

CHAPITRE 3 : CONDITIONS REQUISES POUR LE SUCCES DE LA CULTURE CELLULAIRE.

DIVISION PREMIERE : APPROCHE GLOBALE DES EXIGENCES POUR LA CROISSANCE DES CELLULES EN CULTURE.

La détermination **des exigences** pour la mise au point de milieux et celle des conditions de cultures cellulaires suppose une bonne connaissance des conditions qui prévalent dans le milieu intérieur. Il est supposé que la fidèle reproduction *in vitro* des conditions existant *in vivo* satisfait *a priori* les exigences des cellules que l'on veut mettre en culture.

Les exigences pour la croissance des cellules transformées sont nettement plus complexes qu'on ne l'imaginait à l'origine. Elles impliquent l'existence de nombreuses interactions.

Considérée sous l'angle physiologique et intégré, les variables significatives impliquées dans la multiplication des cellules incluent au moins la série d'éléments suivants.

(1) Maintien d'un environnement physiologique.

Le maintien d'un environnement physiologique suppose **la détermination** d'une température d'incubation correcte, d'une concentration équilibrée d'ions inorganiques essentiels, d'un pH et d'une osmolarité adaptés, **l'usage** d'un système tampon adéquat, **le maintien** d'un potentiel redox acceptable, et **l'établissement** de pressions partielles d'oxygène et de gaz carbonique à des valeurs acceptables et dépourvues de toxicité.

(2) Fourniture d'aliments essentiels.

Il est également essentiel de mettre à la disposition des cellules tous les aliments exigés pour les biosynthèses et les diataxies (ou biosynthèses macromoléculaires), le métabolisme énergétique, la catalyse biochimique (vitamines et oligoéléments appropriés).

(3) Surface de culture.

Il faut offrir une surface de culture qui permettent aux cellules dont la multiplication dépend de l'ancrage d'adhérer, puisque l'adhérence est très souvent une condition nécessaire pour la multiplication. La surface de culture doit donc avoir des charges superficielles distribuées de manière optimale.

(4) Procédures de culture et de subculture.

Lors des subcultures ou de la primoculture, les cellules subissent des dommages ou des traumatismes. Il faut donc utiliser des procédures douces qui minimisent ceux-ci ou apporter dans l'environnement des cellules des facteurs dont la seule fonction consiste (a) à **neutraliser les agents** utilisés pour assurer la dispersion ou la dissociation cellulaires, et (b) à **aider les cellules à surmonter** les traumatismes des processus de dispersion (subculture) ou de dissociation (primoculture).

(5) Mise à disposition des molécules de transport.

Un certain nombre d'hormones, d'oligoéléments et les lipides ne peuvent être fournis à la cellule sans être associés à une molécule porteuse dont le rôle est de rendre disponible ou assimilable les éléments qu'elle transporte.

(6) Mise à disposition de facteurs d'adhérence.

Pour adhérer à leur support de multiplication, les cellules ont besoin de molécules d'adhérence qui vont "conditionner" celui-ci. C'est une exigence absolue pour les cellules qui ne produisent pas de facteurs d'adhérence ou n'en produisent pas en quantités adéquates. C'est une exigence relative pour celles qui le peuvent.

(7) Mise à disposition de molécules informatives.

Ces molécules informatives sont essentiellement des hormones et des facteurs de croissance qui vont stimuler spécifiquement les grands anabolismes et la multiplication cellulaires.

(8) Maintien d'un équilibre quantitatif entre les facteurs.

Les aliments, facteurs de croissance, hormones, ions doivent se trouver en concentrations équilibrées dans le milieu de culture. L'équilibre quantitatif entre facteurs est un élément au moins aussi important que la présence ou l'absence de telle ou telle molécule, comme l'expérience le vérifie dans de très nombreux cas.

(9) Repérage des interactions régulatrices complexes.

Il existe des interactions régulatrices complexes entre les divers constituants du milieu et l'environnement de la culture. Il est donc souvent possible de satisfaire les exigences de la croissance par plusieurs moyens. La multiplication cellulaire peut être affectée de très nombreuses façons. Les interactions apparentes entre variables de l'environnement sont très complexes. Il est donc très utile d'avoir une approche globale (holistique) des exigences à satisfaire pour assurer la croissance/multiplication cellulaire. Dans cette approche, toutes les variables qualitatives ou quantitatives affectant la multiplication, quelque soit leur apparente diversité, sont considérées comme les membres d'une série interactive unique. Cette série est constituée de telle façon qu'une modification de l'un quelconque de ses membres peut potentiellement modifier les réponses de la cellule (en terme de multiplication) à l'un quelconque des autres membres.

Ainsi considérées, les données apparemment contradictoires sur l'amélioration de la croissance cellulaire par des moyens divers commencent à prendre un sens. Par exemple, l'exigence d'une cellule pour un facteur macromoléculaire particulier pourrait être modifiée (a) par des changements quantitatifs des aliments spécifiques du milieu ; (b) par addition d'hormones spécifiques au milieu de culture ; (c) par la modification de la concentration des cations divalents du milieu de culture ; (d) par traitement des cellules avec des réactifs qui modifient les niveaux intracellulaires de cAMP ou d'ions Na⁺. Pour des raisons didactiques, nous étudierons chacun des facteurs les uns après les autres, en utilisant la liste donnée par PAUL, et nous essaierons chaque fois qu'il est possible de souligner leurs éventuelles interactions. Nous suivrons autant que possible la méthode d'extrapolation au milieu de culture des conditions prévalant *in vivo*.

DIVISION 2 : ETUDE SYSTEMATIQUE DES FACTEURS IMPLIQUES.

SECTION PREMIERE : LA TEMPERATURE.

La matière vivante est capable de réaliser des réactions chimiques très complexes à des températures relativement basses. Elle est rapidement détruite à des températures légèrement supérieures à sa température normale de fonctionnement. C'est là une de ses propriétés essentielles. Appliquée à l'organisme, la notion de température normale de fonctionnement prend le nom de température de croissance eugénésique ou température optimale de croissance. Par analogie, nous envisagerons successivement la notion de température optimale de croissance, et les effets des variations de température sur la survie et le comportement des cellules.

1-La température optimale.

11-La situation *in vivo*.

Il est classique de faire une distinction entre la TEMPERATURE CENTRALE de l'organisme et les TEMPERATURES LOCO-REGIONALES propres à tel ou tel tissu. Si le plus souvent la régulation de la température centrale doit être très fine pour assurer la survie de l'organisme, il n'en demeure pas moins que physiologiquement certains tissus sont exposés à des températures qui s'en écartent notablement. Ces constatations ont leur intérêt pour la culture de cellules.

(1) Notion de température centrale (température du milieu intérieur).

La TEMPERATURE CENTRALE (ou du milieu intérieur) est celle du sang. Chez les **homéothermes** (animaux à sang chaud), la température centrale est très finement régulée. Elle est de 37°C pour les **Mammifères** et de 40°C, voire de 41°C, pour les **Oiseaux**. Chez les **poïkilothermes** (animaux à sang froid), la régulation de la température centrale est beaucoup moins fine et varie en fonction de celle de l'environnement. Elle est de l'ordre de 20°C ou moins pour les **Poissons** des eaux douces tempérées, un peu plus faible pour les **Amphibiens**.

(2) Notion de température régionale ou locale.

Certains tissus (épiderme humain, tractus respiratoire par exemple) sont physiologiquement exposés à des températures inférieures à la température centrale parce qu'ils sont en contact direct avec le milieu extérieur. On peut donc légitimement se demander si ce fait a des répercussions sur les exigences thermiques des cellules qui dérivent de ces tissus, quand elles sont mises en culture.

12-Fixation de la température *in vitro*.

(1) Cas des homéothermes.

Il n'y a aucune difficulté *a priori* à cultiver les cellules **d'homéothermes** à la température centrale de l'espèce animale dont elles proviennent. On remarque cependant que la survie et la croissance cellulaires sont meilleures à des températures d'incubation légèrement inférieures : 36,5°C pour les cellules de Mammifères, 38°C-39°C pour les cellules d'Oiseaux.

Lors de l'incubation de cellules d'homéothermes, il convient de contrôler que la température a été étroitement régulée. Il faut donc vérifier à l'aide d'un thermomètre de précision que la température de l'enceinte de l'étuve correspond effectivement à la température de régulation affichée. L'utilisation d'une étuve avec un système d'enregistrement de température permet également de vérifier qu'aucune surchauffe ou interruption de chauffage temporaires ne sont intervenues pendant l'incubation. Si l'on ne dispose pas de ce système, on peut placer dans l'enceinte un thermomètre à *maxima/minima* de précision. Il donnera une idée de la qualité de la régulation thermique (faibles amplitudes des variations autour de la valeur affichée : $\pm 0,5^\circ\text{C}$) ou signalera par des amplitudes de variations inaccoutumées les phénomènes de surchauffe ou de refroidissement.

La température qui règne dans l'enceinte d'une étuve n'est pas homogène. Il existe des gradients de température entre les parties de l'enceinte proches des parois chauffantes et celles qui en sont éloignées. Il faut donc éviter tout contact entre les récipients de culture et les parois. En outre, pour minimiser le biais qui peut résulter de l'existence de ce gradient, il faudra assigner au hasard la position des récipients ou, si l'on travaille dans des plaques de culture à plusieurs puits (*multiwell plates*), assigner au hasard les "traitements" (drogues, dilutions de virus par exemple) des puitsensemencés. Ces gradients de température peuvent aussi entraîner des phénomènes d'évaporation différentielle des milieux. Ce phénomène peut être important lorsque l'on utilise des plaques à plusieurs puits, surtout si ces puits ont un petit volume (plaques à 96 puits). On peut alors améliorer l'humidification de la phase gazeuse de ces plaques, en remplissant les puits périphériques par de l'eau distillée stérile.

(2) Cas des poïkilothermes.

Les cellules de **poïkilothermes** sont incubées à la température du laboratoire (cellules de Poissons des eaux douces tempérées), c'est à dire vers 20°C. Les cellules d'Amphibiens sont cultivées à des températures inférieures, vers 16°C. Il s'agit d'incuber ces cellules à une température qui tombe à l'intérieur de la zone des variations physiologiques de la température centrale : cette zone est assez large. Une fois choisie cette température, on la maintient constante de façon à pouvoir comparer les résultats obtenus au cours de diverses expériences.

(3) Cas particuliers : prise en compte des variations régionales ou locales de température.

Dans certains cas particuliers, on prendra en compte **l'origine** des cellules mises en culture et **la température locale** ou **régionale** de l'environnement où elles se trouvent placées *in vivo*. Les cellules épidermiques humaines proviennent de tissus

physiologiquement exposés à des températures inférieures ou très inférieures à la température centrale. Elles croissent mieux à 33°C-35°C. D'une manière générale, les cellules épithéliales des homéothermes se multiplient mieux à 33°C. Les cellules transformées par des mutants thermosensibles de virus oncogènes constituent un cas très particulier que l'on reverra.

2-Effets des variations de température.

A température optimale, les processus enzymatiques et métaboliques d'un système biologique se déroulent de manière intégrée. Si l'on change la température de fonctionnement de ce système, on introduit une certaine disharmonie dans le développement de ces processus. On induit donc des comportements anormaux qui aboutissent parfois à la mort cellulaire. L'organisme a des moyens physiologiques de lutter contre ces variations de température : **les frissons** engendrent de la chaleur et permettent de lutter contre le refroidissement ; **la sudation** permet de lutter contre une chaleur excessive. Les cellules en culture n'ont pas de moyens propres pour lutter contre ces variations. Il est donc important d'en connaître les effets sur les comportements cellulaires. On envisagera successivement les effets des températures supra-optimales et suboptimales.

21-Effets des températures supra-optimales.

(1) Indications générales.

En règle générale, les cellules **normales** de Mammifères et d'Oiseaux sont tuées en 1 h, à 45-46°C. Elles résistent un peu plus longtemps à 42°C (de 12 à 24 h selon les cas). Les cellules **transformées** résistent généralement mieux au choc thermique (nom que l'on donne à toute exposition à des températures supra-optimales) que ne le font les cellules normales. Enfin la thermorésistance cellulaire dépend aussi de la **phase du cycle** dans laquelle se trouve la cellule lorsqu'elle est exposée au choc thermique : les cellules en phase G1, cultivées en présence de sérum, sont en général beaucoup plus résistantes. Toutes les cellules exposées à un choc thermique réagissent par la néodiataxie de protéines spécifiques, dites **protéines de choc thermique** (*heat shock protein*).

(2) Etude de quelques exemples.

Pour illustrer ces données générales, nous allons maintenant étudier quelques exemples présentés dans le polycopié.

(21) Les cellules d'un glioblastome humain (Gerweck et Richards).

Des cellules de glioblastome humain en lignée sont exposées pendant des temps variables à diverses températures, à pH constant et physiologique (pH 7,4). Après le choc thermique, on dénombre les cellules survivantes par la capacité qu'elles ont de former des colonies, et les résultats sont exprimés en pourcentage de survie. Le schéma montre que les cellules exposées à 42°C pendant 5 h résistent très bien à ce traitement. Pour une durée identique d'exposition, on constate que le simple fait d'augmenter de 1°C la température à laquelle les cellules sont exposées (43°C) fait passer à 80 % environ le pourcentage de mort. Une exposition de 2 h à 45°C provoque la mort de 99,5 % environ des cellules. Ce même pourcentage est atteint au bout d'1 h d'exposition à 46°C.

Le pH de l'environnement cellulaire a une importance capitale sur le niveau de thermorésistance des cellules. Plus il s'écarte d'une valeur physiologique et plus les cellules sont sensibles au choc thermique, pour une durée constante d'exposition. Le nombre de cellules viables diminue beaucoup plus rapidement dans ces conditions.

(22) Les cellules Neuro 2-A de neuroblastome de la Souris (Van Dongen et Van Wick).

Les expériences de ces auteurs ont pour but d'étudier l'influence de la phase du cycle cellulaire sur la thermorésistance. Les cellules Neuro 2-A sont synchronisées puis soumises à un choc thermique dans diverses conditions notamment d'environnement. La survie est mesurée par la mesure de DO. DO peut être défini comme le temps d'exposition requis pour réduire la survie d'un facteur de 1/e sur la portion linéaire de la courbe de survie tracée dans un système de coordonnées semi-logarithmiques. Les auteurs montrent que des cellules en G1 ou en fin de phase S-phase G2, ont des courbes de survie d'allure légèrement différente lorsqu'elles sont exposées pendant des temps variables à une température de 42,7°C, dans un milieu dépourvu de sérum. Les DO sont pratiquement identiques : elles sont de 23 min ± 2 pour les cellules en G1 et de 21 min ± 3 pour les cellules en S/G2. La présence de sérum pendant la période d'exposition au choc thermique augmente la résistance des cellules en phase G1 : la DO passe à 31 min ± 3 min. Elle ne modifie pas la thermorésistance des cellules en S/G2.

(23) Les cellules NBP₂ de neuroblastome de la Souris (Rama et Prasad).

Les auteurs étudient ici l'influence du temps d'exposition à la température sur la survie de cellules NBP₂ de neuroblastome de la Souris. Ils montrent qu'il faut un traitement de 20 h à 40°C pour réduire de 80 % le nombre des cellules viables. Il s'agit là de cellules tumorales qui expriment une relative thermorésistance (voir photocopié).

(24) Les fibroblastes d'embryon de poulet (Rattan et Buchanan).

L'intérêt de l'étude vient de ce que les auteurs étudient des cellules **normales**, les fibroblastes d'embryon de poulet, dans diverses conditions d'environnement (pourcentage et nature du sérum ajouté au milieu), dans des conditions optimales, supra-optimales et suboptimales. L'étude illustre bien l'interdépendance des divers facteurs impliqués dans la culture cellulaire (voir photocopié).

Les auteurs utilisent ici la notion de doublement de population DP qui est exprimé par la relation :

$$DP = \log (x/y)/\log 2$$

dans laquelle **x** est le nombre de cellules dans la couche cellulaire confluite, et **y** le nombre de cellules ensemencées. Les auteurs montrent que c'est légèrement au-dessous de la température centrale de la Poule que l'on observe un maximum de DP cumulés, sur une période de 50 jours. En outre c'est dans un milieu contenant 10 % de sérum de poulet que l'on obtient les meilleurs résultats : les DP cumulés sont de 40-43. A 43°C et dans le même milieu, les DP cumulés ne sont que de 20-23, et à 37°C, que de 25-27. Dans cet exemple qui anticipe sur l'effet des températures suboptimales, on note que la résistance des cellules est meilleure dans ces dernières zones de température.

22-Effet des températures suboptimales.

(1) Indications générales.

Les cellules de Mammifères ou d'Oiseaux supportent mieux l'exposition aux températures suboptimales que celle aux températures supra-optimales. Néanmoins les comportements des cellules varient selon l'origine de ces dernières, le degré de froid, le temps d'exposition au froid, et la position de la cellule dans le cycle cellulaire. Dans les exemples qui vont suivre, nous étudierons 2 zones de températures : une première zone va de 20 à 25°C et correspond grossièrement à ce qu'il est convenu d'appeler la température du laboratoire ; une deuxième zone plus restreinte va de 4 à 5°C et correspond à la température du réfrigérateur. Ces distinctions sont opérationnelles et un peu arbitraires ; nous verrons que certains exemples ont trait à des températures d'exposition qui s'écartent de ces valeurs.

(2) Exposition aux températures du laboratoire, entre 20°C et 25°C.

(21) Cas des cellules qui survivent.

Aux alentours de 20-25°C, la plupart des cellules de Mammifères et d'Oiseaux peuvent survivre, et même croître (essentiellement au sens trophique du terme, plus rarement au sens plasique) et métaboliser pendant au moins 3 ou 4 jours, voire plus. Cependant il existe des cellules qui finissent par mourir lors de l'exposition à un froid modéré quand la durée d'exposition est suffisamment prolongée, alors que d'autres restent vivantes, et peuvent se multiplier de nouveau si elles sont réincubées à température eugénésique.

Parmi les cellules qui survivent après exposition à des températures suboptimales, on peut citer le cas des **fibroblastes de périoste de poulet** qui peuvent être conservés dans un état de dormance plus ou moins profonde à 15°C ou aux alentours de cette température, et ce, pendant des jours, et même des semaines. Ils peuvent de nouveau se multiplier quand on les réexpose à des températures optimales (38°C). Tout comme les fibroblastes de périoste de poulet, d'autres types de cellules normales ou transformées peuvent survivre et rester quiescents quand ils sont exposés à la température du laboratoire. A cette température, il est même possible de conserver des cellules adhérentes à un support, pendant des jours et même pendant quelques semaines, sans avoir à les subcultiver à des intervalles trop rapprochés. Quand les cellules à conserver atteignent presque la confluence, **on remplace le milieu de croissance** riche en sérum, par un **milieu de maintenance** pauvre en sérum (2 % par exemple). Dans ces conditions, abandonnées sur une paillasse, les cellules restent viables pendant des temps variables qu'il convient de déterminer pour chaque cas. En général, ce temps est d'au moins une semaine. Nous avons pu nous-même garder viables, des cellules gliales tumorales de Rat C6, laissées pendant 1 mois à la température du laboratoire et placées dans un flacon rempli totalement de milieu de culture (Milieu de Ham F10, à 5 % de sérum foetal de veau [SFV]).

L'incubation à des **températures suboptimales** peut quelquefois **favoriser l'expression de certaines propriétés**. Des lymphocytes humains induits par le virus Sendai, par exemple, produisent davantage d'interféron quand ils sont incubés à 33-35°C que lorsqu'ils le sont à 37°C.

(22) Cas des cellules qui ne résistent pas.

Certaines cellules sont endommagées et meurent dans la zone de températures comprises entre 20 et 25°C. Ainsi, des cellules en lignée V79, dérivées du poumon de Hamster Chinois présentent cette propriété. Leur résistance a été étudiée par NELSON *et al.* (1971) sur une sous-lignée appelée V79-S171. Il s'agit de cellules quasi-diploïdes. Ces cellules subissent d'importants dommages quand elles sont exposées à des températures comprises entre 25°C et 10°C. Ces dommages sont d'autant plus étendus que la température "anormale" d'exposition est élevée. Ainsi, en 14 jours d'exposition à 25°C, 99,9 % des cellules sont mortes, contre seulement 90 % à 15°C et 80 % à 10°C. Il faut préciser que ces résultats sont obtenus avec des cultures asynchrones. Ces mêmes auteurs étudient par des méthodes autoradiographiques (incorporation de thymidine, d'uridine et de Leu tritiées, pour l'étude des diataxies du DNA, du RNA et des protéines, respectivement) les diataxies résiduelles que peuvent réaliser les cellules V79 à diverses températures. Ils montrent que ces diataxies sont relativement actives à partir de 18-20°C. Il est probable qu'il faut voir dans la mortalité plus élevée aux plus hautes températures suboptimales une conséquence des tentatives ratées que font les cellules pour cycloser dans des conditions qui ne remplissent que partiellement les exigences de la croissance (température ici). Ces résultats sont illustrés dans le polycopié.

(23) Cas particuliers.

(a) Il existe des cellules qui, à la température du laboratoire, subissent une différenciation irréversible et deviennent post-mitotiques. C'est le cas de divers clones dérivés du neuroblastome C1.300 de la Souris qui, à cette température, se différencient en neurone.

(b) D'autres cellules perdent d'importantes fonctions : les cellules musculaires lisses, squelettiques ou cardiaques ne se contractent plus ; les propriétés électrophysiologiques des cellules nerveuses sont fortement modifiées.

(c) Enfin il faut faire une place particulière aux cellules transformées par un mutant de virus oncogène, thermosensible pour la transformation. Une mutation thermosensible **n'a pas d'expression phénotypique** dans des conditions de **température** dites **permissives**. Celles-ci correspondent à des températures inférieures à celle qui permet une multiplication optimale ou une activité de transformation optimale du virus sauvage. Une cellule transformée par ce type de mutant a donc un phénotype **transformé** à "faible" température. En revanche, dans des conditions de **température non permissives** (température plus élevée), le gène thermosensible muté exprime sa mutation : dans le cas présent, il n'est plus capable de produire de protéines de transformation. La cellule prend alors un **phénotype non transformé**, bien que la séquence virale mutée soit intégrée au génome de la cellule hôte. Il est donc possible, en cultivant ces cellules à une température puis à une autre (*shift* des températures), d'observer la modification du phénotype cellulaire et d'étudier les phénomènes moléculaires qui accompagnent celle-ci.

(3) Exposition à la température du réfrigérateur : zone des 4°C-5°C.

(31) Indications générales et applications pratiques de la résistance éventuelle des cellules.

Beaucoup de cellules survivent dans la zone des 4°C-5°C, pendant des temps pouvant aller de 24 à 48 h. Elles ne subissent alors aucun autre dommage apparent qu'un allongement du temps de latence, lorsqu'on les replace à température optimale : elles sont plus lentes à reprendre leur multiplication. Ces observations ont incité Swim et Parker (1955) à chercher s'ils ne pourraient pas tirer partie de cette résistance pour conserver les cellules. Ils montrent qu'il est effectivement possible de conserver des types cellulaires très variés à 4°C pendant 6 à 9 semaines, à condition de respecter certaines règles de méthode. (a) Les cellules doivent être en bon état au moment du refroidissement ; (b) elles doivent adhérer à un support ; (c) elles doivent être cultivées dans leur milieu de culture habituel ; (d) le milieu de culture ne doit pas être changé pendant la période de conservation à 4°C ; (e) le milieu de culture ne doit pas être changé durant les quelques jours qui suivent le retour à température eugénésique.

Les auteurs montrent en effet que dans les 2 à 3 jours qui suivent le placement des cellules à 4°C, celles-ci, dans leur grande majorité, ont tendance à se rétracter et à prendre une forme sphérique. Les expansions cellulaires disparaissent. Un phénomène inverse a lieu quand les cellules sont replacées à 37°C ; il se déroule sur quelques jours. C'est pendant cette période critique qu'il faut éviter de changer le milieu. Les auteurs notent que les cellules continuent de métaboliser faiblement à 4°C et acidifient le milieu.

La résistance de certaines cellules à des températures voisines de 4°C offre aussi la possibilité de simplifier les protocoles expérimentaux d'études pharmacologiques ou virologiques cinétiques. Un lot de récipients de culture,ensemencés avec des cellules qui adhèrent au support, est placé à 4°C. A un moment déterminé, des récipients sont tirés au sort ; les cellules sont traitées par la substance à l'étude ou infectées par le virus en cause. Les récipients sont incubés à température optimale pendant le temps requis. Si H_0 est le moment où l'étude prend fin et que l'on désire faire une étude cinétique, on tire au sort 1 h, 2 h, 3 h,..., n h avant H_0 , et autant de fois que l'on veut obtenir de points expérimentaux, le nombre de flacons nécessaire. On peut ainsi à H_0 disposer de flacons traités pendant des temps variables, et mesurer les effets des traitements ou de l'infection virale en une seule fois, avec les mêmes réactifs ; on tire au sort l'ordre dans lequel les flacons seront étudiés ; on minimise ainsi le biais qui pourrait résulter d'une longueur excessive des manipulations.

(32) Facteurs impliqués dans la résistance aux températures de 4-5°C.

(a) **L'adhérence physiologique à un support** est certainement un élément très important de la résistance à des températures suboptimales voisines des 4°C. L'exemple des cellules L de Souris en lignée (Matsumura *et al.*, 1982) illustrera ce point. Des cellules L, **en suspension** dans du milieu de culture (milieu minimal [ou minimum] essentiel de Eagle [MEM] + 10 % de SFV) et placées à 4°C, perdent très rapidement leur viabilité ; il en meurt 98 % en 9 jours. Des cellules L de la même suspension, mais **mises à adhérer** pendant 3 h à 37°C avant d'être placées à 4°C résistent beaucoup mieux à ce traitement : il n'en meurt que 63 % en 9 jours. Il n'y a que 2 différences entre les 2 systèmes : l'adhérence et l'exposition préalable de 3 h à 37°C, nécessaire pour faire coller les cellules sur le support après une dissociation et transfert dans un nouveau flacon. Pour éliminer ce dernier facteur, on expose les cellules L pendant 3 h à 37°C dans des **tubes siliconés** dont les parois ne permettent pas l'adhérence physiologique des cellules, puis on les place à 4°C. Dans ces conditions les cellules ne résistent pas mieux que les cellules d'une suspension non exposée préalablement à 37°C.

(b) **Le mode de dispersion des cellules** ne modifie pas notablement la sensibilité des cellules au froid, qu'il soit mécanique (grattoir en caoutchouc [*rubber policeman*]) ou enzymatique (trypsine, dispase).

(c) **La composition du milieu de culture** intervient dans la résistance au froid, et plus particulièrement la fraction protéique du milieu. Matsumura *et al.* (1973) ont étudié cette question avec les cellules L de Souris et les cellules JTC-25-P3 du parenchyme hépatique de Souris, et un sous-clone de cette dernière lignée, le sous-clone JTC-25-P5. Les auteurs analysent l'allure des courbes de survie.

Voici d'abord les résultats des observations concernant la survie **des cellules L**. On prépare des suspensions de cellules L en MEM à 10 % de SFV à partir de cultures confluentes réalisées dans le même milieu. Ces suspensions, placées à 4°C, peuvent conserver quelques cellules viables pendant au moins 2 semaines. La courbe de survie est établie par dénombrement des cellules mortes en présence de bleu trypan à différents intervalles de temps. Elle comporte 2 portions distinctes qui permettent d'identifier 2 phases. **Pendant la phase 1**, les cellules restent viables dans leur grande majorité ; le pourcentage de mortalité augmente très faiblement. **Pendant la phase 2**, les cellules perdent rapidement leur viabilité. Il est possible à partir de ces courbes de survie de déterminer 2 paramètres importants qui permettent de quantifier le phénomène. Il suffit de prolonger la partie linéaire de la courbe représentative de cette phase vers le haut. L'intersection avec l'axe des abscisses donne **la durée de la phase 1** ; l'intersection avec l'axe des ordonnées permet de déterminer un nombre **m** dit nombre d'extrapolation. Plus ce nombre est élevé, et plus la mortalité est rapide. On peut aussi calculer le temps DO, ou temps requis pour réduire la survie d'un facteur de 1/e [$e = 2,718$; $1/e = 36 \%$ environ] ; ce temps est mesuré dans la phase 2, en utilisant la portion linéaire de la courbe et en calculant son gradient. Après 8 expériences consécutives, les auteurs concluent que la phase 1 dure en moyenne $16,3 \pm 1,0$ jours, que DO est égal à $4,2 \pm 0,6$ jours, et que $\log m = 1,8 \pm 0,3$ ($m = 62$). Les courbes de survie cependant varient considérablement d'une expérience à l'autre. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette variation : les conditions de culture précédant le placement à 4°C, les différences de qualité des sérums (car plusieurs lots différents ont été utilisés), les différences de qualité des milieux de conservation et d'incubation. L'achèvement de la phase 1 pourrait coïncider avec l'épuisement du milieu de conservation en certains composants. Cet épuisement serait donc la cause de la rentrée en phase 2. Pour vérifier cette hypothèse, une suspension est divisée en 2 lots. Un lot est laissé à 4°C sans aucun changement, l'autre est laissé à 4°C avec renouvellement du milieu par moitié tous les 8 jours (4 changements en 32 jours). Une Figure du polycopié montre qu'il n'y a aucune différence entre les courbes de survie. Ces résultats ne contredisent pas ceux de Swim et Parker qui travaillaient avec des cellules adhérentes. La présence de sérum dans le milieu de conservation à 4°C, à des concentrations allant jusqu'à 2 %, est utile à la survie des cellules (mesurée à 17 jours). Au-delà de 2 %, la survie est progressivement amoindrie. On doit donc utiliser de préférence un milieu de conservation appauvri en sérum, voire dépourvu de sérum de veau [SV].

Voici maintenant les résultats des observations concernant la survie **des cellules JTC-25-P5**. Ces cellules peuvent être conservées pendant une dizaine de jours dans du MEM sans SV, à condition d'avoir été préincubées à 37°C pendant 72 h dans du MEM additionné d'au moins 2 % de SV. Les fractions sériques actives sont les fractions lourdes du sérum. Ces fractions modifient peut-être l'activité métabolique des cellules. Les composants lipidiques du sérum pourraient aussi intervenir. Quand ces cellules sont préincubées seulement pendant 48 h à 37°C dans du MEM à 2 % de SV, elles meurent

plus vite en MEM sans SV qu'en MEM contenant 2 % de SV, quand elles sont exposées à 4°C.

3-Conservation des cellules par congélation.

31-Etude théorique des effets de la congélation.

311-Etat et réactivité de l'eau dans les cellules lors du refroidissement.

L'eau liquide est essentielle au maintien de la structure et des fonctions des cellules vivantes. Il est donc normal qu'en absence de précautions particulières, la solidification de l'eau intracellulaire par congélation soit létale.

Paradoxalement, la congélation peut également préserver la viabilité des cellules pendant de longues périodes de temps. Elle permet par conséquent de conserver sur le long terme des cellules, des tissus ou des organes. La congélation peut être également utilisée pour préserver des constituants subcellulaires ou l'ultrastructure fine de la cellule. Mais elle peut l'être pour désintégrer les cellules et les organites, ou pour isoler les constituants cellulaires si c'est l'effet létal que l'on exploite.

Le véritable défi porté aux cellules congelées n'est pas, comme on le pense couramment, celui de **la résistance aux très basses températures**. Il est, pour la cellule, de résister **aux effets létaux qui se manifestent dans une zone de températures** comprises entre -15°C et -60°C. La cellule doit passer à 2 reprises dans cette zone, une première fois lors de la congélation, une deuxième fois lors de la décongélation.

Aucune **réaction mue thermiquement** ne peut avoir lieu dans des systèmes aqueux à -196°C. (Cette température est celle de l'azote liquide, couramment utilisé en cryobiologie). L'eau liquide en effet n'existe pas en dessous de -130°C et c'est ce qui explique cette inertie. A cette température, l'eau ne peut revêtir que l'état **crystallin** ou l'état **vitreux**. Dans ces 2 cas, sa viscosité est très élevée (10^{13} poises). La diffusion des molécules est insignifiante même sur des périodes de temps géologiques. Enfin, à la température de -196°C, l'énergie thermique est insuffisante pour autoriser des réactions chimiques.

Les seules réactions qui peuvent survenir à -196°C sont des réactions photophysiques, comme la formation de radicaux libres et la production de cassures dans les macromolécules (acides nucléiques). Ces événements sont la conséquence possible des coups (*hit*) portés au système biologique par les radiations ionisantes de bruit de fond, ou les rayons cosmiques. Sur une période de temps assez longue, ces ionisations directes peuvent provoquer suffisamment de cassures ou de modifications du DNA, et devenir nuisibles. Il ne peut y avoir de réparation enzymatique du DNA à ces températures. Les effets nuisibles se manifestent alors dès le réchauffement du système à des températures physiologiques. La dose de rayonnements ionisants qui tue 63 % des cellules de Mammifères (survie de 100-1/e %) est de 200 à 400 rads. La radiation de bruit de fond de l'atmosphère terrestre est de l'ordre de 0,1 rad/an. Il faut donc 2.000 à 4.000 ans pour tuer cette fraction d'une population typique de cellules de Mammifères. La vérification expérimentale de cette prédiction est évidemment impossible. Mais on ne connaît aucun exemple de populations de cellules qui, conservées pendant 2 à 15 ans dans l'azote liquide, en soient totalement mortes. Il n'en

existe aucun non plus, pour des cellules conservées à -196°C et exposées pendant 5 ans à des doses de radiations cent fois supérieures à la dose du bruit de fond. Enfin il n'existe aucune preuve indiquant que la conservation à -196°C entraîne l'accumulation de modifications chromosomiques ou génétiques.

Le maintien de la viabilité sur des siècles ou des millénaires exige donc des températures inférieures à -130°C . Nombre de types cellulaires perdent leur viabilité quand ils sont conservés à/ et au-dessus de/ -80°C , sans doute parce que les suspensions cellulaires contiennent des traces de solutions non congelées. Le taux de mortalité varie de plusieurs pour-cent/h à plusieurs pour-cent/an, selon la température de conservation, l'espèce, le type cellulaire et la composition du milieu de congélation.

La plupart des applications biologiques de la congélation résultent de ce que l'on peut appeler la "**cessation effective de l'écoulement du temps biologique**" à la température de -196°C . Mais pour placer des cellules dans un état de vie suspendue, il faut qu'elles puissent survivre à la fois à la congélation initiale à -196°C puis à la décongélation et au retour à des températures biologiques. Pour comprendre les phénomènes impliqués lors de ces aller et retour d'une température à l'autre, il faut en fait comprendre **les événements physico-chimiques** survenant pendant ces périodes, et **la réponse des cellules à ces événements**.

Lors du refroidissement, l'eau peut passer par divers états qui dépendent et de la température et de la vitesse de refroidissement (voir le polycopié).

Entre -2°C et -5°C , les cellules et leur milieu environnant ne congèlent pas, en raison à la fois de **la dépression du point de congélation** par les solutés protecteurs souvent présents dans le milieu et **du super-refroidissement**.

Entre -5°C et -15°C , il se forme de la glace dans le milieu extérieur. Cette formation peut être spontanée, ou amorcée par l'ensemencement de la solution avec un cristal de glace. Mais le contenu cellulaire reste non congelé et super-refroidi, peut-être parce que la membrane plasmique bloque la croissance des cristaux de glace à l'intérieur du cytoplasme. Par définition, l'eau endocellulaire super-refroidie a un potentiel chimique plus élevée que l'eau des solutions extracellulaires partiellement congelées. La différence des potentiels chimiques fait que l'eau endocellulaire s'écoule vers l'extérieur de la cellule et congèle dans le milieu extérieur. [Le potentiel chimique est une quantité thermodynamique qui exprime la capacité d'un solvant à s'écouler].

Si le refroidissement est **suffisamment lent**, la cellule perd de l'eau par **exosmose** assez rapidement pour concentrer suffisamment les solutés intracellulaires, éviter le super-refroidissement et maintenir le potentiel chimique de l'eau intracellulaire en équilibre avec celui de l'eau extracellulaire. Le résultat est que la cellule se déshydrate et ne congèle pas à l'intérieur.

Si le refroidissement est **rapide** ou **très rapide**, la cellule ne peut plus perdre d'eau suffisamment vite pour maintenir l'équilibre des potentiels chimiques. Elle se super-refroidit progressivement, et atteint éventuellement l'équilibre des potentiels par la congélation intracellulaire.

Ces phénomènes ont été quantifiés par Mazur à l'aide de 4 équations.

312-Les équations de Mazur.

L'équation [1] relie la perte d'eau cytoplasmique au gradient de potentiel chimique exprimé comme un rapport de pression de vapeur :

$$dV/dt = (L_p A R T \times \ln P_e/P_i)/V_1^\circ$$

- V : volume d'eau cellulaire.
 t : temps.
 L_p : coefficient de perméabilité pour l'eau.
 A : surface cellulaire.
 R : constante des gaz (mm³ atm/mol/°K).
 T : température absolue (en °K).
 V₁[°] : volume moléculaire de l'eau.
 P_e : pression de vapeur de l'eau extracellulaire.
 P_i : pression de vapeur de l'eau intracellulaire.

L'équation [2] relie le changement de pression de vapeur et la température à partir des équations de CLAUSIUS-CLAPEYRON et de la loi de RAOULT :

$$d \ln (P_e/P_i)/dT = L_f/RT^2 - [N_2 V_1^\circ / (V + N_2 V_1^\circ) V] dV/dT$$

- N₂ : osmoles de soluté intracellulaire.
 L_f : chaleur latente de fusion de la glace.

Les analyses ont montré que la différence de température de part et d'autre de la membrane cytoplasmique dépassent rarement 0,01°K

L'équation [3] relie le temps et la température à l'aide du taux de refroidissement ; si ce taux est linéaire, son expression devient :

$$dT/dt = B$$

Enfin l'équation [4] relie L_p à la température par l'expression :

$$L_p = L_{p^g} \exp [-E/R' (1/T - 1/T_g)]$$

- L_p^g : coefficient de perméabilité pour l'eau à la température T_g.
 E : énergie d'activation de l'eau.

R' : constante des gaz (exprimée ici en cal/mol/°K).

Pour éviter la congélation intracellulaire, le contenu en eau de la cellule, donné par les équations [1] à [4] doit avoir atteint l'équilibre (donné par l'équation [5]) du contenu en eau, avant d'atteindre la température intracellulaire de nucléation de la glace.

$$V = V_1^{\circ} M_i / [\exp (L_f/RT - L_f/RT_f) - 1]$$

M_i : osmolalité initiale de la solution extracellulaire.

T_f : point de congélation de l'eau (273°K).

Ces diverses expressions permettent de calculer le degré de super-refroidissement dans une cellule, en fonction du taux de refroidissement, pourvu que l'on connaisse, ou que l'on puisse calculer ou estimer, la perméabilité de la cellule à l'eau (L_p), son énergie d'activation (E), les osmoles de soluté initialement présent dans la cellule, et le rapport de la surface de la cellule à son volume. Les résultats de ces calculs sont habituellement exprimés comme des diagrammes de contenu en eau, en fonction de la température, relativement au volume normal ou isotonique qui est le 100 % (Figure du polycopié). Le niveau calculé de super-refroidissement est le nombre de degré centigrades que chaque courbe doit rattraper sur sa gauche vers la courbe d'équilibre, pour une température donnée, en dessous de 0°C. Ces courbes calculées permettent d'estimer la probabilité de congélation intracellulaire en fonction du taux de refroidissement. **Des cellules qui ont été déshydratées dans une zone proche de l'équilibre**, avant d'atteindre la température de nucléation de la glace qui leur est propre, ont une probabilité voisine de 0 de subir une congélation intracellulaire. **Des cellules qui sont encore intensément super-refroidies** quand elles sont placées à la température de nucléation de la glace qui leur est propre, et qui par conséquent sont encore hydratées, auront une très forte probabilité de subir une congélation intracellulaire.

A l'heure actuelle, on dispose d'informations qui permettent de relier la perte d'eau intracellulaire à la probabilité de congélation intracellulaire pour plusieurs types de cellules : levures, ovocytes non fertilisés de Souris, lymphocytes humains, protoplastes de plantes. Dans tous les cas, il y a un bon accord entre la prédiction calculée et les résultats observés.

Les équations utilisées pour prédire les taux de refroidissement conduisant à la congélation intracellulaire font l'hypothèse préalable simplificatrice que le cytoplasme se comporte comme une solution aqueuse diluée idéale. Et de fait, l'eau cytoplasmique ne semble pas avoir de propriétés particulières qui permettraient d'expliquer la réponse des cellules à des températures inférieures à 0°C.

Les cellules prises comme un tout répondent comme des petits sacs remplis de solution aqueuse diluée non seulement lorsque l'on considère leur vitesse de déshydratation par exosmose lors de la congélation à faible vitesse, mais aussi lorsque l'on considère la cristallisation de leur eau cytoplasmique lors de refroidissements suffisamment rapides à de faibles températures. Il existe des preuves **morphologiques** de cette congélation intracellulaire ; des preuves **physiques** (mesures calorimétriques)

montrent que 90 % de l'eau cellulaire est convertie en glace, et, si le refroidissement est rapide, cette conversion prend place dans la cellule.

Les cellules, nous l'avons vu, tendent à se super-refroidir, même en présence de glace extracellulaire. On sait aussi qu'elles ne contiennent aucune substance capable de provoquer la nucléation d'eau super-refroidie en dessous de -25°C . Ainsi, en absence de glace extracellulaire, l'eau présente dans les globules rouges [GR] reste super-refroidie entre -30°C et -40°C . Cette dernière température est proche de la température de nucléation homogène de l'eau, c'est-à-dire de la température à laquelle l'eau se congèle spontanément en absence d'agents nucléateurs de glace. Même en absence de glace extérieure (la glace est le meilleur agent nucléateur connu), de nombreuses cellules, placées dans des solutions de diméthylsulfoxyde [DMSO] ou de glycérol 1,5-2,0 mol/l restent super-refroidies vers les -40°C .

Quand des cellules super-refroidies subissent une congélation interne bien en dessous de -40°C , il s'agit d'une nucléation hétérogène due au/ et provoquée par le/ passage des cristaux de glace extracellulaire à travers la membrane cytoplasmique. Normalement, la température à laquelle la nucléation de la glace survient dans des cellules animales en présence de glace extracellulaire est de -10°C , -15°C ; mais en fait cette température varie de -30°C à -50°C ou en dessous. La température de nucléation (embryon de Souris par exemple) peut dépendre du degré auquel la membrane cytoplasmique est protégée contre les modifications survenant dans la solution extracellulaire en raison de la présence d'agents cryoprotecteurs (glycérol ou DMSO). La nature des lésions produites par les changements que nous venons d'évoquer sera discutée plus loin. Il suffit de garder à l'esprit l'idée que la glace peut traverser la membrane cytoplasmique en dessous de certaines températures, et qu'elle ne le peut pas au dessus de certaines autres, quand celles-ci sont en dessous de 0°C .

L'eau liquide traverse facilement et rapidement les membranes biologiques. Pourquoi la glace ne le peut-elle pas ? Un cristal de glace est un assemblage coordonné de molécules d'eau, faisant intervenir des liaisons de type hydrogène. Cet assemblage peut traverser les membranes si, et seulement si, ces dernières possèdent des pores de taille suffisante et remplis d'eau. Plus le pore est étroit et petit, et plus le rayon de courbure du cristal qui pénètre doit être petit. Selon l'équation de KELVIN, plus le rayon de courbure est petit et plus le point de fusion du cristal est bas. Un cristal de glace au rayon de courbure de 2 nm a un point de fusion de -15°C . Ainsi, au-dessous de -15°C , un tel cristal est capable de croître à travers la membrane cytoplasmique si les pores de cette dernière ont un diamètre inférieur à 0,5-2 nm. La valeur exacte dépend ici de la capacité de l'eau liquide à mouiller les parois des pores. Ces indications sont en accord avec les données de la littérature sur la structure moléculaire de la membrane plasmique.

313-Lésions cellulaires produites lors de la congélation et décongélation.

(1) Effets de la congélation intracellulaire sur la survie des cellules.

Dans les quelques exemples qui ont pu être examinés, il est montré que les taux de refroidissement qui produisent une congélation intracellulaire provoquent également une mort cellulaire extensive (Figure dans le polycopié). Il est prouvé que la congélation intracellulaire est la cause et non la conséquence de cette mort. En effet, un pourcentage substantiellement plus élevé de cellules survit à la congélation intracellulaire (observée ou inférée) quand le taux de réchauffement à la décongélation

est élevé et non bas. Un réchauffement rapide réduit la survenue de **la recristallisation**. Il existe cependant des exceptions. Les embryons congelés de Souris ne peuvent être récupérés viables que si la décongélation est lente ; les GR lentement refroidis dans un milieu contenant du glycérol 2 mol/l ne peuvent être récupérés intacts que s'ils sont lentement réchauffés. Il y a en fait une étroite corrélation entre les taux de refroidissement et de réchauffement, quant à l'effet final de ces 2 facteurs sur la récupération de cellules viables. Ceci conduit au concept de diagramme d'isosurvie que nous reverrons.

(2) Importance de la recristallisation de la glace intracellulaire.

Bien que des refroidissements rapides produisent de la glace intracellulaire, les cristaux tendent à être petits. A des taux de refroidissement extrêmement élevés, les cristaux ont même une taille si petite qu'ils sont invisibles y compris en microscopie électronique. C'est pourquoi l'on utilise la congélation ultra-rapide dans les techniques ultramicroscopiques de cryodécapage.

Ces cristaux invisibles, si petits soient-ils, sont cependant instables thermodynamiquement par comparaison à des cristaux plus gros. La raison en est que les petits cristaux fondent à des températures plus faibles. En conséquence, lors du réchauffement, les petits cristaux ont tendance à s'agréger pour engendrer des cristaux de plus grande taille. C'est le phénomène de recristallisation. On admet généralement que **le réchauffement lent est nuisible** pour les cellules congelées, car il laisse du temps pour le développement de ce phénomène. Il existe une corrélation directe entre la recristallisation de la glace intracellulaire et la mort de la cellule lors du réchauffement lent.

(3) Modifications du milieu extracellulaire lors de la congélation ; effet des cryoprotecteurs.

L'application de taux de refroidissements lents est nécessaire à la prévention de la congélation intracellulaire. Mais le plus souvent cette condition n'est pas suffisante pour assurer la survie de la cellule. Par congélation, on entend la congélation réalisée à une vitesse telle qu'elle permet une fuite suffisante d'eau intracellulaire vers le milieu extracellulaire pour maintenir l'équilibre des potentiels chimiques de l'eau distribuée dans ces 2 compartiments. Dans ces conditions, il ne se forme que de la glace extracellulaire. Toute lésion observée résulte alors (a) d'une action directe de cette glace ; (b) des modifications de la proportion de glace dans le milieu extracellulaire ; (c) de changements dans la composition de la solution extracellulaire résultant de la conversion d'eau en glace, à l'exclusion de toute autre cause.

Effectivement, au fur et à mesure que de la glace se forme à l'extérieur, la concentration des solutés extracellulaires dans le milieu résiduel non congelé augmente selon la relation [6] :

$$M^e = \Phi \nu m^e = \Phi \nu n_2 / V^e + \Delta T / 1,86$$

M^e : osmolalité externe.
 Φ : coefficient osmotique.

- ν : nombre d'espèces dans lesquelles se dissocient les solutés.
- m^e : molalité.
- n_2 : nombre de moles de solutés.
- V^e : volume d'eau extracellulaire.
- ΔT : nombre de degré en dessous de 0°C .
- 1,86 : constante d'abaissement du point de congélation molale pour l'eau.

Dans des solutions partiellement congelées, M^e est indépendant à la fois de la nature des solutés et de leur concentration totale avant la congélation. A pression constante, elle ne dépend que de la température. Pour une solution contenant un soluté donné unique, cette constatation est également grossièrement exacte pour m^e (grossièrement seulement, car Φ varie quelque peu avec la concentration).

En conséquence la concentration osmotique molale totale des solutés dans la portion non congelée d'une solution à une température donnée n'est pas influencée par l'addition de soluté, comme le glycérol ou le DMSO, que l'on utilise comme cryoprotecteurs.

Par exemple, les portions non congelées d'une solution saline isotonique (0,3 osmolale) et d'une solution saline additionnée de glycérol 1 mol/l (1,4 osmol/kg d'eau) ont la même concentration osmolale totale à -10°C . Celle-ci est de $10/1,86 = 5,4$ osmol/kg d'eau.

Mais la présence d'additif réduit effectivement les concentrations salines à la température considérée selon la relation [7] :

$$M^i_{\text{NaCl}} = M^i_{\text{NaCl}} / (1 + R)$$

M_{NaCl}^I : concentration osmolale de l'électrolyte en présence d'additif.

M_{NaCl}^A : concentration osmolale de l'électrolyte en absence d'additif.

R : rapport osmolal de l'additif à l'électrolyte avant congélation.

Les changements de coefficients osmotiques qui accompagnent les changements de température rendent les équations [6] et [7] difficiles à résoudre avec une grande précision. Mais on peut déterminer sans difficultés la composition et les quantités relatives de liquide concentré et de glace, à partir des diagrammes de phase ; on peut donc déterminer exactement la concentration de NaCl pour toutes les températures. Une Figure du polycopié montre comment il est possible, en présence de glycérol ou de n'importe quel autre soluté, de réduire la concentration de NaCl dans la solution résiduelle non congelée.

La concentration des solutés lors de la congélation résulte de la conversion d'eau en glace : m^e augmente, V^e diminue, n_2 reste constant. Mais si l'on augmente la valeur initiale de n_2 en introduisant un autre soluté tel le glycérol, la valeur requise de m^e est réalisée avec une moindre décroissance de V^e . Ceci revient à dire que l'introduction de glycérol (ou de n'importe quel autre soluté) a pour résultat d'augmenter la fraction non congelée à n'importe quelle température comme le montrent les Figures du polycopié.

(4) Effet de la congélation lente sur la survie cellulaire : concentration saline et fraction non congelée.

Même si elle est préférable aux autres modalités, la congélation lente provoque des effets nuisibles. Ces derniers sont illustrés par une Figure du polycopié. Il s'agit de l'exemple des GR humains refroidis à un taux de $1,47^\circ\text{C}/\text{min}$ puis rapidement décongelés. Ce diagramme montre (a) qu'en absence de cryoprotecteur et en milieu tamponné, la "survie" des GR (évaluée par l'absence d'hémolyse) décroît avec l'abaissement des températures ; (b) qu'en présence de glycérol entre 0,5 mol/l et 1,75 mol/l, la décroissance de la "survie" survient à des températures de plus en plus basses et (c) que cette décroissance de la "survie" est amoindrie de façon spectaculaire quand la concentration en glycérol dans le milieu salin tamponné est égale ou supérieure à 1,95 mol/l.

En combinant les données "survie" *versus* "température" avec les données "concentration en NaCl" *versus* "température", on obtient des résultats montrant (voir Figure A dans le polycopié) le rôle incontestable du NaCl dans les effets nuisibles observés lors de la congélation lente. En présence de moins de 1 mol/kg d'eau de NaCl dans la fraction résiduelle non congelée, la survie est de 80 % ; elle est de 20 % seulement pour des concentrations supérieures à 2 mol/kg d'eau. En outre, en combinant les données "survie" *versus* "température" avec les données "température" *versus* "fraction non congelée" (voir la Figure du polycopié), on obtient des résultats (voir la Figure du polycopié) montrant que la survie passe d'une valeur ≥ 80 % avec une fraction non congelée de 0,14 et plus, à une valeur ≤ 20 % quand la fraction non congelée atteint 0,07 et moins.

La question est donc de déterminer si l'hémolyse des GR lentement congelés résulte du fait que l'on a atteint une concentration élevée en NaCl, ou du fait que les fractions non congelées sont en trop petite proportion. Sans rentrer dans des détails trop poussés qui sortiraient du cadre du cours, on peut avancer 4 hypothèses qui permettent d'expliquer les lésions portées aux cellules lors de la congélation lente.

(41) Hypothèse de Lovelock.

Selon cette hypothèse, les effets nuisibles observés sur la survie des cellules lors de la congélation lente résulteraient de l'augmentation de la concentration des électrolytes extracellulaires qui en retour produirait une augmentation de la concentration des électrolytes intracellulaires. Les additifs et cryoprotecteurs agiraient essentiellement par leur capacité **colligative** à abaisser la concentration saline. Mais si cette hypothèse était exacte, certaines expériences non rapportées ici, fourniraient de tout autres résultats que ceux effectivement observés.

(42) Hypothèse de Meryman.

Selon cette hypothèse, les cellules subissent un rétrécissement de taille à la suite des mouvements d'eau (exosmose), en réponse à l'augmentation de la concentration des solutés extracellulaires qui accompagnent la congélation. Les lésions du refroidissement lent seraient une conséquence de ce rétrécissement, ou plus exactement, seraient une conséquence de l'incapacité des cellules à se rétrécir au degré suffisant et nécessaire pour maintenir l'équilibre osmotique.

(43) Hypothèse de Wiest et Steponkuis.

Cette hypothèse concerne essentiellement les protoplastes de végétaux. Elle suppose que les cellules qui se rétrécissent "osmotiquement" lors de la congélation ne peuvent tolérer qu'une augmentation déterminée de taille et de surface lors de la décongélation, au delà de laquelle elles sont endommagées.

(44) Hypothèse de Mazur.

Contrairement aux 3 autres hypothèses qui relient les lésions à la composition du liquide résiduel non congelé, Mazur estime, et semble-t-il prouve, que c'est **la diminution de la fraction non congelée** (appelée U), **et non sa composition**, qui est le principal facteur responsable des lésions cellulaires lors de la congélation lente.

Mazur apporte une explication : selon lui, lors de la congélation lente, les cellules sont séquestrées dans d'étroits "tunnels" de solution non congelée, ménagés entre des bancs de glace. Ceci est prouvé par les observations microscopiques. Lorsque la température baisse, ces tunnels deviennent de plus en plus étroits. Quand des GR de Grenouille sont congelés entre $-1,5^{\circ}\text{C}$ et -5°C , le diamètre des tunnels qui les emprisonnent diminue et atteint une valeur égale à environ la moitié du diamètre de la cellule. La fraction non congelée passe de 0,23 à 0,07 (au-dessous de laquelle, la valeur de la fraction non congelée devient critique pour les GR).

On a également démontré, par des études microscopiques, que des cellules soumises à des solutions hyperosmotiques lors de la congélation lente subissent une distorsion, tandis que des cellules placées dans une solution hyperosmotique, mais en absence de congélation, subissent un rétrécissement isotrope. Cette distorsion suggère que des forces physiques autres que la pression osmotique sont à l'œuvre lors de la congélation et soulève la possibilité que les lésions cellulaires soient la conséquence de ces forces. La contrainte exercée par la glace en croissance sur les contours cellulaires serait assumée par le rétrécissement. Aux basses températures, il en résulterait une distorsion dommageable pour la cellule.

(5) Chaleur latente de fusion.

Quand on refroidit une suspension cellulaire, la plus grande partie de l'eau cellulaire présente dans la préparation est transformée en glace aux alentours de -5°C et moins (voir plus haut). Le changement de l'état liquide vers l'état solide entraîne une production d'énergie sous forme de chaleur appelée "chaleur latente de fusion". Pendant toute la durée du phénomène, la température de la préparation peut augmenter de façon importante (5 à 10°C). Ceci favorise la recristallisation qui aboutit à la formation de plus gros cristaux de glace. Si la production de chaleur n'est pas compensée, certaines cellules ne peuvent être récupérées ultérieurement.

(6) Relations entre survie cellulaire, et taux de refroidissement, nature et concentration du cryoprotecteur, taux de réchauffement. Courbes d'isosurvie.

La survie finale des cellules congelées et décongelées dépend donc de 3 facteurs : **taux de refroidissement, nature et concentration du cryoprotecteur, taux de réchauffement**. Ces 3 facteurs contrôlent la formation de glace intra- et extracellulaire, la concentration des solutés intra- et extracellulaires et la recristallisation qui sont les principaux agents impliqués dans les lésions cellulaires lors de la congélation et décongélation. Une Figure du polycopié illustre la réponse des cellules aux taux de refroidissement (pour une température de réchauffement donnée). Les cellules sont congelées à -60°C et au-dessous, à des vitesses de refroidissement variées. Les courbes représentant le pourcentage de survie en fonction de la vitesse de refroidissement affectent la forme d'un U renversé. Pour un taux de réchauffement donné, il y a donc une vitesse de refroidissement, **propre à chaque cellule** pour lequel la survie finale est maximale. Ce taux est le taux optimal.

Cette Figure rend compte des 2 interrogations fondamentales de la cryobiologie. (a) Pourquoi y-a-il une vitesse optimale de congélation, ou, plus exactement, pourquoi les cellules sont-elles lésées quand elles sont congelées à des vitesses inférieures ou supérieures à la vitesse optimale ? (b) Pourquoi ces valeurs optimales varient-elles si largement d'une cellule à l'autre ?

Une Figure du polycopié illustre le comportement des cellules en présence de cryoprotecteurs. Cette Figure porte sur le cas très particulier des GR humains qui demandent à être congelés très rapidement ; ils constituent pour cette raison un excellent modèle pour l'étude des facteurs qui peuvent modifier le comportement des cellules lors de leur congélation à de faibles taux de refroidissement. La Figure montre que la partie gauche de la courbe en U inversé est brutalement affectée par la présence des cryoprotecteurs, et surtout par leur concentration. Quand celle-ci augmente, les GR humains deviennent de plus en plus résistants au refroidissement lent. Plus on se rapproche du taux optimum de refroidissement, et plus l'influence de la présence et de la concentration du glycérol sur la protection s'amointrit ; elle devient même pratiquement négligeable quand ce taux est atteint, et ce à des concentrations de cryoprotecteur qui varient considérablement ; à un taux de refroidissement de $1.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$, des concentrations en glycérol de 1,1 mmol/l, 2,2 mmol/l et 3,3 mmol/l ont des effets identiques. A des refroidissements supra-optimaux, la présence d'un excès de cryoprotecteur perméant dans le milieu de congélation peut même diminuer le taux de survie cellulaire ; ce cryoprotecteur peut en effet provoquer une congélation intracellulaire létale.

Une Figure du polycopié, enfin, illustre la réponse des cellules à des taux de réchauffement variables. Quand des GR humains sont refroidis **plus rapidement qu'à l'optimum**, la survie est nettement **meilleure** après **réchauffement rapide** qu'après réchauffement lent. Quand des cellules sont refroidies **plus lentement qu'à l'optimum** la réponse est **inversée** : la survie est nettement **meilleure** après **réchauffement lent** qu'après réchauffement rapide.

La partie droite de la courbe en U inversé et sa dépendance par rapport aux taux de réchauffement est aisément explicable en termes d'événements physico-chimiques : nous les avons déjà discutés. C'est **une conséquence** de la congélation intracellulaire, essentiellement de **la recristallisation**.

Un Tableau du polycopié, vous donne quelques données numériques relatives aux cellules L-132 de lymphome de Souris, congelées puis décongelées dans différents couples de conditions. Il montre qu'il existe des couples de conditions très différentes qui donnent des pourcentages de survie équivalents. C'est la notion d'**isosurvie**.

Akhtar, Pegg et Foreman ont utilisé l'étroite corrélation existant entre la vitesse de congélation et la vitesse de décongélation pour construire, à partir de résultats expérimentaux et avec l'aide d'un ordinateur, les courbes d'isosurvie de cellules L de Souris, en présence de glycérol (2 mol/l) ou de DMSO (1,6 mol/l) Ces courbes sont présentées dans une Figure du polycopié. Elles expriment la liaison existant entre les 2 paramètres de vitesse. Chacune d'entre elles représentent tous les couples de conditions donnant un pourcentage de survie identique. Chacune des courbes de ces graphiques est relative à un pourcentage de survie donné. Il peut exister plusieurs courbes indépendantes pour un pourcentage précis.

La façon la plus simple d'expliquer l'existence d'un taux de refroidissement optimum est d'admettre que la survie est la conséquence de 2 facteurs dépendants de manière opposée de ce taux de refroidissement. **Le premier facteur** est la congélation intracellulaire dont la probabilité augmente avec l'augmentation du taux de refroidissement. **Le second facteur** est l'exposition prolongée à la congélation extracellulaire dont les conséquences néfastes diminuent quand on augmente le taux de refroidissement.

Mazur a, semble-t-il, très bien expliqué pourquoi les lésions produites par un lent refroidissement peuvent être d'abord une conséquence de la réduction du volume de liquide entourant la cellule, et secondairement une conséquence de l'augmentation de la concentration en solutés extracellulaires dans ce volume de liquide. L'effet protecteur du glycérol (voir les Figures du polycopié) résulte probablement du fait que sa colligativité augmente le volume de liquide extracellulaire et diminue la concentration saline dans ce volume.

Avec un refroidissement suffisant, toute l'eau liquide peut disparaître par conversion en glace vitreuse ou cristalline. Apparemment, la réduction de la fraction non congelée à des valeurs normalement critiques n'a pas de conséquences nuisibles quand elle survient en dessous de -45°C (voir les Figures du polycopié).

Il reste toutefois un certain nombre de questions sans réponses. Les voici.

- (a) Pourquoi la survie cellulaire dépend-elle du volume de liquide résiduel ?
- (b) Pourquoi lorsque l'on se place du côté "refroidissement lent" du taux de refroidissement optimum, la survie augmente-t-elle lorsque l'on augmente le taux de refroidissement ?
- (c) Pourquoi l'effet du taux de réchauffement réverse-t-il dans des cellules congelées lentement ?

(7) Lésions osmotiques induites lors de la décongélation et du retour des cellules en milieu physiologique.

On peut suggérer une explication concernant la sensibilité des cellules congelées lentement à la décongélation rapide : cette manœuvre induirait une sorte de choc osmotique.

Certaines données indiquent en effet que du cryoprotecteur peut être littéralement "poussé" dans les cellules lors de la congélation lente. Ce phénomène est appelé **le chargement en soluté** (*solute loading*). Le temps nécessaire à la diffusion du cryoprotecteur hors des cellules lors de la décongélation rapide peut s'avérer insuffisant.

Les cellules gonflent et se lysent lorsque le milieu est brusquement dilué par la fonte de la glace extracellulaire.

La façon qu'a la membrane plasmique de s'accomoder de **la diminution du volume cellulaire** lors du refroidissement lent peut aussi avoir de l'importance. Tandis que la cellule se rétracte, elle exige de moins en moins de surface pour enclore un volume progressivement décroissant de cytoplasme. Dans certaines cellules, l'accomodation se fait par **transfert** de l'excès de membrane **à l'intérieur** de la cellule, ou par **bourgeonnement** : c'est le cas des cellules végétales. Rien de tel n'a été signalé chez les cellules animales, qui présentent normalement de très nombreux replis, microvillosités et prolongements. Dans des conditions isotoniques, la cellule animale est si **convolutive** qu'elle devrait être capable de supporter les quelques repliements supplémentaires requis par l'ajustement à des conditions hyperosmotiques. C'est effectivement le cas pour plusieurs cellules animales en lignée.

D'autres mécanismes permettent à une cellule sphérique d'adapter sa surface à une réduction de volume : c'est la distorsion. De gros écarts par rapport à la forme sphérique augmentent la quantité de surface exigée pour enclore un volume donné. C'est ce qui se passe souvent dans la congélation.

Le **choc osmotique** peut également tuer les cellules quand elles sont replacées en milieu isotonique. La plupart des cellules contiennent effectivement des concentrations en cryoprotecteur en équilibre avec les concentrations extracellulaires, avant, et par conséquent après la congélation. Dans certains cas, la perméation des cryoprotecteurs est indispensable à l'obtention d'une survie satisfaisante des cellules ; dans d'autres cas, cette perméation n'est pas nécessaire ; elle est seulement une conséquence incidente du délai inévitable qui sépare la préparation de la suspension cellulaire de la congélation proprement dite. Les cellules décongelées qui contiennent du cryoprotecteur gonfleront osmotiquement quand elles seront replacées dans un milieu physiologique normal. La survenue éventuelle de lésions osmotiques devrait venir spontanément à l'esprit ; pourtant on ne lui a accordé que peu d'attention jusqu'à tout récemment, sauf pour ce qui concerne les GR. On sait maintenant que l'élimination lente des cryoprotecteurs et additifs, à des températures appropriées, est **un facteur critique** dans l'obtention d'un taux de survie élevé pour **les embryons de Lapin, de Souris ou de Veau, pour les lymphocytes et pour les cellules hémopoïétiques** ; ces cellules ont à l'état ordinaire une forme sphérique. Pour d'autres cellules, cette élimination a moins d'importance ; en effet, leur surface membranaire munie de replis et de microvillosités leur permet de mieux résister à l'augmentation de volume. Lors de cette augmentation, qui tend à rendre les cellules sphériques, la surface de membrane disponible est en large excès de sorte que la tension appliquée sur la membrane plasmique n'excède pas les capacités de résistance mécanique de cette dernière.

32-Pratique de la congélation.

En pratique, pour congeler des cellules, on doit prendre en considération plusieurs facteurs : l'état des cellules et leur concentration, le temps de préparation de la suspension à congeler, les vitesses de congélation et de décongélation.

321-Etat des cellules et concentration.

On congèle des cellules dans un état physiologique convenable ; en général, on choisit des cellules prélevées à la fin de la période logarithmique de croissance ou entre cette période et le tout début de la phase stationnaire. La concentration de la suspension cellulaire conditionnée pour la congélation peut être comprise, selon les cas, entre 10^6 et 10^8 cellules/ml. En pratique, on prépare d'un côté une suspension de cellules à double concentration dans du milieu de culture et de l'autre, une solution de cryoprotecteur à double concentration dans le même milieu de culture. La concentration adéquate de cryoprotecteur peut être déterminée par des expériences préalables. Le mélange des 2 préparations permet d'obtenir une suspension ajustée en cellules et en cryoprotecteur. Il marque le début de la période d'équilibration. Enfin, pendant cette phase, il faut éviter autant que possible de soumettre les cellules à des chocs mécaniques (centrifugation, pipettage, agitation violente). Le pH doit être ajusté à des valeurs physiologiques (7,2-7,4).

322-Temps d'équilibration.

Avant de procéder au refroidissement des cellules, il faut laisser celles-ci au contact du cryoprotecteur pendant un temps optimal, ni trop long, ni trop court, à la température du laboratoire. Cette période est appelée **temps d'équilibration**. Sa durée minimale est de 15 min, sa durée maximale, de 40 à 60 min. Passé ce délai et à la température du laboratoire, les cryoprotecteurs (le DMSO surtout) risquent d'être toxiques pour les cellules. Pendant le temps d'équilibration, les cryoprotecteurs pénètrent dans la cellule et peuvent exercer un effet protecteur optimal.

323-Vitesses de refroidissement et vitesses de décongélation.

Une fois cette étape réalisée, on procède au refroidissement. Nous avons vu que le taux de refroidissement conditionne la taille des cristaux de glace et leur vitesse de formation ; nous avons vu aussi que la formation des cristaux de glace est l'un des phénomènes critiques pour la conservation de la viabilité des cellules. On admet qu'une vitesse de refroidissement de 1°C/min convient à la plupart des cellules, et donne une bonne marge de sécurité. En absence d'études quantitatives préalables, c'est donc cette vitesse de refroidissement que l'on choisira. Les études préalables peuvent donner des valeurs différentes et mieux adaptées à leur objet. Ainsi Klebe et Mancuso ont-ils montré que les cellules CHO pouvaient être congelées à une vitesse de 2,6°C/min entre la température du laboratoire et le point de congélation (-10°C), puis à une vitesse de 3,2°C/min entre -10°C et -80°C.

En général, plus les cellules sont grandes, et plus le refroidissement est critique ; la vitesse de refroidissement doit donc être plus faible. Quand une préparation a atteint la température du congélateur à -70°C ou -80°C, elle peut être stockée dans un récipient cryobiologique à azote liquide.

La décongélation qui suit une congélation à vitesse lente, doit être rapidement conduite. Les cellules CHO demandent une vitesse de décongélation de 38°C/min. Cette vitesse, ou des vitesses voisines conviennent à la plupart des cellules. Nous verrons tout à l'heure comment atteindre ces valeurs de réchauffement en pratique.

33-Les cryoprotecteurs.

Deux cryoprotecteurs sont très couramment utilisés : le DMSO, et le glycérol neutralisé par la soude diluée en présence de phénolphtaléine. Certains auteurs ont recommandé l'usage de polymères comme les polyvinylpyrrolidones [PVP], les dextrans, l'hydroxyéthylamidon. Klebe et Mancuso ont étudié toute une série de cryoprotecteurs, en utilisant les cellules CHO comme cellules modèles. Ils expriment les activités cryoprotectrices relativement à l'activité cryoprotectrice du DMSO, fixée arbitrairement à 100 %. Un Tableau du polycopié vous résume les résultats que ces auteurs ont trouvés. Il montre que l'éthylène glycol (0,16 mol/l), le méthylacétamide (1 mol/l), le polyéthylène glycol, la PVP (MM : 10.000 D) sont de bien meilleurs ou de meilleurs cryoprotecteurs que le DMSO ; en revanche, le glycérol et le dextrane 4.700 sont 2 fois moins efficaces que le DMSO. Les cryoprotecteurs exercent souvent des effets synergiques et peuvent être utilisés conjointement. Outre les cryoprotecteurs, le milieu de congélation contient également du sérum en concentration égale à celle que l'on met dans le milieu de croissance. Si l'on utilise du glycérol, il convient de n'utiliser que du glycérol conservé dans des flacons de verre (glycérol Serva, par exemple), et non de plastique. Cette matière libère des plastifiants qui sont toxiques. Le glycérol neutralisé est stérilisé pendant 15 min à l'autoclave ; le DMSO est stérilisé par filtration.

Les concentrations optimales de cryoprotecteurs peuvent varier d'une cellule à l'autre. Mais elles sont toujours égales aux concentrations maximales tolérables par la cellule. Celle-ci s'y trouve exposée de manière plus uniforme qu'à des concentrations plus faibles. Le glycérol est utilisé en général à une concentration de 2 mol/l, le DMSO à des concentrations comprises entre 1,3 et 1,6 mol/l.

Les cryoprotecteurs sont souvent toxiques et quelquefois tumorigènes (DMSO). Il en résulte qu'après décongélation, il est préférable d'éliminer le milieu de congélation

ou de diminuer la concentration des cryoprotecteurs. En pratique (a) on peut **centrifuger à de faibles accélérations** (50 x g maximum) la suspension décongelée, décanter le surnageant et remettre en suspension dans un petit volume de milieu frais préchauffé ; (b) on peut **faire adhérer activement les cellules** sur leur support de croissance dès que la décongélation est réalisée (seules les cellules viables adhèrent activement [*vide infra*]), on élimine alors le milieu et l'on rajoute un mince film de milieu préchauffé au flacon de culture (ce qui permet de régler partiellement les problèmes d'équilibre osmotique entre le milieu intra- et extracellulaire) ; (c) on peut enfin **diluer la suspension décongelée dans du milieu frais**, si la reprise de la culture ne dépend pas de la densité cellulaire, ou si la suspension contient beaucoup de cellules ($10^8/\text{ml}$).

34-Appareillages et dispositifs utilisés pour la conservation des cellules par congélation.

341-Congélation.

Il existe dans le commerce des appareils qui permettent de programmer le refroidissement et donc d'appliquer des conditions de congélation optimales pour chaque type de cellules. On peut citer le **minicongélateur progressif** de la CFPO, dont la source de froid est l'azote liquide et qui peut donner des vitesses de refroidissement de 0,5 à 10°C/min entre 20°C et 0°C et de 0,5 à 15°C/min entre 0 et -100°C. Il permet de congeler 10 cryotubes de 2 ml chaque fois. Le vendeur explique que "les échantillons à congeler sont placés dans un panier spécial au dessus de l'azote liquide contenu dans le réservoir. Une turbine plastique entraînée par un moteur à vitesse variable (graduée [*sic*] de 1 à 10) assure l'évaporation de l'azote liquide et la convection gazeuse dans le cylindre de congélation où sont placés les échantillons à congeler. Les vitesses de congélation sont proportionnelles aux vitesses de rotation de la turbine. Les courbes de descente en température sont parfaitement reproductibles". Le **congélateur programmable Biocool®** permet de refroidir à des vitesses comprises entre 1 et 2,5°C/min selon les modèles, (et selon les zones, dans les cas où ces vitesses sont variables) ; il autorise aussi des paliers dans la réfrigération. Le liquide réfrigérant est le méthanol. Le **congélateur programmable CPS100**, très coûteux, présente l'avantage d'avoir une régulation des vitesses de refroidissement très fine (0,1°C). Les vitesses de refroidissement sont comprises entre 0,1°C et 9,9°C entre 40°C et -60°C, et de 1°C au maximum entre -60°C et -80°C. Le liquide réfrigérant est l'alcool ou un mélange de composition déposée, le cryocool, qui permet de descendre à -180°C.

Ces appareils sont très coûteux pour le service qu'ils rendent. Mais il existe aussi dans le commerce des dispositifs plus rustiques et qui sont souvent suffisants pour atteindre le but visé. Il s'agit de récipients fabriqués dans une matière isolante, et souvent munis d'une double paroi. Le **Minicooler** permet de congeler à des vitesses de 1°C/min. La température de -80°C est atteinte en 1,5 h. La capacité de l'appareil est de 18 cryotubes de 1,2 ml-2 ml. C'est un récipient en polycarbonate, muni d'un couvercle à vis, et d'un portoir permettant de loger les cryotubes. Au moment de l'usage, on ôte le portoir, et l'on remplit la partie inférieure du récipient d'alcool isopropylique. On remplace le portoir et l'on dispose les cryotubes. On visse le couvercle, et le tout est placé dans un congélateur à -80°C. Le **congélateur progressif Bicell®** est un récipient en polypropylène à double paroi limitant un espace rempli de liquide qui joue le rôle

d'isolant. Le vendeur prétend qu'avec ce dispositif, l'on atteint des taux de survie de 96 %. Avant utilisation, le récipient est placé à +4°C. Puis on y place les cryotubes (8 cryotubes de 1,2 ml-2 ml). On ferme hermétiquement et l'on met le tout dans un congélateur à -80°C. Les échantillons atteignent cette température en 3 h.

On peut fabriquer soi-même des récipients qui joueront le même rôle que ceux qui viennent d'être décrits. Il suffit de prendre une boîte isolante en polystyrène expansé (emballage de glace ou de sorbet), d'y mettre un portoir et de la remplir de coton. Après placement des cryotubes, on ajuste le couvercle. L'ensemble du dispositif est placé au congélateur à -80°C. Cette température est atteinte en 2,5 h à 3 h. Si, avec ce dispositif rudimentaire, on obtient des vitesses de refroidissement moins reproductibles qu'avec les récipients commerciaux, il est néanmoins possible avec de l'habitude d'obtenir d'excellents résultats.

342-Conservation.

La conservation des cellules par congélation implique l'usage de matériels et appareillages spécialement conçus.

Les suspensions cellulaires sont conservées dans des cryotubes. Il s'agit de tubes en polypropylène munis d'un capuchon à vis en polyéthylène (marque Nalgène). Les bouchons peuvent être de diverses couleurs pour faciliter le repérage des tubes. Les formes et les volumes des cryotubes peuvent varier (illustration dans une Figure du polycopié) ; en général, on utilise des cryotubes de 1,2 ml, 2 ml ou 5 ml. On n'utilise jamais d'ampoules de verre lorsque l'on conserve les cryotubes dans l'azote liquide. La moindre fêlure, en laissant pénétrer de l'azote, rendrait le maniement des tubes très dangereux ; il y aurait des risques d'explosion lors de la décongélation, en raison de la brutale augmentation de pression résultant de la gazéification de l'azote contenu dans l'ampoule.

On peut grouper les tubes d'un même lot de congélation dans des dispositifs spéciaux : des **cannes** si l'on conserve dans l'azote liquide, des **cryoboîtes** si l'on conserve au congélateur à -80°C . Les cannes sont des portoirs allongés en aluminium. Elles sont munies de logements dans lesquels on place à force les cryotubes ; sur une canne, les cryotubes sont superposés longitudinalement. L'ensemble peut être glissé dans un tube protecteur en chlorure de polyvinyl [PVC]. Les cryoboîtes sont en polycarbonate autoclavable. Elles possèdent des grilles numérotées sur leur couvercle autositionnable ; ces grilles permettent le repérage des tubes. Il en existe pour tous les volumes de cryotubes. Les cryoboîtes peuvent être placées dans des *racks* de rangement en acier inoxydable. Si l'on désire inscrire des indications sur ces divers matériels, il est nécessaire d'utiliser des crayons marqueurs spéciaux ; sinon les inscriptions s'effacent. Les fabricants de matériel pour cryogénie proposent encore bien des accessoires (gants, tablier de protection, visière de protection contre les projections d'azote, pinces, etc.) qui peuvent se révéler très utiles.

La meilleure façon de conserver les cellules congelées est de les placer **dans l'azote liquide** ou dans la phase vapeur qui le surmonte, mais à faible distance du liquide (voir Figure dans le polycopié). L'azote liquide est placé dans des récipients dits cryobiologiques à double paroi. Il en existe de diverses tailles. Le niveau d'azote doit être régulièrement vérifié et ajusté si nécessaire. L'azote lui-même est transporté dans des récipients spéciaux en acier inoxydable, ou, s'il s'agit de petites quantités, dans des vases Dewar spécialement conçus, voire dans des bouteilles thermos.

343-Décongélation.

Il n'existe pas d'appareillages spéciaux pour la décongélation. Celle-ci est donc faite empiriquement. Aktar *et al.* ont mesuré les vitesses de réchauffement moyennes entre -100°C et la fusion pour un certain nombre de dispositifs utilisables pour la décongélation. On trouvera dans le polycopié les très intéressants résultats des leurs observations.

SECTION 2 : LA PRESSION OSMOTIQUE.

1-Généralités : le concept de solution saline physiologique.

Le concept de **solution saline physiologique** est fondé sur la composition ionique du sang. Il a été un des principaux éléments pris en compte pour déterminer la composition des milieux chimiquement définis utilisables en culture de cellules. Le terme de solution saline physiologique a été forgé et développé dans les années 1880 en Angleterre par Ringer. Ce physiologiste étudiait la contraction du cœur et de la patte d'Amphibien (Grenouille). A la suite de ces travaux, divers auteurs avaient modifié et amélioré la composition des solutions salines, notamment pour les adapter aux cellules et aux tissus de Mammifères. Ils avaient proposé, notamment, d'y ajouter du glucose et des tampons (Locke, 1895 ; Tyrode, 1910 ; Lewis, 1911 ; Krebs, 1932, 1950). Vous trouverez la composition de certaines de ces solutions dans le polycopié). Elles étaient utilisées pour des études physiologiques sur **organe isolé**.

Ces développements reposaient sur l'idée, informulée mais bien présente, que pour minimiser les traumatismes infligés aux préparations isolées et assurer une maintenance maximale, il fallait les placer dans un milieu imitant au mieux l'environnement naturel du tissu étudié.

Pour faire croître des **cellules en culture** pendant des jours, des mois, voire des années, il faut remplir des conditions beaucoup plus précises et complexes que pour préserver pendant une ou quelques heures les battements d'un cœur isolé ou le péristaltisme d'un fragment d'intestin. Reportez-vous, du reste, à la définition du terme **culture cellulaire** donné au tout début de ce cours. Les cytoculteurs ont donc cherché à perfectionner les milieux chimiquement définis pour disposer de milieux permettant la croissance, le fonctionnement et même la différenciation de toutes sortes de cellules et tissus, *in vitro*, sur le moyen ou le long terme. Les premiers travaux dans ce domaine ont été réalisés par LEWIS (1911 et 1912). Comme je l'ai déjà dit, la plupart des approches reposait sur le principe d'imitation ; la composition chimique des milieux de culture cellulaire a donc été déterminée en fonction de l'analyse de la composition du sang et des autres liquides biologiques. Elle s'est améliorée ou a évolué au fur et à mesure que la connaissance de cette composition s'améliorait elle-même.

2-Définitions.

21-Tonicité, isotonicité.

On admet sans discuter l'idée que les milieux de culture et les solutions salines simples destinées à la culture cellulaire ou à la survie des organes ou fragments de tissus isolés doivent être **isotoniques** aux solutions qui ne provoquent ni rétraction, ni gonflement, et *a fortiori* ni hémolyse, des GR humains. Mais la notion de tonicité est différente de celle de **concentration osmotique** (ou osmolarité au sens large).

La **tonicité** est décrite en termes de fragilité des GR. Une solution **isotonique** est donc une solution qui ne provoque aucune hémolyse des GR. A moins d'être spécifiquement étalonnée contre un autre standard [solutions de NaCl 154 mmol/l ou 160 mmol/l], l'isotonicité est donc définie ordinairement de façon **empirique** ou **opérationnelle**. Pour DIEM, une solution physiologique est "une solution qui est isotonique eu égard au sérum sanguin, c'est-à-dire qui a la même concentration osmotique". Cette définition a le tort de faire équivaloir **tonicité** et **concentration osmotique** ; mais elle montre bien qu'une solution physiologique doit être au moins iso-osmotique au sérum sanguin.

La **tonicité** est relative à une situation particulière. **La concentration osmotique** peut être mesurée en termes absolus. Ces 2 notions sont donc très différentes. Ainsi une solution de NaCl à 0,9 g % (155 mmol/l) empêche les changements de taille et de forme des GR humains ; elle est isotonique à ces cellules et elle leur est aussi iso-osmotique : on dit qu'elle est **isopiestic**. Une solution d'urée 320 mmol/l est isotonique à une solution de NaCl 155 mmol/l ; mais elle ne lui est pas iso-osmotique, car la membrane des GR est perméable à l'urée qui n'exerce donc aucune pression osmotique sur ces cellules.

22-La pression osmotique.

(1) Mise en évidence de la pression osmotique.

La pression osmotique peut être définie en termes physiques. Quand une solution est séparée d'une certaine quantité de **solvant** par une membrane perméable **au solvant** mais non **au soluté**, le solvant tend à être attiré à travers la membrane vers la solution de façon à la diluer. Le mouvement du solvant peut être prévenu si l'on applique une certaine pression hydrostatique à la solution. La pression osmotique est définie ici en termes de conditions expérimentales ; c'est l'expression d'une certaine propriété physique de la solution. Mais elle ne vient à l'existence que quand certaines conditions définies sont remplies. Elle ne se réfère pas à une quelconque théorie particulière, comme le bombardement des molécules de solvant ou de soluté sur la membrane.

Vous devez noter que le composant dont on observe le mouvement est **le solvant**, et non **le soluté**. Dans le traitement théorique moderne de la pression osmotique, l'attention a donc été portée sur le solvant et non sur le soluté (comme dans la théorie classique de Van't Hoff).

Le mouvement du solvant est défini en termes de **potentiel chimique** : il s'agit d'une quantité thermodynamique qui est utilisée pour mesurer **la tendance à s'écouler**. Cette quantité est définie d'une façon telle, qu'un liquide s'écoule toujours d'un lieu de haut potentiel vers un lieu de potentiel moins élevé ; quand un liquide se meut à travers une membrane perméable, son potentiel chimique finit par être le même des 2 côtés de celle-ci et l'on dit que le système est alors en équilibre.

Habituellement, le potentiel chimique d'un solvant peut être modifié de 2 façons (mais il en existe d'autres, non décrites ici) : (a) **par addition de soluté** qui tend à diminuer le potentiel chimique ; (b) **par application d'une pression au solvant** qui augmente son potentiel chimique.

Ainsi, le flux de solvant à travers une membrane semi-perméable (perméable seulement au solvant) est associé à l'abaissement du potentiel chimique du solvant dans

la solution, lui-même conséquence de la présence du soluté. Le flux est empêché si l'on augmente le potentiel chimique du solvant de la solution, par application d'une pression de valeur telle, que le solvant de la solution retrouve le potentiel chimique du solvant pur, et que le système vienne à l'équilibre.

(2) Définition proprement dite.

La pression osmotique peut donc être définie précisément comme la pression en excès qu'il faut appliquer à une solution pour l'amener à l'équilibre avec le solvant quand l'un et l'autre sont séparés par une membrane parfaitement semi-perméable.

La présentation en termes de thermodynamique est infiniment plus précise que la présentation en termes de lois de Van't Hoff, fondées sur l'analogie avec les lois décrivant le comportement des gaz.

(3) Dérivations thermodynamiques des lois de l'osmose.

Nous avons vu plus haut comment modifier un potentiel chimique par addition de soluté ou par application d'une pression. Voici maintenant les relations mathématiques qui rendent compte de ces faits.

La relation entre changement de potentiel chimique et quantité de soluté ajoutée (si l'on suppose que la solution est idéale et que la température, la pression et la quantité de solvant sont constantes et maintenues telles).

$$\mu_1 - \mu_1^\circ = \Delta\mu_1 = RT \ln \frac{n_1}{n_1 + n_2} \quad [1]$$

ou μ_1 et μ_1° sont les potentiels chimiques du solvant en solution et du solvant pur, respectivement, n_1 et n_2 sont respectivement les nombres de molécules-grammes (moles) de solvant et de soluté dans la solution, R la constante des gaz parfaits (10^7 ergs/°Kelvin/mol ou $10 \text{ cm}^3 \text{ atm}/^\circ\text{Kelvin/mol}$), et T , la température absolue en degrés Kelvin, (c'est à dire $273,15 +$ la température en °C).

La quantité n_1/n_1+n_2 est la fraction de mole : c'est une mesure de la concentration. Comme sa valeur est nécessairement plus petite que 1, son logarithme népérien \ln est négatif et μ_1 est inférieur à μ_1° .

La relation entre changement de potentiel chimique ($\delta\mu_1$) et application d'une pression (δP) est donnée par la relation (température et composition de la solution constante) :

$$\left(\frac{\delta\mu_1}{\delta P} \right)_{T, n_1, n_2} = \bar{V}_1 \quad [2]$$

où P est la pression totale appliquée et \bar{V}_1 est une quantité connue sous le nom de volume molal partiel du solvant en solution : celui-ci est approximativement égal au volume occupé par une mole de solvant en solution (lire \bar{V}_1 barre).

L'augmentation du potentiel chimique du solvant par augmentation de la pression appliquée, d'une quantité Π égale à la pression osmotique, est obtenue par intégration de l'équation [2].

$$\Delta\mu_1 = \int_{P_0}^{P_0 + \Pi} \bar{V}_1 \cdot dP \quad [3]$$

Si l'on suppose que V_1 reste constant quand la pression change, c'est à dire que le solvant est incompressible (ce qui est presque exactement vrai), alors il vient :

$$\Delta\mu_1 = (P_0 + \Pi) V_1 - P_0 V_1 = \Pi V_1 \quad [4]$$

Ainsi l'augmentation du potentiel chimique est proportionnelle à l'augmentation de la pression. Mais à l'équilibre osmotique, la réduction du potentiel chimique du solvant, due à la présence du soluté est exactement compensée par l'augmentation du potentiel chimique due à la pression osmotique. Le changement net du potentiel chimique du solvant dans la solution est donc nul. En termes mathématiques, on a :

$$\Delta\mu_1 \text{ (dû au soluté)} + \Delta\mu_1 \text{ (dû à la pression)} = 0 \quad [5]$$

équation [1] équation [2]

En substituant, il vient :

$$RT \ln \frac{n_1}{n_1 + n_2} + \Pi V_1 = 0 \quad [6]$$

ou bien :

$$\Pi V_1 = -RT \ln \frac{n_1}{n_1 + n_2}$$

Cette équation relie la pression osmotique à la fraction de mole de solvant en solution. Si nous présumons que n_1 est plus grand que n_2 , c'est-à-dire que la solution est très diluée, l'équation peut être simplifiée. En effet :

$$\ln \frac{n_1}{n_1 + n_2} = \ln \left(1 - \frac{n_2}{n_1 + n_2} \right) \approx - \frac{n_2}{n_1 + n_2} \approx - \frac{n_2}{n_1}$$

Si $n_1 \gg n_2$, alors on a :

$$\Pi V_1 = RT \frac{n_2}{n_1} \quad [7]$$

Et :

$$\Pi = \frac{RT n_2}{\overline{n_1 V_1}} \quad [8]$$

Mais $\overline{n_1 V_1} = V_1$ qui est le volume partiel du solvant en solution. Alors on a :

$$\Pi V_1 = RT n_2 \quad [9]$$

Ou

$$\Pi = RT n_2 = RT m \quad [10]$$

dans laquelle m est la concentration molale du solvant en solution.

Les équations [9] et [10] sont des expressions modifiées de la loi de Boyle-Van't Hoff. En les établissant de cette façon, on peut voir que cette loi est une approximation qui dépend entièrement de 2 hypothèses de départ, à savoir (a) **que la solution est idéale** : une solution idéale est une solution dans laquelle les molécules de soluté sont complètement entourées de molécules de solvant, de sorte qu'une addition de solvant ne modifie pas les interactions entre solvant et corps dissous. Dans ces conditions les propriétés des molécules du solvant ne dépendent, dans la solution, que du nombre de particules dissoutes et non de leurs propriétés propres. Une telle solution obéit à la loi de RAOULT (abaissement du point de congélation, augmentation du point d'ébullition de la solution) et (b) **que la solution est extrêmement diluée**.

Il convient aussi de souligner que V_1 dans l'équation [9] est le volume de solvant en solution, et non le volume de la solution elle-même. De la même façon, m , dans l'équation [10] est une concentration molale (poids de soluté/poids de solvant) et non une concentration molaire (poids de soluté/volume de solvant). Cette différence permet de clarifier la signification de la quantité connue sous le nom de "volume osmotiquement actif", telle qu'elle apparaît dans la forme simplifiée de la loi de Boyle-Van't Hoff appliquée conventionnellement aux cellules vivantes.

$$$$

$$\Pi(V-b) = K \text{ (une constante)} \quad [11]$$

où V est le volume cellulaire total, et b , le volume osmotiquement inactif.

La quantité $(V-b)$ correspond à V_1 de l'équation [9] : elle exprime la quantité qui doit être soustraite du volume cellulaire total pour obtenir la valeur précédente, et comprend le volume de soluté cellulaire + celui de tout solide qui, dans la cellule, n'est pas en solution. Le terme de "volume osmotiquement inerte" est dépourvu de signification et induit en erreur : b , en effet, inclut le volume des cristalloïdes qui sont responsables de la majeure partie de la pression osmotique intracellulaire. Le terme de "volume non solvant" est clairement préférable.

(4) Le coefficient osmotique.

Une modification supplémentaire doit être appliquée à la loi de Boyle-Van't Hoff avant qu'on puisse l'appliquer en pratique.

On a vu que 2 hypothèses sont aux fondements de cette loi : la première est que la solution est extrêmement diluée, la seconde que le solvant se comporte idéalement. Il s'agit là de limitations théoriques qui peuvent être surmontées par l'introduction d'un facteur de correction (Φ), le coefficient osmotique. Introduit dans l'équation, il réconcilie les prédictions de la théorie avec le comportement des solutions réelles. Les formes modifiées des équations [9] et [10] deviennent donc

$$\Pi V_1 = \Phi RTn_2 \quad [12]$$

et

$$\Pi = \Phi RTm \quad [13]$$

Les conséquences de ces modifications sont que la loi de Boyle-Van't Hoff révèle une hypothèse ou présomption, restée jusqu'ici sous-jacente :

$$\Phi RTn_2 = K \text{ (constante)}$$

où R est la constante des gaz et T la température absolue (habituellement maintenue constante pendant les expériences). La valeur n_2 est constante, pourvu qu'il n'y ait aucun passage net de soluté à travers la membrane cellulaire pendant l'expérience. Il en résulte que Φ est constant. Il s'agit du coefficient osmotique molal moyen. Cette hypothèse de la constance de Φ n'est pas valide de manière universelle.

(a) En dépit des effets d'attraction électrostatique entre les ions, et des effets d'hydratation ionique, les coefficients osmotiques des fractions cristalloïdes du soluté cellulaire sont en effet pratiquement constants dans la gamme des concentrations retrouvées dans les cellules vivantes.

(b) Mais les coefficients osmotiques des protéines, eux, varient, brusquement avec la concentration, même quand celle-ci est exprimée en unités molales. Ceci est dû partiellement à la liaison d'eau de solvation par les molécules protéiques, liaison qui diminue la quantité d'eau capable d'agir comme solvant vis-à-vis des protéines elles-mêmes, ou vis-à-vis d'autres solutés.

Ogston a souligné cependant que l'eau de solvation est en fait un être de raison, une entité purement théorique utilisée pour interpréter certains résultats. Sa contribution réelle au coefficient osmotique reste donc incertaine.

Une autre cause possible des pressions osmotiques anormales des protéines en solution est la grande entropie molaire partielle des mélanges de solutions protéiques. Celle-ci serait due, au moins en partie, à la grande différence des tailles des molécules de soluté et de solvant dans les solutions protéiques.

Quelque soit la cause des grands coefficients osmotiques des protéines, il est clair qu'ils produisent probablement des anomalies dans le comportement osmotique des cellules qui contiennent de grandes quantités de protéines intracellulaires. Un des importants résultats est que la contribution des protéines à la pression osmotique totale intracellulaire peut être élevée, et cela est inattendu. Soit l'exemple du GR humain. Sa concentration molaire en hémoglobine [Hb] n'est que de 0,005 (si l'on pose qu'il y a 33,5 g d'Hb pour 100 ml de GR, et que la MM de l'Hb est de 67.000 D) ; mais à cette concentration d'Hb, le coefficient osmotique correspondant est de 3,55, de sorte que la pression osmotique partielle due à l'Hb est de 17,5 mOsm et non de 5 mOsm comme attendu. Ceci est une contribution non négligeable, pour une pression osmotique intracellulaire totale de 300 mOsm. En outre, quand la concentration protéique intracellulaire chute, au cours du gonflement osmotique par exemple, le coefficient osmotique diminue brutalement. Ainsi, la forme simple de l'équation de Boyle-Van't Hoff n'est pas respectée puisque dans l'équation :

$$\Pi(V-b) = K$$

K, qui est l'équivalent de ΦRTn_2 n'est plus constant. Il en résulte que **b** semble plus grand qu'il n'est réellement, ou que, inversement, le contenu apparent en eau de la cellule, déterminé par des mesures d'équilibre osmotique, est plus petit que le contenu en eau, déterminé par des méthodes directes.

Pour terminer, il convient de souligner qu'il existe 2 coefficients osmotiques, correspondant aux 2 modes d'expression de la concentration. Si l'on utilise des concentrations molales, on doit utiliser le coefficient osmotique molal. Si l'on utilise des concentrations osmotiques molales, on utilise corrélativement le coefficient osmotique molaire, pour calculer **P** à partir de l'expression $P = \Phi RTm$. Par contre l'osmolarité d'une solution peut être définie directement par la mesure de l'abaissement du point de congélation.

23-Osmole et Δ cryoscopique. Expression de la pression osmotique.

L'**osmole** [Osm] est la pression osmotique d'une solution 1,0 molale (1 mol/kg de solvant) d'un non électrolyte idéal : elle est de 22,4 atmosphères à 0°C. Une **solution** ainsi définie a un abaissement de son point de congélation de 1,86°C. La définition de **la milliosmole (mOsm)** est fondée sur la définition de l'Osm.

La concentration osmotique d'une solution peut donc être déterminée directement par la mesure de son point de congélation. On peut aussi la calculer à partir de la **molalité** ou de la **molarité** d'une solution. Mais il faut alors utiliser le coefficient osmotique molal ou molaire [*vide supra*]. Cette valeur calculée a l'avantage d'être pratiquement indépendante de la température, mises à part quelques très petites variations dues à l'effet de la température sur le coefficient osmotique.

La pression osmotique peut être exprimée soit en termes de particules osmotiquement actives par unité de poids de solvant : c'est **l'osmolalité**, soit en termes de particules osmotiquement actives par unité de volume de solution : c'est **l'osmolarité**. On utilise quelquefois ce dernier terme au sens général de concentration osmotique, sans faire référence au mode d'expression lui-même. C'est à mon avis une erreur. Il vaut mieux utiliser cette expression dans son acception scientifique précise. En pratique, surtout lorsque l'on considère des solutions complexes, il est plus simple d'adopter le point de vue opérationnel prôné par DICK, et de définir la mOsm par l'abaissement du point de congélation et non en termes d'atmosphères par kg de solvant ou par l de solution.

24-Osmosité.

L'**osmosité** d'une solution d'une substance donnée correspond à la concentration molaire en NaCl d'une solution de cette substance ayant le même point de congélation ou la même pression osmotique.

25-Cas des électrolytes ionisés.

Dans le cas des électrolytes ionisés, la concentration osmotique dépend des particules osmotiquement actives. Le degré d'ionisation de ces molécules doit donc être pris en considération pour déterminer la concentration osmotique de la solution.

3-Pression osmotique *in vivo*.

31-Pression osmotique du milieu intérieur.

Vous trouverez dans le polycopié des Tableaux vous donnant la pression osmotique (en osmolalité et éventuellement en Δc) de sérums et de plasmas d'origines diverses. En général ces valeurs sont déterminées par la mesure du Δc , ou plus rarement de la pression de vapeur. Ces Tableaux montrent que la pression osmotique du plasma varie selon **les espèces**. En outre les variations intraspécifiques (souches) sont plus ou moins grandes selon les espèces : la concentration osmotique des sérums de Lapin varie moins que celle des sérums de Souris. **Le sexe** semble influencer la pression osmotique. Chez la Souris, les valeurs obtenues sont en général plus élevées chez les mâles que chez les femelles. La privation de boisson et de nourriture dans les 3 h qui précèdent le prélèvement de sang n'augmente pas la pression osmotique. **L'âge** ne semble pas influencer la pression osmotique sanguine. Une série de mesures a été effectuée sur 96 mâles et 14 femelles de Souris, âgés de 34 à 366 jours. Il n'a été observé aucune variation systématique de pression osmotique. En moyenne, chez les Mammifères la pression osmotique du sang est de l'ordre de 7,6 atmosphères à 38°C : le Δc correspondant est de 0,63°C. Ces valeurs, nous venons de le voir, peuvent varier selon les circonstances. Chez l'Homme, l'osmolalité du sérum est de l'ordre de 290 mOsm/kg et chez la Souris, de l'ordre de 310 mOsm/kg.

32-Variations locales ou régionales de pression osmotique.

Dans l'organisme, il existe des tissus et des cellules qui sont physiologiquement exposés à des pressions osmotiques différentes de celle du plasma. Ainsi, les cellules des pyramides rénales sont exposées à des concentrations salines hyperosmotiques par rapport à la concentration osmotique plasmatique. En culture organotypique, les lymphocytes des ganglions de Rat survivent mieux dans des milieux hypo-osmotiques par rapport au sang ; la survie est meilleure dans un milieu de culture contenant 0,4 g % de NaCl que dans un milieu en contenant 0,8 g %. La lymphe est vraisemblablement hypo-osmotique par rapport au sang.

4-Pression osmotique *in vitro*.

41-Règles générales.

Les cellules en culture ne semblent pas être affectées par des variations de pression osmotique de $\pm 10\%$ autour de la valeur moyenne de la pression osmotique sanguine. En réalité, les cellules peuvent supporter des variations de pression osmotique encore plus importantes pourvu que celles-ci ne soient pas appliquées brutalement. La plupart des cellules supportent des concentrations osmotiques allant de 260 mOsm à 320 mOsm/kg sans aucun dommage apparent. D'une façon générale, les cellules en suspension supportent moins bien les variations de pression osmotique que les cellules adhérant à un support. En effet, les **cellules en suspension sont sphériques** et le rapport Surface/Volume est dans ce cas minimal. La moindre augmentation de volume aboutit à faire peser sur la membrane plasmique des contraintes très importantes. La limite de résistance mécanique est très rapidement franchie. **Les cellules adhérentes sont aplaties**. Elles ont un rapport Surface/Volume beaucoup plus grand que les cellules sphériques. Leur membrane peut donc enclorre un plus grand volume sans atteindre la limite de résistance mécanique. Quand les variations deviennent par trop importantes, les cellules de Mammifères peuvent résister 3 ou 4 jours, après quoi elles finissent par mourir. Ces constatations trouvent des applications pratiques intéressantes. On peut ainsi débarrasser une suspension de lymphocytes spléniques humains des GR qui la contaminent, en ajoutant au culot ou à la suspension cellulaire de l'eau distillée stérile qui lyse les GR. On rétablit la pression osmotique normale en ajoutant un volume approprié de solution stérile hyperosmotique de NaCl. Cette technique est plus avantageuse que la lyse au NH_4Cl , car ce sel présente une certaine toxicité.

En absence d'informations ou de données expérimentales précises concernant la cellule étudiée, on essaiera donc de garder la pression osmotique de son milieu de culture dans les limites de la normale, celles de la pression osmotique sanguine. Pour les cultures en boîtes de Petri, on peut même se placer en milieu légèrement hypo-osmotique pour compenser l'évaporation qui a lieu pendant l'incubation.

La pression osmotique des liquides biologiques qui baignent les cellules et constituent un dialysat du sang est due essentiellement au NaCl, mais aussi à d'autres ions et à d'autres cristalloïdes (glucose). Si l'on augmente la concentration de l'un de ces constituants dans le milieu de culture, le glucose par exemple (cas du milieu minimal essentiel de Eagle modifié par Dulbecco [D-MEM ou mieux DME] qui en contient 3 g/l), on doit garder à l'esprit que la pression osmotique est affectée par cette modification. De même l'addition d'HEPES ou d'autres tampons fixes, de médicaments dissous dans des bases fortes ou des acides forts et la neutralisation subséquente de ces solutés, peuvent affecter la concentration osmotique du milieu. En cas de doute, le mieux est alors de mesurer le Δc .

42-Pression osmotique colloïdale, viscosité.

En plus des ions et cristalloïdes, les liquides biologiques contiennent de grosses molécules, surtout des protéines, qui sont capables d'exercer **une pression osmotique colloïdale** parfois non négligeable.

La viscosité des milieux de culture est influencée essentiellement par ces protéines. La plupart du temps le facteur **viscosité** n'a aucun effet sur la croissance cellulaire. Quand une suspension de cellules fraîchement trypsinées est cultivée sous agitation, le facteur viscosité peut avoir une certaine importance pour l'évolution de la culture. On peut éviter les dommages provoqués aux cellules par ces conditions défavorables en ajoutant de la carboxyméthylcellulose, ou une polyvinylpyrrolidone. Le facteur viscosité peut être capital pour le succès de la culture de cellules en milieu pauvre en sérum, ou sans sérum. L'adjonction de ces substances a des répercussions non seulement sur la viscosité, mais aussi sur la pression osmotique colloïdale ; de plus ces substances s'adsorbent à la surface des cellules. Les effets protecteurs sont dus aux modifications de viscosité et à l'adsorption.

43-Effet des variations de pression osmotique *in vitro*.

(1) Cultures organotypiques.

C'est au tout début de la culture organotypique qu'Ebeling a étudié les effets de la variation de pression osmotique sur des cultures de tissu conjonctif de poulet. Le milieu standard d'Ebeling était un mélange de 2 volumes [vol] de plasma de poulet et d'1 vol d'extrait embryonnaire de poulet. Les effets de ce **milieu standard** ont été comparés aux effets de 3 autres milieux, préparés à partir d'un milieu de base constitué de 3 vol de plasma et d'1 vol d'extrait embryonnaire. Le milieu de base a été dilué (a) avec 2 vol d'eau (**milieu hypotonique**), (b) avec 2 vol de NaCl à 2 g % (**milieu hypertonique**) et enfin (c) avec 2 vol de solution de Ringer (**milieu isotonique**). Ebeling montre que pour obtenir une survie prolongée (jusqu'à 26 jours), le milieu isotonique est supérieur au milieu standard qui de son côté est meilleur que le milieu hypotonique. Le milieu le moins satisfaisant est le milieu hypertonique.

Hogue utilise le milieu développé par Lewis (il s'agit d'un mélange de glucose, de bouillon et de solution de Locke) pour étudier la migration des cellules de cœur de poulet. La migration est accélérée en milieu hypotonique, elle est inhibée en milieu hypertonique.

Willmer reprend ce type d'études en utilisant un milieu encore plus simple : la solution de Ringer glucosée. Il en étudie les effets sur des cultures en goutte pendante de fragments d'intestin de poulet, en faisant varier réciproquement la concentration de NaCl et de glucose de façon à maintenir approximativement constante la pression osmotique. D'autre part, il fait varier la concentration en NaCl dans des solutions à concentration constante de glucose. Il constate que la migration des cellules hors de l'explant dépend de la concentration osmotique du milieu. Celle-ci doit être optimale. En outre, les mouvements amiboïdes des cellules sont stimulés en solution hypotonique (0,7 g % de NaCl).

(2) Cultures histiotypiques.

(21) Effets sur la croissance : quelques exemples.

Ces données incitent à se demander si des solutions isotoniques ou iso-osmotiques pour les GR humains sont toujours optimales pour la survie d'autres types

de cellules ou de tissus humains ou animaux. Il existe peu d'études systématiques sur cette question. J'en ai retenues 4.

(a) Tullis a étudié le comportement **des leucocytes humains** placés dans des milieux de diverses concentrations osmotiques : 237, 270, 300, 320, 337, 360 et 380 mOsm. Dans ces milieux, c'est la quantité d'eau qui varie et non les proportions relatives des solutés. Le milieu utilisé est constitué pour les 2/3 de solution saline de Parker, et pour 1/3 de sérum humain de cordon ombilical. L'étude se fait sur des intervalles de temps allant de 30 min à 30 h. Dans ces conditions, Tullis observe que la "survie" **des neutrophiles** est prolongée en milieux hypertoniques (320 ou 337 mOsm) et que celle **des lymphocytes** l'est en milieu hypotonique (237 mOsm).

(b) Le cas **des lymphocytes** de Rat a été étudié par Trowell. Cet auteur montre que la concentration optimale de NaCl pour un milieu destiné à des lymphocytes de Rat est de **beaucoup inférieure** à la concentration considérée comme physiologique. Son milieu T8 contient 0,61 g % de NaCl. Il est adapté à la culture organotypique de divers tissus de Rat. Il faut diminuer cette concentration en NaCl à 0,4 g % pour obtenir des résultats optimum (milieu T9) avec les lymphocytes de Rat. Ces résultats sont confirmés par Lucas. Des lymphocytes de Rat placés dans des milieux contenant 0,8 g % ou 0,26 g % de NaCl voient leur temps de survie diminuer de moitié par rapport à ce qui est observé en milieu optimum à 0,4 g %. L'auteur conclut que la survie optimale et la production de lactate sont liées à la concentration osmotique et non au niveau de Na⁺ et de Cl⁻.

(c) L'étude **des lignées cellulaires humaines** a été plus systématique. Ainsi Yamada *et al.* ont étudié l'effet de la concentration osmotique sur la survie à court terme et la croissance optimale des cellules HeLa. La croissance est meilleure en milieu légèrement hypertonique, ainsi que la survie à court terme. PAUL (voir Figure du photocopié) réalise une étude systématique des effets de la concentration osmotique sur la croissance des cellules HLM (cellules en lignée de parenchyme hépatique humain). Il utilise comme indice de croissance le nombre de cellules. Pour ces cellules, la concentration osmotique optimale est de 1,2 fois supérieure à celle d'une solution de NaCl à 0,9 g %. Elle est équivalente à une osmoticité de 1,08 g % (341,5 mOsm). C'est une valeur proche de celle qu'ont trouvée Yamada *et al.* pour les cellules HeLa (osmoticité de 1,01 g % ; 320 mOsm).

(d) Les études relatives **aux cellules L 929** de Souris en lignée fournissent des résultats en apparence contradictoires. Waymouth a cultivé 2 sous-lignées dérivées de la lignée L929 pendant 70 passages \pm 3, dans 2 milieux identiques à tous égards, sauf pour la quantité d'eau. L'un des milieux a une osmolalité de 282 mOsm/kg, l'autre de 324 mOsm/kg. Les 2 lignées sont passées régulièrement dans leur milieu respectif pendant une période de 16 mois. Dans les 2 cas, le taux de croissance est identique. Les résultats de PAUL sont différents. Cet auteur montre que les cellules L929 croissent de manière optimale dans un milieu hypo-osmotique de 228 mOsm/kg. Waymouth dans ses propres conditions observe que la croissance de ces cellules, déterminée par la mesure du volume cellulaire, est très fortement suboptimale dans un milieu de 233 mOsm/kg (voir Figure du photocopié).

(22) Effets métaboliques.

La nature des cristalloïdes et surtout leur concentration ne font pas qu'affecter la pression osmotique. Ils ont d'autres effets et notamment des effets métaboliques. La modification de la concentration en NaCl du milieu de culture des cellules HeLa (MEM

à 10 % de sérum de bœuf) a permis de déterminer que la concentration optimale pour la croissance et pour la diataxie du DNA était de 100 à 130 mmol/l (0,58 à 0,75 %). Apparemment ces valeurs sont très inférieures à celles qui sont trouvées par PAUL, mais ces résultats divergents ne sont pas forcément incohérents. Eagle trouve que la croissance des cellules L et des cellules HeLa est optimale à 100 mmol/l de NaCl, ce qui de nouveau contraste avec les résultats de PAUL. En fait la haute osmoticité trouvée par PAUL pour promouvoir la croissance optimale des cellules HLM ou des cellules HeLa est probablement due au fait qu'il y a une forte augmentation de **l'absorption de glucose** quand l'osmolalité augmente elle-même de 200 mOsm à 450 mOsm. L'absorption du glucose est maximale à 450 mOsm. Une augmentation de **l'utilisation** du glucose (exprimée en mmol utilisées par μ g de protéines et par heure) est effectivement observée entre 40 et 220 mmol/l de NaCl (surtout entre 160 et 220 mmol/l en fait) en cellules HeLa. **Le rapport [Déplétion en glucose/Accumulation d'acide lactique]** augmente également, jusqu'à conversion totale du glucose à 220 mmol/l. (Expression en mmol de glucose utilisé/ μ g protéine/h).

Quand on veut évaluer les effets de variations de pression osmotique réalisées par modification des concentrations salines, on doit tenir compte du fait que les **échanges ioniques** sont beaucoup plus actifs dans les cellules somatiques que dans les GR. Les cellules somatiques ne sont pas de simples osmomètres comme pourraient l'être les GR. Elles peuvent par exemple **gonfler** dans un milieu **hypertonique** comme l'ont rapporté Stubblefield et Müller à propos des cellules HeLa. Quand elles sont conservées pendant 4 semaines dans un milieu à haute concentration saline, elles augmentent de taille.

Le maintien d'un équilibre osmotique est très largement le résultat d'un processus actif ; il n'est donc pas étonnant que des modifications de concentration osmotique puissent être impliquées dans des activités intracellulaires ou puissent affecter celles-ci. Dans certaines lignées cellulaires humaines, **l'activité phosphatase alcaline** augmente quand l'osmolalité est augmentée à partir d'un seuil de 302 mOsm/kg (en milieu de Puck). Cette augmentation peut être réalisée par addition de NaCl, de KCl, de glucose ou d'autres sels. Un milieu très hyperosmotique (462 mOsm/kg), par exemple, augmente cette activité enzymatique de 7 fois.

Les protéines et macromolécules du sérum exercent des effets osmotiques par elles-mêmes et peuvent lier des ions et des petites molécules y compris l'eau. Une telle liaison peut se faire non seulement dans le milieu extra- mais aussi dans le milieu intracellulaire. Elle modifie la pression osmotique. Le K^+ , par exemple, se lie essentiellement à des polyanions intracellulaires. On doit garder ces notions à l'esprit quand on met au point des milieux définis additionnés de sérum. Les milieux qui n'imitent que la partie non macromoléculaire du sérum exercent des pressions osmotiques différentes de celles du sérum et *a fortiori* du sang total. De plus, de nombreuses hormones affectent les transports ; leur présence (ou leur absence) dans le milieu peut affecter la cellule et ses relations avec son environnement, mais peut également conduire à ajuster de façon appropriée le milieu de culture.

Quand on utilise des milieux totalement définis, on peut alors constater que divers types cellulaires peuvent effectivement exiger des milieux de concentration osmotique différente. Les cellules embryonnaires s'équilibrent dans des milieux de concentration osmotique plus faible que les tissus adultes. Certains de ceux-ci (*medulla* du rein, foie) peuvent exiger des ajustements de leur milieu à des environnements non physiologiques qui dérogent très fortement à la règle d'or du principe imitatif.

5-Conclusions.

La concentration ou pression osmotique est une variable qui est facile à mesurer ; elle permet de contrôler les changements de composition de milieu, et tout particulièrement les changements intervenus dans le contenu en sels et en eau.

Les changements de pression osmotique et d'équilibre ionique ont des répercussions non seulement sur la croissance mais aussi sur le métabolisme cellulaire. Les potentiels de membrane, le transport des ions, des acides aminés [AA], du glucose ou d'autres métabolites peuvent en être modifiés. Même si cette variable n'est pas de première importance pour la culture de cellules — puisque ces dernières en supportent assez bien les variations autour de la valeur normale —, elle doit être prise en compte, notamment lorsqu'il s'agit d'interpréter ou de reproduire des expériences rapportées par d'autres auteurs.

SECTION 3 : LA CONCENTRATION EN IONS HYDROGENE.

1-Rappel théorique.

11-Définition.

Le pH est défini par la relation suivante :

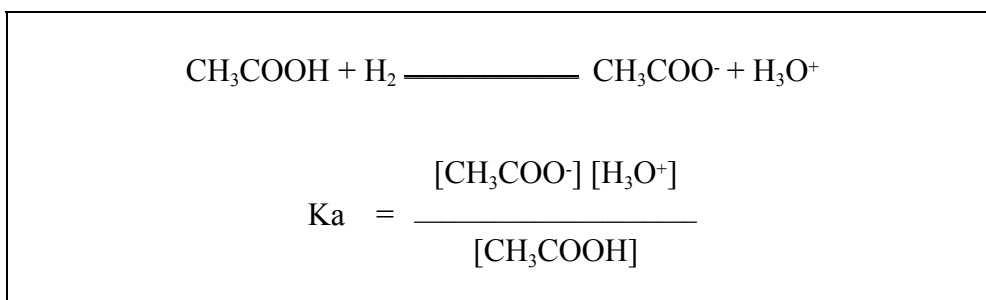
$$\text{pH} = \text{pKa} + \frac{[\text{anion acide}]}{[\text{acide non dissocié}]}$$

dans laquelle

$$\text{Ka} = \frac{[\text{A}] [\text{B}]}{[\text{AB}]}$$

$$\text{pKa} = -\log \text{Ka} = \log \frac{1}{\text{Ka}}$$

Ainsi, dans la réaction



où [] est exprimé en mol/l à l'équilibre.

La constante **Ka** définit en même temps la force de l'acide (ici CH₃COOH) et celle de sa base conjuguée (CH₃COO⁻). L'acide est d'autant plus fort, et sa base conjuguée plus faible que la valeur du pKa du couple est faible. L'équation du pH (dite d'Henderson-Hasselbach) montre que le pouvoir tampon est optimal quand le pH est égal au pKa du groupe ionisant. Ce pouvoir chute progressivement et de plus en plus

vite quand le pH s'éloigne de cette valeur. En pratique **la gamme de pH utiles pour un tampon** est son **pKa ± 1 U pH**. Peu de tampons classiques, acides faibles-bases faibles, ont un pKa tombant dans la gamme des pH de 6,0 à 9,0, si importante physiologiquement.

12-Facteurs affectant le pH.

121-Effets d'activité, effets des sels.

Ces 2 effets ont une influence considérable sur les valeurs de pH d'une solution. Ceci est reflété dans l'équation [1] :

$$\text{pH} = \text{pKa}' + \log \frac{[\text{B}]}{[\text{BH}]} \quad [1]$$

où **[B]** est la concentration du cation basique, **[BH]** la concentration de la base non dissociée. Dans cette équation, pKa' s'exprime par la relation **pKa' = pKa + facteur de correction**.

Les facteurs à utiliser dépendent de la force ionique [Fi] et sont donnés par des tables, pour des valeurs allant de 0,001 à 0,5. Il vont, dans notre cas, de 0,015 pour la Fi la plus faible à 0,159 pour la Fi la plus forte. Ces valeurs de correction sont donc à prendre en considération. La Fi est donnée par l'équation [2] :

$$I = 1/2 \sum (C_i z^2) \quad [2]$$

où **C_i** est la concentration de l'espèce **i**, **z** la charge correspondante. **I** peut être calculée facilement à partir des paramètres expérimentaux.

122-Capacité du tampon.

La capacité maximale d'un tampon, **β_{max}**, d'une espèce monovalente, s'exprime quand le pH est ajusté à la valeur du pKa' (c'est-à-dire la valeur pratique du pKa du tampon dans les conditions expérimentales). Cette β_{max} est calculée dans la gamme de pH allant de 3 à 11 à l'aide de l'équation [3] :

$$\beta_{\text{max}} = 0,576 c \quad [3]$$

où **c** est la concentration totale de la substance tampon. La capacité utile d'un tampon se trouve située dans une gamme de pH égale au pKa' ± 1 U pH.

Si plus de 50 % de la capacité maximale doit être utilisée, la gamme correspondante est égale seulement au pKa' ± 0,75 U pH (voir Figure du polycopié).

La capacité β d'un tampon est donnée par la relation [4] :

$$\beta = \frac{d[B]}{dpH} \quad [4]$$

où $d[B]$ est la quantité de base ajoutée au composant tampon BH pour obtenir une variation déterminée de pH dans la solution tampon, notée dpH . Et la capacité tampon d'un mélange tampon acide faible-base faible est d'autant plus élevée que l'on se trouve proche du pK_a .

Les valeurs β d'un mélange de tampon sont additives. On peut, à partir de l'équation [5] ci-dessous, calculer le rapport molaire des espèces basiques/espèces acides qui permettent d'obtenir un pH donné dans la gamme tampon pratique de $pH = pK_a' \pm 1$ U pH :

$$pH = pK + \log \frac{[\text{espèces basiques}]}{[\text{espèces acides}]} \quad [5]$$

Une Figure du polycopié donne le rapport $[B]/[BH]$ et le pH, et permet d'estimer rapidement la capacité du tampon en %.

123-Effets de température.

Les effets de la température sur le pH d'une solution donnée peuvent être considérables. Ainsi le TRIS a un pK_a de 8,55 à 0°C, de 8,06 à 25°C et de 7,22 à 37°C. Le décrétement moyen du pK_a du TRIS dpH/dt est égal à - 0,03 U $pH/^\circ C$.

124-Effets de dilution.

Ces effets dépendent essentiellement de la charge de l'espèce tampon. La dilution d'un système tampon du type HA/A^- 0,01 mol/l avec un égal volume d'eau distillée a pour résultat un changement de valeur de pH de l'ordre de 0,024 U pH . Le pH est abaissé dans le cas de tampons basiques et augmenté dans le cas de tampons acides quand on procède à la dilution. La variation de pH de systèmes tampons du type HA/A^{2-} est augmentée environ d'un facteur 3.

2-Situation dans l'organisme *in vivo*.

Dans l'**organisme**, la survie des cellules est conditionnée de façon déterminante par la concentration de leur voisinage immédiat en ions H^+ . Le pH des liquides biologiques doit tourner autour de la neutralité pour permettre la survie de l'organisme entier. Dans l'organisme, le pH est maintenu à la neutralité par 2 systèmes de régulation. L'un est **un système direct** : il est constitué des substances tampons du sang

(bicarbonate, hémoglobine). L'autre est **un système indirect** : il est représenté par les poumons et les reins ; les poumons contrôlent l'élimination du CO₂ produit par la respiration, les reins éliminent l'excès d'acidité ou d'alcalinité du sang.

Les pH locaux peuvent aussi avoir une grande importance dans l'organisme ; comme pour la pression osmotique, certaines cellules, en effet, sont adaptées à des pH qui diffèrent notablement du pH normal du milieu intérieur, et qui sont spécifiques d'un tissu particulier. **Les sangs veineux** quittant le pancréas ou la muqueuse stomacale à la phase sécrétoire n'ont pas les mêmes réserves alcalines et présentent des concentrations très différentes en ions H⁺. Les endothéliums des vaisseaux qui drainent ces 2 territoires sont donc manifestement exposés à des pH différents. Les faces, interne ou externe, des **épithéliums de revêtement (épithéliums du canal pancréatique, des tractus respiratoires et urinaires)** sont exposés à des liquides biologiques de pH différents.

3-Le pH *in vitro*.

31-Notion de pH optimal.

Il est assez difficile techniquement de déterminer le pH optimal exigé *in vitro* par tel ou tel tissu ou cellule, et il est également difficile de le contrôler. On ne le peut **qu'en utilisant les systèmes directs** que sont le tampon (en l'occurrence, le bicarbonate) et **en contrôlant la composition de la phase gazeuse** surmontant le liquide de culture.

In vitro, la plupart des tissus ou cellules tolèrent de remarquables variations de pH. La cellule de Mammifères "moyenne" peut survivre indéfiniment dans une gamme de pH allant de 6,6 à 7,8. Il existe même des exemples documentés de cellules qui croissent et se différencient à des pH voisins ou supérieurs à 7,8. Inversement, il existe des exemples de cellules qui ont été maintenues en survie pendant des temps prolongés à des pH inférieurs à 6. Les cellules ont en fait un pH optimal de croissance (voir les Figures et le Tableau du photocopié).

Les cellules humaines transformées par un virus ou provenant d'une tumeur tendent à avoir un pH optimal de croissance plus acide que des fibroblastes ou des cellules normaux (voir la Figure du photocopié). **Les cellules de Singe et de Rat** croissent bien sur une gamme de pH **beaucoup plus large** que ne le font les cellules humaines ou de Souris. Les cellules **de Mammifères** admettent en général des pH optimaux compris entre **7,2 et 7,6** ; les cellules **d'Oiseaux** ont un pH optimal **un peu plus alcalin**.

32-Effets des variations de pH.

321-Effets sur la multiplication cellulaire et sur l'inhibition de contact.

Au pH optimal, les cellules croissent non seulement plus rapidement, mais encore atteignent une densité de saturation plus élevée. Bien que les cellules normales diploïdes soient soumises au phénomène d'inhibition de contact (inhibition de la croissance dépendant de la densité cellulaire), la densité **absolue** à laquelle la croissance est effectivement inhibée est clairement dépendante du pH. On peut induire

une inhibition presque totale de la croissance en faisant passer le pH de la culture à une valeur suboptimale. Réciproquement, des cultures stabilisées reprennent leur croissance si le pH est ajusté à son niveau optimal.

Enfin, la densité de saturation maximale au pH optimal est un "grand multiple" de la densité nécessaire pour former une couche complète de cellules ; il faut donc nécessairement conclure que les contacts intercellulaires ne sont pas les seuls facteurs impliqués dans l'arrêt de la croissance par inhibition de contact. De multiples causes peuvent induire la cessation de la croissance cellulaire à la phase stationnaire. Trois en particulier sont importantes : (a) l'état nutritionnel ; (b) le pH du milieu ; (c) la concentration en sérum.

Soit une culture arrivée à la phase stationnaire, parce que le milieu de culture n'a pas été renouvelé et se trouve épuisé, ou parce que la concentration du milieu en sérum est suboptimale, ou encore parce que le pH du milieu n'a pas été contrôlé. On observe que le changement de milieu ou l'adjonction de sérum ou l'ajustement du pH ont pour effet de stimuler brutalement la croissance cellulaire et de stabiliser la culture à une densité de saturation supérieure. L'ajustement approprié d'une seconde variable provoque une seconde stimulation brutale, et celui de la troisième, une augmentation supplémentaire. L'ordre dans lequel se font ces ajustements n'affecte pas le résultat final. La concentration effective de sérum est indépendante du pH de l'environnement ; le pH optimal est indépendant de la concentration du milieu en sérum.

322-Effet sur la diataxie des protéines cellulaires.

Le pH optimal pour la production de **collagène** par les fibroblastes humains et murins coïncide avec le pH optimal de croissance de ces cellules (pH 7,2 et 7,7 respectivement). La conversion du procollagène en collagène est indépendante du pH dans la gamme de pH 6,8-8,0. La réticulation du collagène en revanche est sensible au pH. Elle se fait à partir de résidus aldéhydiques dérivés de la lysine et de l'hydroxyproline. La formation de ces résidus est catalysée par la lysyl-oxydase. Le pH optimal de l'activité de l'enzyme isolée est le même que le pH optimal auquel le rendement en collagène réticulé est maximal ; ce rendement est mesuré par l'extractibilité du collagène.

Le pH optimal pour la diataxie et la sécrétion **d'immunoglobulines** par les cellules de myélome de Souris est aussi le pH optimum de croissance pour les cellules en cause (pH 7,35).

En revanche, la diataxie de la **protéine S100** par les astrocytes de Rat est optimale à pH 6,4-6,8, alors que le pH optimal de croissance de ces cellules est de 7,15 et donc nettement plus alcalin.

323-Effet sur la fusion et l'hybridation cellulaires.

Le pH du milieu semble n'avoir qu'un modeste effet sur la fusion cellulaire induite par le virus Sendaï ou la lysolécithine. A pH 7,8-8,0, il y a une augmentation de 3 à 5 fois de l'efficacité de fusion par rapport à l'efficacité de fusion observée à pH 6,8-7,2. Le pH a cependant un effet prononcé sur l'hybridation cellulaire consécutive à la fusion, c'est-à-dire sur la formation d'hybrides viables à partir des polycaryons ou cellules fusionnées multinucléées. Quand des cellules sont fusionnées à pH 7,2 ou 8,0 et qu'elles sont ensuite incubées à des pH variés, le rendement éventuel des colonies d'hybrides obtenues augmente progressivement jusqu'à un pH maximum de 7,8-8,0 : il y a 2 logs de différence entre les rendements obtenus à pH 7,1-7,2 et les rendements obtenus à pH 7,8-8,0. Au delà de ce pH, le rendement diminue de nouveau et toutes les cellules meurent quand le pH est supérieur à 8,4.

Quelle que soit l'étape sensible au pH dans l'hybridation cellulaire, elle s'exprime dans les 4 à 8 jours qui suivent la fusion. En effet, si les cellules fusionnées sont conservées pendant des durées variables à pH 8,0 avant d'être replacées à pH 7,2, le nombre de colonies d'hybrides viables qu'elles engendrent augmente continuellement avec la durée de l'incubation initiale à pH 8,0 pour atteindre un maximum après 4 à 8 jours. Inversement si les cellules fusionnées sont incubées pendant des temps variables à pH 7,2 puis replacées au pH optimal, le nombre de colonies d'hybrides formées diminue en fonction directe de la durée d'incubation à pH 7,2. La nature de l'étape sensible au pH n'est pas connue.

324-Effet sur le rendement viral.

La production de *Reovirus* en culture est fortement affectée par le pH. Le pH de production optimale ne coïncide pas avec le pH optimal de croissance de la cellule hôte. Les pH optimaux de croissance des cellules de foie de Rat et des fibroblastes d'embryon de Souris sont de 7,8 et 7,2 respectivement. Dans ces 2 types cellulaires, la production optimale de virus se fait à des pH compris entre 6,8 et 7,2. Le pH optimal pour la production de virus reflète peut-être l'activité d'une enzyme spécifique du virus.

L'effet le plus spectaculaire du pH sur le rendement viral est observé lors d'expériences de sauvetage (*rescue*) du SV 40. La fusion d'une cellule transformée par le SV 40 (cellules mKS BU 100 de Souris, cellules BTH de Hamster) avec une cellule permissive pour ce virus aboutit à la production de SV 40 par l'hybride : on dit qu'il y a sauvetage du virus. Le degré de sauvetage du virus augmente progressivement avec le pH (8,2-8,4). Ces pH alcalins sont finalement létaux pour les 2 types de cellules parentales. Il y a 4 log de différence entre les titres des suspensions de virus récupérées à pH 6,8 et à pH 8,4. Le mécanisme qui est responsable de ces effets est très probablement le même que celui qui est responsable de l'augmentation de la formation d'hybrides après fusion.

325-Effets létaux.

Au-dessus de pH 7,8 et au-dessous de pH 6,6, de nombreux types cellulaires meurent en 24 h. C'est un phénomène analogue qui survient dans les cultures organotypiques non agitées. L'oxygène ne parvient pas à diffuser convenablement vers le cœur de l'explant. Les cellules sont en anaérobiose et produisent plus d'acide lactique qui s'accumule et fait baisser le pH très fortement. Le centre de l'explant se nécrose.

SECTION 4 : LES IONS INORGANIQUES.

Toutes les cellules exigent pour croître la présence de certains ions dans le milieu de culture. Cette présence est requise pour d'autres raisons que le seul maintien de la pression osmotique ou le contrôle du pH du milieu. Pour des raisons didactiques, les ions indispensables ont été subdivisés en 2 catégories : les ions dont la présence est requise en quantité pondérale et que j'appellerai les **ions massifs**. Les ions dont des traces souvent infimes suffisent à remplir les exigences des cellules et que l'on appelle les **oligoéléments**.

1-Les ions massifs.

11-Les cations.

Les cations nécessaires aux cellules sont le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium (sous formes de chlorures). Ces éléments sont constitutifs de tous les liquides biologiques.

Le **sodium** sert au maintien de la pression osmotique, au fonctionnement de certaines enzymes (ATPases dépendantes du Na^+ et du K^+), au transport d'AA, etc.

Le **potassium** sert également au maintien de la pression osmotique et au fonctionnement de certaines enzymes. Mais il remplit d'autres fonctions spécifiques souvent mal connues. Il peut être un facteur très important pour les cellules dont il affecte souvent le taux de croissance [*vide infra*].

Le calcium et le magnésium sont indispensables au fonctionnement de certaines enzymes (par exemple l'amylase de la salive humaine, ou du pancréas de Porc). Le calcium peut aussi intervenir indirectement dans la régulation de leur activité par l'intermédiaire de calciprotéines comme la calmoduline ou d'autres molécules. Il est impliqué dans la polymérisation des protéines du cytosquelette, dans la contraction musculaire, dans l'adhérence des cellules à un support de culture et dans l'adhérence intercellulaire, par l'intermédiaire des intégrines qui sont les récepteurs des molécules impliquées dans ces phénomènes telle la fibronectine. Les taux de calcium et de magnésium peuvent profondément affecter la morphologie cellulaire. Le calcium et le magnésium sont précipités par les phosphates ; il faut donc respecter un équilibre quantitatif entre ces constituants dans le milieu de culture. Les cellules peuvent supporter des carences momentanées en calcium, car elles en possèdent des stocks intracellulaires importants et quelquefois une simple mobilisation du calcium intracellulaire suffit à couvrir les exigences. Les cultures de cellules en suspension se font en milieu appauvri en calcium (comme le milieu RPMI 1.640) ou même en milieu dépourvu de calcium (MEM-Spinner). Enfin, on a noté que les cellules tumorales sont moins exigeantes en calcium que les cellules normales. Les milieux de culture pour cellules d'Insectes sont plus riches en calcium (600 mg/l de CaCl_2 pour le milieu de Schneider [cellules de Drosophile] ; 750 mg/l pour le milieu de Grace [cellules d'Insectes en général]) que les milieux pour cellules de Mammifères ou d'Oiseaux (33,22 mg/l pour le milieu de Ham F12 ; 140 à 200 mg/l pour les diverses formes de MEM contenant du calcium).

12-Les anions.

Le carbonate et le bicarbonate sont exigés d'abord parce qu'ils sont les éléments du seul système tampon physiologique traversant librement les membranes plasmiques (les phosphates ne le peuvent pas). Mais ils sont aussi exigés pour des raisons métaboliques. Si, dans un milieu de culture au pH soigneusement régulé, l'on soutire constamment le CO_2 formé par la respiration, les cellules finissent par devenir métaboliquement inactives. Ces anions interviennent dans des métabolismes très importants comme la synthèse des acides gras [*vide infra*] ou la biosynthèse des précurseurs des acides nucléiques (la condensation d'ammoniac et de gaz carbonique en présence d'ATP conduit au carbamylphosphate, point de départ de la biosynthèse de l'acide orotidylique et des bases pyrimidiques ; le 5-amino-imidazole ribotide réagit avec du gaz carbonique pour donner du 5-amino-4-carboxy-imidazole ribotide qui est un intermédiaire de synthèse de l'acide inosinique et des bases puriques qui en dérivent).

Les phosphates sont indispensables au métabolisme énergétique de la cellule. Ils peuvent lui être fournis sous forme inorganique ou organique. En l'absence de phosphates organiques (qui sont présents en assez grande quantité dans les liquides biologiques, mais qui ne traversent pas facilement les membranes plasmiques, et qui sont clivés par les phosphatases et les phosphodiesterases en phosphate et oses simples, par exemple), il faut fournir des phosphates inorganiques. Les phosphates peuvent devenir des facteurs limitants en culture cellulaire. Les ions phosphates jouent également le rôle de tampon du milieu extracellulaire.

Le sulfate n'est pas toujours exigé par les cellules. Certaines d'entre elles cependant, exposées à du sulfate marqué au ^{35}S incorporent activement ce dernier dans leurs

protéines qui sont donc probablement sulfatées. La sulfatation est l'une des modifications post-traductionnelles possibles des protéines. D'autres cellules, très particulières, exigent absolument du sulfate, car elles synthétisent des polysaccharides sulfatés qu'elles stockent (cellules intestinales en gobelet) ou qu'elles excrètent (chondrocytes). Il ne faut pas confondre exigence en sulfate et exigence en soufre. Cette dernière exigence est remplie par la fourniture de soufre organique (cystéine, cystine, méthionine) et caractérise des cellules qui comme les kératinocytes produisent des protéines soufrées, de la kératine en l'occurrence.

2-Les oligoéléments.

21-Difficultés de l'étude.

Il est très difficile d'étudier les exigences qualitatives et quantitatives des cellules en oligoéléments. En effet, malgré toutes les précautions que l'on peut prendre, on ne parvient jamais à purifier les constituants des milieux de culture au point d'en éliminer tous les oligoéléments : l'étude des effets d'une carence précise en culture de cellule est donc délicate. La détection qualitative d'un oligoélément ne soulève pas de difficultés majeures. Mais il est difficile de doser les oligoéléments et donc de déterminer les exigences quantitatives des cellules pour ceux-ci. Les méthodes de dosage restent encore limitées à quelques laboratoires de recherche spécialisés. Il est plus simple en revanche d'étudier les effets d'une carence en oligoéléments chez l'animal entier. Il est également possible de chercher dans les listes de métalloprotéines et de métalloenzymes, celles des molécules qui semblent avoir de très importantes fonctions dans la physiologie cellulaire. Malgré ces difficultés, les études consacrées à cette question ont commencé dans les années cinquante (Shooter et Gey : fibroblastes d'embryon de Rat ; Melnick *et al.*, Waymouth : cellules humaines et murines). Outre le fer connu depuis longtemps pour être un cation important, d'autres ions se sont révélés indispensables pour la culture de cellules. Ils ont été découverts et étudiés en 3 vagues successives. **Jusqu'en 1957**, sont établis comme essentiels les oligoéléments suivants : cuivre, cobalt, iode, manganèse, molybdène et zinc. Puis **entre 1957 et 1959**, viennent s'ajouter à cette liste le sélénium et le chrome. Enfin **après cette dernière date**, on identifie comme essentiels, ou probablement essentiels, le nickel, le vanadium, l'arsenic, le silicium, le fluor et l'étain.

22-Fer.

Le fer intervient dans le fonctionnement des enzymes et pigments respiratoires (cytochromes, et cytochrome oxydases). Son transport est assuré dans le plasma par une molécule appelée la transferrine (celle du plasma humain peut lier aussi du manganèse et du cuivre). Il intervient aussi dans le fonctionnement de certaines enzymes (adrénoxine de la médullosurrénale du Porc, NADH-déshydrogénase du cœur de Porc, succinate déshydrogénases des cœurs de Bœuf et de Porc, aldéhyde oxydase du foie de Porc, phosphatase acide de la rate de Bœuf, etc.). On l'utilise en quantité faible mais pondérale.

23-Cuivre, zinc, manganèse, cobalt, molybdène et iode.

Ces ions interviennent surtout comme cofacteurs d'enzymes. **Le cuivre** est transporté dans le plasma par la céruléoplasmine (Homme, Porc). Il participe, avec le zinc, au fonctionnement de la superoxyde dismutase du cerveau, du foie et des GR des Mammifères, et seul, à celui de la monoamine oxydase du plasma de Bœuf, de la diamine oxydase du rein de Porc, de la tyrosinase des tissus de Mammifères, etc. (se reporter au Tableau du polycopié). **Le zinc** rentre dans la structure de l'anhydrase carbonique des GR de divers Mammifères, dans celle des carboxypeptidases pancréatiques A et B, de l'alcool déshydrogénase hépatique, de diverses déshydrogénases, etc. **Le manganèse** est le cofacteur de la pyruvate carboxylase à biotine du foie de poulet, par exemple. **Le cobalt**, qui est transporté par la transcobalamine, rentre dans la structure de la vitamine B12. **Le molybdène** rentre dans la structure de la sulfite réductase du foie de Bœuf, qui est une enzyme à hème. **L'iode** rentre dans la constitution des hormones thyroïdiennes.

Tous ces oligoéléments, sauf le molybdène, sont considérés aujourd'hui comme des composants essentiels des milieux de culture synthétiques. Il faut donc tenir compte de ce fait pour l'élaboration de ces milieux. Mais en l'absence de données définitives, les recherches à venir doivent déterminer les concentrations optimales qu'il faut y ajouter pour obtenir une survie et une croissance optimales des cellules.

24-Sélénium et chrome.

(a) Le rôle du **sélénium** a été soupçonné en 1957 quand on a remarqué que des traces de ce métalloïde pouvait prévenir chez le Rat la nécrose hépatique qui survient lors d'une carence en vitamine E. Les signes de déficiences en sélénium ont été étudiés depuis chez divers animaux de laboratoire : il s'agit d'alopécie, d'opacification du cristallin, de cataracte, de défauts ou d'anomalies de la vascularisation, du ralentissement de la croissance lors de l'administration d'un régime carencé en sélénium mais normalement supplémenté en vitamine E.

L'exigence nutritionnelle en sélénium *in vivo* varie avec la concentration du régime alimentaire en vitamine E. Chez l'homme, la concentration sanguine en sélénium va de 0,10 à 0,34 µg/ml (valeurs obtenues chez 210 donneurs de sexe masculin aux USA), avec une moyenne de 0,2 µg/ml.

Le sélénium est un composant essentiel de la glutathion peroxydase, enzyme qui détruit les peroxydes. Ce fait explique pourquoi l'exigence nutritionnelle en sélénium dépend de l'apport en vitamine E. Le sélénium est peut-être un cofacteur de la poly-ADP ribose polymérase.

Il est absolument indispensable en culture cellulaire. Dans les milieux synthétiques, on l'ajoute obligatoirement et sous forme de sélénite de sodium. Il assume d'importantes fonctions dans le maintien de la survie et dans la croissance. Ainsi, on ne peut cloner des fibroblastes diploïdes humains en milieu appauvri en sérum, qu'en y ajoutant du sélénium. Habituellement on utilise des concentrations finales de 0,005 mg/l de sélénite de sodium.

(b) Chez l'animal, l'indicateur le plus sensible du déficit en **chrome** *in vivo* est une modification de la tolérance au glucose. Chez le Rat, en outre, un déficit en chrome se traduit par des anomalies de croissance et l'apparition d'opacités cornéennes. Chez

l'homme, un tel déficit se manifeste également par l'incapacité à utiliser le glucose comme source d'énergie mais aussi par l'apparition d'une neuropathie normo-insulinique, de hauts niveaux d'acides gras libres circulants, un faible quotient respiratoire et des anomalies du métabolisme de l'azote. Le chrome pourrait intervenir dans la stabilisation de la structure des acides nucléiques. On l'y trouve constamment dans leurs préparations. Cependant on ne sait encore avec certitude si le chrome est exigé pour la culture cellulaire.

25-Nickel, vanadium, arsenic, silicium, fluor et étain.

(a) Le rôle physiologique du **nickel** a été soupçonné en 1970. Les effets de la déficience en nickel ont été étudiés chez le poulet et le Rat. Ils sont essentiellement hépatiques. On observe une diminution des phospholipides du foie et une réduction de la capacité oxydative de cet organe. Les hépatocytes ont une ultrastructure anormale. Ils ont un cytoplasme lavé ; les contours de leur noyau sont irréguliers ; l'hétérochromatine adjacente à l'enveloppe nucléaire est augmentée, de sorte que certains noyaux ont un aspect pycnotique ; l'espace périnucléaire est dilaté ; les mitochondries sont nombreuses et forment des amas étroits ; elles sont souvent allongées, leur matrice a une densité plus faible et semble dilatée. Les lumières des *cisternae* du réticulum endoplasmique rugueux sont dilatées et généralement elles semblent vides. Outre ces troubles hépatiques, il y a une diminution de la quantité de certains lipochromes jaunes de la peau. Le nickel aurait un rôle dans le maintien de la structure des acides nucléiques (RNA et DNA). *In vivo*, le nickel est associé à une macroglobuline plasmatique, la nickeloplasmine (MM : 70 kD). On y retrouve 0,9 atome-gramme de nickel par mol. Le nickel *in vitro* active de nombreuses enzymes : *la désoxyribonucléase, l'acétylcoenzyme A synthétase, la phosphoglucomutase*. Le nickel est un élément ubiquiste qui contamine la plupart des AA et des sels minéraux. Le risque d'avoir des milieux de culture déficients en nickel est infime, comme il en va pour de nombreux autres oligoéléments.

(b) La carence en **vanadium** (concentration < 10 ng/g de nourriture) induit une réduction de la croissance des plumes des ailes et du croupion du poulet. Chez le Rat, cette carence provoque une diminution de la croissance, une augmentation de l'hématocrite, une augmentation du fer dans le sang et les os. Les fonctions biologiques spécifiques du vanadium sont inconnues. Ce métal est probablement un cofacteur dans une ou des réactions métaboliques. Ce pourrait être des réactions d'oxydo-réduction. Le vanadium n'est pas ubiquiste comme le nickel. La préparation de milieux déficients est donc possible et permet d'étudier aisément les exigences des cellules en cet ion.

(c) **L'arsenic** est fourni sous forme d'arséniate. Il semble être essentiel *in vivo*. Sa privation entraîne chez le Rat une splénomégalie, une fragilisation des GR et une dépression de la croissance. La nécessité de l'arsenic en culture de cellule est insuffisamment établie. Sinon certaine, elle est cependant possible.

(d) **Le silicium** est également indispensable. Sa carence entraîne chez le poulet une dépression de la croissance, un retard de la plumaison ainsi qu'une pâleur des téguments et des muqueuses. Le tissu sous-cutané prend une couleur jaunâtre, et non blanc rosé comme il serait normal. Le silicium interviendrait dans la réticulation du collagène : on en retrouve en effet 3 à 6 atomes par chaîne α . Il aurait un rôle dans la calcification de l'os ; il y fonctionnerait soit comme matrice, soit comme catalyseur. Le

silicium doit donc être considéré comme un élément putatif important en culture de cellules où il pourrait assurer d'autres rôles.

(e) **Le fluor** est connu depuis 1930 pour le rôle qu'il joue dans la prévention de la carie dentaire. Chez l'adulte, il participe au maintien d'un squelette normal. Chez l'animal, le fluor maintiendrait la fertilité, la croissance et l'hématocrite à des niveaux normaux. Il reste à prouver que le fluor est nécessaire en culture cellulaire.

(f) **L'étain** serait indispensable au Rat chez qui sa privation entraînerait des troubles de la croissance. Il pourrait participer au maintien de la configuration tertiaire des protéines. L'étain tétravalent forme très facilement des complexes de coordination avec 4, 5, 6 et peut-être même 8 ligands. Il pourrait participer aussi à des processus d'oxydoréduction. Sa nécessité en culture cellulaire reste à démontrer.

L'eau pure est très agressive. Elle dissout aussi bien le verre que le plomb ou le cuivre des canalisations. Dans ces conditions, son usage peut entraîner, en culture de cellules, l'apparition de phénomènes toxiques par apport d'ions métalliques lourds en excès.

3-Importance de l'équilibre quantitatif : balance des ions et culture de cellules.

31-Importance dans le déterminisme de la forme de la cellule.

Nous avons déjà signalé l'importance du calcium et du magnésium dans le déterminisme de la forme. Effectivement il est possible d'observer des modifications de la forme des cellules en culture, quand on modifie la composition du milieu en cations bivalents. Ainsi, des cellules de lymphosarcomes murins sont arrondies à concentration calcique normale. Si on la réduit, elles deviennent fusiformes mais leur taux de croissance n'est pas affecté.

32-Importance du rapport [Na]/[K] pour la croissance optimale.

Trois exemples peuvent illustrer ce point : celui des cellules L de Souris, celui des cellules de foie fœtal de Souris et l'ensemble complexe des expériences de Roffo.

(1) Les cellules L de Souris.

Les cellules L de Souris **croissent bien** dans un milieu de type MD 705/1 dont le rapport Na/K est de 50,9 (Na : 132 mmol/l ; K : 2,6 mmol/l) et la pression osmotique de 308 mOsm/kg. Mais **leur croissance optimale** exige une **quantité supérieure de K**, celle du milieu MAT 661/2 dont le rapport Na/K est de 29,1 (Na : 137 mmol/l ; K : 4,7 mmol/l) et la pression osmotique de 322 mOsm/kg. Dans ces conditions, la croissance est effectivement meilleure.

(2) Les cellules de foie fœtal de Souris.

Les cellules de foie fœtal de Souris peuvent être maintenues et croître pendant des mois dans des conditions convenables, en présence de faibles concentrations de corticostéroïdes dans un milieu de concentration osmotique optimale de 300 mOsm/kg. Ces cellules ont un **comportement différent des cellules L** de Souris. Fait peut-être à mettre en **corrélation** (a) avec l'augmentation du contenu du foie en potassium au moment de la naissance et (b) avec la fuite facile du potassium hors du foie fœtal (elle n'est pas observée dans le foie adulte), on note que ces cellules croissent bien dans un milieu synthétique ayant une concentration élevée en potassium, le milieu MAB 87/L (variante du milieu MAB 87/3) dont le rapport Na/K est de 2,3 (Na : 90 mmol/l ; K : 39 mmol/l), bien qu'elles croissent aussi en milieu MAB 87/3 dont le rapport Na/K est de 37,0 (Na : 130 mmol/l ; K : 3,5 mmol/l). Une forte concentration en potassium n'est donc pas inhibitrice. Il a été montré d'ailleurs par Flink *et al.* qu'il fallait utiliser une solution de Ringer bicarbonatée enrichie en potassium (36 mmol/l) pour maintenir le potassium dans des tranches de foie de Rat. Cette concentration en potassium est très voisine de celle du milieu MAB 87/L laquelle est de 39 mmol/l.

(3) Expériences de Roffo : cœur de poulet, sarcome et carcinome de Rat.

Roffo a étudié les effets de la modification de la concentration des milieux en certains ions (le calcium et le potassium) sur la croissance des cellules cardiaques de poulet, et sur celle des cellules de sarcome et de carcinome de Rat.

(a) Il constate que des milieux hypo-osmotiques (plasma dilué dans une solution de NaCl à 0,5 % [p/v]) favorisent la croissance initiale des cellules.

(b) Il dilue le plasma de Poule dans une série de solutions de Ringer modifiées (voir le polycopié) et il observe que **le cœur de poulet** normal croît bien dans les solutions 3 et 5, faiblement en solution 2, très faiblement dans la solution 4 exempte de potassium. **Le sarcome fusocellulaire** de Rat a une croissance optimale en solution 5 dépourvue de calcium. Il croît bien en solution 3 qui se révèle elle-même supérieure à la solution 1. La croissance est faible ou nulle en solutions 2 et 4. **Le carcinome** a une bonne croissance en solution 3 et 5.

Ces expériences démontrent la nécessité absolue de la présence du potassium et la moindre importance du calcium pour la croissance des cellules, au moins sur le court terme.

SECTION 5 : LES GLUCIDES.

1-Métabolisme des sucres *in vivo*.

11-Métabolisme du glucose et des oses simples par la voie classique.

C'est grâce au métabolisme des sucres, notamment, que l'organisme récupère l'énergie sous forme de liaisons phosphates riches en énergie. Les sucres lui servent en

quelque sorte de combustible. Dans l'organisme, la voie de fermentation du glucose est la même, que les conditions d'utilisation soient aérobies ou anaérobies : cette étape de fermentation est appelée **glycolyse**. En conditions aérobies, les produits de fermentation du glucose (essentiellement l'acide lactique) sont repris dans la respiration aérobie. La dégradation anaérobie du glucose (ou d'autres hexoses simples) constitue une étape préalable obligatoire de la phase respiratoire (voir Figure du polycopié).

(1) La glycolyse.

Chaque molécule de glucose donne naissance à 2 molécules d'acide lactique selon le schéma dégradatif figurant dans le polycopié. Le bilan énergétique global de la glycolyse est le suivant :



La glycolyse est catalysée par l'action successive de onze enzymes (page 87 du polycopié). Toutes ou presque ont été isolées, cristallisées et complètement étudiées. Ces enzymes ont été extraites des cellules sous une forme soluble, et elles sont localisées dans la portion soluble du cytoplasme. Elles n'entretiennent aucune association physique les unes avec les autres, et ne constituent pas un complexe polyenzymatique.

La glycolyse comprend 2 grandes étapes (voir le polycopié). (a) **La première** est une étape préparatoire vers laquelle converge, outre le glucose, un certain nombre d'hexoses après qu'ils ont été phosphorylés aux dépens de l'ATP. Ils sont finalement transformés en glycéraldéhyde 3-phosphate. (b) **La seconde étape** de la glycolyse constitue la voie commune à tous les sucres. Elle est caractérisée (b1) **par la réaction d'oxydoréduction** caractéristique des fermentations, et qui ne fait pas intervenir l'oxygène et (b2) **par le mécanisme de récupération de l'énergie** qui phosphoryle l'ADP en ATP.

Trois types de transformations chimiques interviennent dans la glycolyse ; ils sont intimement intriqués : (a) la séquence des réactions qui dégradent le squelette carboné du glucose en acide lactique ou voie métabolique des atomes de carbone ; (b) la séquence des réactions introduisant le phosphate inorganique dans le groupe phosphoryl terminal de l'ADP ou voie métabolique du phosphate ; (c) la séquence d'oxydoréduction ou voie des électrons.

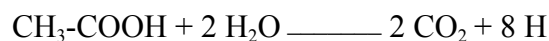
On trouvera dans le polycopié le détail des réactions de la glycolyse. Elle emprunte les mêmes voies dans toutes les cellules qui réalisent ce type de transformation ; mais il existe des différences dans les propriétés des enzymes, selon l'espèce ou le type de cellule. Ceci permet d'inférer (a) qu'il peut y avoir des différences ou des préférences d'utilisation des sucres d'un type de cellule à l'autre et (b) qu'il y a une certaine flexibilité dans les exigences. Le polycopié présente de manière schématique, les réactions essentielles qui permettent au fructose, au mannose et au galactose de rentrer dans la glycolyse et donc d'être assimilés par la cellule.

(2) La respiration.

La respiration comprend le cycle de KREBS et la chaîne respiratoire proprement dite.

(21) Le cycle de KREBS.

Le schéma d'ensemble de la respiration est présenté dans le polycopié. Ce schéma montre que les groupes acétyles provenant des glucides, mais aussi des lipides (acides gras) et des acides aminés, rentrent dans la troisième étape, celle du cycle de KREBS, ou des acides tricarboxyliques, qui constitue la voie finale commune du catabolisme oxydatif de toutes les molécules combustibles des cellules aérobies. Dans ce cycle, les groupes acétyles sont démembrés avec libération de CO₂ et d'atomes d'hydrogène. Ces derniers, ou les électrons équivalents, sont alors introduits, lors d'une quatrième étape, dans une chaîne respiratoire constituée d'une série de transporteurs d'électrons. Le processus consécutif du transport des électrons vers l'oxygène moléculaire s'accompagne d'une très importante diminution d'énergie libre. Cette énergie est récupérée en partie sous forme d'ATP par une réaction de phosphorylation oxydative.



Cette équation montre que ni l'oxygène moléculaire, ni l'ATP ne participent au cycle de Krebs. Le rôle de ce cycle est de déshydrogéner l'acide acétique pour former en fin de compte 2 molécules de CO₂ et 4 paires d'atomes d'hydrogène. Le détail des réactions du cycle de KREBS figure dans le polycopié. Ce cycle se déroule dans les mitochondries.

(22) La chaîne de transport des électrons.

La chaîne respiratoire et les points d'entrée des électrons à partir de divers substrats sont figurés dans le polycopié. Ce qu'il est important de retenir est que le NADH est un donneur d'électrons et que ceux-ci vont fluer d'un donneur vers un accepteur. Le transporteur d'électrons situé à l'extrémité la plus réductrice de la chaîne, près du substrat (le NAD), se trouve être le plus réduit. Ceux qui sont situés près de l'accepteur terminal (l'oxygène moléculaire) sont les plus oxydés. L'accepteur est toujours oxydé par rapport au donneur quand il reçoit un électron. Un Tableau du polycopié montre aussi la séquence des réactions dans le transport des électrons.

Les molécules de transporteurs d'électrons qui constituent la chaîne respiratoire sont disposées en groupes supramoléculaires, les assemblages respiratoires. Ceux-ci contiennent un nombre déterminé de molécules de chaque transporteur et sont englobés dans la structure de la membrane interne de la mitochondrie.

12-Voie du phosphogluconate ou des pentoses phosphate.

En plus du cycle tricarboxylique, de nombreuses cellules présentent une autre voie de dégradation et d'utilisation du glucose qui n'est pas une voie principale. La première réaction de cette voie, dite des **pentoses-phosphate ou shunt des hexoses monophosphate**, est une oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate.

Son premier rôle, essentiel, est de créer dans le cytoplasme extramitochondrial une capacité de réduction sous la forme de NADPH. Une telle capacité est particulièrement importante dans les tissus (foie, glande mammaire, tissu adipeux, cortex surrénal) qui réalisent la synthèse des acides gras et des stéroïdes à partir de petites molécules précurseurs. La voie des pentoses-phosphate n'existe pas dans les cellules musculaires squelettiques. **En second lieu**, elle a pour rôle de former des pentoses, notamment du D-ribose, indispensable à la synthèse des précurseurs des acides nucléiques.

Les diverses étapes de cette voie métabolique se déroulent dans la fraction soluble du cytoplasme extramitochondrial des cellules animales. Elles sont résumées dans un schéma figurant dans le photocopié.

2-Les glucides en culture de cellules.

21-Règles générales et flexibilité des exigences.

On sait depuis 1958 (Eagle, Freeman et Levy) que **le glucose** est essentiel pour la croissance des cellules en CULTURES ORGANOTYPIQUES ; grâce à l'utilisation de matériel marqué au ^{14}C , on a pu montrer que dans ces cultures le glucose est utilisé pour la biosynthèse de certains AA, des bases puriques et pyrimidiques, d'autres sucres et pour celle de lipides cellulaires.

Habituellement, en CULTURES HISTIOTYPIQUES, on utilise également **le glucose** comme source principale d'énergie, et ce, à une concentration équivalente à celle que l'on trouve dans le sang périphérique de l'espèce animale dont proviennent les cellules (Poule, Rat : 2 g/l ; Homme : 1 g/l). Dans certains cas particuliers (culture de cellules nerveuses, *vide infra*) on augmente la concentration du glucose à 3 g/l (cas de l'un des DME [voir page 256]).

Mais d'autres sucres peuvent avantageusement remplacer le glucose : des OSES SIMPLES comme **le fructose**, **le mannose** et même **le galactose** mais dans ce cas le plus souvent en présence de pyruvate. Il existe toutefois des cellules qui ne peuvent utiliser ces sucres comme substituants du glucose : les cellules CHO n'assimilent pas le fructose, les cellules L n'utilisent pas le galactose, même en présence de pyruvate. On a également montré que des DISACCHARIDES, comme **le maltose** et même des POLYSACCHARIDES peuvent quelquefois remplacer le glucose. Mais il faut alors que ces sucres complexes soient clivés en oses élémentaires avant de pouvoir être assimilés par la cellule. Les enzymes responsables de ce clivage peuvent être des enzymes présentes dans le sérum utilisé pour compléter le milieu de culture : ainsi le maltose est clivé en glucose par la maltase sérique. Ces études indiquent donc que les exigences des cellules en glucides peuvent être satisfaites de diverses façons et qu'elles sont par conséquent flexibles à un degré qui dépend de la cellule en cause.

Eagle, Barban, Levy et Schulze ont étudié de façon systématique la flexibilité des exigences des cellules humaines en culture, et leur mode d'utilisation des sucres, en déterminant l'aptitude de ces cellules à utiliser tel ou tel sucre comme source unique de carbone glucidique. Les cellules examinées sont de diverses origines : cellules de conjonctive en lignée de Chang, cellules de foie en lignée de Chang, lignée intestinale de Deinhardt et Henlé, lignée cardiaque de Girardi, lignée de cellules de conjonctive. Ces 3 dernières lignées sont d'origine embryonnaire. Ils y ajoutent 3 lignées d'origine tumorale (HeLa, KB, HEP 1) et, comme contrôle, une cellule animale, la lignée L. On

peut résumer comme il suit les principaux résultats de ces recherches (voir les Tableaux du polycopié).

(1) Les 3 classes de substrats : réponse de croissance.

Les auteurs font appel à 43 substrats différents (oses simples [hexoses, pentoses], disaccharides, polyols, acides uroniques, intermédiaires du cycle de KREBS) ; ils mesurent la réponse de croissance des cellules vis-à-vis de ces substrats utilisés isolément ou, plus rarement, en association. Sauf rares exceptions, les diverses lignées répondent de manière qualitativement identiques à ces composés. En fonction des réponses qu'ils suscitent, ceux-ci peuvent être classés en 3 catégories. (a) **La première** comprend des composés totalement inefficaces qui ne permettent ni la croissance ni la survie des/ ou d'une partie des/ cellules étudiées. Tous les intermédiaires du cycle de KREBS sont membres de cette catégorie, ainsi qu'un certain nombre de pentoses [arabinose, lyxose, ribose, xylitol], d'hexoses [allose, altrose, galactose, gulose, rhamnose, sorbose], ou de disaccharides [lactose, saccharose]. Le D-ribose et le D-galactose, classés dans cette catégorie suscitent toutefois, mais exceptionnellement, des réponses non nulles de certaines cellules (polycopié, page 92/4) . (b) **La seconde** catégorie comprend des composés qui permettent une légère croissance de toutes les cellules ou de certaines d'entre elles ; cette croissance est toujours inférieure à celle qui est observée en présence de glucose : c'est le cas du cellobiose, du mélibiose, du sorbitol, du talose, du xylose et du ribose (polycopié, page 92/4). (c) **La troisième** classe comprend des composés qui permettent régulièrement la croissance et la multiplication cellulaires quand ils remplacent le glucose : ce sont des disaccharides [tréhalose, turanose], des hexoses [D-fructose, D-mannose, D-galactose], et 2 esters phosphate [glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate]. Ces composés sont efficaces pour toutes les cellules essayées ou pour certaines seulement [cas du D-galactose] (consulter cette liste et la structure des dans le polycopié.

(2) Propriétés et qualités des substrats permettant la croissance.

Ces propriétés peuvent être résumées comme il suit.

(a) Il existe des différences significatives dans les concentrations optimales des composés efficaces. Si l'on considère le taux de croissance aux concentrations optimales, ces différences sont moins grandes.

(b) **Le glucose et le mannose** sont pour l'essentiel aussi efficaces l'un que l'autre, tant en termes de concentration optimale qu'en termes de taux de croissance des cellules à la concentration optimale.

(c) Les 6 lignées humaines peuvent utiliser **le galactose au lieu du glucose**. Les cellules L de Souris ne le peuvent pas. Mais les réponses au galactose sont extrêmement variables. Dans certaines expériences, le galactose est même presque plus efficace que le glucose : des concentrations significativement inférieures à celles du glucose suffisent à assurer une croissance optimale. Dans d'autres expériences et avec les mêmes lignées, le galactose n'est efficace qu'à des concentrations élevées. De la même manière, bien qu'en présence de galactose à concentration identique, le taux de croissance soit souvent analogue à celui que l'on observe avec le glucose, il est parfois

inexplicablement bas. L'addition de pyruvate (1 mmol/l) qui, à lui seul ne peut remplacer le glucose, permet de rendre plus reproductible et mieux prévisible la réponse des cellules au galactose : le taux de croissance est accru ; des concentrations plus faibles de galactose se révèlent efficaces. Le pyruvate (1 mmol/l) n'a qu'un très faible effet sur la réponse de croissance cellulaire au glucose. Dans ces conditions, l'on n'observe qu'une diminution de la concentration minimale efficace du glucose. Mais le pyruvate ne modifie pas alors la quantité de glucose métabolisé, ni la quantité d'acide lactique formé.

(d) **Le fructose** doit toujours être utilisé en concentration supérieure à celle du glucose pour obtenir une croissance optimale. Le rapport des concentrations optimales peut varier de 2 à 20 selon les lignées étudiées. Mais à ces concentrations optimales, les taux de croissance sont pour l'essentiel identiques à ceux que l'on observe avec le glucose.

(e) **Le glucose-1-phosphate** et **le glucose-6-phosphate** sont aussi actifs que le glucose. Ceci indique qu'ils sont transportés dans la cellule ou plus exactement, probablement déphosphorylés par des phosphoestérases ou des phosphatases avant d'être transportés dans le cytosol.

(f) **Le turanose** doit être utilisé en concentration supérieure à celle du glucose pour obtenir une croissance optimale. Mais à ces concentrations, la croissance est tout à fait satisfaisante (voir le polycopié).

(g) A des concentrations relativement élevées, plusieurs composés (D-talose, D-xylose, sorbitol) permettent une faible croissance initiale de certaines lignées, mais pas de toutes. A 50 mmol/l, le cellobiose et le mélibiose ont un effet sur la survie plutôt que sur la croissance. La signification des résultats obtenus avec ces sucres est donc équivoque. Ces composés ne sont actifs qu'à des concentrations élevées et à un degré limité. Eagle *et al.* n'ont pas vérifié que leurs composés étaient exempts de contamination par le glucose, mais ils soulèvent la question de la spécificité des effets observés, en soulevant celle d'une éventuelle contamination par des sucres plus efficaces.

(h) Contrairement à ce que montrent certaines observations, **le D-ribose**, dans un milieu dépourvu de glucose, a un effet, limité mais réel, sur la croissance cellulaire. Comme pour le galactose, **l'addition de pyruvate augmente** régulièrement l'ampleur de la réponse de croissance au D-ribose (voir Tableau du polycopié). Dans certains cas, le ribose et le pyruvate conjugués sont efficaces, alors que le ribose tout seul ne permet pas la croissance (voir Figure du polycopié). C'est le cas des fibroblastes embryonnaires humains. La réponse de croissance au **ribose-5-phosphate**, observée sur une large gamme de concentration du substrat, ne varie pas amplement comme dans le cas du ribose. Seules les lignées répondant au ribose répondent aussi au ribose-5-phosphate. Vous trouverez dans le polycopié, un Tableau qui donne la liste des enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres.

22-Les préférences cellulaires.

Les règles générales qui viennent d'être énoncées ont été tirées des travaux de Eagle *et al.* sur la nutrition des cellules humaines. Ces études ont fait l'objet de 2 critiques : (a) la première, évoquée du reste par Eagle *et al.*, est la contamination des sources de sucres par le glucose ou d'autres oses simples efficaces ; (b) la seconde est la possible conversion du sucre étudié en glucose par des enzymes du sérum utilisé pour la préparation du milieu de culture.

C'est pourquoi Burns *et al.* (1976) ont mis au point une méthode qui permet d'éliminer les résultats faussement positifs dus à la présence accidentelle de glucose dans le milieu de culture. A cet effet, les auteurs supplémentent le milieu en catalase et en glucose-oxydase avant d'étudier l'effet des sucres sur la croissance des cellules. Les auteurs confirment dans ces études la flexibilité des exigences cellulaires pour les glucides et mettent en évidence une seconde notion qui est celle de la préférence des cellules pour tel ou tel glucide. Ils utilisent pour ces travaux des cellules de Rongeurs : cellules CHO sauvages et mutées (clone YH21 : G6PDH⁻, HPRT⁻), des cellules L mutées (TK⁻), des cellules B-16 de mélanome murin, un clone muté de la lignée d'hépatome de Rat HTC (clone 6TG-11, résistant à l'azaguanine). Ces cellules sont cultivées dans du milieu de Dulbecco et Vogt modifié par Naylor. Ce milieu est additionné de SFV dialysé, de glucose oxydase, de catalase et du glucide à étudier.

Dans une **étude initiale**, les auteurs observent les effets de 93 sucres sur les cellules CHO et L. Quinze d'entre eux se révèlent toxiques et 27 autres se révèlent inhibiteurs de la croissance (en présence de glucose [2 mg/ml] dans les 2 cas). Il est intéressant de noter que le D-tagatose, un stéréo-isomère du D-glucose, est toxique pour les cellules, et que le L-glucose, isomère optique du D-glucose, est inhibiteur de la croissance. En outre plusieurs sucres, largement répandus dans la nature, sont, soit toxiques, soit inhibiteurs : il s'agit du L-fucose, de la glucosamine, du 2-désoxy-D-ribose, de l'acide D-glucuronique, du glucuronamide et du glycérophosphate. Enfin, 51 sucres ne sont ni toxiques ni inhibiteurs de croissance en présence de glucose. Ils sont donc étudiés pour leur capacité à remplacer le glucose comme seule source de carbone.

L'étude ultérieure des 51 sucres retenus montre que 15 d'entre eux peuvent susciter la prolifération d'une ou plusieurs lignées cellulaires. On note avec intérêt que certains sucres exigent la présence de pyruvate (1 mmol/l) pour autoriser la prolifération cellulaire en présence du sucre à l'épreuve. L'exigence en pyruvate est très prononcée pour le clone YH21 des cellules CHO. En présence de pyruvate, le spectre d'utilisation des sucres est identique pour les cellules CHO sauvages et mutées ; en l'absence de pyruvate, il existe 6 différences dans la réponse de croissance des cellules CHO sauvages et mutées. Les cellules étudiées présentent des profils distincts et caractéristiques d'utilisation des sucres. Chaque lignée se distingue des autres par ses "préférences". Les cellules L et B-16, par exemple, ont une très faible capacité à utiliser d'autres sucres que le glucose ; elles diffèrent par leur réponse au mannose, au maltose + pyruvate et à la dextrine. La lignée HTC et les cellules CHO répondent à de très nombreux sucres. La lignée HTC et les lignées CHO diffèrent dans leur réponse au fructose et au turanose + pyruvate.

Ces résultats confirment donc ce que PAUL avait avancé en 1965 : les cellules de Mammifères peuvent utiliser toute une série de sucres pour leur croissance. Grâce au système glucose-oxydase/catalase, l'étude que nous venons d'analyser, évite de tomber sous le coup des critiques qui frappent les travaux antérieurs, celles de la contamination des substrats par le glucose, et celle de la conversion des substrats par les enzymes du sérum utilisé pour préparer le milieu de culture.

23-Métabolisation des sucres en culture de cellules et production d'acide lactique.

(1) Importance de l'oxygène et de la concentration du substrat.

Le Tableau du polycopié illustre ce point. Il montre comment des cellules de neuroblastome de Souris assimilent le glucose en fonction de sa concentration et de la tension d'oxygène de la phase gazeuse.

Dans des conditions normales de culture (glucose : 5 mmol/l ; oxygène : 21 %), l'utilisation du glucose par les cellules de neuroblastome de Souris est de 90 % environ, au bout de 48 h de culture ; à ce moment, 2/3 du glucose initialement présent ont été convertis en lactate ; la mortalité cellulaire, exprimée en pour-cent de LDH extracellulaire par rapport à la LDH totale, est assez faible.

En hypoxie (oxygène : 5 %) **et en présence de 5 mmol/l de glucose**, il y a une forte réduction de la croissance cellulaire et une forte mortalité cellulaire (42 % de LDH extracellulaire) ; la consommation de glucose est très importante (97 % du glucose initial) et celui-ci est transformé en grande partie en lactate.

En présence de 15 mmol/l de glucose et en normoxie comme en hypoxie, la croissance cellulaire n'est pas modifiée (oxygène : 21 %) ou à peine (oxygène : 5 %), mais la viabilité cellulaire est considérablement augmentée ; en condition hypoxique, une proportion plus importante de glucose est convertie en lactate.

Ces constatations, faites ici avec des cellules tumorales dérivées du tissu nerveux, ont une portée générale et de semblables remarques ont été faites avec d'autres types cellulaires.

(2) Nature du substrat carboné.

La nature du substrat carboné peut influencer considérablement la production de lactate par les cellules ainsi que l'évolution dans le temps du pH du milieu de culture. L'exemple illustré dans le polycopié est celui des cellules MDCK. Il s'agit de cellules de rein de chien en lignée. Elles sont ici cultivées sur des microporteurs dans des conditions où l'évolution du pH vers l'acidité introduit de sérieuses limitations expérimentales, en raison de la densité cellulaire très élevée (4×10^5 à 2×10^6 cellules/ml) tout au long de la culture.

Une Figure du polycopié montre que la croissance cellulaire est pratiquement identique dans des milieux contenant du glucose (20 mmol/l ; 10 % de SVF), du maltose (5 mmol/l ; 10 % de SVF), ou du fructose (20 mmol/l ; 10 % de sérum de cheval [SC]). Mais le fructose est utilisé beaucoup plus lentement que le glucose et ce à toutes les concentrations essayées, et c'est avec le glucose que la production de lactate est maximale. Elle est 4 fois moins importante en présence de fructose ou de maltose (voir les Figures du polycopié). Corrélativement, c'est avec le glucose que le milieu s'acidifie le plus (le pH passe de 7,5 à 6,5 en 5 jours, contre 7,5 à 7,1 pendant la même période, avec les 2 autres substrats (Figure du polycopié).

Les auteurs montrent que la production de cellules et l'absorption d'hexose entre les jours 1 et 2 de culture (rendement cellulaire par μmol d'hexose utilisée) sont optimales avec le maltose ou le fructose. Comme la production de lactate et de pyruvate

rend compte de la majeure partie de la production l'acidité non volatile, il apparaît que le maltose et le fructose induisent la plus faible libération d'acide fixe par gramme de cellules produit.

Ces observations indiquent que les voies du métabolisme intermédiaire dans les cellules MDCK sont fortement influencées par la nature du sucre présent dans le milieu de culture. Pour maintenir le pH et la stabilité du potentiel redox dans ces cultures à haute densité cellulaire, il est donc judicieux de remplacer le glucose par du fructose ou du maltose. Comme l'usage du maltose impose d'ajuster avec soin l'activité maltase dans le sérum et le milieu, on lui préfère celui du fructose, plus pratique. Des observations analogues ont été faites avec d'autres cellules (fibroblastes humains FS4 par exemple). L'usage du fructose s'est répandu dans l'industrie (cultures cellulaires en fermenteurs sur microporteurs).

Des résultats voisins ont été obtenus par Eagle *et al.* dans l'étude que nous avons analysée plus haut. Ces auteurs notent que les 4 hexoses (glucose, mannose, fructose, galactose) qui permettent la croissance de la plupart des lignées humaines étudiées par eux, diffèrent non seulement dans les concentrations optimales (concentrations minimales qu'il convient d'utiliser pour avoir une croissance maximale), mais aussi dans leur métabolisation. Cette dernière est étudiée par la détermination de la quantité de sucre métabolisé par unité de croissance cellulaire, ou par la quantité d'acide lactique produit. Les auteurs observent notamment que l'augmentation de l'utilisation du sucre n'est pas reliée au taux de croissance, qui, avec le glucose par exemple, est optimal entre 0,5 et 2 mmol/l. A des concentrations supérieures, elle s'accompagne d'un accroissement de la glycolyse globale. Avec le fructose, les résultats sont qualitativement similaires : la quantité de sucre métabolisé et la glycolyse augmentent avec la concentration de sucre dans le milieu. Mais quantitativement ces 2 valeurs atteignent des niveaux moindres avec le fructose qu'avec le glucose ou le mannose. Avec le galactose, habituellement, la quantité de sucre métabolisée et celle d'acide lactique formée, sont inférieures à celles que l'on observe avec le glucose ou le fructose (voir Figure du polycopié).

Le polycopié donne aussi les résultats d'une expérience relative à la quantité de substrat métabolisé et d'acide lactique produit par mg de protéines cellulaires formées, et ce, en fonction de la concentration du substrat. Quand la concentration de **glucose** passe de 0,2 mmol/l à 20 mmol/l, la quantité métabolisée par mg de protéines néoformées par les cellules de foie humain en lignée passe de 13 à 69 μmol et corrélativement, la quantité d'acide lactique formé passe de 13 à 81 μmol . Dans cette gamme de concentrations, la glycolyse rend compte habituellement de la moitié à peu près du glucose total métabolisé. Dans le cas du **galactose**, cependant, quand la concentration est augmentée de 100 fois, (du niveau maximal efficace de 0,2 mmol/l à 20 mmol/l), les quantités de sucre métabolisé par mg de protéines néoformées augmentent de 2,8 μmol à 19 μmol , tandis que la quantité d'acide lactique formé reste pour l'essentiel constante et égale à 4-6 μmol par mg de protéines néoformées. A des concentrations plus élevées, la glycolyse ne rend compte que de 12 % du galactose métabolisé par les cellules dans cette expérience. **Le mannose** se comporte comme le glucose et **le fructose**, plutôt comme le galactose.

Il ressort de ces données que l'expérimentateur doit déterminer pour chaque type cellulaire, la nature du sucre et sa concentration, en fonction du but qu'il se propose d'atteindre. Ce souci est évidemment prioritaire dans les biotechnologies.

24-Remplacement du sucre par un céto-2-acide.

Le glucose, ou le sucre qui en tient lieu, peut souvent être remplacé par des molécules plus simples (comme le lactate ou le pyruvate [2 mmol/l]) tant qu'un apport d'oxygène aux cellules est assuré. Ces molécules satisfont donc les exigences énergétiques cellulaires.

La croissance de nombreux types de cellules de Mammifères en culture présente ce que l'on pourrait appeler une exigence pour l'acide pyruvique "dépendante de la densité de population". En d'autres termes, à densité clonale, ces cellules exigent de l'acide pyruvique.

Cette exigence est curieuse. Les cellules en effet produisent ces acides. On a donc d'abord présenté l'exigence en acide pyruvique comme résultant, à **densité clonale**, d'une fuite de ce métabolite hors de la cellule. Le taux de fuite excéderait largement la capacité de synthèse de la cellule. On présumait **qu'à haute densité cellulaire**, les cellules conditionnaient le milieu en y accumulant une quantité d'acide pyruvique suffisante pour maintenir une concentration extracellulaire en pyruvate à un niveau compatible avec la maintenance et la croissance cellulaire. Mais cette interprétation simple s'est heurtée au fait que d'autres céto-2-acides, qui ne sont pas obligatoirement physiologiques, peuvent remplacer l'acide pyruvique.

McKeehan et McKeehan ont alors étudié en détail cette question et aboutissent à un certain nombre de conclusions. Ils montrent (a) que l'un quelconque d'une série définie de céto-2-acides est un substrat pour une ou plusieurs déshydrogénases intracellulaires à pyridine-nucléotide et favorise la croissance cellulaire et (b) que, de plus, des macromolécules du sérum modifient l'exigence des cellules pour des céto-2-acides extracellulaires : l'exigence augmente brutalement quand la quantité de sérum du milieu est diminuée. Ceci laisse supposer que les céto-2-acides sont impliqués dans un mécanisme fondamental de régulation de la multiplication et que ce mécanisme a peut-être pour médiateur le rapport $NAD^+/NADH$.

Pour leurs travaux, les auteurs utilisent des fibroblastes humains diploïdes en monocouche, du milieu MCDB 105, et la fraction non dialysable [FND] du sérum de veau fœtal. Voici, résumés, les principaux résultats de leur étude.

(a) En présence de 250 µg de FND, la multiplication clonale des fibroblastes diploïdes de poumon humain est promue par addition d'acide pyruvique au milieu. Le taux de multiplication cellulaire atteint la moitié de la valeur maximale (valeur appelée $S_{0,50}$) à une concentration d'acide pyruvique de 5×10^{-6} mol/l. L'effet de l'acide pyruvique est indépendant des niveaux d'AA et de glucose dans le milieu de culture (voir le polycopié).

(b) D'autres céto-2-acides supportent effectivement la multiplication cellulaire en absence d'acide pyruvique. Les acides glyoxylique, oxo-2-glutarique et oxalo-acétique ont des $S_{0,50}$ égales ou inférieures à celle de l'acide pyruvique. Tous les substrats actifs induisent un taux maximal de multiplication (R_{max}) similaire. L'acide glyoxylique est le plus actif des céto-2-acides étudiés. La $S_{0,50}$ des acides glyoxylique, oxo-2-glutarique et oxalo-acétique n'est pas influencée par la présence dans le milieu de culture de leurs AA correspondants, à savoir la glycine, l'acide glutamique et l'acide aspartique

(c) L'effet d'un céto-2-acide donné, ajouté en quantité limitante, est additif avec celui d'un autre céto-2-acide, lui-même limitant.

(d) La $S_{0,50}$ augmente avec la longueur des chaînes carbonées. Les acides en C4-C5 tels les acides oxo-2-butyrique, oxo-2-valérique et oxo-2-isovalérique sont 2,5 à

4 fois moins actifs que l'acide pyruvique. Les acides en C6, tels les acides oxo-2-caproïque ou oxo-2-isocaproïque sont complètement inactifs.

(e) Les formes réduites (acides hydroxy-2-carboxyliques) des formes actives de céto-2-acides sont inactives, tout comme une série d'autres substrats du métabolisme intermédiaire.

(f) L'exigence en céto-2-acides ne peut être remplie par des accepteurs d'électrons non spécifiques comme le bleu de méthylène, la ménadione ou le méthosulfate de phénazine.

(g) La concentration du milieu de culture en FND affecte considérablement l'exigence en acide pyruvique. Quand la concentration de cette fraction augmente, la $S_{0,50}$ pour l'acide pyruvique diminue brutalement et à des concentrations de FND égales ou supérieures à 450 $\mu\text{g/ml}$, on n'observe plus aucune réponse à l'adjonction d'acide pyruvique (réponse d'ordre zéro). Dans des expériences séparées, on observe des effets similaires avec d'autres céto-2-acides actifs, dont la liste vous est donnée dans le photocopié. La FND en revanche n'a aucun effet sur la $S_{0,50}$ des acides aminés comme la sérine ou la glycine, bien que l'absorption cellulaire de ces acides aminés soit modulée par le sérum ou des facteurs de croissance purifiés. La $S_{0,50}$ pour la glycine augmente légèrement quand on augmente la concentration en FND.

(h) La réduction apparente de la $S_{0,50}$ pour l'acide pyruvique qui se manifeste quand la concentration en FND augmente est due à la modulation de l'exigence cellulaire pour les céto-2-acides plutôt qu'à l'addition au milieu déficient de céto-2-acides dérivés du sérum. On a dosé le contenu en céto-2-acides d'un milieu sans pyruvate, avec et sans 1.000 μg de fraction non dialysable, après incubation en présence de cellules pendant 12 jours. La contribution de la FND au contenu du milieu en acide glyoxylique, pyruvique ou oxo-2-glutarique est en dessous du minimum (S_{min}) requis pour promouvoir une multiplication détectable. Pour rendre compte de la multiplication d'ordre zéro observée en réponse aux céto-2-acides, avec des cellules cultivées en présence de 450 $\mu\text{g/ml}$ de FND, il faudrait que cette dernière contribue pour au moins $1,6 \times 10^{-5}$ à 6×10^{-5} mmol/l de céto-2-acides dans le milieu de culture. Cette concentration, calculée à partir de l'équation de Michaelis-Menten, est exigée pour promouvoir un taux de multiplication égal à 90 % (S_{90}) du taux maximal, à concentration limitante en FND. La concentration de la FND en céto-2-acides est trop faible pour qu'elle puisse affecter le taux de multiplication.

(i) Enfin, l'EGF purifié à concentration de 10 ng/ml provoque une diminution de 4 fois de la $S_{0,50}$ pour les céto-2-acides dans le cas (non publié) de fibroblastes de prépuce humain.

25-Remarques diverses.

Certaines cellules peuvent vivre très longtemps en absence de **glucose** et tout spécialement les cellules dotées d'un fort pouvoir protéolytique. Ces cellules en effet sont capable de désaminer les AA et d'utiliser alors leur squelette carboné résiduel comme source de carbone et d'énergie. Un excès de **glucose**, par ailleurs, peut empêcher la multiplication des *Enterovirus*.

L'inositol est exigé par les fibroblastes humains, les hépatocytes en général, les cellules de Rat et de Souris et sans doute de nombreuses autres cellules. Le rôle hépatoprotecteur de l'inositol et du sorbitol *in vivo* est bien établi.

Le saccharose a la propriété d'induire les enzymes des lysosomes. Celle-ci est mise à profit pour faire le diagnostic des maladies lysosomiques, sur des fibroblastes préparés à partir de biopsies de peau et provenant de sujets suspects.