

## COMPARAISON DES EFFETS DU PLOMB ET DU CADMIUM SUR DES LIGNÉES CONTINUES DE CELLULES DE MAMMIFÈRES

Y. ŠKREB, V. HABAZIN-NOVAK et Đ. HORVAT

*Institut de recherches médicales et de médecine du travail, Zagreb, Yougoslavie*

### RÉSUMÉ

---

On a entretenu en culture asynchrone en couche monocellulaire, 4 lignées de cellules de mammifères: une cancérogène (HeLa), une transformée (rat XC) et deux normales (rein de rat et hamster chinois V 79). Le milieu nutritif MEM a été enrichi pendant différents temps de 0 à 30 heures en chlorure de plomb ou en chlorure de cadmium.

Différents paramètres ont été étudiés: le taux de prolifération d'une population asynchrone, la capacité d'une cellule viable à former une colonie, le taux d'incorporation de la thymidine tritiée, l'activité mitotique et les aberrations chromosomiques.

Les résultats obtenus sur les quatre souches se ressemblent par le caractère des effets toxiques dont l'intensité diffère suivant la lignée cellulaire (normale, transformée ou cancéreuse), le métal (plomb ou cadmium) la concentration du sel métallique et la durée de l'incubation.

On confirme que sans être spécifique, le taux d'incorporation de la thymidine tritiée est jusqu'ici un des paramètres les plus sensibles pour évaluer rapidement le degré de toxicité des métaux lourds sur les cellules animales en culture.

---

Les métaux lourds tels que le plomb<sup>7</sup> ou le cadmium<sup>5</sup> sont connus pour produire de graves intoxications aiguës ou chroniques suivant les conditions dans lesquelles l'organisme humain se trouve à leur contact.

Les critères biologiques pour évaluer la toxicité de ces métaux ont une valeur variable<sup>8</sup>.

À côté des manifestations organiques visibles, consécutives à une intoxication, il existe au niveau cellulaire des effets qui décelés à temps permettent de détecter le début d'une intoxication et d'en évaluer la gravité. De nombreuses études *in vivo* chez l'homme et chez l'animal ont permis d'établir la complexité du mode d'action des métaux lourds au niveau cellulaire. Une fois dans la cellule, les métaux lourds se lient d'une façon plus ou moins spécifique et durable à différentes structures<sup>16</sup>. Ils produisent en particulier des altérations des acides nucléiques par suite d'interactions avec les phosphates et les liaisons avec

les bases. Ils modifient entre autre la perméabilité de la membrane altérant la synthèses des protéines ainsi que les phosphorylations oxydatives.

Ils interfèrent avec de nombreux processus enzymatiques dans les cellules d'organes et de tissus variés. Ils peuvent aussi induire des effets mutagènes, cancérogènes<sup>12</sup> et tératogènes<sup>19</sup>.

Comparés aux systèmes *in vivo*, les cultures de cellules de mammifères de souches établies constituent un modèle expérimental accessible pour l'étude du mécanisme de l'action d'agents de l'environnement tels que les métaux lourds comme pour l'élaboration de tests relatifs à l'évaluation de leur toxicité. Depuis longtemps Verne et Sannié<sup>17</sup> avaient ouvert la voie en comparant les effets de nombreux sels métalliques sur les cellules en culture.

Nous avons montré que le chlorure de plomb ajouté au milieu de culture des cellules HeLa produisait une inhibition temporaire des synthèses macromoléculaires qui devenait réversible quand les cellules étaient remises dans du milieu normal<sup>14</sup>. Ces résultats sont comparables à ceux de Fischer<sup>3,4</sup> pour d'autres cellules et des conditions d'incubation différentes. Nous avons confirmé ces premiers résultats sur deux autres souches et comparé avec les effets du chlorure de cadmium<sup>15</sup>.

Dans ce présent travail, nous avons voulu étendre ces recherches à une autre souche de cellules normales en appliquant des paramètres qui se sont montrés extrêmement fructueux en radiobiologie cellulaire

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

On a entretenu en culture asynchrone, en couche monocellulaire 4 lignées de souches établies suivant nos méthodes déjà décrites<sup>14,15</sup>. Une souche de cellules cancéreuses est représentée par les cellules HeLa, une de cellules transformées par les cellules de rat XC, 2 souches sont normales: rein de rat NRK et hamster chinois V 79.

Après repiquage, les cellules en phase exponentielle sont mises à incuber avec du milieu MEM enrichi de 3 concentrations différentes de chlorure de plomb ou de cadmium (p.a. Kemika, Zagreb): une faible concentration  $10^{-5}M$ , une moyenne  $5 \times 10^{-5}M$  et une forte  $2,5 \times 10^{-4}M$ . Les concentrations maximum ont été choisies parce qu'elles ne modifiaient pas les propriétés du milieu et ne produisaient pas de précipité durant nos expériences.

Les conséquences de cette incubation avec les sels métalliques ont été suivies en premier lieu sur la prolifération cellulaire. Un certain nombre de flacons ont étéensemencés avec une même suspension ( $10^5$  cell./ml). Dix à douze heures plus tard les différents solutions de sels métalliques ont été ajoutées. Pour chaque intervalle de temps choisi, 3 flacons ont été trypsinés et les cellules comptées.

La capacité de clonage des cellules viables a été évaluée en ensemençant un petit nombre de cellules par flacon (40–50 cell./ml) et en les traitant ensuite par les sels métalliques pendant différents temps. Au bout de 8 ou 14 jours les colonies ont été colorées au violet cristal et comptées.

La synthèse de l'acide désoxyribonucléique (DNA) a été suivie par le taux d'incorporation de la thymidine tritiée  $^3\text{H}$ -TdR ( $0.2 \mu\text{Ci/ml}$ , act. spec.  $5 \text{ Ci/mmole}$ , Amersham, U K) évalué à l'aide de la technique de comptage en scintillation liquide que nous avons mise au point<sup>14,15</sup>.

L'index mitotique a été calculé pour des populations de 2000 cellules soumises à chaque traitement, et après fixation au Carnoy, colorées par le Giemsa.

Les aberrations chromosomiques ont été identifiées sur 200 plaques métaphasiques de chaque catégorie de cellules traitées, grâce à une adaptation de la technique de Moorhead.

### RÉSULTATS

Les courbes de prolifération cellulaire ont été établies d'après le nombre de cellules en fonction du temps (Figure 1). A faible concentration, les 2 sels ne produisent qu'un bref ralentissement de la croissance des cellules HeLa. La forte concentration de chlorure de plomb bien qu'exerçant un ralentissement prononcé de la croissance est moins toxique que la moyenne concentration de cadmium qui tue les cellules. La forte concentration de cadmium tue rapidement toutes les

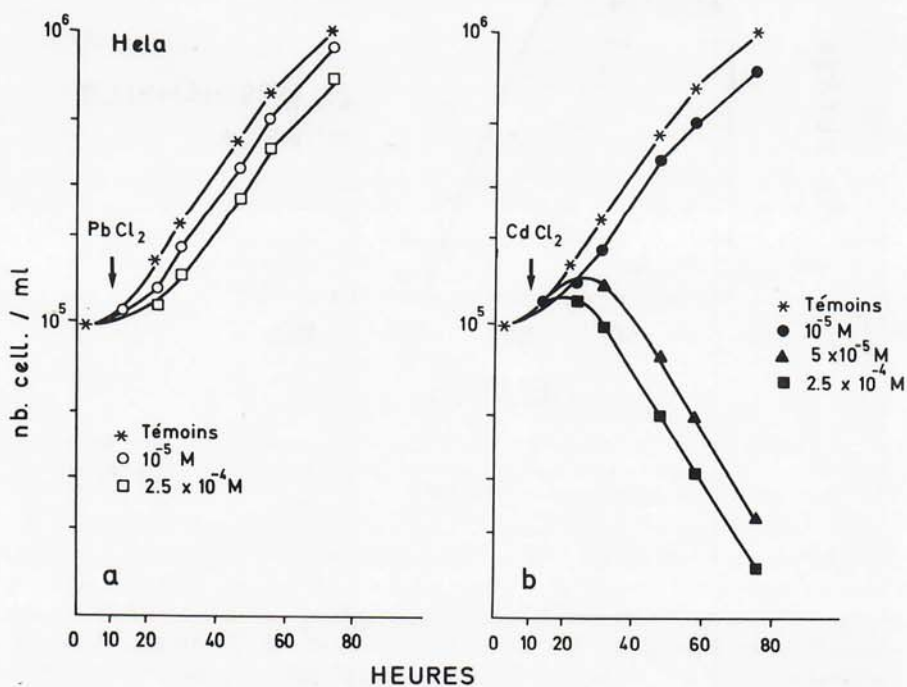


FIG. 1 - Cinétique de prolifération des cellules HeLa en présence de différentes concentrations de chlorures métalliques: a: chlorure de plomb; b: chlorure de cadmium; abscisse: temps en heures; ordonnée: nombre de cellules/ml.



cellules. Les rapports entre la toxicité des différentes concentrations sont semblables pour les autres souches malgré différents temps de duplication.

Sur la Figure 2 sont représentés par rapport aux témoins de 100%, les pourcentages de colonies formées après différentes durées d'incubation dans le chlorure de plomb  $5 \times 10^{-5}M$ , des cellules HeLa et de hamster chinois V 79. Le nombre total de colonies diminue en fonction du temps, beaucoup plus vite pour les cellules HeLa que pour celles de hamster chinois V79. De plus le nombre des colonies de taille réduite augmente proportionnellement avec la durée de l'incubation.

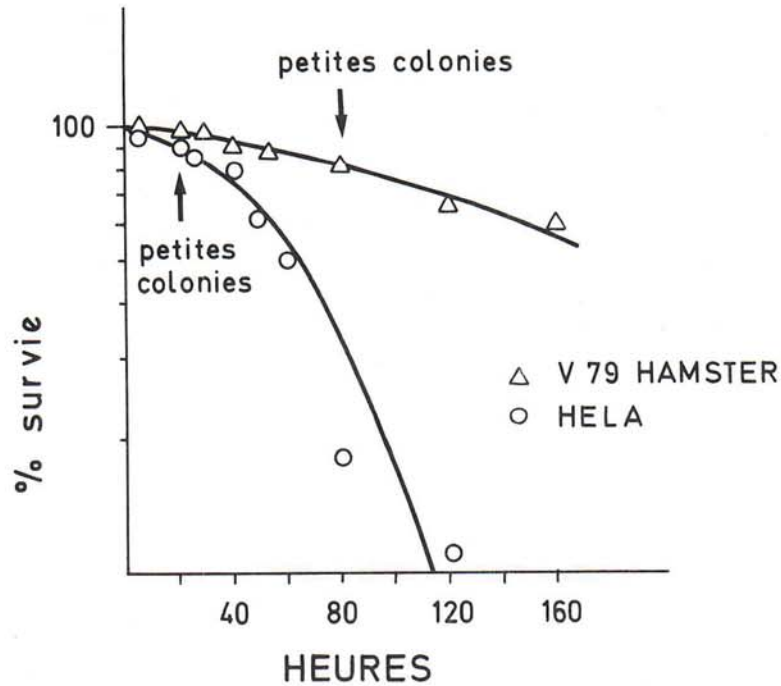


FIG. 2 - Action du chlorure de plomb ( $5 \times 10^{-5}M$ ) sur la capacité des cellules HeLa (O) et hamster chinois V 79 ( $\Delta$ ) à former des colonies; abscisse: temps en heures; ordonnée: pourcentage de colonies formées par rapport aux témoins 100%.

Le taux de synthèse du DNA évalué par l'incorporation de la thymidine tritiée est représenté sur la Figure 3 par rapport aux témoins (100%) pour les 4 souches. En ce qui concerne le chlorure de plomb  $2,5 \times 10^{-4}M$  la courbe d'inhibition est biphasique. De 20 à 30% pendant les 6-10 premières heures, l'inhibition atteint 50% au bout de 20 heures. Le chlorure de cadmium à moyenne concentration produit au bout de 2 heures une inhibition allant jusqu'à 50% puis pendant quelques heures le taux remonte, l'incorporation devient presque normale et est à nouveau inhibée jusqu'à 40% environ au bout de 20 heures. Il est

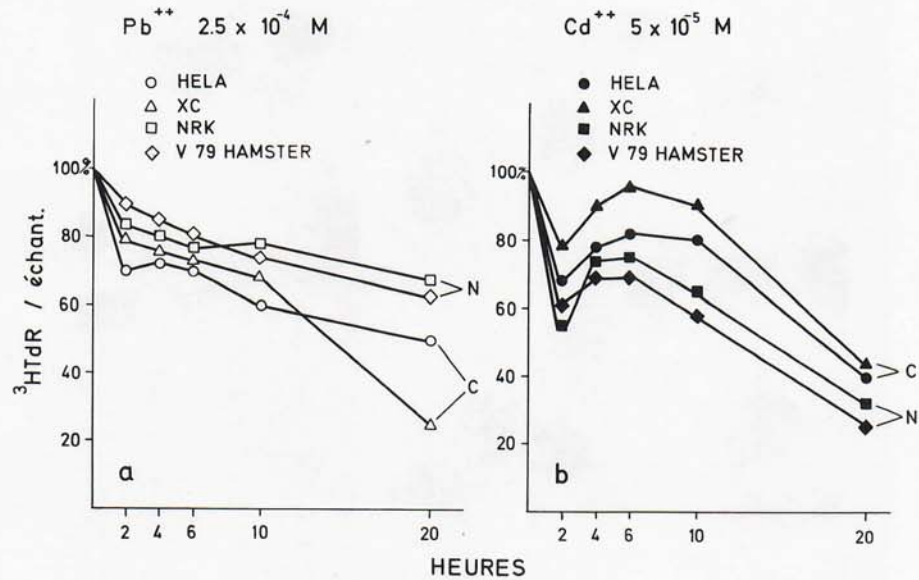


FIG. 3 - Taux d'incorporation de la thymidine tritiée dans les 4 souches; a: chlorure de plomb ( $2,5 \times 10^{-4}M$ ); b: chlorure de cadmium ( $5 \times 10^{-5}M$ ); abscisse: temps en heures; ordonnée: % de c.p.m. dans les cellules traitées par rapport aux témoins de 100%; N: cellules normales; C: cellules cancéreuses ou transformées



FIG. 4 - Effet du chlorure de plomb ( $5 \times 10^{-5}M$ ) pendant 24 heures sur l'index mitotique des cellules HeLa. (Microscope Orthoplan Leitz, oculaire 10, objectif immersion à huile 100/1.30).

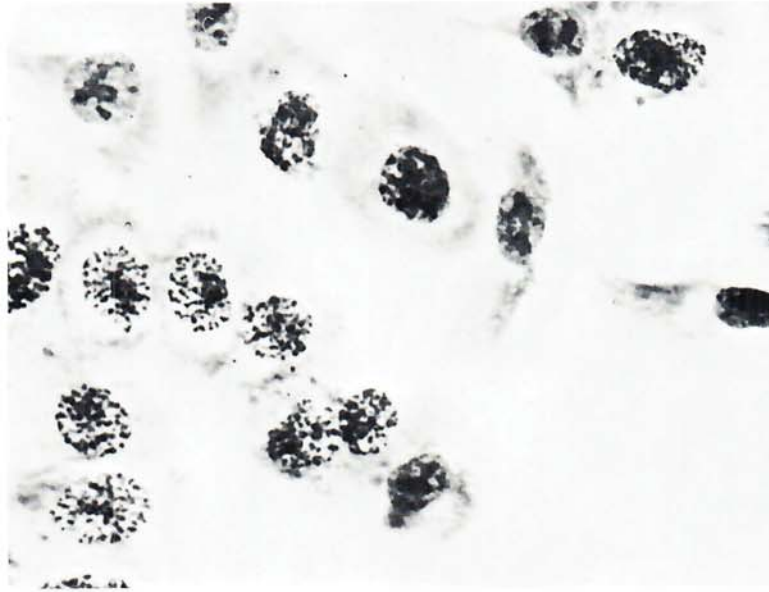


FIG. 5 – Effet du chlorure de cadmium ( $5 \times 10^{-5}M$ ) pendant 24 heures, sur l'index mitotique des cellules HeLa.

évident que les 4 souches réagissent qualitativement de la même façon envers chaque métal avec des différences quantitatives dans l'intensité de l'effet observé.

L'index mitotique a été évalué pour les différentes souches en présence des chlorures métalliques. En ce qui concerne le chlorure de plomb ( $5 \times 10^{-5}M$ ), peu de changements sont visibles comme le montre la Figure 4 représentant les cellules HeLa après 24 heures d'incubation. L'index mitotique reste environ de 4%.

Après 10 heures d'incubation dans le chlorure de cadmium  $5 \times 10^{-5}M$ , l'activité mitotique n'est pas changée pour les cellules NRK et de hamster chinois V 79. Elle est augmentée pour les cellules HeLa (43%) et XC (26%) Mais les nombreuses mitoses sont presque toutes anormales (Figure 5).

Dans les mêmes conditions, le chlorure de plomb ne produit qu'une faible élévation du taux des aberrations chromosomiques, surtout des cassures (Figure 6). Au delà de 10 heures d'incubation dans la moyenne concentration de cadmium, les nombreuses lésions chromosomiques observées dans les cellules HeLa sont irréversibles. L'abondance des cassures se traduit par une véritable pulvérisation de la plaque métaphasique (Figure 7).

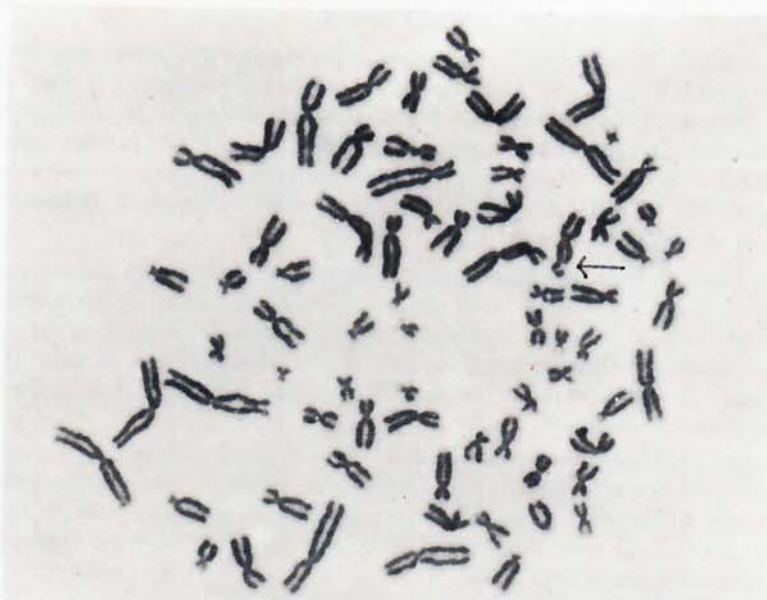


FIG. 6 - Aberrations chromosomiques (cassures) induites dans les cellules HeLa après 24 heures d'incubation dans le chlorure de plomb ( $5 \times 10^{-5}M$ ).

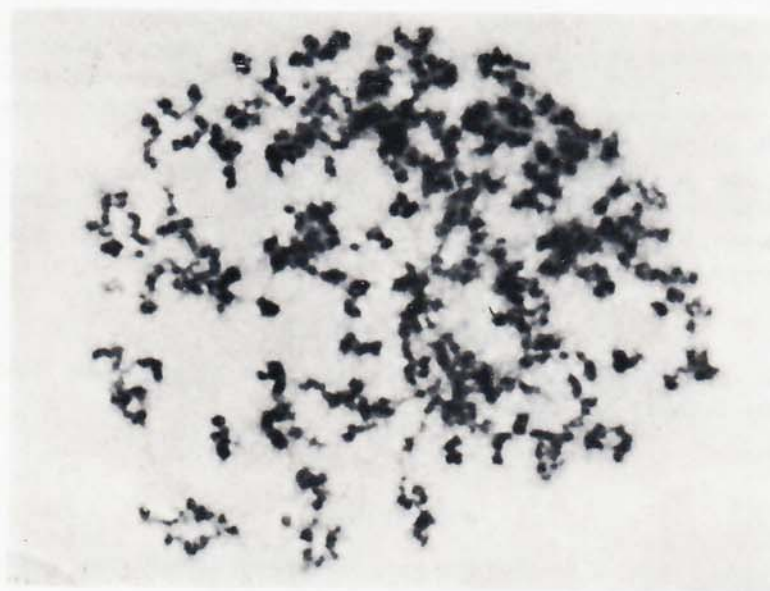


FIG. 7 - Aberrations chromosomiques (pulvérisation) induites dans les cellules HeLa après 24 heures d'incubation dans le chlorure de cadmium ( $5 \times 10^{-5}M$ ).



### DISCUSSION

Des résultats qui précèdent, on peut établir que les effets tardifs sur la prolifération cellulaire sont la conséquence d'effets précoces sur la synthèse du DNA<sup>9</sup>. Même si cet effet n'est pas direct et traduit seulement la conséquence de modifications complexes des processus enzymatiques, il permet d'évaluer rapidement et avec précision les premières perturbations produites dans la cellule par la présence de sels métalliques<sup>14</sup>. Painter<sup>10</sup> avait déjà attiré l'attention sur la valeur de ce paramètre.

Bien que le bref effet stimulateur produit par le cadmium ne soit pas une exception, il est difficile au stade actuel de nos recherches de l'expliquer<sup>1,11</sup>. L'abondance des mitoses anormales et le nombre excessif d'aberrations chromosomiques confirment qu'au delà d'une concentration donnée de sels métalliques et d'un certain temps d'incubation, le matériel génétique est irréversiblement atteint<sup>2,6</sup>.

Les résultats mentionnés ici obtenus avec d'autres paramètres et une autre souche confirment nos résultats précédents<sup>15</sup>. Ils montrent que différents facteurs contribuent à l'expression de la toxicité des métaux lourds pour les cellules animales en culture mais que l'importance relative de chacun est fonction des conditions expérimentales.

Il semble aussi que les cellules normales soient moins sensibles au plomb et plus sensibles au cadmium que les cellules cancéreuses ou transformées. L'intensité des effets inhibiteurs dépend aussi du métal lui-même, le cadmium étant au moins 5 fois plus toxique que le plomb et elle augmente en fonction de la concentration du sel métallique et de la durée d'application. L'étude de la réversion permet de voir dans quelles conditions le matériel génétique est atteint<sup>15</sup>. Bien qu'obtenus dans des conditions différentes ces résultats sont en accord avec les données récentes concernant les effets de divers métaux au niveau cellulaire *in vitro* ou *in vivo*<sup>4,13,18</sup>.

A côté de l'approfondissement du mode d'action des métaux lourds, ce modèle relativement simple permettrait aussi de tester la toxicité de différents sels métalliques. Il pourrait ainsi servir de base avant l'étude et le traitement d'intoxications aiguës ou chroniques chez l'animal et l'homme.

### REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec la collaboration technique de Mesdames Jadranka Račić et Nada Horš.

### RÉFÉRENCES

1. *Chote, D. D., Richter, G. W.* Cell Proliferation in Mouse Kidney Induced by Lead. *Lab. Invest.*, **5** (1974) 647-651
2. *Deknudt, Gh., Léonard, A.* Cytogenetic Investigations on Leucocytes of Workers from a Cadmium Plant. *Environ. Physiol. Biochem.*, **5** (1975) 319-327.



3. *Fischer, A. B.* The effects of lead on cells cultivated in vitro I. Acute effects. *Zentralbe. Bakterial. Hyg., 1. Abt. Orig. B.*, **161** (1975) 26-37.
4. *Fisher, A. B.* Acute and Chronic Effects of Lead on Mammalian Cells *in vitro*. International experts discussion on "Lead occurrence, fate and pollution in the marine environment" Pergamon Press (1978) (in press)
5. *Flick, D. F., Kraybill, H. F., Dimitroff, J. M.* Toxic Effects of Cadmium: A Review. *Environ. Res.*, **4** (1971) 71-85.
6. *Jacquet, P., Leonard, A.* Cytogenetic Investigations on Mice Treated with Lead. *J. Toxicol. Environ. Health*, **2** (1977) 619-624.
7. *Keboe, R. A.* Pharmacology and Toxicology of Heavy Metals: Lead. *Pharmacol. Ther.*, **1** (1976) 161-188.
8. *Lauwerys, R.* Biological Criteria for Selected Industrial Toxic Chemicals: A Review. *Scand. J. Work Environ., Health*, **1** (1975) 139-172.
9. *Nias, A. H. W., Gilbert, C. W., Lajtha, L. G., Lange, C. S.* Clone-Size Analysis in the Study of Cell Growth following Single or During Continuous Irradiation. *Int. J. Rad. Biol.*, **9** (1965) 275-290.
10. *Painter, R.* Rapid test to detect agents that damage human DNA. *Nature*, **265** (1977) 650-651.
11. *Rubin, H., Koide, T.* Stimulation of DNA Synthesis on 2-Deoxy-D-Glucose Transport in Chick Embryo Cultures by Excessive Metal Concentrations and by a Carcinogenic Hydrocarbon. *J. Cell Physiol.*, **81** (1973) 387-396.
12. *Sunderman, F. W.* Carcinogenic Effects of Metals. *Fed. Proc.*, **37** (1978) 40-46.
13. *Szumiel, L., Nias, A. H. W.* Action of a Platinum Complex cis-Dichlorobis (Cyclopentylamine) - Platinum (II) on Chinese Hamster Ovary Cells *in vitro*. *Chem-Biol. Interact.*, **14** (1976) 217-232.
14. *Škreb, Y., Habazin-Novak, V.* Reversible Inhibition of DNA, RNA and Protein Synthesis in Human Cells by Lead Chloride. *Toxicology*, **5** (1975) 167-174.
15. *Škreb, Y., Habazin-Novak, V., Horš, N.* Toxicité du plomb et du cadmium pour des lignées continues de cellules de Mammifères. *C. R. Soc. Biol.*, **172** (1978) 422-426.
16. *Ulmer, D. D.* Metals - from Privation to Pollution. *Fed. Proc.*, **32** (1973) 1758-1762.
17. *Verne, J., Sannié, C.* Recherches sur l'action des sels métalliques sur les cultures de tissu *in vitro*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **15** (1933) 1022-1043.
18. *Waters, M. D., Gardner, D. E., Coffin, D. L.* Cytotoxic Effects of Vanadium on Rabbit Alveolar Macrophages *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **28** (1974) 253-263.
19. *Wide, M.* Effect of Inorganic Lead on the Mouse Blastocyst *in vitro*. *Teratology*, **17** (1978) 165-170.