

Evaluation de la toxicité de la caféine par les cultures organotypique et cellulaire in-vitro

**Mortada M⁽¹⁾; Ezzedine M⁽¹⁾; Berri F⁽²⁾;
Zein Eddine I⁽³⁾ et Naoufal D⁽³⁾**

^{(1),(3)} Université libanaise, faculté des sciences section 1, Hadath - Beyrouth – LIBAN

⁽²⁾ Université libanaise, faculté de pharmacie, Beyrouth - LIBAN

Received 30/03/200
Accepted 15/11/2005

Résumé

Dans cette recherche, on a étudié la toxicité de la caféine sur les cellules animales mammifères en utilisant la technique de culture organotypique et cellulaire in vitro. Les résultats ont montré chez le rat que la concentration du caféine a un effet plus important sur les cellules hépatiques que sur les cellules endothéliales humaines. Chez l'homme, l'augmentation de la caféine augmente le taux de toxicité et aboutit à une inhibition complète de la synthèse de l'ADN cellulaire. Chez le rat, la caféine s'accumule dans les noyaux des cellules hépatiques.

Mots clés: Toxicité, Caféine, Culture organotypique, Culture cellulaire, Analyse autoradiographique

(3)

(2)

(1)

(1)

(3)

(2)

(3) (1)

2005/03/30

2005/11/15

DNA

:

1- Introduction.

Des nombreux travaux ont été réalisés sur la toxicité de la caféine. Ils ont montré qu'elle a deux actions principales : l'inhibition de la réparation de l'ADN et la mutagénicité pendant la réplication de l'ADN^{(3), (9), (13), (18)}, ainsi que sur la santé^{(4), (5), (13)}.

Cette activité mutagène de la caféine est démontrée chez la bactérie, l'ascomycète, la drosophile et les plantes supérieures^{(4), (13)}. D'autres tests ont montré des perturbations pour la maturation des ovocytes des souris⁽⁹⁾.

Les résultats statistiques montrent des dommages génétiques dus au café et qu'une tasse de café est équivalente à une irradiation de 0,01 rad par les rayons x chez l'homme^{(1), (13)}.

Le café augmente légèrement le risque de pression artérielle en maladie cardio-vasculaire⁽¹⁵⁾ et un facteur lipidique élevant la cholestérolémie est présent dans le café bouilli mais non pas dans le café filtré^{(6), (12)}.

Enfin, la caféine a un effet négatif sur l'équilibre du calcium en diminuant son absorption et en augmentant son évacuation par l'urine^{(2), (7)} et ceci influe sur la signalisation cellulaire qui est assurée par le calcium stocké et libéré par le reticulum endoplasmique⁽¹⁶⁾.

Notre travail consiste à évaluer la toxicité de la caféine sur les cellules du foie du rat et les cellules endothéliales par la culture cellulaire et organotypique.

2- Matériels et méthodes

2.1- La caféine.

La caféine froide ou non marquée a été achetée de la société SIGMA (référence C0750) sous forme de poudre blanche et soluble dans l'eau (15 mg/ml, 77.2 mM). Les concentrations utilisées dans les expériences ont été diluées directement dans les milieux de culture.

La caféine tritiée (H^3 -caféine) nous a été fournie par le commissariat à l'Energie Atomique CEA-France.

2.2- Techniques de culture des cellules endothéliales humaines.

2.2.1-Milieu de prélèvement : le cordon ombilical est prélevé directement après l'accouchement et conservé à 4° C et mis dans un tampon physiologique de pH 7,4 contenant du glucose 2 %.

2.2.2-Milieu de culture: les cellules endothéliales sont cultivées dans un milieu composé de tricine 1% (2ml); ultrocère 1% (2ml); L-glutamine 1% (1ml); pénicilline ; streptomycine 1% (0,5 ml); complété à 100 ml avec le milieu « M 199 ».

2.2.3-Techniques d'obtention des cellules endothéliales⁽⁸⁾.

Canuler les deux extrémités de la veine et la laver avec du tampon PBS 0,1 M à pH 7,4 pour éliminer les globules rouges.

Remplir de collagénase à 0,2% et mettre au bain-marie à 37° C pendant 5 minutes environ pour dissocier les cellules endothéliales.

Centrifuger à 400g pendant 5 minutes.

Remettre les cellules dans des milieux de culture contenant la caféine froide à différentes concentrations (de 5×10^{-3} mol/l jusqu'à 9×10^{-3} mol/l : concentrations non létales pour les cellules et susceptible d'être mutagènes).

Ensemencer en boîte de culture 700.000 à 1000.000 cellules par 25 cm² et incuber pendant une semaine dans une étuve à 5% CO₂ et à 37° C.

Dénombrer les cellules vivantes restantes après 7 jours de culture.

2.3-Techniques de culture des organes in vitro.

La cabine de culture est stérilisée à l'ultraviolet. De plus le matériel à utiliser doit être stérile afin de réduire le risque d'infection.

Des rats âgés d'un mois sont disséqués stérilement sous un stéréoscope dans un liquide physiologique contenant du glucose à 2%.

Les organes à explanter sont disséqués sous un stéréoscope dans un liquide physiologique stérile contenant des acides aminés, des sucres, des peptides et des vitamines.

Les méthodes de culture : nous avons utilisé :

la culture en milieu gélosé : elle consiste à utiliser une boîte nunclon à 4 cupules dans lesquelles est coulé le gélose contenant le milieu de culture avec la caféine tritiée (H³).

Les explants sont déposés à la surface de la gélose et la boîte est incubée dans un incubateur à CO₂ à 37° C pendant environ 20 heures.

la culture en milieu liquide : elle consiste à utiliser une boîte de pétri contenant le milieu B (dialysat de levure 5% ; jaune d'œuf 20% ;

glucose 2% ; rouge de phénol 2%) et la caféine tritiée H^3 à différentes concentrations.

Sur l'excavation de la boîte est déposée une grille triangulaire et l'explant est déposé directement à la surface de la grille.

2.4-Histologie et analyse autordiographique.

Après la culture, les explants sont fixés dans le fixateur de Carnoy (1V acide acétique + 6V alcool + 3V chloroforme), inclus dans la paraffine puis déshydratés par passage à plusieurs bains :

alcool 70° : 1 bain pendant 5 minutes.

alcool 95° : 3 bains de 5 minutes chacun.

alcool 100° : 3 bains de 5 minutes chacun.

toluène : 3 bains de 5 minutes chacun.

paraffine : 2 bains de 5 minutes chacun.

Les explants inclus dans la paraffine sont coupés au microtome et collés sur une lame.

Avant l'analyse autoradiographique, les coupes sont déparaffinées et réhydratées :

toluène : 2 bains de 5 minutes chacun.

alcool 100° : 1 bain pendant 5 minutes.

alcool 70° : 1 bain pendant 5 minutes.

Les lames sont plongées dans un tube de Borrel contenant le gel (K5 ILFORD) qui est liquéfié à 43° C avec deux volumes d'eau distillée.

Une couche d'émulsion très mince et uniforme permet d'obtenir une autoradiographie après exposition à l'obscurité pendant 3 jours.

Les lames sont fixées dans l'hyposulfite à 20% pendant 10 minutes puis lavées à l'eau courante pendant 40 minutes.

2.5-Coloration.

Les lames sont colorées dans l'hématoxyline de Groot pendant 5 minutes (ceci colore le noyau), rincées plusieurs fois à l'eau courante, plongées dans l'éosine à 2% pendant 20 secondes puis séchées et couvertes avec une lamelle et observées sous microscope photonique.

2.6-Essai d'incorporation de la caféine tritiée en culture organotypique du foie du rat.

Les explants du foie du rat sont réparties en 4 séries expérimentales :

série a : témoin de 3 heures sur milieu standard.

série b : expérimentale de 3 heures sur milieu standard additionné de caféine H³.

série c : témoin de 23 heures sur milieu standard.

série d : expérimentale de 23 heures sur milieu standard additionné de caféine H³.

3-Résultats et discussion

3.1-Culture des cellules endothéliales en présence de la caféine froide.

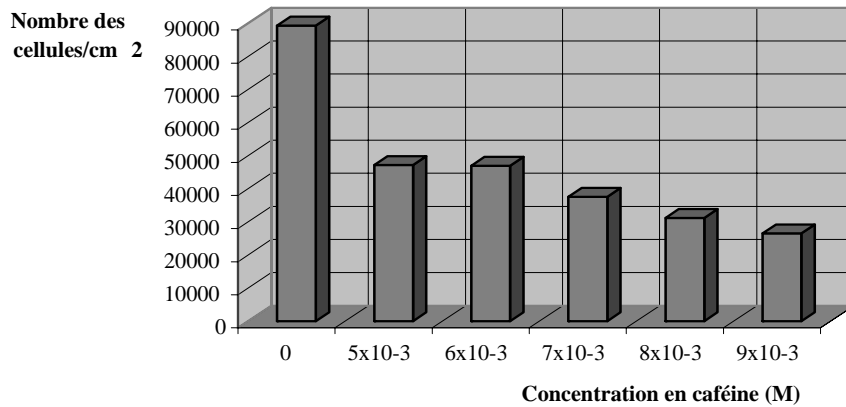
La comparaison de la densité cellulaire (nombre des cellules vivantes) dans les boites contenant de la caféine à différentes concentrations, par rapport au nombre des cellules présentes dans les boites témoins, montre bien une diminution du rapport $\frac{Nc}{Nt}$ proportionnelle à l'augmentation de la concentration de la caféine.

Tableau 1. Nombre des cellules vivantes restantes en fonction de concentration croissante en caféine

Concentration en mole	Nombre des cellules/cm ² au temps zéro.	Nombre des cellules/cm ² au bout de 7 jours de culture.	$\frac{Nc}{No}$	$\frac{Nc}{Nt}$
C = 0 M	30000	89320 ± 300	3	1
C= 5x10 ⁻³ M (0,97 g/l)	30000	47200± 250	1,57	0,53
C= 6x10 ⁻³ M (1,16 g/l)	30000	46960± 300	1,56	0,52
C= 7x10 ⁻³ M (1,35 g/l)	30000	37600± 400	1,25	0,42
C= 8x10 ⁻³ M (1,55 g/l)	30000	31200± 300	1	0,34
C= 9x10 ⁻³ M (1,74 g/l)	30000	26520± 310	0,88	0,29

No : nombre des cellules au temps zéro.

Histogramme exprimant la croissance cellulaire en fonction des concentrations croissantes en caféine



Nt : nombre des cellules dans les boites témoins cultivées pendant 7 jours.

Nc : nombre des cellules traitées avec la caféine en culture pendant 7 jours.

Figure 1. Variation du nombre des cellules vivantes restantes en fonction de concentration croissante en caféine

L'histogramme met en évidence la diminution du taux de croissance cellulaire en fonction de l'augmentation de la concentration de la caféine.

D'après le rapport $\frac{N_c}{N_o}$, on constate que le nombre des cellules cultivées dans les boites témoins est multiplié par trois tandis que l'augmentation de la concentration en caféine est accompagnée d'une diminution nette de ce rapport.

A la concentration 8×10^{-3} M, le rapport $\frac{N_c}{N_o}$ est égale à 1, ceci prouve que la population cellulaire est en état stationnaire, tandis qu'en dessous de cette concentration, l'augmentation du nombre des cellules est lente. De même, le rapport $\frac{N_c}{N_t}$ révèle bien la diminution de la croissance cellulaire en fonction des doses croissantes de la caféine.

D'autre part, l'effet toxique de la caféine a été montré en fonction du temps de la culture :

Tableau 2. Croissance cellulaire en fonction du temps, en présence de la concentration en caféine

	C = 0 M	C = 2×10^{-3} M (0,39 g/l)	C = 5×10^{-3} M (0,97 g/l)	C = $7,5 \times 10^{-3}$ M (1,45 g/l)
Densité cellulaire/cm ² au temps zéro	19300 ± 300	19300 ± 300	19300 ± 300	19300 ± 300
Densité cellulaire/cm ² en 7 jours de culture	50300 ± 150	30100 ± 200	22600 ± 400	18900 ± 200
Densité cellulaire/cm ² en 14 jours de culture	54100 ± 200	22600 ± 250	15800 ± 100	7000 ± 140
Densité cellulaire/cm ² en 21 jours de culture	57000 ± 170	22800 ± 180	7200 ± 110	3100 ± 120
$\frac{Nc}{No1}$	1	0,65	0,44	0,36
$\frac{Nc}{No2}$	1	0,48	0,28	0,13
$\frac{Nc}{No3}$	1	0,40	0,12	0,054

Nc : nombre des cellules traitées avec la caféine en culture pendant 7 , 14 et 21 jours.

No₁ : nombre des cellules dans les boites témoins en culture pendant 7 jours.

No₂ : nombre des cellules dans les boites témoins en culture pendant 14 jours.

No₃ : nombre des cellules dans les boites témoins en culture pendant 21 jours.

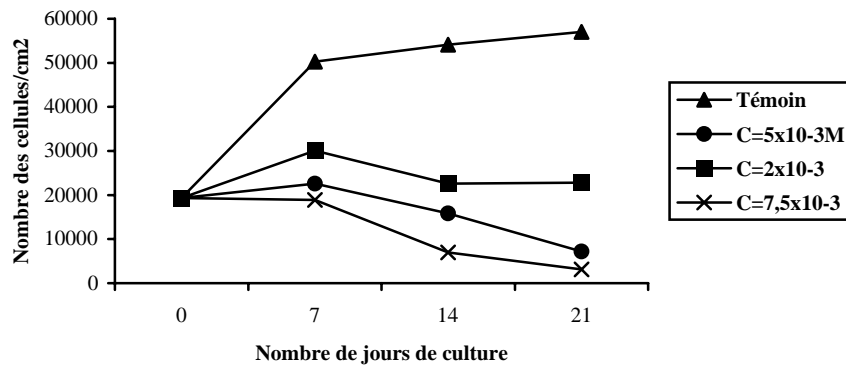


Figure 2. Variation de la croissance cellulaire en fonction du temps, en fonction de la concentration en caféine.

Le témoin (sans caféine) montre une croissance cellulaire rapide dans les sept premiers jours, suivie d'un ralentissement jusqu'au 21^{ème} jour où les cellules arrivent à confluence.

Il est à remarquer qu'à la concentration 5×10^{-3} M, le nombre des cellules reste inchangé pendant la première semaine de culture, ceci montre que les cellules sont dans un état stationnaire.

Les rapports $\frac{Nc}{No1}$, $\frac{Nc}{No2}$ et $\frac{Nc}{No3}$ révèlent l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales humaine traitées avec des concentrations différentes de caféine.

L'analyse histologique et autoradiographique de ces 4 séries permet de faire les observations suivantes :

A -les explants témoins sur milieu standard (3 heures) sont en bon état, les noyaux sont arrondis et centrés montrant que la culture évolue bien. Il y a des nombreuses cellules en mitose et aucune nécrose n'est observée.

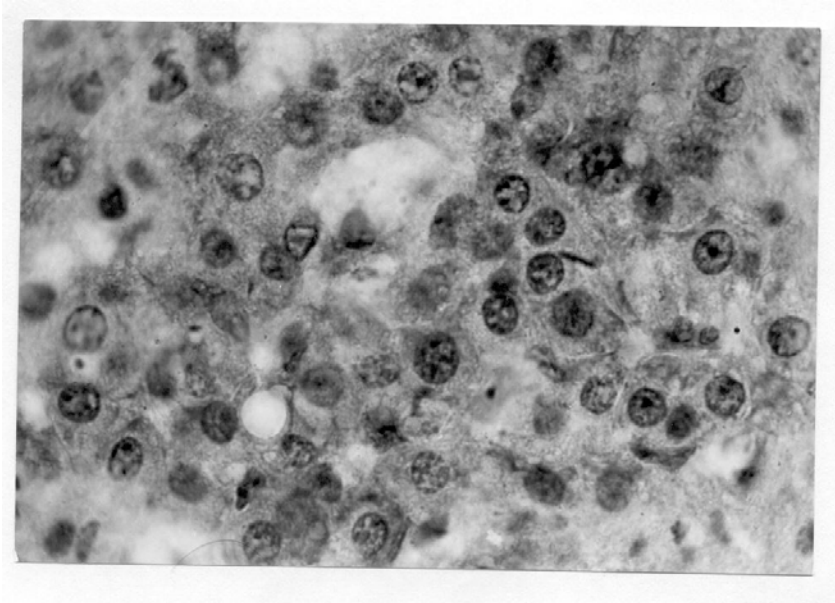


Figure 3. foie de rat incubé 3heures en milieu standard (agrandissement x 1250)

B- l'observation des explants cultivés 3 heures en présence de caféine- H^3 montre que 2% des cellules présentes ont incorporé la caféine marquée spécifiquement au niveau du noyau ; les cellules qui n'ont pas incorporé la caféine- H^3 sont encore en bon état car la dose de la caféine ajoutée dans le milieu de culture est une dose vitale correspondante à 0,6 g/l soit 3×10^{-3} M.

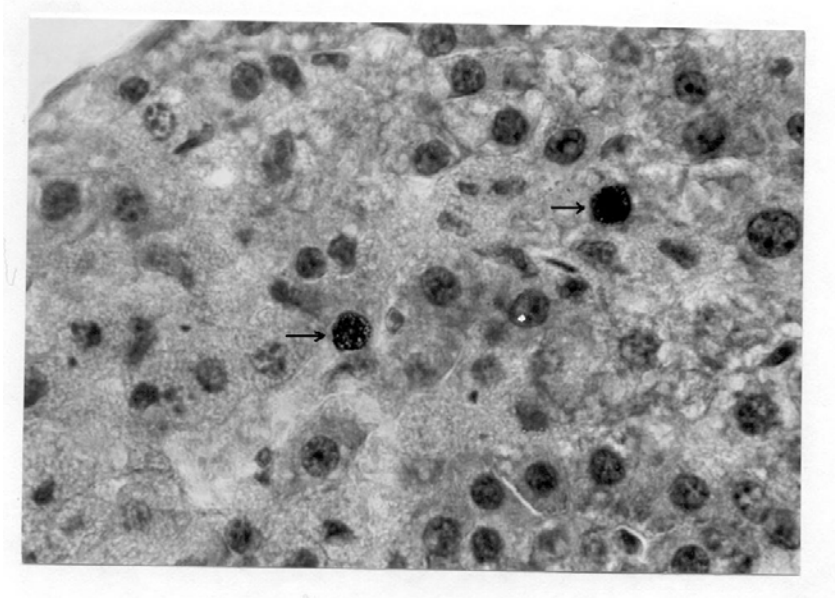


Figure 4. foie de rat incubé 3 heures en milieu standard avec caféine tritiée.
(Les flèches indiquent la caféine incorporée au noyau).
(agrandissement x 1250)

C- les explants cultivés en milieu standard (23 heures) montrent un ensemble des cellules relativement sain ; le tissu représente des mitoses avec quelques signes de nécrose.

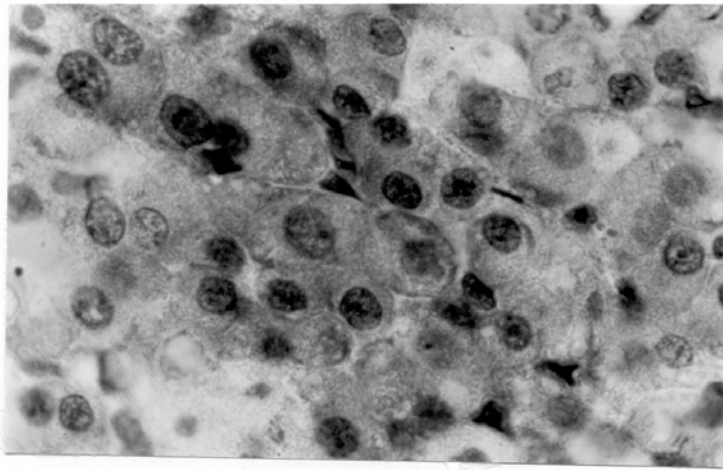


Figure 5. foie de rat incubé 23heures en milieu standard. (agrandissement x 1250)

d- les explants cultivés en milieu standard additionné de caféine- H^3 pendant 23 heures contiennent environ 7% des cellules qui ont incorporé la caféine au niveau du noyau.

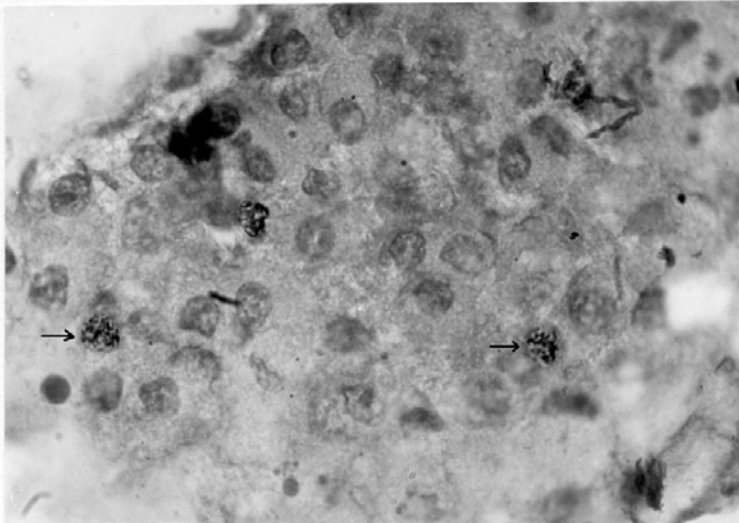


Figure 6.foie de rat incubé 23 heures en milieu standard avec caféine tritiée.
(Les flèches indiquent les cellules marquées). (agrandissement x 1250)

Tableau 3. Pourcentage d'incorporation de la caféine H3 avec le temps de culture

Milieux	Temps de culture	% des cellules marquées par la caféine
Témoin en milieu standard	3 heures	0 %
Milieu + caféine 3×10^{-3} M	3 heures	2 %
Témoin en milieu standard	23 heures	0 %
Milieu + caféine 3×10^{-3} M	23 heures	7 %

Nous savons que la sensibilité à une telle substance peut varier d'une espèce à une autre⁽¹⁹⁾, principalement à cause de différence dans leur équipement enzymatique de détoxification. Celui-ci permet l'apparition d'intermédiaires chimiques capables de réagir avec les cibles cellulaires impliquées dans la cancérisation⁽²⁰⁾.

Les résultats obtenus montre que la caféine-H3 a été incorporée dans les noyaux des cellules du foie du rat et non sur les cellules endothéliales humaines ce qui montre que les cellules humaines sont plus résistantes à la transformation par les agents chimiques que les cellules du foie du rat⁽¹³⁾.

D'autre part les explants cultivés en présence de H3-caféine pendant 3 heures ont 2% de leurs noyaux marqués, alors que ce nombre passe à 7% lorsque les cellules sont cultivées pendant 21 heures ce qui nous permet de dire que l'incorporation de la caféine dans les noyaux est un phénomène cumulatif et stable.

Aussi nous n'avons pas trouvé une incorporation de la caféine dans le cytoplasme ce qui suggère la possibilité d'une action de la caféine au niveau des chromosomes.

Ces résultats sont comparables avec ceux de NEHLIG⁽¹³⁾ qui montrent un effet inhibiteur de la synthèse d'ADN et des cassures au niveau des chromosomes.

En ce qui concerne la culture des cellules endothéliales, nos résultats montrent une diminution remarquable du nombre des cellules avec l'augmentation de la concentration de la caféine et avec le temps, ce qui nous permet de conclure que la caféine a un effet anti-mitotique.

Finalement, nous n'avons pas pu poursuivre nos cultures au-delà de 3 semaines mais il serait intéressant de faire des cultures de longue durée pour voir si aux doses non létales des modifications du comportement cellulaire se manifesteraient.

4- Conclusion générale

Il est devenu évident que les techniques d'expérimentation animale très longues ne pouvaient être expliquées systématiquement aux nombreux produits dont on voudrait évaluer le caractère carcinogène, et surtout, les matières toxiques qui ont des faibles effets (en comparaison avec les autres matières toxiques) comme la caféine. C'est pour cela qu'on a utilisé dans nos essais des expériences de courtes durées, basées sur les tests de mutagénicité, soit par culture organotypique, soit par culture cellulaire⁽¹⁷⁾.

Deux organismes différents ont été utilisés : le rat et l'homme ont été utilisés dans nos essais et nous avons montré la plus grande sensibilité des cellules du foie chez le rat (effet de la caféine sur les chromosomes) par rapport aux cellules endothéliales de l'homme.

Il existe également un effet létal dominant et une inhibition de la synthèse d'ADN dans les cellules endothéliales humaines à partir d'une dose correspondante à 0,6 g/l.

La concentration moyenne de la caféine dans le café est d'environ 0,25 g/l et nous avons travaillé sur des concentrations 2,4 fois plus grandes que la concentration habituelle.

Chez l'homme, la sensibilité à la caféine est moindre que chez le rat ou d'autres animaux, mais son effet létal dominant est bien évident, ainsi que son action sur les phosphodiésterases qui perturbe le cycle de l'AMP cyclique⁽¹¹⁾.

La dose que nous avons utilisée dans notre expérience correspond à l'équivalent 25 tasses de café, qui, consommée par jour est capable d'inhiber la synthèse de la moitié de la quantité d'ADN et qu'une dose importante de café chez le rat cause une réduction significative de fertilité^{(10), (11), (14)}.

Par contre, on ne doit pas oublier l'utilité de la caféine et la théobromine utilisées comme diurétiques, stimulants cardiaques et pour la dilatation des artères périphériques et coronaires⁽¹⁵⁾.

Enfin, il faut noter qu'on ne peut pas définitivement se prononcer sur le caractère carcinogène ou non de ces substances que lorsque l'on teste la potentialité tumorigène des organes cultivés en leur présence, par greffe de ces organes sur l'animal.

Références

- 1-ANJARIA KB., RAO BS. (2001). Effect of caffeine on the genotoxic effects of gamma radiation and 4-NQQ in diploid yeast. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20 (1): 39-45.
- 2-BERGMAN E.A., et al. (1990). Effects of dietary caffeine on renal handling of minerals in adult women. *Life Sci.* 47 (6):557-64.
- 3-COCCHI L., SCARCELLI V. et al. (2005). Endogenous sex hormones affect the mutagen-induced chromosome damage by altering a caffeine-sensitive checkpoint. *Mutat.Res.* 520 (2): 281-288.
- 4-DEBRY G.(1993). La caféine et ses effets sur la santé. *Gazette médicale* 100 (37).
- 5-DEVILLIERES P., OPITZ M., CLERVOY P., STEPHANY J. (1996). Bouffée délirante et privation de sommeil. *L'encéphale* 22 (3).
- 6-GRTTINI S. (1995). Some notes on coffee, caffeine and health. *Colloque scientifique international sur le café/16/1995 -04-09/Kyoto JPN.*
- 7-HEANEY RP. (2002). Effects of caffeine on bone and the calcium economy. *Food and chemical toxicology.* 40(9): 1263-1270.
- 8-LEE WO., WRIGHT SM. (1999). Production of endothelin by cultured human endothelial cells following exposure to nicotine or caffeine. *Metabolism, clinical and experimental* 48 (7): 845-848.
- 9-MAILHES JB., YOUNG D., LONDON SN. (1996). Cytogenetic effects of caffeine during in vivo mouse oocyte maturation. *Mutagenesis* 11 (4).
- 10-MAO J., WU GM., et al. (2005). Effect of methyl-beta-cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on in vitro fertilization and embryo development in the absence or presence of caffeine. *Theriogenology* in press.
- 11-MAXWELL WM., ROBINSON et al.(1995). Motility, acrosome integrity and fertility of frozen ram spermatozoa treated with caffeine, pentoxifylline, c-AMP, 2-deoxyadenosine and kallikrein. *Reprod. Fertil. Dev.* 7 (5): 1081-1087.
- 12-MOLIMARD R. (1994). Tabac et café, nicotine et caféine. *La semaine des hôpitaux de Paris.* 70 (13): 370-375.
- 13-NEHLIG A., DEBRY G. (1994). Potential genotoxic, mutagenic and antimutagenic effects of coffee : a review. *Mutation research, Reviews in genetic toxicology* 317 (2): 145-162.
- 14-STACHECKI JJ., DRESSER BL. et al.(1995). Stimulation of ejaculated domestic cat sperm motility with caffeine, pentoxifylline and 2-deoxyadenosine. *Arch. Androl.* 34 (2): 63-68.

- 15-SUDANO I., BINGGELI C., et al. (2005). Cardiovascular effects of coffee: is it a risk factor?. *Prog. Cardiovasc. Nurs.* 20 (2): 65-69.

- 16-VANTERPOOL CK., PEARCE WJ., BUCHHOLZ JN. (2005). Advancing age alters rapid and spontaneous refilling of caffeine sensitive calcium in sympathetic superior cervical ganglion cells. *J. Appl. Physiol.* in press.
- 17-WEISBURGER JH., DOLAN L., PITTMN B. (1998). Inhibition of PhIP mutagenicity by caffeine, lycopene, daidzein, and genistein. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis* 416 (1-2): 125-128.
- 18-YAMADA K., TAKEZAWA J., EZAKI O. (2003). Translesion replication in cisplatin-treated xeroderma pigmentosum variant cells is also caffeine-sensitive: features of the error-prone DNA polymerase involved in UV-mutagenesis. *DNA Repair (Amst)*. 2 (8): 909-924.
- 19- Reference Internet: www.geocities.com/HotSprings/2455/caff-wh.html
- 20- Reference Internet: www.prohighway.com/Article/article_show.asp.s