

COMPTE-RENDU DE RESULTATS

Projet : 2017-03-HBN-GG-SERV01-01

Gérald Goudet - HBN

Effet du complément alimentaire « Télomère Active » sur les systèmes de réparation de l'ADN, en présence ou non d'un contrôle génotoxique positif, l'EMS (MéthaneSulfonate d'Ethyle)

Analyse Test ExSy-SPOT

28-06-2017

COMMANDE

N° Bon de commande :

Date : 23/03/2017

N° de devis associé : 2017-03-HBN-GG-SERV01-01

Adresse de facturation :

Gérald GOUDET
Société **HBN**
1 rue des pénitents blancs
31010 Toulouse

Adresse de livraison :

Gérald GOUDET
Société **HBN**
1 rue des pénitents blancs
31010 Toulouse

Renseignements Généraux

Contacts	Nom	Gérald Goudet, CEO
	Mail	hbn.gg@live.fr
	Téléphone	06 03 30 20 32
	FAX	

Objectif global de l'étude

Déterminer le mécanisme responsable de l'effet protecteur observé *in vivo* du complément alimentaire « Télomère Active » (CA) administré avec un agent génotoxique, en étudiant l'implication des systèmes de réparation de l'ADN dans cet effet protecteur.

Approche *in vitro* sur modèle cellulaire HepG2, avec un challenge par l'agent génotoxique EMS (MéthaneSulfonate d'Ethyle)

Information Complémentaires fournies par le Collaborateur

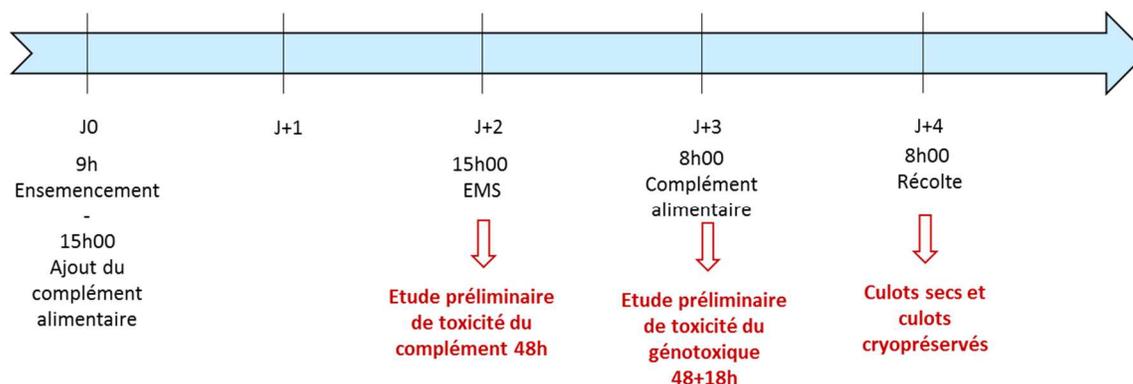
Rapport de test *in vitro* de cytotoxicité du complément alimentaire réalisé par la société Toxem en date du 28/09/2015.

Rapport du test FACIR (Functional Analysis of Chemicals Induce TP53 Restoration) réalisé par la société Toxem en date du 23/12/2015.

Rapport des tests « *In Vivo* Erythrocytes-BASED Pig-A GENE MUTATION ASSAY » et « *In Vivo* MAMMALIAN ALKALINE COMET ASSAY » réalisés par Pasteur Lille en date du 23/12/2015.

Plan expérimental

- 1- Pré-traitement des cellules par le complément alimentaire (CA)
 - 2- Challenge avec le composé génotoxique EMS (18h) - 2 concentrations
 - 3- Remise des cellules en présence du complément alimentaire
 - 4- Récolte et tests
- Contrôles sans CA réalisés en parallèle



- Nombre de conditions – sur la base de 2 concentrations pour le composé génotoxique et 1 concentration pour le complément alimentaire

CA = complément alimentaire et EMS = composé génotoxique

0 : concentration 0

1 : Concentration sélectionnée 1

2 : Concentration sélectionnée 2

Prétraitement CA	Traitement Génotoxique	Post-traitement CA	
CA 0	EMS 0	CA 0	
CA 0	EMS 1	CA 0	
CA 0	EMS 2	CA 0	
CA 1	EMS 0	CA 1	
CA 1	EMS 1	CA 1	
CA 1	EMS 2	CA 1	
			Nombre de conditions
6	6	6	18

Déroulement de l'Etude

L'étude se déroule en 3 phases.

Modèle : lignée cellulaire de foie HepG2.

Phase I : Choix des conditions expérimentales pour les tests de cytotoxicité

Méthodes utilisées : test de prolifération au BromodU (BrdU) et, pour comparaison, test MTT ((bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) qui mesure la respiration mitochondriale.

Phase II : Détermination de la cytotoxicité du complément alimentaire (CA) après une incubation de 48h et étude de la cytotoxicité du génotoxique EMS après une incubation de 17h (respect des conditions expérimentales réelles qui seront appliquées).

Phase III : Etude de l'impact de CA et EMS sur les mécanismes de réparation de l'ADN
+ préparation en parallèle de culots secs pour une éventuelle étude des Télomérasés.

Phase I : optimisation des conditions expérimentales

1/ Déterminations des conditions d'ensemencement : Ensemencements en Pétri et plaques 96 puits à \neq concentrations

2/ Test MTT

- Conditions classiques : Ajout de 10 μ L par puits d'une solution de MTT à 5 mg/mL. Incubation 2h à 37°C. 3 Lavages en PBS. 100 μ L de DMSO. Lecture à 562 nm contre le blanc.
- Test 48h et 48h+18h après l'ensemencement

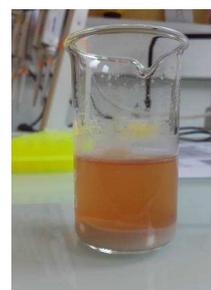
3/ Test BrdU Colorimétrique - Kit Roche - Référence 11 647 229 001

Optimisation de la quantité de cellules ensemencées et des conditions optimales d'utilisation du test (temps incubation anticorps et substrat).

4/ Solubilisation du complément alimentaire

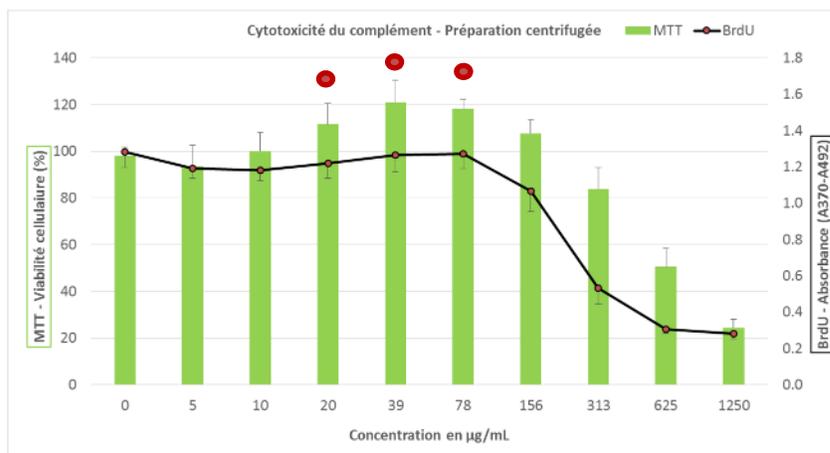
En se basant sur la gamme TOXEM :

- Après broyage, préparation d'une solution mère de complément alimentaire en H₂O à 12,5 mg/mL. Agitation à 37°C pendant 1 heure.
- Elimination des résidus par centrifugation 1500 rpm 5 minutes.



Phase II : Etude de cytotoxicité du complément alimentaire et de l'EMS

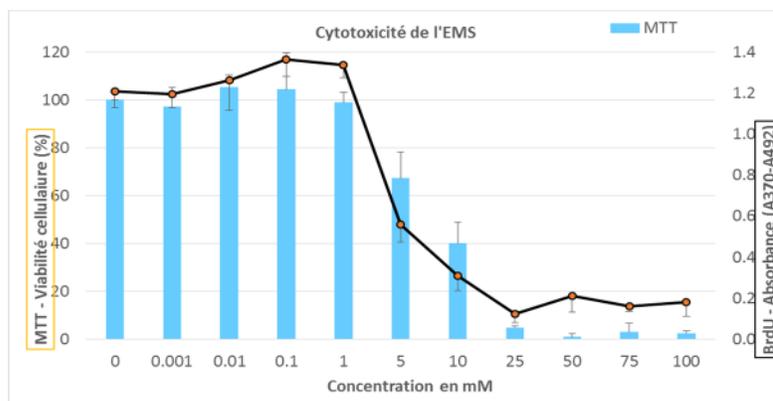
1/ Cytotoxicité du complément alimentaire CA



Concentration la plus faible associée à une absence de Cytotoxicité : 156 µg/mL avec MTT et 78 µg/mL pour le BrdU.

- Différence significative par rapport au Non Traitées (CA=0), $p < 0.05$ (test MTT) ; voir l'analyse statistique en Annexe du rapport, p11.

2/ Cytotoxicité du génotoxique EMS



Concentration la plus faible associée à une absence de Cytotoxicité: 1 mM avec MTT et BrdU.

Conditions retenues pour la phase III

Utilisation du complément alimentaire (CA) à 40 µg/mL.

Utilisation du génotoxique EMS [G1] = 1 mM et [G2] = 0.2 mM ([G1] / 5)

Nomenclature des Echantillons et Dosage Protéique			
Tube	Nom	Nombre de Cellules (x10 ⁶)	Concentration (mg/mL)
1	NT-1	4	5.13
2	NT-2	4	4.59
3	NT-3	4	4.44
4	G1 - 1	4	4.64
5	G1 - 2	4	4.70
6	G1 - 3	4	4.01
7	G2 - 1	4	4.02
8	G2 - 2	4	4.83
9	G2 - 3	4	5.30
10	CA - 1	4	3.98
11	CA - 2	4	3.81
12	CA - 3	4	3.80
13	CA + G1 - 1	4	4.81
14	CA + G1 - 2	4	4.28
15	CA + G1 - 3	4	3.97
16	CA + G2 - 1	4	4.31
17	CA + G2 - 2	4	4.57
18	CA + G2 - 3	4	4.44

Principe du test ExSy-SPOT

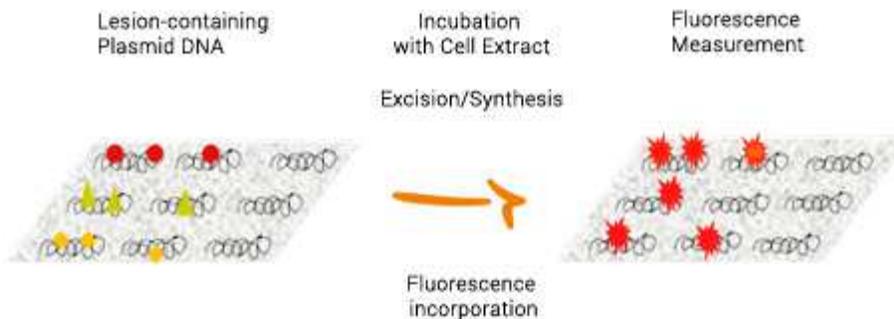
Les extraits sont déposés sur une puce fonctionnalisée par des plasmides comportant des séries de lésions de l'ADN spécifiques :

- 8oxoG (8oxoG)
- éthénobases (Etheno)
- Glycolss de thymine et cytosine (Glycolss)
- sites abasiques (AbaS)
- photoproduits (dimères de pyrimidine et photoproduits 6-4) (CPD-64)

Les enzymes de réparation de l'ADN, contenues dans les extraits, excisent les lésions (ou le fragment d'ADN entourant les lésions) et incorporent un marqueur fluorescent (dCTP-Cy3) lors de la resynthèse d'ADN.

Le signal fluorescent est quantifié à l'aide d'un scanner. Il est proportionnel aux capacités d'Excision/Resynthèse de chaque extrait vis-à-vis de chacune des lésions.

Ce test permet de caractériser les systèmes de Réparation par Excision de Bases (BER), de Réparation par Excision de Nucléotides (NER).



Concentration en extraits **0.2 mg/mL**.

Mesure de fluorescence : Fluorescence totale

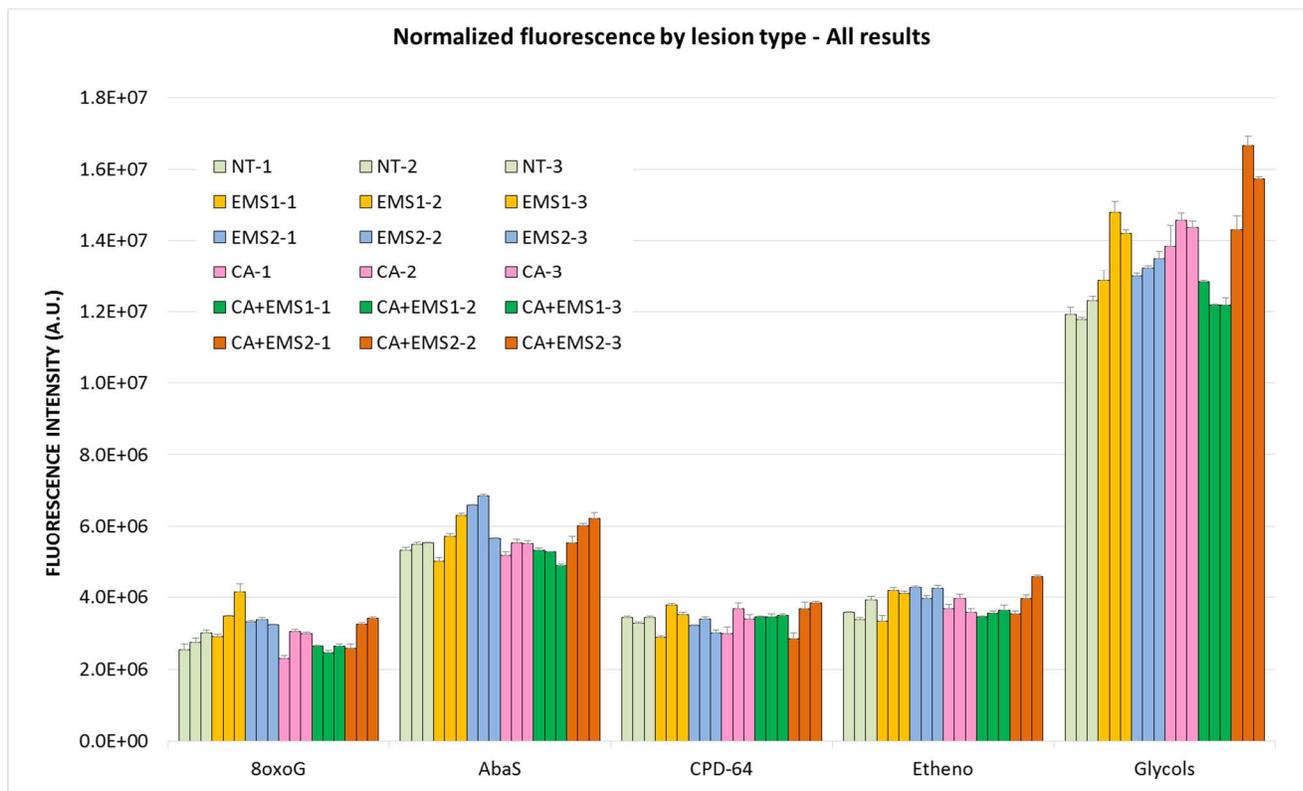
Chaque échantillon est testé sur 2 puces. Chaque puce comporte 4 spots par lésion. Les résultats sont ensuite normalisés (Normalizelt).

La valeur du plasmide Contrôle (pas de lésion) est soustraite à la valeur de l'intensité totale obtenue pour chaque lésion.

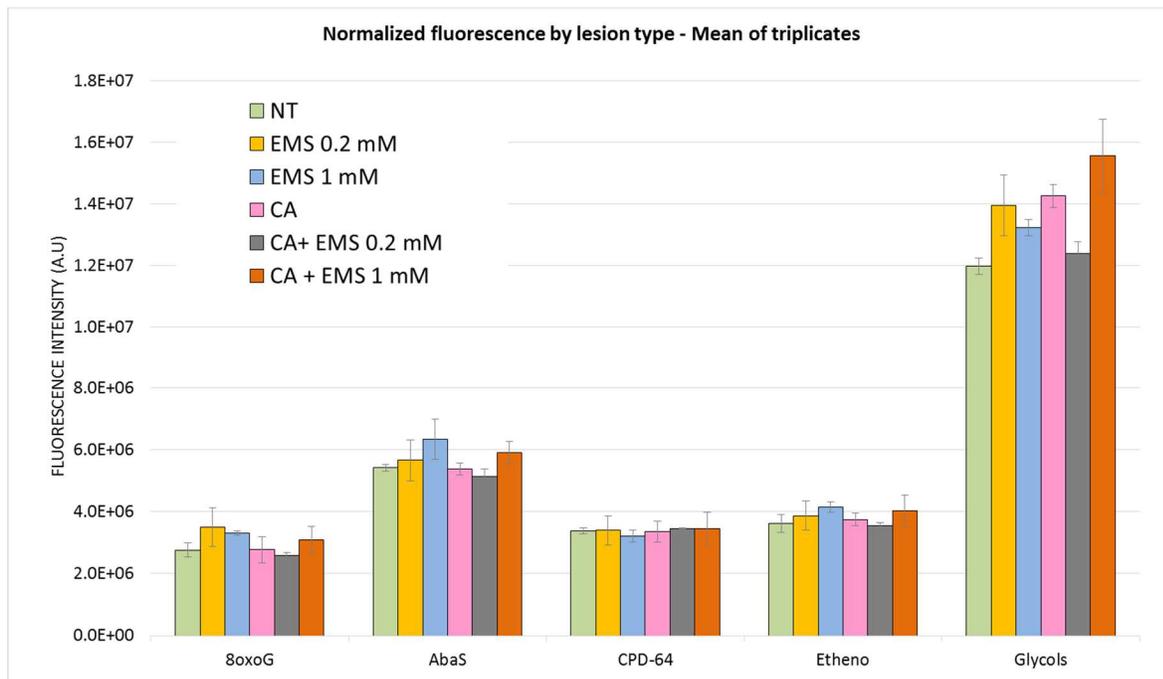
Les résultats sont donnés en **Intensité de Fluorescence totale pour chaque lésion +/- Ecart-Type**.

Résultats

I. Représentation de l'ensemble des données – Intensités de Fluorescence



II. Moyennes/écart-type des Intensités de Fluorescence (triplicatas d'échantillons)



III. Signal Traité sur Non Traité

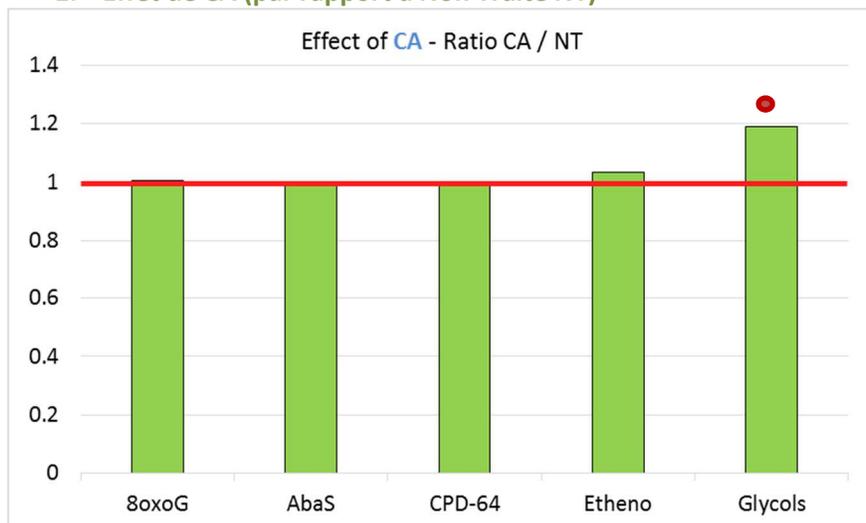
Pour évaluer l'effet du composé sur les activités de réparation, nous calculons les rapports des signaux obtenus avec les cellules Traitées sur les signaux obtenus avec les cellules Non Traitées.

- Un résultat > 1 signifie que le **Traitement stimule** les activités de réparation.
- A l'inverse, un résultat < 1 signifie que le **Traitement inhibe** les activités de réparation.

Toutes les valeurs sont calculées sur les **moyennes des Intensités de Fluorescence**, obtenues par condition.

- Résultat significatif selon Multiple t-test calculé par Dr Alain Gerbi ($p < 0.05$)

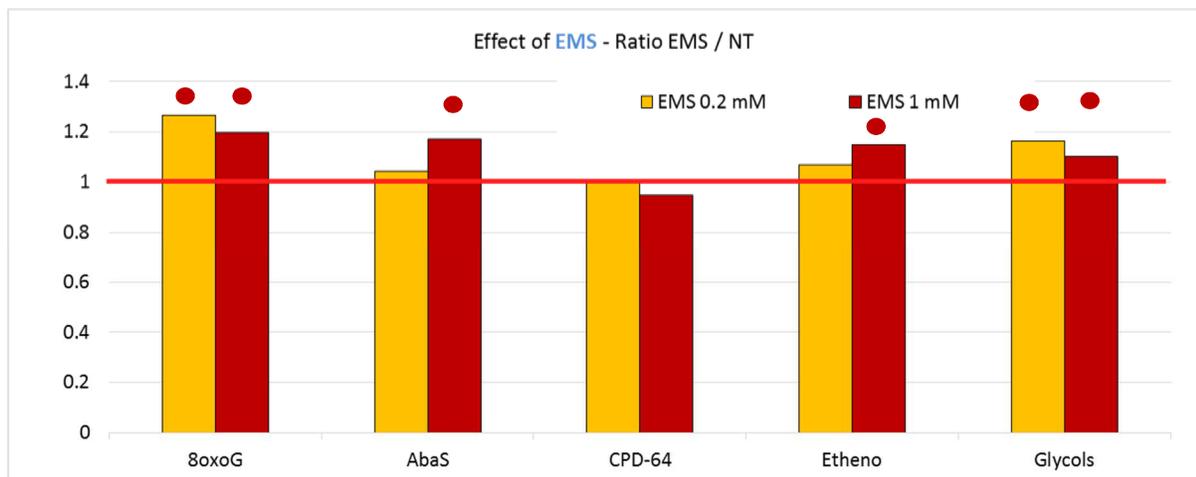
1. Effet de CA (par rapport à Non Traité NT)



A la dose non cytotoxique testée, le complément alimentaire (CA) n'a aucun effet sur les systèmes de réparation de l'ADN, à l'exception d'un effet simulateur de la réparation des Glycols, qui d'après la littérature sont pris en charge par l'enzyme hNTH1 chez les humains.

- différence significative par rapport à NT ($p < 0.05$; statistiques en Annexe de Rapport)

2. Effet d'EMS (par rapport à Non Traité NT)



Au moins à la plus forte concentration testée, l'EMS stimule exclusivement la Réparation par Excision de Base (BER).

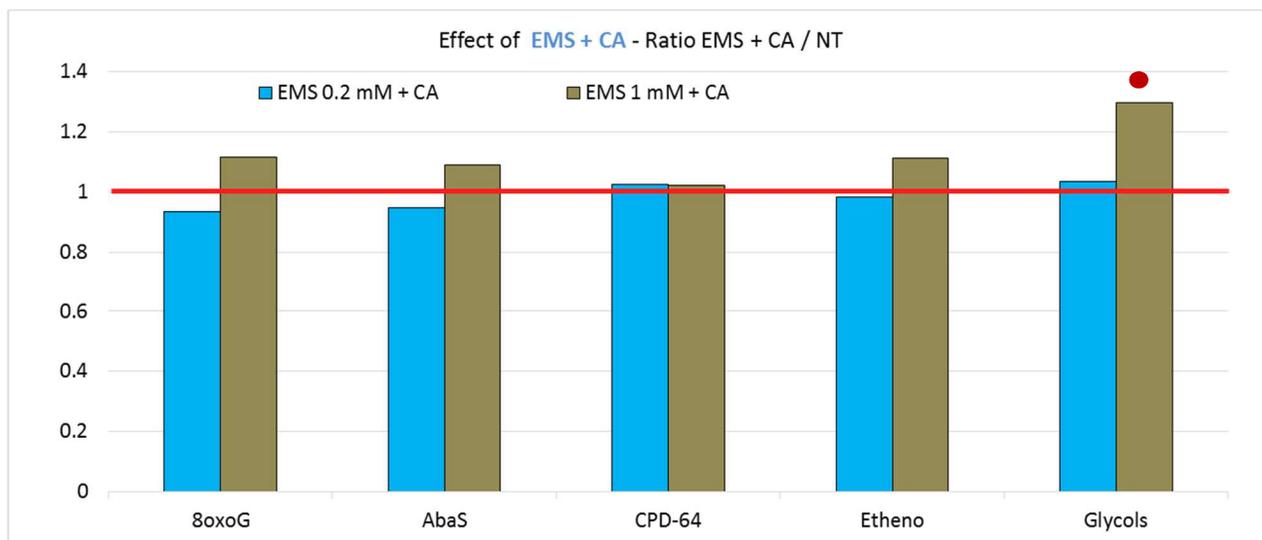
La réparation des photoproduits (CPD-64), pris en charge par la réparation par Excision de Nucléotides (NER) n'est pas affectée.

Ce résultat est en faveur de la formation par EMS de petites lésions de types alkylations ou oxydations, ce qui induirait l'activation des enzymes les prenant en charge.

Ce résultat est conforme à ce qui est attendu.

- différence significative par rapport à NT ($p < 0.05$; statistiques en Annexe de Rapport)

3. Effet d'EMS + CA (par rapport à Non Traité NT)



Le prétraitement des cellules par le composé CA annule complètement l'impact d'EMS utilisé à la plus faible concentration, sur les systèmes de réparation de l'ADN.

En revanche, il persiste une induction des systèmes de réparation de l'ADN à la plus forte concentration d'EMS. Cette induction est cependant plus faible qu'avec EMS seul, sauf pour la lésion Glycols. La stimulation de la réparation de la lésion Glycols évoque l'effet de CA seul.

- différence significative par rapport à NT ($p < 0.05$; statistiques en Annexe de Rapport)

Conclusion

Sur la base des résultats, voici nos conclusions :

1. CA seul, à dose non cytotoxique, n'a pas d'impact formel sur la réparation de l'ADN, mis à part une action significative de stimulation de la réparation des Glycols. L'enzyme NTH1 qui répare les glycols est également impliquée dans maintenance des télomères, en lien avec le vieillissement biologique.
2. L'EMS seul, à dose non cytotoxique (DNC) et à DNC/5, induit comme attendu une stimulation des enzymes de la BER, en réponses aux lésions qu'il crée.
3. Le pré-traitement par CA annule les effets de la plus faible dose d'EMS et réduit les effets de la plus forte dose ; ceci est en faveur d'un effet dû à CA et dépendant de la concentration en EMS.
 - A la plus faible dose d'EMS, CA qui serait en quantité suffisante, inactive l'EMS vis-à-vis de ses effets génotoxiques sur l'ADN.
 - A la plus forte dose d'EMS, CA qui dans ce cas, serait en quantité limitante, ne suffirait pas à inactiver la totalité de l'EMS présent, mais en réduirait l'impact.



Les résultats sont en faveur d'une capacité de détoxification de l'agent génotoxique par le CA par piégeage ou absorption.

Grenoble le 28 juin 2017

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Sylvie Sauvaigo', written over a faint, illegible stamp or background.

Sylvie Sauvaigo - CEO

LXRepair

Sylvie.sauvaigo@lxrepair.com

Annexe – Analyses statistiques par Multiple t tests (Dr A Gerbi)

- **Cytotoxicité - résultats MTT : significativité de l'effet par rapport aux cellules Non Traitées (0)**

Concentration comparison ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Difference Significant?	Adjusted P Value
0 - 20	Yes	0.0414
0 - 39	Yes	0.0067
0 - 78	Yes	0.0011
0 - 156	No	0.0773

MTT

Le MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) est un sel de tétrazolium utilisé pour détecter le métabolisme réducteur des cellules vivantes. Après réduction, les sels de tétrazolium sont transformés en produits très colorés qui sont quantifiés par mesure colorimétrique.

Le métabolisme exact du MTT n'est pas complètement compris. Il impliquerait une réaction avec le NADH ou d'autres molécules réductrices qui transfèrent des électrons au MTT. Une autre hypothèse est que le MTT serait réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes et serait donc un marqueur de l'activité mitochondriale cellulaire.

Référence :

Cell Viability Assays

Terry L Riss, PhD, Richard A Moravec, BS, Andrew L Niles, MS, Sarah Duellman, PhD, Hélène A Benink, PhD, Tracy J Worzella, MS, and Lisa Minor.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

- **Tests de réparation de l'ADN : Significativité de l'effet des traitements**

8oxoG	Significant?	P value	Mean1	Mean2	Difference	SE of difference	t ratio	df
EMS 1/NT	Yes	0,00291	1	1,27	-0,27	0,08279	3,261	28
EMS 2/NT	Yes	0,02461	1	1,197	-0,1967	0,08279	2,376	28
CA	No	0,96817	1	1,003	-0,003333	0,08279	0,04026	28
EMS 1 CA NT	No	0,42745	1	0,9333	0,06667	0,08279	0,8053	28
EMS 2CA NT	No	0,16978	1	1,117	-0,1167	0,08279	1,409	28
AbaS								
AbaS	Significant?	P value	Mean1	Mean2	Difference	SE of difference	t ratio	df
EMS 1/NT	No	0,42374	1	1,043	-0,04333	0,05338	0,8118	28
EMS 2/NT	Yes	0,00354	1	1,17	-0,17	0,05338	3,185	28
CA	No	0,9015	1	0,9933	0,006667	0,05338	0,1249	28
EMS 1 CA NT	No	0,35691	1	0,95	0,05	0,05338	0,9367	28
EMS 2CA NT	No	0,09133	1	1,093	-0,09333	0,05338	1,749	28
CPD-64								
CPD-64	Significant?	P value	Mean1	Mean2	Difference	SE of difference	t ratio	df
EMS 1/NT	No	0,96189	1	1,003	-0,003333	0,06914	0,04821	28
EMS 2/NT	No	0,44697	1	0,9467	0,05333	0,06914	0,7713	28
CA	No	0,92388	1	0,9933	0,006667	0,06914	0,09642	28
EMS 1 CA NT	No	0,73829	1	1,023	-0,02333	0,06914	0,3375	28
EMS 2CA NT	No	0,73829	1	1,023	-0,02333	0,06914	0,3375	28
Etheno								
Etheno	Significant?	P value	Mean1	Mean2	Difference	SE of difference	t ratio	df
EMS 1/NT	No	0,26322	1	1,07	-0,07	0,06131	1,142	28
EMS 2/NT	Yes	0,02096	1	1,15	-0,15	0,06131	2,447	28
CA	No	0,5546	1	1,037	-0,03667	0,06131	0,5981	28
EMS 1 CA NT	No	0,74668	1	0,98	0,02	0,06131	0,3262	28
EMS 2CA NT	No	0,07511	1	1,113	-0,1133	0,06131	1,849	28
Glycols								
Glycols	Significant?	P value	Mean1	Mean2	Difference	SE of difference	t ratio	df
EMS 1/NT	Yes	0,00179	1	1,16	-0,16	0,04636	3,451	28
EMS 2/NT	Yes	0,03402	1	1,103	-0,1033	0,04636	2,229	28
CA	Yes	0,00032	1	1,19	-0,19	0,04636	4,098	28
EMS 1 CA NT	No	0,43564	1	1,037	-0,03667	0,04636	0,7909	28
EMS 2CA NT	Yes	<0,00001	1	1,297	-0,2967	0,04636	6,399	28