

**PSE: Encapsulation liposomale d'une molécule aux propriétés antioxydantes, la (-)-catéchine, et développement d'un test *in vitro* de métabolisme cellulaire**

**Méthodes et protocoles**

Sommaire

- I. Biochimie
  - 1. Formation de liposomes et encapsulation de la catéchine
  - 2. Contrôle de la taille des liposomes
- II. Biologie cellulaire
  - 1. Culture cellulaire
  - 2. Test de cytotoxicité

**I. Biochimie**

1. Formation de liposomes et encapsulation de la catéchine

**Matériel:**

- L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (Sigma Aldrich, P3782-100MG)
- cholestérol (Sigma Aldrich,
- Chloroforme (Sigma Aldrich)
- Solution saline dans un tampon phosphate (PBS, pH 7.4, référence: 10010001).
- ((-)-Catechin (issue du thé vert) (Sigma Aldrich, référence : C0567-5MG)

**Protocole: hydratation en couche mince**

Initialement, les solutions stock de phospholipides et de cholestérol sont préparées. Pour la première, 100 mg de phosphatidylcholine sont dissous dans 10 mL de chloroforme et, pour la deuxième, 100 mg de cholestérol sont dissous dans 10 mL de chloroforme.

Pour chaque échantillon, sont additionnés 125  $\mu$ L de la solution de phospholipides et 250  $\mu$ L de la solution de cholestérol dans un tube à essai. Ensuite, le solvant est évaporé avec l'aide d'un flux d'azote et les tubes sont posés dans un dessiccateur, *overnight*. Ainsi, les couches minces de lipides sont formées.

L'étape suivante est la réhydratation des couches qui s'effectue par l'addition de 1 mL de solution de PBS. Dans certains tubes, un aliquot de 0,23 mL de solution de fluorescéine (solution mère à 1000 mg fluorescéine/L de tampon PBS) a été ajouté, et le volume de PBS additionné a été réduit conformément. Pour les liposomes contenant de la catéchine, une solution 0,5% (v/v) de catéchine dans le PBS a été ajoutée. Le résultat est une solution de liposomes avec une large distribution de taille.

2. Contrôle de la taille des liposomes

Les ultrasons sont capables de décomposer les grands liposomes multilamellaires en SUV de taille inférieure à 100 nm. L'effet responsable de la décomposition des liposomes est la cavitation, qui

consiste en l'apparition et l'effondrement de bulles de gaz, provoquant d'importantes différences de pression locale.

### **Protocole de sonication**

De cette façon, un appareil ultrason a été utilisé pour décomposer les liposomes et ainsi uniformiser leur taille. Les paramètres de l'appareil ont été optimisés, donc on a testé:

- Amplitude: 20, 30 et 40%
- Temps de sonication: 15 et 30 minutes
- Présence de fluorescéine
- Présence de catéchine

### **Évaluation de la taille**

Afin de vérifier la réussite du procédé de sonication, les solutions ont été étudiées à l'aide de la diffusion dynamique de la lumière. Pour cela, les solutions de liposomes ont été diluées 100 fois et analysées avec l'appareil zetasizer. Les solutions ont aussi été observées à l'aide de la microscopie de fluorescence, pour bien vérifier la forme et la présence des liposomes (via la fluorescéine).

## **II. Biologie cellulaire**

### **1. Culture cellulaire**

#### **Matériel:**

#### **Commandé:**

-Antibiotiques-antimycotiques (100x) (Gibco Thermofisher, référence: 15240096) (37,96 euros).

#### **Récupéré à l'ESPCI et ses environs:**

-Cellules MDCK (Madin Darby Canine Kidney) (Sigma Aldrich, référence: 84121903): 1 million de cellules par cryotube (récupérées auprès d'Isabelle Bonnet, chercheuse à l'Institut Curie);

-Milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco Thermofisher, référence: 11965092);

-Fetal Bovine Serum (FBS, MaxSpec) (Thermofisher, référence: A4766801);

-Antibiotiques-antimycotiques (100x) (Gibco Thermofisher, référence: 15240096) (37,96 euros).

-Trypsine-EDTA (0,25 %), rouge de phénol (Gibco Thermofisher, référence: 25200056);

-Solution saline dans un tampon phosphate (PBS, pH 7.4, référence: 10010001);

-Tubes Falcon 50 mL , 15 mL, flasques de culture T25, pipettes 10 mL, pipetboy, béchers, micropipettes...

-Incubateur, réglé sur 37°C et 5% en CO<sub>2</sub>, 95% d'humidité relative (bouteille de CO<sub>2</sub> récupérée via le partenariat ESPCI-Air Liquide).

## Protocoles

### *A noter:*

Pour la culture cellulaire, notamment dans le cadre du PSE où le poste de sécurité microbiologique est également utilisé par des groupes travaillant sur des bactéries, il est primordial de penser à désinfecter complètement les surfaces et le matériel, avec un désinfectant (Aniosurf), avant et après la manipulation.

Toutes les semaines, on change le bac d'eau dans l'incubateur, pour éviter une contamination.

Au début de la culture cellulaire: dans la bouteille de milieu de culture, on ajoute les suppléments (le mélange antibiotiques-antifongiques à 1% vol/vol et le sérum de veau foetal à 10 % vol/vol).

- *Décongélation des cellules*

Isabelle Bonnet, chercheuse à l'Institut Curie, nous a fourni les cellules MDCK congelées dans un cryotube, que l'on a ramené dans un bac à glace jusqu'au laboratoire de PSE. Le tube est décongelé rapidement (2 minutes) dans un bain-marie à 37°C. Le but de cette étape est de se débarrasser du DMSO, qui peut abîmer les membranes de cellules et qui est présent dans le milieu de congélation.

Le contenu du cryotube est versé dans une flasque T25, suivi du milieu de culture préchauffé à 37°C (6 mL). La flasque est placée à l'incubateur à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> et 95 % d'humidité relative. Entre deux à vingt-quatre heures plus tard, on change le milieu par du milieu neuf: on peut le faire dès que les cellules sont attachées au fond de la flasque.

- *Passage cellulaire*

Cette manipulation est effectuée tous les 4 jours environ (quand les cellules couvrent 80% de la surface de la flasque).

Les aliquots de milieu de culture (8 mL), de PBS (5 mL) et de trypsine (2 mL) sont placés dans un bain-marie à 37°C pendant 20 minutes.

La flasque de culture est sortie de l'incubateur, le milieu de culture est enlevé de la flasque. On lave la flasque avec les 5 mL de PBS (on incline la flasque de façon à arroser les parois latérales et pas directement le fond de la flasque, pour ne pas abîmer les cellules). Après avoir enlevé le PBS, on ajoute la trypsine (0,5 mL) et la flasque est placée à l'incubateur pendant deux minutes. On vérifie au microscope que les cellules se sont bien détachées. Pour neutraliser la trypsine, on ajoute du milieu de culture (1 mL) et on transfère le tout dans un tube Falcon que l'on centrifuge à 1000 rpm pendant trois minutes. A la sortie de la centrifugeuse, on observe un culot de cellules au fond du tube. On enlève le surnageant, puis on ajoute le milieu de culture (6 mL) et on homogénéise à la pipette. Le contenu du tube est versé dans une nouvelle flasque annotée "Initiales de l'expérimentateur, nom des cellules, numéro du passage, date" et placée à l'incubateur (après avoir compté le nombre de cellules).

Le milieu de culture est remplacé par du milieu neuf préchauffé à 37 degrés deux jours plus tard.

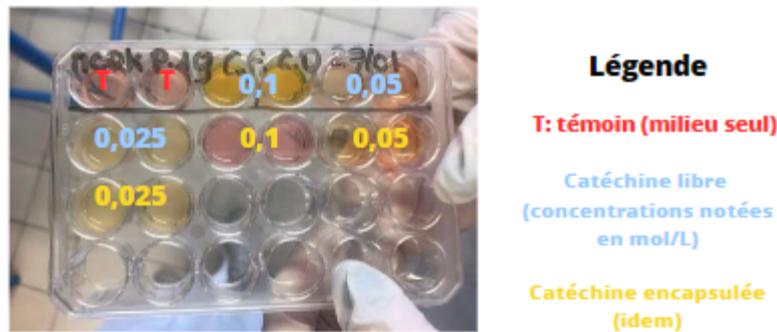
L'expérience de passage est à nouveau effectuée lorsque les cellules deviennent confluentes.

## 2. Test de cytotoxicité

Lors d'un passage cellulaire, les cellules sont en partie ensemencées dans une flasque et en partie sur une plaque 96 puits (de manière homogène, afin d'avoir approximativement le même nombre de cellules par puits).

Quelques jours plus tard, lorsque l'on estime qu'il y a suffisamment de cellules par puits (50 000 cellules), le milieu est remplacé par du milieu neuf dans lequel la solution de catéchine encapsulée a

été diluée. Différentes concentrations en catéchine sont ainsi testées. Le plan de plaques suivi est montré ci-dessous (*figure 1*).



*Figure 1*: Plan de plaque de l'expérience.

Les mesures ont été effectuées en duplicats pour une meilleure représentativité des résultats (nous n'avions pas assez de cellules pour réaliser des triplicats).

La plaque est placée à l'incubateur pendant trois jours, à l'issue desquels le milieu est à nouveau changé (pour enlever les cellules mortes, qui sont détachées). Les puits sont observés au microscope, les cellules comptées. On prend des photos dans les différents puits, que l'on analyse sur image J.

On a ainsi pu observer la cytotoxicité de la catéchine, en comparant le nombre de cellules vivantes pour les différentes concentrations en catéchine liposomale encapsulée ou libre et le témoin (milieu seul).

L'idée de départ était de réaliser un test de métabolisme cellulaire afin d'évaluer l'effet antioxydant de la catéchine sur les cellules (effet qui pourrait être intéressant à la fois en cosmétique ou en pharmaceutique). Cependant, le test commandé n'est jamais arrivé, c'est pourquoi l'on s'est concentré sur le test de cytotoxicité, qui permet de sélectionner les concentrations en catéchine pour lesquelles la mortalité cellulaire est inférieure à celle du témoin sans catéchine. Ce sont ces concentrations qui auraient été utilisées ensuite dans le test de métabolisme.