

10/12/2019



Evaluation des effets thérapeutiques du dioxyde de chlore, de l'acide alpha lipoïque et de l'hydroxycitrate dans les lignées de glioblastome dérivées de patients






1. OBJECTIFS

Selon le contrat signé entre l'Association VAINCRE et l'Institut du Cerveau et de la Moelle le 23 juillet 2018, nous avons évalué les propriétés anti-prolifératives de l'acide alpha lipoïque (ci-dessous nommé AAL) et de l'hydroxycitrate de calcium (ci-dessous nommé HC) en combinaison, avec ou sans le dioxyde de chlore (ci-dessous nommé DC), dans nos lignées de glioblastome (GBM) dérivées de patients (GBM PDCLs). Ces lignées ont la particularité d'être cultivées en condition de neurosphères, en l'absence de sérum de veau, contrairement aux lignées disponibles commercialement. Cette technique de culture cellulaire favorise le maintien des propriétés souches des cellules tumorales et le maintien des altérations moléculaires des tumeurs parentales dont elles dérivent.

A la fin de la période d'exposition des GBM-PDCLs aux composés (i.e. AAL, HC et DC), le WST-1 est ajouté aux puits, et laissé incuber 3 h. L'absorbance est ensuite lue à 450 nm. La lecture d'absorbance est proportionnelle à la viabilité et au nombre de cellules par puits. La valeur des puits expérimentaux est comparée aux puits contrôles.

Au vu des premiers résultats obtenus, des études complémentaires non contractuelles ont été entreprises en modifiant les conditions d'exposition aux composés, et en ajoutant différents contrôles. Le rapport est donc présenté en 6 sections, où chaque section rapporte les résultats de 6 différentes conditions d'essais.

2. VALIDATION DU RAPPORT D'ÉTUDE:

Version	Commentaire	Approbateur	signature	Date
1	Version initiale	Direction de l'installation d'essai		06/01/2020
		Ahmed Idbah Directeur de l'étude		06.01.2020
		Maité Verreault		
2	Amendement	Directeur de l'étude		06.01.2020
	Prolongation de 8 mois, jusqu'au 22 septembre 2019	Maité Verreault		

3. PERIODE DE COMPLÉTION

Date de début: 3 septembre 2018

Date de fin: 10 décembre 2019

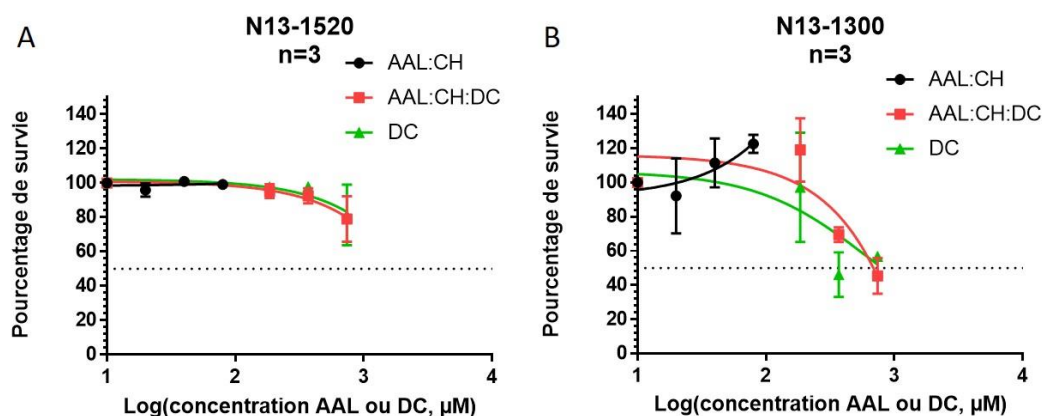
4. RESULTATS

4.1 ETUDES FINALES:

Selon la méthodologie décrite dans le contrat (tableau ci-dessous), nous avons testé l'effet de l'AAL et du HC en combinaison, à un ratio AAL : HC de 1 : 5, avec ou sans ajout de DC, sur deux de nos PDCLs (N13-1300 et N13-1520). Les cellules ont été exposées aux composés pendant 96h, avec un remplacement de l'ensemble du milieu de culture, comprenant les composés expérimentaux, tous les jours, deux fois par jour. Pour les deux graphiques, l'axe des abscisses indique la concentration de AAL pour la condition AAL seul, et la concentration de DC pour les conditions AAL:HC:DC et DC seul. Les résultats montrés sont la compilation de 3 expériences indépendantes.

Condition	Concentrations AAL (μM)	Concentrations HC (μM)	Concentrations DC (μM)
Contrôle	0	0	0
Conc 1 (0.5X)	20	100	0
Conc 2 (1X)	40	200	0
Conc 3 (2X)	80	400	0
Conc 1 (0.5X)	20	100	185
Conc 2 (1X)	40	200	370
Conc 3 (2X)	80	400	740
Conc 1 (0.5X)	0	0	185
Conc 2 (1X)	0	0	370
Conc 3 (2X)	0	0	740

Pour la N13-1520 (graphique A), la combinaison AAL:HC:DC ainsi que la condition DC ont tous les deux réduit de 20% la viabilité cellulaire aux plus hautes doses testées. La combinaison AAL:HC n'a pas impacté la prolifération cellulaire. Pour la N13-1300 (graphique B), la combinaison AAL:HC:DC ainsi que la condition DC seule ont tous les deux réduit de 50% la prolifération cellulaire. Dans cette lignée, la combinaison AAL:HC n'a pas non plus impacté la prolifération.



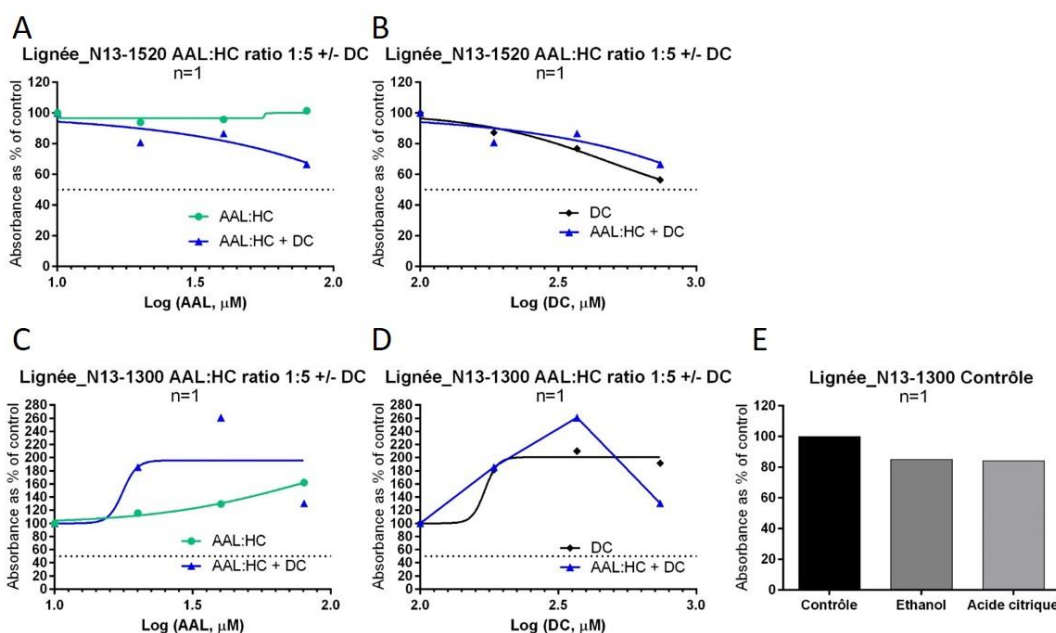
4.2 ETUDE 1:

Ce projet a été initié en septembre 2018, et plusieurs tests ont été réalisés afin d'optimiser les différentes conditions d'essai. Ici, nous rapportons dans l'ordre chronologique tous les résultats obtenus au cours de l'année 2018-2019, où 7 groupes d'expériences indépendantes ont été réalisées, en plus des 3 essais contractuels compilés dans les graphiques finaux présentés en 4.1.

Pour cette première étude, les cellules ont été exposées aux composés du tableau précédent pendant 96h, avec un remplacement de 50% du milieu de culture, comprenant les composés expérimentaux, tous les jours, deux fois par jour. Nous avons choisi de ne pas remplacer l'ensemble du volume de milieu dans les puits afin d'éviter de décoller les cellules tumorales qui adhèrent faiblement aux fonds des puits pré-coatées avec de la laminine. Les volumes rajoutés prennent toutefois en compte la dilution des composés expérimentaux le milieu restant dans les puits.

Les résultats suivants montrent un léger effet anti-prolifératif (30% de diminution de la prolifération cellulaire) de la combinaison AAL:HC + DC sur la N13-1520 aux plus hautes concentrations testées (Conc 3 ; graphique A). L'effet observé est toutefois similaire à celui observé avec le DC seul sur cette lignée (graphique B). Pour les deux graphiques A et C, l'axe des abscisses indique la concentration de AAL, alors que pour B et D, l'axe des abscisses indique la concentration de DC.

En ce qui concerne la N13-1300, les différentes combinaisons ne diminuent pas la prolifération cellulaire, et semblent même l'augmenter en présence de DC i.e. valeurs d'absorbance supérieures à celles des contrôles non-traités (graphiques B et D). Pour cette première étude, nous avons évalué sur la N13-1300 l'effet des solvants utilisés pour resoudre les composés, i.e. l'éthanol pour l'AAL et l'acide citrique pour le DC, à des concentrations équivalentes à celles présentes pour les plus hautes concentrations testées des composés expérimentaux. L'éthanol et l'acide citrique ont tous les deux réduit la prolifération cellulaire de 15% (graphique E).



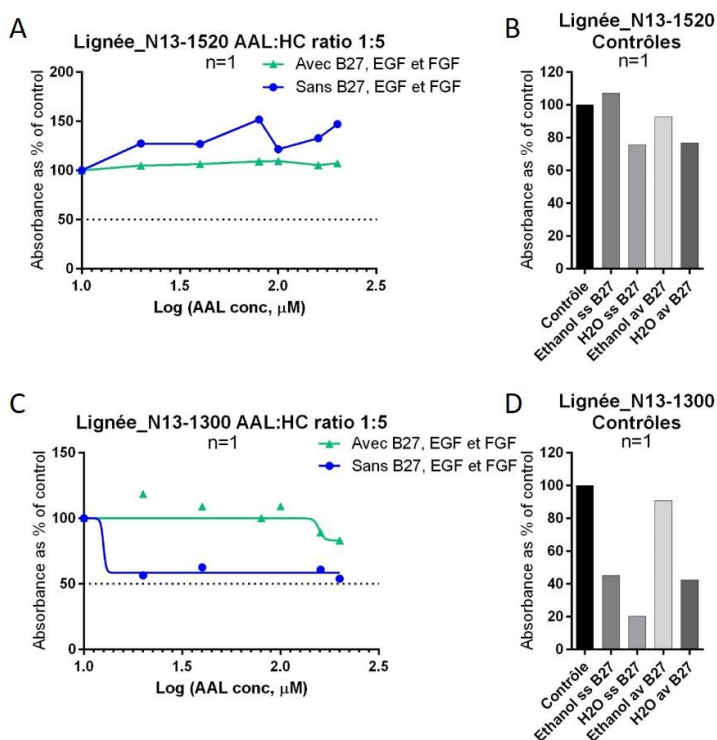
ETUDE 2:

Pour les études suivantes, suite à une discussion avec le Dr Laurent Schwartz, nous avons focalisé nos efforts sur la combinaison de l'AAL et du HC seulement, aux concentrations indiquées dans le tableau ci-dessous, où le ratio 1 :5 est conservé. Nos milieux de culture des GBM-PDCL comportent du B27, EGF et FGF afin de préserver la survie de nos cellules tumorales. Nous avons toutefois évalué si la présence de B27/EGF/FGF avait influencé l'impact de la combinaison des composés expérimentaux sur nos cellules. Les cellules ont été exposées aux composés expérimentaux pendant 96h, avec un remplacement de 50% du milieu de culture contenant les composés tous les jours, deux fois par jour.

Condition	Concentrations AAL (μM)	Concentrations HC (μM)
Contrôle	0	0
Conc 1 (0.5X)	20	100
Conc 2 (1X)	40	200
Conc 3 (2X)	80	400
Conc 4 (3X)	120	600
Conc 5 (4X)	160	800
Conc 6 (5X)	200	1000

Pour la N13-1520 (graphique A), les conditions expérimentales sans B27/EGF/FGF n'ont pas réduit la prolifération cellulaire par rapport aux conditions contrôles (i.e. avec B27/EGF/FGF). A noter que le contrôle H₂O, solvant utilisé pour le HC, a légèrement diminué (25%) la prolifération cellulaire à la concentration équivalente à celle présente pour la plus haute concentration de HC testée (graphique B). Pour les deux graphiques, l'axe des abscisses indique la concentration de AAL.

Pour la N13-1300 (graphique C), la condition avec B27/EGF/FGF diminue légèrement (17%) la prolifération aux concentrations des composés expérimentaux les plus hautes. Dans la condition sans B27/EGF/FGF, on observe une diminution de la prolifération de près de 50% dès les premières doses testées. Il est toutefois important de noter que sur cette lignée, les contrôles éthanol et H₂O ont réduit la prolifération cellulaire de plus de 50% dans les conditions sans B27/EGF/FGF (graphique D). Il est donc impossible dans cette étude de conclure sur cette lignée en absence de B27/EGF/FGF.

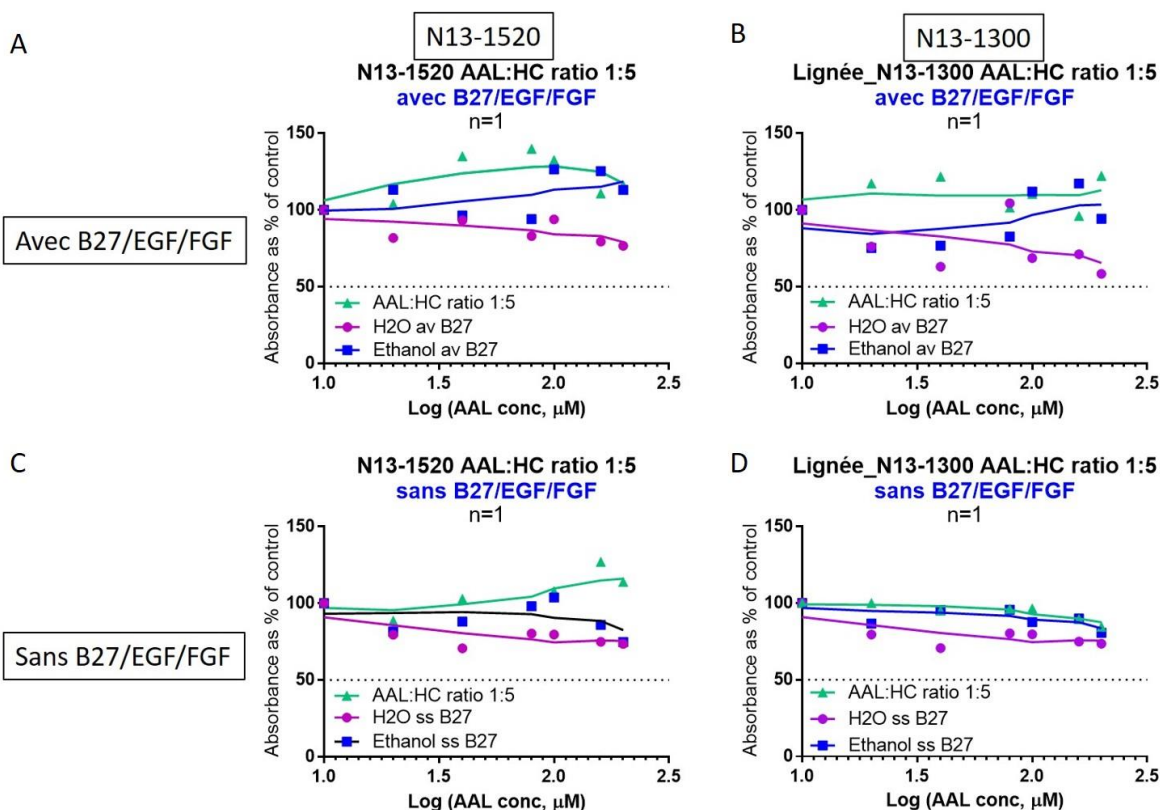


4.3 ETUDE 3:

Pour l'étude suivante, nous avons donc effectué une gamme de contrôles plus complète, en plus de la combinaison des composés expérimentaux testée. Les cellules ont été exposées aux composés expérimentaux pendant 96h, avec un remplacement de 50% du milieu de culture, contenant les composés expérimentaux, tous les jours, deux fois par jour.

La combinaison n'a pas réduit la prolifération de la N13-1520, dans les conditions avec (graphique A) ou sans B27/EGF/FGF (graphique C). Les contrôles éthanol et H2O ont induit une légère diminution de la prolifération (0-20%) selon les conditions. Pour les quatre graphiques, l'axe des abscisses indique la concentration de AAL.

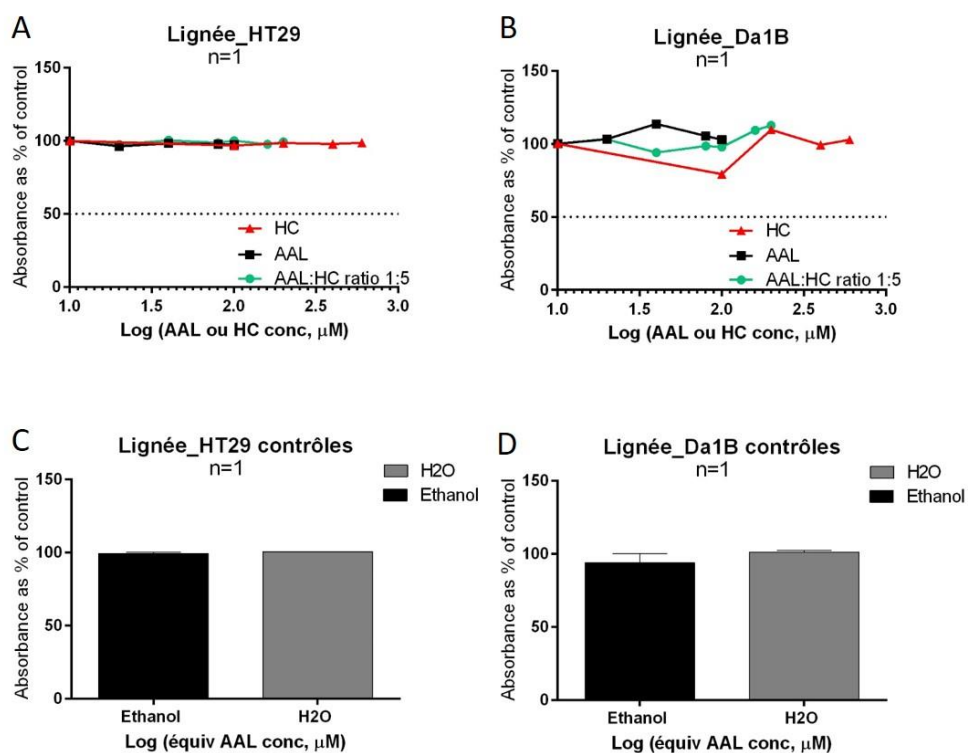
La combinaison n'a pas affecté la prolifération de la N13-1300 dans la condition avec B27/EGF/FGF (graphique B), mais l'a diminuée légèrement (15%) dans la condition sans B27/EGF/FGF (graphique D). Toutefois, encore une fois, la gamme H2O a affecté la prolifération des cellules 5-40% selon les concentrations, en présence ou en absence de B27/EGF/FGF.



4.4 ETUDE 4:

Afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux obtenus précédemment par les collègues du Dr Laurent Schwartz, on nous a remis les lignées HT26 et Da1B, lesquelles se cultivent en milieu DMEM 10% sérum de veau. Les cellules ont été exposées aux composés expérimentaux pendant 72h, sans remplacement de milieu de culture au cours de la période d'exposition aux composés expérimentaux. Pour les deux graphiques, l'axe des abscisses indique la concentration de AAL pour les conditions AAL et AAL :HC, et en concentration de HC pour la condition HC seul.

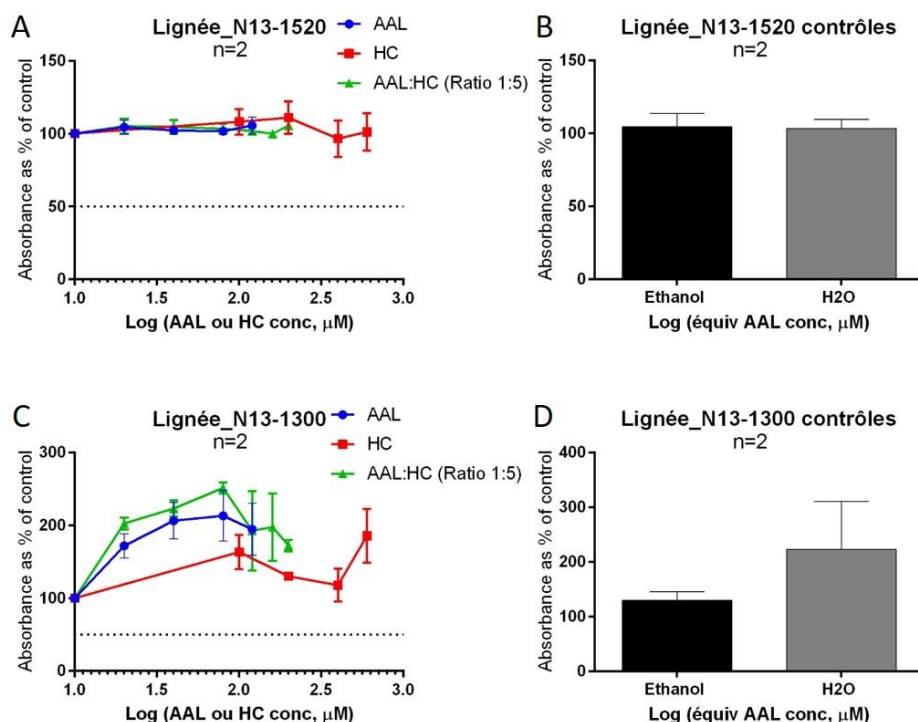
Dans nos mains, ni la combinaison AAL/HC, ni les composés expérimentaux seuls n'ont impacté la prolifération des cellules tumorales pour ces deux lignées. Les contrôles éthanol et H2O n'ont pas affecté la prolifération.



4.5 ETUDES 5 ET 6:

L'équipe de Dr Laurent Schwartz nous a par la suite indiqué que le HC qu'ils nous avaient remis n'était peut-être par le bon. En effet, nous avons travaillé avec l'hydroxycitrate de potassium, alors que les travaux de l'équipe du Dr Laurent Schwartz utilisaient sur l'hydroxycitrate de calcium. Nous avons donc commandé les nouveaux produits chez Sigma© et les avons testés sur nos lignées de GBM-PDCL. Les cellules ont été exposées aux composés expérimentaux pendant 144h, sans remplacement du milieu de culture comportant les composés expérimentaux au cours de la période d'exposition. Nous avons répété cette étude une deuxième fois, les résultats montrés sont donc la compilation de deux expériences indépendantes. Pour les deux graphiques, l'axe des abscisses indique la concentration de AAL pour les conditions AAL et AAL:HC, et la concentration de HC pour la condition HC seul.

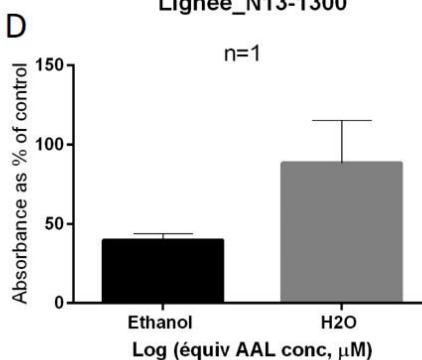
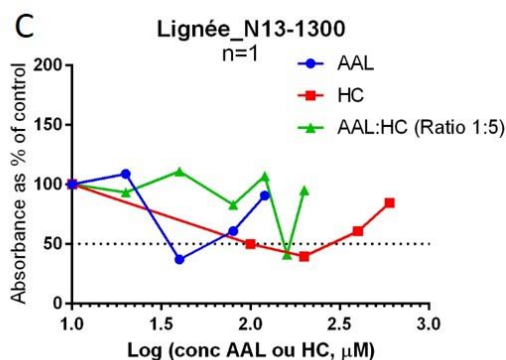
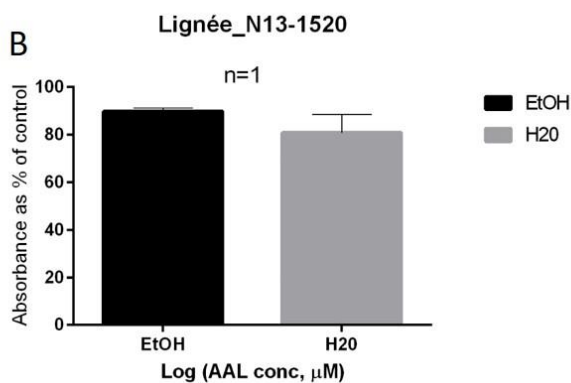
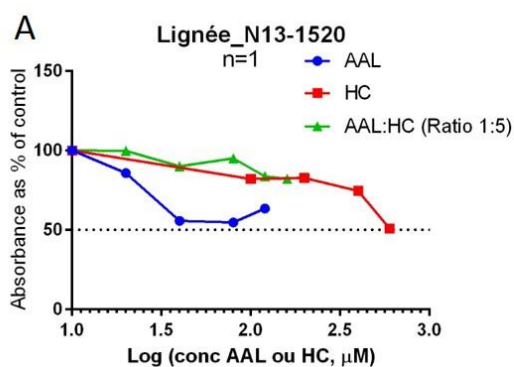
Dans cette étude, ni la combinaison, ni les deux composés expérimentaux seuls n'ont impacté la prolifération cellulaire. Les contrôles éthanol et H₂O n'ont pas non réduit la prolifération.



4.6 ETUDE 7:

Pour l'étude suivante, nous avons remplacé l'intégralité du milieu de culture à 48h et 120h, pour une exposition totale de 144h aux deux composés expérimentaux seuls ou en combinaison. Pour la N13-1520, qui adhère mieux dans les puits que la N13-1300, nous avons observé une diminution de près de 50% de la prolifération cellulaire avec le AAL seul dès la concentration à 40 μM (graphique A). Les doses plus élevées n'ont pas réduit davantage la prolifération. Une diminution de 50% de la prolifération est également observée avec le HC à 1000 μM . Toutefois, lorsque les deux composés expérimentaux sont combinés, un maximum de 15% de réduction est observé aux plus hautes concentrations. Les contrôles éthanol et H2O ont également diminué de 10-20% la prolifération. Pour les deux graphiques, l'axe des abscisses indique la concentration de AAL pour les conditions AAL et AAL:HC, et la concentration de HC pour la condition HC seul.

Pour la N13-1300 (graphique C), cette lignée adhérant beaucoup moins bien aux fonds des puits, une variabilité importante est observée entre les réplicats en raison du retrait probable de cellules à chaque remplacement du volume complet de milieu de culture dans les puits. Il est donc impossible de conclure sur cette lignée dans cette étude.



5. CONCLUSIONS

L'objectif de ce projet était d'évaluer l'efficacité de la combinaison de l'AAL :HC avec ou sans le DC.

Les données présentées en 4.1 nous permettent de conclure que la combinaison AAL :HC n'a pas d'impact sur la prolifération des deux GBM-PDCL utilisées.

L'ajout de DC à cette combinaison diminue la prolifération cellulaire de 20 à 50% selon la lignée testée, mais cet effet semble s'expliquer essentiellement par la présence du DC, cet agent seul ayant également diminué la prolifération des cellules de la même façon.

L'AAL seul semble toutefois réduire la prolifération de la GBM-PDCL N13-1520 dans l'étude 7 (section 4.6), où les nouveaux composés ont été testés avec un remplacement de l'ensemble du milieu de culture contenant les composés expérimentaux, tous les jours, deux fois par jour. Cependant, le résultat montré en 4.6 n'est issu que d'une seule expérience, et ces conditions n'ont pas été répliquées dans le cadre du présent contrat. De plus, les conditions de cette expérience n'ont pas permis de conclure sur la deuxième GBM-PDCL.

Les conclusions obtenues ne sont valables que dans les conditions expérimentales utilisées dans le cadre de ce projet.