableau II : Sensibilité de différents types de cellules aux divers constituants
d'un milieu défini (BARNES et SATO, 1979)**

Hormones	Concentration	Responsive Cell Lines
Insulin	0.1-10 µg/ml	All Lines
Glucagon	0.05-5 µg/ml	HC84S, HLE222, (MDCK)
Follicle Stimulating Hormone	0.05-0.5 µg/ml	M2R, TM4
Growth Hormone	0.05-0.5 µg/ml	TM4
Somatomedin C or MSA*	1-100 ng/ml	GH ₃ , TM4, (SV-3T3)
Epidermal Growth Factor	1-100 ng/ml	Hela, MCF-7, TM4, HC84S, HLE222, BHK, (MDCK)
Fibroblast Growth Factor	1-10 ng/ml	GH ₃ , Hela, C6, ZR-75-1, BHK, (MDCK)
Nerve Growth Factor	1-10 ng/ml	M2R
Parathyroid Hormone	1-10 ng/ml	GH ₃
Thyrotropin Releasing Hormone	1-10 ng/ml	GH ₃
Luteinizing Hormone Releasing Hormone	1-10 ng/ml	M2R
Prostaglandin F _{2α}	1-100 ng/ml	MCF-7
Prostaglandin E ₁	1-100 ng/ml	MDCK
Triiodothyronine	1-100 pM	GH ₃ , MDCK, ZR-75-1, HC84S, HLE222
Hydrocortisone	10-100 nM	Hela, MDCK, ZR-75-1, RF-1, HC84S, L6
Progesterone	1-100 nM	B104, (M2R)
Testosterone	1-10 nM	M2R
Estradiol	1-10 nM	ZR-75-1, (MCF-7)
Binding Proteins		
Transferrin	0.5-100 µg/ml	All Lines Except L6
Fatty-Acid-Free Albumin ^b	0.5-2 mg/ml	SV-3T3, C6
Attachment Factors		
Cold-Insoluble Globulin	0.5-5 µg/ml	B104, MCF-7, RF-1, F9, HLE222, BHK, SV-3T3
Serum Spreading Factor	0.5-5 µg/ml	MCF-7, C6, (SV-3T3), (RF-1), (F9), (Hela)
Fetuin	1 mg/ml	L6

Ces milieux synthétiques définis, bien adaptés au type cellulaire étudié, permettent dans la plupart des cas une augmentation de la capacité proliférative et de l'efficacité de clonage. Par ailleurs, un des rôles très importants des milieux définis serait de favoriser le maintien des fonctions différenciées.

L'utilité de ces milieux synthétiques définis, repose aussi dans le fait qu'ils permettent l'étude de l'interaction d'hormones ou de médicaments avec la cellule et donc d'élucider des mécanismes d'action physiologiques ou thérapeutiques. Ils apportent aussi, une meilleure connaissance des besoins hormonaux et nutritionnels nécessaires à la division et à la différenciation telles qu'elles se produisent *in vivo*.

Au laboratoire, le modèle étudié est une lignée de cellules cancéreuses mammaires MCF7 (SOULE et al. 1973). Ces cellules ont la particularité d'être oestrogénodépendantes c'est à dire que l'estradiol stimule leur prolifération.

Le sérum de veau foetal contenant un certain nombre d'hormones en quantité variable, il est donc nécessaire d'éliminer ces hormones sériques si on veut étudier leur action. Pour réaliser cette opération différentes techniques ont été utilisées : la dialyse ou bien l'absorption sur charbon destran. Si ces traitements éliminent certaines hormones, le milieu sérique reste quand même non défini. C'est pourquoi il est nécessaire de pouvoir utiliser un milieu bien défini, qui permette, une prolifération cellulaire correcte, ainsi que l'étude des interactions hormonales existantes dans ces cellules ainsi que les phénomènes de passages transmembranaires.

Dans ce travail nous allons étudier le volet protéique d'un tel milieu et plus particulièrement l'effet de l'albumine sur la prolifération cellulaire.

Dans une première partie, nous présenterons les détails techniques, puis dans une deuxième partie les résultats obtenus et enfin nous discuterons nos résultats.

2ème partie

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

MATERIELS ET METHODES

I - Cultures cellulaires

Les cellules MCF-7 nous ont été fournies par l'unité INSERM 204 de l'hôpital St Louis à PARIS. Il s'agit d'une lignée cellulaire hormonodépendante, issue d'une métastase pleurale d'un adénocarcinome mammaire apparu chez une femme ménopausée à l'âge de 69 ans en 1970 au MICHIGAN, USA (SOULE et al. 1973).

II - Conditions de travail - Stérilité

Les cultures cellulaires sont réalisées au sein du Laboratoire départemental (Pr. J.A. NICOLAS : LIMOGES).

Toutes les manipulations sont effectuées dans des conditions stériles sous hotte à flux laminaire (ADSO, France).

Les pipettes utilisées sont stériles et à usage unique (Stérilin 1 et 5 ml, Flacon 10 ml).

Les cultures se font dans :

- des flacons stériles de différentes tailles T25 ou T75 (Corning, USA),
- des boîtes 6 puits stériles.

Ils sont vidés à l'aide d'une pipette pasteur stérile fonctionnant avec une pompe à vide (Kurt NEUBERGER, France).

Les cellules sont cultivées dans un étuve Narco 5100 à CO₂ (5 % CO₂ et 95 % d'air humidifié).

III - Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture est préparé par fraction de 5 litres.

Un flacon de milieu de culture MEM (Gibco, réf. 72-1700) en poudre avec rouge de phénol est dissous dans 4,25 l d'eau pyrodistillée apyrogène Aqual (Biochrom, Angoulême réf. 1400-B), auquel on ajoute 11,9 g d'Hepes (Impérial Lab. réf. 5-762-72) dissous dans 100 ml d'eau pyrodistillée, 2,5 g de bicarbonate de sodium (Merck, réf. 6329) dissous dans 100 ml d'eau pyrodistillée et 50 ml d'acides aminés non essentiels (Gibco, réf. 43-1140H).

Le pH est ensuite ajusté à 7,7 à 20°C par addition d'environ 30 ml de NaOH 1N (Merck, réf. 9137) filtrée sur filtre 0,22 μm Sterivex-GS, (réf. SVGS 01015 Millipore, USA).

Le tout est agité doucement durant une heure.

Ce milieu de culture est ensuite stérilisé par filtration : pré-filtre non stérile 0,45 μm (réf. AP 200 4700) et filtre stérile 0,22 μm Sterivex - GS (réf. SVGS 01015 Millipore, USA) à l'aide d'une pompe péristaltique masterflex (Cole Parmer Instrument Co, USA), et fractionné en flacons de 450 ml.

Ces flacons sont stockés en chambre froide à -4°C et utilisés dans le mois qui suit leur préparation.

Le contrôle de stérilité est effectué par stockage des premiers et derniers 50 ml filtrés, à 37°C pendant la semaine précédant l'utilisation du milieu de culture.

IV - Supplémentation du milieu de culture

Le milieu ainsi préparé, est supplémenté extemporanément avec 5 % ou 10 % de sérum de veau foetal (Gibco, réf. 13-6290H), à l'aide d'une seringue stérile de 10 ml munie d'une unité minisart NML de filtration 0,22 μm (SLGV 025

BS Millipore), 5 $\mu\text{g/ml}$ de la solution d'insuline bovine de pancréas (Sigma, réf. I-5500), de 2 mM de glutamine à une concentration de 30 mg/ml (Imperial Lab. réf. 5-702-66) et avec, soit, 100 U/ml de pénicilline et 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine (Imperial Lab. réf. 4-804-07), soit 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamycine sulfate seule (Panpharm).

V - Entretien de la souche MCF7

1 - Préparation de la solution saline tamponnée au phosphate - EDTA : STP-EDTA

138 M de NaCl Normapur (Prolabo, réf. 27 810-29)

27 mM de KCl (Merck, réf. 4936)

81 mM de Na₂HP0₄ (Merck, réf. 6579)

14,7 mM de KH₂P0₄ (Merck, réf. 4873)

30 mM d'EDTA Titriplex III (Merck, réf. 8418)

Le pH est ajusté à 7,4 avec NaOH 1N.

Cette solution est ensuite diluée au 1/10 dans de l'eau pyrodistillée.

2 - Préparation de la solution trypsine - EDTA (0,05 % - 0,02 %)

Elle est préparée par dilution au 1/5 de la solution commerciale de trypsine 0,25 % (Imperial lab. réf. 4-770-07) dans du STP et par addition de 0,2 mg/ml d'EDTA.

3 - Décollement des cellules MCF7

Les cellules, lorsqu'elles sont à confluence, sont repiquées dans de nouveaux flacons et ceci après décollement : les cellules sont d'abord rincées avec 2 ml d'une solution stérile de STP-EDTA (30 mM) , ce qui permet d'éliminer les ions Mg^{++} et Ca^{++} indispensables à l'adhésion intercellulaire et diminue le "temps de trypsination". Puis ces cellules sont mises en contact 1 à 2 minutes avec 0,5 ml de STP-EDTA et 1 ml de trypsine - EDTA.

La trypsine est alors neutralisée avec 8,5 ml de milieu de culture.

La suspension cellulaire est aspirée, puis refoulée 2 à 3 fois pour bien séparer les cellules entre elles. On prélève enfin 0,5 ml et 0,25 ml de la suspension que l'on ajoute à 15 ml de milieu de culture contenus dans des flacons T75 soit une dilution du 1/30 et 1/60.

Le milieu de culture est changé le lendemain du repiquage puis tous les deux jours jusqu'à confluence des cellules.

VI - Congélation des cellules MCF7

1 - Milieu de congélation

Ce milieu est préparé extemporanément, dans un bain de glace, car il serait toxique pour les cellules à température ambiante.

Il est obtenu, par addition, dans l'ordre, du milieu de culture à 5 % de SVF, du DMSO (Merck, réf. 16743) et du SVF (75,1 0,15 : V/V)

2 - Méthode de congélation

Les cellules à congeler doivent être trypsinées avant la confluence, car les cellules en phase exponentielle redémarrent mieux.

Les cellules sont décollées comme il a été décrit ci-dessus puis centrifugées 5 minutes à 1000 g à 4°C. Après élimination du surnageant, on ajoute le milieu de congélation au culot (5 millions de cellules soit environ la moitié d'un flacon de culture T75, non confluent, par tube de congélation et par ml de milieu).

Les tubes de congélation (Nunc) sont ensuite placés 30 minutes à -20°C, puis 24 heures à -80°C et enfin dans l'azote liquide à -196°C.

VII - Décongélation des cellules MCF 7

Le tube de congélation (Nunc) contenant les cellules, sorti de l'azote liquide à -196°C est rapidement réchauffé à température ambiante.

Son contenu est transvasé stérilement dans un flacon contenant 3,5 ml de culture à 20 % de SVF.

Après une nuit d'incubation, le milieu de culture est changé, un troisième antibiotique est ajouté (gentamycine 100 µg/ml) et la concentration du couple pénicilline - streptomycine est augmentée respectivement à 300 U/ml et 300 mg/ml.

VIII - Comptage des cellules

Le comptage des cellules se fait au microscope à l'aide d'un hémocytomètre (cellule de MALASSEZ).

Après cette manipulation, le reste du milieu cellulaire contenu dans un mélange de 2 ml d'un mélange de solution STP-EDTA et de trypsine est conservé au congélateur pour permettre ensuite le dosage de l'ADN.

IX - Dosage de l'ADN

Le dosage de l'ADN cellulaire s'effectue par spectrofluorimétrie selon deux méthodes :

- méthode utilisant le bromure d'éthidium
- méthode utilisant le 4,6 Diamidino-2 phenylindole, hydrochloride :

DAPI, la plus sensible.

1 - Méthode au bromure d'éthidium

a - Principe

On utilise, un fluorescent intercalant, le bromure d'éthidium dont les caractérisations physiques sont :

- longueur d'onde d'excitation = 504 nm
- longueur d'onde d'émission = 593 nm

Sous l'action d'un rayonnement excitateur à 503 nm, le bromure d'éthidium fixé à la molécule d'ADN, émet une fluorescence à 593 nm proportionnelle à la quantité d'ADN présent.

Cette fluorescence est mesurée dans une cuve en quartz avec un spectrofluorimètre JOBIN YVON JY3.

b - Les réactifs

- Solution étalon d'ADN (1 mg/ml dans NaCl 10 mM) diluée au 1/1000 dans de l'eau pyrodistillée.

- Bromure d'éthidium 0,5 mg/ml dilué au 1/40

- NP 40 dilué au 1/1000 dans de l'eau pyrodistillée. Il s'agit d'un mouillant dont l'action permet de libérer entièrement l'ADN de la cellule.

c - Dosage de l'ADN

Les tubes, contenant le milieu cellulaire dans le mélange STP-EDTA-trypsine, sont décongelés à température ambiante et agiter de façon à remettre les cellules en suspension.

Les mesures se font sur un volume de 5 ml :

- 20 μ l de bromure d'éthidium 1/40

- 2 ml de NP 40 1/1000

- 500 μ l de la suspension cellulaire à doser

- eau pyrodistillée pour compléter à 5 ml

Les tubes sont agités et la lecture est faite à l'aide du spectrofluorimètre à une sensibilité de 0,1.

Les densités optiques sont reportées sur une courbe étalon.

d - Gamme étalon

Elle est réalisée à partir d'une solution d'ADN (1 mg/ml dans NaCl 10 mM) dilué au 1/1000. Les intensités de fluorescences lues sur l'appareil correspondent respectivement à 0 μ g ; 0,25 μ g ; 0,50 μ g ; 1 μ g d'ADN.

On réalise ainsi une courbe étalon = intensité de fluorescence en fonction de la quantité d'ADN (μg). Il est donc ainsi facile de déterminer la quantité de DNA ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de chaque solution, à partir de la densité optique lue.

2 - Méthode du DAPI

a - Principe

Il est basé sur la propriété du benzimidazol de se lier de façon non covalente avec les paires de bases d'adénine thymine des molécules d'ADN.

Le DAPI sous l'action d'un rayonnement exciteur à 309 nm émet une fluorescence à 526 nm, proportionnelle à la quantité d'ADN présente.

La fluorescence est mesurée dans une cuve en quartz avec un spectrofluorimètre JOBIN YVON JY3 à une sensibilité de 0,03.

b - Réactifs

- ADN de thymus de veau (1 mg/ml dans NaCl 10 mM)
- Solution de DAPI dans l'éthanol 1 mg/ml
- NaCl 10 mM

c - Dosage de l'ADN

Les tubes contenant la suspension cellulaire sont préparés de la même façon que pour la méthode au bromure d'éthidium.

Les mesures se font sur un volume de 5 ml :

- 2 ml de DAPI dilué au 1/5000 (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- de 50 à 200 μl de la solution à doser selon la quantité d'ADN
- NaCl 10 mM qsp 5 ml

d - Courbe étalon

La gamme étalon est réalisée en prélevant 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ml de la solution d'ADN à 0,2 $\mu\text{g/ml}$ soit respectivement 0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 μg d'ADN.

La quantité d'ADN est déterminée à l'aide de cette courbe.

Remarque

La solution de DAPI se dégrade à la lumière, il est donc préférable de préparer extemporanément cette solution avant chaque série de mesures.

X - Electrophorèse en gel de polyacrylamide

1 - Réactifs

. Solution A (gardée à 4°C)

HCL 1N		12 cm^3
Tris (tris hydroxyméthyl) aminométhane		9,15 g
Temed		
N, N, N', N' tétra-méthyléthylènediamine		0,115 ml (115 μl)
H ₂ O bidistillée	...qsq...	100 ml

. Solution B

NH ₄ ⁺ persulfate		0,14 g
H ₂ O bidistillée	...qsq...	100 cm^3

. **Solution C** (gardée à 4°C)

Acrylamide	28 g
Bisacrylamide	0,735 g
H ₂ O bidistillée ...qsq...	100 cm ³

2 - Préparation du gel

			7 %	4,5 %
. Mélanger extemporannément	1 Vol	Solution A	4 ml	1 ml
	2 Vol	Solution B	8 ml	2 ml
	1 Vol	Solution C	4 ml	0,6 ml

. Avec une seringue, couler dans des tubes en verre

. Equilibrer dans le tampon réservoir (pH 8,3 - 8,6)

Tris	6 g
Glycine	28,8 g
H ₂ O bidistillée ...qsq...	1 l

Coloration avec du bleu de bromophenol (que l'on ajoute soit dans l'échantillon à analyser, soit dans le tampon).

3 - Matériel

- Générateur Shandon SAE 2761
- Cuve électrophorèse MGV-100 C.B.S. Scientific C_O

RESULTATS

I - Croissance cellulaire en fonction de l'origine du sérum de veau foetal

Les cellules MCF7 ont été mises en culture dans un milieu de base enrichi en insuline et par deux types de sérum de veau foetal, de provenance différente :

- Sigma Réf. 0116290H
- Institut Jacques Boy

Ces sérums sont filtrés sur filtre Millipore 0,22 μm sans absorption de protéines (SLGVO25BS) de façon à obtenir un milieu stérile exempt de contamination.

La croissance cellulaire est suivie par comptage des cellules et par mesure de l'ADN cellulaire.

Les résultats sont portés dans le tableau III et sur la figure 1.

Tableau III : Croissance des cellules MCF7 en présence de sérum de veau foetal

Conditions et Jours	Nombre de cellules 10 ³			ADN en µg			Facteur de multiplication de la croissance cellulaire		
	moyenne			moyenne					
	1	2	3	1	2	3	a	b	c
SVF F Sigma	1 22 7 10	24 64 84	25 88 87	24 71 85			2,95	1,19	3,54
SVF Boy (A)	4 7 10	78 560 960	95 495 1010	86 544 1097	3,8 5,1 8,3	3,10 3,1 9	1,8 5,1 6,4	2,9 4,43 7,9	12,75
SVF F Boy (B)	4 7 10	28 136 246	30 154 325	35 150 317	3 6,7 14,7	3,5 8,8 17,3	3,5 10 18,4	3,33 8,5 16,8	9,05
SVF F Boy (A)	4 7 10	64 340 1200	83 340 1060	78 254 1062	4,4 6 21	2,4 7,7 20,3	4,1 6,7 19	3,63 6,8 20,1	13,61

(a) Facteur de multiplication de la croissance entre J1 ou J4 et J7

(b) Facteur de multiplication de la croissance entre J7 et J10

(c) Facteur de multiplication de la croissance entre J1 ou J4 et J10

(A) Sérum de veau foetal utilisé immédiatement après ouverture

(B) Sérum de veau foetal ouvert et conditionné en flacons de 40 ml utilisé 4 mois après

SVF F Sérum de veau filtré

SVF NF Sérum de veau non filtré

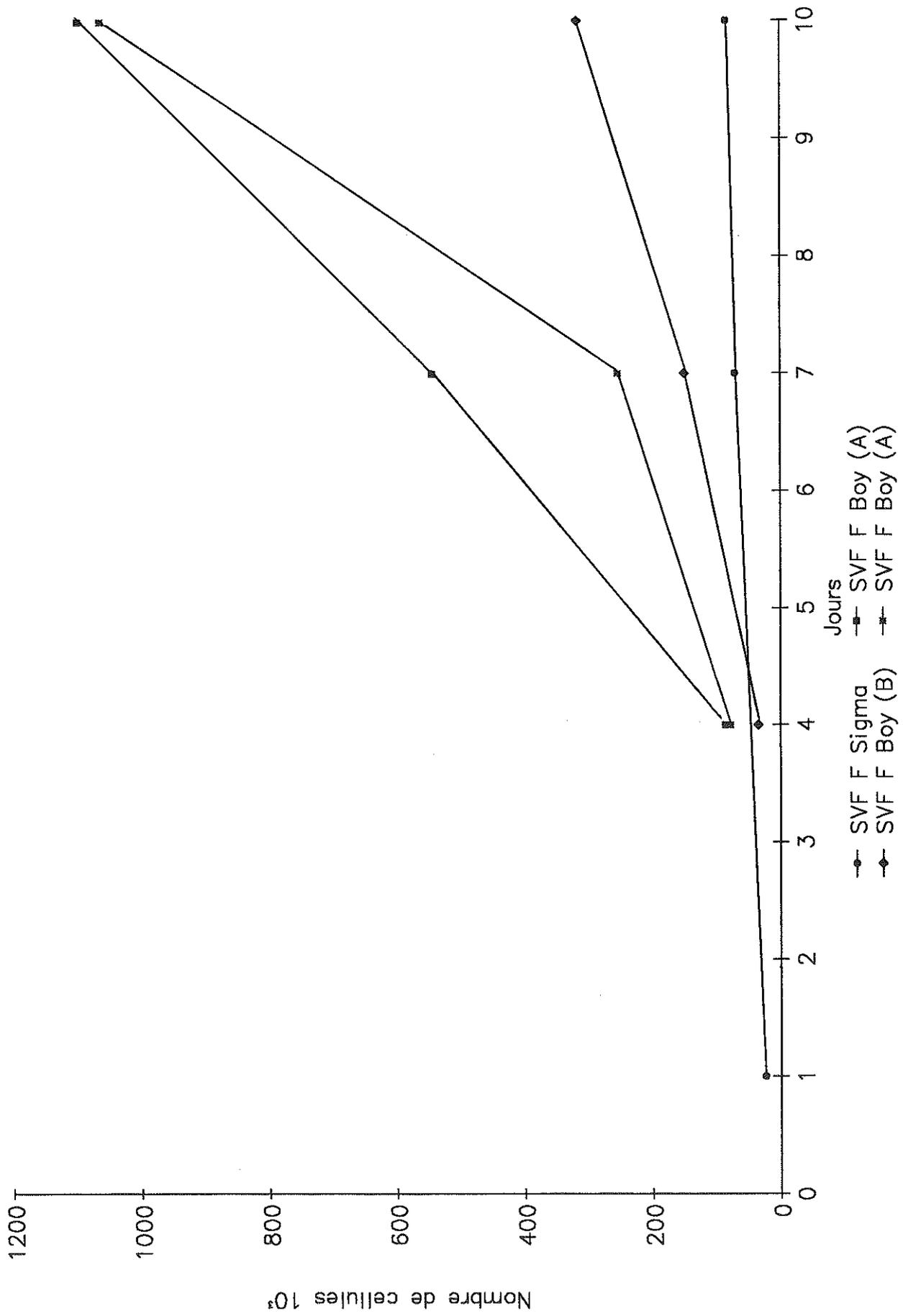


Figure 1 : Courbe de croissance des cellules MCF7 en présence de sérum de veau foetal

Ainsi on constate sur la figure 1 que :

- Le sérum de veau foetal Sigma induit une croissance cellulaire nettement inférieure à celle obtenue avec le sérum de l'Institut Jacques Boy.

- Les sérums de veau fraîchement décongelés et utilisés immédiatement permettent une multiplication nettement plus efficace qu'un sérum provenant du même flacon mais ouvert et conditionné en flacons de 40 ml depuis 4 mois. En effet, la croissance cellulaire, exprimée en nombre de cellules, est pour les cellules cultivées suivant la condition (A) de 3 fois supérieure à celle des cellules mises en culture dans un milieu enrichi en SVF BOY déconditionné depuis 4 mois. Et ceci est valable aussi bien pour le milieu contenant du SVF filtré que pour celui avec du SVF non filtré (moyenne d'environ $1097 \cdot 10^3$, $1062 \cdot 10^3$ cellules contre $317 \cdot 10^3$ cellules à 10 jours de culture).

- La croissance cellulaire, entre J4 et J7, est pratiquement la même pour le milieu contenant du SVF Boy non filtré et utilisé immédiatement après ouverture et pour le milieu contenant du SVF Boy filtré et déconditionné depuis 4 mois (pente de la courbe presque identique).

- On obtient une croissance cellulaire équivalente pour les milieux contenant du SVF Boy utilisé juste après ouverture qu'il soit filtré ou non. Par contre, la multiplication ne se fait pas de la même façon au cours du temps.

En effet, on assiste à une forte prolifération cellulaire entre J4 et J7 pour le milieu avec sérum de veau filtré (facteur de multiplication de 6,32) alors que le rapport du nombre de cellules n'est que de 3,25 pour le milieu avec sérum de veau non filtré.

Puis, dans la 2^{ème} partie du temps de culture, ce sont les cellules dans le milieu avec SVF non filtré, qui croissent le plus rapidement (facteur de multiplication de 4,18 contre 2,01).

On peut donc conclure que l'origine et le mode d'utilisation des sérums influent sur la croissance cellulaire.

Il semble que le sérum le mieux adapté à la culture des cellules MCF7 soit celui de l'Institut Jacques BOY, qu'il soit filtré ou non. Il est préférable également de l'utiliser immédiatement après décongélation et déconditionnement.

Face à la non reproductivité et variabilité des résultats obtenus avec les cultures de cellules MCF7 en présence de sérum de veau foetal, nous allons travailler avec un milieu défini en hormones de croissance et en protéine. Et tout d'abord nous étudierons l'influence de l'albumine sur la croissance des cellules.

II - Croissance cellulaire en présence d'albumine

De façon à obtenir un milieu de culture de composition constante et connue, nous allons substituer le sérum de veau foetal par de l'albumine bovine à deux stades différents de purification :

- albumine monomère purifiée Silab
- albumine Silab contenant des acides gras, de composition suivante :

Tableau IV : Composition en acides gras totaux (%) de l'albumine L0039 Silab
(Institut des coprs gras - Bordeaux 1991)

C 12	0,1
C 14	1,7
C 14:1	0,6
I C 15	0,3
AI C 15	0,5
C 15	0,7
C 15:1	0,1
I C 16	0,3
C 16	20,4
C 16:1	3,3
I C 17	0,4
AI C 17	0,7
C 17	1,2
C 17:1	0,8
C 18	21,8
C 18:1	26,1
C 18:2	13,1
C 18:3	2,2
C 20:1	0,5
N. I.	4,8

Les solutions d'albumine sont utilisées à la concentration de 25 g/l dans de l'eau distillée, de façon à reproduire exactement la quantité d'albumine contenue dans le sérum de veau foetal. Elles sont filtrées sur filtre millipore 0,22 μ m sans absorption de protéines. Leur concentration dans le milieu de culture est de 10 %.

Cette culture est effectuée en présence d'insuline (5 μ g/ml) à la concentration de 1 % dans le milieu de culture et en présence ou non d'estradiol 10^{-8} M.

La récupération et le comptage des cellules ainsi que le dosage de l'ADN sont faits à J7 et J10.

La croissance des cellules est toujours comparée à celle effectuée en présence de SVF.

Les résultats sont portés dans les tableaux V, VI, VII, VIII les courbes des figures 2, 3a, 4a, 5a et les histogrammes des figures 3b, 4b, 5b.

Tableau V : Croissance des cellules MCF7 en présence d'albumine monomère Silab et d'albumine L0039

Conditions	Jours	Nombre de cellules 10 ³			Facteur de multiplication de la croissance cellulaire		
		par puits			a	b	c
		1	2	3			
SVFF	1	22	24	25	2,95	1,19	3,54
	7	63	64	88			
	10	82	84	87			
AP	7	84	92	137	4,33	3,85	16,70
	10	340	375	490			
AG	7	30	32	44	1,45	2,28	3,33
	10	76	80	82			
AP + E	7	98	108	157	5,04	10,25	51,66
	10	1120	1250	1350			
AG + E	7	25	25	40	1,25	2,53	3,16
	10	70	72	86			

(a) Facteur de multiplication de croissance entre J1 et J7

(b) Facteur de multiplication de croissance entre J7 et J10

(c) Facteur de multiplication de croissance entre J1 et J10

SVF F = Serum de veau foetal Jacques Boy filtré

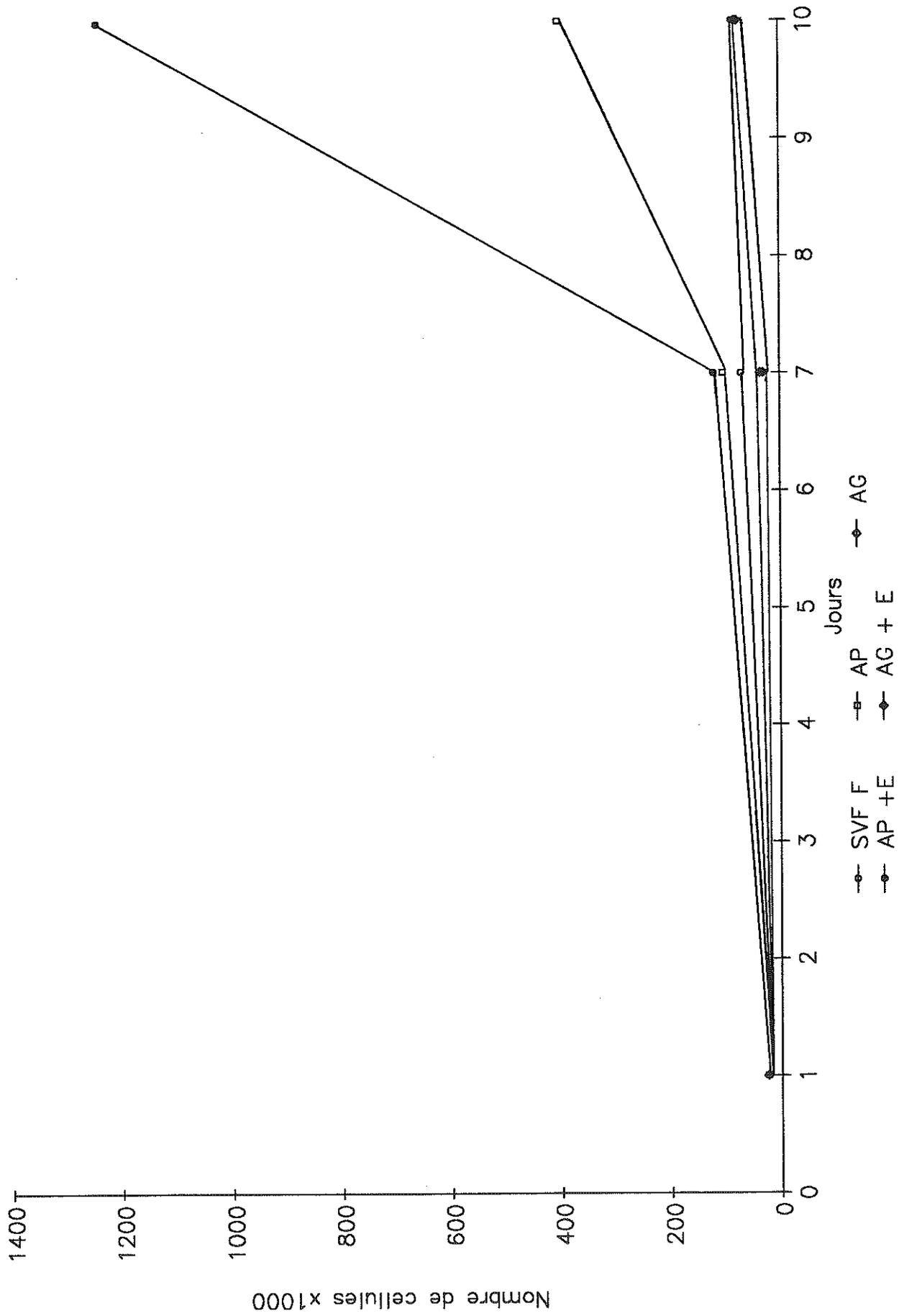


Figure 2 : Courbe de croissance des cellules MCF7 en présence d'albumine monomère Silab et d'albumine L0039

Tableau VI : Croissance des cellules MCF7 en présence d'albumine monomère Silab et d'albumine L0039

Conditions et Jours	Nombre de cellules 10 ³			ADN en µg			Facteur de multiplication de la croissance cellulaire		
	par puits			par puits			moyenne		
	1	2	3	1	2	3	a	b	c
SVF NF	1 20	35 46	46 34	0,70 1,30	1,30 1,90	1,90 1,3	4,26	7,86	33,55
	7 130	152 155	145 141	0,7 11,6	3,2 15,6	5 19,3	2,97		
	10 1035	1175 1215	1141 1141	11,6 0,7	15,6 3,4	19,3 3,8	15,5	2,02	6
AP	7 78	76 83	79 204	0,7 2,6	3,4 2,6	3,8 3,2	2,64	2,95	
	10 160	213 239	204 204	2,6 0,7	2,6 3,2	3,2 3,8	2,8	0,97	0,94
AG	7 31	32 35	33 33	0,7 1,3	3,2 1,9	3,8 3,8	2,57	0,97	
	10 31	32 33	32 32	1,3 1,3	1,9 3,8	3,8 3,8	2,33	2,46	5
AP + E	7 63	65 78	69 170	1,3 5	2,6 6,2	3,2 9,2	2,37	2,02	
	10 155	174 180	170 170	5 3,8	6,2 1,3	9,2 1,9	6,8	0,79	0,73
AG + E	7 21	29 24	27 25	3,8 1,3	1,3 5	1,9 5	1,6	0,92	
	10 21	24 29	25 25	1,3 5	5 1,3	5 1,9	4,6		

(a) Facteur de multiplication de la croissance entre J1 et J7

(b) Facteur de multiplication de la croissance entre J7 et J10

(c) Facteur de multiplication de la croissance entre J1 et J10

SVF NF = Sérum de veau foetal Sigma non filtré (Réf. 011 6290 H)

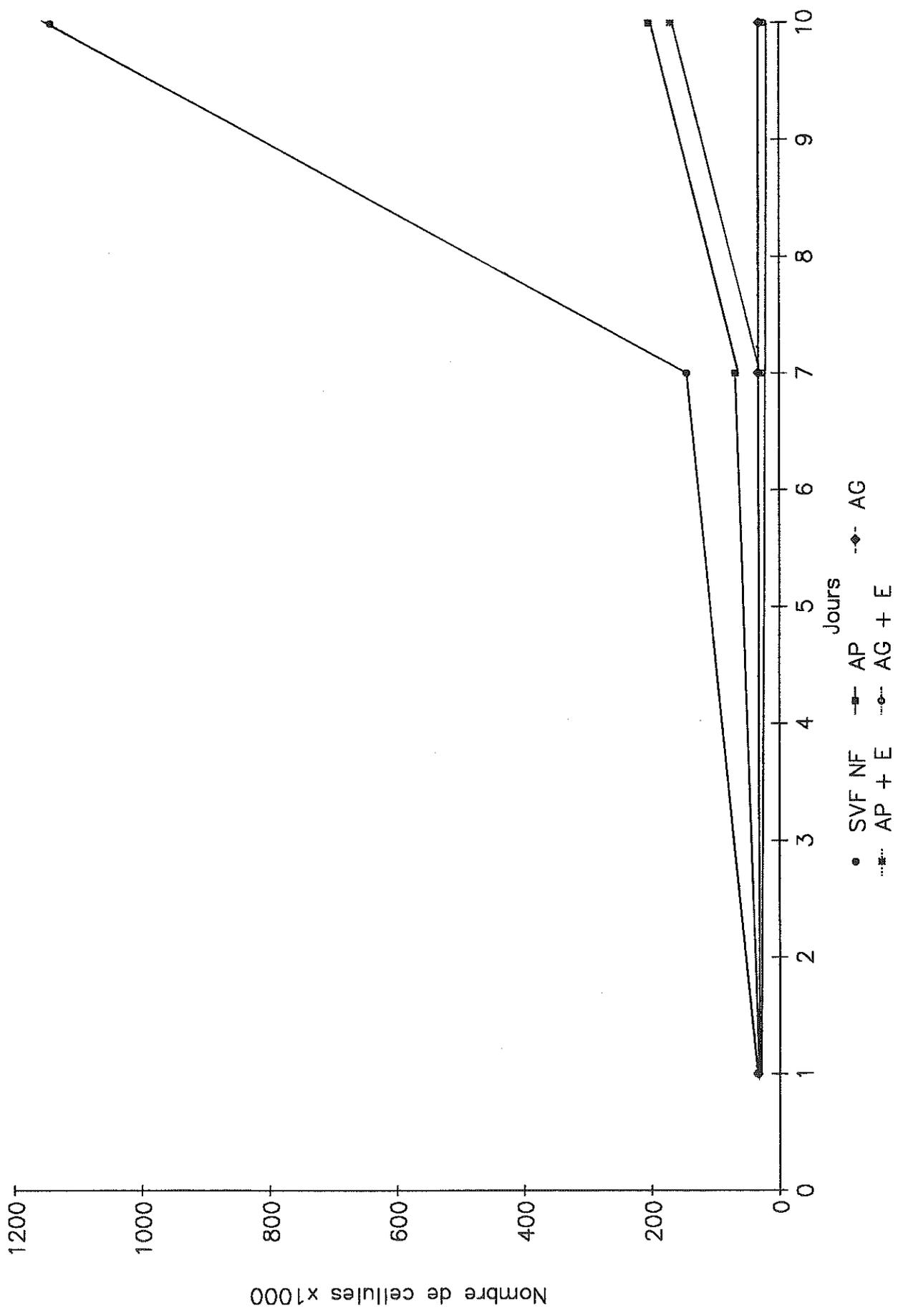


Figure 3a : Courbe de croissance des cellules MCF7 en présence d'albumine monomère Silab et d'albumine L0039

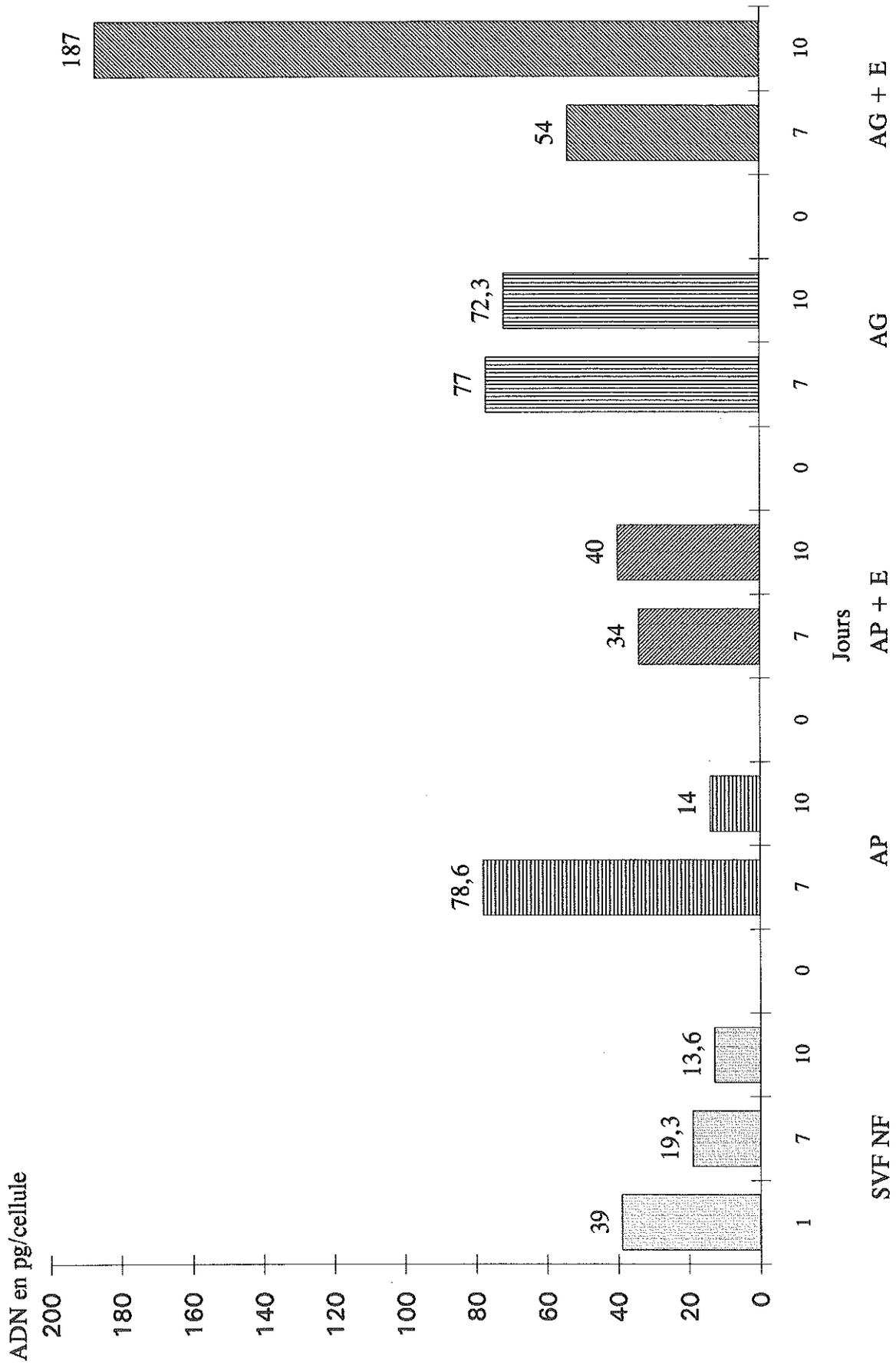


Figure 3b : Comparaison de l'ADN cellulaire durant la croissance des cellules MCF7

Tableau VII : Croissance des cellules MCF7 en présence d'albumine monomère Silab

Conditions	Jours	Nombre de cellules 10 ³			Moyenne	ADN en µg			Moyenne	Facteur de multiplication de croissance cellulaire		
		1	2	3		1	2	3		a	b	c
SVF F	4	28	30	47	35	3	3,5	3,5	3,33	4,28	2,11	9,05
	7	136	154	162	150	6,7	8,8	10	8,5			
	10	246	325	380	317	14,7	17,3	18,4	16,8			
AP	4	22	28		25	1,9	2,4		2,15	3,08	2	6,16
	7	72	82		77	3,5	4		3,75			
	10	140	168		154	7,2	7,6		7,4			
AP + E	4	40	44		42	2,4	2,4		2,4	3,88	1,52	5,90
	7	142	184		163	5	5		5			
	10	244	252		248	11,5	13,6		12,55			

(a) Facteur de multiplication de croissance entre J4 et J7

(b) Facteur de multiplication de croissance entre J7 et J10

(c) Facteur de multiplication de croissance entre J4 et J10

SVF F = Sérum de veau foetal Sigma filtré (Réf. 011 6290 H)

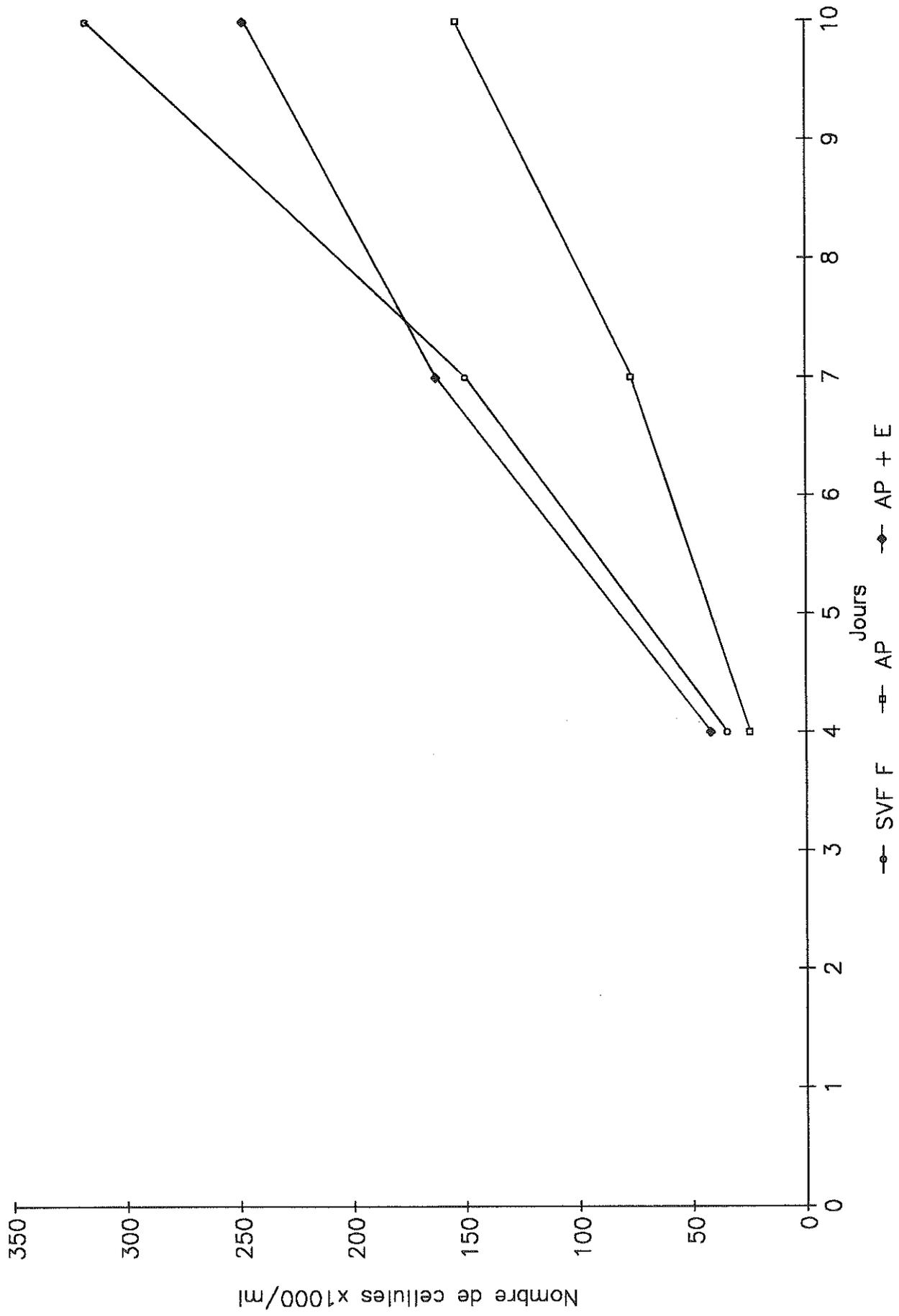


Figure 4a : Courbe de croissance des cellules MCF7 en présence d'albumine monomère Silab

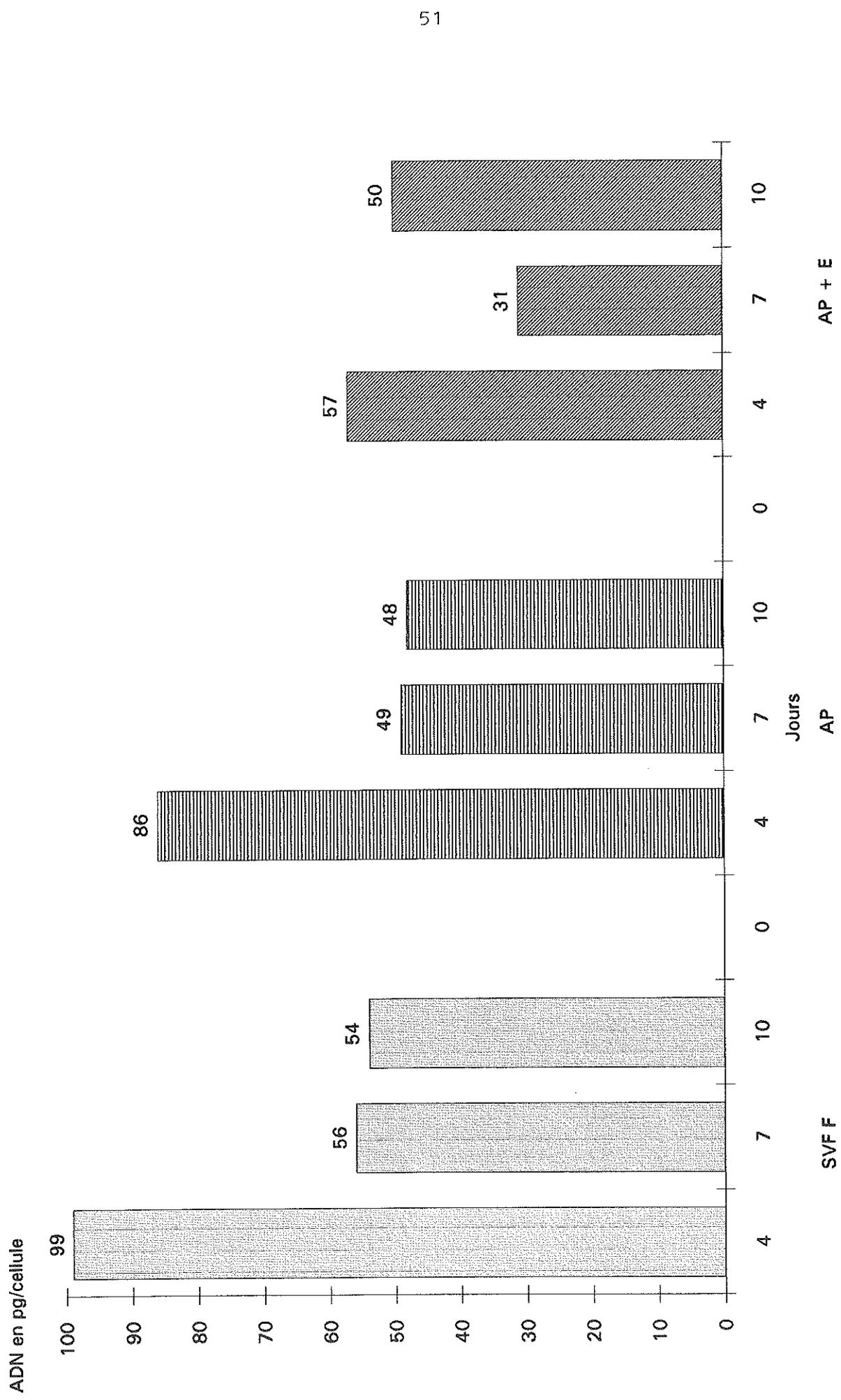


Figure 4b : Comparaison de l'ADN cellulaire durant la croissance des cellules MCF7

Tableau VIII : Croissance des cellules MCF7 en présence d'albumine monomère Siab

Conditions	Jours	Nombre de cellules 10 ⁵			ADN en µg			Facteur de multiplication de croissance cellulaire				
		1	Par puits		Moyenne	1	Par puits		Moyenne	a	b	c
			2	3			2	3				
SVF F	4	78	95	85	86	3,8	3,10	1,8	2,9	6,32	2,01	12,75
	7	560	495	575	544	5,1	3,1	5,1	4,43			
	10	960	1010	1320	1097	8,3	9	6,4	7,9			
AP	4	86	86	91	88	2,4	4,4	2,8	3,2	1,11	2,09	2,33
	7	64	101	128	98	3,8	3,8	4,4	4			
	10	216	180	220	205	7,7	8,3	7	7,67			
AP + E	4	63	80	86	76	3,1	3,1	4,4	3,53	1,54	2,42	3,73
	7	85	120	145	117	7,7	8,3	11,6	9,2			
	10	288	298	265	284	23	15,6	19,6	19,4			
SVF NF	4	64	83	86	78	4,4	2,4	4,1	3,63	3,25	4,18	13,61
	7	340	340	80	254	6	7,7	6,7	6,8			
	10	1200	1060	925	1062	21	20,3	19	20,1			
SVF F sans RP	4	33	42	48	41	3,8	1,8	3,1	2,9	6,02	2,53	15,24
	7	250	225	265	247	4,4	6,4	4,4	5,07			
	10	570	605	700	625	14,4	13,70	13	13,7			

(a) Facteur de multiplication de croissance entre J4 et J7

(b) Facteur de multiplication de croissance entre J7 et J10

(c) Facteur de multiplication de croissance entre J4 et J10

SVF F = Sérum de veau foetal filtré Sigma

SVF NF = Sérum de veau foetal non filtré Sigma

SVF F = Sérum de veau foetal filtré Sigma sans rouge de phénol

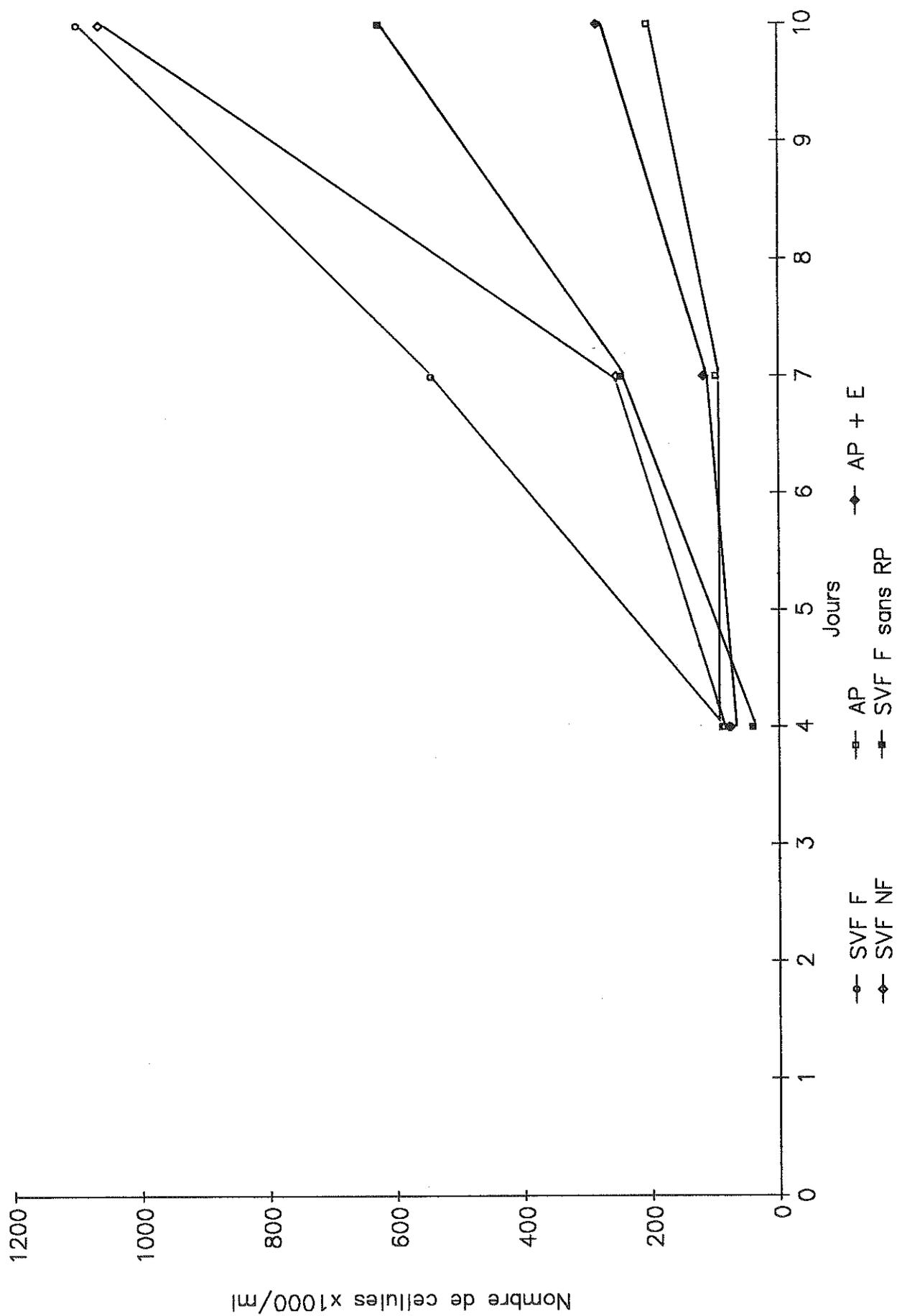


Figure 5a : Courbe de croissance des cellules MCF7 en présence d'albumine monomère Silab et d'albumine L0039

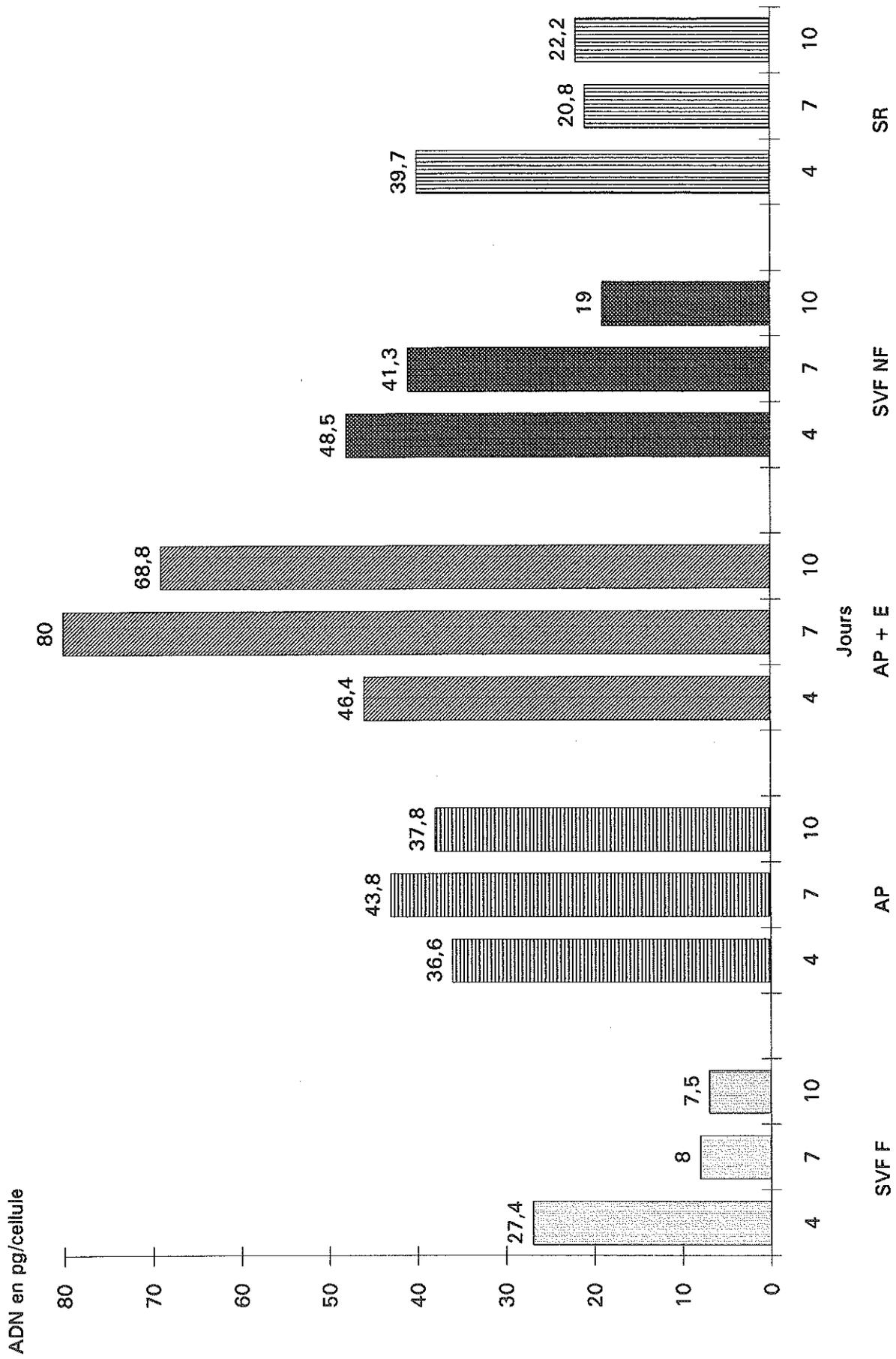


Figure 5b : Comparaison de l'ADN cellulaire durant la croissance des cellules MCF7

1 - Comparaison albumine pure AP - albumine grasse AG

On constate que :

- Plus le temps d'incubation est long, plus le nombre de cellules est important

- Jusqu'à 7 jours de culture, la différence entre la prolifération cellulaire dans les milieux additionnés de SVF, AP, AP + E, AG et AG + E est peu significative (figure 1 et 3a).

Toutefois à J7 la prolifération des cellules MCF7 en présence d'albumine pure est supérieure à celle des cellules cultivées dans du milieu avec albumine contenant des acides gras (environ x 3). Cette différence ne fait que se confirmer à J10 avec un facteur de multiplication de la croissance cellulaire de 16,70 pour AP contre 3,33 pour AG.

- A 10 jours de culture, la différence de prolifération cellulaire entre AP et AP + E est nettement marquée. L'estradiol semble donc favoriser la multiplication cellulaire : le facteur de multiplication de la croissance entre J1 et J10 étant de 51,66 pour le milieu supplémenté en AP + E contre 16,70 pour celui supplémenté par AP seule, soit un rapport d'environ 3 entre les deux.

- La supplémentation du milieu par de l'albumine contenant des acides gras avec ou sans estradiol ne semble pas favorable au développement de la croissance cellulaire puisqu'il n'y a pas de division de cellules, la courbe restant pratiquement horizontale.

- Le taux d'ADN par cellule est plus élevé pour les cellules cultivées dans AG ou AG + E que pour celles cultivées dans AP ou AP + E . Ceci correspond à une faible division des cellules dans AG avec ou sans estradiol.

2 - Comparaison albumine pure AP - sérum de veau foetal

On constate que :

- A 4 jours de culture, il est difficile d'interpréter les résultats. La différence entre les conditions de culture est peu marquée et donc peu significative. Il est difficile d'en apprécier l'influence malgré une légère supériorité du milieu AP + E (figure 4a).

- A J7, la différence entre AP et AP + E n'est pas marquée pour les manipulations des figures 1 et 2a alors qu'elle est très nette pour la manipulation de la figure 3a. La croissance cellulaire reste toutefois inférieure ou partiquement égale à celle du milieu avec SVF (exception faite de la manipulation de la figure 1 où le SVF ne permet pas une croissance correcte des cellules).

La croissance des cellules dans les milieux SVF et AP + E est équivalente entre J4 et J7 puisque la pente des courbes est la même (figure 3a).

- A 10 jours de culture, la croissance cellulaire avec SVF devient nettement supérieure à celle avec AP ou AP + E (sauf celle de la figure 1). Le nombre de cellules est alors plus important.

La croissance des cellules avec AP + E et AP est la même entre J7 et J10 (pente de la courbe équivalente).

- Le taux d'ADN progresse en fonction de la prolifération cellulaire : le taux d'ADN est d'autant plus important que le taux d'incubation est long et que le nombre de cellules est important.

- Le graphique des figure 2b et 3b montre que le taux d'ADN par cellule est élevé à J4 au moment de la forte division des cellules puis celui-ci diminue environ de moitié à J7 et reste constant pour les cellules cultivées dans le milieu de base additionné de SVF et AP alors qu'il réaugmente pour les cellules cultivées dans AP + E.

En résumé :

- . L'albumine contenant des acides gras en présence ou l'absence d'estradiol n'est pas capable d'induire une croissance correcte des cellules MCF7.

- . L'albumine purifiée peut permettre la prolifération des cellules mais celle-ci est moins spectaculaire qu'avec le sérum de veau foetal.

III - Croissance cellulaire en fonction des différents facteurs

1 - Influence de l'albumine, insuline, transferrine, estradiol

Pour cela nous avons donc étudié l'influence de différents facteurs sur la prolifération des cellules MCF7 en culture dans du milieu de base additionné de :

- albumine dans l'eau distillée 25 g/l
- insuline 8 $\mu\text{g/ml}$
- transferrine 10 $\mu\text{g/ml}$

- estradiol 10^{-8} M

Les résultats sont portés dans le tableau IX et exprimés par les figures 6 et 7.

Tableau IX : Pourcentage de croissance cellulaire en fonction de différents facteurs à 7 et 10 jours d'incubation.

Conditions	Pourcentage de croissance	
	J7	J10
TSIA	100	100
SIA	55,4	57
TIA	80	121,5
TSA	73,75	78,7
TSI	74,16	81
TSIAE	132,5	191,4

A Albumine dans l'eau 2,5 g/l
 I Insuline 8 μ g/ml
 T Transferrine 10 μ g/ml
 S Sodium sélénite 40 mg/ml
 E Estradiol 10-8 M
 SVF Sérum de veau foetal

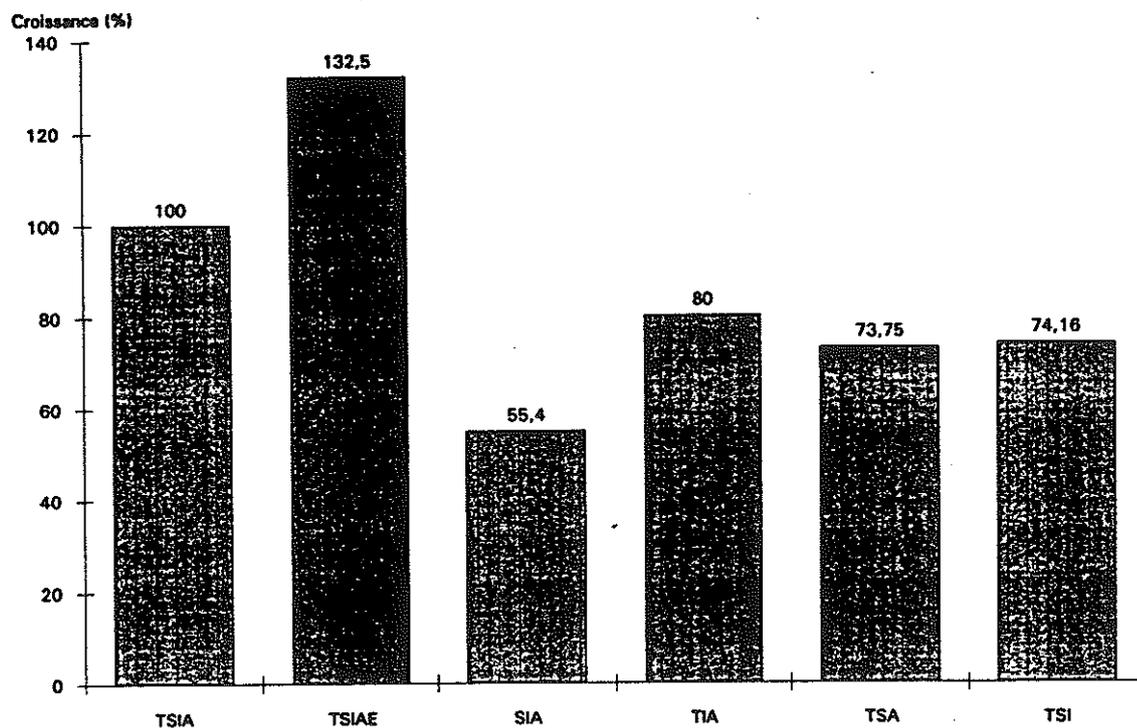


Figure 6 : Pourcentage de croissance des cellules MCF7 à 7 jours dans les milieux TSIA, TSIAE, SIA, TIA, TSA, TSI

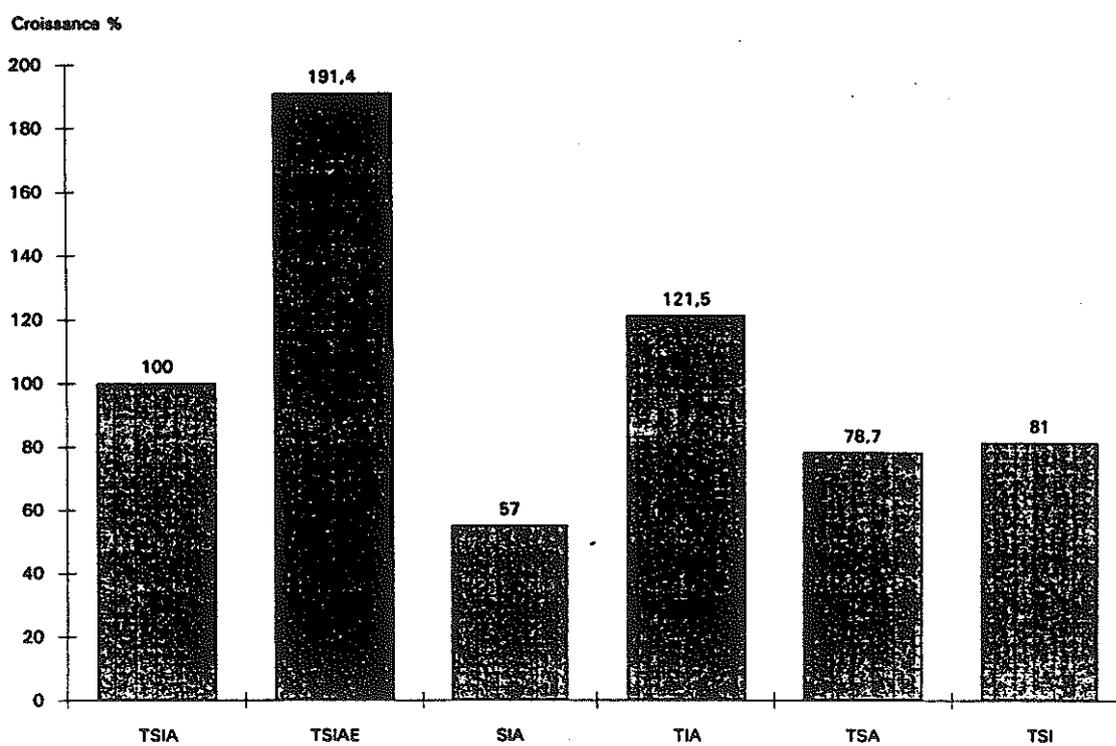


Figure 7 : Pourcentage de croissance des cellules MCF7 à 10 jours dans les milieux TSIA, TSIAE, SIA, TIA, TSA, TSI

On prend comme témoin le milieu contenant la transferrine (T), le sodium selenite (S), l'insuline (I) et l'albumine (A) : TSIA.

On constate que :

- La croissance à 7 jours de culture est supérieure au lot témoin seulement pour le milieu additionné d'estradiol TSIAE.

- Le milieu TIA permet une culture correcte mais après 10 jours de culture uniquement.

- Si les milieux SIA, TSA et TSI sont capables de provoquer la prolifération des cellules MCF7 à 7 jours, celle-ci est nettement inférieure à celle du milieu témoin. De plus, il n'y a plus de multiplication cellulaire après 7 jours de culture puisque le pourcentage de croissance reste constant.

Ceci permet donc de noter l'influence des protéines de transport, transferrine et albumine sur la croissance cellulaire ainsi que leur complémentarité avec l'insuline. Celles-ci semblent indispensables au bon développement des cellules.

De plus, on remarque également l'effet mitogène de l'estradiol, qui permet d'obtenir une multiplication plus importante et plus rapide.

2 - Influence du rouge de phénol

Les cellules sont mises en culture dans un milieu de base avec et sans rouge de phénol dans les conditions suivantes :

- transferrine (10 $\mu\text{g/ml}$) et insuline (5 $\mu\text{g/ml}$) : TI

- transferrine (10 $\mu\text{g/ml}$), insuline (5 $\mu\text{g/ml}$) et albumine pure (25 g/l) à la concentration de 0,25 % : TIA 0,25 %

On obtient les graphiques suivants représentés par les figure 8 et 9.

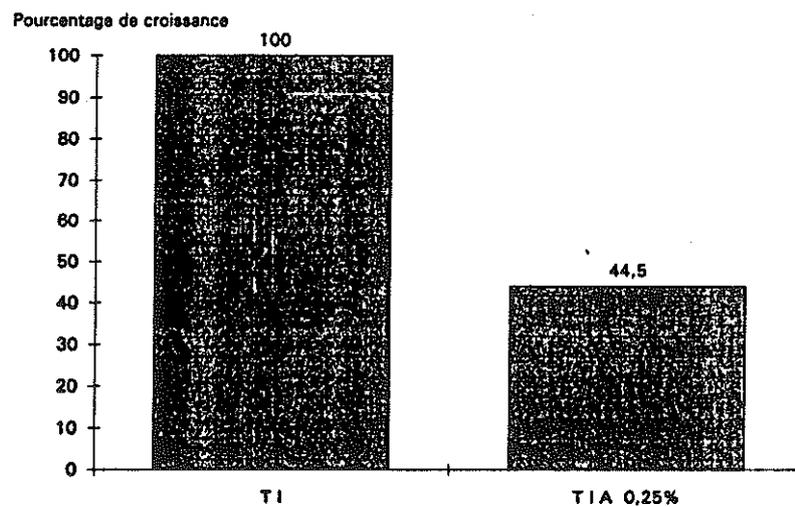


Figure 9 : Croissance (%) des cellules MCF7 dans un milieu sans rouge de phénol après 10 jours de culture

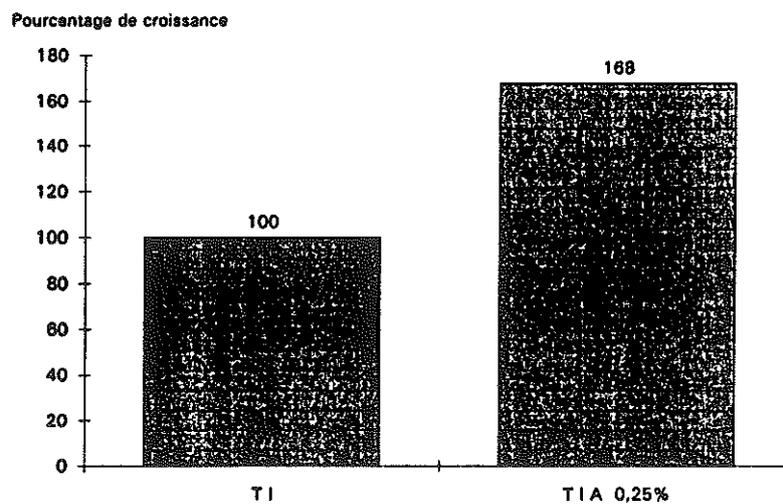


Figure 8 : Croissance (%) des cellules MCF7 dans un milieu avec rouge de phénol après 10 jours de culture

En supposant que la croissance cellulaire exprimée en pourcentage est de 100 % avec le milieu contenant l'insuline et la transferrine on remarque que :

- La prolifération des cellules MCF7 est inférieure en présence d'albumine pure à la concentration de 0,25 % dans un milieu de base sans rouge de phénol.

- La prolifération cellulaire dans un milieu avec rouge de phénol additionné d'albumine pure est de 168 %.

On en déduit donc que :

- L'albumine pure a un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire lorsqu'elle est ajoutée à un milieu de base sans rouge de phénol.

- L'albumine pure a un effet mitogène sur les cellules MCF7 cultivées dans un milieu avec rouge de phénol.

IV - Croissance cellulaire en fonction des différentes protéines

Nous allons donc essayer de mettre en évidence le rôle du facteur protéique dans la croissance des cellules. Pour cela, nous allons travailler en présence d'un milieu de culture défini en hormones de croissance et en substituant le sérum de veau foetal par différentes protéines.

Les cellules sont alors mises en culture dans des solutions de protéines (albumine de porc, γ globuline, fétuine, thyroglobuline, albumine pure bovine) dans un milieu de base MEM contenant de la transferrine (10 $\mu\text{g/ml}$), de l'insuline

(8 $\mu\text{g/ml}$) et une association d'antibiotiques (100 U/ml de pénicilline et 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine).

On note les résultats dans le tableau X

Tableau X : Croissance des cellules MCF7 en présence de différentes solutions protéiques

Conditions	Moyenne du nombre de cellules 10^3	ADN en $\mu\text{g/ml}$
T PSA 0,1%	84	26,4
T PSA 0,1% + E	140	20,8
T glob 0,1%	76	29,2
T glob 0,1% + E	92	23,6
T Fétuine 0,025%	43	34,8
T Fétuine 0,025% + E	63	32
T Thyroglobuline	70	29,2
T Thyroglobuline + E	90	29,2
T AP Sigma 0,25 %	116	13
T A Sigma 0,25 % + E	155	15

On remarque que les diverses protéines agissent différemment les unes des autres dans la prolifération cellulaire. Ainsi certaines sont plus efficaces et plus propices à la culture des cellules MCF7.

Ainsi on note que :

- . La fétuine induit une faible croissance cellulaire même si celle-ci est additionnée d'estradiol.

- . La thyroglobuline et la γ globuline ont une influence pratiquement équivalente sur la prolifération.

- . La croissance des cellules est la meilleure en présence d'albumine qu'elle soit de porc ou de boeuf.

- . Le nombre de cellules obtenu est plus élevé lorsque le milieu est supplémenté en estradiol et ceci quelque soit le type de protéine.

On remarque également que le taux d'ADN est d'autant plus élevé que le nombre de cellules est faible. Cela signifie donc que les cellules ne se divisent pas.

En résumé, l'efficacité des protéines par ordre croissant est :

Fétuine < Thyroglobuline < globuline < Albumine pure de porc < Albumine pure de boeuf

On conclut donc, que parmi ces 5 protéines la meilleure pour la croissance des cellules MCF7 est l'albumine pure de boeuf à la concentration de 0,25 %.

Nous continuerons donc notre étude en supplémentant le milieu de culture par de l'albumine pure de boeuf à la place du sérum de veau foetal.

Pour cela, nous étudierons l'influence de l'origine de l'albumine mais également l'influence de la concentration de l'albumine utilisée.

V - Croissance cellulaire en fonction de l'origine de l'albumine

Les cellules MCF7 sont mises en culture dans un milieu de base MEM supplémenté en transferrine (10 $\mu\text{g/ml}$) et insuline (5 $\mu\text{g/ml}$) en présence de deux albumines pure d'origine différentes à la concentration de 0,25 % :

- albumine purifiée Silab
- albumine purifiée Sigma fraction V (Réf. A 9306)

Les résultats sont reportés dans le tableau XI.

Tableau XI : Influence de l'origine de l'albumine pure sur la croissance cellulaire après 7 jours d'incubation.

Conditions	Moyenne du nombre de cellules $10^3/\text{ml}$	Concentration d'ADN en $\mu\text{g/ml}$
T I A Silab 0,25%	102	8,35
T I A Sigma 0,25%	116	13

On constate que les deux albumines ont un effet comparable en ce qui concerne la prolifération cellulaire exprimée en nombre de cellules x 1000/ml.

La concentration en ADN est quant à elle inférieure lorsqu'on utilise l'albumine pure SILAB.

Par ailleurs, l'albumine pure SIGMA est utilisée à des concentrations différentes : 0,25 % et 0,025 %.

On observe dans le tableau XII un effet mitogène important à la concentration de 0,025 % alors que l'effet est nettement inférieur à une concentration 10 fois supérieure, et ceci même en présence d'estradiol.

Tableau XII : Influence de la concentration d'albumine pure sur la croissance cellulaire et la concentration d'ADN après 7 jours d'incubation.

Conditions	Moyenne du nombre de cellules $10^3/\text{ml}$	Concentration d'ADN en $\mu\text{g}/\text{ml}$
T A Sigma 0,025%	312	21
T A Sigma 0,25%	116	13
T A Sigma 0,25% + E	155	15

Nous avons donc étudié l'effet de différentes concentrations d'albumine sur la croissance cellulaire.

VI - Croissance cellulaire en fonction de la concentration d'albumine pure

Les cellules MCF7 sont mises en culture dans le milieu de base sans rouge de phénol additionné de transferrine (10 $\mu\text{g/ml}$), d'insuline (5 $\mu\text{g/ml}$) et d'albumine pure Silab à des concentrations croissantes allant de 0 à 1 %.

Tableau XIII : Influence de la concentration d'albumine pure sur la croissance cellulaire après 7 jours d'incubation.

Conditions	Moyenne du nombre de cellules $10^3/\text{ml}$	Quantité de DNA en $\mu\text{g/ml}$
T I	241	24,4
T I A 0,010%	290	28,8
T I A 0,025%	360	37,2
T I A 0,10%	229	28,8
T I A 0,25%	132	21,6
T I A 0,50%	73	14,3
T I A 1%	41	7,2

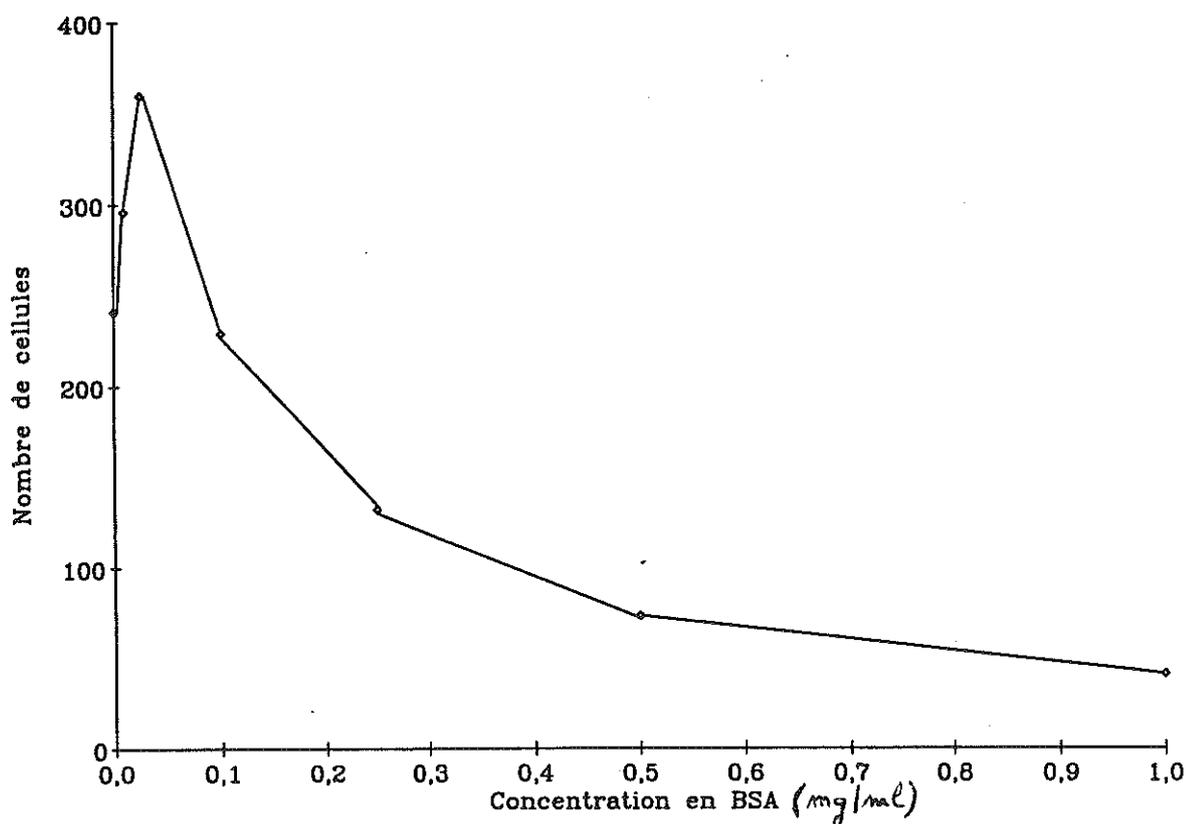


Figure 10 : Croissance des cellules MCF7 en présence de concentrations croissantes d'albumine (%)

On remarque d'après les résultats obtenus, portés dans le tableau XIII et la figure 10 que l'albumine pure Silab à un effet mitogène pour des concentrations comprises entre 0,01 et 0,10 % avec un maximum pour la concentration de 0,025 %.

A des taux plus importants (supérieur à 0,10 %) l'albumine pure a alors un effet inhibiteur puisque le nombre de cellules obtenu est inférieur à celui produit en absence d'albumine purifiée.

On note également une quantité d'ADN importante lorsque la prolifération des cellules est à son maximum.

Remarque :

La même étude est effectuée en présence d'estradiol 10^{-8} M.

On constate que le nombre de cellules est supérieur à celui obtenu sans addition d'estradiol et que la prolifération cellulaire est également maximale pour une concentration d'albumine pure égale à 0,025 %.

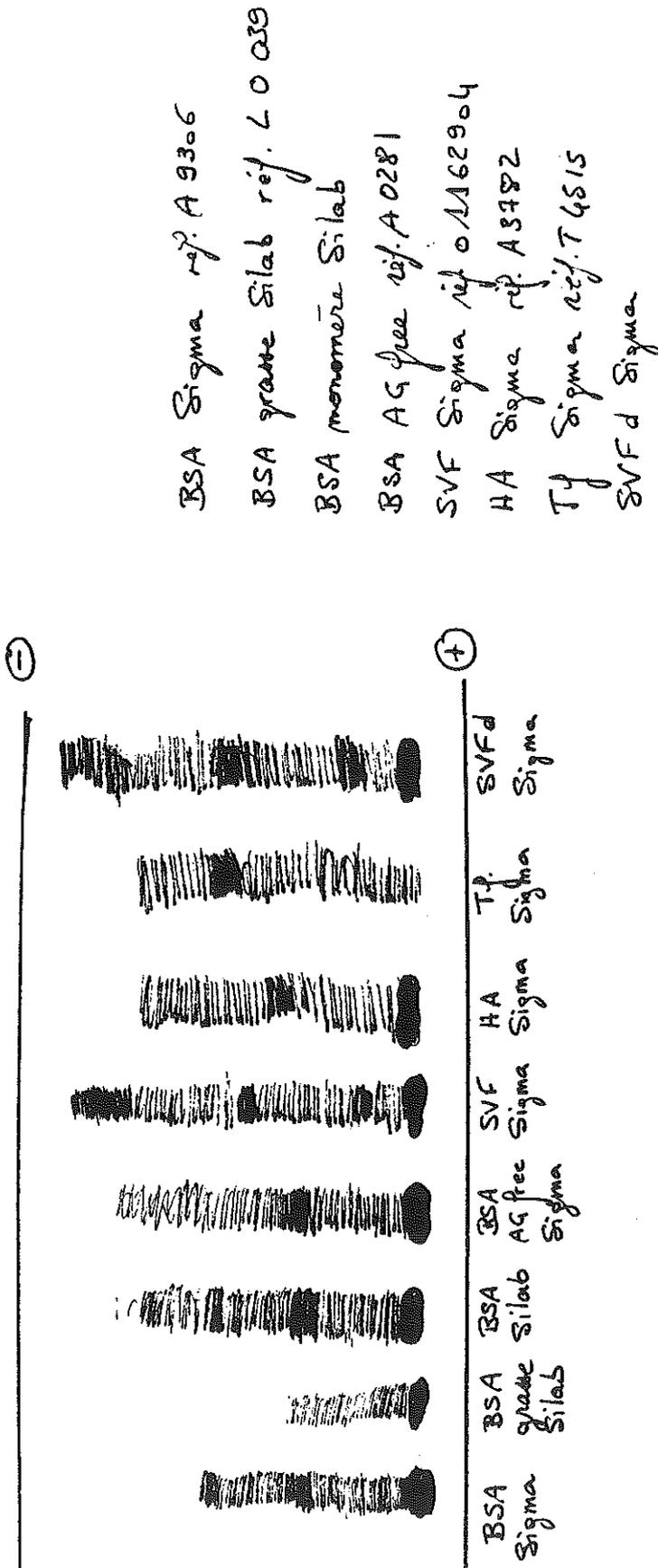
On en déduit donc que l'estradiol a un effet mitogène sur la prolifération des cellules MCF7 et que cet effet est supérieur en présence d'albumine pure.

VII - Electrophorèse

L'albumine présentant un effet mitogène pour de faibles concentrations, il ne peut que cet effet soit dû à facteurs protéiques contenus dans cette fraction. Aussi nous allons étudier l'éventuelle hétérogénéité de la fraction albuminique quelle que soit l'origine par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Les résultats obtenus sont montrés sur les figures 11.

Nous pouvons constater que les différentes albumines utilisées contiennent des fractions non albuminiques.



Electrophorèse en gel de polyacrylamide
à 7%.

DISCUSSION

I - Variabilité de l'effet des sérums

Notre travail expérimental sur les cellules MCF7 montre que les différents sérums de veau ne sont pas équivalents et ne possèdent pas les mêmes propriétés en ce qui concerne la prolifération des cellules cancéreuses mammaires en culture *in vitro*.

En effet, on a pu montrer que le sérum Sigma ne permet pas une multiplication correcte des cellules, inférieure de plus de 10 fois à celle des cellules cultivées en présence de SVF Boy.

Ceci provient essentiellement des variations qu'il existe dans la composition des sérums, que ce soit au niveau des hormones, des facteurs de croissance ou bien encore des minéraux ou des éléments nutritifs tels que glucose ou protéines.

Ces résultats se rapprochent de ceux de CAILLEAU et al. 1957 qui montrent que la composition d'un sérum varie d'une espèce à l'autre et même d'un animal à l'autre.

Puis les travaux de HONN et al. 1975 et plus récemment ceux de MACLEOD et DRUMMOND 1980 démontrent que des lots différents d'un même sérum sont de composition distincte.

De plus, il est montré par PRICE et GREGORY 1982 que le taux des composants influe sur la croissance des cellules en culture *in vitro* : une forte proportion d'hormones de croissance et une limitation des endotoxines sont favorables à la croissance des cellules RAJII et VERO E6. Mais, les cellules réagissent différemment à la composition du milieu : le manque d'estradiol induit une diminution de croissance des cellules estrogéno-dépendantes (MCF7, ZR-75-1,

T-47D), l'absence de dexaméthasone provoque une stimulation de la croissance des cellules MCF7 alors qu'elle diminue celle des BT 20 (CALVO et al. 1984).

D'autre part, nous avons pu également constater au cours de notre étude, que le mode d'utilisation du sérum, en l'occurrence celui de l'Institut Jacques Boy, influence la prolifération des cellules MCF7.

On a montré qu'il est plus efficace à la croissance cellulaire si il est utilisé immédiatement après décongélation et déconditionnement. Il se produit peut être durant les 4 mois de conservation une oxydation entraînant ainsi une dégradation du sérum. Par conséquent, des souches cellulaires en culture sont altérées et leur développement ne se fait pas correctement.

Cette détérioration s'accompagne d'une carence en facteurs d'attachement et de croissance puisque les cellules sont peu nombreuses, petites, facilement détachables de leur support (beaucoup de surnageant) et poussent en dômes.

II - Influence des facteurs

Nous avons pu remarquer l'importance des facteurs de croissance, l'insuline, et de transport, la transferrine, au cours de nos travaux expérimentaux de cultures. En pratique, elles rentrent toutes deux dans la composition de presque tous les milieux de culture définis (BARNES et SATO, 1980) et l'absence de l'une d'elles ou des deux provoque l'inhibition de la croissance de cinq lignées cellulaires : MDA-MB-231, ZR 75-1, BT - 20, T-47D et notamment des MCF7 (CALVO et al. 1984). Elles permettent donc d'obtenir une croissance, un développement satisfaisant et une différenciation des cellules.

L'insuline, bien sûr, joue un rôle primordial dans le métabolisme de la cellule que ce soit au niveau du transport du glucose ou de son utilisation : elle permet l'obtention de sources d'énergie telles que glycogène ou protéines qui représentent le moyen de développement des cellules. PORETSKY et KALIN, 1987

mettent en évidence l'action de l'insuline sur la synthèse de gonadotrophines et plus particulièrement sur la synthèse de la LH par des cellules de la thèque porcine (BARBIERI et al. 1983). MAGOFFIN et ERICKSON, 1988 confirment le rôle de l'insuline sur la synthèse des stéroïdes, facteurs de croissance tels que la progestérone.

D'autre part, il est montré que la souche de cellules MCF7 répond à de faible taux d'insuline avec augmentation de la synthèse d'ADN, d'ARN et d'acide gras et donc, par conséquent qu'elle est insuline dépendante avec des récepteurs à insuline (MONACO et LIPPMAN 1976 ; OSBORNE et al. 1976 ; OSBORNE et al. 1978) mais sans pour cela provoquer la multiplication des cellules MDA-MB-231 à court terme.

Au contraire BARNES et SATO, 1979 expliquent que l'insuline est le composant le plus criticable du milieu de culture et que son absence ne provoque pas l'effondrement de la croissance cellulaire que suggère CALVO et al. 1984. De même que ALLEGRA et LIPPMAN 1978 décrivent un milieu de culture avec insuline et transferrine capables d'induire la croissance des cellules ZR-75-1 et ne pouvant assurer par contre la prolifération des MCF7.

La transferrine quant à elle est aussi essentielle à la survie de la cellule par son rôle de transport et essentiellement de fer. Tous les auteurs s'accordent à en supplémenter leur milieu de culture de base pour milieu défini.

Ainsi nos résultats se rapprochent de ceux de VANDEWALLE et al. 1988 qui montrent que l'addition d'estradiol à un milieu supplémenté en transferrine provoque une multiplication des cellules plus importante.

III - Variabilité de l'albumine

Nous avons pu montrer lors de nos travaux sur l'influence de l'albumine dans le milieu de culture, que la concentration la plus efficace sur la prolifération cellulaire est de 0,025 % soit une faible quantité et qu'un taux d'albumine pure de 0,25 % dans le milieu provoque une croissance équivalente à celle obtenue dans un milieu supplémenté par 10 % de SVF.

Ensuite des concentrations plus élevées d'albumine pure provoquent une inhibition de la croissance.

Ainsi à partir de 0,10 % d'albumine c'est un effet inhibiteur de la croissance qui se produit sur les cellules MCF7. Ceci peut être dû à une saturation en protéines qui alors entraîne une toxicité du milieu. Mais cette diminution de croissance peut être en faveur de l'hypothèse de STROBL et LIPPMAN 1979 : l'albumine fait sortir l'estradiol contenu dans des cellules oestrogénodépendantes préalablement cultivées dans un milieu additionné de sérum de veau foetal à 10 %. La croissance des cellules est alors freinée par carence intracellulaire en estradiol. La sortie d'estradiol est d'autant plus importante que le taux d'albumine est important.

Ceci conforte les résultats obtenus lors de la culture sans rouge de phénol. En effet, de la même façon que précédemment l'albumine en absence de rouge de phénol inhibe la prolifération cellulaire en soustrayant l'estradiol des cellules. Par contre, cet effet est compensé par la présence de rouge de phénol dans la 2^{ème} expérience : en effet le rouge de phénol a un effet estrogénique (BERTHOIS et al. 1986) qui permet de remplacer l'estradiol déficient.

Il est donc préférable pour obtenir une multiplication cellulaire correcte d'utiliser une concentration d'albumine faible, inférieure à 0,10 %. D'autant plus que cela produit un caractère mouillant à la BSA qui est favorable à l'action de la transferrine.

Cette albumine doit être pure ou contenant de faible proportion d'acide gras pour pouvoir être capable d'assurer une multiplication des cellules. En effet, nos résultats prouvent que l'albumine grasse SILAB est toxique pour les cellules, ce qui est en accord avec l'étude de CAILLEAU et al. 1957 qui montre que les acides gras en forte quantité (supérieure à $0,4 \mu\text{moles/mg}$) nuisent au développement de la culture.

Ces données rappellent celles de L. BRUNET, 1992. La prolifération des cellules MCF7 est inhibée par des acides gras omega 3 et plus particulièrement par l'acide α linoléinique, l'acide cis-5, 8, 11, 14, 17 eicosapentaénoïque et l'acide cis-4, 7, 10, 13, 16, 19 docosahexaénoïque l'EPA et DHA à des concentrations optimales de 10^{-6} M.

De même, NAJID et al. 1989 proposait que l'acide arachidonique et l'acide 15-hydropéroxyeicosatétraénoïque avaient un effet inhibiteur pour une concentration de 10^{-5} M alors qu'il obtient des courbes de croissance très proches de celles des cellules témoins à 10^{-7} M.

Certains auteurs suggèrent également que ce sont les métabolites formés, et donc des peroxydes d'acides gras les responsables de l'augmentation de la multiplication cellulaire (GONZALEZ et al. 1991). Ils agiraient par inactivation des polymérase en bloquant le fonction SH (ROUBAL et TAPPEL 1966).

Cela est confirmé par l'addition d'antioxydant tel que la vitamine E, qui limite la production de peroxydes et donc limite par conséquent la prolifération des cellules (COHEN 1986 ; BRUNET 1992).

SPEIKER - POLET et POLET 1991 montre que l'effet des acides gras est fonction de la longueur et de la configuration des doubles liaisons. Par contre, la position des doubles liaisons n'a pas d'influence. Ils établissent une combinaison optimale d'acides, formée d'acide palmitique (25 %) et oleique (33 %) afin d'obtenir une croissance satisfaisante.

Enfin l'étude électrophorétique des différentes fractions protéiques commerciales montre que celles-ci ne sont pas pures à 100 % comme elles sont annoncées. Il serait donc nécessaire que leurs composition soient :

- soit définies afin de mieux connaître les fractions accompagnantes qui peuvent éventuellement jouer un rôle sur la prolifération cellulaire (augmentation ou diminution)

- soit constantes d'un lot à l'autre afin d'obtenir des résultats reproductibles.

De toutes façons, afin de mieux maîtriser la culture cellulaire en milieu défini, il serait bon que la composition soit connue et constante.

Enfin, à travers ces résultats l'action de l'albumine mérite réflexion et devrait permettre d'expliquer le mode d'action des hormones stéroïdes. Il est en effet troublant que la croissance cellulaire en présence d'albumine sans rouge de phénol soit diminué, cela pose alors le problème du rôle de l'albumine et de son trafic intracellulaire. Si l'on retient les travaux de STROBL et LIPPMAN 1979, il semblerait donc que l'on doive reconsidérer le mode d'action de l'estradiol. Ceci devrait donc avoir des conséquences importantes dans l'explication du mode d'action du tamoxifène mais aussi dans l'interaction des différentes hormones ovariennes et surrénaliennes circulantes (BOCCUZZI et al. 1992).

Ainsi, à partir de ces travaux et compte tenu de la définition précise du milieu de culture qui en résulte, il serait bon de poursuivre ces travaux en mimant *in vitro* les situations hormonales *in vivo*. Ce qui permettrait de donner un éclairage nouveau du rôle des protéines plasmatiques de transport, des hormones ainsi que du mode d'action des antihormones.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - **ADOLPHE M.**
In Culture de cellules animales.

Applications Méthodologies 1988, Paris, Editions INSERM p. XIII-XVII

- 2 - **ALKHALAF M., PROPPER A.Y., ADESSI G.L.**
Proliferation of guinea-pig uterine epithelial cells in serum-free culture conditional : effect of 17 β estradiol epidermal growth factor and insulin.

Journal Steroid Biochem. Molec. Biol. 1991, 345-350

- 3 - **ALLEGRA J.C., LIPPMAN M.E.**
Growth of a human breast cancer cell line in serum-free hormone supplementing medium.

Cancer Res. 1978, **38** : 3823-3829

- 4 - **BARBIERI R.L., MAKRIS A., RYAN K.J.**
Effects of insulin on steroidogenesis in cultured porcine ovarian theca.

Fertil Steril 1983, **40** : 237

- 5 - **BARNES D. et SATO G.**
Growth of a human mammary tumour cell line in a serum-free medium.

Macmillan Journals Lid. 1979, 388-389

- 6 - **BARNES D., SATO G.**
Method for growth of cultured cells in serum-free medium.

Anal. Biochem. 1980, **102** : 255-270

- 7 - **BERTHOIS Y., KATZENELLENBOGEN J.A.,
KATZENELLENBOGEN B.S.**
Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen : Implication concerning the study of estrogen responsive cells in culture.

Cell Biology 1986, 2496-2500
- 8 - **BOCCUZZI G., BRIGNARDELLO E., DI MONACO M., FORTE C.,
LEONARDI L., PIZZINI A.**
Influence of dehydroepiandrosterone and 5-En-androstene-3 β , 17 β -diol on the growth of MCF-7 human breast cancer cells induced by 17 β -estradiol.

Anticancer Research 1992, 12 : 799-804
- 9 - **BOONE C.W., MANTEL N., CARUSO T.D., KAZAM Jr. E. and
STEVENSON R.E.**
Quality control studies on fetal bovine serum used in tissue culture.

In Vitro 1992, 7 : 174-189
- 10 - **BRIAND P. and LYKKESFELDT A.E.**
Long term cultivation of a human breast cancer cell line, MCF7, in a chemically defined medium effect of estradiol.

Anticancer Research 1986, 85-90
- 11 - **BRUNET L.**
Influence des acides gras omega-3 sur la croissance de cellules cancéreuses mammaires en culture (MCF-7).

Thèse de Pharmacie de Limoges 1992
- 12 - **CAILLEAU R., HOARD D., ZITCER E.M.**
Chemical composition of some sera and cells used in tissue cultures.

Ex Resp. Biol. Med. 1957, 15 : 250-259

- 13 - **CALVO F., BROWER M., CARNEY D.N.**
Continuous culture and soft agarose cloning of multiple human breast carcinoma cell lines in serum-free medium.

Cancer Research 1984, 44 : 4553-4539
- 14 - **COHEN L.A.**
Dietary fat and mammary cancer. In : Diet nutrition and cancer a critical evaluation. Vol 1 : macro nutrients and cancer.

Boca Raton : CRC Press, 1986, 77-100
- 15 - **DARBRE P.D., CURTIS S., KING R.J.B.**
Effects of estradiol and tamoxifen on human breast cancer cells in serum free culture.

Cancer Research 1984, 44 : 2790-2793
- 16 - **ESBER H.J., PAYNE I.J., BOGDEN A.E.**
Variability of hormone concentrations and ratios in commercial sera used for tissue culture.

Journal of the National Cancer Institute 1973, 50 : 559-562
- 17 - **FROGER B., ADOLPHE M.**
Besoin nutritifs des cellules en culture . En culture de cellules animales.

Applications Méthodologiques 1988, Paris Edition INSERM p. 9-15
- 18 - **GONZALES M.J., SCHEMMEL R.A., GRAY J.I., LEROY DUCAN J.R., SHEFFIELD L., WELSCH C.W.**
Effect of dietary fat on growth of MCF-7 and MDA-MB 231 human breast carcinomas in athymic nude mice relationship between carcinoma growth and lipid peroxydation product levels.

Carcinogenesis 1991, 12 : 1231-1235

- 19 - **HONN V., SINGLEY A. and CHAVIN W.**
Fetal Bovine Serum : A Multivariate Standard.

Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1975,
149 : 344-347
- 20 - **MACLEOD A.J. and DRUMMOND O.**
Serum quality : an analysis of its components.

Dev. Biol. Stand. 1980, 46 : 17-20
- 21 - **MAGOFFIN D.A., ERICKSON G.F.**
An imposed method for primary culture of ovarian androgen producing cells
in serum-free medium effect of lipoproteins, insulin and insulinlike growth
factor -I.

In Vitro Cellular and Developmental Biology 1988, 862-870
- 22 - **MELSERT R., BOS D.J.M., VAN DER LINDEN R.F., FISHER M.J.E.,
WILTING J., JANSSEN L.H.M., HOOGERBRUGGE J.W. et
ROMMERTS F.F.G.**
The stimulatory effect of albumin of luteinizing hormone stimulated Leydig
cell steroid production depends on its fatty acid content and correlates with
conformational changes.

Molecular and Cellular Endocrinology 1991, 82 : 23-32
- 23 - **MONACO M.E., LIPPMAN M.E.**
Insulin increases fatty acid synthesis in human breast cancer in tissue culture.

Endocrinology 1976, 98 : 126

- 24 - **NAJID A., BENEYTOU J.L., TIXIER M.**
Cytotoxicity of arachidonic acid and of its lipoxygenase metabolite 15 hydroperoxy eicosatetraenoic acid on human breast cancer MCF-7 cells in culture.

Cancer Letters 1989, **46** : 137-141
- 25 - **NAJID A., NICOLAS A., TIXIER M., HABRIOUX G.**
Mitogenic effect of estradiol on MCF7 human breast cancer cells can be modulated by serum.

Experimental Cell Biology 1989, 139-145
- 26 - **OSBORNE C.K., BOLAN G., MONACO M.E., LIPPMAN M.E.**
Hormone responsive human breast cancer in long term tissue culture IV. The effect of insulin.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 73 1976, 4536-4540
- 27 - **OSBORNE C.K., MONACO M.E., LIPPMAN M.E. et KAHN C.R.**
Correlation among insulin binding, degradation and biological activity in human breast cancer cells in long term tissue culture.

Cancer Research 1978, **38** : 94-102
- 28 - **PETROSSIAN A., CORTESSIS G.P.**
Large scale production of monoclonal antibodies in defined serum-free media in air lift bioreactors.
- 29 - **PRAMOD T., PENTO J.J.**
Growth medium for the evaluation of antiestrogenic compounds in MCF7 cell culture.

Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacology 1991, 595-598

30 - PRICE P.J., GREGORY E.A.

Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement.

In Vitro 1982, **18** : 576-583

31 - PRORETSKY L., KALIN M.F.

The gonadotropic function of insulin.

Endocrine Revue 1987, **8** : 132-141

32 - ROUBAL W.T. et TAPPEL A.L.

Damage to proteins, enzymes and aminoacids by the peroxidings lipids.

Ach. Biochem. Biophys. 1966, **113** : 5-8

33 - RUEDL C., CAPELETTI V., CORADINI D., GRANATA G., DI FRONZO G.

Influence of culture conditions on the estrogenic cell growth stimulaiton of human breast cancer cells.

J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 1990, 195-200

34 - SALLE V., SOUTTOU B., MAGNIEN V. ISRAEL L., CREPIN M.

Facteurs de croissance des cellules épithéliales de mastopathies et de carcinomes du sein en primoculture.

Bull. Cancer 1992, **79** : 133-140

35 - SOULE H.D., VASQUEZ J., LONG A., ALBERT S. and BRENNAN M.

A human cell line from a pleural effusior derived from a breast carcinoma.

J. Nat. Cancer Inst. 1973, **51** : 1409-1416

36 - SPIECKER-POLET H. et POLET H.

Requirement of a combination of a saturated and an unsaturated free fatty acid and a fatty acid carrier protein for in vitro growth of lymphocytes.

Journal of Immunology N° 3, 1981, **126** : 949-954

37 - STROBL J.S. et LIPPMAN M.E.

Prolonged retention of estradiol by human breast cancer cells in tissue culture.

Cancer Research 1979, **39** : 3319-3327

38 - VANDEWALLE B., REVILLION-CARETTE F. et LEFEBVRE J.

Involvement of cell surface transferrin receptor in the assessment of estradiol stimulating effect on cultured breast cancer cell.

Anticancer Research 1988, 495-498

TABLE DES MATIERES

PLAN	13
1ère partie : La culture cellulaire	18
I - Introduction	19
II - Les milieux de culture	20
2ème partie : Travaux expérimentaux	25
MATERIELS ET METHODES	26
I - Cultures cellulaires	27
II - Conditions de travail - Stérilité	27
III - Préparation du milieu de culture	28
IV - Supplémentation du milieu de culture	28
V - Entretien de la souche MCF7	29
1- Préparation de la solution saline tamponnée au phosphate-EDTA STP EDTA	29
2 - Préparation de la solution trypsine - EDTA (0,05 % - 0,02 %) .	29

3 - Décollement des cellules MCF7	30
VI - Congélation des cellules MCF7	30
1 - Milieu de congélation	30
2 - Méthode de congélation	31
VII - Décongélation des cellules MCF7	31
VIII - Comptage des cellules	31
IX - Dosage de l'ADN	32
1 - Méthode au bromure d'éthidium	32
a - Principe	32
b - Les réactifs	33
c - Dosage de l'ADN	33
d - Gamme étalon.....	33
2 - Méthode du DAPI	34
a - Principe	34
b - Les réactifs	34
c - Dosage de l'ADN	34
d - Courbe étalon	35

X - Electrophorèse en gel de polyacrylamide	35
1- Réactifs	35
2 - Préparation du gel	36
3 - Matériel	36
 RESULTATS	 37
 I - Croissance cellulaire en fonction de l'origine du sérum de veau	 38
 II - Croissance cellulaire en présence d'albumine	 42
1 - Comparaison albumine pure - albumine grasse	55
2 - Comparaison albumine pure - sérum de veau foetal	56
 III - Croissance cellulaire en fonction des différents facteurs	 57
1 - Influence de l'albumine, insuline, transferrine, estradiol	57
2 - Influence du rouge de phénol.....	60
 IV - Croissance cellulaire en fonction des différentes protéines	 62

V - Croissance cellulaire en fonction de l'origine de l'albumine	65
VI - Croissance cellulaire en fonction de la concentration d'albumine pure	67
VII - Electrophorèse	69
DISCUSSION	71
I - Variabilité des sérums	72
II - Influence des facteurs	73
III - Variabilité de l'albumine	75
BIBLIOGRAPHIE	78
TABLE DES MATIERES	86

RESUME

La difficulté apparue dans les travaux de différents chercheurs pour étudier des actions hormonales avec un milieu de culture contenant du sérum de veau foetal à conduit à se pencher sur le problème des milieux de culture définis.

Notre étude a porté sur l'étude de la croissance de cellules cancéreuses mammaires MCF7 en lignée continue dans un milieu de culture sans sérum de veau foetal.

Pour ces cellules, un milieu de base (MEM) doit être additionné de transferrine, d'insuline et d'estradiol.

Le facteur protéique a particulièrement été étudié. Parmi différentes protéines étudiées, l'albumine pure dépourvu d'acides gras semble la plus adéquate. Sa concentration dans le milieu doit être comprise entre 0,0025 % et 0,01 % (p/v).

Toutefois il a été montré que pour obtenir un effet mitogénique maximum de l'estradiol, sa concentration devait être de 0,025 %.

De plus l'importance d'un indicateur coloré comme le rouge de phénol a été étudié.

L'intérêt d'un tel milieu est qu'il permet de mieux comprendre l'estrogénodépendance des cellules MCF7.

Mots clés : Albumine
Milieux définis
Croissance cellulaire
MCF7
Facteur protéique