Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Développement d'un protocole de cryopréservation des hépatocytes isolés et mis en suspension: évaluation de critères métaboliques et morphologiques

DUPIEREUX-FETTWEIS, François

Award date:
1989

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2026

Facultés Universitaire Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/22.90.61 - Télex 59222 facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Développement d'un protocole de cryopréservation des hépatocytes isolés et mis en suspension. Evaluation de critères métaboliques et morphologiques.

DUPIEREUX-FETTWEIS François

Résumé

L'objectif de ce travail est de caractériser la suspension d'hépatocytes isolés après un stockage à -13°C en milieu liquide. Des tests d'intégrité membranaire confirmés par des observations en microscopie électronique à transmission et à balayage montrent que la majorité des cellules cryopréservées conservent une membrane plasmique intacte. Cependant, l'étude du transport du taurocholate indique un déficit important de l'intégrité métabolique de ces cellules.

Suite à ce constat, nous avons étudié de manière détaillée certaines phases du protocole de cryopréservation. Nous obtenons un plus grand maintien de l'intégrité membranaire et métabolique lorsque du glucose est ajouté au milieu de réchauffement. Par contre, un stockage en présence d'un mélange équimolaire de cryoprotecteurs n'a pas augmenté la viabilité des cellules cryopréservées.

Abstract

Our aim is to evaluate cell's integrity after a protocol of cryopreservation in a liquid medium at -13°C. Erythrosine excluding tests, LDH retention criteria and ultrastructural examinations indicate a good maintenance of plasma membrane integrity. However the study of taurocholate transport show a important loss of metabolical integrity.

We confirm the favourable role of glucose in the thawing medium.On the other hand, a mixture of cryoprotective agents doesn't seem to increase cell's integrity.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Septembre 1989
Promoteur : Professeur E.Feytmans
Co-Promoteur : E.Depiereux

REMERCIEMENTS

Avant que vous ne commenciez à lire les pages qui vont suivre, je tiens à adresser mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidé à mener à bien ce travail.

Je remercie tout particulièrement le professeur E.Feytmans (Promoteur) ainsi qu' Eric Depiereux (Co-promoteur) pour leurs nombreux conseils tant sur le plan scientifique que rédactionnel.

Je tiens à témoigner ma gratitude envers Etienne Pirotte pour sa disponibilité et la bonne humeur qu'il a fait régner au laboratoire durant toute l'année.

Un grand merci à Chantal Devignon sans qui les travaux en microscopie électronique à transmission n'auraient pas été possibles.

Mes remerciements vont également à Noëlle Paulus et Yves Houbion pour leur contribution à l'observation en microscopie électronique à balayage.

Enfin, laissez-moi exprimer ma reconnaissance à Rose Thibaut, Thierry Coche, Messieurs Dubois et Collet qui ont collaboré à l'élaboration de ce travail.

TABLES DES MATIERES

1.INTRODUCTION

1.1.cadre du projet p.1

1.1.1.Les hépatocytes isolés p.1
1.1.2.Intérêt de la cryopréservation p.2
1.1.3.Projet du mémoire p.4

1.2.matériel d'étude p.5

1.2.1.caractérisation de la suspension d'hépatocytes p.5
1.2.1.1.Transport des acides biliaires p.5
a)rappels
b)le transport des acides biliaires
1.2.1.2.la synthèse protéique p.9
a)l'incorporation des acides aminés
b)le métabolisme des acides aminés
1.2.1.3.Autres critères caractérisants l'hépatocyte p.11
1.2.2.Critères de viabilité de la suspension d'hépatocytes p.12
1.2.2.1.intégrité menbranaire p.12
a)exclusion du colorant vital
b)rétention d'enzymes cytoplasmiques
c)détermination du potentiel de menbrane
d)concentration en Na^+ et K^+ intracellulaire
e)respiration endogène
1.2.2.2.intégrité métabolique p.14
a)transport du taurocholate à l'état stationnaire
b)synthèse protéique
c)taux de conjugaison
d)synthèse de glycogène
e)autres
1.2.2.3.examen morphologique p.16

1.3.la cryopréservation p.17

1.3.1.la cryopréservation en milieu solide p.17
1.3.1.1.la cristallisation du milieu p.17
1.3.1.2.l'augmentation de la concentration en solutés p.18
1.3.1.3.les cryoprotecteurs p.18
a)les CPA synthétiques
b)les CPA naturels
c)utilisation d'un mélange de cryoprotecteurs
1.3.2.la cryopréservation en milieu liquide p.22
1.3.2.1.rappels historiques p.22
1.3.2.2.variation de pK p.22
1.3.2.3.dissipation des gradients ioniques p.24

1.4.Travaux réalisés antérieurement au laboratoire de Biologie Quantitative p.26

1.4.1. protocole de cryopréservation des hépatocytes isolés en suspension p.26
1.4.2.incorporation de leucine dans les protéines p.27
1.4.3.transport du taurocholate à l'état staionnaire p.28

1.5.Ojectifs p.29

2.MATERIELS ET METODES

2.1.Animaux p.30

2.2.Réactifs p.30

2.3.Technique d'isolement des hépatocytes p.31

2.3.1.Apparaillage p.31
2.3.2.Solutions p.31
2.3.3.Technique opératoire et perfusion p.32
2.3.4.Filtration-purification p.33

2.4.Technique de congélation à -13°C en milieu liquide p.34

2.4.1.Solutions p.34
2.4.2.Séquence expérimentale p.34

2.5.Evaluation de l'intégrité de l'hépatocyte p.35

2.5.1.Exclusion du colorant vital p.35
2.5.2.Rétention d'enzymes cytoplasmique:dosage de la LDH p.35
2.5.3.Cinétique du transport du taurocholate p.37
2.5.3.1.Préparation des tubes
2.5.3.2.Mesure
2.5.3.3.utilisation d'un compteur à scintillation liquide
2.5.3.4.modélisation mathématique du transport du taurocholate

2.6.Observation des hépatocytes en microscopie p.43

2.6.1.Microscopie électronique à transmission p.43
2.6.2.Microscopie électronique à balayage p.43
2.6.3.Microscopie optique p.44

2.7.Dosage des protéines p.45

2.7.1. Méthode au réactif de Folin (Miller 1957) p.45
2.7.2. Méthode au molybdate rouge de pyrogallol p.45

3.RESULTATS

3.1.Les hépatocytes fraîchement isolés p.46

3.1.1.Intégrité membranaire p.46
3.1.1.1.Exclusion du colorant vital
3.1.1.2.Libération de LDH
3.1.2.Intégrité métabolique p.47
3.1.2.1.Cinétique du transport du taurocholate
3.1.3.Examen morphologique p.48

3.2.Les hépatocytes cryopréservés p.49

3.2.1.Matériel biologique perdu lors des changements de milieu d'incubation p.49
3.2.2.Intégrité membranaire p.51
3.2.2.1.Exclusion du colorant vital
3.2.2.2.Rétention de LDH
3.2.3.Intégrité métabolique p.52
3.2.3.1.Cinétique du transport du taurocholate
3.2.4.Examen morphologique p.56

3.3.Importance du glucose dans le milieu de réchauffement p.57

3.3.1.Critères d'intégrité membranaire p.57
3.3.2.Critères d'intégrité métabolique p.58
3.3.3.Examen morphologique p.58

3.4.Essai d'un mélange équimolaire d'agents cryoprotecteurs p.59

3.4.1.Critères d'intégrité membranaire p.59

4.DISCUSSION GENERALE

4.1.Technique opératoire et perfusion p.60

4.2.Critères de viabilité p.61

4.2.1.Intégrité membranaire p.61
4.2.2.Intégrité métabolique p.62
4.2.3.Examen de l'ultrastructure des hépatocytes p.62

4.3.Les hépatocytes fraîchement isolés p.63

4.3.1.Intégrité membranaire p.63
4.3.2.Intégrité métabolique p.63
4.3.3.Examen morphologique p.64

4.4.Les hépatocytes cryopréservés p.65

4.4.1.Matériel biologique perdu lors des changements de milieu d'incubation p.65
4.4.2.Intégrité membranaire p.65
4.4.3.Intégrité métabolique p.67
4.4.4.Examen morphologique p.69

4.5.Importance du glucose dans le milieu de réchauffement p.69

4.6.Essai d'un mélange équimolaire d'agents cryoprotecteurs p.70

5.CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5.1. conclusions p.71
5.2.perspectives p.73

Annexe p.74

6.BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

1.1. CADRE DU PROJET.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la cryopréservation des hépatocytes isolés en suspension. Le choix des hépatocytes comme matériel d'étude est dicté par une série d'avantages techniques que nous explicitons plus loin et par de nombreux travaux qui ont permis, ces dernières années, de caractériser l'hépatocyte de manière fine.

Sur le plan expérimental, la cryopréservation de ces cellules permettrait l'obtention de suspensions d'hépatocytes mieux standardisées et immédiatement disponibles pour différentes études métaboliques et tests pharmacologiques. Sur le plan médical, la cryopréservation à long terme présente un grand intérêt pour la transplantation d'hépatocytes isolés en cas de déficience hépatique.

1.1.1.Les hépatocytes isolés.

D'un point de vue général, l'hépatocyte est un matériel de choix pour l'étude de la biologie cellulaire .

Un bon nombre de ses voies métaboliques ont été décrites (Arias 1982, Van Bezooijen 1978) et l'ultrastructure a été examinée (Drochmans 1977, Fuller 1982) ce qui a permis de caractériser la cellule hépatique d'une manière précise. Les fonctions métaboliques les plus étudiées sont le transport des acides biliaires, la synthèse protéique, la biodégradation, le métabolisme des lipides, le métabolisme du glucose(glycolyse, gluconéogenèse, glycogenèse et glycogénolyse) et la synthèse de RNA (Coche 1988, Crane 1977, Jackson 1985, Colbeau 1971, Howard 1968).

Les hépatocytes isolés présentent de nombreux avantages pour l'étude du foie *in vivo* . En effet, l'influence de facteurs circulatoires, hormonaux ou nerveux qui peuvent modifier les paramètres physiologiques est difficilement contrôlable dans une étude *in vivo* (Elliot 1979). La suspension d'hépatocytes constitue un système plus homogène dans lequel les problèmes liés au contrôle de la diffusion du substrat vers la cellule sont minimisés.

Par rapport au modèle des hépatocytes mis en culture, la suspension d'hépatocytes se prête particulièrement bien à des études quantitatives et cinétiques car une quantité précise de cellules peut être prélevée au cours du temps dans une même incubation.

L'inconvénient majeur de ce modèle est la perte de la polarité structurelle de la cellule. En effet, on ne distingue plus chez les hépatocytes mis en suspension de pôle canaliculaire ni de pôle sinusoïdal mais une cellule sphérique. Il n'y a cependant pas d'évidence d'une perte de polarité fonctionnelle de ces deux domaines membranaires (Groothuis 1981).

1.1.2.Intérêt de la cryopréservation des hépatocytes.

Après la récolte des hépatocytes à partir du foie, ceux-ci peuvent actuellement être mis en suspension ou en culture. Leur mise en suspension ne permet leur conservation que 3 à 4 heures à 0°C. Au delà de cette période, les différentes voies métaboliques se dégradent. Ce délai relativement court est le facteur limitant du nombre de tests différents qui peuvent être réalisés à partir d'un même foie. Le matériel disponible est donc sous-employé et la variabilité individuelle augmente lors de la comparaison entre les tests réalisés sur des animaux différents.

La mise en culture des hépatocytes isolés permet de les maintenir viables plus longtemps (une semaine). Cependant l'évaluation de la teneur en enzymes spécifiques, de la réponse au glucagon et de la synthèse d'albumine indique qu'au delà de quelques jours, la cellule subit une dédifférenciation progressive (Maganto 1988).

La cryopréservation est une technique bien adaptée aux cellules peu différenciées. La congélation de sperme ou d'embryons est actuellement utilisée en routine. Les premiers essais sur hépatocytes ont cependant révélé un problème de viabilité plus difficile à maîtriser.

Actuellement, la transplantation d'hépatocytes isolés et cryopréservés chez le rat a permis de pallier à certaines déficiences hépatiques (Cuervas-Mons 1982, Eroles 1984, Makowka 1980, Sommer 1979) et cela malgré un rendement médiocre, puisque moins de 10% de la suspension cellulaire est viable. En effet, un faible nombre d'hépatocytes peut-être suffisant pour suppléer à une déficience hépatique (Fuller 1982). D'autre part, le métabolisme des cellules cryopréservées, même altéré, est susceptible de compléter celui des cellules de l'hôte en libérant, par exemple, des facteurs stimulant leur régénération. Dans certains cas, des fractions cellulaires ont suffi à rétablir certaines déficiences métaboliques(Makowka 1981).

Figure 5 — Example of a mammalian cell attached to a solid surface (a), magnified × 1350. In (b) it is shown that the attachment can be used by the cell to organise its internal configuration

Figure 6 — Example of a suspended mammalian cell (a), magnified × 3350. Since the cell does not have a physical external point of reference, it is possible that the gravity vector plays a role in its internal organisation (b)

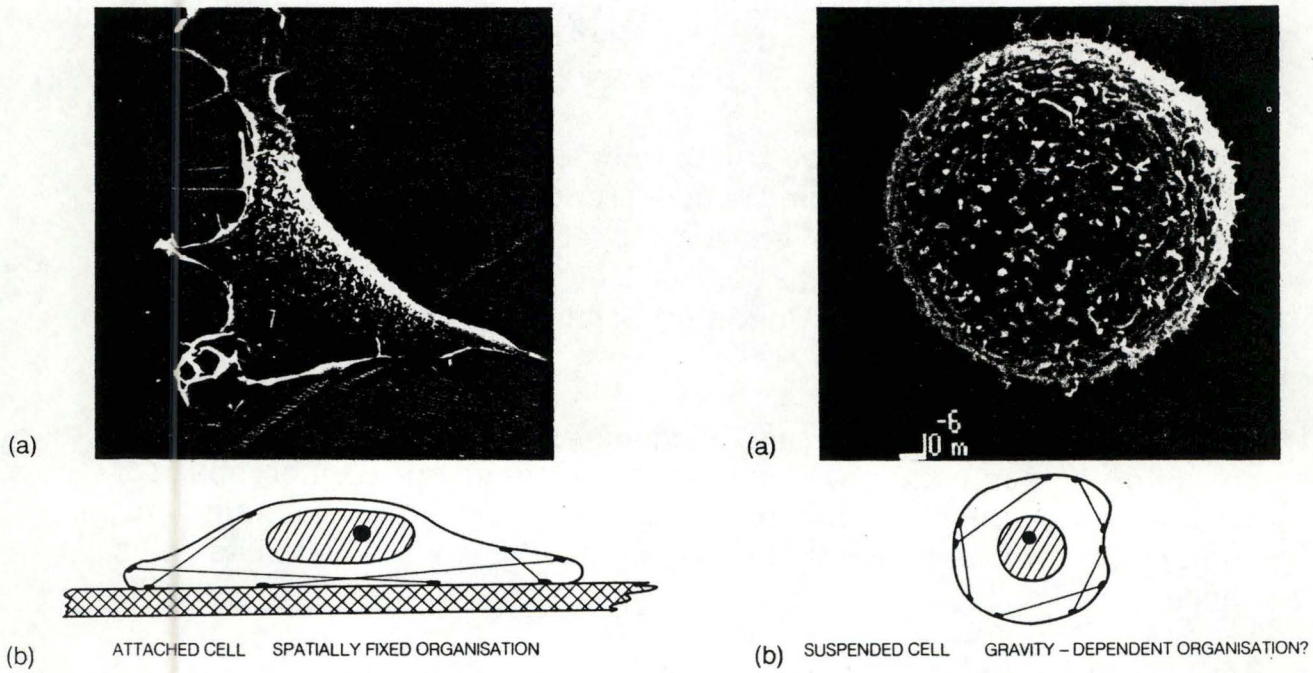


fig.1 : Rôle probable de la gravité dans le fonctionnement des systèmes vivants (ESA 1984).

Une deuxième perspective d'utilisation des hépatocytes isolés et cryopréservés s'est développée dans le cadre de la recherche spatiale. Différentes expériences ont été projetées dans le progamme de la navette spatiale, visant à caractériser le métabolisme cellulaire en apesanteur. En raison des avantages cités plus haut, le modèle de l'hépatocyte isolé en suspension a été envisagé, projet qui se heurte a priori à un obstacle technique : il est impossible de réaliser l'isolement des hépatocytes lorsque le laboratoire spatial est en orbite. Dès lors, il s'avère indispensable de décaler l'isolement (réalisé sur terre) et l'incubation des hépatocytes (envisagée dans l'espace). Entre ces deux étapes, les hépatocytes devraient être conservés à des températures négatives. Juste avant l'expérience, les cellules seraient réchauffées.

Avant de poursuivre, il est intéressant de souligner le double intérêt de l'étude du métabolisme en micro-gravité. L'expérimentation en absence de gravité permet une étude -prospective- des perturbations dues à la microgravité et une étude -rétrospective- du rôle de la gravité dans le métabolisme cellulaire.

-Etude prospective

Au cours d'expériences réalisées en microgravité, plusieurs effets furent mis en évidence sur différents types cellulaires.

Le catabolisme du glucose par des cellules embryonnaires humaines de poumon est significativement réduit (ESA 1986).

Les lymphocytes humains en culture présentent une réduction de la consommation de glucose, une activation de la secrétion d'interféron et une diminution de la prolifération induite par la concanavaline B (Cogoli 1984).

Paramecium semble proliférer plus vite et sa concentration en Ca^{++} est modifiée (ESA 1984).

-Etude rétrospective

Outre la contribution directe à la compréhension de pathologies humaines spécifiques à l'état d'apesanteur (mal de l'espace, décalcification), ces résultats préliminaires suggèrent que le fonctionnement des systèmes vivants est en partie dépendant de la force gravitationnelle (fig.1). En effet, beaucoup de propriétés cellulaires vitales impliquent des mécanismes de mouvements (pinocytose, exocytose, division ou fusion cellulaire et distribution intracellulaire des organites) et la présence d'une force unidirectionnelle et constante (la gravité) peut être impliquée dans un contrôle de ces mouvements cellulaires.

1.1.3. Projet du mémoire.

Notre projet consiste en une étude de l'intégrité membranaire et métabolique des hépatocytes cryopréservés.

Nous disposons au départ :

- d'une méthode reproductible d'isolement des hépatocytes (Coche 1982).

- d'une technique permettant de caractériser le transport du taurocholate par l'hépatocyte isolé (Coche 1988)

- d'une étude préliminaire des effets de la cryopréservation en milieu liquide sur une suspension d'hépatocytes isolés (Decat1987).

- d'une technique permettant de mesurer la synthèse protéique d'une supsension d'hépatocytes avant et après cryopréservation (Dubois 1988)

- de résultats préliminaires obtenus par E.Pirotte en vue d'augmenter la viabilité des hépatocytes après cryopréservation (Feytmans 1987).

Dans le §1.2., les caractéristiques de notre matériel d'étude sont détaillées.

1.2.MATERIEL D'ETUDE.

Les hépatocytes isolés et mis en suspension représentent un matériel biologique facile à manipuler et permettent une étude *in vitro* moins complexe qu'une étude *in vivo* .

Le modèle des hépatocytes isolés en suspension a été utilisé par Coche (1988) dans le cadre de l'étude du transport des acides biliaires.

1.2.1. Caractérisation de la suspension d'hépatocytes.

Le foie joue un rôle central dans le métabolisme. D'une manière générale, il intervient dans l'absorption, la transformation, le stockage, le métabolisme et la redistribution dans le sang et la bile de métabolites divers dont notamment les lipoprotéines (Coche1988). Il est alimenté par deux sources sanguines qui représentent ensemble 25% du débit cardiaque:la veine porte(sang pauvre en O_2) et l'artère hépatique(sang riche en O_2)(fig.2a,2b).

L'hépatocyte est l'unité fonctionnelle du foie. Les hépatocytes, qui constituent 60% des cellules du foie,sont classés en trois catégories suivant leur zonation dans le foie (fig.3). Cette zonation tient compte du gradient en oxygène et en substances dissoutes qui s'établit dans les sinusoïdes entre le sang afférent et le sang efférent.

Deux voies métaboliques ont été plus particulièrement étudiées: le transport des acides biliaires et la synthèse protéique. Elles présentent l'intérêt de mettre en jeu une importante série de fonctions cellulaires: transport membranaire, transport intracellulaire, sécrétion, métabolisme énergétique et leur bon fonctionnement devrait refléter une intégrité cellulaire conservée. Techniquement, elles ont l'avantage de pouvoir être étudiées quantitativement en utilisant des traceurs radioactifs.

1.2.1.1.Le transport des acides biliaires.

Chaque hépatocyte présente deux surfaces sinusoïdales en contact avec deux espaces de Disse distincts. La surface d'échange au niveau sinusoïdal est augmentée par des replis de la membrane plasmique. L'espace de Disse s'invagine entre deux hépatocytes, se termine en une jonction serrée (tight junction) et délimite le canalicule biliaire (fig.4).

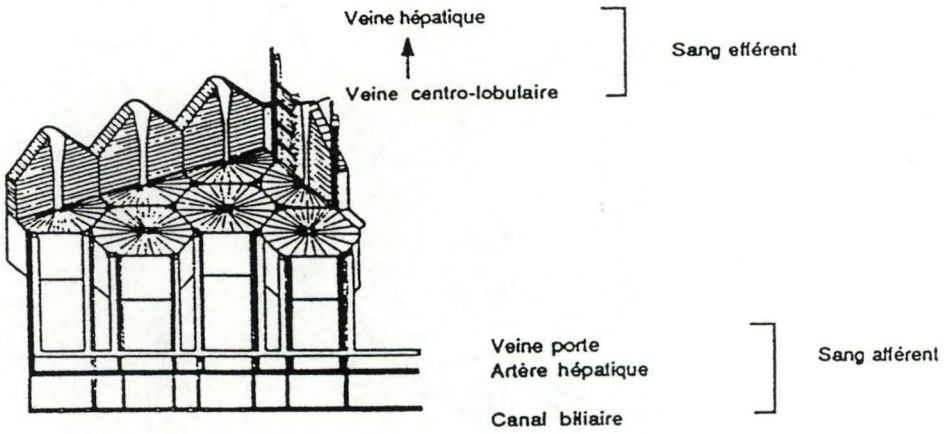


fig2a : irrigation des travées d'hépatocytes (redessinée d'après Wheater 1979 in: Coche 1988).

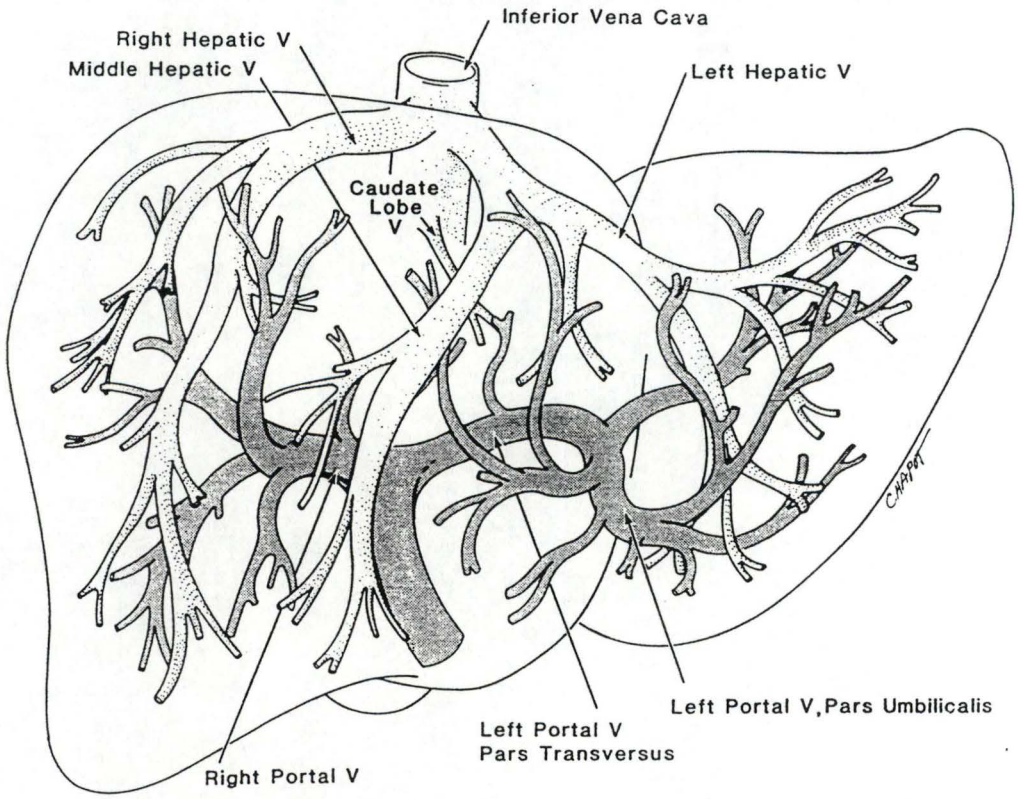


FIG. 2. Hepatic veins and intrahepatic portal vein.

fig2b : irrigation du foie, circuit veineux (Arias 1982).

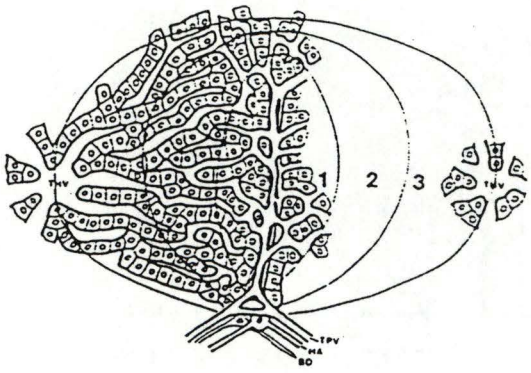


fig.3 : Zonation des hépatocytes dans le foie (Gumucio in: Arias 1982).

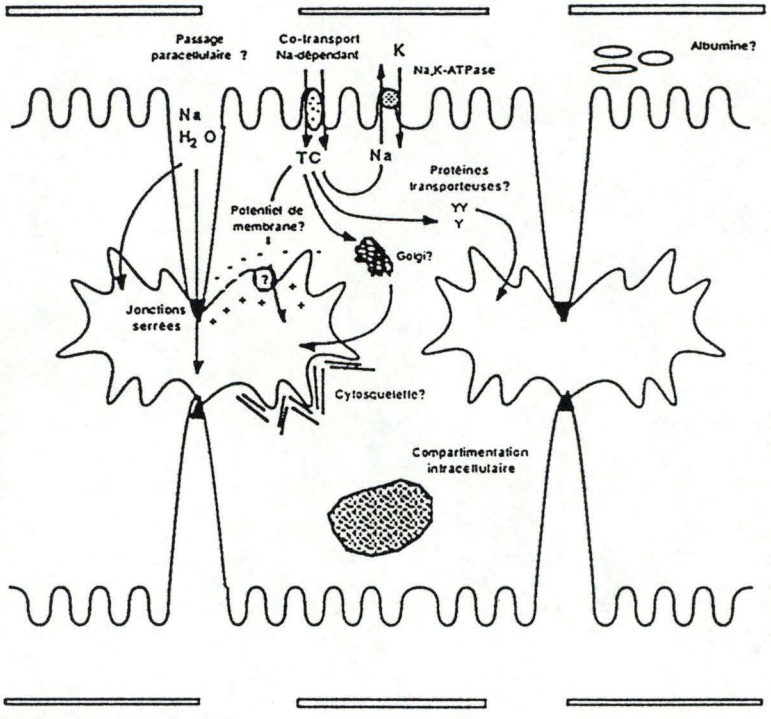


fig.4 : Schématisation d'une travée d'hépatocytes et des canaux biliaires (Coche 1988).

La bile est une secrétion exocrine, les proportions relatives de ses principaux solutés chez l'homme sont données à la figure 5. La bile contient des ions Na^+ et K^+ qui forment avec les différents acides biliaires les sels d'acides biliaires, des phospholipides (principalement la lécithine), du cholestérol non estérifié, des pigments biliaires et diverses protéines. Chez le rat, la composition est sensiblement différente.

Les acides biliaires sont les composés organiques majeurs de la bile, ils s'y trouvent sous forme dissociée car leur pKa est inférieur au pH de la bile (Kayser 1970). A titre d'exemple, le pKa du taurocholate est de 1.85 (Nair 1971) et le pH de la bile est compris entre 7.0 et 7.7. Le rôle des acides biliaires, grâce à leur nature amphiphile, est de solubiliser des molécules telles que le cholestérol, les vitamines liposolubles, la lécithine et les monoglycérides. La solubilisation de ces molécules permet leur excrétion biliaire ou leur résorption intestinale.

La synthèse d'acides biliaires est la seule voie métabolique permettant d'éliminer l'excès de cholestérol corporel. Les acides biliaires sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol dont ils conservent le noyau stéroïde (fig.6).

Les acides biliaires secrétés dans la bile sont réabsorbés dans la portion terminale de l'intestin et regagnent le foie par la veine porte. Le cycle porte le nom de cycle entérohépatique (fig.7). Le recyclage continuel des acides biliaires présente un double intérêt:

-Il permet de réduire la synthèse des acides biliaires

-la présence continuelle d'acides biliaires régularise le catabolisme du cholestérol. En effet, en présence d'un excès de cholestérol, la résorption de ce dernier est réduite et l'excès est éliminé par voie fécale. Il semblerait que la synthèse des acides biliaires et le catabolisme du cholestérol soient régulés en grande partie par la quantité de sels biliaires dans le sang portal (Coche 1988).

La quantité d'acides biliaires est maintenue constante dans la circulation entérohépatique grâce à une biosynthèse continue à partir du cholestérol. Environ 100 mmoles parcourent le cycle en 24 heures (Strange 1984). Si la biosynthèse s'arrête, le pool d'acides biliaires s'amenuise progressivement suite à une élimination fécale continue; le cholestérol ne peut plus être éliminé et les vitamines liposolubles ne sont plus absorbées.

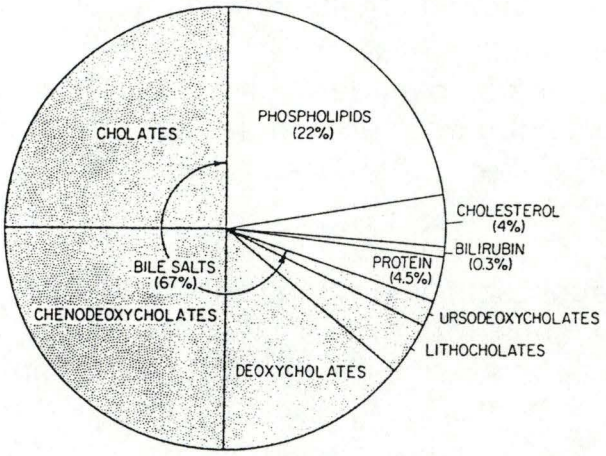


FIG. 1. Typical solute composition (weight percentage) of hepatic and gallbladder bile in healthy humans.

fig.5 : Proportions relatives des solutés majeurs de la bile (Arias 1982).

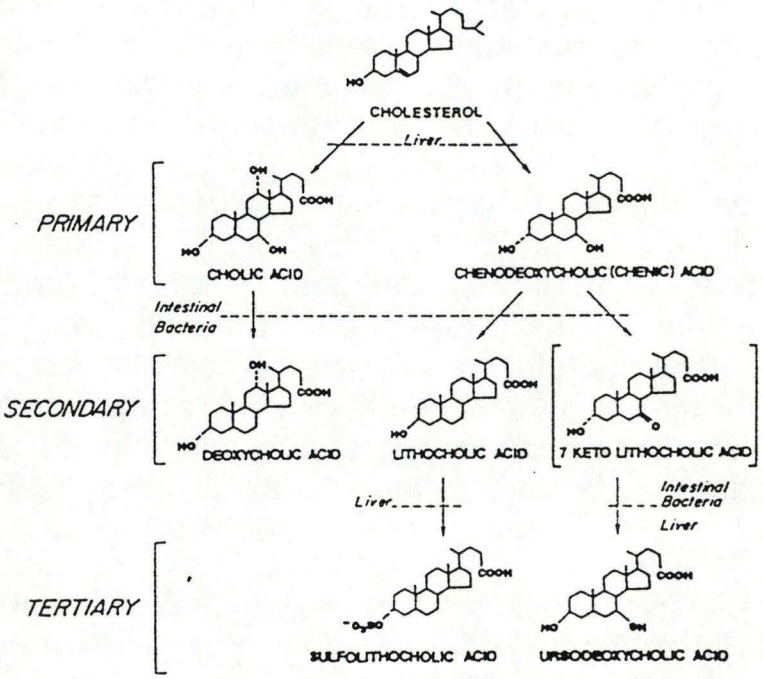


fig.6 : Synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol (Carey in: Arias 1982).

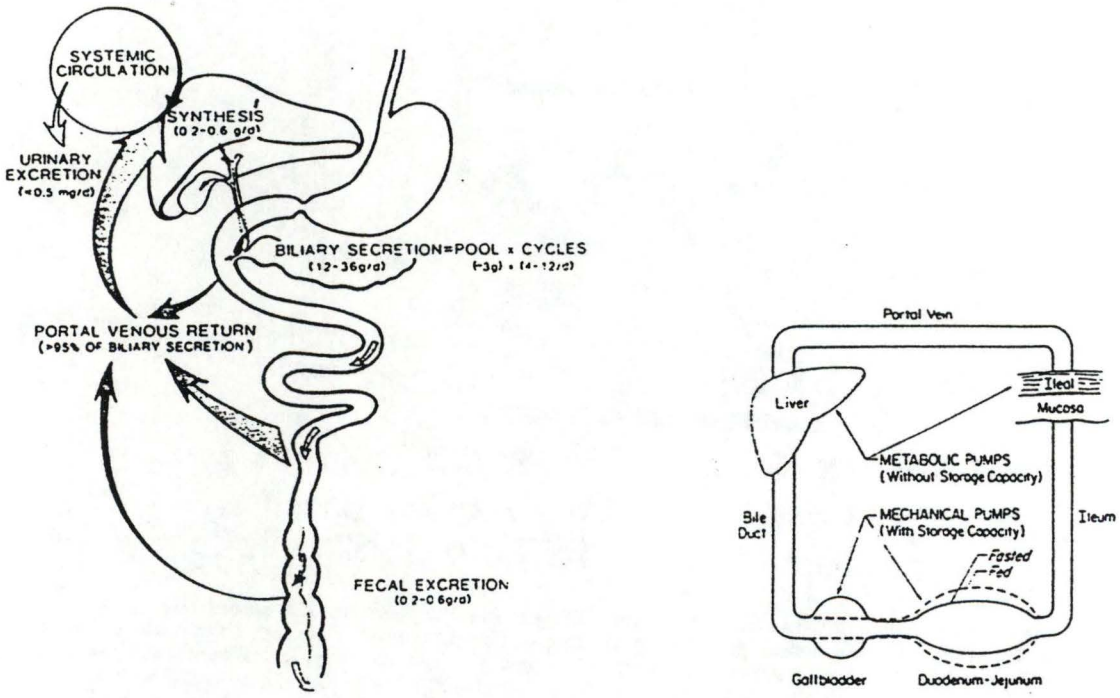
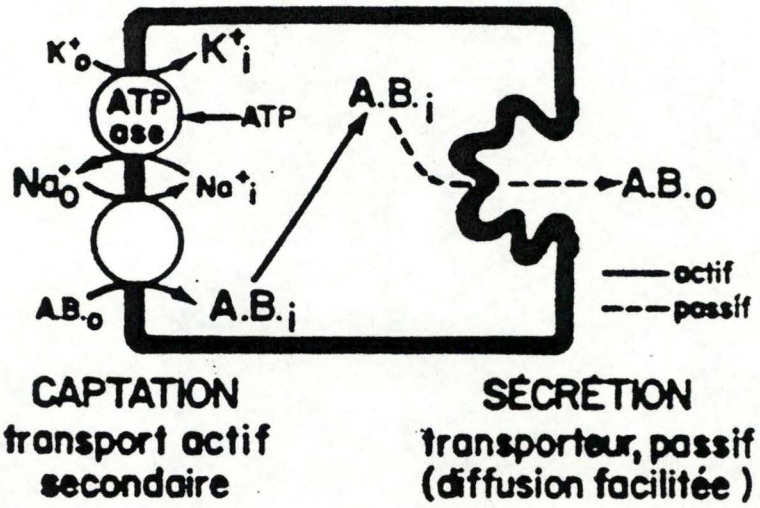


fig.7 : Schématisation du cycle entérohépatique
(Carey in: Arias 1982).



— Représentation hypothétique du transport des acides biliaires par l'hépatocyte. Les acides biliaires sanguins ($A.B._e$) sont captés par la membrane sinusoïdale grâce à un système de symport avec le sodium (Na^+_e) qui utilise le gradient de sodium établi par la Na^+, K^+-ATPase comme source d'énergie. Ce système, appelé transport actif secondaire, permet la concentration des acides biliaires à l'intérieur de la cellule ($A.B._i$) contre leur gradient électrochimique (flèche ascendante). Ils peuvent alors être sécrétés dans la bile le long de leur gradient électrochimique, probablement par un système de diffusion facilitée grâce à un transporteur de la membrane canaliculaire. On ne sait pas si ce système est purement passif (comme cela est représenté ici) ou s'il utilise une source supplémentaire d'énergie.

fig.8 : Représentation hypothétique du transport des acides biliaires par l'hépatocyte (Erlinger 1982).

Deux pompes, l'une hépatique, l'autre entérique permettent la recirculation des acides biliaires. La pompe hépatique est manifestement la plus importante puisqu'elle détermine le flux biliaire et par conséquent la vitesse de recirculation dans le système entérohépatique.

Le transport des acides biliaires par les hépatocytes peut être subdivisé en trois processus distincts : la captation sinusoïdale, le stockage intracellulaire et l'excrétion canaliculaire.

1°La captation.

L'utilisation d'indicateurs multiples (Glasinovic 1975, Arias 1982) a permis de montrer que la captation est saturable et de postuler qu'elle s'effectue par des transporteurs spécifiques.

La captation s'effectuerait par un mécanisme de co-transport avec du Na^+ (fig.8). L'énergie pour la captation des acides biliaires serait fournie par le gradient transmembranaire en Na^+ entretenu par la pompe sodico-potassique (des rats hyperthyroïdiens ou traités au phénobarbital présentent une activité Na^+-K^+ATPasique élevée et un flux biliaire plus élevé que des rats hypothyroïdiens (Layden 1976,Strange 1984)).

Certaines expériences suggèrent que les hépatocytes périportaux (fig.3 : zone1) transportent préférentiellement les acides biliaires (Layden 1978). Pour certains auteurs (Schwarz 1975), c'est la concentration en acides biliaires libre dans le plasma qui détermine la vitesse de captation; pour d'autres (Forker 1981), c'est la concentration en acides biliaires liés à l'albumine qui détermine la vitesse de captation via des récepteurs albuminiques situés dans la membrane.

Des substances qui interfèrent avec le cytosquelette modifient le transport du taurocholate ce qui suggère que les microfilaments pourraient intervenir dans le transport des acides biliaires.

Certaines expériences ont aussi mis en évidence une composante non saturable de l'entrée du taurocholate (Iga 1982, Anwer 1976, Scharschmidt 1981). Cette entrée Na^+-indépendante n'apparait qu'à des concentrations élevées en acides biliaires (>200µM pour le taurocholate) et est négligeable aux concentrations physiologiques. Il s'agit vraisemblablement d'une diffusion passive à travers la membrane. Cette composante du transport pourrait apparaître suite à l'endommagement de la membrane plasmique par l'action détersive des acides biliaires.

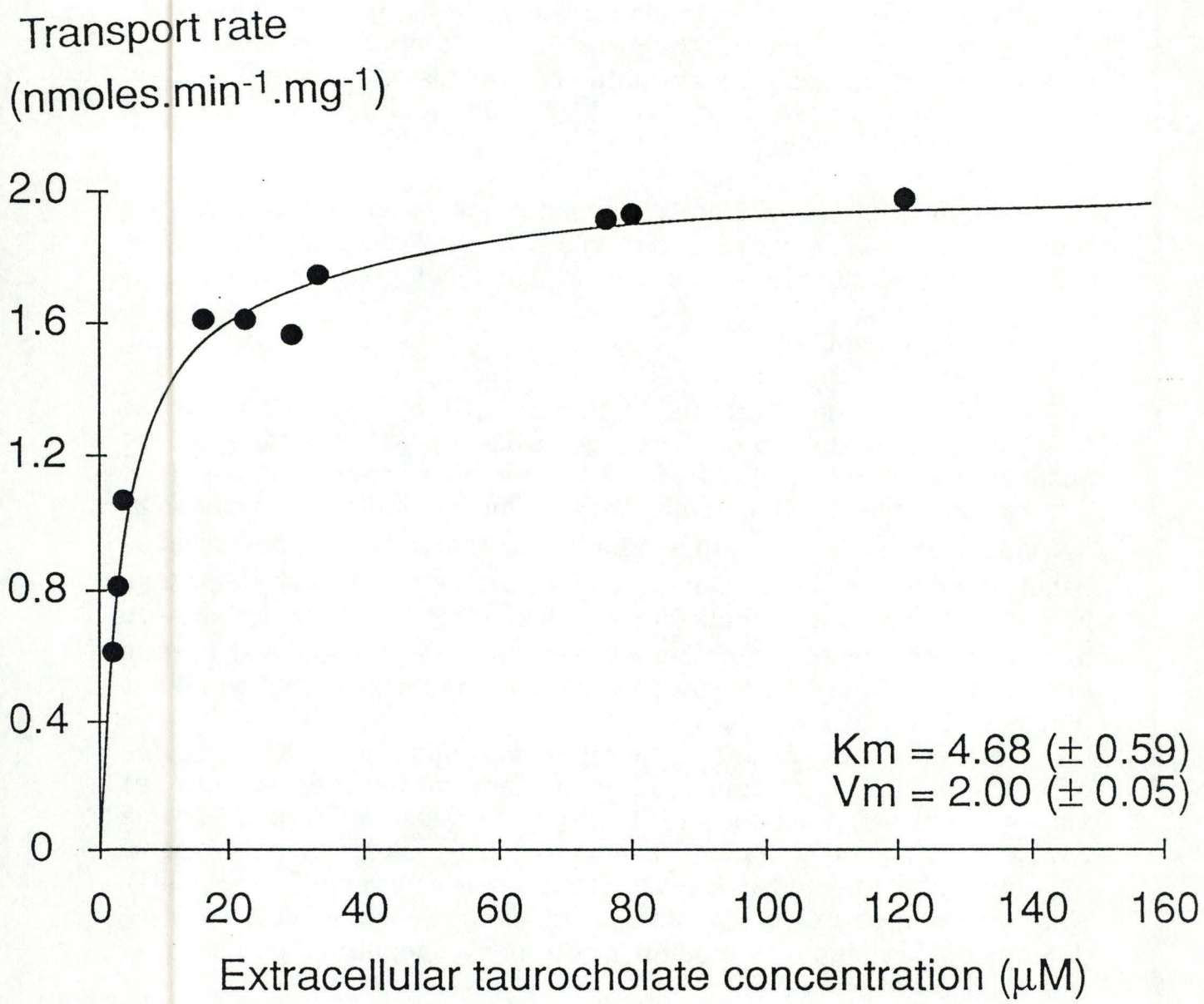


fig.9 : Vitesse d'incorporation du taurocholate par les hépatocytes en fonction de la concentration extracellulaire en taurocholate (Th.Coche 1988).

La variation de la vitesse initiale d'entrée du taurocholate dans les hépatocytes isolés en fonction de la concentration en taurocholate dans le milieu est décrite par une hyperbole de type Michaëlis-Menten (fig.9).

2°Le transport intracellulaire.

Les acides biliaires ont été dosés à partir d'homogénats de foie après séparation par chromatographie en phase gazeuse (Okishio 1966) : 70% des acides biliaires se situent dans la fraction cytosolique, les 30% restants sont répartis équitablement dans les fractions nucléaire, mitochondriale et microsomiale. Mais les acides biliaires étant diffusibles, il se pourrait qu'ils aient été redistribués dans les différentes fractions cellulaires lors du fractionnement (Coche 1988).

D'autres études basées sur l'affinité du taurocholate pour différents organites subcellulaires ont tenté de localiser le taurocholate à l'intérieur de la cellule. Simon (1984) met en évidence deux types d'interactions organites subcellulaires-taurocholate:

-des liaisons de faible affinité (responsable de la répartition non spécifique du taurocholate dans la couche lipidique des membranes subcellulaires)

-des liaisons de haute affinité observées dans le Golgi et les membranes plasmiques. Ainsi l'itinéraire intracellulaire comporterait la captation membranaire, l'incorporation dans des vésicules du SER, le passage par le Golgi et une exocytose canaliculaire.

Par ailleurs, des considérations physico-chimiques qui tiennent compte des propriétés de diffusion des acides biliaires en solution aqueuse et l'hypothèse d'une répartition non spécifique proposée par Strange (1979) indiquent que les acides biliaires pourraient traverser la cellule par simple diffusion. D'autres études supposent l'existence de protéines transporteuses intracellulaires sans qu'une participation éventuelle de ces protéines n'ait été démontrée de manière formelle.

3° Excrétion.

Une des études réalisée sur des hépatocytes isolés (Schwarz1976) indique que la vitesse initiale de sortie du taurocholate augmente avec la quantité intracellulaire de taurocholate. En effet, la sortie du taurocholate est inhibée au faibles concentrations intracellulaires et stimulée aux fortes concentrations internes. Cette baisse de sortie observée aux faibles concentrations est en accord avec les résultats de Tarao (1980,1982).

Cette observation est aussi en accord avec les études *in vivo* dans lesquelles on observe une diminution de 50 % de la vitesse d'excrétion des acides biliaires dans la bile (Gumucio 1971).

D'autre part, un second système de sortie du taurocholate (Na^+-dépendant) viendrait s'ajouter au mécanisme d'excrétion canaliculaire (probablement Na^+-indépendant). Si cette hypothèse est correcte, une augmentation de la concentration intracellulaire en Na^+ dans les cellules doit être accompagnée d'une augmentation de de la vitesse de sortie du taurocholate. Coche (1988) a montré que des rats prétraités à l'éthinyloestradiol (inhibition de la Na^+-K^+ ATPase) présentent une augmentation de la vitesse de sortie du taurocholate et un accroissement de la concentration intracellulaire en Na^+. L'hypothèse d'une sortie Na^+-dépendante est donc renforcée par ce résultat.

1.2.1.2. La synthèse protéique.

Une des fonctions des hépatocytes est la synthèse et la sécrétion de protéines plasmatiques. Il faut distinguer deux étapes importantes dans le processus de synthèse protéique : d'une part l'incorporation d'acides aminés par la cellule et d'autre part la synthèse protéique proprement dite au niveau des ribosomes.

1°L'incorporation d'acides aminés.

Les cinétiques de transport et les études de compétition entre les différents acides aminés pour l'entrée dans la cellule indiquent qu'il existe au moins cinq systèmes de transport différents, chacun ne pouvant transporter qu'un petit nombre d'acides aminés (Lehninger 1984). Ces systèmes sont spécifiques pour:

-les acides aminés neutres de petite taille(dont la leucine),
-les acides aminés neutres de grande taille,
-les acides aminés basiques,
-les acides aminés acides,
-les iminoacides.

Cette classification est remaniée par Handlogten (1982) qui propose trois systèmes pour le transport des acides aminés :

-Un transport Na^+-dépendant : système GLY(glycine) et ASC (alanine, sérine, cystéine),

-Un transport Na^+-indépendant : système L(leucine, valine) et BCH (acides aminés neutres),

-Un transport pour les acides aminés aromatiques : système T (tyrosine, tryptophane).

Le transport de la leucine par l'hépatocyte est bien décrit dans la littérature. De plus, il donne des éclaircissements sur l'incorporation des acides aminés en général.

Le transport de la leucine est caractérisé par deux composantes d'affinité différentes (Weissbach 1982) : le système L1 dont la valeur de la constante d'affinité (Km) est de l'ordre de 44 µM et le système L2 dont le Km est de 8 µM.

Différentes observations (Takadera 1983, Handlogten 1982) laissent supposer que le transport de la leucine dans la cellule est la résultante de deux systèmes Na^+-indépendants et d'un système faiblement Na^+-dépendant.

De plus, le transport de la leucine est dépendant d'un gradient de potentiel électrochimique du proton qui peut servir de force motrice pour le transport de la leucine à travers la membrane cellulaire (Morhi 1983).

2° Le métabolisme des acides aminés.

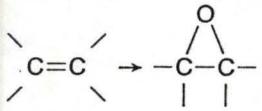
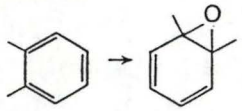
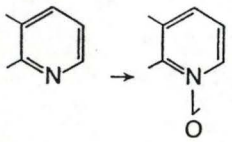
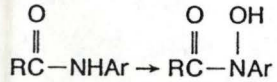
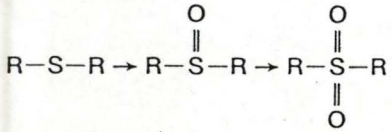
Le métabolisme des acides aminés par les hépatocytes isolés est défini par Crane (1977) : les cellules du foie épuisent le milieu d'une large fraction d'acides aminés initialement disponibles pendant 24 heures d'incubation. La leucine, l'isoleucine et la valine font exception à ce schéma général et leurs concentrations augmentent dans le milieu tout au long de l'incubation. Ce comportement indique que les protéines sont dégradées plus vite qu'elles ne sont synthétisées. Cependant, l'existence d'une dégradation protéique importante par les cellules du foie au cours d'une incubation de 20 heures masque le catabolisme lent de la leucine (Crane 1977).

D'autre part, le processus d'augmentation de la concentration en leucine, isoleucine et valine dans le milieu d'incubation serait le reflet d'une excrétion protéique simultanée à la synthèse (Crane 1977) .En effet, les hépatocytes continuent à secréter des protéines de manière linéaire pendant une incubation de 20 heures, bien qu'ils catabolisent 10 à 15% de leurs propres protéines tout au long de cette période.

table 1 : liste des enzymes intervenants lors de la biotransformation hépatique (Arias 1982).

Ref.	Enzyme	Reaction
4,8	UDP-glucuronyltransferase	Glucuronide formation at O, S, N, and C
26	Alcohol sulfotransferase	Sulfate transfer to 1° and 2° alcohols including steroids
30	Amine O-sulfotransferase	Formation of sulfamates with 1° and 2° amines
20,21	Phenol sulfotransferase	Sulfation of phenols and hydroxylamines
32,33	Glutathione transferase	Thiolate attack on susceptible electrophilic atoms
54	Phenol *O*-methyltransferase	Formation of methoxides with phenols
56	Catechol *O*-methyltransferase	Formation of methoxide with catechols
61,62	Amine *N*-methyltransferase	Methylation of 1°, 2°, and 3° amines
107	Histamine *N*-methyltransferase	Methylation of imidazoles
51	Thiol *S*-methyltransferase	Methylation of S of thiols and H_2S
83,84	Benzoyl-CoA glycine acyltransferase	Peptide bond formation with glycine
83,84	Salicylate-CoA glutamate acyltransferase	Peptide bond formation with glutamate
71,75	Acetyltransacetylase	Acetylation of amines, hydrazines, and hydroxymates
34	Cysteine *S*-conjugate *N*-Acetyltransferase	Acetylation of premercapturic acid
47	Cysteine conjugate β-lyase	β-Cleavage forming a mercaptan
108	Thioltransferase	Disulfide interchange
109	Rhodanese	Thiosulfate reaction with cyanide

table 2 : oxydation de différents groupements chimiques par le cytochrome P_{450} (Arias 1982).

Type and reaction	Examples
Alkanes	
$RCH_2CH_3 \rightarrow RCH_2CH_2OH$	Hexane Decane Hexadecane
Alkenes	
	Vinyl chloride Aflotoxin-B_1 Dieldrin
Aromatic hydrocarbons	
	Naphthylene Bromobenzene Benzo(a)pyrene Biphenyl
Aliphatic amines	
$R_1NHCH_2R_2 \rightarrow R_1NH_2 + R_2CHO$	Aminopyrene Benzphetamine Ethylmorphine
Heterocyclic amines	
	3-Acetylpyridine 4,4′-Bipyridil Quinoline
Amides	
	*N*-Acetylaminofluorene Urethane
Ethers	
$R_1-O-CH_2R_2 \rightarrow R_1OH + R_2CHO$	Indomethacin Phenacetin *p*-Nitroanisole
Sulfides	
	Chlorpromazine Promazine Thioanisole

1.2.1.3. Autres critères caractérisant l'hépatocyte.

Outre l'incorporation du taurocholate et la synthèse de protéines plasmatiques qui sont des voies métaboliques caractéristiques de l'hépatocyte, il est un autre processus vital assuré par la cellule hépatique : la biotransformation. D'autres fonctions métaboliques non spécifiques de la cellule hépatique peuvent également la caractériser : ce sont le métabolisme des lipides, le catabolisme du glucose, la gluconéogenèse et la synthèse de RNA.

La biotransformation rend les substances liposolubles plus hydrophiles et par conséquent plus facilement éliminables par les urines. Cette augmentation de l'hydrosolubilité est réalisée par des réactions de conjugaison entre la substance à éliminer et l'acide glucuronique (glucuronoconjugaison) ou le 3'phosphosulfate-5'phosphate (sulfoconjugaison) ou par l'action directe d'enzymes tels que le cytochrome P_{450} ou la déhalogénase (tables 1 et 2).

Le métabolisme des lipides intervient dans les fonctions biologiques de stockage et de communication cellulaire.
Les phospholipides sont les principaux composants membranaires et participent à la formation de l'acide arachidonique, le précurseur des leucotriènes et des prostaglandines qui sont des médiateurs cellulaires.

Le catabolisme du glucose est la première source d'énergie de la cellule. Par glycolyse ou par respiration l'hexose est dégradé respectivement en lactate ou en $CO_2 + H_2O$. Le catabolisme du glucose permet à la cellule de stocker de l'énergie (nécessaire à l'anabolisme) sous forme d'ATP.

La gluconéogenèse est un procédé anabolique qui permet à la cellule de resynthétiser du glucose à partir du lactate ou à partir d'un intermédiaire du cycle de Krebs tel que le malate.

La synthèse de RNA se situe essentiellement dans le noyau elle est un indicateur de l'activité métabolique de la cellule.

1.2.2. Critères de viabilité de la suspension d'hépatocytes isolés.

Trois types de critères de viabilité peuvent être testés : les uns estiment l'intégrité membranaire, les autres le métabolisme cellulaire et les derniers donnent des renseignements sur la morphologie et l'ultrastructure de la cellule.

1.2.2.1.Intégrité membranaire.

L'intégrité membranaire est une condition nécessaire au bon fonctionnement de la cellule car la membrane est le lieu de transports passifs (diffusion à travers la membrane, filtration par des pores menbranaires, diffusion facilitée) et actifs (transporteurs spécifiques, pinocytose). Ces différents types de transport permettent l'homéostasie cellulaire, car en évacuant les déchêts hors de la cellule et en absorbant les nutriments nécessaires (glucose et acides aminés) la cellule se maintient en état de fonctionnement. Par conséquent, toute altération de la membrane s'avère dommageable, voire même létale pour la cellule.

Ces altérations sont décelées par les tests suivants :

1°Exclusion d'un colorant vital

La membrane des hépatocytes est, en conditions normales, imperméables aux colorant vitaux. Lorsque ceux-ci passent librement dans la cellule, cela indiquent d'importantes lésions membranaires et donc fonctionnelles. Les cellules ne pouvant pas exclure un colorant vital (bleu de trypan, érythrosine) sont dénombrées au microscope optique, ce qui permet d'établir un pourcentage de cellules viables dans la population. Cette méthode bien que rapide et offrant des résultats immédiats ne permet de déceler que les dégâts membranaires graves et irréversibles (Baur 1975).

2°Rétention d'enzymes cytoplasmiques.

La membrane plasmique est imperméable aux enzymes cytoplasmiques. En conséquence, seule une cellule dont la membrane est altérée laisse passer ses enzymes vers le milieu extracellulaire. En déterminant le rapport entre l'activité enzymatique dans le cytoplasme et l'activité enzymatique totale, on peut suivre la libération par la cellule de certains enzymes au cours du temps (Bergmeyer et Brent 1970).

Les enzymes fréquemment dosés sont la lactate deshydrogénase(LDH), l'aspartate deshydrogénase et la NADPH cytochrome C réductase.

Cette méthode n'est pas aussi rapide que le test d'exclusion du colorant vital, mais peut renseigner de manière plus précise sur la viabilité d'une population cellulaire.

3°Détermination du potentiel de membrane.

Le potentiel membranaire est évalué en mesurant la distribution passive des ions Cl^- de part et d'autre de la membrane. Il est est mesuré comme suit :

$$E_m = E_{Cl} = \frac{R\,T}{F} \ln \frac{[Cl^-]_{in}}{[Cl^-]_{ex}}$$

R = constante des gaz parfaits = 0.0821 l atm $°K^{-1}$ $mole^{-1}$
T = température en °K
F = constante de Faraday
$[Cl^-]$ in = concentration intracellulaire en Cl^-
$[Cl^-]$ex = concentration extracellulaire en Cl^-

Le potentiel de membrane est de 36 mVolts pour des hépatocytes intacts (Baur 1975). Le critère de viabilité est sensible mais la méthode,utilisant le $^{36}Cl^-$, est longue et ne peut être utilisée en routine.

4°La concentration en Na^+et K^+ intracellulaire.

Rappelons qu'il existe un gradient en Na^+ et en K^+ entre la cellule et le milieu extracellulaire. Ce gradient est maintenu par la pompe sodico-potassique qui est logée dans la membrane plasmique. Toute altération membranaire modifie l'environnement de l'enzyme et par conséquent son activité. Le test de viabilité se base sur la concentration intracellulaire en Na^+ et en K^+. La spectrophotométrie de flamme permet la mesure des concentrations ioniques. Un hépatocyte intact contient environ 47.3 mM de Na^+ et 117.7 mM de K^+ (Baur 1975).

Alors que les trois premiers critères cités (exclusion d'un colorant vital, rétention d'enzymes cytoplasmiques et détermination du potentiel membranaire) estiment exclusivement l'intégrité membranaire, le 4ème critère donne en plus une idée de l'activité de la pompe sodico-potassique.

Le critère de viabilité est sensible (Baur 1975) mais les valeurs de viabilité ne sont pas disponibles aussi rapidement que lors du test d'exclusion du colorant vital.

5°La respiration endogène.

La respiration endogène peut être stimulée par des intermédiaires du cycle de Krebs. Des cellules endommagées au niveau de la membrane sont perméables à ces intermédiaires (succinate, malate) et leur respiration endogène peut donc être stimulée contrairement aux cellules intactes.

Mesuré par oxypolarimétrie, le taux de respiration endogène est un critère imprécis car il n'est pas uniquement fonction du taux de viabilité. De plus, le taux de respiration endogène est très faible par rapport à celui d'une fraction mitochondriale. La validité du test de respiration endogène a été remis en cause par Pfaff (1980).

Une modification de cette technique est suggérée par Mapes et Harris (1975) pour déterminer la viabilité d'hépatocytes isolés.

Une suspension d'hépatocytes est incubée en présence de digitonine (un détergent qui perméabilise les membranes). En conséquence, l'enzyme qui catalyse la conversion du succinate en malate est libéré dans le milieu et peut réagir avec son substrat. Le taux de conversion du succinate en malate pour une suspension d'hépatocytes dont les membranes sont intactes est plus faible que celui obtenu pour les cellules traitées à la digitonine.

1.2.2.2.Critères d'intégrité métabolique.

Si les tests d'intégrité membranaire indiquent que les membranes plasmiques sont intactes, cela ne signifie pas que les cellules sont fonctionnelles. En effet, des hépatocytes chauffés à 60°C durant trois minutes montrent encore 80% d'exclusion du colorant vital alors qu'ils ne sont plus métaboliquement fonctionnels (Tennant 1964). Ceci montre que des hépatocytes intacts d'un point de vue membranaire peuvent être fortement endommagés au niveau du métabolisme.

Pour le déceler,certains tests se basent sur le métabolisme spécifique des cellules hépatiques comme le transport du taurocholate, la synthèse de protéines plasmatiques ou la biotransformation de substances liposolubles. D'autres tests font appel au métabolisme basal de la cellule : respiration endogène, gluconéogenèse et synthèse de glycogène.

1°Transport du taurocholate à l'état stationnaire.

La modélisation compartimentale du transport du taurocholate à l'état stationnaire et l'emploi de traçeurs radioactifs (non catabolisés par la cellule) permettent de déterminer la vitesse maximale d'incorporation de l'acide biliaire (Vmax) et l'affinité des transporteurs spécifiques du taurocholate (Km). Ces deux paramètres cinétiques sont des indicateurs de l'intégrité métabolique de la cellule car le transport du taurocholate à l'état stationnaire implique la mise en oeuvre de plusieurs fonctions cellulaires (§1.2.1.1.).

Les altérations au niveau des transporteurs membranaires se répercutent sur les valeurs de Km (affinité modifiée) et/ou de Vmax (nombre de transporteurs modifiés).

2°La synthèse protéique.

L'emploi de traçeurs radioactifs tels que la (^{3}H)-leucine permet de déterminer le taux de synthèse protéique des hépatocytes lors d'une incubation en présence d'un pool extracellulaire d'acides aminés.

Le taux de synthèse protéique donne une évaluation de l'intégrité métabolique de la cellule car il dépend du bon fonctionnement de divers organites subcellulaires : mitochondries, RER, noyau et membrane plasmique.

3°La biodégradation.

Comme il a été expliqué précédemment (§1.2.1.3.) la biodégradation peut être réalisée par des réactions de conjugaison entre la substance à éliminer et l'acide glucuronique. Le taux de glucuronoconjugaison avec la bilirubine est déterminé pour les hépatocytes fraîchement isolés (Fuller 1982), il est d'environ 6,5 nmoles de bilirubine conjuguée en trois heures par 10^{6} hépatocytes. La quantité de bilirubine conjuguée est mesurée,après extraction dans un mélange chloroforme/méthanol (Bissel 1978) et après chromatographie, par une réaction colorimétrique.

4°La synthèse de glycogène.

La synthèse de glycogène permet à la cellule de stocker des molécules de glucose sans que la pression osmotique intracellulaire augmente.

Après un repas contenant des hydrates de carbone,le foie peut stocker une quantité de glycogène équivalente à 7% de son poids. Mais cela ne représente pas la quantité maximale stockée par l'hépatocyte qui s'élève à 10% du poids de la cellule voire même 17% en cas de pathologie (glycogen storage disease typeI) (Arias 1982).

5°Autres.

Citons, par exemple, d'autres critères de viabilité peu employés: la perméabilité membranaire estimée par fluorimétrie, l'activité de la glucose-6-phosphatase mise en évidence par cytochimie, la teneur en adénylates (ATP, ADP, AMP) et le rapport ATP/ADP.

1.2.2.3. Examen morphologique.

L'examen morphologique des hépatocytes est complémentaire aux critères d'intégrité membranaire et métabolique. Il peut confirmer différentes observations telles qu'un découplage de la phosphorylation-oxydation dans les mitochondries qui se manifeste par des mitochondries gonflées (Trump 1965).

Une variété de techniques basées sur la microscopie a permis d'examiner la suspension d'hépatocytes isolés :

-La microscopie optique à fond clair ou à fond noir permet d'apprécier des critères morphologiques simples tels qu'un noyau sphérique et l'absence de déformations membranaires.
-En microscopie à contraste de phase, les cellules mortes apparaissent plus faiblement contrastées que les cellules vivantes.
-L'observation en microscopie électronique à transmission (TEM) donne des renseignements très utiles quant à l'altération ultrastructurelle d'organites subcellulaires.
-La microscopie électronique à balayage renseigne sur l'aspect extérieur des cellules et donne une bonne visualisation des microvillosités et des défauts membranaires. Bien que la préparation des coupes pour la microscopie à balayage soit moins fastidieuse que pour la TEM, peu d'informations vitales sont fournies par les micrographies électroniques à balayage.

1.3. LA CRYOPRESERVATION.

La cryopréservation des hépatocytes est envisagée pour conserver les cellules à long terme tout en respectant leur intégrité membranaire et métabolique. En effet, même maintenus à 0°C les hépatocytes ne s'avèrent viables que durant 3 à 4 heures, ce qui limite fortement le nombre d'expérimentations au départ d'une même suspension.

Une cryopréservation permettant d'obtenir des suspensions d'hépatocytes viables en proportion élevée pourrait permettre la constitution de banques d'hépatocytes.

1.3.1.La cryopréservation en milieu solide.

Le principe de la cryopréservation en milieu solide est simple, mais son application soulève beaucoup de problèmes.

L'activité métabolique des hépatocytes est très élevée à 37°C et un stockage à cette température mène rapidement à la mortalité cellulaire par épuisement des réserves du milieu et par accumulation de déchêts toxiques.

A 0°C, les cellules présentent une activité métabolique ralentie. Le stockage à 0°C est d'ailleurs fréquemment utilisé avant l'emploi d'hépatocytes.

Il est donc raisonnable de penser que le stockage des hépatocytes à plus long terme pourrait s'effectuer à des températures encore plus faibles. Cependant, la cristallisation du milieu et l'augmentation de la concentration en solutés contribuent à blesser la cellule lors de la congélation.

1.3.1.1.La cristallisation du milieu extracellulaire.

L'intégrité de la cellule ne peut être maintenue que moyennant l'égalité des potentiels chimiques du milieu extra- et intracellulaire.

Lorsque la température de la suspension cellulaire atteint -5°C, il apparaît une phase solide dans le milieu extracellulaire. Les cristaux de glace n'acceptent aucune autre molécule que l'eau et la phase liquide extracellulaire présente dès lors une surconcentration en sels. D'autre part le cytoplasme reste en surfusion. Mazur (1969) explique cet état de surfusion par l'imperméabilité de la membrane vis à vis des petits cristaux de glace qui pourraient provoquer une cristallisation en pénétrant dans la cellule. Il en résulte un appel d'eau du cytoplasme vers le milieu extracellulaire, provoqué par la différence des pressions osmotiques entre les deux phases liquides.

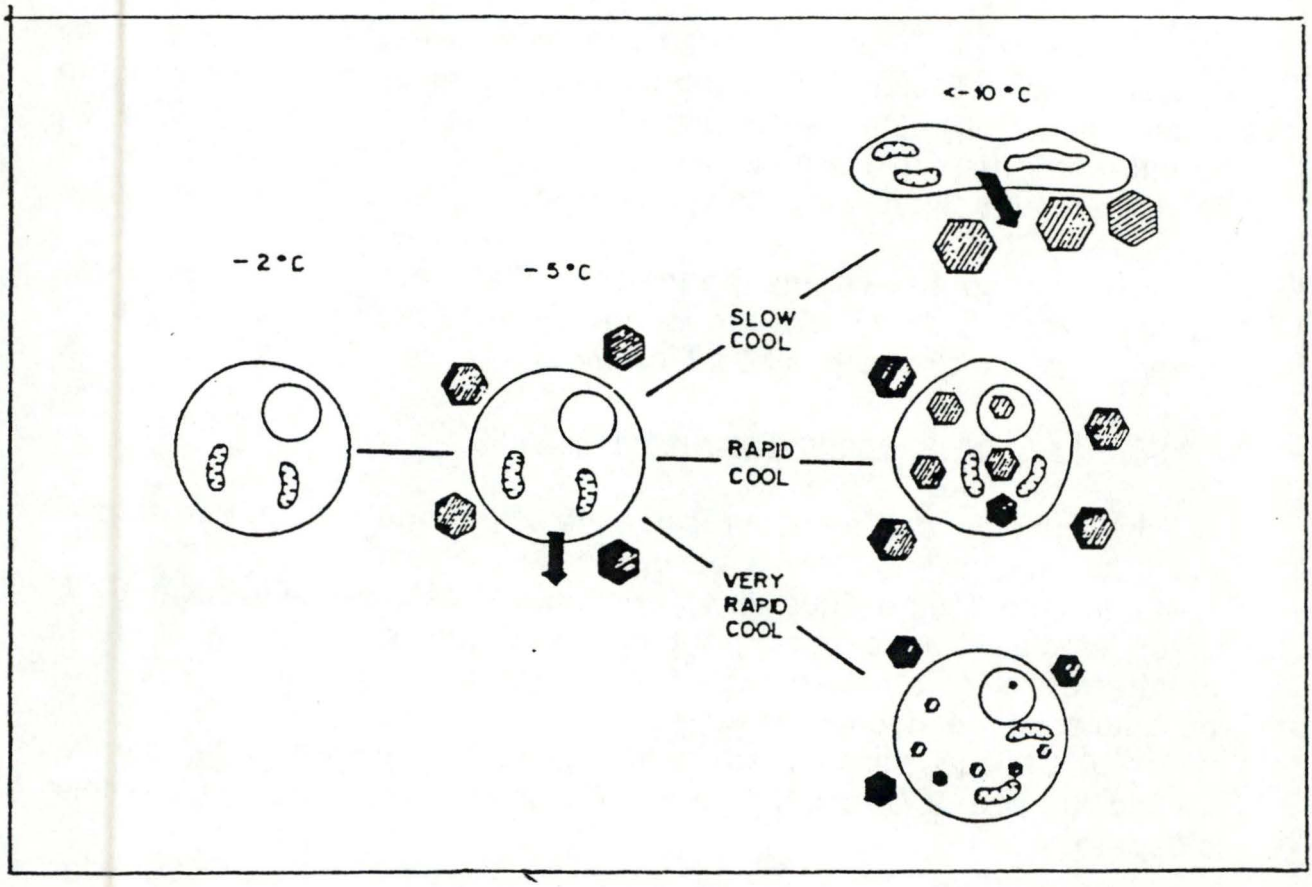


fig.10 : Schématisation des différents états cellulaires en fonction de la vitesse de refroidissement au delà de -5°C (Mazur 1984).

Au dessous de -5°C, les cellules réagissent différemment en fonction de la vitesse de refroidissement (fig10).

Un refroidissement lent provoque une déshydratation cellulaire. Les cristaux de glace extracellulaires incluent de plus en plus de molécules d'eau et la phase liquide extracellulaire devient par conséquent de plus en plus concentrée. La cellule perd son eau pour combler la différence des concentrations en sels entre les deux phases liquides. Les milieux extra- et intracellulaire restent à des concentrations impliquant l'égalité des potentiels chimiques.

Un refroidissement plus rapide ne permet pas à la cellule de libérer suffisamment d'eau pour maintenir l'équilibre des potentiels chimiques, le milieu intracellulaire atteint la température de cristallisation.

Un refroidissement très rapide mènera plutôt à un état vitrifié qui abrite cependant de petits cristaux de glace.

La formation de cristaux de glace intracellulaires est toujours dommageable pour la cellule car elle provoque une déchirure des membranes (Storey 1989). Les cristaux de glace détruisent également les différents compartiments qui jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement de la cellule. Ces lésions peuvent encore être aggravées par la recristallisation qui fait que des petits cristaux de glace, instables thermodynamiquement, se regroupent pour en former de plus grands lors du réchauffement.

1.3.1.2. Augmentation de la concentration en solutés.

Selon Locksley (1978), un accroissement de la concentration en solutés est toxique pour la cellule.
Pour d'autres(Greiff 1971, Santarius 1970, Sherman 1976), les altérations cellulaires sont dues à la combinaison d'une forte concentration saline et de basses températures.

1.3.1.3.Les cryoprotecteurs.

Les agents cryoprotecteurs (CryoProtective Agent ou CPA) ont pour rôle de diminuer le point de congélation et de déplacer les surconcentrations en solutés vers des températures plus basses où les dégats cellulaires sont plus lents à se manifester (Locksley 1978).

Les CPA sont classés en deux catégories : la première regroupe les CPA qui pénètrent à l'intérieur de la cellule (diméthylsulfoxyde ou DMSO) et le deuxième regroupe les CPA qui ne pénètrent pas dans la cellule (hydroxyethyl Starch ou HES, polyéthylène glycol ou PEG). En fonction de leur capacité à traverser la membrane plasmique, le mode d'action des CPA est différent mais le résultat final est toujours une réduction du point de congélation et une diminution de la toxicité des solutés.

Les agents qui pénètrent dans la cellule réduisent la quantité de glace formée dans les compartiments intra- et extracellulaire, ce qui empêche une trop forte augmentation de la concentration saline. La différence de pression osmotique entre les deux compartiments provoque une perte d'eau cellulaire à des températures suffisamment basses pour que les dégâts cellulaires soient moins marqués.

Les CPA qui ne pénètrent pas dans la cellule induisent une différence de pression osmotique provoquant une perte d'eau cellulaire. Cette perte d'eau s'effectue au moment où la concentration en solutés est encore faible car la quantité de cristaux de glace dans le milieu extracellulaire est encore faible. A l'extérieur, la concentration ionique toxique n'est donc atteinte qu'à des températures très basses (températures où la cellule est moins sensible à la surconcentration en solutés). Cependant la toxicité des solutés à l'intérieur de la cellule n'est pas réduite.

L'emploi de CPA nécessite une phase d'équilibration durant laquelle l'agent cryoprotecteur se répartit dans les milieux extra- (et intra) cellulaire (suivant sa capacité a traverser la membrane plasmique). Cette phase d'équilibration se réalise à des températures comprises entre +37 et -5°C, après quoi la température est diminuée pour atteindre la température de stockage.
Le glycérol est un CPA particulier en ce sens qu'il pénètre dans la cellule si la température d'équilibration est supérieure à 20°C. Par contre si la température d'équilibration est voisine de 0°C, le glycérol fonctionne comme un CPA non pénétrant.

1°)Les CPA synthétiques.

Barnett(1978) a comparé la toxicité du DMSO (CPA synthétique) et celle du glycérol(CPA naturel). Cette toxicité a été déterminée par l'inhibition de la Na^+-K^+ATPase et les effets sur la membrane plasmique.

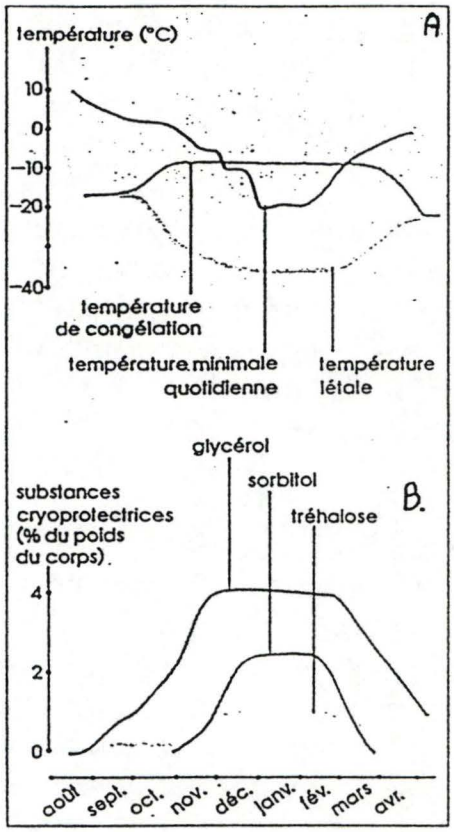


fig.11 : Abaissement de la température de congélation des liquides physiologiques de la larve du cynips (*Eurosta solidaginis*) (A) suite à la synthèse de substances cryoprotectrices naturelles (B) (Storey 1989).

Les résultats obtenus indiquent que le DMSO et le glycérol, inhibent plus fortement la pompe sodico-potassique à 37°C qu'à 0°C. Mais une concentration en DMSO de 20% (w/v) donne le même pourcentage d'inhibition enzymatique qu'une concentration en glycérol de 40% (w/v). Le DMSO est donc plus toxique à ce point de vue.

Le mécanisme d'inhibition est peu connu. Barnett (1978) suggère que le DMSO et le glycérol changent la structure des lipides membranaires tout comme le font un certains nombre d'alcools, puissants inhibiteurs de la Na^+-K^+ATPase. L'environnement lipidique de l'enzyme est donc modifié et ce dernier est inactivé.

L'action des CPA synthétiques sur la membrane plasmique est confirmée par l'utilisation du PEG non seulement comme cryoprotecteur mais aussi comme agent fusogénique pour la fusion cellulaire (Prisler 1976).

2°)les CPA naturels.

Les cryoprotecteurs naturels sont présents chez certaines espèces animales qui peuvent passer l'hiver à l'état congelé. Afin de déplacer la formation de cristaux de glace et l'effet toxique des solutés aux températures plus négatives, elles synthétisent des substances (fig.11) qui abaissent la température de congélation des liquides physiologiques (glycérol, sorbitol, glucose) ou stabilisent la membrane plasmique (tréhalose, proline) (Storey 1989). Ces espèces tolérant le gel sont : *Eurosta solidaginis* (la larve du cynips), *Rana sylvatica* (la grenouille des bois), *Chrysemis picta* (la tortue peinte) et certains insectes de l'ordre des Hyménoptères, Diptères et Coléoptères.

Les mécanismes d'action des cryoprotecteurs naturels n'ont pas encore été élucidés complètement.Toutefois :

-le tréhalose éviterait la formation d'une phase "gel" de la membrane (Rudolph & Crowe 1985). Storey (1988) affirme que des liaisons hydrogènes entre les parties polaires des lipides et le tréhalose assurent un étalement des lipides et une stabilisation de la membrane.

-La proline est une molécule amphiphile de faible poids moléculaire. Elle interagirait avec les parties hydrophobes des macromolécules biologiques en les stabilisant dans une solution aqueuse (Schobert 1978). L'augmentation de la solubilité de molécules faiblement solubles dans l'eau, en présence de proline, confirme cette hypothèse (Rudolph & Crowe 1985).

FIG. 1

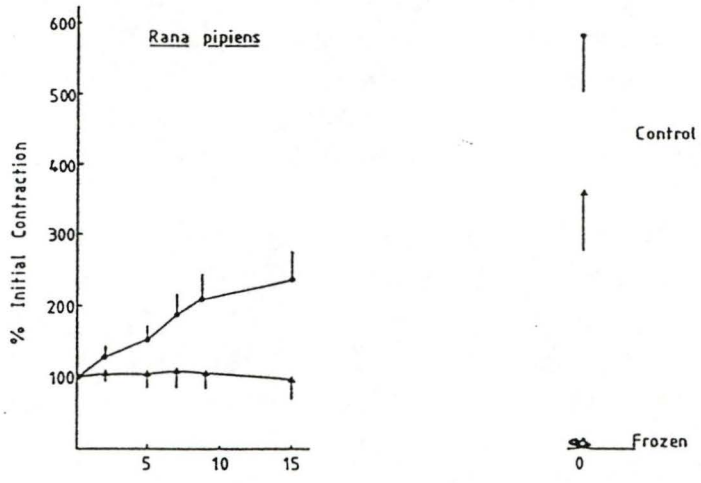


FIG. 2

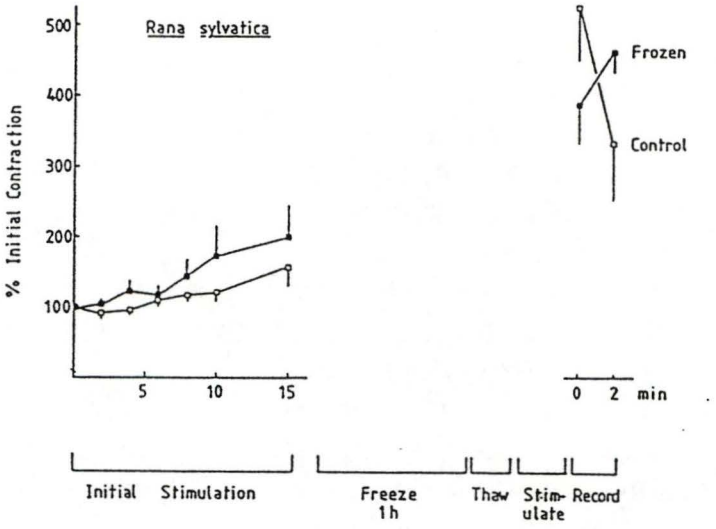


FIG.(A) Force development in Rana pipiens ventricle strips and the effect of freezing in the absence (o,•) or presence (▵,▲) of 250 mM glycerol. Stimulation, freezing and thawing are as in Materials and Methods. Data are means ± s.d., n = 10 strips before freezing, n = 5 each for control and experimental after freezing.

FIG.(B) Force development in Rana sylvatica ventricle strips and effect of freezing in the presence of 250 mM glucose. Data are means ± s.d., n = 5 pairs of strips, control (▫) versus freezing exposed (▪).

fig.12 A: Effet d'une cryopréservation en présence de glycérol sur la contraction du ventricule de *Rana pipiens*

B : Effet d'une cryopréservation en présence de glucose sur la contraction du ventricule de *Rana sylvatica* (Canty 1986).

-Le glycérol préserve la structure protéique en stabilisant l'enveloppe hydratante qui entoure les macromolécules (Storey 1988).

-Le glucose joue un rôle surprenant car il doit, pour agir, être présent en concentration élevée. Or des variations du taux de glucose dans les liquides physiologiques sont strictement limitées chez les vertébrés comme l'indique les états pathologiques causés par le diabète.

Canty (1986) montre que des fragments de myocarde de grenouille (*Rana sylvatica* : espèce tolérant le gel) congelés en présence de glucose sont redevenus contractiles quand ils ont été soumis à une stimulation électrique après décongélation (fig.12).

Lorsqu'un protocole de congélation utilisant le glucose 0.25 M comme agent cryoprotecteur est appliqué au myocarde de grenouille intolérante au gel (*Rana pipiens*), les fragments musculaires cryopréservés ne répondent plus à une stimulation électrique après décongélation (Canty 1986).

De manière générale, les cryoprotecteurs naturels s'avèrent moins efficaces que le DMSO lors de la congélation de divers matériels biologiques dont notamment les hépatocytes isolés et mis en suspension (Klebe 1983, Jackson 1985, Chesné1988, Maganto 1988).

Les CPA naturels ne semblent donc efficaces que pour la cryopréservation de cellules d'animaux adaptés au gel. De telles substances utilisées lors de la cryopréservation des hépatocytes donnent des rendements de viabilité faibles. Mais, employés conjointement avec des cryoprotecteurs synthétiques, les CPA naturels pourraient contribuer à obtenir un rendement plus élevé (Pegg 1987).

3°)Utilisation d'un mélange de cryoprotecteur.

L'utilisation d'un mélange équimolaire de cryoprotecteurs présente un double avantage :

-Diminution de la concentration toxique de chaque molécule cryoprotectrice (Novicki 1982, Chesné 1988) grâce à l'utilisation, par exemple, d'une solution contenant du HES (15% W/V) et du glycérol (15% W/V) au lieu d'une solution de HES (30% W/V)(Pegg 1987) .

-Mise à profit de la synergie entre différents CPA (Klebe 1983) (fig.13).

SYNERGISM BETWEEN CRYOPROTECTIVE AGENTS[a]

Compound	Percent DMSO Cryoprotective Effectiveness
DMSO (0.13 *M*)	1.4%
N,N-dimethylformamide (0.03 *M*)	3
PEG — 200 (0.05 *M*)	5
Glucose (0.03 *M*)	0.011
DMSO (0.13 *M*) + *N,N*-dimethylformamide (0.03 *M*)	18
DMSO (0.13 *M*) + PEG - 200 (0.05 *M*)	12
DMSO (0.13 *M*) + Glucose (0.03 *M*)	3

[a] Suboptimal concentrations of cryoprotective agents were employed in combination to protect CHO cells from freezing injury. When cryoprotective agents were used in combination, their combined effect was greater than one would expect, due to their additive effect. The studies described above were carried out in an identical fashion to the survey presented in Table 1 except that cells were frozen in the presence of two cryoprotective agents at the concentrations indicated. Experimental points were compared to the cryoprotective effect of 1.3 *M* DMSO (100% cryoprotection).

fig.13 : Synergie entre différents agents cryoprotecteurs (Klebe 1983).

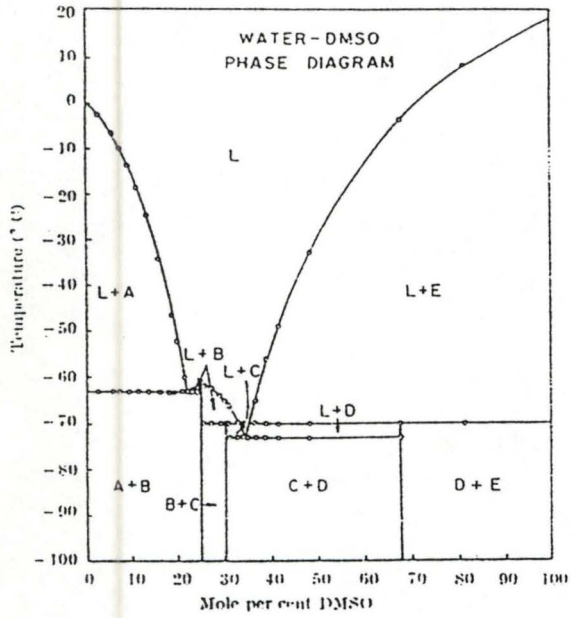


Fig. 2. Phase diagram for the water–DMSO system (plotted on a mole per cent basis). Symbols: L, liquid phase; A, H_2O (s); B, $DMSO.3H_2O$ (s); C, $DMSO.2\text{-}1/2\ H_2O$ (s)*; D, $DMSO.1/2\ H_2O$ (s)*; E, DMSO (s). *Tentative assignment.

fig.14 : Diagramme de phase du mélange eau-DMSO (Rasmussen 1968).

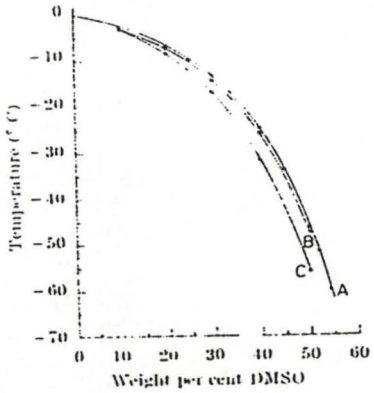


fig.15 : Effet du NaCl sur le point de fusion du système H_2O-DMSO-NaCl : (A) pas de NaCl, (B) 1g de NaCl pour x g de H_2O et y g de DMSO (avec x + y = 100g), (C) 10g de NaCl pour x g de H_2O et y g de DMSO (avec x + y = 100g) (Rasmussen 1968).

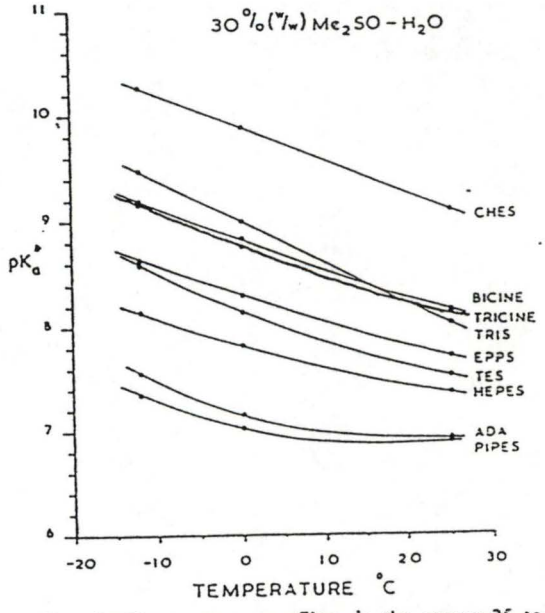


FIG. 3. Temperature profiles, in the range 25 to −12°C, for the pK_a values of nine zwitterionic buffer compounds in 30% (w/w) dimethyl sulfoxide–water.

fig.16 : Variation du pK d'une solution eau-DMSO lors du refroidissement de +25°C à -12°C (Taylor 1982).

1.3.2. La cryopréservation en milieu liquide.

La cryopréservation en milieu liquide permet d'éviter la formation de glace et la surconcentration en solutés plutôt que de déplacer ces phénomènes létaux vers des températures plus basses où la cellule est moins sensible.

Divers problèmes sont rencontrés :

-la variation du pK des tampons physiologiques suite à l'addition d'un non électrolyte : le DMSO.

-la dissipation des gradients ioniques causés par l'inactivation des différentes "pompes ioniques" telles que la Na^+-K^+ATPase et la Ca^{++}-Mg^{++}ATPase (cette inactivation enzymatique aux basses températures ne se marque pas par une dissipation des gradients lors d'une cryopréservation en milieu solide puisque tout mouvement ionique est impossible dans la phase solide).

1.3.2.1.Rappels historiques.

En 1963, Huggins évite la formation de glace durant le refroidissement des érythrocytes en utilisant une concentration en DMSO de 39% (w/v) soit 5.5 M. Ces cellules sans noyau tolèrent un pareil taux de CPA, mais d'autres types cellulaires, comme les hépatocytes, ne peuvent y survivre (Huggins in: Farrant 1965).

En 1965, Farrant utilise une solution eau-DMSO (concentration en DMSO de 55% w/v) permettant au mélange de rester liquide à -79°C. En utilisant l'utérus ou le colon de cobaye, il met en évidence l'effet néfaste d'une surconcentration en solutés (causée par la formation d'une phase aqueuse solide) sur la contraction musculaire tandis que la présence de cristaux en tant que telle ne semble pas être un facteur influençant la contraction du muscle lisse (Farrant 1965).

En 1983, Taylor met en évidence l'effet dommageable des cristaux de glace sur la contractibilité de muscles lisses stockés à -21°C (Taylor 1983).

1.3.2.2.Variation du pK :

Si le stockage en milieu liquide aux températures négatives élimine le problème des cristaux de glace, il ne faut pas négliger le changement du pK du tampon physiologique dû à la présence de DMSO (fig.16). En effet, tout changement de pK va induire une variation du pH de la solution (équation d'Hasselbach), ce qui peut contribuer à endommager la cellule lors du refroidissement (Taylor 1982 b).

Equation d'Hasselbach :

$$pH = pK + \log \frac{C_B}{C_A}$$

C_B = concentration de la forme basique de l'électrolyte
C_A = concentration de la forme acide de l'électrolyte

Les solutions utilisées pour une cryopréservation incorporent souvent un non électrolyte tel que le DMSO. Or, la nature du solvant modifie le pK du tampon physiologique car les molécules du solvant sont inclues dans un équilibre acide-base comme donneurs ou accepteurs de protons. Le DMSO ne donne pas de protons en solution mais il possède un groupement cétone (C=O) capable de fixer un proton (H^+). Lorsque des molécules de DMSO sont ajoutées à une solution aqueuse, elles altèrent la constante diélectrique du milieu avec une modification correspondante de l'équilibre acide-base.

Les constantes d'ionisation (sous forme de pK) de solutions aqueuses contenant du DMSO donnent des informations sur l'effet de la composition du solvant sur l'équilibre acide base (fig.17 & 18). Les constantes d'ionisation sont déterminées en mesurant le pH à la demi-équivalence ($pH_{1/2}$).

Par ailleurs, la mesure du pH aux températures négatives et en présence de solvants tels que le DMSO doit tenir compte des paramètres suivants afin de permettre la comparaison des valeurs de pH en conditions physiologiques et en conditions de cryopréservation :

1°)<u>La température</u> agit sur le processus d'ionisation en solution et sur le produit ionique de l'eau ($[H^+] * [OH^-] = K_W$)

$$pK_W = -\log K_W = 4471.33/T - 6.0846 + 0.017053\ T$$

K_W = produit ionique de l'eau
T = température exprimée en °K

Par conséquent, la neutralité de l'eau est pH=7.00 à 25°C ,
pH=7.47 à 0°C
et pH=8.40 à -35°C.

TABLE 2

Practical pK_a^* Values, Buffer Capacities, and Temperature Coefficients in Solutions Containing 20 and 30% (w/w) Dimethyl Sulfoxide[a]

	20% (w/w) Me_2SO-H_2O							30% (w/w) Me_2SO-H_2O						
	25°C		0°C		−5.5°C			25°C		0°C		−12°C		
Buffer	pK^*	β	pK^*	β	pK^*	β	$\Delta pK^*/°C$	pK^*	β	pK^*	β	pK^*	β	$\Delta pK^*/°C$
ADA	6.65 ±0.00 (2)	0.056	6.92 ±0.00 (2)	0.056	7.10 ±0.01 (3)	0.057	−0.015	6.93 ±0.01 (3)	0.054	7.17 ±0.00 (2)	0.056	7.57 ±0.01 (5)	0.060	−0.017
PIPES	6.66 ±0.01 (3)	0.053	6.89 ±0.01 (3)	0.053	7.08 ±0.01 (3)	0.055	−0.014	6.90 ±0.01 (3)	0.053	7.03 ±0.00 (2)	0.054	7.37 ±0.00 (3)	0.056	−0.013
TES	7.39 ±0.01 (5)	0.053	7.96 ±0.00 (2)	0.055	8.23 ±0.00 (4)	0.057	−0.028	7.54 ±0.01 (4)	0.056	8.15 ±0.00 (2)	0.054	8.60 ±0.02 (4)	0.058	−0.029
HEPES	7.29 ±0.01 (3)	0.054	7.66 ±0.01 (3)	0.056	7.89 ±0.01 (5)	0.058	−0.020	7.38 ±0.01 (2)	0.057	7.83 ±0.00 (2)	0.055	8.15 ±0.03 (4)	0.059	−0.021
EPPS	7.72 ±0.01 (3)	0.053	8.12 ±0.00 (2)	0.054	8.34 ±0.00 (5)	0.058	−0.020	7.72 ±0.01 (3)	0.053	8.31 ±0.00 (2)	0.055	8.64 ±0.01 (3)	0.059	−0.025
[illegible]	7.99 ±0.00 (2)	0.054	8.56 ±0.01 (3)	0.055	8.81 ±0.01 (4)	0.057	−0.027	8.13 ±0.00 (2)	0.053	8.77 ±0.01 (3)	0.055	9.17 ±0.02 (5)	0.057	−0.028
Tris	8.03 ±0.01 (2)	0.052	8.85 ±0.00 (2)	0.054	9.15 ±0.02 (4)	0.055	−0.037	8.04 ±0.01 (2)	0.058	9.00 ±0.01 (3)	0.053	9.48 ±0.02 (2)	0.058	−0.039
Bicine	8.13 ±0.00 (2)	0.051	8.62 ±0.00 (2)	0.054	8.89 ±0.02 (3)	0.055	−0.026	8.16 ±0.01 (4)	0.055	8.83 ±0.01 (4)	0.054	9.19 ±0.02 (2)	0.059	−0.028
CHES	9.10 ±0.00 (2)	0.053	9.76 ±0.00 (2)	0.053	10.01 ±0.00 (2)	0.057	−0.030	9.11 ±0.01 (3)	0.052	9.89 ±0.00 (2)	0.053	10.27 ±0.02 (4)	0.060	−0.031

[a] Some of these data have been presented in a preliminary communication (29).

fig.17 : Valeurs du pK et pouvoir tampon de différents tampons contenant du DMSO 20 et 30%(w/v) et cela pour des températures de 25,0 et - 5.5°C (Taylor 1982).

TABLE I
Practical pK'_a Values and Buffer Capacities (β) in Water at 25°C[a]

	Trivial name	Molecular weight	pK'_a (± 1 SE, n = 3)	pK'_a values given by Good *et al.* at 20°C	Adjusted literature values for 25°C[b]	Buffer capacity, β at $pH_{1/2}$	Buffer capacity β at pH 7.5
N-(2-Acetamido)iminodiacetic acid	ADA	190.16	6.56 ± 0.01	6.60	6.55	0.055	0.010
Piperazine-*N*,*N*'-bis-(2-ethanesulfonic acid)	PIPES	302.36	6.77 ± 0.01	6.80	6.76	0.057	0.014
N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid	TES	229.18	7.49 ± 0.00	7.50	7.40	0.053	0.053
N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid	HEPES	238.30	7.48 ± 0.00	7.55	7.48	0.054	0.054
N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-3-propanesulfonic acid	EPPS	252.32	7.79 ± 0.01	—	—	0.053	0.048
N-Tris(hydroxymethyl)methylglycine	Tricine	179.17	8.02 ± 0.01	8.15	8.05	0.052	0.034
Tris(hydroxymethyl)methylamine	Tris	121.12	8.06 ± 0.00	8.30	8.14	0.055	0.032
N,*N*'-Bis(2-hydroxyethyl)glycine	Bicine	163.17	8.11 ± 0.01	8.35	8.26	0.054	0.018
2-(Cyclohexylamino)ethanesulfonic acid	CHES	207.29	9.27 ± 0.01	—	—	0.052	0.006

[a] Some of these data have been presented in a preliminary communication (29).
[b] Using the temperature coefficient of Good *et al.* (12).

fig.18 : Valeurs du pK et pouvoir tampon de différents tampons utilisés lors de la cryoprésérvation de cellules animales (Taylor 1982).

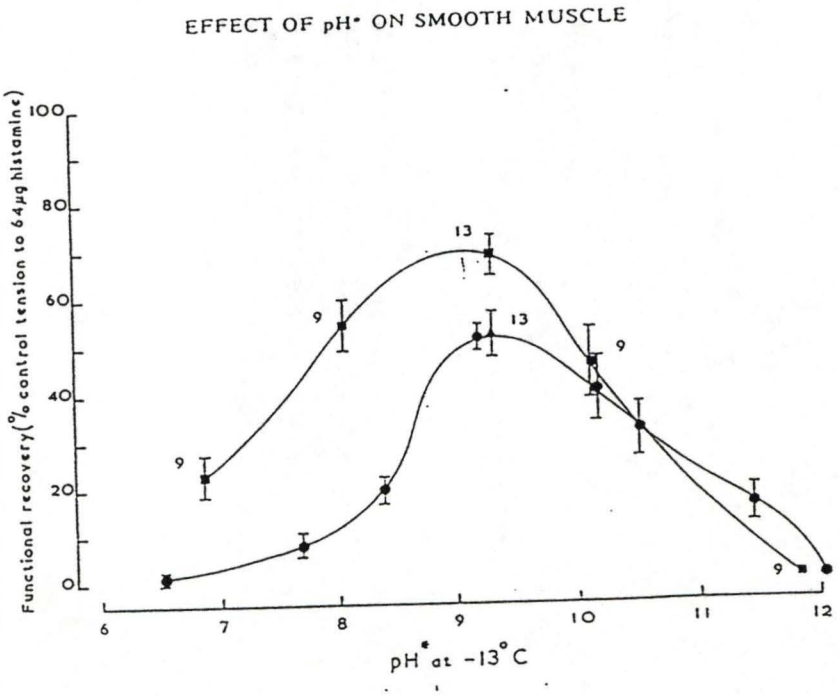


fig.19 : Effet du pH (lors du stockage à -13°C) sur la contraction du muscle lisse du colon de cobaye après réchauffement à 37°C (Taylor 1982).

2°)La force ionique du milieu (μ) influence l'activité du proton (AH^+) comme le démontre la loi de Debye et Huckël : si μ augmente alors le coefficient d'activité (γ) diminue et donc le pH augmente

$$pH = -\log AH^+ \qquad \text{et} \qquad AH^+ = [H^+] * \gamma H^+$$

Toutes ces conditions particulières (température, force ionique, donneurs ou accepteurs de protons, constante diélectrique, interactions avec le solvant) font que le pH optimum pour le maintien de l'intégrité cellulaire est différent en conditions physiologiques et en conditions de cryopréservation. Il faut donc être prudent lors de l'extrapolation de conditions bien connues aux températures physiologiques vers les conditions qui prévalent aux basses températures. Ainsi, le pH optimum pour des muscles lisses de mammifères stockés à -13°C dans un milieu contenant du DMSO (30% w/v) est de 9.2 (Taylor 1982 a) (fig.19).

1.2.3.3.Dissipation des gradients ioniques.

Pour des hépatocytes isolés il existe un changement de perméabilité de la membrane plasmique lorsque la température intracellulaire diminue (Fuller 1985 b). En refroidissant de 37°C jusqu'à -20°C, il y a une tendance à l'augmentation de la concentration en Na^+ dans la cellule. La perméabilité au sucrose est légèrement augmentée au dessous de -10°C (fig.20).

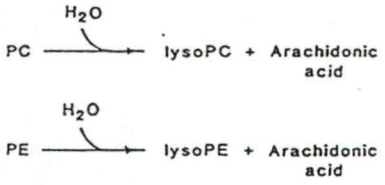
L'augmentation de la concentration intracellulaire en Na^+ est expliquée par la diffusion passive de ces ions à travers la membrane dès que la température descend sous les +15°C,c'est à dire lorsque la pompe sodico-potassique est partiellement inactivée (Kimzey 1971, Berthon 1980, Stewart 1980).

Aux températures physiologiques, la Ca^{++}-Mg^{++}ATPase permet le stockage des ions Ca^{++} dans le reticulum, mais l'enzyme est de plus en plus inactivé parallèlement à la diminution de la température. Les ions Ca^{++} diffusent passivement dans le cytosol. Durant une hypothermie prolongée, la concentration en Ca^{++} intracellulaire augmente et active l'hydrolyse des phospholipides membranaires, ce qui conduit à des dégâts cellulaires ou à la mort de la cellule (Hochachka 1986) (fig.21).

Enfin, une chute de la température cellulaire altère la dissociation de groupements imidazole des protéines, il en résulte une augmentation de pH qui augmente directement le flux de Ca^{++} du réticulum vers le cytosol (White 1982).

TEMPERATURE	Na^+ CONTENT OF CELL PELLET (mMOL/L CELL WATER)	% VIABILITY MEASURED BY PROTEIN SYNTHESIS, RELATIVE TO FRESH CELLS
37°C	24.13 ± 7.65	
0°C	43.11 ± 26.97	94.3 ± 12.6
-2°C (frozen)	66.05 ± 33.18	78.1 ± 11.3
-5°C	ND	62.8 ± 15.1
-10°C	99.31 ± 27.73	7.7 ± 4.7
-20°C	139.22 ± 36.27	5.3 ± 3.6
-5°C (for 1 hr)	ND	38.7 ± 9.4

fig20 : Changement de la perméabilité membranaire lors du passage de +37 à -20°C (Fuller 1982).



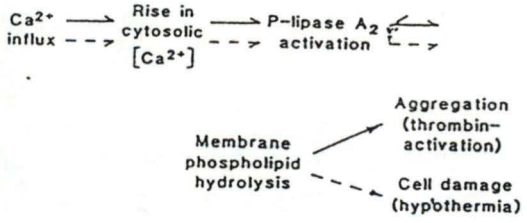


fig21 : Effet de l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca++ (Hochachka 1986).

fig22 : Composition de différents tampons utilisés lors de la cryoprésevation (Taylor 1982).

TABLE 1
Ionic Composition[a] and Physico-Chemical Properties of the Various Bathing Solutions

	KREBS	K-PIPES	K-ACES	K-HEPES	K(135)-TES	K-Tricine	K-EPPS
Major anion[b]	Cl^-	PIPES	ACES	HEPES	TES	Tricine	EPPS
(m*M*)	134.0	(59.4)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
K^+ (m*M*)	5.4	165.5	165.5	135.5	135.5	135.5	135.5
Na^+ (m*M*)	137.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4
Cl^- (m*M*)	134.0	56.9	86.9	56.9	56.9	81.9	56.9
pH_{20} (0%Me_2SO)	7.2	7.2	7.25	7.9	7.7	—	—
"pH"$_{20}$ (30%Me_2SO)	—	"7.7"	"7.6"	"8.0"	"8.1"	"8.6"	"8.7"
pH^*_{-13} (in 30% (w/v) Me_2SO)	—	8.40	8.56	8.91	9.20	9.32	9.30
pK^*_{-12} of buffer (in 30% (w/w) Me_2SO)[c]	—	7.37	9.27[d]	8.15	8.60	9.17	8.64
Osmolality (mosmol/kg)	290	306	370	336	315	350	312

[a] Other constituents as in Krebs solution (see Methods) except in solutions containing Me_2SO where the precipitation of calcium and magnesium salts was avoided by omitting calcium and magnesium chloride.

[b] ACES *N*-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid.
EPPS *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-3-propanesulfonic acid.
HEPES *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid.
PIPES Piperazine-*N*,*N'*-bis-(2-ethanesulfonic acid).
TES *N*-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulfonic acid.
Tricine *N*-Tris(hydroxymethyl)methylglycine.

[c] References Taylor (35) and Taylor and Pignat (37).

[d] Unpublished measurement.

Puisqu'il est impossible de faire fonctionner les enzymes qui maintiennent les gradients ioniques, on utilise des tampons physiologiques de composition ionique comparable au milieu intracellulaire.

Outre leur richesse en ions K^+ et leur pauvreté en ions Na^+, les tampons contiennent des ions de type zwitterionic (fig.18) qui remplacent partiellement l'ion Chlore comme anion majeur en solution. Les ions zwitterionic ont un P.M. compris entre 200 et 300 Daltons. L'imperméabilité de la membrane vis à vis de ces ions est la conséquence de leur charge négative et de leur volume. La composition de tels milieux de stockage est donnée à la figure 22, ils contiennent les mêmes concentrations en calcium, magnesium, bicarbonate, phosphate et glucose que le tampon Krebs.

1.4.Travaux réalisés antérieurement au laboratoire de biologie quantitative.

La cryopréservation des hépatocytes isolés et mis en suspension est étudiée au laboratoire de biologie quantitative depuis 1987. Nous disposons au départ :

-d'une méthode reproductible d'isolement des hépatocytes (Coche 1982)

-d'une technique permettant de caractériser le transport du taurocholate par l'hépatocyte isolé (Coche 1988).

Sur ces bases, et suite à une recherche bibliographique approfondie dans le domaine de la cryopréservation, un protocole de cryopréservation a été développé pour les hépatocytes (Decat 1987) et une technique permettant de mesurer l'incorporation de leucine dans les protéines totales a été mise au point pour estimer la viabilité des hépatocytes avant et après cryopréservation (Dubois 1988).

1.4.1.Protocole de cryopréservation des hépatocytes isolés en suspension(Decat,Pirotte 1987)

Le protocole de stockage en milieu liquide développé par Taylor en 1983 pour les muscles lisses a servi de point de départ au développement d'un protocole de congélation des hépatocytes. La technique est la suivante :

Les bandes musculaires issues du Taenia coli de cobaye sont équilibrées une heure à 37°C dans une solution de Krebs-DMSO (20%w/v). Les languettes sont ensuite immergées dans une solution de PIPES-DMSO (30%w/v) durant une heure à -7°C. Enfin, les échantillons sont refroidis à -13°C. Le réchauffement se fait rapidement en transférant les bandes musculaires dans une solution de Krebs bien gazéifiée (95% O2-5% CO2) à 37°C.

Sur base d'essais préliminaires au cours desquels la viabilité des hépatocytes est testée par la perte de LDH cytoplasmique dans le milieu extracellulaire et la capacité de transport du taurocholate, le protocole de Taylor est modifié de la façon suivante:

-La phase d'équilibration est limitée à 10 minutes et effectuée à 0°C. Le matériel biologique sous forme de suspension cellulaire présente un coefficient surface/volume beaucoup plus élevé que le même poids de bandelettes musculaires et la répartition du DMSO dans les milieux extra- et intracellulaire est donc plus rapide. Le temps et la température peuvent donc être réduits puisque les hépatocytes présentent un métabolisme ralenti à 0°C.

KRB avec glucose	osmolalité (mosmol/Kg)
.0 5 M	295
.25 M	526
.5 M	804
1 M	3412
Solution avec DMSO	osmolalité (mosmol/Kg)
20 %	3064
30%	3422

fig.23 : Osmolalité des solutions utilisées lors de notre protocole de cryopréservation des hépatocytes (A.Decat 1987).

-L'immersion d'une heure à -7°C dans du PIPES-DMSO (30%w/V) est modifiée en un point : le PIPES est remplacé par le K^+-Tricine.

-Le réchauffement du matériel biologique dans du Krebs à 37°C provoque un choc osmotique dû à la différence d'osmolalité entre le K^+-Tricine-DMSO (30%w/v) et le Krebs. Les hépatocytes sont dés lors réchauffés dans une solution de Krebs-glucose (1 M) afin de rétablir l'égalité des pressions osmotiques des deux solutions (fig.23). Ainsi, le choc osmotique dû au transfert des hépatocytes d'une solution d'osmolalité élevée vers une autre d'osmolalité faible est supprimé et la viabilité augmentée.

1.4.2.Incorporation de leucine dans les protéines (Deremme 1987, Dubois 1988).

L'objectif global est l'étude de la synthèse protéique en suivant l'incorporation de la leucine radioactive (tritiée) dans les protéines des hépatocytes isolés en suspension. En appliquant un protocole d'incorporation de la leucine dans les protéines à des hépatocytes ayant subi une congélation, le taux de synthèse obtenu permet de calculer le rendement de la congélation et peut être comparé aux mesures de viabilité selon différents critères (libération de LDH, exclusion d'un colorant vital, transport du taurocholate).

Les résultats de l'incorporation de leucine dans les protéines totales sont les suivants pour les hépatocytes fraîchement isolés :

La quantité de leucine radioactive incorporée dans les protéines totales augmente linéairement durant 60 minutes. Ensuite, elle se stabilise et se maintient à un niveau constant pendant environ 60 minutes. Après deux heures d'incubation, la quantité de leucine incorporée dans les protéines totales décroît, ce qui confirme la balance protéique négative des hépatocytes, c'est à dire une dégradation protéique plus rapide que la synthèse.

Après cryopréservation, l'incorporation de leucine tritiée dans les protéines est de 70% par rapport aux cellules fraîchement isolées (fig.24).

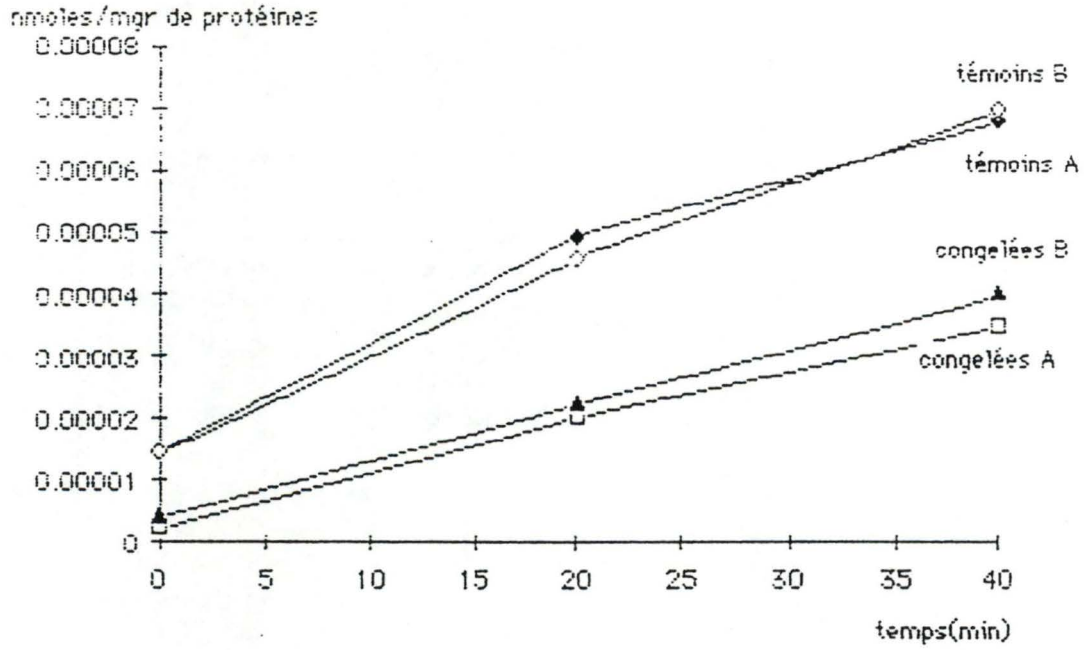
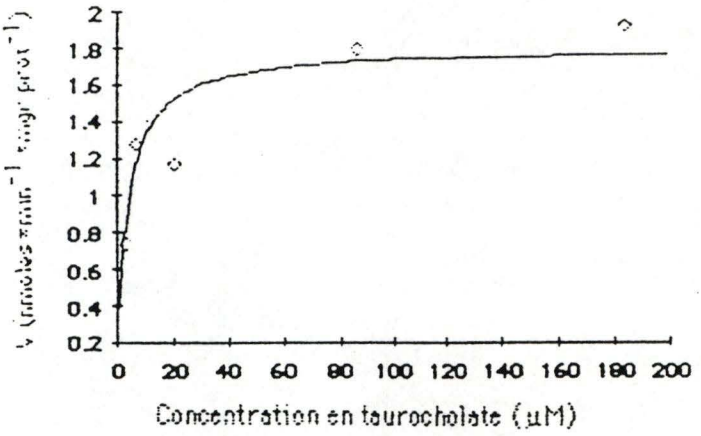
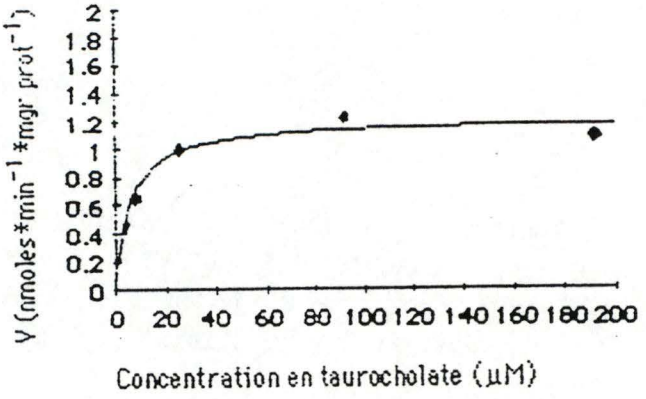


fig24 : Cinétique d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales pour les hépatocytes cryopréservés (30 minutes à -13°C) et les hépatocytes fraîchement isolés (B.Dubois 1988).



Cinétique du taurocholate, chez les hépatocytes fraîchement isolés
Rat 1



Cinétique du taurocholate, chez les hépatocytes cryopréservés.
Rat 1

fig.25 : Cinétique du transport du taurocholate à l'état stationnaire pour les hépatocytes cryopréservés (30 minutes à -13°C) et les hépatocytes fraîchement isolés (Dubois 1988).

1.4.3.Transport du taurocholate à l'état stationnaire

Nous avons vu (§ 1.2.1.) que le transport du taurocholate est un bon critère d'intégrité métabolique La cinétique d'incorporation du taurocholate en fonction de la concentration en taurocholate externe suit l'équation de Michaëlis-Menten : Km=4 µM et Vmax= 2 nmoles /min/mg de protéines totales.

Les cellules cryopréservées montrent une diminution du Vmax de l'ordre de 40% et une augmentation du Km d'environ 60% (fig.25).

Les résultats obtenus pour l'incorporation de leucine et pour le transport du taurocholate sont difficilement comparables car toutes les valeurs sont ramenés par mg de protéines de la suspension de départ.

Il s'en suit que :

a)Si la suspension de départ est fragmentée en plusieurs fioles d'incubation, les prélèvements pourraient ne pas être homogènes et identiques et chaque fiole d'incubation pourrait contenir des quantités de protéines différentes.

b)La concentration en protéines de la suspension de départ n'est pas le reflet exact du nombre de cellules transportant le taurocholate ou synthétisant des protéines car des cellules complétement détruites dont le contenu s'est solubilisé dans le milieu seront prises en compte lors de la mesure de la concentration protéique.

1.5.OBJECTIFS

Pour compléter les travaux décrits ci-dessus, nous nous proposons de réaliser les travaux suivants :

1° -Confirmer les pertes d'intégrité membranaire des hépatocytes cryopréservés par les tests d'exclusion du colorant vital et de libération d'enzymes cytoplasmiques.

-Quantifier les modifications d'activité métabolique de la suspension des hépatocytes cryopréservés gràce à l'étude du transport du taurocholate.

-Savoir si une diminution de l'activité métabolique de la suspension des hépatocytes cryopréservés indique que toutes, ou seulement une proportion, des cellules sont endommagées.

2° -Réaliser un examen morphologique des suspensions d'hépatocytes fraîchement isolés et cryopréservés.

En marge de notre double objectif, nous nous proposons d'améliorer le protocole de cryopréservation des hépatocytes

-en changeant la composition du milieu de réchauffement.

-en modifiant les conditions de stockage à -13°C par l'utilisation d'un mélange équimolaire de DMSO et de glycérol.

MATERIELS ET METHODES

2.1.Animaux.

Les animaux utilisés sont des rats femelles Sprague-Dawley d'approximativement 250 g de poids corporel. Elles sont nourries ad libitum par nourriture standard (UAR A04, Animal Labo,Bruxelles, Belgium) et maintenues en régime d'illumination diurne. Douze heures avant l'opération l'animal est mis a jeûn.

2.2.Réactifs.

Le β-D(+)-glucose, le Diméthylsulfoxyde (DMSO), la L-LDH, L lactate: NAD+Oxydoréductase, l'acide pyruvique (a-Ketopropionic acid, 2oxopropanoïc acid, sodium salt type II cristalline) et l'albumine de sérum bovin proviennent de Sigma Chemical Company, St Louis, USA.

La Collagénase provient de Gibco laboratories (Life technologies INC.Grand Island, New York, USA).

Le réactif de Folin (Folin-Ciocalteus Phenolreagenz art.9001), les sels suivants: $MgSO_4.7H_2O$(art.5886), KH_2PO_4(art.4873), KCl(art.4936), NaCl(art.6404), $NaHCO_3$(art.6329), $CaCl_2.2H_2O$(art.2382), KOH(art.5033), $MgCl_2.6H_2O$(art.5833), NaH_2PO_4(art.6346) et le Triron X100(art.11869) proviennent de E.Merck, Darmstad RFA.

Le $KHCO_3$ provient de UCB (RPL) Grauwmeer, H.R.Leuven 6172, Belgium.

Le liquide scintillant Ready-solv EP provient de Beckman (Irvine California, USA), le milieu nutritif de Leibovitz L-15 provient de Flow Laboratories U.K. et le nembutal (Pentobarbital Sodique) provient de Sanofi (Paris, France).

Le molybdate rouge de pyrogallol (total protein test, reagent1, 4X concentrated) provient de s.a.Sopar-Biochem (Bruxelles, Belgium).

Le paraplast provient de Monoject Scientific INC. (a division of Sherwood medical) Athy,Co.Kildare Ireland.

L'acide taurocholique(^3H) 99.9GBq/mmol (2.7Ci/mmol)) provient de NEN Research products, Boston, USA.

La tricine ((N-(Tris-(Hydroxyméthyl)-méthyl)-glycine) provient de Janssen Chemica, Beerse, Belgium.

L'huile de Silicone provient de Wacker chemie GmbH, München, West Germany.

L'eau est purifiée par deux systèmes Aqualab 30 mis en série(distribué par Vel Leuven, Belgium).

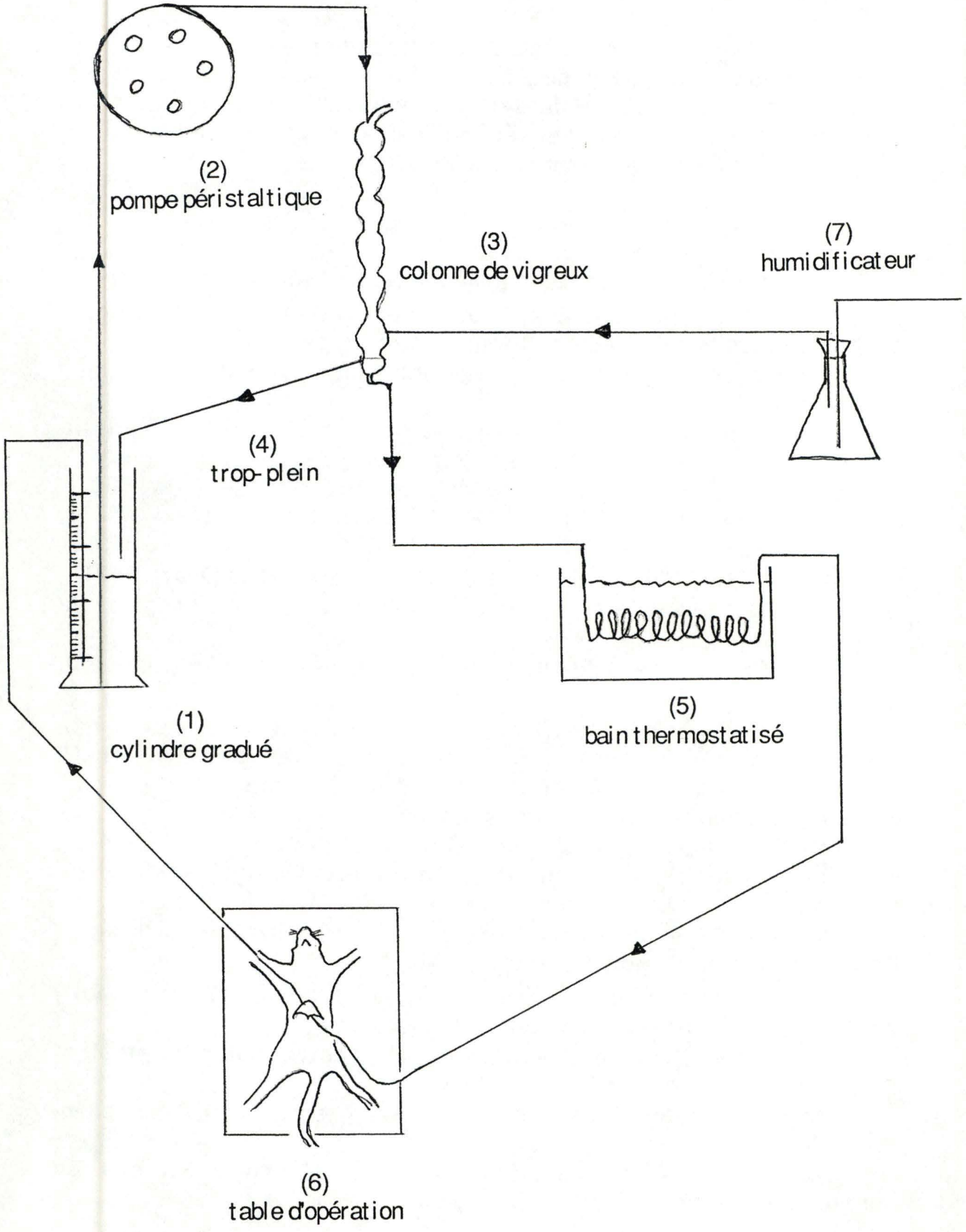


fig.26 : Technique d'isolemment des hépatocytes.

2.3.Technique d'isolement des hépatocytes.

2.3.1.Appareillage(fig.26).

La solution à perfuser est contenue dans un cylindre gradué d'une capacité de 250 ml (réservoir central) (1). Une pompe péristaltique (2) aspire le perfusat et le conduit au sommet d'une colonne de vigreux (3) connectée à une source de carbogène préalablement saturé en vapeurs d'eau par un humidificateur (7). Le carbogène (95% de O2 - 5% de CO2) maintient le pH aux alentours de 7 et alimente les cellules en O2. La solution ainsi traitée est réchauffée à 37°C dans un bain thermostatisé (5) avant de pénétrer via un cathéter dans la veine porte de l'animal (6).

Le rat est placé sur une table d'opération de hauteur réglable. La hauteur de la table d'opération est réglée de manière à obtenir une pression de 10 à 15 cm à la sortie du cathéter d'eau soit une pression équivalente à la pression portale in vivo. Cette pression est maintenue constante grâce au trop plein ramenant l'excès de solution dans le cylindre gradué de 250 ml(4).

Le perfusat est récupéré via un second cathéter inséré dans la veine cave thoracique et réintroduit dans le réservoir central assurant ainsi une perfusion en circuit fermé.

2.3.2.Solutions.

Un tampon Krebs-Ringer-bicarbonate sans calcium (pH = 7.4 à 37°C) est destiné au lavage du foie (pré-perfusion), sa composition est :

$MgSO_4.7H_2O$	1.18mM
KH_2PO_4	1.18mM
KCl	4.75mM
NaCl	118mM
$NaHCO_3$	25mM
Glucose	11.1mM

Un tampon Krebs-Ringer-bicarbonate avec calcium (pH = 7.4 à 37°C) est utilisé pour la perfusion enzymatique du foie (Collagénase 0.5 à 1 mg/ml), sa composition est :

$MgSO_4.7H_2O$	1.18mM
KH_2PO_4	1.18mM
KCl	4.75mM
NaCl	118mM
$NaHCO_3$	25mM
$CaCl_2$	1.23mM
glucose	5.55mM

Le CaCl2 sert à maintenir la structure tertiaire de la collagénase (Seifter 1970).

Un second tampon Krebs-Ringer-bicarbonate avec calcium, appelé solution de stockage (pH = 7.4 à 37°C), permet de stocker les hépatocytes à 0°C pendant 3 à 4 heures, sa composition est :

$MgSO_4.7H_2O$	1.18mM
KH_2PO_4	1.18mM
KCl	4.75mM
NaCl	118mM
$NaHCO_3$	25mM
$CaCl_2$	2.50mM
glucose	5.55mM

2.3.3.Technique opératoire et perfusion.

Les hépatocytes sont isolés à partir du foie de rat par la méthode de Berry et Friend (1969) modifiée par Zahlten et Stratman (1974) et adaptée par Coche (1982).

Le rat est anesthésié par une injection intrapéritonéale de nembutal a raison de1µL par g de poids corporel. L'animal est placé à environ 15 cm sous le niveau d'écoulement de la solution en réglant la hauteur de la table d'opération.

Après incisions longitudinale et transversale de la peau et des muscles, les viscères sont déplacés sur la gauche de l'animal afin de dégager la veine porte et la veine cave postérieure.

Une première ligature lâche est placée autour de la veine cave postérieure (à hauteur du trou physiologique) en aval des veines rénales. Une seconde ligature lâche est préparée autour de la veine porte en aval de la veine splénique. A ce moment, on introduit le premier cathéter dans la veine porte, la seconde ligature est directemment serrée: le cathéter est fixé.

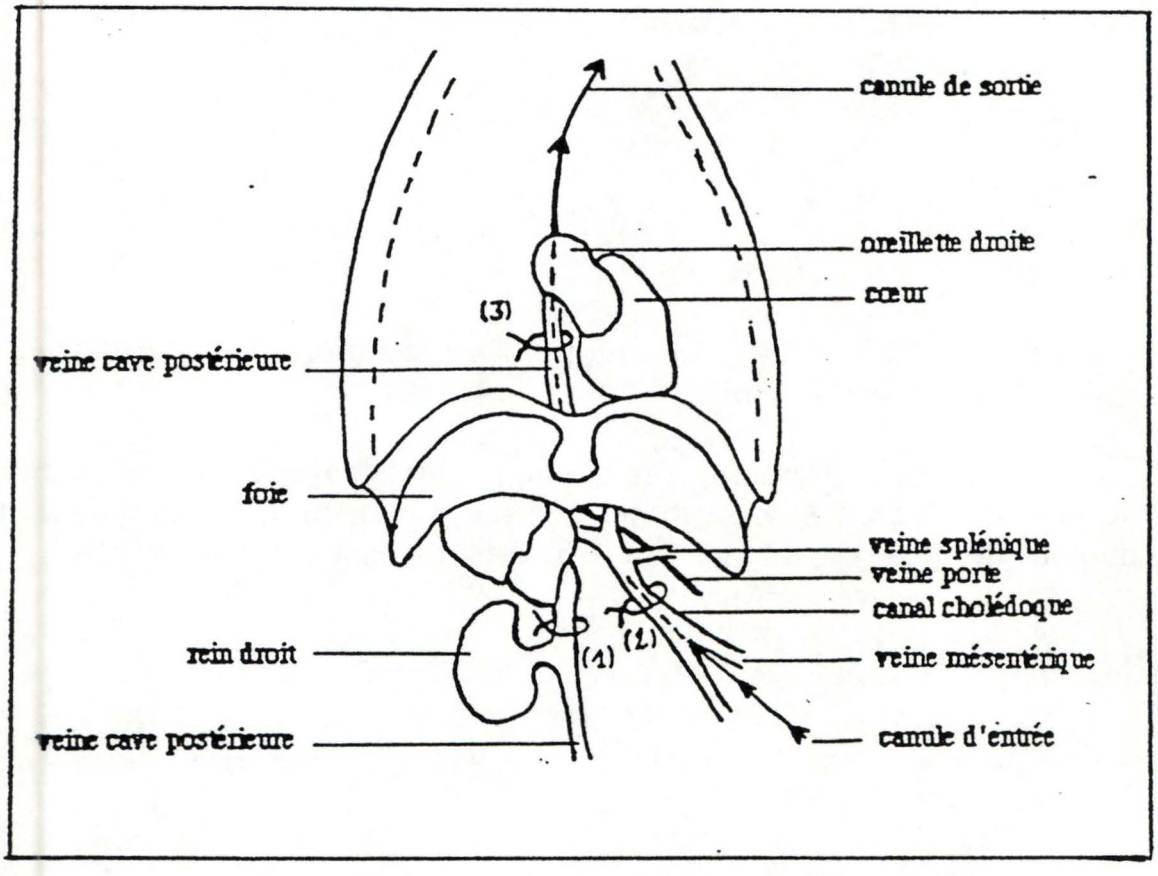


fig27 : Technique de perfusion du foie.

Le liquide de pré-perfusion(oxygéné, à 37°C) s'écoule par le cathéter dans le foie. Ce dernier gonfle et blanchit totalement. Rapidement la veine cave postérieure est sectionnée en amont de la première ligature, la solution de pré-perfusion quitte l'organe.

La cavité thoracique est ouverte en sectionnant les côtes, le sternum et le diaphragme. Une troisième ligature lâche est placée autour de la veine cave thoracique. Un second cathéter est enfoncé à partir de l'oreillette droite du coeur jusqu'à proximité du foie via la veine cave thoracique. La troisième ligature est serrée assurant la fixation du second cathéter (fig.27). Lorsque le cylindre central est vide, il est rempli avec 100ml de liquide de perfusion. Après que le foie ait été lavé par 50 ml de tampon de perfusion, un tuyau raccordé au second cathéter est plongé dans le réservoir central. La première ligature est serrée assurant la fermeture du circuit de perfusion. Si le circuit est bien fermé (resserer les ligatures en cas de fuite) 50 mg de collagénase sont ajoutés dans le cylindre gradué contenant 50ml de solution de perfusion (l'enzyme ayant été préalablement dissoute dans un peu de solution de perfusion).

Au bout de 20 minutes, la consistance de l'organe est plus molle et le perfusat suinte à travers la capsule de Glisson. Il est temps dés lors d'exciser le foie du corps de l'animal. Sans déchirer la capsule de Glisson le foie est déposé dans une boîte de pétri contenant la solution de stockage.

Les hépatocytes sont libérés dans cette solution en déchirant délicatement la capsule de Glisson. Le squelette fibreux du foie est éliminé, on obtient la suspension d'hépatocytes brute.

2.3.4.Filtration-purification.

La suspension brute est filtrée à travers quatre épaisseurs de gaze et récoltée dans deux tubes à centrifuger. Une première centrifugation (75 g.min) permet d'éliminer les débris cellulaires. Les culots d'hépatocytes sont resuspendus dans un milieu Krebs-Ringer-bicarbonate avec calcium (stockage) et à nouveau filtrés et centrifugés.

La dernière resuspension est réalisée de manière à obtenir la densité cellulaire désirée pour les expérimentations futures. Les hépatocytes sont alors placés à 0°C jusqu'au moment de leur utilisation.

2.4.Technique de congélation à -13°C.

2.4.1.Solutions.

Une solution de Krebs-DMSO (20% w/v) (pH = 8.5 à 0°C) utilisée lors de la phase d'équilibration à O°C se compose de :

NaCl	0.1212 M
$CaCl_2.2H_2O$	0.0025 M
NaH_2PO_4	0.0012 M
KCl	0.0054 M
$MgCl_2$	0.0012 M
$NaHCO_3$	0.015 M
Glucose	0.0115 M
DMSO	2.56 M

Le tampon est saturé en carbogène.

Une solution de K^+-Tricine-DMSO (30% w/v) (pH = 9.2 à -13°C) utilisée lors du stockage à -13°C se compose de :

NaCl	0.0072 M
CaCl2.2H2O	0.0025 M
NaH2PO4	0.0012 M
KCl	0.0423 M
MgCl2	0.0137 M
KHCO3	0.0155 M
KOH	0.0777 M
Glucose	0.0155 M
Tricine	0.1 M
DMSO	3.9 M

Le tampon est saturé en carbogène.

2.4.2.Séquence expérimentale.

Dans une série d'éprouvettes, on place 500µl de suspension d'hépatocytes. Par centrifugation (75gmin) on odbtient un culot d'hépatocytes, le milieu d'incubation formant le surnageant.

Le milieu d'incubation est remplacé par la solution de Krebs-DMSO (20%) à 0°C. Durant dix minutes les concentrations intra- et extracellulaire en DMSO s'équilibrent.

Grâce à une nouvelle centrifugation (75 gmin) le deuxième milieu (Krebs-DMSO) est remplacé par un troisième (K^+-Tricine-DMSO) à -7°C.

Les milieux intra- et extracellulaires s'équilibrent pendant une heure, ensuite la température est diminuée à un taux de 0.5°C/minute pour atteindre -13°C.

Le réchauffement est brutal. Par la même technique de centrifugation le K^+-Tricine-DMSO est remplacé par du Krebs-glucose (1M) à 37°C. Pour éliminer toutes traces néfastes de DMSO le quatrième milieu est rajouté de manière à effectuer une dilution d'environ 10 fois.

Toujours par centrifugation, 9/10 du milieu de réchauffement sont éliminés après 10 minutes afin de retrouver une densité cellulaire proche de la densité de départ. Une suspension d'hépatocytes dans un tampon KRB-glucose (1M) est donc obtenue.

2.5.Evaluation de l'intégrité de la cellule.

2.5.1.Exclusion d'un colorant vital.

Une solution d'érythrosine (3.6mg/ml NaCl 0.9%) est préparée, 10 µl de la solution d'érythrosine sont ajoutés à 50 µl de suspention d'hépatocytes. Après homogénéisation du milieu 10 µl de suspension ainsi traitée sont déposés sur une cellule de Neubauer.

$$\text{Viabilité (\%)} = \frac{\text{Nombre de cellules rejetant le colorant} * 100}{\text{Nombre total de cellules}}$$

L'espace de comptage de la cellule de Neubauer acceuille 4.10^{-4} ml de suspension. La suspension est diluée 1.2 X suite à l'addition d'érythrosine. Donc,

$$\text{Densité } (10^6 \text{ cell/ml}) = \text{Nombre total de cellules} * 10^4 * 1.2$$

2.5.2.Rétention d'enzymes cytoplasmiques: dosage de la lactate déshydrogénase (LDH).

Les solutions à préparer sont :

-solution A = NADH 1mM (7.36 mg dissous dans 10ml d'eau distillée)
-solution B = Tampon TRIS 0.5 M,pH = 7.4
-solution C = Pyruvate 10 mM (10 mg d'acide pyruvique dissous dans 10 ml de tampon TRIS 0.05 M,pH = 7.4)
-Triton X 100 0.14% et 1.1% (dans l'eau distillée)
-Une solution de TRIS-pyruvate est obtenue en mélangeant 10 ml de C + 10 ml de B + 60 ml d'eau distillée.

La LDH catalyse la réaction suivante :

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactate} + NAD^+$$

(Enz.cytoplasmique)

On introduit dans une cuvette 0.8 ml de solution TRIS-Pyruvate,0.1 ml d'enzyme correctement dilué et 0.1 ml de NADH (solution A).

Après homogénéisation la mesure de l'activité enzymatique est lue à 340 nm et se calcule comme suit:

$$U.I./L = \frac{\Delta abs.}{\Delta t} * \frac{1}{\xi * d} * \frac{V}{v} * 10^3$$

Δ abs=variation d'absorbance
ξ =Coefficient d'extinction molaire en $cm^2\ \mu mole^{-1}$
d =trajet optique de la cuve en cm
V =Volume réactionnel total
v =volume de l'échantillon
Δt =intervalle de temps en minutes

1 U.I. représente la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute dans les conditions standard (Union internationale de Biochimie 1961).

L'activité totale est dosée dans 1 ml de suspension auquel sont ajoutés 1.9 ml de Triton X100 à 0.14%.

L'activité cytoplasmique est dosée dans le culot cellulaire obtenu après centrifugation (75 g.min).

L'activité présente hors des cellules est dosée dans le surnageant de la suspension cellulaire obtenu après centrifugation, 20 µl de Triton X100 1.1% sont ajoutés à 200 µl de surnageant.

Le dosage est effectué le jour même ou le lendemain. Bergmeyer (1970) observait une perte d'activité enzymatique de l'ordre de 10 à 15 % après 24 heures de stockage à température ambiante dans un tampon physiologique.

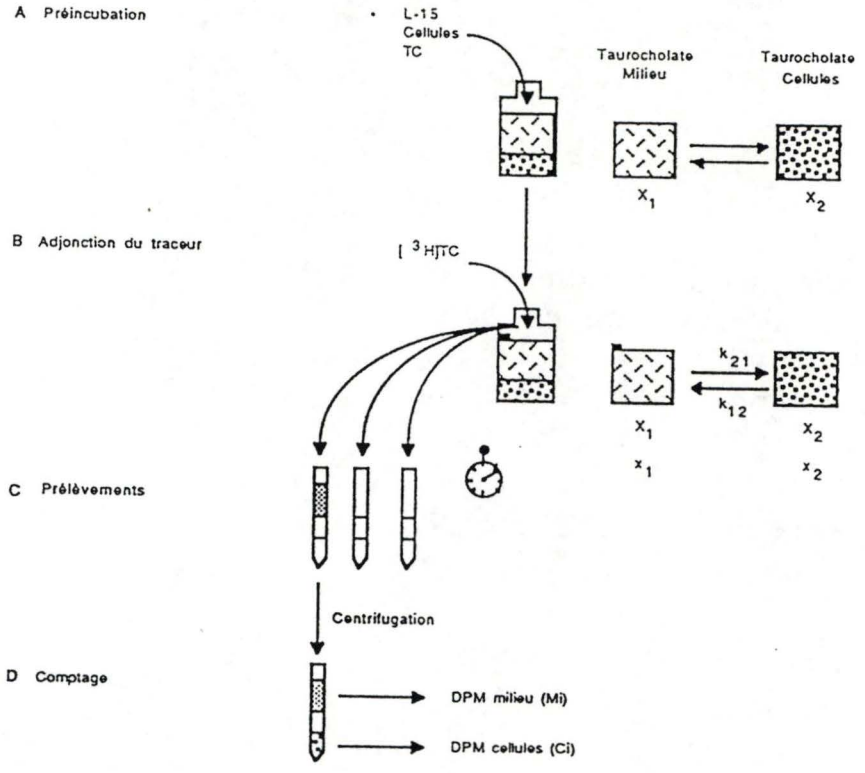


fig.28 : Séquence expérimentale permettant la détermination de la cinétique du transport du taurocholate par les hépatocytes.

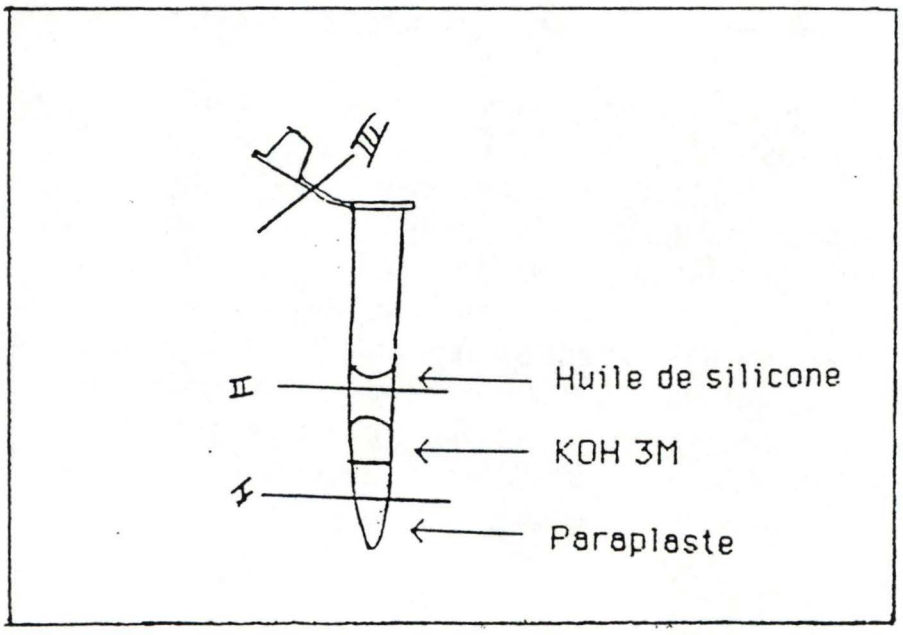


fig.29: Tubes utilisés pour la détermination de la cinétique du transport du taurocholate par les hépatocytes.

2.5.3.Cinétique du transport du taurocholate à l'état stationnaire.

1° Préparation des tubes.

On injecte successivement 50 µl de paraplast liquéfié (afin de le couler plus facilement dans le tube), 50 µl de KOH 3M et 3 à 4 gouttes d'huile de silicone.

2° Mesure.

La suspension cellulaire (100 µl d'une densité 20 * 10^6 cellules/ml) est incubée dans 2 ml de milieu (Leibovitz L-15) porté à 37°C et contenant le taurocholate froid.

Afin d'équilibrer la vitesse d'entrée et de sortie du taurocholate dans la cellule, une incubation à 37°C durant 20 minutes avec agitation latérale est réalisée. Ensuite, du taurocholate tritié est ajouté. Des échantillons de cette suspension sont prélevés à différents temps et déposés dans les tubes préparés. Une centrifugation à 13000 rpm dans la microfuge E^{tm} Beckman sépare les cellules du milieu (fig.28). Ces dernières éclatent dans le KOH après avoir traversé l'huile de silicone. Après congélation les microtubes sont aisément coupés à hauteur de l'huile de silicone (fig.29 : I) et du paraplast (fig.29 : II).

Dans une fiole contenant le surnageant, on ajoute 4.5ml de liquide scintillant et on mesure la radioactivité dans un compteur à scintillation liquide. Les fioles contenant les cellules sont placées dans une étuve à 70°C afin de faire fondre le paraplast et ainsi libérer le KOH et le contenu cellulaire. 0.5 ml de benzène solubilisent le paraplast, 115 ul d'HCL (2 N) neutralisent le KOH et 4.5 ml de liquide scintillant permettent la mesure de la radioactivité dans le compteur à scintillation liquide(fig.30).

3°Mesure de la radioactivité β par scintillation liquide.

Schématiquement, le comptage à scintillation liquide se base sur la mesure des photons émis par des atomes excités, directement ou indirectement, par les rayonnements β. Chaque isotope émet des rayonnements β d'énergies différentes, c'est le spectre d'émission des rayonnements β.

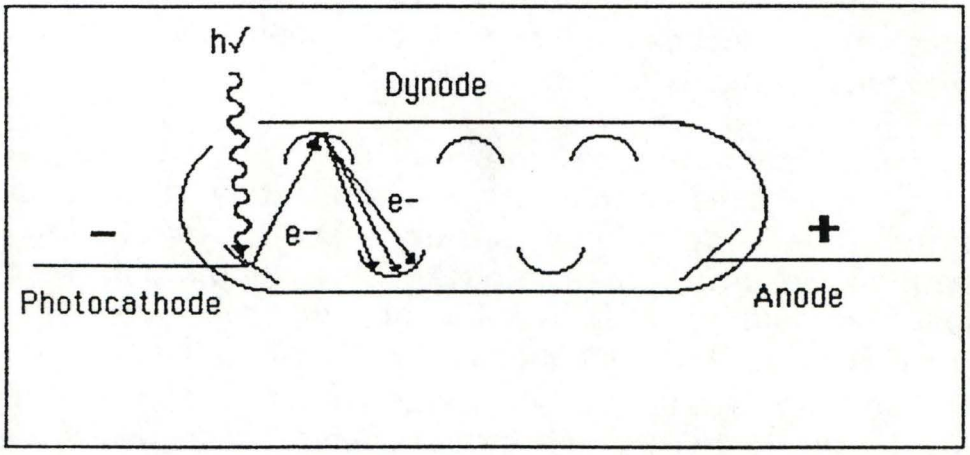


fig.30 : Schématisation du compteur à scintillation liquide.

Les isotopes sont classés d'après le rayonnement le plus énergétique (Emax), l'unité de mesure est le KiloélectronVolt (KeV).

Emax ^{3}H = 18 KeV
Emax ^{14}C = 154 KeV
Emax ^{32}P = 1710 KeV

Le comptage de la radioactivité des échantilons se déroule comme suit: les aliquots sont dissous dans un solvant et les molécules du solvant (benzène ou toluène) sont excitées par les rayonnements β. Elles transforment l'énergie cinétique des rayons β en énergie électronique d'excitation.

Les molécules excitées du solvant transfèrent cette dernière à d'autres molécules, les substrats scintillants qui retombent ensuite au niveau fondamental en émettant des photons (les molécules scintillantes peuvent être directement excitées par les rayons β). L'efficacité du solvant à transmettre l'énergie reçue des rayonnements β aux molécules de scintillant peut être fortement réduite par des substances étrangères. Ces substances sont appelées agents quenchants, elles vont désactiver les molécules excitées du solvant et donc diminuer le transfert d'énergie vers les molécules scintillantes.

Les molécules de scintillant sont choisies afin que la majorité des molécules excitées émettent un photon dans le visible lors du retour à l'état fondamental. Le rendement quantique de fluorescence (Φ) est la fraction de molécules excitées qui retournent à l'état fondamental en émettant un photon, il est en général plus élevé que 0.85.

Le photomultiplicateur est une cellule photoélectrique qui permet la mesure des photons émis. L'appareillage contient une photocathode qui émet des électrons sous l'action des photons. Les électrons produits sont attirés par une première électrode intermédiaire qui se trouve à un potentiel plus positif que la photocathode. Les électrons ainsi accélérés frappent l'électrode intermédiaire et un nombre plus important d'électrons sont réémis. Ceux-ci sont attirés par l'électrode suivante et ainsi de suite jusqu'à l'anode(fig.30). Le facteur d'amplification (m) est déterminé comme suit:

$$m = f * n$$

n = nombre d'électrodes intermédiaires
f = facteur d'émission secondaire, c'est à dire le nombre d'électrons émis par une électrode intermédiaire frappée par un électron.

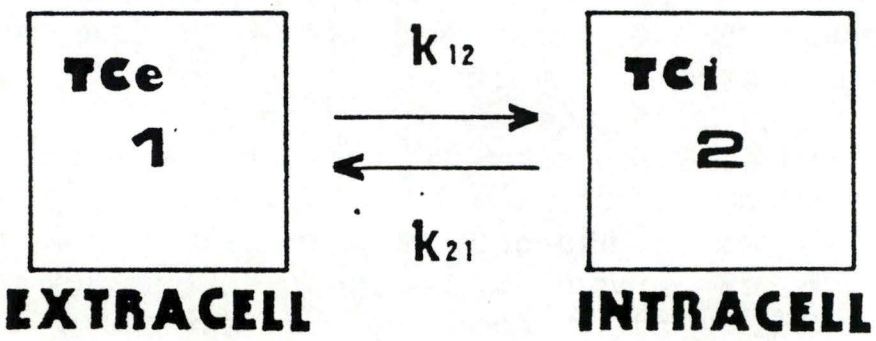


fig.31 : Modèle compartimental caractérisant le transport du taurocholate par l'hépatocyte.

Les cpm représentent le nombre de coups par minute enregistré tandis que les dpm indiquent le nombre de désintégrations par minute des atomes radioactifs. L'efficience de comptage est le rapport $\frac{cpm}{dpm} * 100$, la présence d'agents quenchants la diminue.

4°Modélisation mathématique.

Une modélisation compartimentale (Jacquez 1972) représente un système sous forme de transferts de substance entre différents compartiments. Un compartiment est une quantité de substance qui se comporte cinétiquement d'une manière distincte et homogène. Il est à distinguer d'un volume physiologique, bien que la quantité de matière dans un tel volume puisse être un compartiment.

Il peut y avoir entrée de matière venant de l'environnement et sortie de matière vers cet environnement, le système est ouvert. S'il n'y a pas d'échange avec l'environnement, le système est fermé.

Le modèle fermé à deux compartiments est utilisé pour caractériser le transport du taurocholate (fig.31).

Les cellules sont en suspension dans le milieu. La concentration en taurocholate intracellulaire est en équilibre avec la concentration en taurocholate extracellulaire. Le système étant placé à l'état stationnaire, la vitesse d'entrée est égale à la vitesse de sortie. Par convention, le milieu extracellulaire sera le compartiment 1 et contiendra une quantité Q_1 de taurocholate non marqué. Le milieu intracellulaire sera le compartiment 2 et contiendra une quantité Q_2 de taurocholate non marqué.

L'échange de taurocholate entre le milieu et la cellule est caractérisé par des constantes de vitesses K_{21} et K_{12} (min^{-1}).

La constante de vitesse K_{12} exprime la fraction du compartiment 1 transférée vers le compartiment 2 par unité de temps.

A l'état stationnaire et pour une concentration donnée en taurocholate, la cinétique est considérée d'ordre 1 et la vitesse est proportionnelle à la quantité de substance présente dans le compartiment d'origine : $V_{ij} = K_{ij} * Q_{ij}$

V_{ij} = vitesse

K_{ij} = constante de vitesse exprimant le transfert de la substance du compartiment i vers le compartiment j par unité de temps

Q_i = quantité de substance passant dans le compartiment i

A l'état stationnaire, les vitesses d'entrée et de sortie sont égales et par conséquent :

$$dQ_1/dT = V_{12} - V_{21} = 0 \qquad (1)$$

Q_1=Quantité de taurocholate non marqué dans le milieu extracellulaire

$$dQ_2/dT = V_{21} - V_{12} = 0$$

Q_2=Quantité de taurocholate non marqué dans le milieu intracellulaire

donc

$$dQ_1/dT = K_{12} * Q_1 - K_{21} * Q_2 = 0$$

$$dQ_2/dT = K_{21} * Q_2 - K_{12} * Q_1 = 0$$

et

$$K_{12} * Q_1 = K_{21} * Q_2 \qquad (2)$$

Au temps 0, on ajoute une faible quantité de taurocholate radioactif, pour mesurer la vitesse à l'état stationnaire.

Le taurocholate radioactif est un traçeur parfait, il se mélange instantanément avec le taurocholate non marqué, et la cellule ne transporte pas différemment le taurocholate radioactif et le taurocholate non radioactif.

Le taurocholate radioactif va pénétrer dans la cellule, simultanément la vitesse d'excrétion du taurocholate radioactif augmente jusqu'à l'équilibre des vitesses d'entrée et de sortie.

La caractérisation de l'état stationnaire est alors possible, si K_{21} et K_{12} sont connues.

-Détermination de K_{21} et K_{12} .

L'identification consiste à estimer les valeurs des paramètres du modèle compartimental à partir des données expérimentales. Dans l'étape d'identification, les valeurs des paramètres du modèle compartimental sont cherchées de manière à représenter les données expérimentales discrètes par une relation continue.

La méthode de Levenberg-Marquardt est à la base d'un logiciel permettant d'ajuster les équations explicites du modèle aux données expérimentales par le calcul des moindres carrés non linéaires.

Les équations utilisées pour décrire l'évolution du taurocholate marqué dans les cellules et dans le milieu sont :

milieu

$$dq_1/dt = K_{12} * q_1 - K_{21} * q_2 = 0$$

$$q_1(t) = \frac{K_{12} * q_{1(0)}}{(K_{21}+K_{12})} + \frac{K_{21} * q_{1(0)}}{(K_{21}+K_{12})} * e^{-(K_{21}+K_{12})t}$$

$q_1(t)$=quantité de taurocholate marqué dans le milieu extracellulaire au temps t

cellules

$$dq_2/dT = K_{21} * q_2 - K_{12} * q_1 = 0$$

$$q_2(t) = \frac{K_{21} * q_{1(0)}}{(K_{21}+K_{12})} * (1-e^{-(K_{21}+K_{12})t}) + q_{2(0)}$$

$q_2(t)$=quantité de taurocholate marqué dans le milieu intracellulaire au temps t

-Détermination de la vitesse de transport.

$$Qt = Q1 + Q2 \qquad (3)$$

Qt = quantité de taurocholate non marqué ajoutée dans le milieu de départ(connue).

Q1 = quantité de taurocholate non marqué dans le milieu à l'équilibre

Q2 = quantité de taurocholate non marqué dans les cellules à l'équilibre

$$Q1 = Qt - Q2 \qquad (4)$$

On substitue Q_2 dans (2) à $(Q_t - Q_1)$ dans (4)

$$K_{21} * (Qt - Q1) = K_{12} * Q1$$

La vitesse d'incorporation du taurocholate est :

$V_{12} = K_{12} * Q1$

V_{12} est exprimé en nmoles de taurocholate transportées par minutes et par mg de protéines.

En répétant l'expérience à différentes concentrations en taurocholate, on peut étudier la relation vitesse-concentration, elle est décrite par une hyperbole de type Michaëlis-Menten.

A partir de cette équation la constante d'affinité : Km (µM) et la vitesse maximlale de transport : Vmax (moles/min) peuvent être déterminées.

2.6 Observation des hépatocytes en microscopie.

2.6.1 Microscopie électronique à transmission.

1° Solutions à préparer.

-Glutaraldéhyde 2.5 %
-Acide Osmique 2 %

Les deux solutions sont préparées dans un tampon physiologique (généralement le Cacodylate 0.1 M , pH = 7.2 à 37°C)

2° Protocole.

200 µl de suspension d'hépatocytes (10 * 10^6 cell/ml) sont mélangés à 1 ml de glutaraldéhyde 2.5 % à 37°C. Les hépatocytes ont été préalablement incubés 20 minutes à 37°C dans du Leibovitz L-15 afin de fixer les cellules en conditions physiologiques. Le reste des opérations se fait à température ambiante. Après deux ou trois minutes, la suspension fixée est centrifugée 30 secondes à la microfuge Beckman E^{tm} (13000 rpm). Le culot est récupéré dans un verre de montre contenant un peu de solution de glutaraldéhyde 2.5 % et débité en petits cubes de 1mm de coté. Après trois rinçage de 10 minutes chacun dans le tampon physiologique, une seconde fixation d'une heure dans l'acide osmique est réalisée. Ensuite, les échantillons sont rincés trois fois pendant 10 minutes dans le tampon physiologique. Les échantillons peuvent être conservés dans le dernier milieu de rinçage durant une nuit au frigo.

La suite du travail est réalisée par le laboratoire de microscopie électronique, il consiste en :

- une déshydratation des échantillons à l'alcool
- une inclusion dans l'Epon
- la réalisation de coupes semi-fines et ultrafines
- Un contraste des coupes à l'acetate d'uranyl et au citrate de Plomb.

2.6.2 Observations en microscopie à balayage.

1° Solutions à préparer.

-Glutaraldéhyde 2.5 %

La solution est préparée dans un tampon physiologique (généralement le Cacodylate 0.1 M , pH = 7.2 à 37°C)

2° Protocole.

Un aliquot de la suspension cellulaire (100 à 200 µl) est fixé dans 2.5 ml de glutaraldéhyde. La fixation se fait à 37°C pendant une heure maximum.

Ensuite, les cellules sont filtrées sur un filtre d'argent: La taille des hépatocytes et la surface du filtre sont connues, un nombre adéquat de cellules est filtré de manière à former une monocouche d'hépatocytes sur le filtre d'argent. Le filtre est lavé deux fois et déshydraté par une gradation à l'alcool. Le filtre ne doit jamais être au contact de l'air mais toujours recouvert de liquide (eau ou alcool).

La suite des opérations est confiée au laboratoire de microscopie électronique :

- élimination de la phase liquide en trois étapes :
  1° remplacement de l'alcool (liquide) par du CO_2 liquide
  2° évaporation de la phase liquide (CO_2) en une phase gazeuse (CO_2) par le passage autour du point critique
  3° élimination de la phase gazeuse
- collage des filtres sur un support
- métallisation des filtres par une fine couche d'or.

2.6.3.Observations en microscopie optique.

Les hépatocytes peuvent être observés sur la cellule de Neubauer à un grossissement 1000 X grâce à une technique d'immersion sous huile.

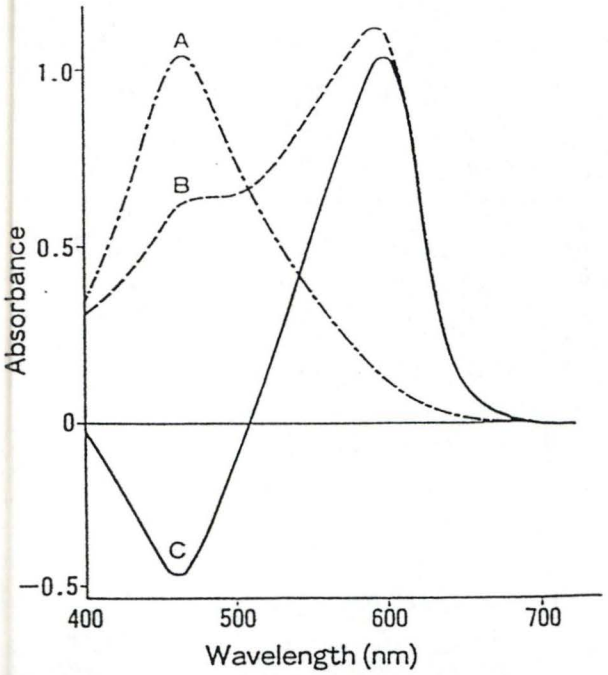


Fig. 1. Absorption spectra of (*A*) reagent, (*B*) a mixture of 4 g/L albumin solution and the reagent, (*C*) the difference between the mixture and the reagent

Table 1. Substances Tested for Potential Interference with Measurement of Protein Concentration

Substance	Concn tested, g/L	Protein concn observed, g/L
None		2.17
Chlorpromazine	0.2	2.19
Ampicillin	0.4	2.14
Caffeine	0.6	2.17
L-Dopa	0.03	2.16
Cefazolin sodium	2	2.17
Latamoxef sodium	8	2.17
Gentamicin sulfate	0.2	2.23
Phosphate, inorg.	2	2.18
Ca^{2+}	2	2.19
Mg^{2+}	4	2.18
Creatinine	3	2.19
Urea	30	2.19
Glucose	40	2.21
Uric acid	4	2.15
Citrate, sodium	0.5	2.13
Oxalate, sodium	0.3	2.17
Ascorbate, sodium	5	2.15
HCl, 2 mol/L	0.04[a]	2.12
NH_3, 0.5 mol/L	0.06[a]	2.26

[a] mL

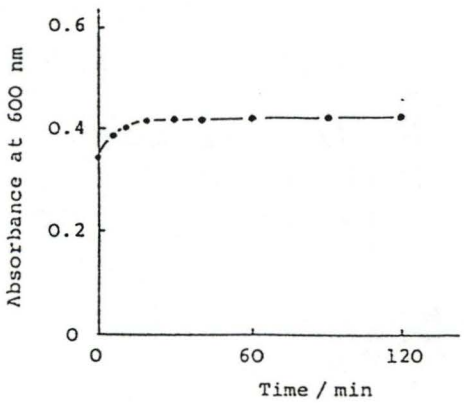


Fig. 2 Effect of standing time on the color reaction

Albumin : 200 µg/10 ml; Mo(VI) : 5.0×10^{-5} M; PR : 1.0×10^{-4} M; gum arabic : 1.0 ml of 2.0 % gum arabic solution/10 ml; pH : 2.5; Reference : solution B.

fig.32, 33, 34 : Fiche technique de la méthode au molybdate rouge de pyrogallol (Fujita 1983, Watanabe 1986).

2.7.Dosage des protéines.

2.7.1.Méthode au réactif de Folin (Miller1959).

1°Solutions à préparer.

-Solution A = 7 ml de Na_2CO_3 14.3% (dans l'eau distillée)
+ 2.5 ml de NaOH 2 N
+ 0.5 ml de tartrate sodico-potassique 20% (dans l'eau distillée)
-Solution B = 1 ml de $CuSO_4$ 0.5% (dans l'eau distillée)
-Solution C = 10 ml de solution A + 1 ml de solution B
-Réactif de Folin = Folin-Ciocalteus Phenolreagenz dilué 11X (dans l'eau distillée)

2°Protocole :

1 ml (ou 0.2) d'échantillon sont incubés 10 minutes à température ambiante en présence de 1 ml (ou 0.2) de solution C. Après ce délai, 3 ml (ou 0.6) de réactif de Folin sont ajoutés et le tout est incubé à 50°C pendant 10 minutes. L'absorbance de cette solution est mesurée à 660 nm et est proportionnelle à la concentration protéique. L'albumine 0.1mg/ml sert d'étalon.

2.7.2.Méthode au molybdate rouge de pyrogallol(fig.32).

1° Méthode standard

3ml de réactif (molybdate rouge de pyrogallol) dilué 4 fois dans l'eau distillée sont incubés 15 minutes à température ambiante avec 50 µl d'échantillon à doser. L'absorbance de la solution est mesurée à 598 nm et est proportionnolle à la concentration protéique. L'albumine 1mg/ml sert d'étalon.

2° Microméthode

750 µl de réactif non dilué sont incubés 15 minutes à température ambiante avec 2.5 ml d'échantillon à doser. L'absorbance de cette solution est mesurée à 598 nm et est proportionnolle à la concentration protéique.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Avant d'interpréter les modifications d'activité métabolique des hépatocytes cryopréservés, il est nécessaire de caractériser la suspension d'hépatocytes fraîchement isolés (hépatocytes témoins). Trois approches différentes et complémentaires permettent cette caractérisation: la première estime l'intégrité membranaire des hépatocytes, la seconde quantifie l'activité métabolique des cellules gràce à leur capacité à transporter le taurocholate. La troisième approche consiste en un examen de l'ultrastructure de la cellule en microscopie électronique.

3.1.LES HEPATOCYTES FRAICHEMENT ISOLES.

3.1.1.Intégrité membranaire.

3.1.1.1.Exclusion du colorant vital.

Il est possible de réaliser simultanément le test d'exclusion du colorant vital et l'estimation de la densité cellulaire (§ 2.5.1.). L'expérience est réalisée pour 18 suspensions d'hépatocytes isolés à partir de 18 rats. La proportion de cellules viables dans une suspension d'hépatocytes fraîchement isolés varie entre 80 et 90 % (fig.35) (moyenne = 84.61 +/- 5.66 n = 18).

La densité optimale pour la cryopréservation des hépatocytes isolés et mis en suspension est de 6.5 * 10^6 cellules/ml (Novicki 1982). Fuller (1985) conseille de ne pas dépasser une densité de 10 * 10^6 cellules/ml. La densité cellulaire est ajustée après l'étape de filtration-purification (§2.3.4.) avec le tampon Krebs-Ringer-bicarbonate-Ca^{++} (stockage).

3.1.1.2.Libération d'enzymes cytoplasmiques.

En déterminant le rapport entre l'activité enzymatique dans le cytoplasme et l'activité enzymatique totale, nous pouvons suivre la libération de certains enzymes par les cellules, c'est à dire l'évolution de l'intégrité membranaire au cours du temps (§1.2.2.2. & §2.5.2.). Les hépatocytes sont incubés à 37°C dans un milieu nutritif (le Leibovitz: L-15) pendant une heure. Deux aliquots (duplicats) sont prélevés après O, 30 et 60 minutes d'incubation. Nous mesurons alors l'activité de la lactate deshydrogénase (LDH).

Une diminution minime de l'intégrité membranaire (3% en 1 heure) (fig. 36) suggère que les cellules conservent leur structure membranaire plus ou moins intacte durant une heure d'incubation à 37°C.

RAT (No)	% DE VIABILITE DES HEPATOCYTES ISOLES ET MIS EN SUSPENSION
1	85
2	86
3	80
4	85
5	81
6	86
7	86
8	86
9	83
10	86
11	89
12	86
13	85
14	80
15	80
16	88
17	86
18	88
MEAN	84,8
STD()	2,8

fig.35 : Estimation de la viabilité de 18 suspensions d'hépatocytes isolés à partir de 18 animaux différents (test d'exclusion du colorant vital).

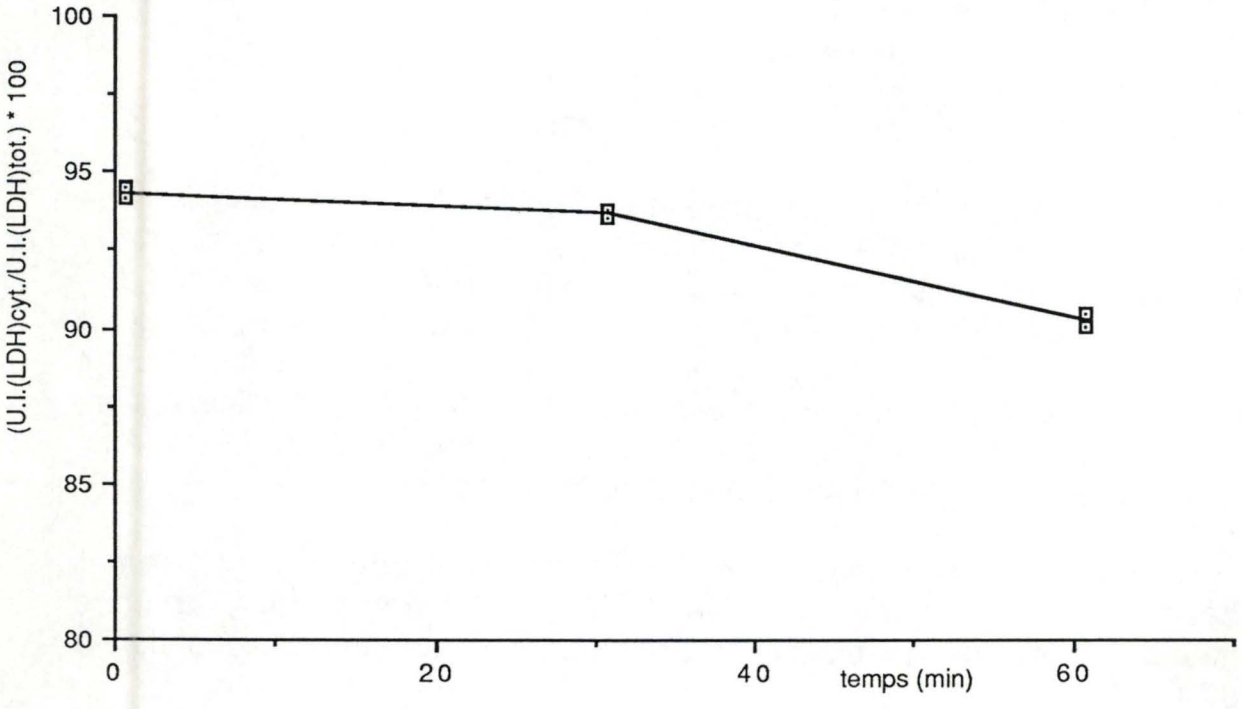


fig.36 : estimation de la viabilité de la suspension d'hépatocytes isolés (test de libération de LDH cytoplasmique).

3.1.2.Intégrité métabolique.

3.1.2.1. Transport du taurocholate.

Le transport du taurocholate est caractérisé par deux paramètres: la vitesse maximale de transport (Vmax) et la constante d'affinité des transporteurs spécifiques (Km).

Nous réalisons, à l'état stationnaire, une série de cinétiques d'incorporation de l'acide biliaire en fonction du temps. Et cela, pour différentes concentrations en taurocholate extracellulaire.

La relation vitesse-concentration est assimilable à une relation de type Michaëlis-Menten. Le détail de la détermination des valeurs de Vmax et Km est donné en annexe.

La relation vitesse-concentration a été estimée à partir de 10 à 15 cinétiques pour trois rats.

La vitesse maximale est d'environ 2 nmoles * min^{-1} * mg^{-1} (moyenne = 2.09 +/- 0.23 n = 3) et la constante d'affinité s'élève à environ 4 µM (moyenne = 3.96 +/- 2.35 n= 3) (fig. 37, 38, 39).

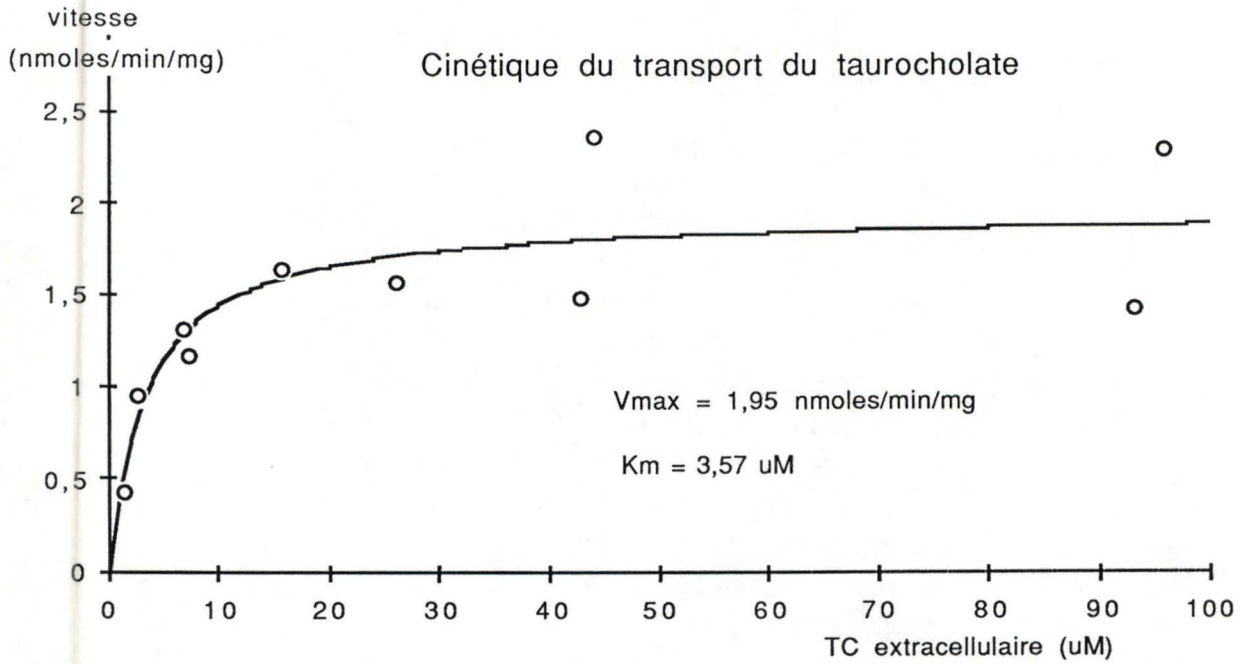


fig.37 : Transport du taurocholate à l'état stationnaire.
Relation vitesse-concentration
(rat 1 : hépatocytes témoins).

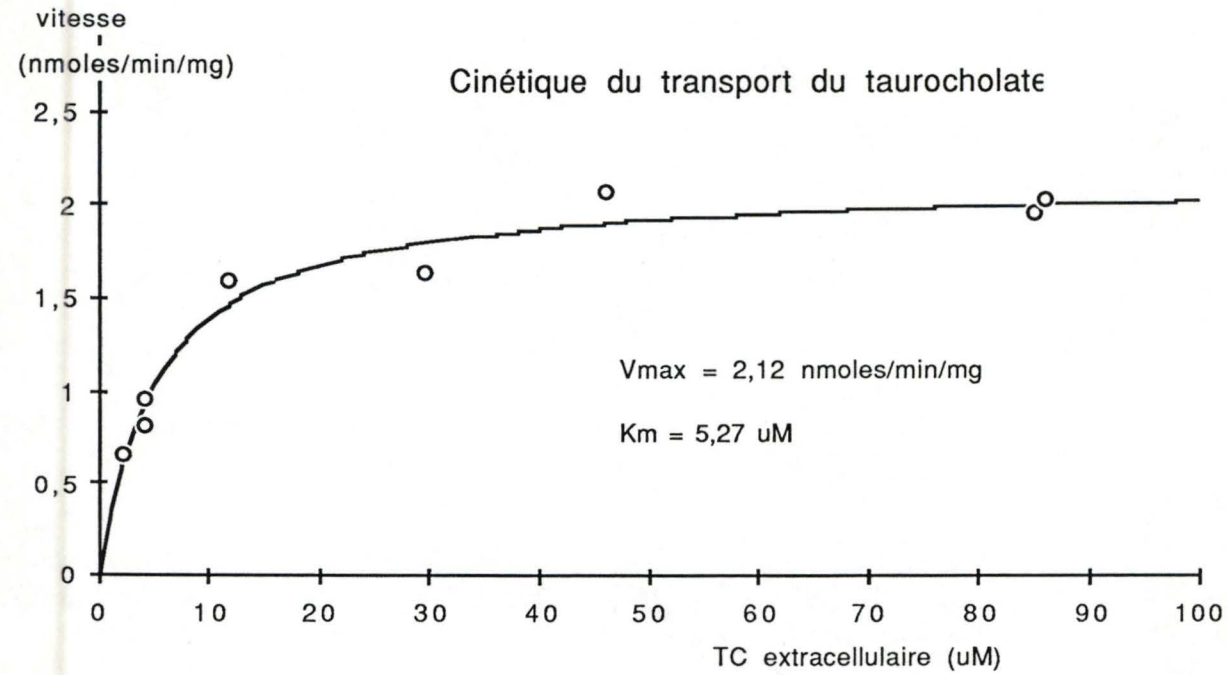


fig.38 : Transport du taurocholate à l'état stationnaire.
Relation vitesse-concentration
(rat 2 : hépatocytes témoins).

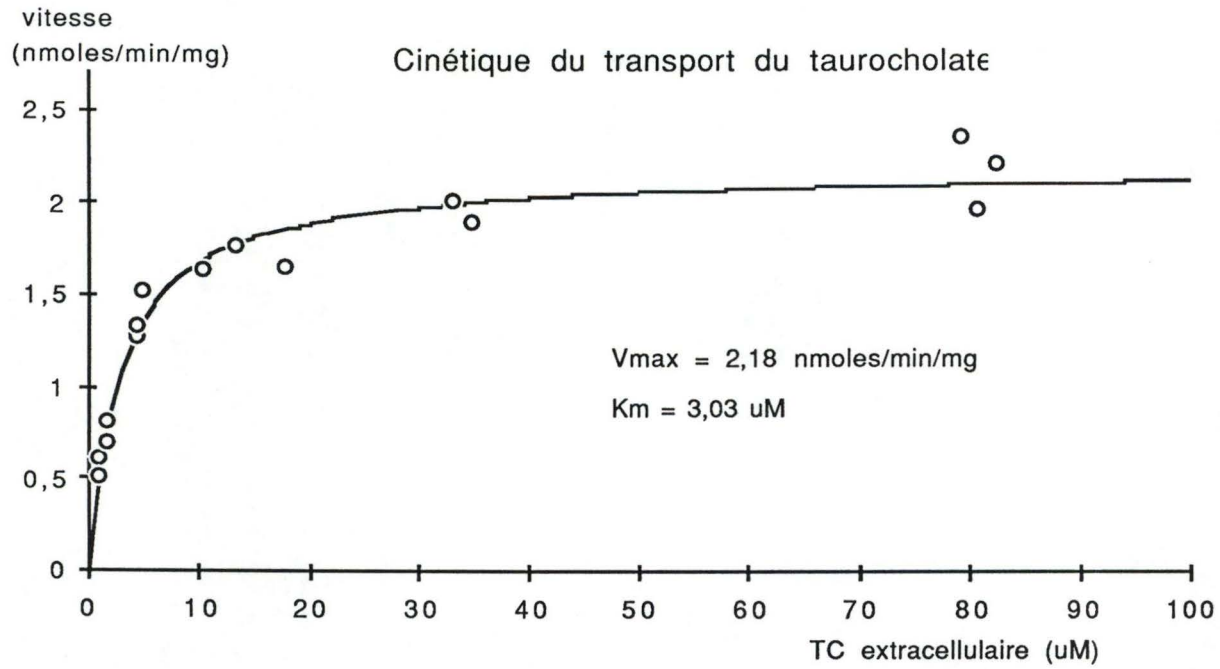


fig.39 : Transport du taurocholate à l'état stationnaire.
Relation vitesse-concentration
(rat 3 : hépatocytes témoins).

3.1.3.Examen morphologique des hépatocytes témoins.

L'observation de la suspension d'hépatocytes a été réalisée de manière qualitative et non quantitative. Les hépatocytes proviennent de deux rats: l'un est utilisé pour les observations en microscopie électronique à transmission, l'autre pour les observations en microscopie électronique à balayage. Quelques prises de vues ont été faites de façon à appuyer les résultats des tests d'intégrité membranaire.

Avant la fixation, les hépatocytes sont incubés 20 minutes à 37°C dans du Leibovitz (L-15) afin d'observer des cellules en conditions physiologiques (§2.6.1.2.).

3.1.3.1.Microscopie électronique à transmission.

Les hépatocytes fraîchement isolés ne présentent pas d'altérations morphologiques graves (fig.40 a, b, c, d, e, f), cependant, quelques cellules sont atypiques. Cette faible proportion de cellules atypiques pourrait être dues aux conditions d'isolement et de fixation des cellules (Fuller 1982). L'observation des micrographies fait l'objet d'une discussion ultérieure.

3.1.3.2.Microscopie électronique à balayage.

La microscopie électronique à balayage nous donne peu de renseignements vitaux mais nous permet cependant de visualiser la membrane plasmique.

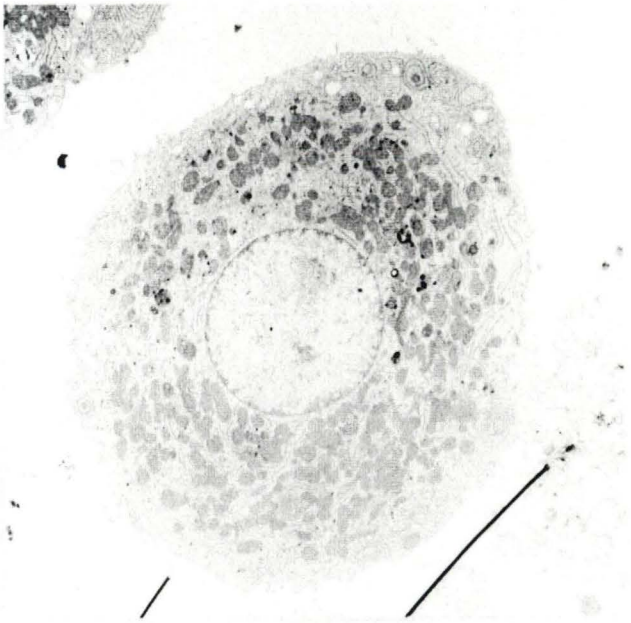
Nous observons une membrane plasmique hérissée de microvillosités. Quelques cellules ont leur membrane déchirée sur une surface plus ou moins grande (fig.41 g, h). Nous discuterons de ces micrographies plus loin.

fig.40 : Micrographies en microscopie électronique à transmssion de la suspension d'hépatocytes témoins.

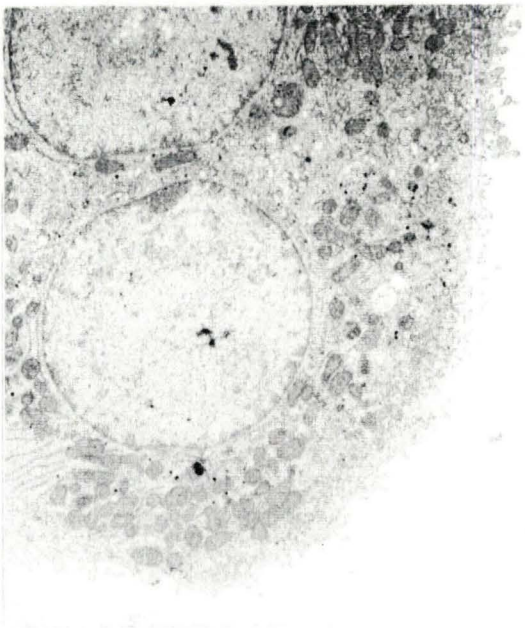
A : vue générale d'un hépatocyte (X3000)
B : vue générale d'un hépatocyte (X4500)
C : mitochondries et reticulum (X40000)
D : membrane plasmique (X27000)
E : mitochondrie (X62000)
F : membrane et pore nucléaire (X89000).

fig.41 : Micrographies en microscopie électronique à balayage de la suspension d'hépatocytes témoins.
G : vue générale de la suspension (X1000)
H : vue générale d'un hépatocyte (X10800).

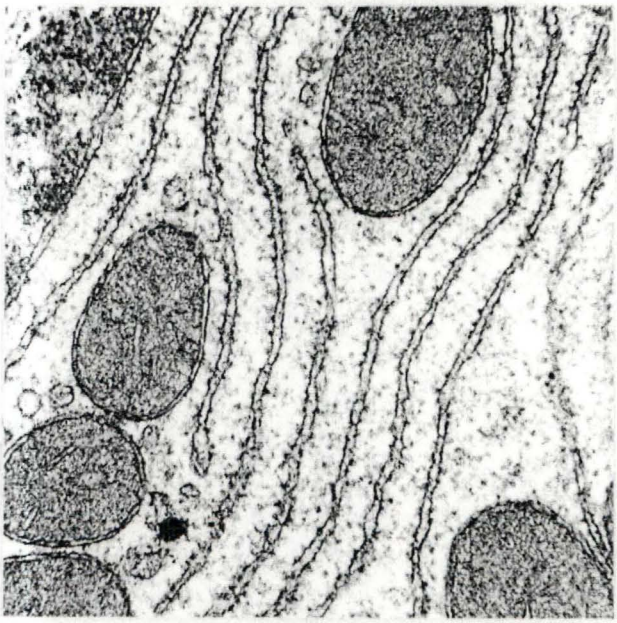
FIG.40



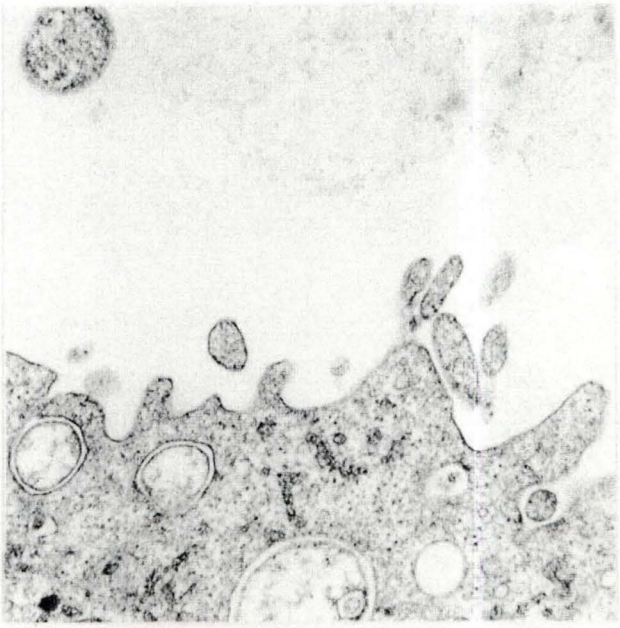
A



B



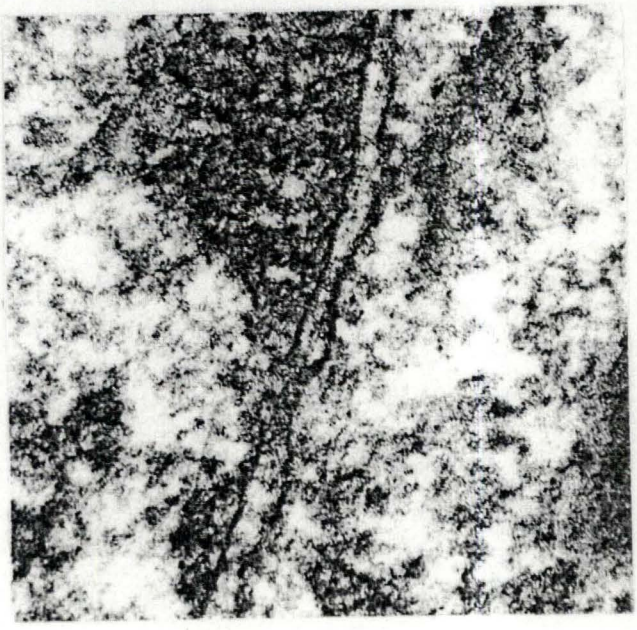
C



D

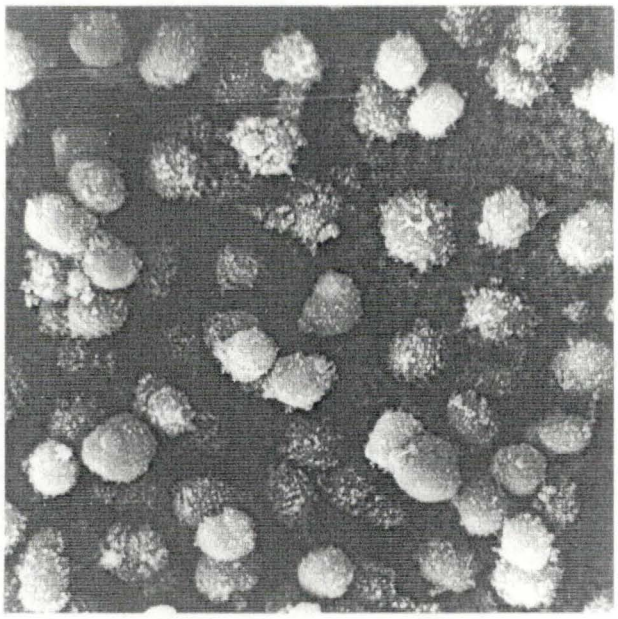


E

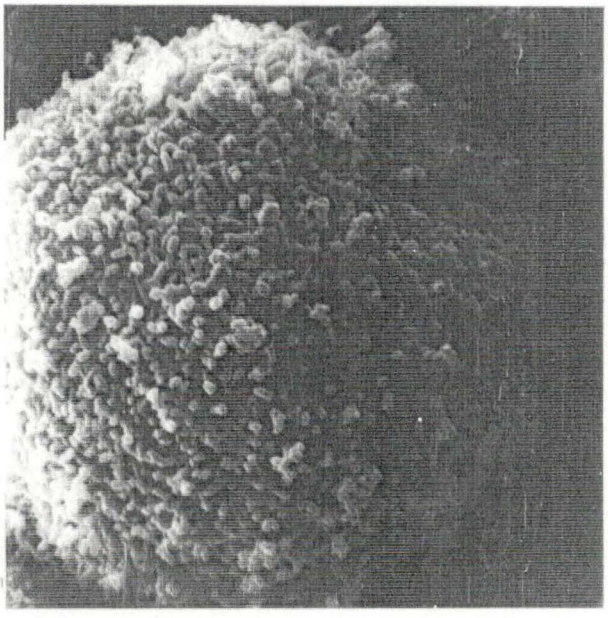


F

FIG. 41



G



H

Après avoir caractérisé la suspension d'hépatocytes témoins, et avant d'estimer les modifications de viabilité de la suspension d'hépatocytes cryopréservés, nous déterminons les pertes de matériel biologique inhérentes au protocole de cryopréservation.

3.2.LES HEPATOCYTES CRYOPRESERVES.

3.2.1.Matériel biologique perdu lors des changements de milieu d'incubation.

Une centrifugation (75gmin) de la suspension cellulaire sépare le culot d'hépatocytes du surnageant, formé par le milieu d'incubation.

Notre protocole de cryopréservation comporte quatre centrifugations successives. Chacune est suivie de l'élimination de la totalité (ou d'une partie) du milieu d'incubation (§2.4.2.). Or, les cellules dont la membrane est déchirée ne sédimentent pas mais restent en suspension dans le milieu. Par conséquent, l'élimination du milieu d'incubation (le surnageant) provoque une perte de matériel biologique. Celle-ci est estimée par la quantité de protéines solubilisées dans le milieu d'incubation à éliminer.

Les protéines solubles proviennent d'hépatocytes dont la membrane s'est déchirée. En conséquence, la quantité de protéines solubles dans le milieu d'incubation est un indicateur de la perte de l'intégrité membranaire.

Les dosages protéiques des culots et surnageants obtenus après centrifugation de la suspension nous permettent :

-de déterminer les étapes du protocole les plus létales pour la suspension d'hépatocytes.

-de quantifier la perte de matériel biologique au cours du protocole de cryopréservation

La figure 42 exprime la fraction de protéines présentent dans le culot et dans le surnageant (en pourcent par rapport a la quantité totale de protéines).

Lorsque les hépatocytes sont en suspension dans le tampon KRB,10 à 15 % des protéines cytoplasmiques sont libérées dans le milieu.

La phase d'équilibration à 0°C dans le tampon KRB-DMSO (20% W/V) s'avère plus dommageable pour les hépatocytes que l'équilibration à -7°C (suivie du stockage à -13°C) dans le tampon K^+-Tricine-DMSO (30% W/V).

Après un réchauffement de 10 minutes à 37°C dans du KRB-Glucose (1M), une quantité importante de protéines solubles (17% des protéines totales) reflète une mortalité élevée.

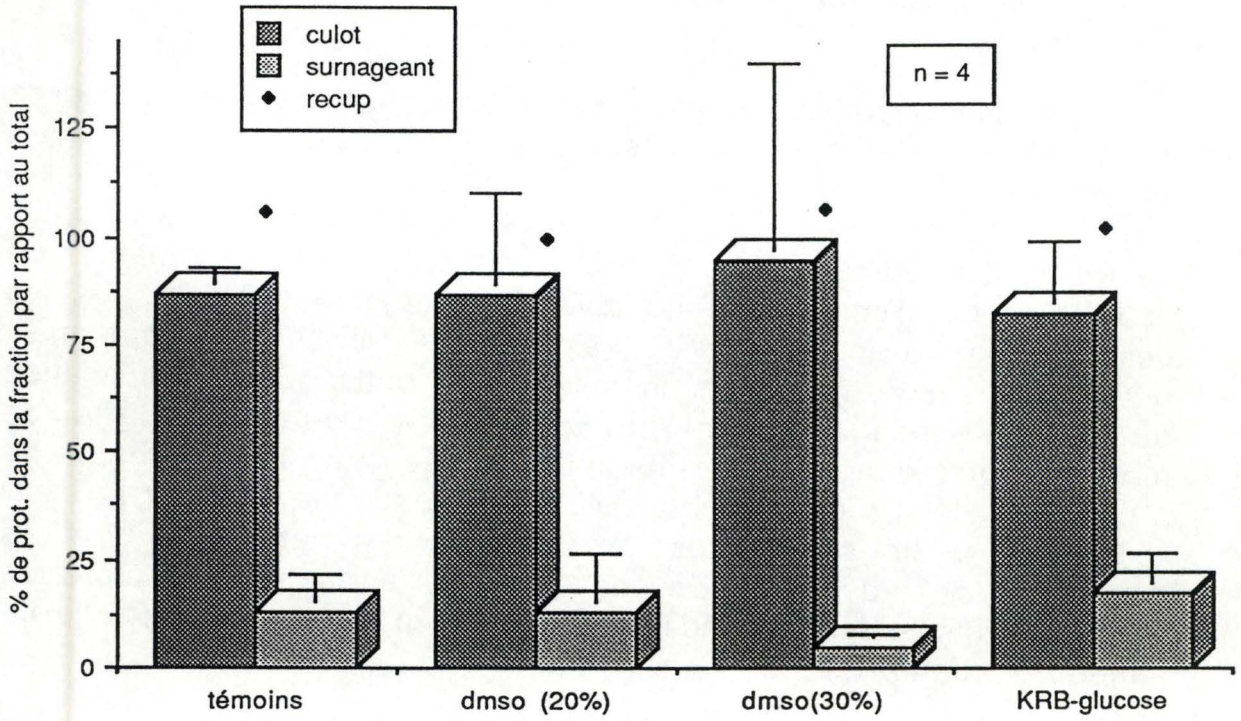


fig.42 : fraction de protéines présente dans le milieu d'incubation à remplacer (en %par rapport à la quantité de protéines totales).

A partir de ces résultats, la perte de matériel biologique a été estimée. La figure 43 illustre la quantité de protéines restant après chaque élimination d'un milieu d'incubation (en pourcent par rapport à la quantité totale de protéines de la suspension d'hépatocytes témoins).

Environ 40% du matériel biologique est perdu lors d'une cryopréservation à -13°C en milieu liquide.

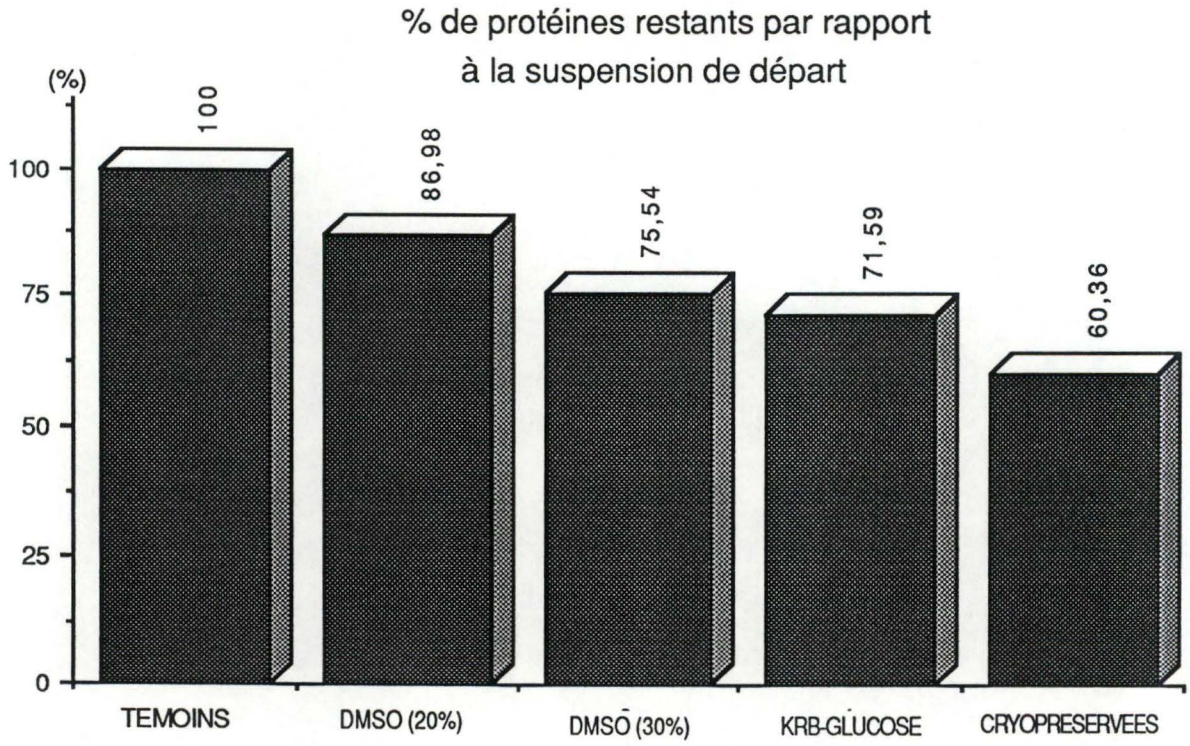


fig.43 : Perte de matériel biologique au cours du protocole de cryopréservation. Les résultats sont exprimés en %de protéines restant par rapport à la suspension de départ.

Dans les § 3.2.2. et 3.2.3., nous caractérisons la suspension d'hépatocytes cryopréservés grâce aux tests d'intégrité membranaire et métabolique précédemment employés pour les hépatocytes témoins. Dans le § 3.2.4., un examen de l'ultrastructure des hépatocytes complète la caractérisation des cellules cryopréservées.

3.2.2.Intégrité membranaire

3.2.2.1.Exclusion du colorant vital

Le test est réalisé pour 10 suspensions d'hépatocytes cryopréservés provenant de 10 rats. La proportion de cellules excluant le colorant vital dans une population d'hépatocytes cryopréservés varie entre 70 et 80% (fig.44) (moyenne = 74.3 +/- 9.84 n = 10).

3.2.2.2.Libération d'enzymes cytoplasmiques

Les hépatocytes cryopréservés sont incubés dans du Leibovitz (L-15) à 37°C pendant une heure. La libération de LDH dans le milieu permet d'estimer l'évolution de l'intégrité membranaire. Celle-ci est déterminée pour trois populations d'hépatocytes provenant du même animal: hépatocytes témoins, hépatocytes cryopréservés 30 minutes (fig.45) et hépatocytes cryopréservés 24 heures (fig.46).

Nous constatons que

1° la viabilité de départ est différente pour les trois populations d'hépatocytes.
-témoins: 94%
-cryopréservés 30 minutes: 88%
-cryopréservés 24 heures: 83%

2° Tout comme la population d'hépatocytes témoins, les populations d'hépatocytes cryopréservés libèrent environ 3% de leurs enzymes cytoplasmiques pendant une heure d'incubation.

RAT (No)	% DE VIABILITE DES HEPATOCYTES	
	TEMOINS	CRYOPRESERVES
1	86	85
2	86	72
3	80	68
4	85	72
5	81	73
6	86	75
7	86	80
8	86	74
9	83	70
10	83	74
MEAN	84,2	74,3
STD()	2,30	4,92

fig.44 : Estimation de la viabilité de 10 suspensions d'hépatocytes cryopréservés (isolés à partir de 10 animaux différents) (test d'exclusion du colorant vital).

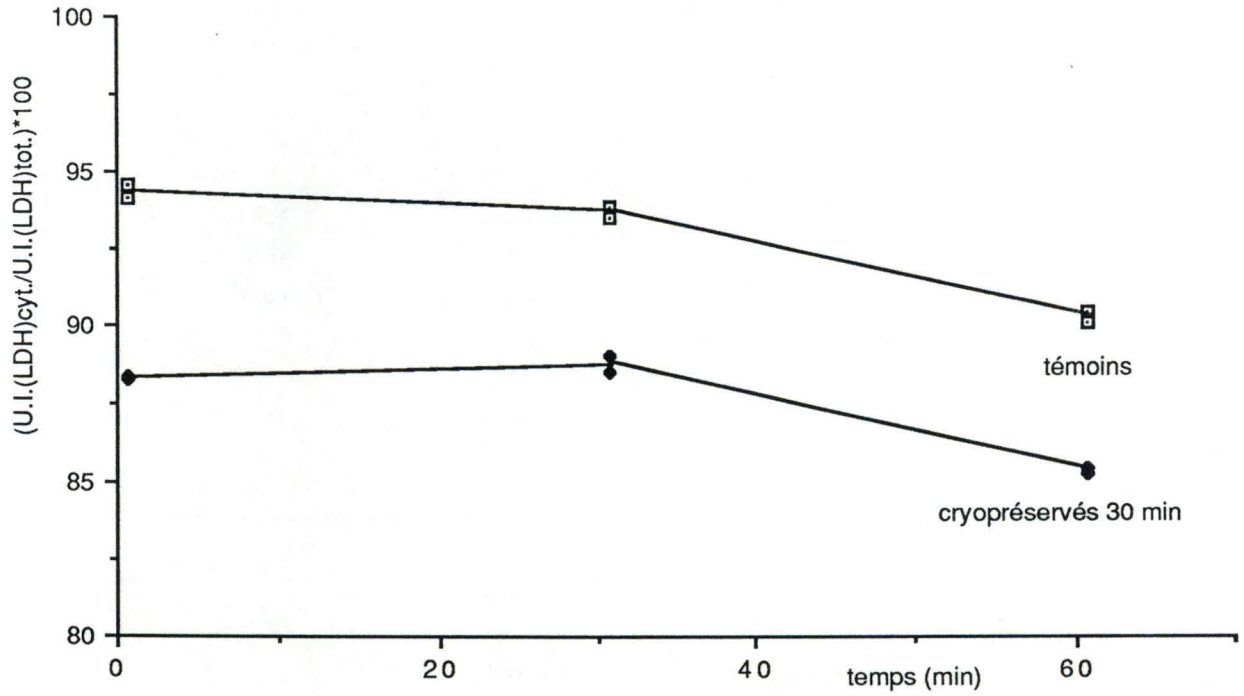


fig.45 : estimation de la viabilité de la suspension d'hépatocytes isolés et cryopréservés 30 minutes (test de libération de LDH cytoplasmique).

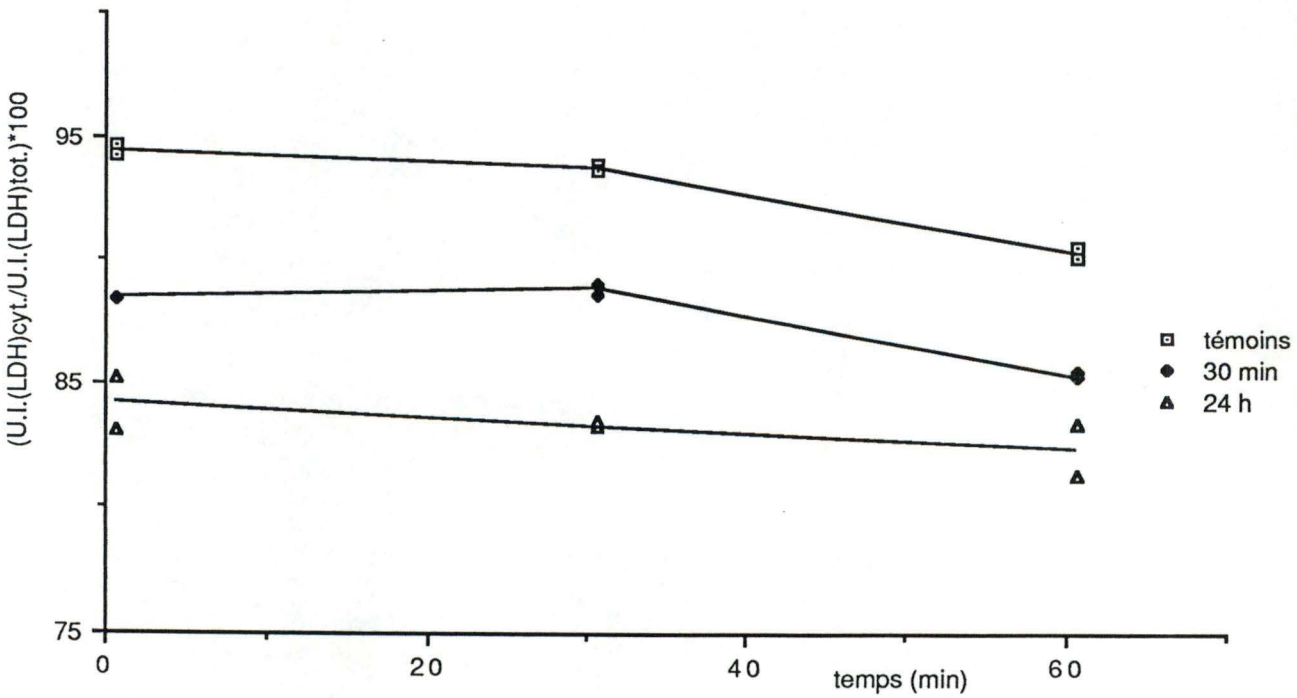


fig.46 : estimation de la viabilité de la suspension d'hépatocytes isolés et cryopréservés 24 heures (test de libération de LDH cytoplasmique). Comparaison par rapport aux témoins et aux cryopréservés 30 minutes.

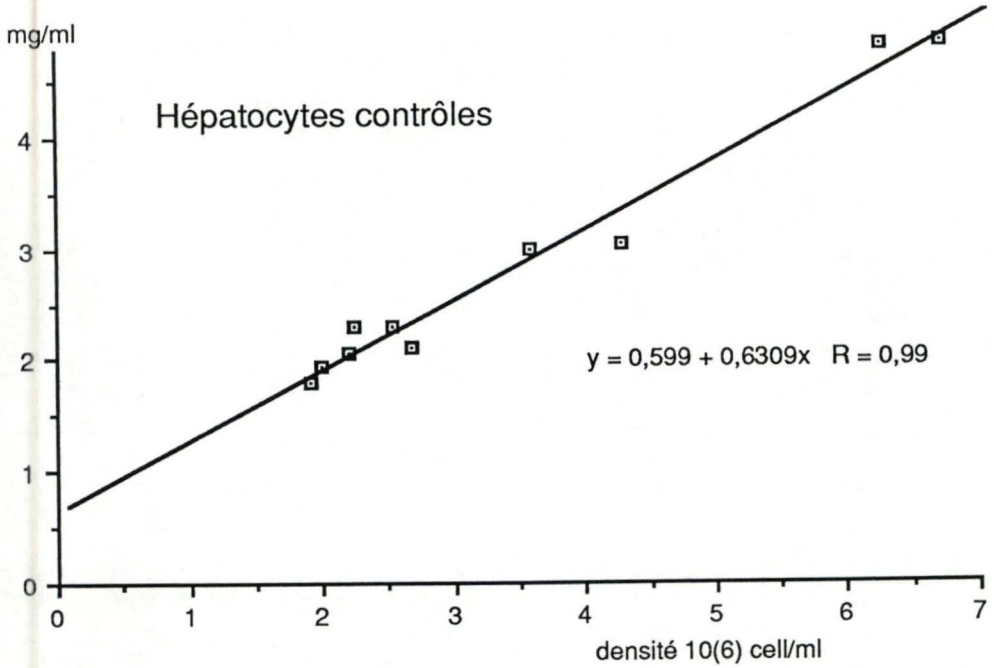


fig.47a : relation entre la concentration protéique et la densité cellulaire d'une suspension d'hépatocytes témoins.

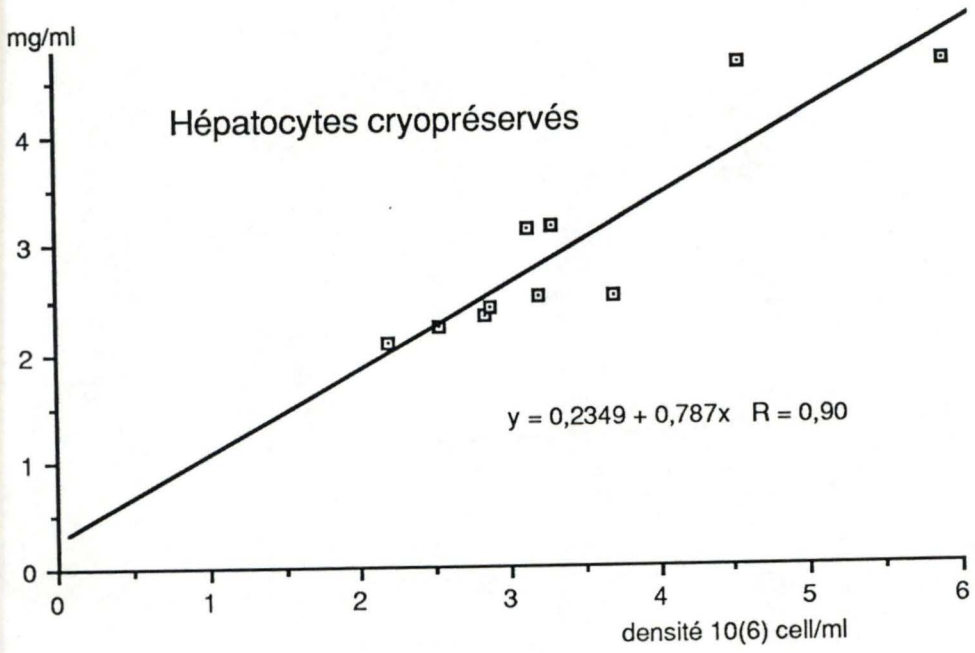


fig.47b : relation entre la concentration protéique et la densité cellulaire d'une suspension d'hépatocytes cryopréservés.

3.2.3.Intégrité métabolique.

3.2.3.1.Transport du taurocholate.

a.Problèmes de standardisation des résultats

Les vitesses de transport de l'acide biliaire s'expriment en nmoles de taurocholate transportées par minute. Afin de les standardiser, les valeurs de vitesse sont divisées par un nombre proportionnel à la quantité de cellules. En effet, la quantité de cellules transportant l'acide biliaire varie d'une expérience à l'autre.

Le plus naturel est de standardiser par mg de protéines de la suspension. En effet, les figures 47a et 47b montrent que la densité cellulaire est directement proportionnelle à la concentration protéique de la suspension d'hépatocytes témoins ou cryopréservés.

De plus, le dosage protéique allie rapidité et précision.

Cependant, différents arguments sont défavorables à la standardisation par mg de protéines de la suspension:

1°Comme la suspension de départ est fragmentée en plusieurs fioles d'incubation, les prélèvements pourraient ne pas être homogènes et identiques. Chaque fiole pourrait contenir des quantités de protéines différentes.

2°La concentration protéique totale ne reflète pas la même quantité d'hépatocytes intacts d'un point de vue membranaire dans une suspension d'hépatocytes témoins et cryopréservés.

Les tests d'intégrité membranaire montrent que la suspension d'hépatocytes cryopréservés abrite une proportion plus importante de cellules dont la membrane est déchirée. Par conséquent, la concentration protéique totale surestime le nombre de cellules intactes d'un point de vue membranaire et cela d'une manière plus importante dans le cas de la suspension d'hépatocytes cryopréservés.

3°Au cours d'une incubation en présence de taurocholate, la perte de l'intégrité membranaire est plus importante qu'en absence de l'acide biliaire.

La figure 48 illustre cette perte d'intégrité membranaire pour deux suspensions d'hépatocytes témoins et deux suspensions d'hépatocytes cryopréservés (provenant du même animal).

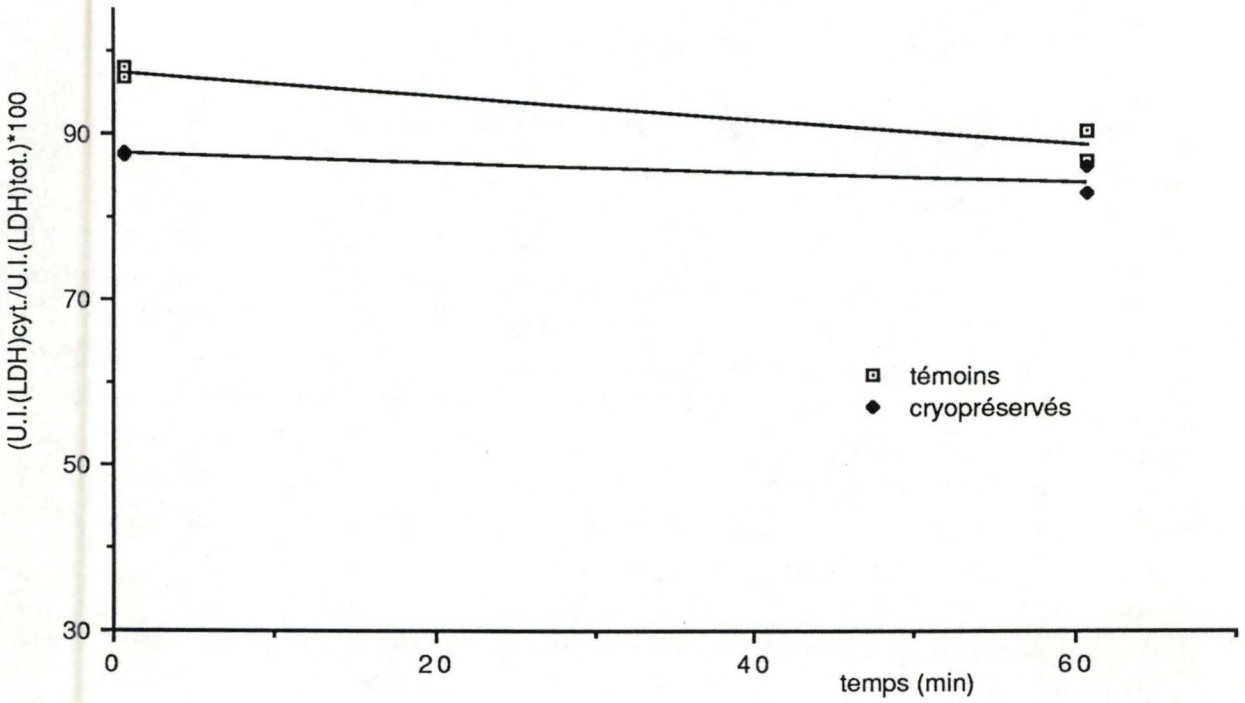


fig.48 : Evolution de la viabilité des cellules témoins et cryopréservées lors d'une incubation en présence de taurocholate. test de libération de LDH.

b.Alternative

Devant ces arguments défavorables, il a fallu s'orienter vers une autre méthode de standarisation. Les valeurs de vitesse doivent être divisée par un nombre proportionnel à la quantité de cellules membranairement intactes contenues dans la fiole d'incubation.

Une centrifugation (75gmin) permet d'isoler un culot cellulaire (les hépatocytes entouré d'une membrane) et un surnageant (le milieu et les contenus cellulaires libérés par les cellules abimées).

Un dosage protéique et/ou enzymatique du culot cellulaire permet d'estimer le nombre de cellules membranairement intactes dans la fiole d'incubation. Il aboutit à une standardisation adéquate des valeurs de vitesse de transport de l'acide biliaire.

LA TENEUR EN PROTEINES DES CELLULES DU CULOT

Plusieurs difficultés ont été rencontrées lors du dosage protéique du culot cellulaire:

Le milieu nutritif (Leibovitz + glutamine) interfère avec la méthode de dosage des protéines par le réactif de Folin. La concentration protéique est donc déterminée par la méthode au molybdate rouge de pyrogallol.

Cette technique, moins sensible que celle utilisant le réactif de Folin donne des résultats assez variables et nécessite l'emploi de triplicats. De plus, la méthode de dosage standard (§2.7.2) n'est pas assez sensible pour doser les protéines solubilisées dans le milieu d'incubation. L'emploi de la microméthode de dosage (détectant jusqu'à 1µg/ml) permet de doser le surnageant mais nécessite un volume d'échantillon important (2.5 ml).

Devant cette impasse, nous devons augmenter la quantité de matériel biologique dans les fioles d'incubation:

-soit en augmentant la densité cellulaire

-soit en travaillant avec de plus grands volumes d'incubation. L'augmentation de la densité cellulaire mène à un épuisement du milieu d'incubation et à une accumulation de déchêts toxiques perturbant l'incorporation du taurocholate.

Nous décidons de travailler avec de plus grands volumes d'incubation (2.5 fois plus importants) tout en gardant une densité cellulaire voisine de 1 à 2 10^6 cellules/ml. Pour de tels volumes une agitation latérale automatique ne rend pas le milieu suffisament homogène. Nous compensons cela par une agitation manuelle aussi régulière que possible.

Viabilité des suspensions d'hépatocytes témoins
lors des incubations en présence de taurocholate

(même expérience que fig.39)

TC extracell (uM)	LDH cyt. * 100 / LDH tot.
82,2	80,2
33,0	86,3
4,9	85,4
1,8	85,7
1,0	89,5
80,6	88,7
34,7	94,2
4,5	86,2
1,7	85,9
78,9	88,0
17,7	92,3
13,4	90,6
0,9	91,6
4,4	92,9
10,4	91,3

fig.49 : Viabilité des suspensions d'hépatocytes témoins réalisant le transport du taurocholate (même expérience que fig. 39).

L'imprécision de nos résultats nous fait penser que malgré l'agitation manuelle complétant l'homogénéisation mécanique, les aliquots ne sont pas prélévés, au cours du temps, dans une suspension homogène. Nous nous orientons vers un dosage enzymatique du culot cellulaire.

TENEUR EN ENZYMES CYTOPLASMIQUES DES CELLULES DU CULOT

Nous dosons la quantité de lactate deshydrogénase des cellules du culot. Les avantages sont une plus grande sensibilité du dosage et l'utilisation de volumes réduits.

Par conséquent, nous ne devons plus craindre une homogénéisation incorrecte du milieu.

Le dosage enzymatique des cellules du culot nous apporte de plus une estimation de la viabilité de la suspension (fig.49):

$$\text{Viabilité} = \frac{\text{U.I.(LDH) des cellules du culot}}{\text{U.I.(LDH) totale}}$$

Remarque:

Dans un premier temps, nous réchauffions les hépatocytes cryopréservés 10 minutes à 37°C et les maintenions à 0°C jusqu'au moment de leur utilisation. Mais, de faibles valeurs de vitesse d'incorporation du taurocholate ont confirmé que les cellules cryopréservées ne se conservent pas aussi bien dans la glace que les cellules fraichement isolées. En conséquence, nous avons conservés les hépatocytes à -13°C jusqu'au moment de leur utilisation.

Suite à des impératifs techniques:

-la mauvaise conservation des hépatocytes cryopréservés à 0°C

-l'obligation de réaliser deux cinétiques d'incorporation du taurocholate le même jour à partir du même animal (pour diminuer la variabilité des résultats)

la durée de stockage à -13°C est portée à 1h30.

c.Paramètres cinétiques de l'incorporation du taurocholate pour des hépatocytes cryopréservés.

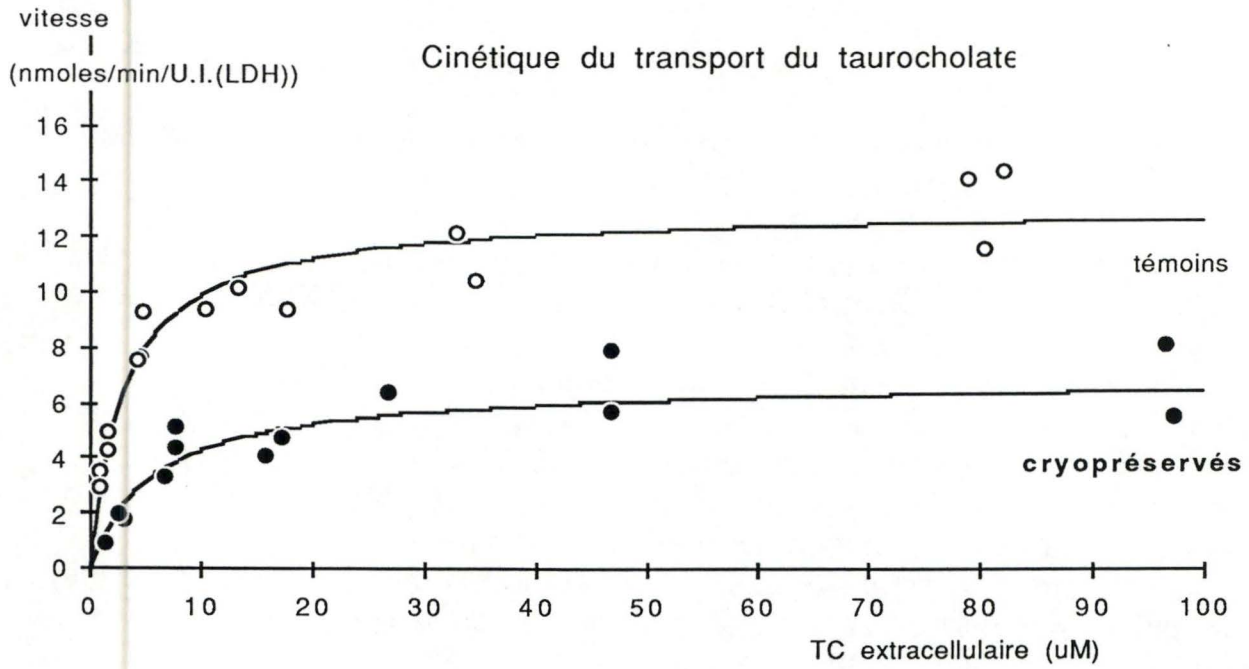
Deux suspensions d'hépatocytes (provenant de deux rats différents) sont cryopréservées 1h30 à -13°C. Suite à cette cryopréservation, les paramètres cinétiques du transport du taurocholate (Vmax et Km) sont modifiés (fig.50a,50b). La vitesse maximale est diminuée de 52 et 61%. La constante d'affinité est augmentée de manière fort variable: 88 et 20%.

Des temps de cryopréservation plus longs (5h et 24h) ont été testé sur deux suspensions provenant du même animal.

Lorsque le temps de cryopréservation est porté à 5h, les modifications des valeurs de Vmax sont proches de celles observées lors d'un stockage d'une durée de 1h30. En effet, Vmax est diminué de 60% (fig.51). Une valeur de Km anormalement élevée pour les témoins ne nous permet pas d'estimer les modifications de l'affinité des transporteurs.

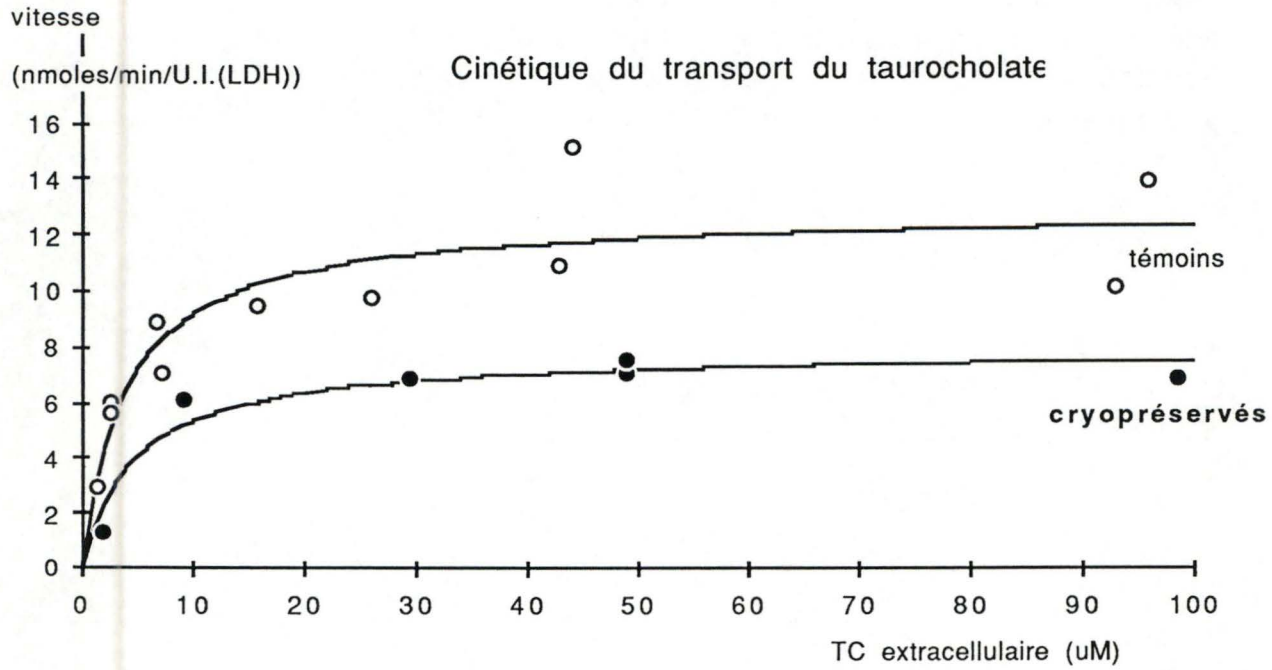
Un temps de cryopréservation de 24h semble plus dommageable pour les hépatocytes. Bien que la vitesse maximale de transport (Vmax) se stabilise à une valeur diminuée de 50% par rapport aux témoins, la constante d'affinité est fortement augmentée (Km = 17.3) (fig.51).

En conclusion, même les hépatocytes cryopréservés intacts d'un point de vue membranaire semble altérés par le protocole de cryopréservation. Ces altérations se marquent tant au niveau du nombre de transporteurs de l'acide biliaire (Vmax est diminuée) qu'au niveau de l'affinité de ces derniers (Km est augmentée).



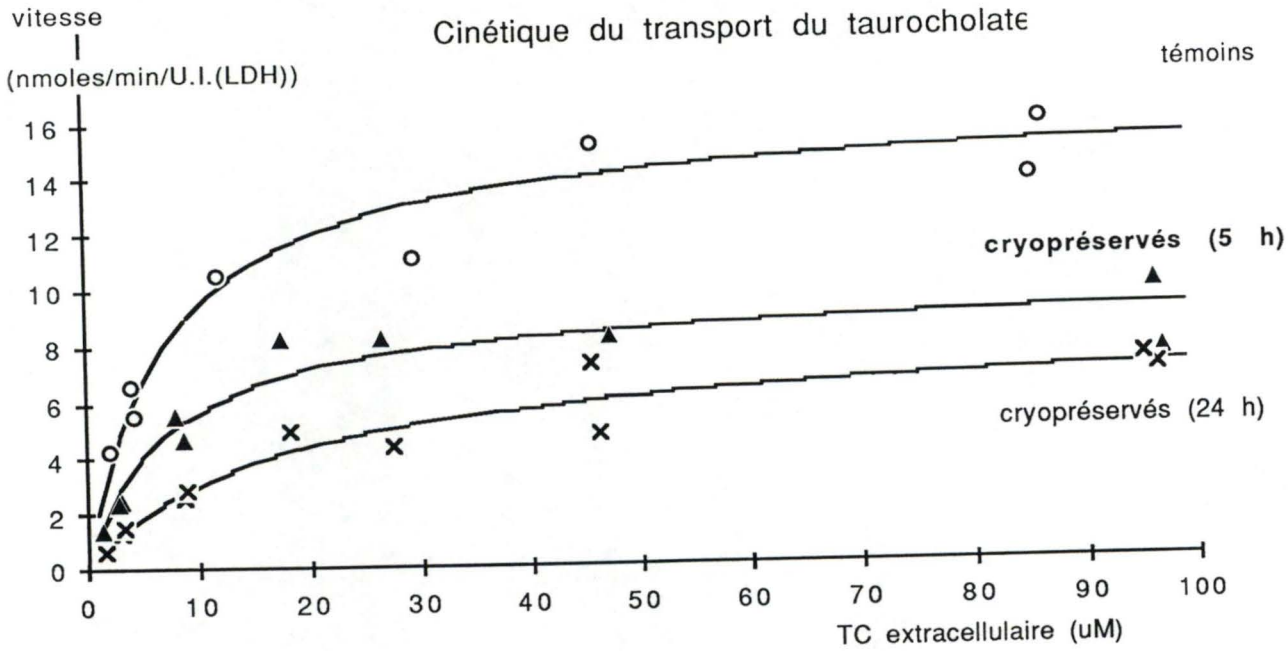
	témoins	cryopréservés 1h30
Vmax =	13.02	6.82
Km =	3.17	5.96

fig.50 a : Transport du taurocholate à l'état stationnaire. Relation vitesse - concentration (rat 1 : hépatocytes témoins et cryopréservés).



	témoins	cryopréservés 1h30
Vmax =	12.82	7.88
Km =	3.94	4.74

fig.50 b : Transport du taurocholate à l'état stationnaire. Relation vitesse - concentration (rat 2 : hépatocytes témoins et cryopréservés).



	témoins	cryopréservés 5h	cryopréservés 24h
Vmax =	16.32	9.75	8.24
Km =	7.35	7.23	17.30

fig.51 : Transport du taurocholate à l'état stationnaire.
Relation vitesse - concentration
(hépatocytes témoins, cryopréservés 5heures et 24 heures).

3.2.4.Examen morphologique des hépatocytes cryopréservés

Les suspensions d'hépatocytes témoins (§3.1.3.) et cryopréservés (§3.2.4.) proviennent d'un même rat, afin de diminuer la variabilité des résultats.

3.2.4.1.Microscopie électronique à transmission.

La proportion de cellules atypiques dans une suspension d'hépatocytes cryopréservés est plus importante que dans la suspension d'hépatocytes témoins. Les dégâts recensés sont très généraux et ne sont pas localisés à un seul compartiment subcellulaire (fig.52 i, j, k, l). La majorité des hépatocytes cryopréservés a l'apparence de cellules hépatiques morphologiquement intactes. Cela laisse supposer que, d'un point de vue ultrastructurel, une proportion d'hépatocytes n'est pas altérée par le stockage à -13°C.

Nous avons pu mettre en évidence l'apparition de boursoufflures non hérissées de microvillosités (blebs) sur les hépatocytes cryopréservés (fig.52 m, n). Ce type d'altération est cependant rare.

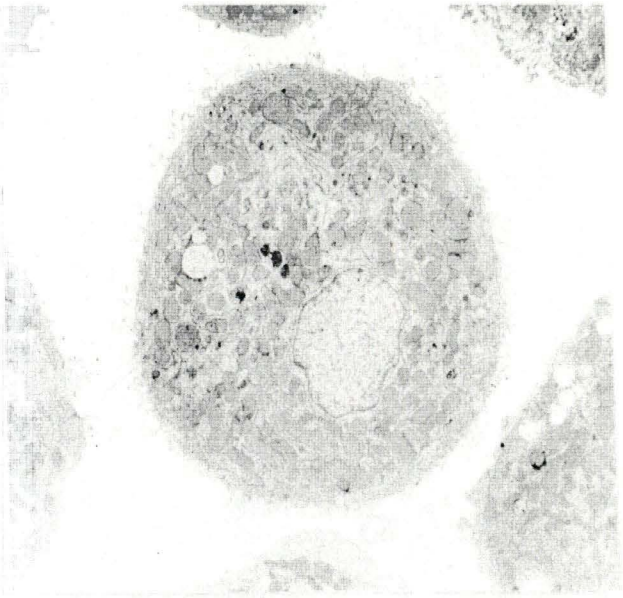
3.1.4.2.Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage nous donne peu de rensignements vitaux mais permet d'observer l'aspect extérieur des cellules. Nous observons une membrane plasmique hérissée de microvillosités et confirmons la présence, sur certaines cellules, de déformations membranaires (blebs) dépourvues de microvillosités (fig.54 o, p, q, r).

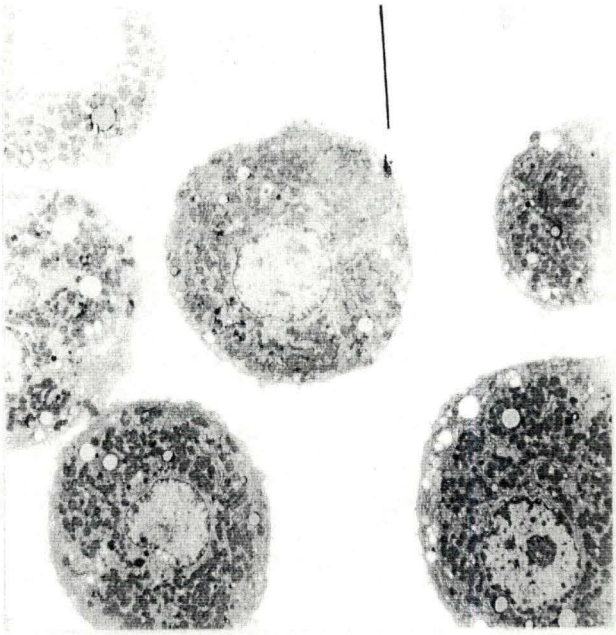
fig.52 : Micrographies en microscopie électronique à transmssion de la suspension d'hépatocytes cryopréservés.
I : vue générale d'un hépatocyte (X3000)
J : vue générale de la suspension (X2000)
K : mitochondries et reticulum (X27000)
L : vue générale d'un hépatocyte atypique (X10000)
M : vue générale d'un hépatocyte présentant un "bleb" (X2000)
N : vue générale du "bleb"(X13000).

fig.54 : Micrographies en microscopie électronique à balayage de la suspension d'hépatocytes cryopréservés.
O : vue générale de la suspension (X1700)
P : vue générale de la suspension (X2200)
Q : vue d'un hépatocyte présentant des "blebs" (X2000)
R : vue d'un "bleb" (X12000).

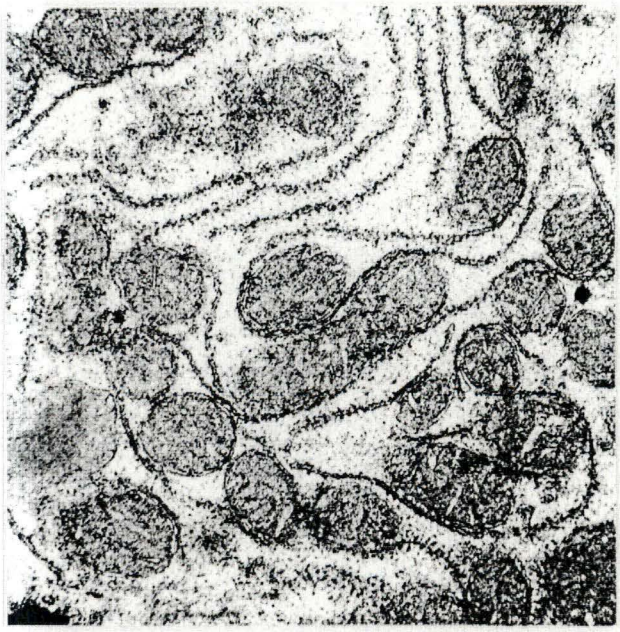
FIG.52



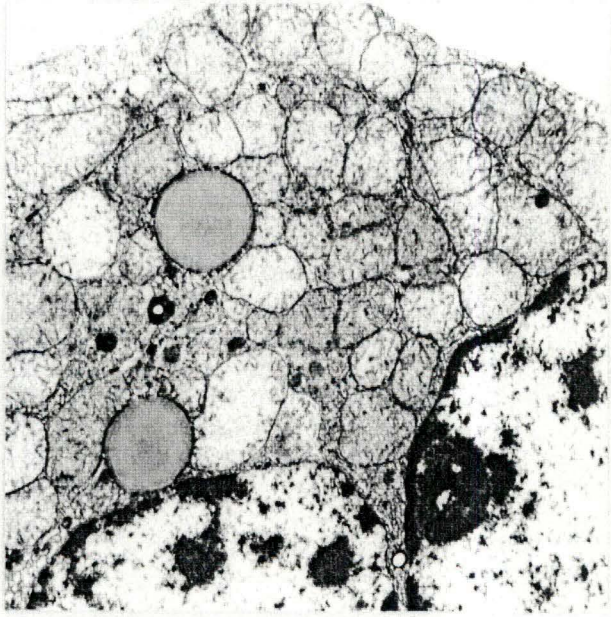
I



J



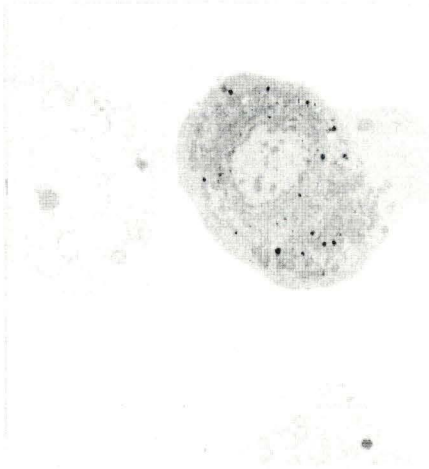
K



L

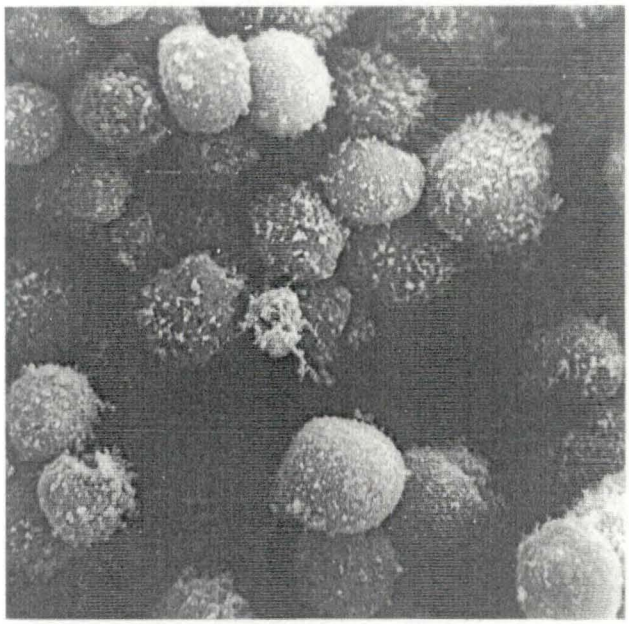


M

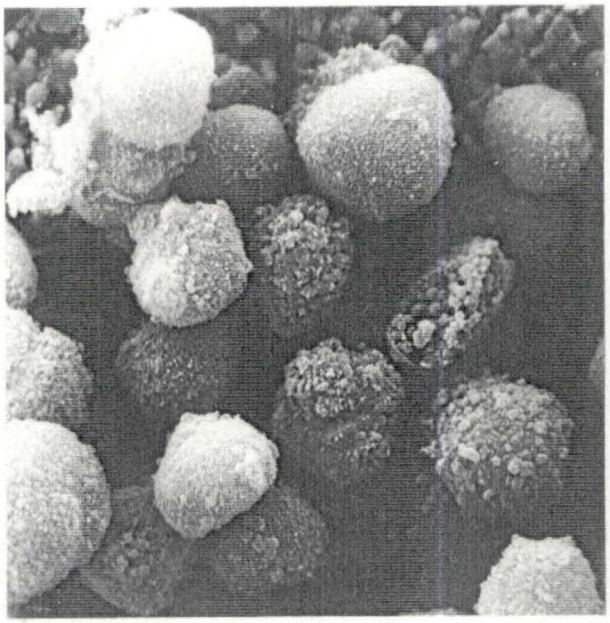


N

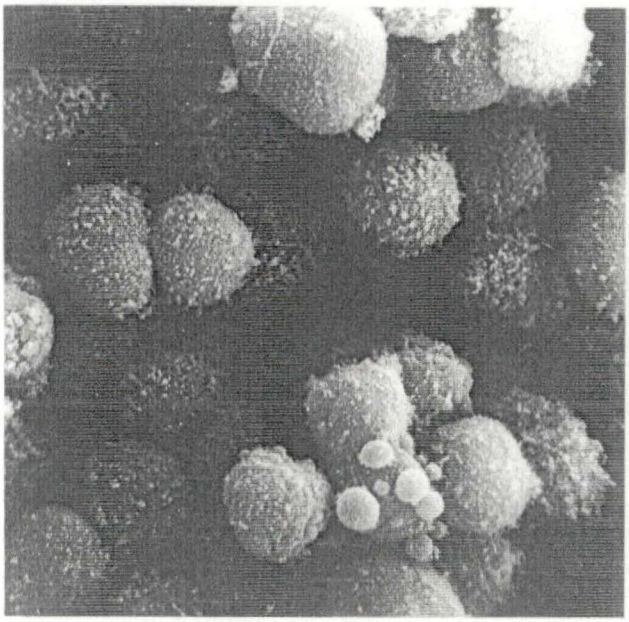
FIG. 54



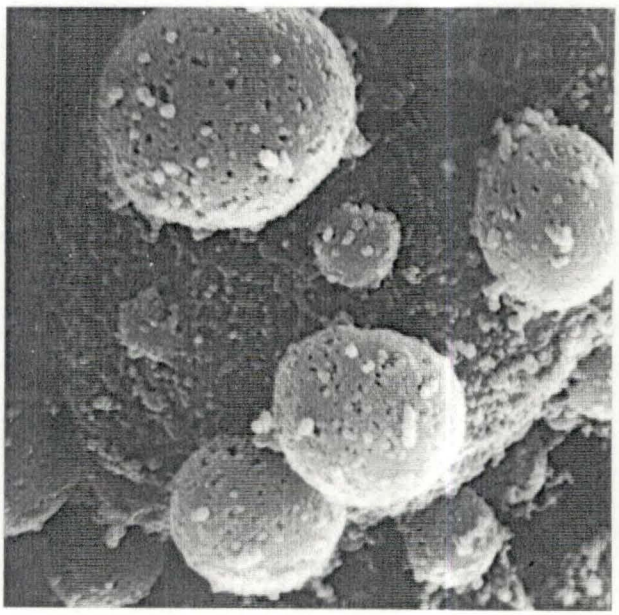
O



P



Q



R

3.3. IMPORTANCE DU GLUCOSE DANS LE MILIEU DE RECHAUFFEMMENT

L'adjonction de glucose dans le milieu de réchauffement a été justifiée de manière assez empirique par Decat (1987). Ce dernier observe un meilleur maintien de l'intégrité membranaire lorsque les cellules sont réchauffées en présence de l'hexose. Selon lui, le glucose augmente l'osmolalité du milieu et réduit le choc osmotique qui était provoqué lors du transfert des cellules du K^+-Tricine-DMSO (3422 mosmoles/Kg) vers le KRB (295 mosmoles/Kg). Cependant,

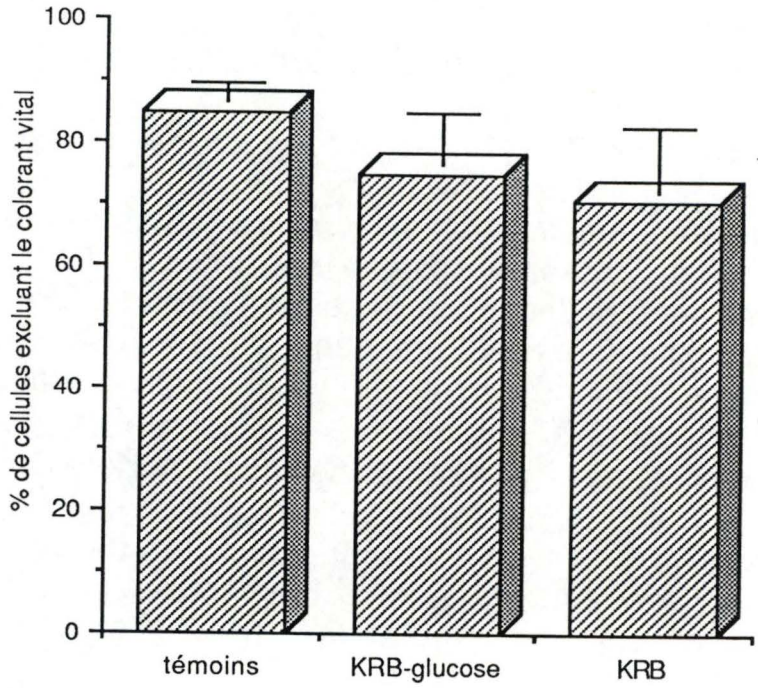
-Le glucose n'est pas un simple agent osmotique, il peut être métabolisé par l'hépatocyte. Selon Hochachka (1986), une forte concentration en glucose réduit le métabolisme des cellules hépatiques isolées.

-l'interférence du glucose avec la méthode de dosage des protéines par le réacif de Folin (Miller 1959) est contournée par l'emploi d'une méthode peu sensible au glucose (la méthode au molybdate rouge de pyrogallol). Mais la sensibilité de la méthode de Miller est perdue et la variabilité des réplicats augmente.

-si le choc osmotique lors du transfert du matériel biologique du K^+-Tricine-DMSO vers le milieu de réchauffement est évité, il ne l'est pas lors du transfert du KRB-glucose (1M) vers le Leibovitz + glutamine (L-15).

L'emploi du glucose étant controversé, nous nous proposons d'étudier de manière plus systématique l'importance du glucose dans le milieu de réchauffement. Nous étudions la viabilité de suspensions cryopréservées après un réchauffemment dans un tampon KRB ou dans un tampon KRB-glucose . Les tests d'exclusion du colorant vital, le transport du taurocholate à l'état stationnaire et un examen de l'ultrastructure des hépatocytes permettent cette étude de viabilité.

L'exclusion du colorant vital indique une différence de viabilité lorsque les hépatocytes sont réchauffés dans un tampon KRB avec ou sans glucose. Un test de T est réalisé avec les données suivantes: 4 observations pairées exprimant le pourcentage de cellules excluant le colorant vital après un réchauffement dans un tampon KRB ou KRB-glucose (fig.55).



% de cellules excluant le colorant vital

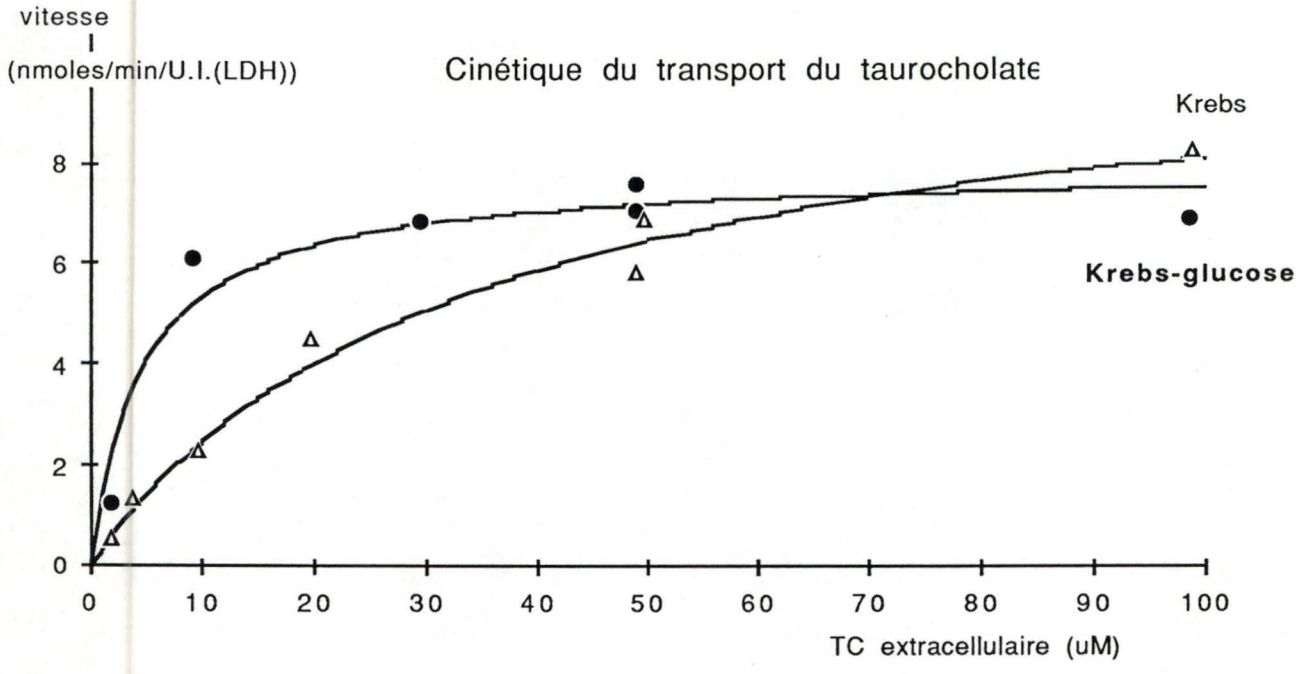
Observations réalisées sur des suspensions cryopréservées et réchauffées dans 2 milieux différents

Rat No	KRB-glucose (X1)	KRB (X2)	(X1 - X2)
1	80	75	5
2	74	72	2
3	70	63	7
4	75	72	3
MEAN	74,75	70,50	4,25
STD()	4,11	5,20	2,22

T observé = (4.25 - 0)/(2.22/2) = 3.83

T (3°lib.;P = 97.5%) = 3.18

fig.55 : Estimation de la viabilité de la suspension d'hépatocytes témoins et cryopréservés (réchauffés dans du KRB ou dans du KRB-glucose). Expérience réalisée pour 4 animaux (test d'exclusion du colorant vital).



	KRB-glucosé	KRB
Vmax =	7.88	10.93
Km =	4.74	34.41

fig.56 : Transport du taurocholate à l'état stationnaire.
Relation vitesse - concentration (hépatocytes cryopréservés, réchauffés dans du KRB ou dans du KRB-glucose).

Les paramètres cinétiques du transport du taurocholate semblent indiquer une plus grande altération de l'affinité des transporteurs membranaires (Km = 34 µM) lorsque nous utilisons le tampon KRB comme milieu de réchauffement (fig.56). La valeur de Vmax plus élevée pour les hépatocytes cryopréservés réchauffés dans du KRB est difficilement interprétable. En effet, Km étant élevée, les vitesses proches de Vmax sont atteintes à des concentrations en taurocholate extracellulaire qui ne sont plus physiologiques.

De plus, pour des concentrations en taurocholate extracellulaire supérieures à 200 µM, des phénomènes de transport passifs apparaissent (Coche 1988), ce qui ne permet pas de vérifier la valeur de Vmax.

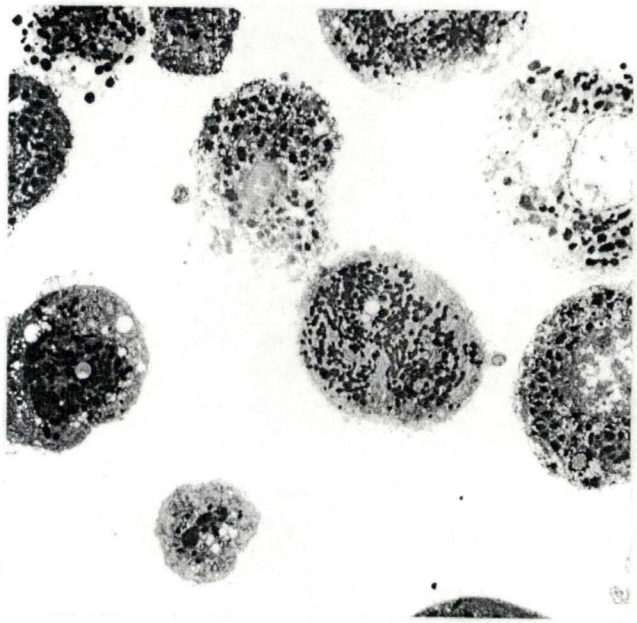
L'observation de l'ultrastructure en microscopie électronique à transmission montre :

-une proportion de cellules endommagées plus élevée que lors du réchauffement dans le tampon KRB-glucose (fig.57 s, t, u) (ce qui est à mettre en relation avec le test d'exclusion du colorant vital).

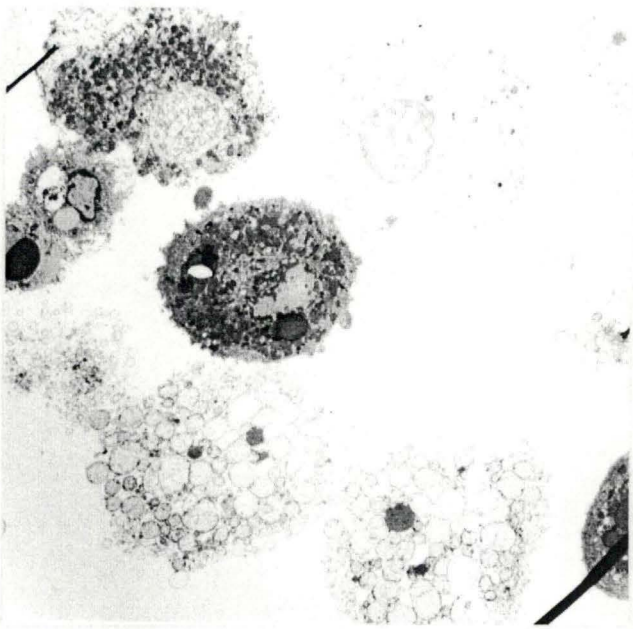
-Une proportion de cellules apparemment intactes.

fig.57 : Micrographies en microscopie électronique à transmssion de la suspension d'hépatocytes cryopréservés.
S : vue générale de la suspension (X1400)
T : vue générale de la suspension (X1400)
U : vue générale de la suspension (X1400).

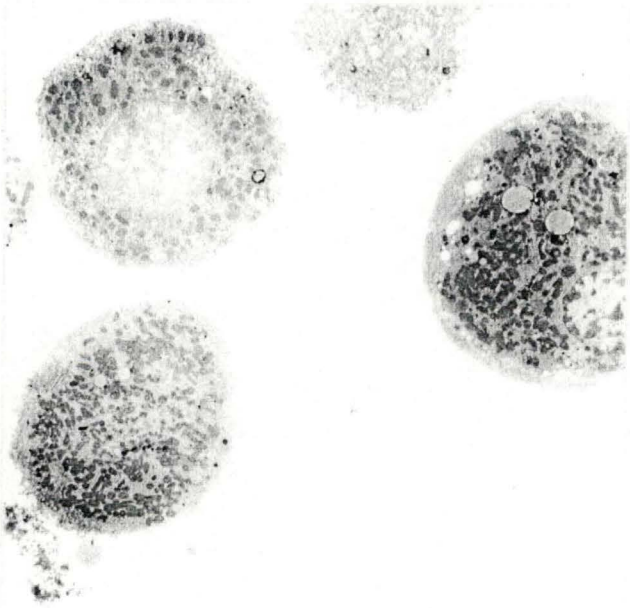
FIG.57



S



T



U

3.4. ESSAI D'UN MELANGE EQUIMOLAIRE D'AGENTS CRYOPROTECTEURS

Les avantages de l'utilisation d'un mélange équimolaire d'agents cryoprotecteurs sont donnés au §1.3.1.3.(pt.3°). Nous avons étudié, par des tests d'intégrité membranaire, la viabilité d'une suspension d'hépatocytes cryopréservés dans un mélange de CPA. Les résultats obtenus sont les suivants.

Les tests d'exclusion du colorant vital montrent que l'emploi d'un mélange de DMSO-glycérol est plus efficace lorsque la phase d'équilibration se réalise à 20°C plutôt qu'à 0°C (fig.58).

En effet à 0°C, le glycérol est un cryoprotecteur non pénétrant tandis qu'à 20°C, il peut pénétrer dans la cellule.

Lorsque le glycérol ne pénètre pas dans le compartiment intracellulaire, il provoque une différence de pression osmotique qui induit une perte d'eau cellulaire. La concentration en solutés à l'intérieur de la cellule augmente et ses fonctions métaboliques peuvent s'en trouver altérées.

Un test d'exclusion du colorant vital (fig.59) confirmé par un test de rétention d'enzymes cytoplasmiques (fig.60) indique que la cryopréservation en présence d'un mélange équimolaire de DMSO et de glycérol est moins efficace qu'en présence de DMSO seul.

Nous supposons cependant qu'un mélange de cryoprotecteurs assure une meilleure cryopréservation. Mais dans notre cas, la phase d'équilibration à 20°C permettant une bonne pénétration du glycérol dans la cellule (meilleure à 37°C qu'à 0°C) induit une plus grande toxicité du DMSO (plus toxique à 37°C qu'à 0°C).

En conclusion,l'apport bénéfique du glycérol à la solution cryoprotectrice serait masqué par l'augmentation de la toxicité du DMSO lorsque la température est de 20°C plutôt que de 0°C.

VIABILITE (%) DES HEPATOCYTES CRYOPRESERVES

Après cryopréservation les hépatocytes sont incubés à 37°C dans du L-15, le test d'exclusion du colorant vital est réalisé au cours du temps

TEMPS (min)	milieu de stockage à -13°C	
	DMSO	DMSO-glycérol
0	72	84
0	83	79
30	86	72
30	75	72
60	69	68
60	74	64

fig.58 : Estimation de la viabilité des hépatocytes cryopréservés en fonction du milieu de stockage et de la température d'équilibration (test d'exclusion du colorant vital).

VIABILITE (%) DES HEPATOCYTES CRYOPRESERVES

Après cryopréservation les hépatocytes sont soumis au test d'exclusion du colorant vital

milieu de stockage	température d'équilibration °C	viabilité (%)
DMSO-glycérol	0	72
DMSO-glycérol	20	77
glycérol	0	72
glycérol	20	74

fig.59 : Estimation de la viabilité des hépatocytes cryopréservés 30 minutes dans un mélange équimolaire de DMSO- glycérol. Comparaison avec une cryopréservation en présence de DMSO (test d'exclusion du colorant vital).

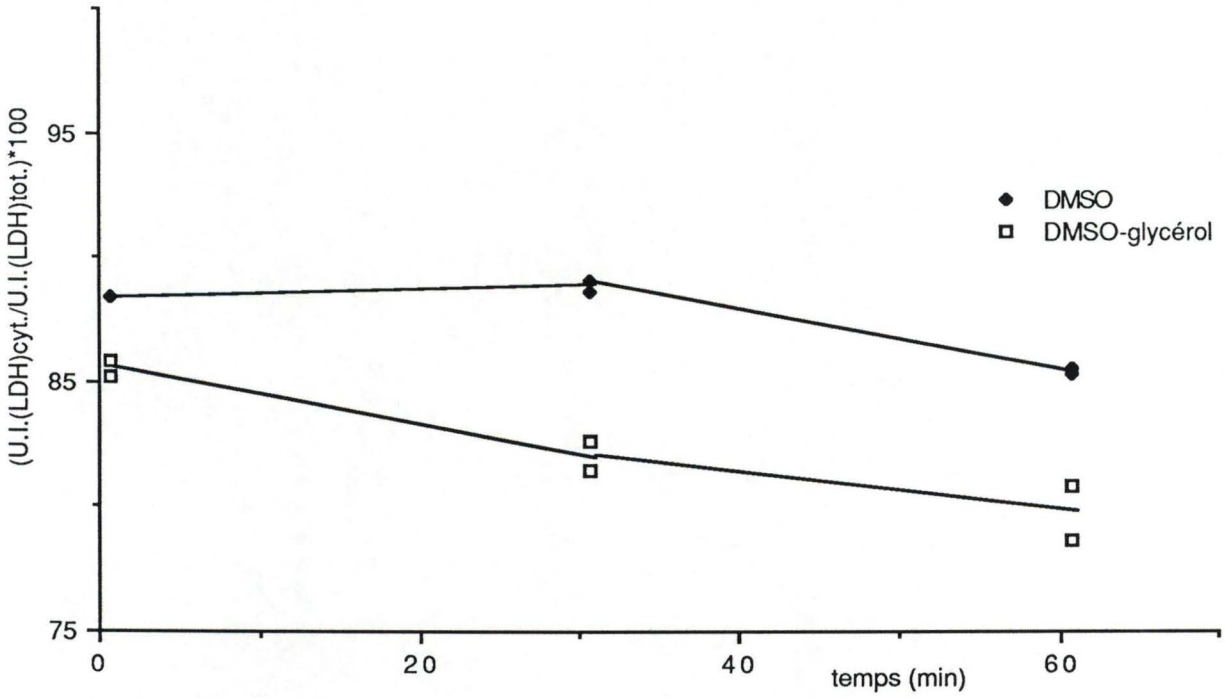


fig.60 : estimation de la viabilité de la suspension d'hépatocytes cryopréservés 30 minutes dans un mélange équimolaire de DMSO et de glycérol (test de libération de LDH cytoplasmique). Comparaison par rapport à une cryopréservation de 30 minutes en présence de DMSO (30% w/v).

DISCUSSION GENERALE

4.1.Technique opératoire et perfusion

L'emploi du tampon KRB lors de la perfusion nécessite un équilibre préalable de 15 minutes avec le carbogène afin d'obtenir une stabilisation du pH aux valeurs physiologiques. Le glucose inclus dans le perfusat permet de conserver le glycogène cellulaire.

Des auteurs désireux de répondre à un souci particulier ont modifié la composition du milieu de perfusion:

-perfusat + érythrocytes : accroissement de l'oxygénation (Muller 1972).

-perfusion par un milieu de culture : diminution des dommages membranaires causés par le perfusat (Nutt, Attenburrow 1980).

Lors du lavage du foie par la solution de KRB sans calcium, ce dernier doit blanchir rapidement et totalement sous peine de formation de zones encore riches en érythrocytes. Durant la perfusion enzymatique ces zones sont peu attaquées par la collgénase et le nombre d'hépatocytes isolés diminue.

La concentration optimale en collagénase est de 0.O5% (Howard et Pesch 1968). Une concentration plus élevée entraine la formation d'aggrégats de cellules (Crane 1977).

La variabilité de contamination en protéases des lots de collagénase expliquerait les rendements variables obtenus par différents auteurs. Drochmans (1977) affirme cependant qu'une perfusion avec de la collagénase purifiée ne donne que des rendements faibles, mais les avis diffèrent à ce sujet.

La présence d'ions calcium avec la collagénase est utile car Seglen (1970) montre que ces ions stabilisent la structure tertiaire de la collagénase pure.

Lors de l'étape de filtration-purification, les filtres (4 épaisseurs de gaze) doivent présenter des pores d'un diamètre supérieur à 60 µm pour laisser passer les cellules mais inférieur à 500 µm pour retenir les débris conjonctifs et les cellules non dissociées.

4.2.Critères de viabilité

Après un processus d'isolement des hépatocytes et/ou un protocole de cryopréservation, une évaluation critique de leur viabilité est nécessaire.

Un test de viabilité idéal doit être sensible et d'application simple, mais ces deux propriétés sont rarement liées.

Trois approches différentes et complémentaires permettent l'évaluation de la viabilité d'une suspension d'hépatocytes: la première estime l'intégrité membranaire des hépatocytes, la seconde quantifie l'activité métabolique des cellules grâce à leur capacité à transporter le taurocholate. La troisiéme approche consiste en un examen de l'ultrastructure de la cellule en microscopie électronique.

4.2.1.Intégrité membranaire

L'intégrité membranaire est une condition nécessaire au bon fonctionnement de la cellule car la membrane constitue une interface entre le milieu extra- et intracellulaire. Par conséquent, toute altération de la bicouche lipidique entraine une perturbation du transport actif et/ou passif des nutriments et des déchêts du métabolisme. Les deux tests suivants estiment l'intégrité membranaire:

4.2.1.1.Exclusion du colorant vital

Comme dit précedemment, ce test ne permet que de déceler des dommages graves et irréversibles (Baur 1975) mais sa rapidité de mise en oeuvre en fait une bonne indication de l'état de notre matériel d'étude.

4.2.1.2.Libération d'enzymes cytoplasmiques

Le test est complémentaire au test d'exclusion du colorant vital. Il permet d'estimer la quantité d'enzymes perdue par les cellules au cours du temps, c'est à dire l'évolution de l'intégrité membranaire de la suspension.

Cependant, le remplacement d'un milieu d'incubation et les opérations de lavage de la suspension éliminent les cellules lésées et la plupart de l'activité enzymatique du milieu. Par conséquent, l'interprétation du rapport entre la LDH cytoplasmique et totale doit tenir compte de ces opérations.

Le test de libération d'enzymes cytoplasmiques est plus précis que le test d'exclusion du colorant vital mais les résultats ne font que confirmer la corrélation qui existe entre les deux tests de viabilité.

4.2.2.Intégrité métabolique

Si les tests d'intégrité membranaire indiquent que les membranes plasmiques sont intactes, cela ne signifie pas que les cellules sont fonctionnelles. La cinétique d'incorporation du taurocholate permet de déceler une perte de l'intégrité métabolique des cellules. En effet, le transport de l'acide biliaire présente l'intérêt de mettre en jeu une importante série de fonctions cellulaires : transport membranaire, transport intracellulaire, sécrétion, métabolisme énergétique et leur bon fonctionnement devrait refléter une intégrité métabolique conservée. Le transport du taurocholate a l'avantage de pouvoir être étudié quantitativement en utilisant des traceurs radioactifs.

4.2.3.Examen de l'ultrastructure des hépatocytes

L'examen morphologique des hépatocytes est complémentaire aux tests d'intégrité membranaire et métabolique.

Une approche qualitative de la suspension d'hépatocytes permet de corréler certains déficits métaboliques et les observations réalisées à partir des micrographies:

-une faible teneur en glycogène peut être corrélée à l'observation d'un petit nombre d'amas de glycogène en rosettes dans la cellule (Fuller 1982).

-un découplage de la phosphorylation oxydative peut être corrélé à la présence de mitochondries gonflées (Trump 1965).

-une augmentation de la Km des transporteurs membranaires du taurocholate pour des hépatocytes prétraités à la cytochalasine (inhibiteur du cytosquelette) peut etre corrélée à la perte des microvillosités de la membrane (Dubisy 1985).

Une approche quantitative en microscopie électronique est plus longue car elle nécessite un grand nombre de micrographies prises au hasard. Celles-ci sont réalisées au départ de coupes ultrafines faites à partir de plusieurs culots cellulaires fixé dans le glutaraldéhyde et l'acide osmique.

4.3.LES HEPATOCYTES FRAICHEMENT ISOLES.

4.3.1.Intégrité membranaire

Les valeurs d'intégrité membranaire de la suspension d'hépatocytes fraîchement isolés sont en accord avec les résultats précedemment obtenus au laboratoire par Decat (1987), Dubois (1988) et Pirotte (1987, 1988), Coche (1988) ayant obtenu quant à lui des valeurs plus élevée (93 à 96% de cellules excluent le colorant vital). L'emploi d'une technique d'isolement légèrement différente de la nôtre pourrait expliquer cela:

-La collagénase provenait de Cooper biochemical New Jersey, USA, la nôtre provient de Gibco laboratories New York, USA. Nous avons vu au §4.1. que le taux de purification de l'enzyme (contamination par des protéases) influence la viabilité des suspensions d'hépatocytes isolés.

-La concentration en Ca++ dans le milieu de perfusion était de 0.25M. L'emploi de collagénase provenant de chez Gibco avec une concentration en Ca++ de 0.25M provoque une floculation de la suspension cellulaire. En conséquence, le tampon de perfusion est modifié en un point: il contient une concentration en Ca++ diminuée de moitié . Or, nous avons vu que la présence d'ions Ca++ stabilise la structure tertiaire de l'enzyme.

4.3.2.Intégrité métabolique

Les cinétiques du transport du taurocholate à l'état stationnaire par des hépatocytes fraîchement isolés sont conformes aux résultats obtenus par Coche (1988). A savoir, une vitesse maximale (nmoles * min^{-1} * mg^{-1}) de **2.00 +/- 0.05** et une constante d'affinité (μM) = **4.68 +/- 0.59**.

Nos résultats (fig. 37, 38, 39) indiquent une vitesse maximale (nmoles * min^{-1} * mg^{-1}) de **2.09 +/- 0.23** (n = 3) et une constante d'affinité (μM) de **3.96 +/- 2.35** (n= 3).

4.3.3.Examen morphologique

Nos observations sont en accord avec les micrographies de Fuller (1982) et avec la caractérisation morphologique de l'hépatocyte faite par Junqueira dans "BASIC HISTOLOGY" (3rd Ed. Lange Medical Publications USA).

Ces derniers observent:

-des cellules sphériques dont la membrane est hérissée de nombreuses microvillosités

-un cytoplasme dense et grannuleux

-des mitochondries, denses aux électrons, en grand nombre dans le cytosol

-un réticulum endoplasmique rugueux arrangé en citernes non dilatées couvertes de ribosomes

-un noyau montrant une chromatine intacte

-des amas de glycogène un peu partout dans la cellule

La forme arrondie des hépatocytes examinés à faible grossissement au TEM est en accord avec la forme sphérique visualisée au microscope électronique à balayage ainsi qu'avec les informations receuillies en microscopie optique.

Le diamètre moyen des hépatocytes est de 20 à 30 µm.

Les noyaux, limités par une double membrane nucléaire, présentent un diamètre moyen de 6 à 8 µm. La disposition et la densité électronique de la chromatine correspondent aux description faites à partir des hépatocytes isolés et de l'organe intact.

Les mitochondries ont un diamètre de 0.5 à 1 µm et atteignent jusqu'à 4 µm de longueur.

Le RER est d'apparence normale et la présence de nombreux ribosomes est corrélée au maintien de la machinerie de synthèse protéique.

La présence de SER est plus discrète.

Une association fréquente entre le RER et les mitochondries se manifeste par un enroulement du reticulum autour d'une partie ou de la totalité de la mitochondrie. Ce phénomène pourrait intervenir lors de l'exportation de noyaux hémiques de la mitochondrie vers les protéines membranaires néoformées (Chapman 1973).

4.4.LES HEPATOCYTES CRYOPRESERVES.

4.4.1.Matériel biologique perdu lors des changements de milieu d'incubation.

Lorsque les hépatocytes sont en suspension dans le tampon KRB,10 à 15 % des protéines cytoplasmiques sont libérées dans le milieu. Ceci est en accord avec les tests de libération d'enzymes cytoplasmiques qui estiment la viabilité de la suspension de départ à environ 85% (§ 3.1.1.).

La phase d'équilibration à 0°C dans le tampon KRB-DMSO (20% W/V) s'avère plus dommageable pour les hépatocytes que l'équilibration à -7°C (suivie du stockage à -13°C) dans le tampon K^+-Tricine-DMSO (30% W/V). Les altérations cellulaires seraient donc plus importantes, bien que la concentration en cryoprotecteurs soit moins élevée et que le temps d'incubation en présence de DMSO soit dix fois moins long. La moindre sensibilité des cellules aux basses températures (Barnett 1978) pourrait expliquer la différence de mortalité entre les deux étapes.

De plus, à 0°C, des redistributions ioniques se font dans le sens contraire du gradient (§1.3.3.3.) et altèrent la cellule (Hochachka 1986). Le phénomène de dissipations des gradients ioniques ne se déroule pas lors du stockage à -13°C puisqu'un tampon de composition ionique proche du milieu intracellulaire est utilisé.

Après un réchauffement de 10 minutes à 37°C dans du KRB-Glucose (1M), une quantité importante de protéines solubles (17% des protéines totales) reflète une mortalité élevée.

Bien qu'un réchauffement rapide soit préférable à un réchauffement lent (Farrant 1977, Fuller 1982, Chesné 1988), le retour aux températures positives est toujours létal pour une partie de la population cellulaire.

4.4.2.Intégrité membranaire

La suspension d'hépatocytes cryopréservés contient une proportion plus faible de cellules excluant le colorant vital (75%) que la proportion observée dans la suspension d'hépatocytes témoins (85%).

Mais cela ne signifie pas que notre protocole de cryopréservation engendre une perte de 10% de l'intégrité membranaire (85% - 75%). En effet, rappelons nous que la suspension d'hépatocytes cryopréservés ne contient en fait que 60% des cellules de départ (fig.42).

En conclusion:

-d'un point de vue qualitatif, la suspension d'hépatocytes cryopréservés présente une intégrité membranaire diminuée de 10% par rapport à la suspension d'hépatocytes témoins

-d'un point de vue quantitatif, la proportion de cellules excluant le colorant vital par rapport au nombre total de cellules du départ est passé de 85% à 45% (c'est à dire à 75% des 60% de cellules restant).

Les mêmes considérations peuvent être faites pour le test de libération d'enzymes cytoplasmiques. Remarquons cependant que les valeurs de viabilité (en %) données par ce critère sont plus élevée que le pourcentage de cellules excluant le colorant vital. Cela s'expliquerait par le fait que les cellules perméables au colorant vital ne libèrent pas la totalité de leur enzymes cytoplasmiques.

4.4.3.Intégrité métabolique

a.Problèmes de standardisation

Nous pourrions standardiser les valeurs de vitesse par le nombre de cellules excluant le colorant vital dans la fiole d'incubation. Mais nous ne savons pas si des cellules perméables à l'érythrosine peuvent jouer un rôle dans le transport et le stockage de l'acide biliaire. De plus les comptages sur un hémocytomètre sont très variables (suspension non homogène lors du prélèvement, répartition non uniforme des hépatocytes sur la surface de comptage).

b.Nouvelle méthode de standardisation

La démarche vers une nouvelle expression des vitesses du transport du taurocholate est décrite dans le §3.2.3.1. Les valeurs de vitesses ne sont plus données en nmoles * min^{-1} * mg^{-1} mais en (nmoles * min^{-1} * U.I.$(LDH)_{culot}^{-1}$) * 10^4.

Ainsi, les valeurs de vitesse de transport du taurocholate sont divisées par une valeur directement proportionnelle au nombre de cellules qui transportent l'acide biliaire et nous ne prenons en compte que les cellules membranairement intactes. Par conséquent, les vitesses de transport du taurocholate n'étant plus sous-estimée, nous nous attendons à une diminution de la Vmax moins importante pour les hépatocytes cryopréservés.

Les figures 61 et 62 permettent de comparer les deux méthodes de standardisation et confirment une diminution moins importante de Vmax. Lorsque la vitesse est standardisée par mg de protéines, Vmax des cellules cryopréservées diminue de 70%. Lorsque la vitesse est standardisée par U.I.$(LDH)_{culot}$, Vmax des cellules cryopréservées diminue de 50%.

c.Paramètres cinétiques du transport du taurocholate par les hépatocytes cryopréservés

Nous observons une diminution de la Vmax de 52% et 61% (résultats pour deux suspensions d'hépatocytes cryopréservés provenant de deux rats). L'augmentation de Km est assez variable par rapport aux hépatocytes témoins.

Les résultats (standardisation par mg de protéines totales) obtenus par E.Pirotte, A.Decat (1987) et B.Dubois (1988) indiquent une diminution de Vmax de 40%. L'influence du temps de cryopréservation (1h30 au lieu de30 min) est donc du même ordre de grandeur que la correction apportée par la standardisation.

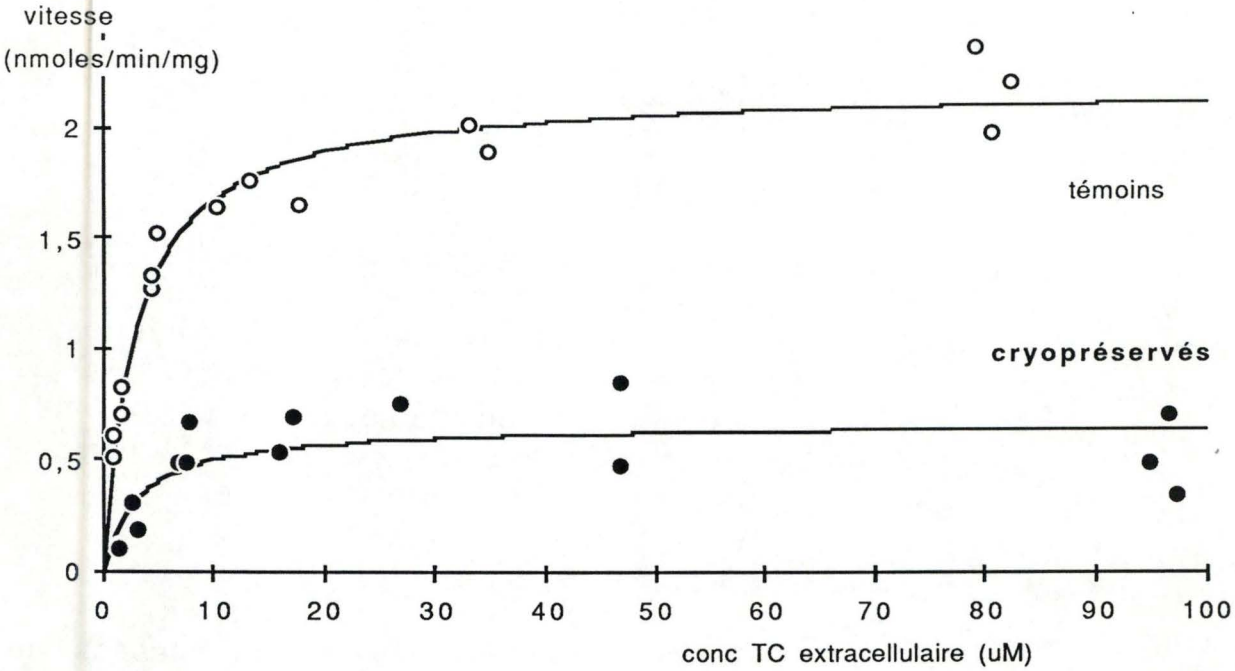


fig. 61 : Standardisation des vitesses d'incorporation du taurocholate par mg de protéines.

	témoins	cryopréservés
Vmax =	2.18	0.66
Km =	3.02	3.19

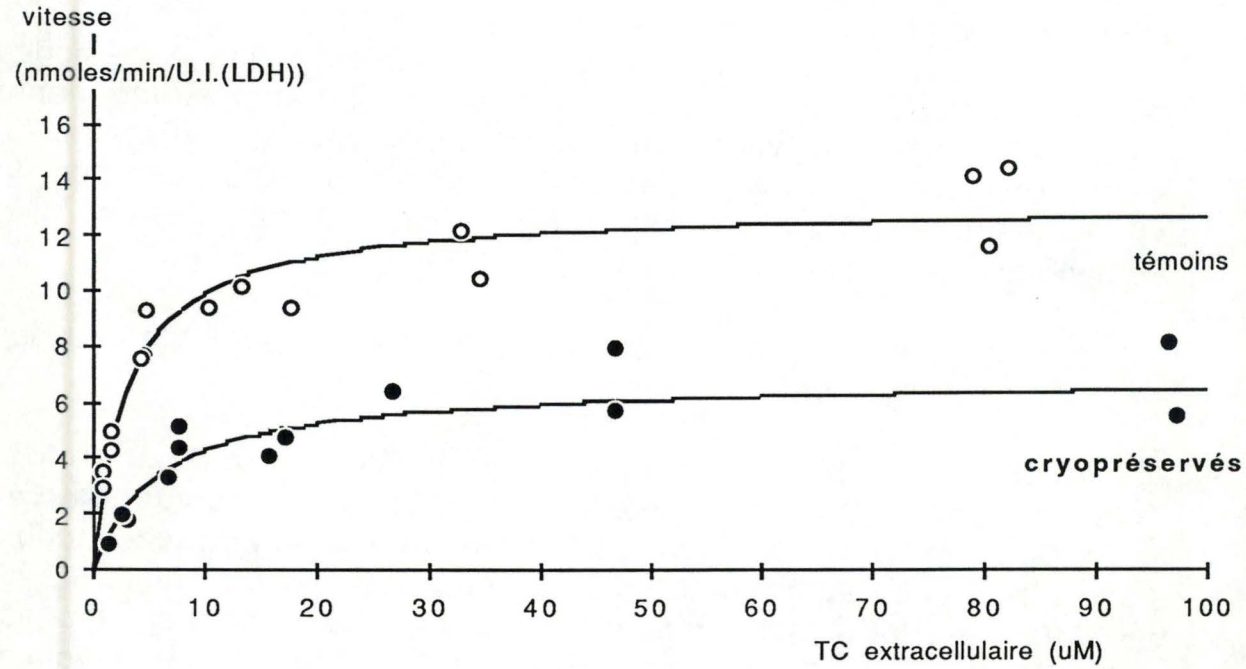


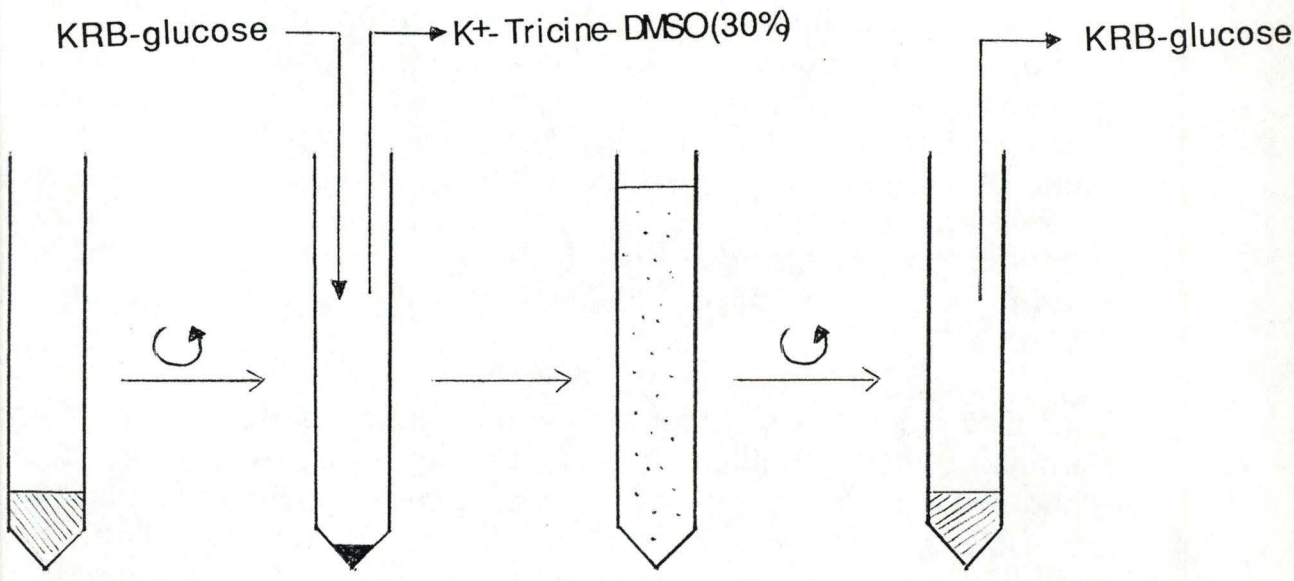
fig. 62 : Standardisation des vitesses d'incorporation du taurocholate par U.I.(LDH)culot. même données que fig. 61.

	témoins	cryopréservés
Vmax =	13.02	6.82
Km =	3.17	5.96

De telles modifications de Vmax et de Km laissent supposer que, dans la suspension d'hépatocytes cryopréservés, les cellules intactes d'un point de vue membranaire sont altérées par le protocole de cryopréservation. Cette supposition est en accord avec les résultats obtenus pour des hépatocytes cryopréservés et mis en culture (Novicki 1982, Jackson 1985). Certes, les protocoles de cryopréservation sont différents, mais dans ce cas, seuls les hépatocytes intacts d'un point de vue membranaire sont mis en culture et un déficit de l'activité métabolique est tout de même observé.

Des temps de cryopréservation plus longs (5h et 24h) ne semblent plus modifier Vmax mais bien Km. Il est probable que l'augmentation du temps de contact entre la membrane plasmique et le DMSO soit à l'origine de la diminution de l'affinité des transporteurs. En effet, nous avons vu précédemment l'action néfaste du DMSO sur les membranes plasmiques et sur la pompe sodico-potassique (§1.3.1.3.) qui interviennent toutes deux dans le transport du taurocholate.

En conclusion, les dégats d'ordre métabolique causés par la cryopréservation en milieu liquide semblent plus importants que ne le laissent supposer les critères d'intégrité membranaire. Cela reste en accord avec les limites des tests d'exclusion du colorant vital et de rétention d'enzymes cytoplasmiques.



Volume (ul)	500	50	5000	500
Concentration en DMSO (w/v)	30	30	0.3	0.3

fig. 63 : Schématisation de la fin du protocole du cryopréservation. Elimination de toutes traçes néfastes de DMSO dans la suspension.

4.4.4.Examen morphologique des hépatocytes cryopréservés

Peu d'observations sont renseignées dans la littérature en ce qui concerne les hépatocytes cryopréservés en milieu liquide. Cependant des altérations graves se manifestent par:

-des cellules non sphériques dont la membrane peut être déchirée sur une surface plus ou moins grande

-un cytoplasme moins grannuleux présentant des organites aggrégées

-des mitochondries gonflées (découplage de la phosphorylation oxydative) (Trump 1965) et moins denses aux électrons suite à la perte d'enzymes solubles du cycle de Krebs (perte de leur "coloration"aux électrons) (Sherman 1978).

La présence de "blebs" pourraient être la conséquence d'une interaction entre le cytosquelette et le DMSO (Dubisy 1985). Mais, la présence de DMSO dans la suspension d'hépatocytes cryopréservés étant faible (moins de 0.5%) (fig.63), nous pourrions interpréter ce phénomène comme signe avant-courreur de la déchirure de la membrane. L'hépatocyte altéré d'un point de vue métabolique ne pourrait plus maintenir son cytosquelette intact.

4.5.Importance du glucose

Le maintien de l'intégrité membranaire est influencé par la présence de glucose dans le milieu de réchauffement (test d'exclusion du colorant vital). L'examen de l'ultrastructure des hépatocytes cryopréservés et réchauffés dans du KRB est en accord avec ce test.

De plus, la présence de l'hexose lors du réchauffement semble nécessaire pour un plus grand maintien de l'intégrité métabolique. En effet, la Km est augmentée lorsque le glucose est absent dans le milieu de réchauffement.

Tout ces résultats sont en accord avec Chesné (1988): "L'addition de glucose dans le milieu de réchauffement limite le choc osmotique causé par le flux de CPA de la cellule vers le milieu extracellulaire" (fig.64).

Pour Hochachka (1986):"Un pourcentage élevé de glucose réduit le métabolisme des hépatocytes isolés et peut jouer un rôle important dans la coordination de la baisse du métabolisme lors de la congélation".

L'activité métabolique de l'hépatocyte ainsi ralentie en présence de glucose engendre peut-être une moindre sensibilité de l'hépatocyte aux conditions de réchauffement.

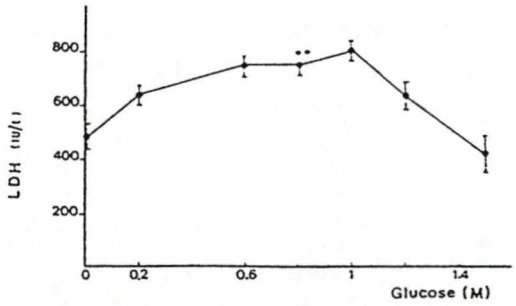


FIG. 7. Effect of the glucose in the thawing medium. Hepatocytes were frozen at 3°C/min in L15 medium containing 20% FCS and 16% Me_2SO. The cells were then thawed in L15 medium containing glucose at different concentrations. This step of thawing lasted 10 min before centrifugation. Intracellular LDH was measured in thawed cells after 20 hr of culture. The values are means ± SE ($n = 3$). $^{**}P < 0.01$ vs 0 M glucose. Glucose had a significant effect at 0.8 M and was used at this concentration in the regime for freezing; under these conditions, the viability after freezing was 28%.

fig. 64 : Rôle favorable du glucose dans le milieu de réchauffement (Chesné 1988).

Remarquons qu'au cours d'une cinétique d'incorporation du taurocholate, la suspension d'hépatocytes est diluée 20X dans un milieu nutritif (100 µl de cellules dans 2.15 ml). Par conséquent, dans le cas des hépatocytes cryopréservés et réchauffés dans le KRB-glucose, la concentration en glucose dans le milieu nutritif se situe aux alentours de 0.05M. Cette faible concentration en glucose ne perture pas le transport du taurocholate. Les modifications de l'intégrité métabolique sont donc dues aux conditions de réchauffement et non à la présence de glucose lors du transport de l'acide biliaire.

En conclusion, la présence de glucose lors du réchauffement assure le maintien de l'intégrité membranaire et métabolique.

4.6. Essai d'un mélange de cryoprotecteurs.

Les avantages de l'utilisation d'un mélange équimolaire d'agents cryoprotecteurs sont donnés au §1.3.1.3.(pt.3°), mais les données receuillies dans la littérature ne concerne que la cryopréservation en milieu solide.

Nos résultats (§3.4.) peuvent être difficilement comparés avec des travaux antérieurs cependant, nous supposons que l'apport bénéfique du glycérol à la solution cryoprotectrice est masqué par l'augmentation de la toxicité du DMSO lorsque la température d'équilibration est de 20°C plutôt que de 0°C.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5.1.CONCLUSIONS

L'objectif global de ce travail était de caractériser les hépatocytes stockés à -13°C en milieu liquide.

Les hépatocytes cryopréservés ont été caractérisé par trois approches différentes et complémentaires: la première estimant l'intégrité membranaire, la seconde l'intégrité métabolique et la troisième consistant en un examen de l'ultrastructure des cellules.

Conformément aux travaux antérieurs (Decat 1987, Dubois 1988) les hépatocytes cryopréservés présentent une intégrité membranaire largement conservée. 75% des cellules excluent le colorant vital et 15% de la LDH cytoplasmique est libérée dans le milieu extracellulaire.

Nous avons déterminé l'intégrité métabolique des cellules cryopréservées par l'étude du transport du taurocholate à l'état stationnaire. Nous avons dû, au préalable, mettre au point une nouvelle méthode de standardisation des vitesses de transport permettant de ne tenir compte que des cellules dont la membrane est intacte. Cette étude montre que les hépatocytes cryopréservés présentent un déficit de l'intégrité métabolique. Vmax diminue de 50% pour des temps de cryopréservation allant de 1h30 à 24h00, Km augmente de manière fort variable avec la durée de la cryopréservation.

L'examen morphologique des hépatocytes cryopréservés a été réalisé de manière qualitative et non quantitative. Il confirme les tests d'intégrité membranaire.

Suite à ce constat, nous avons tenté d'améliorer certaines phases du protocole de cryopréservation.

Nous avons étudié l'effet du glucose 1M dans le milieu de réchauffement grâce aux critères d'intégrité membranaire et métabolique cités plus haut. Un examen morphologique a complété cette étude qui confirme le rôle favorable du glucose.

Nous avons également envisagé une amélioration des conditions de stockage à -13°C en utilisant un mélange équimolaire de DMSO-glycérol. Les tests d'intégrité membranaire montrent que le DMSO est plus efficace que le mélange DMSO-glycérol. L'absence d'un test d'intégrité métabolique ne permet pas de généraliser cette affirmation.

En conclusion, Le stockage des hépatocytes en milieu liquide à -13°C permet:

-un maitien de l'intégrité membranaire de la majorité des cellules

-une altération importante des hépatocytes dont la membrane est intacte en ce qui concerne leur capacité à transporter le taurocholate .

5.2.PERSPECTIVES

Nous pourrions envisager deux grand axes de recherches:

Un premier type de recherche viserait à enrichir la suspension d'hépatocytes témoins et/ou cryopréservés en cellules viables. Différentes techniques séparant les cellules intactes et le reste de matériel biologique (métaboliquement inerte) sont renseignées dans la littérature: centrifugation dans un gradient de métrizamide (Bengtsson 1981), électrophorèse (Hannig 1972).

Ces méthodes séparent la suspension initiale en différentes sous-populations selon des critères de taille, de densité ou selon des propriétés de surface. Mais les inconvénients majeurs sont une reproductibilité faible et une augmentation des coûts (matériel et temps).

Une centrifugation dans un gradient de percoll (Kreamer 1986) permet de séparer les cellules intactes d'un point de vue membranaire (densité comprise entre 1.07 et 1.1) et les cellules dont la membrane est déchirée sur une surface plus ou moins grande (densité inférieure à 1.05). L'emploi de cette technique aboutit à une suspension de cellules dont l'intégrité membranaire est augmentée (98% des hépatocytes excluent le colorant vital) ainsi que l'intégrité métabolique (réponse de la suspension au glucagon et synthèse de DNA sont augmentées).

Un second type de recherche aurait pour but d'améliorer le protocole de cryopréservation sur bases de critères d'intégrité métabolique tels que le transport du taurocholate et l'incorporation de leucine dans les protéines.

L'utilisation d'un mélange d'agents cryoprotecteurs, un tampon de cryopréservation composé d'un milieu nutritif tel que le L-15 seraient autant d'innovations susceptibles d'améliorer la viabilité de la suspension cellulaire après cryopréservation.

ANNEXE

Détermination des paramètres cinétiques (Vmax et Km) du transport du taurocholate par les hépatocytes isolés et mis en suspension.

Les cellules (100 µl, environ 2 mg de protéines) sont préincubées 20 minutes dans 2 ml de Leibovitz (L-15) et 50 µl de taurocholate non marqué. La concentration initiale en taurocholate dans le milieu est comprise entre 2 et 200 µM. Au temps t = 0, 10 µl d'une solution de ^{3}H-taurocholate sont ajoutés de manière à obtenir 90 nCi * ml^{-1} après dilution.

Le modèle fermé à deux compartiment est utilisé pour caractériser le transport du taurocholate. L'échange de taurocholate entre le milieu et la cellule est caractérisé par des constantes de vitesses K_{21} et K_{12} (min^{-1}). La constante de vitesse K_{12} exprime la fraction du compartiment 1 (milieu extracellulaire) transférée vers le compartiment 2 (milieu intracellulaire) par unité de temps.

La captation du taurocholate par les hépatocytes isolés est un phénomène rapide. Pour obtenir des points expérimentaux précis, il faut arrêter les phénomènes de transport quasi instantanément.

Des aliquots de 150 µl sont prélevés dans la fiole d'incubation au cours du temps, ensuite, ils sont centrifugés à travers une fine couche d'huile de silicone (filtration centrifuge).

La filtration centrifuge (§2.5.3.1.) est une technique peu couteuse qui permet de séparer les cellules de leur milieu environnant et qui répond aux critères de rapidité et de précision cités plus haut .

Un horaire d'échantillonnage est établi en fonction du nombre de fioles d'incubation (contenant des concentrations en taurocholate différentes) et en fonction du nombre de prélèvements par fioles (généralement neuf, échelonnés entre 0 et 40 minutes) (fig.1).

Remarquons (fig.1) que la dernière cinétique d'incorporation du taurcholate commence environ 2 heures après la première. Durant ce laps de temps, les hépatocytes sont maintenus dans la glace (ils peuvent être conservés à 0°C pendant 3 à 4 heures: §1.3.1.).

Après avoir prélevé et centrifugés tout les aliquots de 150 µl, la radioactivité totale, extra- et intracellulaire est déterminée grâce au compteur à scintillation liquide (§2.5.3.2. & 2.5.3.3.).

Les calculs de récupérations (tableau2) et les pourcentages de radioactivité dans les cellules et le milieu sont établis (tableau 3).

Un graphe (fig.2) exprimant l'évolution de la radioactivité dans les cellules (points noirs) et dans le milieu (points blancs) en fonction du temps ainsi que les valeurs de récupérations (carrés noirs) permet de vérifier la validité des prélèvements.

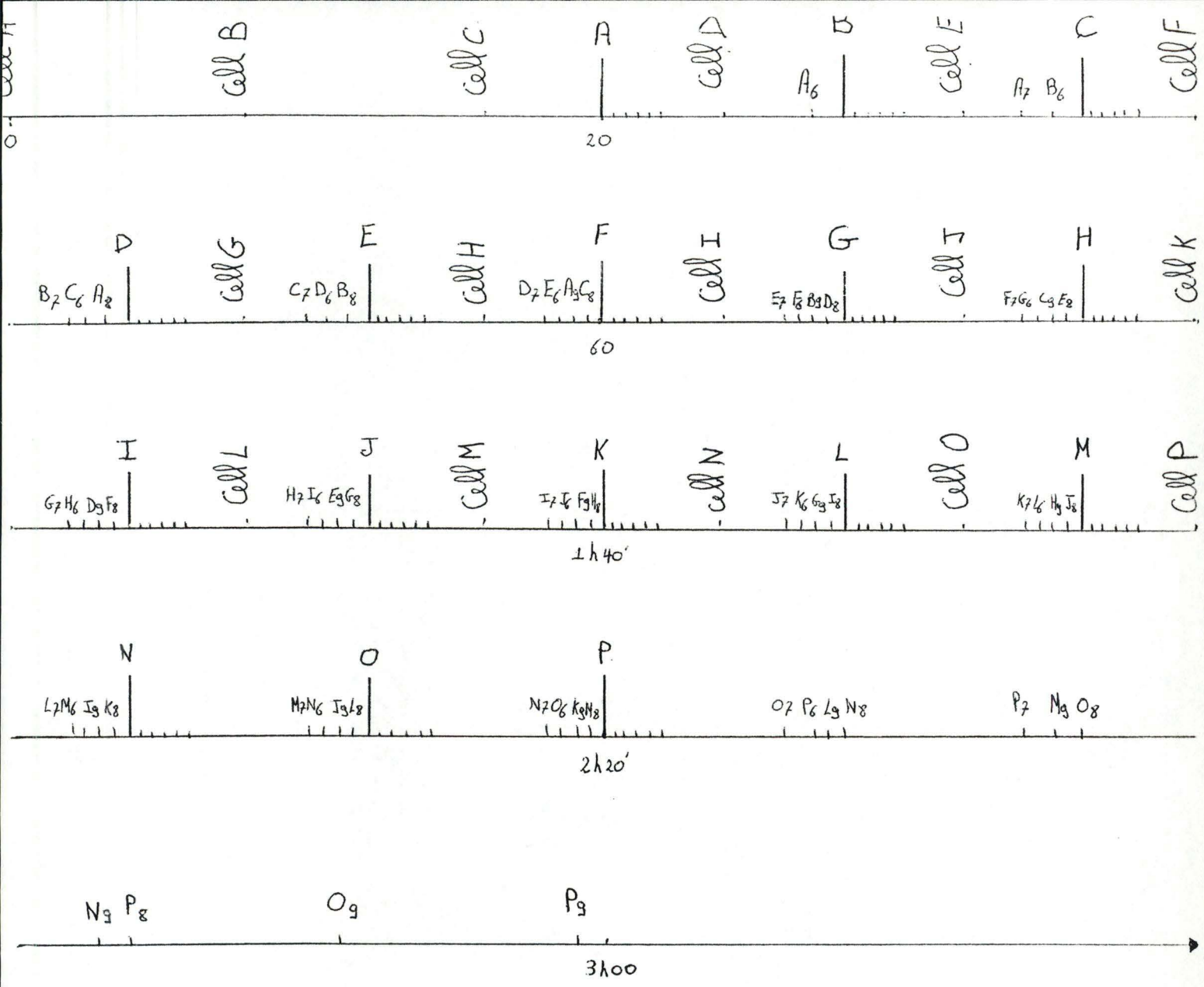
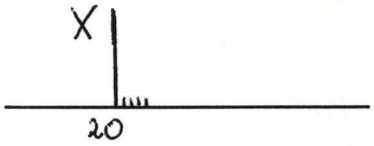


fig.1: Hbraire de prélèvement des aliquots pour 16 fioles d'incubation, marquées de A à P, contenant différentes concentrations en taurocholate.

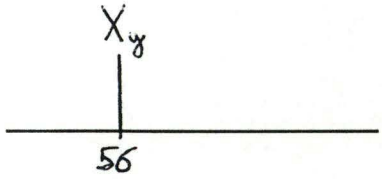
Légende:

——————————→ Echelle de temps en minutes

Cell X Préincubation des cellules dans la fiole X



Ajout du traçeur radioactif dans la fiole X au temps t = 20'
et réalisation de 5 prélèvements successifs en 2 minutes.



$y^{ème}$ prélèvement dans la fiole X au temps t = 56'

TABLEAU 1

séries	temps (sec)	temps (min)
	18	0,3
	45	0,8
conc TC	74	1,2
8uM	106	1,8
	139	2,3
	371	6,2
	848	14,1
	1408	23,5
	1987	33,1

TABLEAU 2

séries	temps (min)	dpm surn.	dpm culot	dpm totaux	récupération
	0,3	40415	1389	44066	94,9
	0,8	38575	4103	44066	96,8
conc TC	1,2	36244	6498	44066	97,0
8uM	1,8	33614	8935	44066	96,6
	2,3	32690	10216	44066	97,4
	6,2	27033	17600	44066	101,3
	14,1	24446	19160	44066	99,0
	23,5	21791	22864	44066	101,3
	33,1	23625	22430	44066	104,5

TABLEAU 3

séries	temps (min)	% dpm surn.	% dpm culot	récupération
	0,3	96,7	3,3	94,9
	0,8	90,4	9,6	96,8
conc TC	1,2	84,8	15,2	97,0
8uM	1,8	79,0	21,0	96,6
	2,3	76,2	23,8	97,4
	6,2	60,6	39,4	101,3
	14,1	56,1	43,9	99,0
	23,5	48,8	51,2	101,3
	33,1	51,3	48,7	104,5

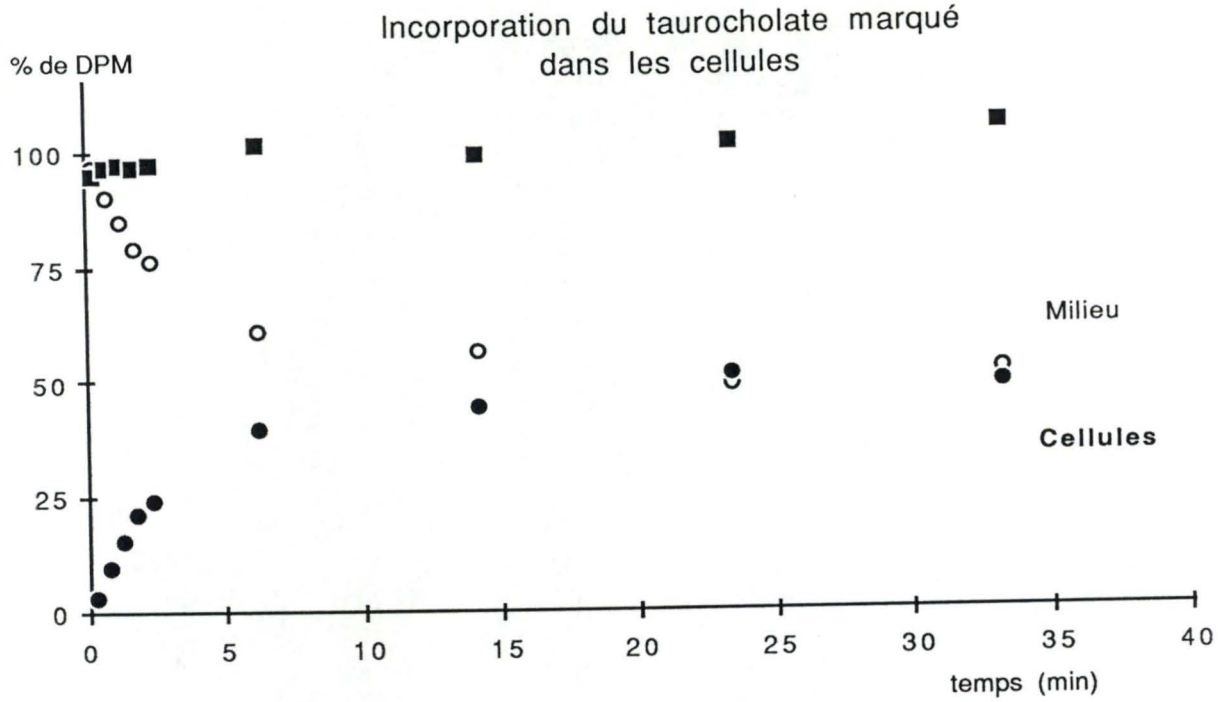


fig.2 : graphe exprimant l'évolution de la radioactivité dans les cellules (points noirs) et dans le milieu (points blancs) en fonction du temps ainsi que les valeurs de récupérations (carrés noirs).

TABLEAU 4

TC total uM	K 12	K 21	Qt nm
200	0,0074821	0,092419	653
100	0,015376	0,087025	326,5
20	0,0909	0,1317	64,9
8	0,1287	0,1460	25,96
4	0,2133	0,2359	12,98
200	0,0075	0,0836	653
100	0,0157	0,0968	326,5
60	0,0303	0,0988	195,9
40	0,0370	0,1038	130,6
8	0,1581	0,1713	25,96

TABLEAU 5

TC total uM	K 12	K 21	Qt nm	Q1 nm	V12 nm /min
200	0,0074821	0,092419	653	604,09	4,52
100	0,015376	0,087025	326,5	277,47	4,27
20	0,0909	0,1317	64,9	38,40	3,49
8	0,1287	0,1460	25,96	13,80	1,78
4	0,2133	0,2359	12,98	6,82	1,45
200	0,0075	0,0836	653	599,31	4,49
100	0,0157	0,0968	326,5	280,82	4,42
60	0,0303	0,0988	195,9	149,91	4,54
40	0,0370	0,1038	130,6	96,31	3,56
8	0,1581	0,1713	25,96	13,50	2,13

TABLEAU 6

Q1 nm	V12 nm /min	mg totaux	TC extra (uM)	V12 nm/min/mg
604,1	4,52	0,46	185	2,1
277,5	4,27	0,46	85	1,9
38,4	3,49	0,46	12	1,6
13,8	1,78	0,46	4	0,8
6,8	1,45	0,46	2	0,7
599,3	4,49	0,46	184	2,1
280,8	4,42	0,46	86	2,0
149,9	4,54	0,46	46	2,1
96,3	3,56	0,46	29	1,6
13,5	2,13	0,46	4	1,0

Les valeurs des paramètres du modèle compartimental (K_{21} et K_{12}) sont ensuite estimée à partir des données expérimentales grâce à un logiciel basé sur la méthode de Levenberg-Marquardt et utilisant le calcul des moindres carrés non linéaires.

La quantité totale de taurocholate étant connue (Qt = concentration * volume d'incubation), on calcule la quantité de taurocholate extracellulaire ($Q1 = Qt * \frac{K_{21}}{K_{21} + K_{12}}$) et la vitesse d'incorporation à l'état stationnaire ($V_{12} = Q1 * K_{12}$) (tableau 5).

Le dosage protéique du contenu de la fiole d'incubation permet d'exprimer la vitesse (V_{12}) en nmoles/min/mg (tableau 6).

En suivant les instructions détaillées jusqu'à présent, les vitesses d'incorporation sont déterminées pour chaque fioles d'incubation, c'est à dire pour chaques concentrations différentes en taurocholate extracellulaire.

Sur un second graphe, les vitesses de transport (nmoles/min/mg) sont exprimées en fonction de la concentration extracellulaire en taurocholate (fig.3).

Enfin, le programme informatique Maclab version 1.3.+ (by Coche 1988) permet l'ajustement d'une hyperbole de type Michaëlis-Menten sur les points expérimentaux (fig.4). De plus, il donne les valeurs de Vmax et Km accompagnées de paramètres statistiques tels que l'écart-type, le carré moyen résiduel, la variance résiduelle et le nombre de degré de liberté.

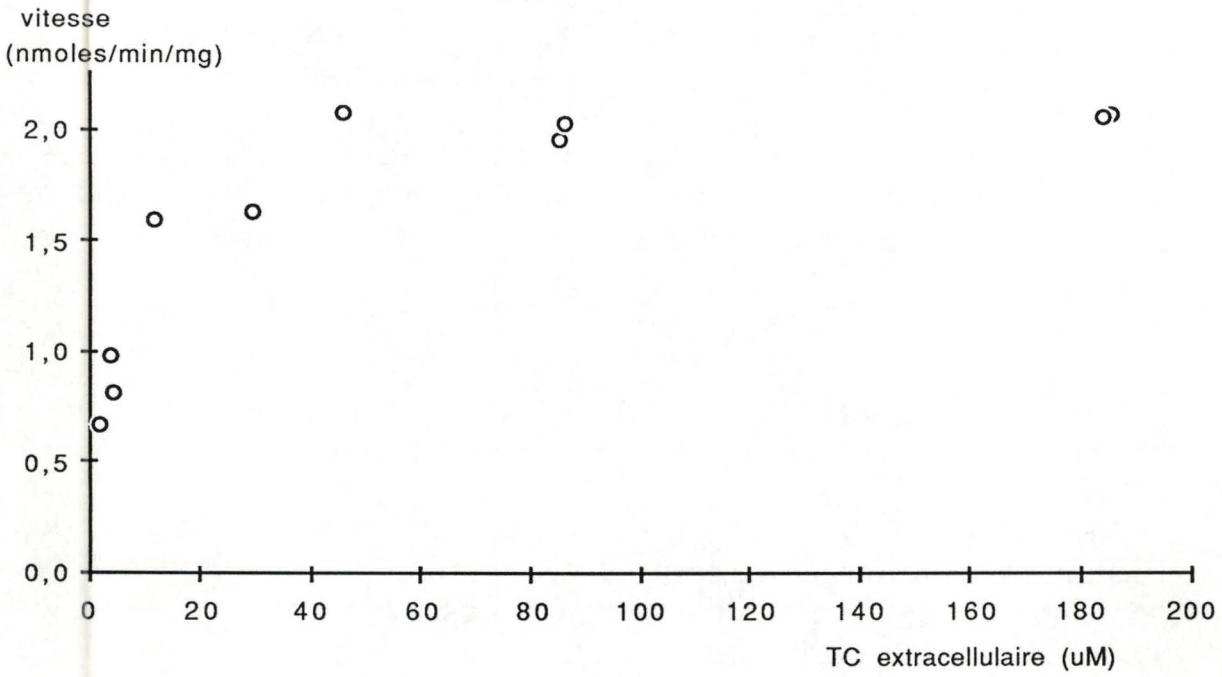


fig.3 : graphe exprimant les vitesses de transport du taurocholat (nmoles/ min/ mg) en fonction de la concentration extracellulaire en taurocholate

	Final Parameters	Std. Deviations	Dependencies
Vm	2.124487	5.750025E-02 (2.706548 %)	.4681236
Km	5.273337	.7201716 (13.65685 %)	.4681236

Residual sum of squares (weighted) : 9.718888E-02
Total sum of squares (weighted) : 2.8482
Final Res. Variance 1.214861E-02

Multiple correlation coefficient : .9658771
F value : 113.2232

Weight: 1 Degrees of freedom 8 Final Lamda .000001

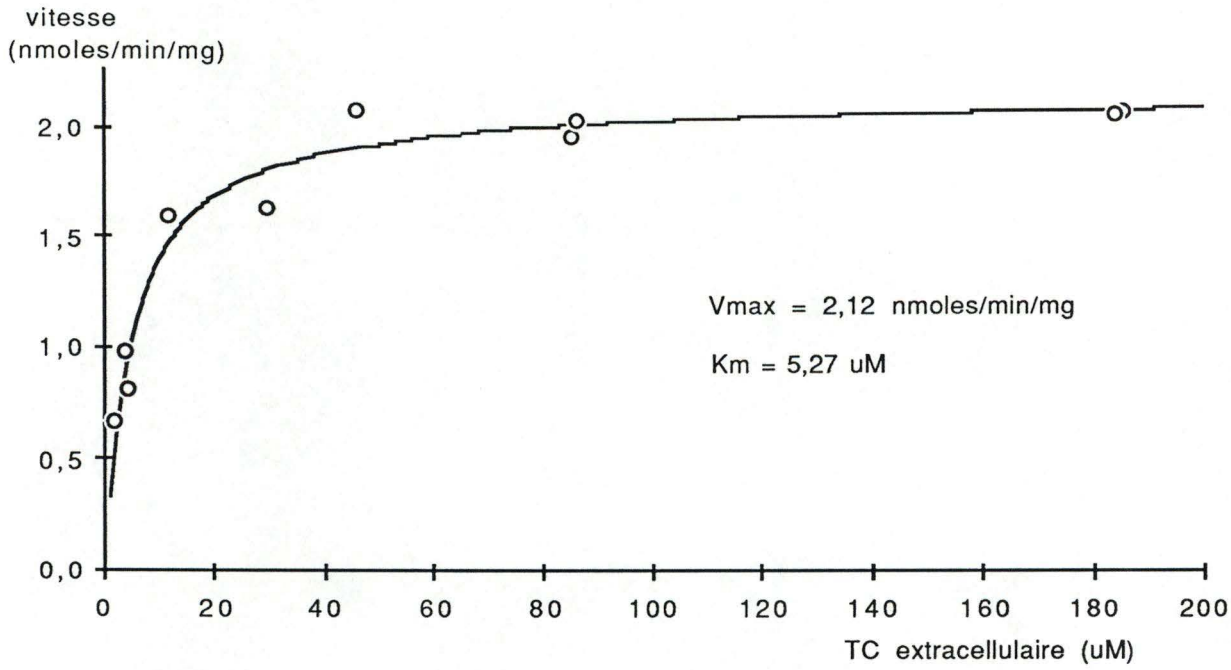


fig.4 : Ajustement d'une hyperbole de type Michaëlis-Menten sur les points expérimentaux.

BIBLIOGRAPHIE

Anwer M. (1976) Effect of albumin on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes. Is there a common bile acid carrier? Biochem. Biophys.Acta 73, p63-71.

Arias I., Popper H., Schachter D. and Sharfritz D. (1982) The liver. Biology and pathobiology. Raven press N.Y.

Basic histology (3rd Ed.) L.C.Junqueira, J.Carneira Lange Medical publication USA.

Barnett R.E. (1978) The effects of dimethylsulfoxyde and glycerol on Na^+-K^+ ATPase and menbrane structure. Cryobiology 15, p227-229.

Baur H., Kasperk S. and Pfaff E. (1975) Criteria of viability of isolated liver cells. Hope-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, p827-838.

Bengtsson B.G., Kiessling K.H. and Smith-Kieland A. (1981) Partial separation and biochemical characteristics of periportal perivenous hepatocytes from rat liver. Eur J. Biochem 118, p.591-597.

Bergmeyer H.V., Brent E. (1970) In methoden d.Enzymat.analyse (Bergmeyer H.V., ed.) 2nd edn., Vol 1, p533-538, verlag chemie, Wheinheim/Bergstr.

Berry M.N., Friend D.S.(1969) J.Cell.Biol. 43, p506-520.

Berthon B., Claret M., Mazet J. and Poggioli J. (1980) J.Physiol.(London)305,p267-277.

Bissel D., Billing B. (1978) Bilirubin metabolism in primary culture. In "the liver quantitative aspects of structure and function." p110-118. Edito cantor Aulendorf.

Canty A., Driedzic W.R., Storey K.B. (1986) Freeze tolerance of isolated ventricle strips of the wood frog (*Rana sylvatica*). Cryo-letters 7, p81-86.

Chapman G.S., Jones A.L., Mayer U.A. and Bissel D.H. (1973) Parenchymal cells from adult rat liver in non proliferating monolayer culture. J.Cell.Biol. 59, p.735- .

Chesné C., Guillouzo A.(1988) Cryopreservation of isolated rat hepatocytes: a critical evaluation of freezing and thawing conditions. Cryobiology 25, p323-330.

Coche T. (1982) Les hépatocytes en suspension comme modèle expérimental pour l'étude de la cinétique des acides biliaires chez le rat. Mémoire FNDP.

Coche T. (1988) transport du taurocholate à l'état stationnaire par des hépatocytes isolés à partir de rats contrôles et prétraités à l'éthinyloestradiol. Thèse FNDP

Cogoli A., Tschopp, Fushs-Bislin P. (1984) Cell sensitivity to gravity. Science 225, p228-230.

Colbeau A., Nachbaur J. and Vignais P.M. (1971) Enzymatic characterisation and lipid composition of rat liver subcellular menbranes. Biochemica et Biophysica Acta 249, p462-492.

Crane J.L. (1977) Plasma protein sunthesis by isolates rat liver parenchymal cells.J.Cell Biol. 72, p11-25.

Cuervas-Mons V., Maganto P., Cienfuegos J.A. (et al.) (1982) Ectopic liver using dispersed liver cells as a support measure in acute fulminant hepatic failure. Hepatology 2, p183- .

Decat A. (1987) Recherche d'un protocole de cryopréservation des hépatocytes isolés,en vue de leur stockage pour l'étude de leur métabolisme dans le cadre du laboratoire spatial européen. Mémoire FNDP.

Deremme D. (1987) Caractérisation des voies métaboliques de l'hépatocyte isolé en suspension dans le cadre des contraintes spécifiques du laboratoire spatial européen: incorporation de la leucine marquée dans les protéines. Mémoire FNDP.

Drochmans P., Wanson J.C., May C. and Bernaert D.(1977) Ultrastructural and metabolic studies of isolated and cultured hepatocytes. Cibo found.Sympos. 55, p 7-24.

Dubisy F. (1985) Modification du transport des acides biliaires par des inhibiteurs du cytosquelette:étude morphologique et cinétique sur des hépatocytes isolés. Mémoire FNDP.

Dubois B. (1988) Cinétique de la synthèse protéique dans les hépatocytes isolés.Evaluation de l'intégrité métabolique des hépatocytes après stockage à -13°C. Mémoire FNDP.

Elliot Keith R.F. (1979) The preparation, characterisation and use of isolated cells for metabolic studies. Techn.in Metab.Res.B. 204, p1-20.

Eroles G., Maganto P., Cienfuegos J.A.(et al.) (1984) Functionnal changes in cirrhotic animals after synergic hepatocellular transplantation.Eur.J.Surg.Res. 16, p114- .

European space agency (1984) Biorack: a spacelab multipurpose research facility for cell and developmental biology.Rapport de l'ESA.

European space agency (1986) Influence of microgravity on isolated hepatocytes. Rapport de l'ESA.

Farrant J. (1965) Mechanism of cell dammage during freezing and thawing and its prevention. Nature 205, No 4978, p1284-1287.

Farrant J., Walter C.A. (1977) Use a two step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. Cryobiology 15, p273-286.

Feytmans E., Coche T., Depiereux E. (1987) Cryopreservation of isolated rat hepatocytes for future use in spacelab experiments - preliminary results. ESA SP-271 295-297.

Forker E., Luxon B. (1981) Albumin helps mediate removal of taurocholate by rat liver.J.Clin.Invest. 67, p1517-1522.

Fujita Y., Mori I., Kitano S. (1983) Color reaction between pyrogallol red-molybdenum(VI) complex protein. Bunseki Kagaku 32, pE379-E386.

Fuller B.J. (1985 a) Cryopreservation of isolated rat hepatocytes in pellet form. Cryo-letters 6, p49-56.

Fuller B.J., Deloecker W. (1985 b) Changes in permeability characteristics of isolated hepatocytes during slow freezing.

Fuller B.J., Grout B.W. (1982) Biochemical and ultrastructural examination of cryopreserved hepatocytes in rat. Cryobiology 19, p493-502.

Glasinovic J., Dumont M., Duval M. and Erlinger S. (1975) Hepatocellular uptake of bile acids in the dog: evidence for a common carrier-mediated transport system. Gastroenterology 69, p973-971.

Greiff D., Strong D.M., Seifert P. (1971) Cryotolerance of selected sites on the surface of menbranes and cells II.A,B, and H combining sites of human erythrocytes. Cryobiology 8, p550-558.

Groothuis G., Hulstaert E., Kalicharan D. and Hardonk J. (1981) Plasma menbrane specialization and intracellular polarity of freshly isolated rat hepatocytes. Eur.J.Cell.Biol. 26, p43-51.

Gumucio J., Miller D. (1981) Functionnal implications of liver cell heterogeneity. Gastroenterology 80, p393-403.

Gumucio J., Valdivieso V. (1971) Studies on the mechanism of the ethynylestradiol impairment of bile flow and bile excretion in the rat. Gastroenterology 61, p 334-339.

Handlogten M.E., Weissbach L. and Kilberg M.S. (1982) Heterogeneity of Na^+-independant aminobicyclo-(2,2,1)-heptane,2 carboxilic acid and leucine transport in isolated rat hepatocytes in primary culture. Biochemical and Biophysical research commun.

Hannig K. (1972) Electrophoretic separations of cells and particles by continuous free-flow electrophoresis. In: Glick D., Rosenbaum R., eds.Techniques of biochemical and biophysical morphology, vol.1 New-York : Wiley and sons; p191-232.

Hatley R.H.M. and Franks F. (1986) Denaturation of lactate deshydrogenase at subzero temperatures. Cryo-letters 7, p226-233.

Hochachka P.W. (1986) Defense strategies against hypoxia and hypothermia. Science 230, p234-241.

Howard R.B., Pesch L.A. (1968) Respiratory activity of intact isolated parenchymal cells from rat liver.J.Cell Biol. 35, p675- .

Iga T., Klaassen C. (1982) Uptake of bile acids by isolated rat hepatocytes. Biochem.pharma. 31, p211_ .

Jackson B., Davies J. and Chipman J. (1985) Cytochrome P450 activity in hepatocyte following cryopreservation and monolayer culture. Biochem. pharmacol. 34, p3389-

Jacquez J.A. (1972) Kinetics of distribution of tracer-labeled materials. Compartimental Analysis in Biology and Medecine. 1, p1-12.

Jamieson N.V., Sundberg R. (1988) A comparison of cold storage solutions for hepatic preservation using the isolated perfused rabbit liver. Cryobiology 256, p300-310.

Kayser C.(1970) Physiologie.I.Historique.Fonctions de la nutrition.Flammarion Paris.

Keith R.F.(1979) The preparation, characterisation and use of isolated cells for metabolic studies. Departement of biochemistry, university of Manchester, Manchester, M 123 9PL U.K.

Kimzey S.L., Willis J. (1971) J.gen.Physiol. 58, p620-633.

Klebe R.J., Mancouso M.G. (1983) Identification of new cryoprotective agents for cultured mammalian cells. In vitro 19, No 3(part 1), p167-170.

Kreamer B.J., Staecker J.L. (1985) Use a low speed,iso-density percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocytes preparations. In vitro Cellular & Developmental Biology 22, No 4, p201-211.

Layden T., Bayer J. (1976) The effect of thyroïd hormone on bile salt independant bile flow and Na^+-K^+ ATPase activity in the liver plasma menbranes enriched in bile canaliculi.J.Clin.Invest 57, p1009-1018.

Layden T., Elian E. and Boyer J.(1978) Bile formation in the rat: the role of the paracellular shunt pathway.J.Clin.Invest 62, p1375-1385.

Lehninger A.L.(1984) Biochimie Flammarion Méd.Sc.

Lepock J.R., Morse P.D. (1978) Freeze-thaw dammage in isolated lobster sarcoplasmic reticulum menbranes: a model system for menbrane dammage. Cryobiology 14, p643-653.

Locksley E., Mac Gann (1978) Differing actions of penetrating and non penetrating cryoprotective agents. Cryobiology 15,p382-390.

Lovelock J.E., Bishop N.W.H. (1959) Prevention of freeze dammage to living cells by dimethylsulfoxyde. Nature 183,p1394-1395.

Makowka L., Falk R.E.(et al.) (1980) Cellular transplantation in the treatment of experimental hepatic failure. Science 210, p901-903.

Makowka L., Rotstein L.(et al.) (1981) Allogenic and xenogenic hepatocyte transplantation. Transplant.Proc. 13, p855-859.

Manganto P., Cienfengos J.A. (1988) Cryopreservation and transplantation of hepatocytes: an approach for culture and clinical application. Cryobiology 25, p300-310.

Mapes J.P., Harris R.A. (1975) On the oxydation of succinate by parenchymal cells isolated from rat liver. FEBS Lett. 51, p80-83.

Mazur P. (1969) Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. J.of general physioloy 47, p347-365.

Mazur P. (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am.J.Physiol. 247 (Cell Physiol. 16) p. C125-C142.

Miller (1959) Protein method.Anal.Chem 81, p964- .

Morhi T., Mitsumoto Y., Ohyashiki T. (1983) Leucine transport coupled to proton movement in menbrane vesicles from Chang liver cells. Biochemistry international 7(2), p 159-167.

Muller M., Schreiber M. (et al.) (1972) Cancer Research 32, p2568-2576.

Munro H.N. and Fleck A. (1966) The determination of nucleic acids: method of biochemical analysis 14, p113-176.

Nair P., Kritchevsky D. (1971) The bile acids chemistry, physiology and metabolism Vol1: chemistry. Plenum press.

Newbold R.P., Tume R.K. (1977) Aust.J.Biol.Sc. 30, p519- .

Novicki D.L., Irons G.P. (1982) Cryopreservation of isolated rat hepatocytes. In vitro 18, No 4, p393-399.

Nutt L.H., Attenburrow V.D. and Fuller B.J. (1980) Investigations of repair of freeze-thaw dammage in isolated rat hepatocytes. Cryo-letters 1, p513-518.

Okishio T., Nair P. (1966) Studies on bile acid. Some observations on the intracellular localization of major bile acids in rat liver. Biochemistry 5, p3662-3667.

Pegg D.E. and Karrow A.M. (1987) The biophysics of organ cryopreservation. NATO ASI series: series A: Life Sciences.

Pfaff E., Schuler S., Krell H. and Höte H.(1980) Control and special features of isolated hepatocytes.Arch.toxicol. 44, p3-21.

Prisler H.D., Christoff G., Taylor E. (1976) Cryoprotective agents as inducers of erythroleukemic cell differentiation in vitro. Blood 47, p363-368.

Rasmussen D.H., Mac Kenzie A.P. (1968) Phase diagram for the system water-dimethylsulfoxyde. Nature 220, p1315-1317.

Rojkind M., Portales M., Cid M.E. (1974) Isolation of rat liver cells containing concanavalin-A receptor sites. FEBS Lett. 47, p11-14.

Rudolph A., Crowe J. (1985) Menbrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants trehalose and proline. Cryobiology 27, p367-377.

Santarius K.A., Heber V. (1970) The kinetics of the inactivation of thylakoid menbranes by freezing and high concentrations of electrolytes. Cryobiology 7, p71-78.

Scharschmidt B., Stephens J. (1981) Transport of sodium chloride and taurocholate by cultured rat hepatocytes. Proc.Natl.Acad.Sci. 78, p986-990.

Schobert B., Tschesche H. (1978) Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. Biochem.Biophys.Acta 541, p270-277 .

Schwarz L., Schwenk M., Pfaff E. and Grein H. (1976) Excretion of taurocholate from isolated hepatocytes. Eur.J.Biochem. 71, p369-373.

Schwarz L.R., Burr R. (1975) Uptake of taurocholic acid into isolated rat liver cells. Eur.J.Biochem.55, p617-623.

Schwarz P.E., Seglen P.O. (1980) Protein metabolism and survival of rat hepatocytes in early culture. Experimental cell research 130, p185-190.

Seglen P.O. (1973) Preparation of rat liver cells :
1°Effects of ions and chelators on tissue dispersion. Experimental cell research 76, p25-30
2°Enzymatic requirements for tissue dispersion. Experimental cell research 82, p391-398

Sherman J.K. (1978) Correlation in ultrastructural cryoinjury of mitochondria with aspects of their respiratory function. Experimental cell research 66, p378-384.

Sherman J.K., Lui K.C.(1976) Relation of ice formation to ultrastructural cryoinjury and cryoprotection of rough endoplasmic reticulum. Cryobiology 13, p599-608.

Simon F., Fleischer B. and Fleischer S. (1984) Two distinct mechanisms for uptake in subcellular fractions from rat liver. J.Biol.Chem. 259, p10814-10822.

Sommer B.G., Sutherland D.E. (et al.) (1979) Hepatocellular transplantation for treatment of D-galactosamine induced acute liver in rats. Transplant.Proc. 11(1), p578-584.

Stewart G.W., Ellory C., Klein R.A. (1980) Nature 286, p403-404.

Storey K.B. (1988) Can.J.Zool. 66, p124- .

Storey K.B., Storey J.M. (1989) Comment les animaux survivent au gel. La Recherche 208, p332-341.

Strange R. (1984) Hepatic bile flow.Physiological reviews 64, p1055-1102.

Strange R., Chapman B., Johnston J., Nimmo I. and Percy-Robb I. (1979) Partitioning of bile acids into subcellular organelles and the in vivo distribution of bile acids in the rat liver. Biochemica, Biophysica Acta 573, p535-545.

Takadera T., Morhi T. (1983) Effect of N-ethylmaleide on leucine transport in Chang liver cells. Biochemica er Biophysica Acta 735, p197-202.

Tarao K., Olinger E., Osrow J. and Balistreri W. (1982) Impaired bile acid efflux from hepatocytes isolated from the liver of rats with cholestasis. Am.J.Physiol. 243, pG253-G258.

Tarao K., Takamura Y. (1980) Bile acids excretion in isolated hepatocytes from cholestatic rat. Nippon Shokakibyo Gokkai Zasski 77, p744-749.

Taylor M.J.(1981) The meaning of pH at low temperatures. Cryo-letters 2, p 231-

Taylor M.J. (1982 a) The role of pH and buffer capacity in the recovery of function of smooth muscle cooled to -13°C in unfrozen media. Cryobiology 14, p 251-272.

Taylor M.J., Pignat V. (1982 b) Practical acid dissociation constants, temperature coefficients and buffer capacities for some biological buffers in solutions containing dimethylsulfoxyde between 25 and -13°C. Cryobiology 19, 99-109.

Taylor M.J., Pegg D.E. (1983) The effect of ice formation on the function of smooth tissue stored at -21 or -60°C. Cryobiology 20, p36-40.

Tennant J.R. (1964) Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. Transplantation 2, p 685-694.

Trump B.F., Young D.E., Arnold E.A. and Stowell R.E. (1965) Effects of freezing and thawing on structure, chemical combination and fixation of cytoplasmic structures. Fed.Proc. 24, p5144-5168.

Van Bezooijen C.F.A. (1978) Cellular basis of liver aging studied with isolated hepatocytes. Thesis for a doctoral degree at the university of Utrecht.

Watanabe N. (1986) Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and Hitachi 726 automated analyser. Clinical chemitry 32, p1551-1554.

Weigand K., Muller M. (1971) Intact endoplasmic reticulum and albumin synthesis in rat liver cell suspensions. Experimental cell research 67, p27-32.

Weissbach L., Handlogten M.E., Christensen H.N. and Kilberg M.S. (1982) Evidence for two Na^+-independant neutral amino acid transport systems in primary cultures of rat hepatocytes. J.of Biological Chemistry 257(20), p12006-12011.

White F.N., Somero G.N. (1982) Physiol.revue 62, p40- .

Zahlten R.M., Stratman F.W. (1974) The isolation of hormone-sensitive rat hepatocytes by modified enzymatic technique. Arch. of Bioch. and Biophys. 163,p600-608.