



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Caractérisation des voies métaboliques de l'hépatocyte isolé en suspension dans le cadre des contraintes spécifiques du laboratoire spatial européen : incorporation de leucine marquée dans les protéines

Dereme, Dominique

Award date:
1987

Awarding institution:
Université 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.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

**Caractérisation des voies métaboliques
de l'hépatocyte isolé en suspension dans le
cadre des contraintes spécifiques du
laboratoire spatial européen:**

**Incorporation de leucine marquée dans
les protéines.**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

DEREME Dominique.

1987

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Faculté des Sciences
rue de Bruxelles 61, B-5000 NAMUR
Tél. 081-22.90.61 Télex 59222 facnam-b Téléfax 081-23.03.91

**Caractérisation des voies métaboliques de l'hépatocyte isolé en suspension dans le cadre des contraintes spécifiques du laboratoire spatial Européen:
Incorporation de leucine marquée dans les protéines.**

DEREME Dominique

Résumé.

Dans ce travail, un protocole d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines a été adapté aux contraintes matérielles d'un laboratoire spatial, en particulier, volumes d'incubation réduits et manipulations expérimentales minimales. Les protéines ont été isolées par précipitations successives à l'eau et au TCA (Seglen, 1976) à partir d'hépatocytes de rat incubés de 50 à 200 minutes en présence de leucine tritiée. Le taux d'incorporation de leucine totale obtenu est de 90 ± 8 pmoles/min/mgr prot. Les expériences réalisées mettent en évidence essentiellement la composante passive de l'incorporation de la leucine dans la cellule, et l'excrétion des protéines néosynthétisées dans le milieu d'incubation.

Abstract.

^3H leucine has been incorporated in proteins of isolated rat hepatocytes in suspension. The experimental protocole was adapted to the constraints of the SPACELAB, to provide a valable tool for the study of microgravity conditions on some of the major metabolic pathways of the liver cell. The proteins have been isolated by running precipitation of water and TCA from rat's hepatocytes incubated from 50 to 200 minutes with [^3H]-leucine. The total incorporation rate of leucine obtained is 90 ± 8 nmol/min/mgr prot. Results indicate that the captation of leucine by the isolated hepatocyte is due to a passive input, and the excretion of the neosynthetised proteins in the incubation medium.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1987

Laboratoire de Biologie Quantitative

Promoteur: E. FEYTMANS

Copromoteur: E. DEPIEREUX

ERRATUM

Je tiens à signaler que les références citées dans le texte et manquantes dans la bibliographie ont été reprises telles quelles d'articles énoncés dans cette bibliographie.

Ce choix a été dicté par un souci de ne pas alourdir une bibliographie par des références non consultées de façon approfondie.

Si néanmoins vous désirez une information supplémentaire à ce sujet, je pourrai vous fournir par la suite un complément de références.

Mes remerciements vont tout naturellement à Monsieur DEPIEREUX qui m'a permis pendant cette année de mener à bien un travail scientifique enrichissant.

Je remercie également Monsieur FEYTMANS, Monsieur VANDENHAUTE, Monsieur TRAUSCH, Monsieur DUBOIS et le Père DEVOS pour leurs conseils qui furent des plus utiles.

Par la même occasion, je remercie tous les membres du laboratoire et spécialement Thierry COCHE ainsi qu' Etienne PIROTTE dont l'aide apportée fut très appréciable.

Je tiens tout particulièrement à remercier André DECAT qui a su rendre cette année agréable en permettant le développement d'une amitié sincère.

Ce mémoire étant le résultat d'un travail d'équipe, je remercie tous ceux qui ont contribué à sa réalisation, et notamment Emmanuel et Axel TAILLIEU, sans qui ces quelques lignes n'auraient pas existé.

Merci à Bernadette et Christine pour la bonne humeur qu'elles ont su faire régner lors de leurs nombreuses visites au laboratoire.

TABLE DE MATIERES

Introduction

1. <u>Matériel utilisé pour l'étude en microgravité</u>	1
1.1. Matériel spatial.....	1
1.1.1. Le laboratoire spatial.....	1
1.1.2. Le "Biorack".....	2
1.2. Matériel biologique.....	5
1.2.1. Le foie.....	6
1.2.2. Les acides biliaires.....	7
1.3. Objectifs généraux.....	8
2. <u>Modèle expérimental</u>	10
2.1. Suspension de cellules isolées.....	10
2.2. Préparation de la suspension cellulaire.....	13
2.2.1. Historique.....	13
2.2.2. Perfusion enzymatique.....	15
3. <u>Viabilité et caractéristiques des hépatocytes isolés</u>	17
3.1. Intégrité structurante.....	17
3.1.1. Exclusion du colorant vital.....	17
3.1.2. Morphologie.....	18
3.1.3. Conservation et rétention de certaines substances.....	18
3.2.4. Respiration.....	20
3.2. Intégrité métabolique.....	20
4. <u>Marquage des grandes voies métaboliques par des isotopes radioactifs</u>	22
4.1. Notions sur la marquage radioactif.....	22
4.1.1. Mesure de la radioactivité β par scintillation liquide...	23
4.2. Analyse compartimentale.....	27
4.3. Conditions d'expérimentation.....	30
4.4. Objectifs.....	31

5. <u>La synthèse protéique</u>	33
5.1. Généralités concernant la leucine et son transport.....	34
5.2. Incorporation de leucine dans les protéines.....	35
5.3. Perte de leucine radioactive.....	36
5.4. Transport passif de la leucine dans les hépatocytes isolés en suspension.....	37
5.5. Protocole d'incorporation de leucine dans les protéines.....	38

Matériel et méthodes.

1. <u>Animaux</u>	40
2. <u>Réactifs</u>	40
3. <u>Isolement des hépatocytes</u>	40
3.1. Appareil de perfusion.....	40
3.2. Milieu de perfusion.....	41
3.3. Préparation du rat.....	42
4. <u>Tests de viabilité</u>	44
4.1. Test à l'érythrosine.....	44
4.2. Test L.D.H.....	44
4.3. Dosage des protéines.....	45
4.4. Cinétique d'incorporation de leucine radioactive dans les cellules.....	46
4.5. Cinétique d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines.....	47

Résultats.

1. <u>Résultats des différents tests de viabilité</u>	48
1.1. Test à l'érythrosine.....	48
1.2. Test LDH.....	48
1.3. Dosage des protéines.....	49
2. <u>Résultats de l'incorporation de leucine radioactive</u>	49
2.1. Incorporation dans les cellules.....	49
2.1.1. Effet du TCA et du KOH.....	50
2.1.2. Effet de la température.....	51
2.1.3. Effet du temps de pré-incubation.....	52
2.1.4. Incorporation de leucine et tests de viabilité.....	53
2.2. Incorporation dans les protéines.....	55
2.2.1. Effet de la cycloheximide.....	55
2.2.2. Incorporation dans les protéines cellulaires et dans les protéines totales.....	56

Discussion.

1. <u>Hépatocytes isolés en suspension</u>	57
2. <u>Critère de viabilité</u>	57
2.1. Erythrosine rouge.....	58
2.2. Dosage de la LDH.....	58
3. <u>Incorporation de leucine radioactive</u>	60
3.1. Incorporation dans les cellules.....	60
3.2. Incorporation dans les protéines.....	62

Conclusions & perspectives.

1. <u>Conclusions</u>	66
2. <u>Perspectives</u>	68

Références.

INTRODUCTION

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une recherche menée par la NASA et l'ESA (European Space Agency) afin de tester certaines expériences dans un environnement spatial et plus spécifiquement en microgravité. Celles-ci permettront une meilleure compréhension des mécanismes développés par les systèmes vivants sur terre pour contrer les effets de la gravité.

Les scientifiques voudraient mener à terme des expériences sans avoir à subir l'entraînement intensif des astronautes et dans un même temps, être capables de réutiliser l'équipement expérimental et de rapporter différents spécimens pour des analyses plus complexes en laboratoire.

1. MATERIEL UTILISE POUR L'ETUDE EN MICROGRAVITE .

1.1 Matériel spatial.

1.1.1 Le laboratoire spatial.

Le laboratoire spatial est une unité de recherche pouvant être embarquée à bord de la navette spatiale et est constitué de deux éléments indissociables:

- le module, souvent associé au nom "spacelab", comprend le "coeur" et les segments expérimentaux, le tout formant un laboratoire en microgravité ou l'on peut travailler "en bras de chemise".
- la palette, sur laquelle les instruments devant être directement exposés à l'environnement extérieur (radiations, observations..) peuvent être montés.

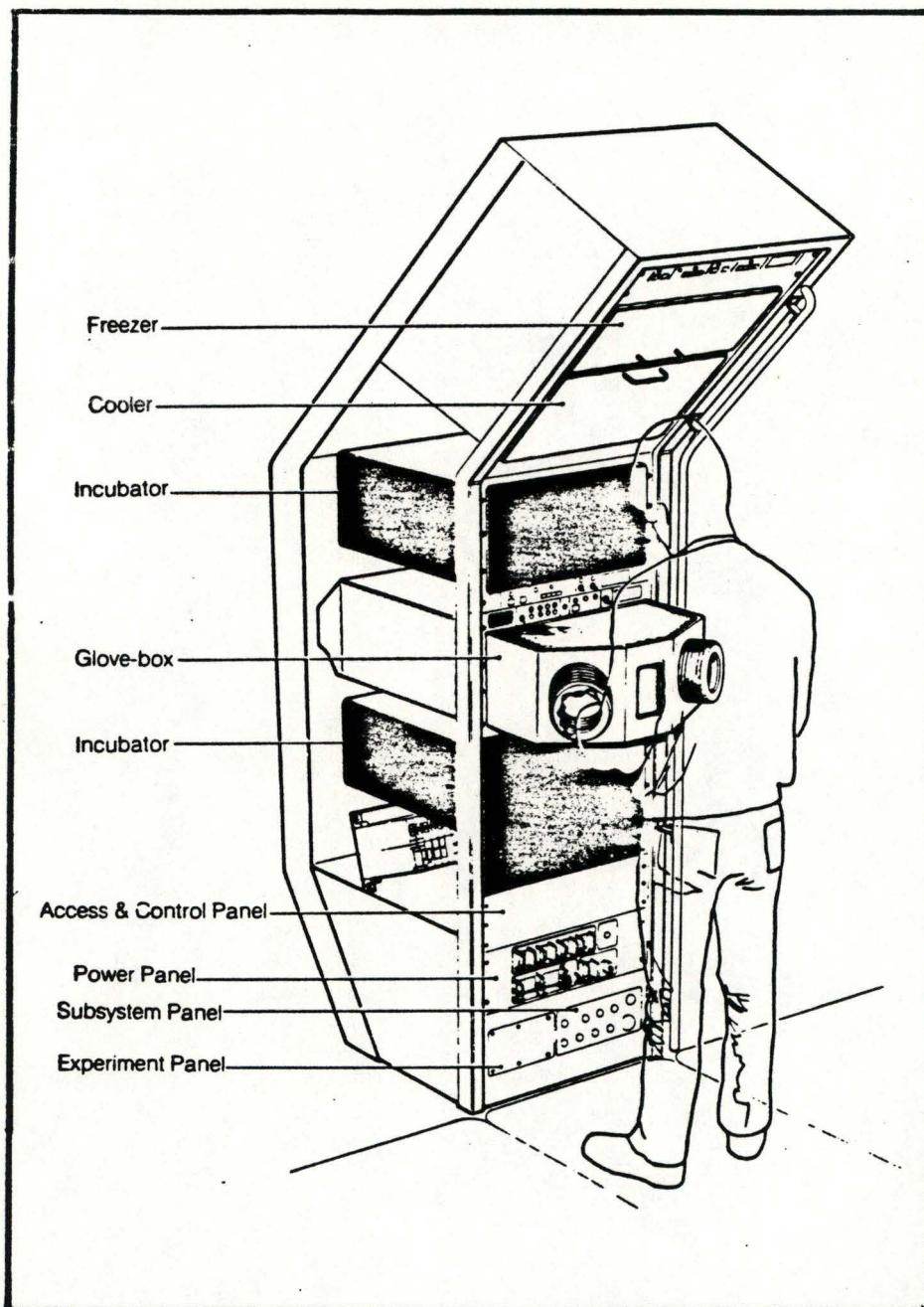


Figure n°1 : Configuration du Biorack.

(ESA bulletin n°36, novembre 1983)

Bien que les scientifiques doivent subir un entraînement minimum, le spacelab est conçu pour être utilisé par des personnes n'étant pas nécessairement des astronautes.

Ils auront l'avantage de travailler en microgravité tout en utilisant des instruments qui leur sont familiers.

Le spacelab offre une grande flexibilité d'aménagement afin que différentes disciplines puissent être étudiées côte à côte, ceci donnant un avantage économique en plus d'une stimulation intellectuelle.

Une équipe de six personnes, nécessaire pour effectuer toutes les expériences scientifiques, serait constituée :

- _ d' un pilote,
- _ d' un commandant,
- _ de deux scientifiques s'occupant des expériences sur le comportement des individus et pouvant se prêter à des tests d'investigation médicale,
- _ de deux astronautes responsables de l' aménagement des ressources du spacelab et qui assisteraient les deux scientifiques.

1.1.2 Le "Biorack".

Le Biorack est un élément multifonctionnel procurant l'environnement expérimental spécifique aux recherches dans le domaine cellulaire et physiologique. (Figure n°1)

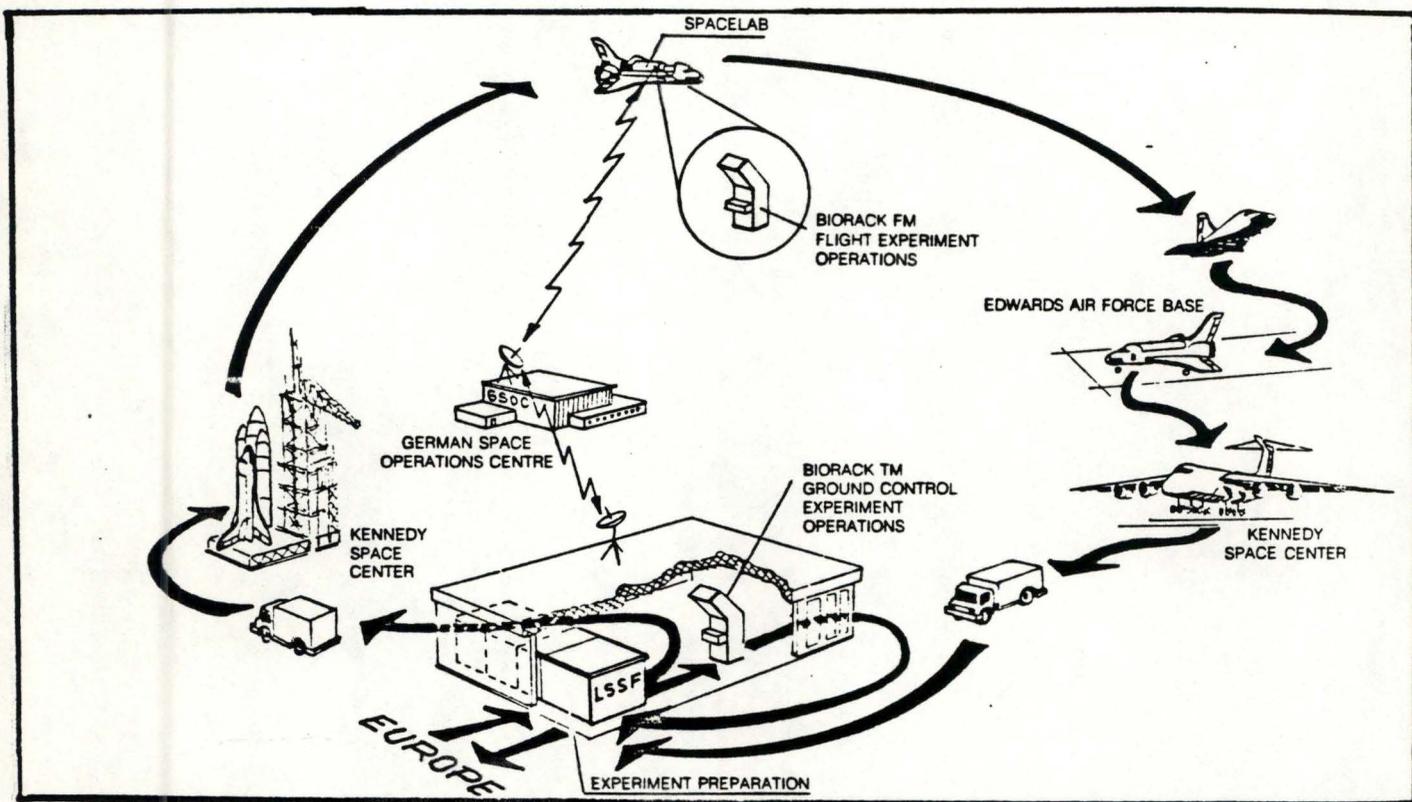


Figure n°2 : Séquence générale du déroulement de la mission spatiale.

(ESA bulletin n°47, août 1986)

Les éléments principaux du Biorack sont :

- Les deux incubateurs dont l'un travaille de 18°C à 30°C et l'autre de 30°C à 40°C .Ces incubateurs contiennent des racks pouvant accueillir les huit containers renfermant les spécimens biologiques. Parmi ces racks se trouvent notamment des centrifugeuses permettant de recréer une gravité 1G en orbite afin de pouvoir isoler les effets de la microgravité d'autres effets éventuels dûs au vol dans l'espace.
- Le compartiment en verre assure un haut niveau de propreté dans une aire de travail manuel sans risque de contamination. Ce compartiment offre certaines facilités pour l'emploi ultérieur d'appareils microscopiques, photographiques et vidéographiques.
- Le frigo et le réfrigérateur fournissent un environnement adéquat pour le stockage pré- et post- expérimental.

Afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles, différentes conditions doivent être remplies (Figure n° 2);

- Contrôle des conditions de température avant, pendant et après le vol.
- Enregistrement de tous les paramètres de l'environnement pendant le vol.
- Duplicat de chaque expérience, de préférence dans un deuxième Biorack pour éliminer les effets inconnus.
- Contrôle simultané au sol et dans les mêmes conditions expérimentales. Une communication directe et constante avec l'équipe de contrôle au sol est établie pour signaler les changements éventuels pouvant intervenir dans le déroulement des expériences.

Lors de la mission D-1 (août 1986), 14 expériences de 5 pays différents ont été sélectionnées par l'E.S.A pour le vol dans le biorack du German D-1.

— Expériences sur la structure cellulaire: distribution des composés cellulaires dans les globules rouges de mammifères, polarité spécifique des leucocytes, structure et prolifération des Paraméciums.

— Expériences sur la prolifération cellulaire: sur les spores bactériennes en mesurant la densité optique et sur E.Coli en observant l'effet de différents antibiotiques.

— Expériences sur le fonctionnement cellulaire: au niveau du comportement des cellules de Physarum, au niveau du rythme circadien chez Chlamydomonas et au niveau de la réactivité décroissante des lymphocytes du système immunitaire dans le sang des astronautes.

— Expériences sur les interactions bactériennes: conjugaisons, infections et interactions artificielles.

— Expériences sur la différenciation cellulaire: au niveau de l'embryogenèse des amphibiens Xénopus et étude de l'effet des radiations sur les oeufs d'insectes.

(ESA bulletin n°47, août 1986).

Les expériences concernant les bactéries ont révélé une augmentation très nette de leur prolifération ainsi qu'une résistance accrue aux antibiotiques. Les expériences au niveau des cellules humaines responsables de la reconnaissance et de l'élimination de matériel étranger par production d'anticorps, semblent démontrer que la microgravité inhibe souvent complètement le processus d'activation des globules rouges et ceci aussi bien dans les échantillons sanguins de l'équipage en vol qu'à partir d'échantillons prélevés avant le vol et mis en culture.

En plus de l'intérêt scientifique de ces résultats, une importance pratique peut donc être dégagée pour les risques de maladies infectieuses atteignant souvent les membres de l'équipage pendant le vol.

Il n'y a actuellement plus de doute quant aux effets de la microgravité sur les cellules et ces études peuvent donc être utilisées afin de mieux comprendre certains des nombreux effets de la microgravité sur les organismes et rétrospectivement, de mieux comprendre les mécanismes de fonctionnement normal des cellules dans leur environnement.

Deux phénomènes majeurs, en particulier, la prolifération et la différenciation cellulaire, semblent être affectés et ceci peut donc suggérer de nombreuses expériences pour l'avenir.

1.2. Matériel biologique.

Le but de cette recherche étant l'étude du métabolisme cellulaire en microgravité, deux facteurs importants doivent être pris en considération :

- _ le matériel biologique étudié doit posséder des voies métaboliques caractéristiques;
- _ il doit être compatible avec le protocole expérimental se conformant aux contraintes matérielles du spacelab.

Le matériel biologique utilisé est la cellule hépatique, celle-ci jouant un rôle important dans l'organisme et présentant une grande diversité de fonctions ainsi que des voies métaboliques très caractéristiques. Le protocole expérimental envisagé est celui des hépatocytes isolés en suspension, permettant de répondre aux contraintes d'incubation et de prélèvement rencontrées.

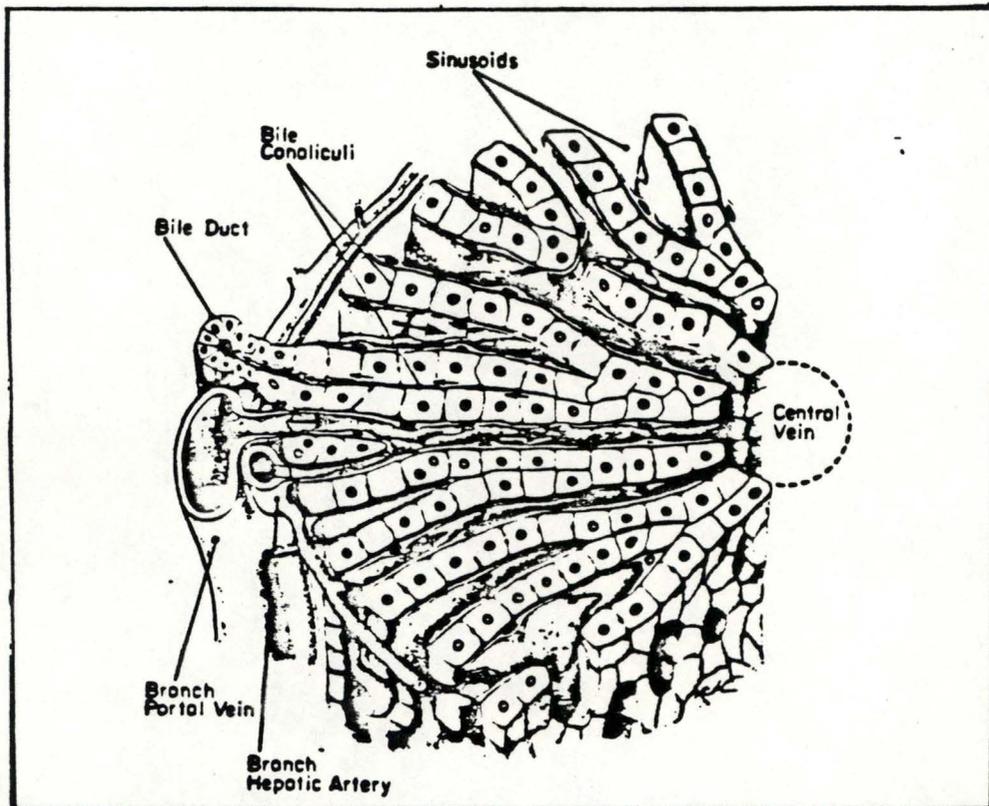


Figure n°3 : Agencement des hépatocytes en travées.

(Extrait de Bloom and Fawcett, 1975)

1.2.1 Le foie.

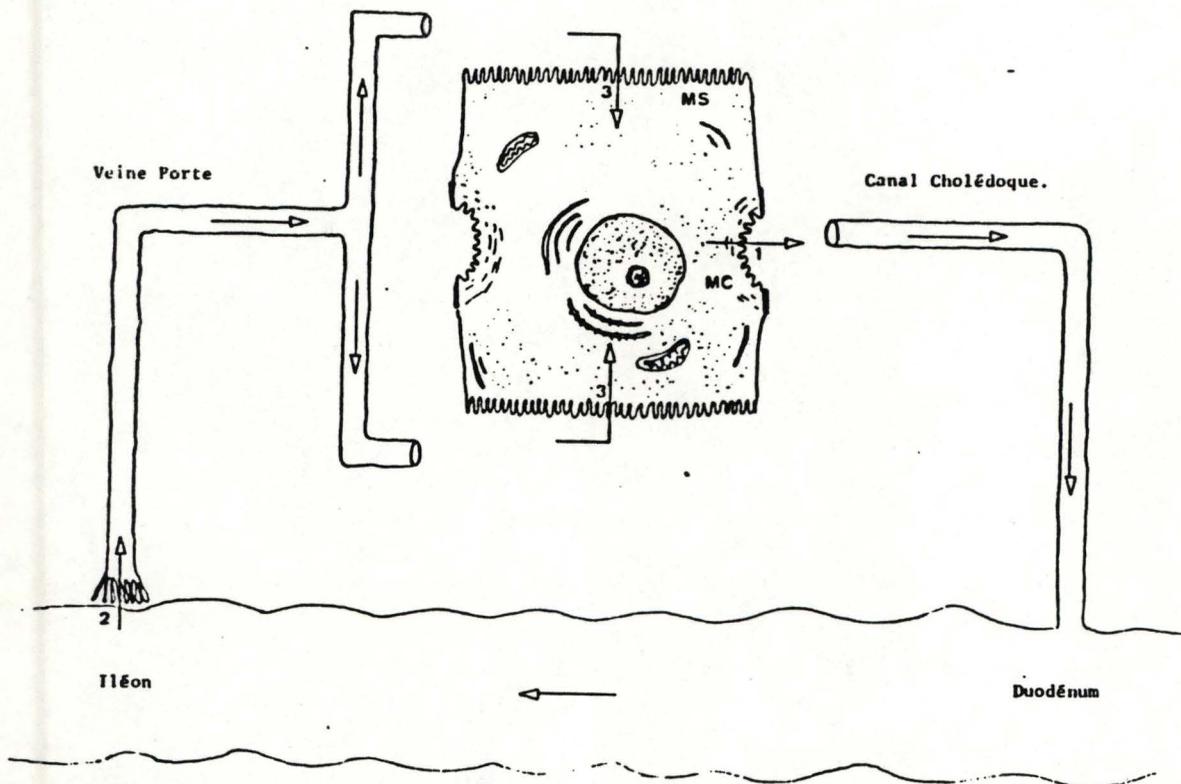
Le foie est un des organes stratégiques de l'organisme; il permet l'absorption de substances à partir du tractus gastrointestinal. Une des fonctions les plus importantes de cet organe est de former la bile, solution aqueuse contenant des acides biliaires, des pigments, du cholestérol, des phospholipides, et des protéines dont quelques enzymes (Bloom & al, 1975).

Le foie, constitué de quatre lobes recouverts de la capsule de Glisson, est divisé en lobules de section hexagonale contenant plusieurs types cellulaires: hépatocytes, cellules endothéliales, cellules de Küpffer, "fat storing cells" et plus rarement "pit cells".

Les hépatocytes sont des cellules polarisées hautement différenciées. Ils représentent à eux seul 90 à 95% du poids total de l'organe (Klassen & al, 1984). Ces hépatocytes sont assemblés en travées de Remak séparées, par l'espace de Disse, d'un sinusoiide (Figure n°3). Le lobule est formé de l'assemblage de ces travées autour de la veine centrolobulaire. L'espace porte, à l'extrémité de chaque lobule, est constitué entre autre d'une branche de l'artère hépatique et de la veine porte. Le canalicule biliaire est délimité par l'invagination membranaire de deux hépatocytes voisins. Les canalicules se rassemblent pour former le canal biliaire interlobulaire et ensuite le canal cholédoque qui va s'ouvrir dans le duodénum.

Le sang, arrivant au niveau de l'espace porte, est drainé par les sinusoides. Ces sinusoides ayant un endothélium fenestré, certaines substances du plasma passent dans l'espace de Disse puis sont captées par l'hépatocyte (Bloom & al, 1975).

Les hépatocytes in vivo sont donc fortement polarisés pour permettre ce transport: deux pôles morphologiques et fonctionnels distincts peuvent être observés au niveau de la membrane canaliculaire et de la membrane sinusoiide.



- MS Membrane sinusoidale
- MC Membrane canaliculaire
- 1 Excrétion canaliculaire
- 2 Réabsorption iléale
- 3 Extraction sinusoidale

Figure n°4 : Schéma mettant en évidence les trois transports membranaires des acides biliaires au cours du cycle entérohépatique.

1.2.2 Les acides biliaires.

Les acides biliaires, synthétisés dans les hépatocytes à partir du cholestérol, furent découverts en 1809 et représentent 67% des composants biliaires (Carey, 1982). Etant peu soluble à pH physiologique, ils se retrouvent surtout sous forme conjuguée à la glycine ou à la taurine par un lien peptidique facilitant leur solubilisation (Klaassen & al, 1984). Cette conjugaison pourrait avoir un rôle de détoxification de la propriété de détergent de ces acides (Vessey & al, 1981; Hardisson & al, 1981).

Le glycocholate est l'acide le plus abondant chez l'homme, tandis que chez le rat, il s'agit du taurocholate (conjugaison de l'acide cholique et de la taurine).

Les acides biliaires ont comme rôle de participer à la stabilisation de l'état physique de la bile (en neutralisant le pH acide du chyme stomacal) et d'intervenir dans la digestion et l'absorption des graisses dans l'intestin (Carey, 1982).

Ces acides sont secrétés dans la bile contre un gradient de concentration, ils sont ensuite déversés dans le tube digestif où ils participent à l'émulsion des graisses et favorisent l'action des lipases. Au niveau de l'iléon, 90% des acides biliaires sont réabsorbés de façon active et se lient à l'albumine avant de regagner le foie par la veine porte (Magne & al, 1980). 10% des acides biliaires sont perdus à chaque cycle par dégradation bactérienne et par voie fécale.

Toute interruption de ce cycle, appelé cycle entérohépatique (Figure n°4), augmente la synthèse du cholestérol et la sécrétion des sels biliaires (Magne & al, 1980).

Les hépatocytes présentent des voies métaboliques très caractéristiques, de plus ils ont une capacité de transport pouvant être utilisées pour des études cinétiques de captation et d'excrétion.

1.3 Objectifs généraux .

Après cette revue sommaire du cadre général dans lequel s'inscrit le travail, des objectifs plus précis peuvent être formulés.

Il s'agira donc ici de rechercher des modifications éventuelles dans les fonctions cellulaires fondamentales dues à l'environnement spatial et plus particulièrement à la microgravité. On peut par exemple étudier :

- Le transport membranaire par la cinétique de transport d'acides biliaires marqués comme le taurocholate.
- La gluconéogénèse par le dosage du glucose produit après incubation des cellules en présence de lactate.
- La synthèse des protéines par incorporation d'acides aminés radioactifs.
- Le métabolisme des lipides par incorporation de palmitate ou d'acétate radioactifs.
- La synthèse de RNA par incorporation d'uridine radioactive.

....

Différents modèles expérimentaux peuvent être proposés afin de mener à bien ces expériences qualitatives sur les hépatocytes.

Les modèles les plus proches de la réalité physiologique sont ceux du foie "in situ" et isolé. Cependant, dans ces modèles, les cellules restent assez inaccessibles et le type de dispositif dont on dispose dans la navette ainsi que les différentes contraintes du biorack excluent directement ces deux propositions.

Il reste donc à envisager le modèle des hépatocytes isolés mis en culture ou incubés en suspension et de choisir parmi ces deux modèles celui qui se prêtera le mieux à l'environnement spécifique des expériences en microgravité.

2. MODELE EXPERIMENTAL.

2.1. Suspension de cellules isolées.

La suspension de cellules isolées permet à l'expérimentateur une manipulation simple d'un système homogène qui présente une série de voies métaboliques comparables à celles des cellules "in situ."

Un certain nombre d'avantages des cellules isolées par rapport aux autres systèmes peuvent être envisagées (Seglen P.O, 1976) :

- _ Les cellules conservent leur structure membranaire et leur organisation intracellulaire alors que dans les homogénats et les préparations de tranches de tissus, cette intégrité est perdue.
- _ L'incubation de cellules est un modèle assez simple car les problèmes de diffusion du substrat vers les cellules peuvent être minimisés.
- _ Un seul type de cellules peut être obtenu à partir d'un organe complexe. Les interactions entre tissus seront donc annulées ainsi que celles entre différents types de cellules à l'intérieur d'un organe.
- _ L'utilisation d'une suspension homogène de cellules isolées permet d'obtenir un grand nombre d'incubations à partir d'une même préparation, ce qui limite les problèmes de variabilité individuelle rencontrés lors de l'utilisation de l'organe entier. On réduit donc à la fois le coût, la variabilité et le temps expérimental.
- _ Une suspension de cellules isolées offre un système idéal pour les études de propriétés de transport cellulaire alors que dans des grands organes intacts (et en particulier dans les homogénats) elles s'avèrent difficiles.
- _ La suspension de cellules isolées peut, en général, être réalisée en routine sans demander d'équipement spécialisé ou coûteux.

– Dans une suspension de cellules fraîchement isolées on retrouve souvent des fonctions similaires à celles de l'organe entier, comme le montre par exemple la synthèse de sérum albumine dans des suspensions d'hépatocytes de rat (Weigand-Muller & al, 1971; East & al, 1973).

Parmi les deux modèles choisis, culture d'hépatocytes et hépatocytes isolés en suspension, trois solutions peuvent être envisagées:

- culture d'hépatocytes à chaud;
- culture d'hépatocytes à froid;
- hépatocytes isolés en suspension, à froid.

Les avantages et les inconvénients de ces trois systèmes vont être détaillés ci-dessous afin de permettre un choix adéquat pour l'expérimentation spatiale. Rappelons, cependant, que ces avantages et inconvénients sont très relatifs puisqu'ils sont formulés par rapport aux contraintes spécifiques du Biorack.

– La suspension de cellules isolées présente l'inconvénient majeur de la perte structurelle et peut-être fonctionnelle de leur polarité (Vonk & al, 1978). Par contre, lors de la mise en culture, les hépatocytes récupèrent cette polarité biliaire (Gebboudt, 1984) en s'assemblant en travées après 24 heures (Wanson, 1976). Cependant, les hépatocytes en milieu de culture agité présentent une altération de l'ultrastructure (Guillanzo & al, 1972) ainsi que des divisions cellulaires amiotiques (Le Guilly & al, 1969).

– Le modèle des hépatocytes isolés en culture à chaud présente un inconvénient de taille pour les expériences envisagées dans ce travail: les conditions très strictes du Biorack ainsi que les effets dus au départ (vibrations, pression et rupture éventuelle d'alimentation) peuvent nuire à la préservation de telles cellules.

- Les hépatocytes isolés en suspension offrent un avantage particulier par le fait que plusieurs prélèvements dans une même incubation permettent de collecter sélectivement un échantillon de cellules, et de milieu d'incubation. Ce qui présente un atout certain pour toute étude cinétique.

- La cryoprotection des hépatocytes isolés semble "à priori" plus facilement réalisable que la conservation des cultures d'hépatocytes à basse température.

L'isolation des hépatocytes étant techniquement impossible dans l'espace, les cellules seront isolées avant le départ, cependant leur durée de vie est limitée à quatre heures à 0°C.

Il s'est donc avéré nécessaire de trouver une méthode permettant de les garder viables plus longtemps. C'est dans ce but que certaines expériences ont été entreprises au laboratoire sur la congélation des hépatocytes.

Il faudra ensuite s'assurer que les cellules soient fonctionnelles et préservent un métabolisme comparable à celui des hépatocytes "in vitro."

La séquence générale d'une expérience est donc envisagée comme suit:

- isolation des hépatocytes avant le départ.
- congélation de ceux-ci jusqu'au moment de l'expérience proprement dite dans l'espace.
- décongélation et mise en présence de précurseurs radioactifs afin de suivre une cinétique de captation, d'incorporation et d'excrétion.
- centrifugation pour séparer les cellules du milieu d'incubation.
- congélation jusqu'au retour au sol où la suite des manipulations pourra être réalisée.

Nous allons donc parler maintenant de quelques techniques acquises concernant la préparation d'une suspension cellulaire, les différents tests de viabilité des cellules et le marquage des voies métaboliques par des traceurs radioactifs.

2.2. Préparation de la suspension cellulaire.

2.2.1. Historique.

Il existe trois méthodes de base pour la désagrégation des tissus après isolation de l'organe. Ces méthodes peuvent soit être utilisées indépendamment l'une de l'autre, soit être associées.

- Méthode mécanique.

Il s'agit d'utiliser une force mécanique pour casser les connections intercellulaires (K.R.F. Elliot, 1979).

Exemple : - homogénéisation lâche (thymus).

- agitation vigoureuse (muqueuse des intestins).

- passer au tamis (foie).

- microdissection. (îlots pancréatiques).

En général, sauf pour la microdissection, cette méthode produit des cellules non viables comme résultat de dégâts causés à la membrane plasmique.

Dans la majorité des cas, cette méthode reste inappropriée malgré son utilisation courante pour certains tissus comme le thymus.

- Méthode chimique.

Celle-ci consiste en une destruction des connexions intercellulaires par action du Ca^{++} , jouant un rôle important dans l'adhésion cellulaire, en présence d'agents chélatants comme l'EDTA ou le citrate. Cependant une séparation complète requiert encore des forces mécaniques considérables. Malgré que cette méthode soit meilleure que la précédente, la majorité des cellules reste encore non viable.

- Méthode enzymatique.

ref. 20
C'est en 1963 qu'Howard & al. firent la première incubation de tranches de foie dans un tampon contenant de la collagénase et de l'hyaluronidase. Les hépatocytes ainsi isolés étaient capables de respirer et présentaient une intégrité structurelle. Cependant, le rendement était assez faible.

La première perfusion du foie avec un milieu contenant de la collagénase et de l'hyaluronidase fut réalisée par Berry & Friend en 1969.

En 1972, Seglen introduit le gonflement du foie dans un système de perfusion fermé, comme indicateur du degré de dispersion des tissus. Il trouva en 1973 qu'une perfusion avec un milieu sans Ca^{++} suivie d'une perfusion avec 5mM Ca^{++} pH 7.5, collagénase et hyaluronidase donne un gonflement maximum du foie.

Krebs & al. utilisèrent la même méthode en 1974 mais sans l'hyaluronidase qui s'était avérée inutile d'après d'autres auteurs (Ingebretsen & Wagle, 1972 ; Berry & Werner, 1974).

2.2.2. Perfusion enzymatique.

Il existe deux méthodes de base pour mettre des tissus en contact avec des solutions d'enzymes. Soit le tissu est grossièrement fragmenté et incubé in vitro dans la solution d'enzymes, soit l'organe entier est perfusé avec cette solution.

Muller, Schreiber, Kartenbeck et Schreiber (1972) comparèrent les différentes méthodes sur base d'exclusion de colorant vital (trypan bleu). Ils étudièrent la différence quantitative et qualitative des cellules isolées par agitation du tissu dans un milieu de dispersion ou par perfusion de l'organe entier avec ce milieu. Une perfusion continue avec de l'hyaluronidase 0.1% et de la collagénase 0.05% s'est avérée supérieure à toutes les autres méthodes testées. Cette conclusion fut confirmée par des analyses au microscope électronique de l'ultrastructure des cellules.

Il est donc apparu que le système de perfusion permettait d'obtenir un plus grand nombre de cellules viables en un temps plus court.

Cependant, dans certaines circonstances, la perfusion d'organe reste impossible:

Exemple : organes de grands animaux ou organes peu vascularisés comme les coussinets graisseux de l'épididyme. (K.R.F. Elliott, 1979)

Le système de perfusion offre cependant certains avantages non négligeables par rapport à la fragmentation et à l'incubation dans la solution enzymatique;

-plus grand nombre de cellules viables. 50 % contre moins de 10 % pour la méthode précédente (K.R.F.Elliott, 1979).

-temps d'obtention des hépatocytes plus court; 15 à 30 minutes contre 60 pour la méthode précédente.

La perfusion du foie s'est avérée performante avec un système très simple dans lequel le gaz ($O_2 + CO_2$) oxygène un milieu dans un réservoir thermostatique. Ce milieu circule via une pompe péristaltique de la veine porte hépatique au réservoir par la veine cave inférieure.

Le foie sera tout d'abord perfusé avec un milieu sans Ca^{++} afin de laver l'organe de son sang et de cliver les desmosomes par élimination des ions Ca^{++} .

L'espace intrahépatique deviendra alors beaucoup plus accessible à l'enzyme utilisé pour la séparation des desmosomes (Berry, 1976). Pour améliorer l'effet de l'enzyme, un milieu avec Ca^{++} sera employé par la suite.

Il est préférable de porter l'organe à une certaine hauteur au-dessus du réservoir pour faciliter la sortie du milieu et pour arrêter le gonflement dû à la pression hydrostatique.

Si les premières techniques d'isolation des hépatocytes ne permettaient pas l'obtention d'un grand nombre de cellules viables, l'évolution progressive de ces techniques a permis d'augmenter le nombre et la viabilité des hépatocytes obtenus. Actuellement et dans les conditions décrites ultérieurement (cfr. matériel et méthode), nous obtenons en moyenne 95 % de viabilité.

Dans la section suivante, nous allons décrire les différents tests de viabilité existants car il ne suffit pas d'obtenir de grandes quantités d'hépatocytes, encore faut-il qu'ils présentent une intégrité métabolique et fonctionnelle comparable à celle in situ.

3. VIABILITE ET CARACTERISTIQUES DES HEPATOCYTES ISOLEES.

Il existe deux classes essentielles de tests de viabilité. Tout d'abord l'intégrité structurante, c'est à dire l'intégrité de la membrane et des différents organites de la cellule et ensuite l'intégrité métabolique c'est à dire le fonctionnement cellulaire typique tel qu'on le trouve in situ.

3.1. Intégrité structurante.

3.1.1. Exclusion du colorant vital.

Cette méthode est la plus couramment employée et utilise le principe de l'exclusion du trypan bleu ou de l'érythrosine. Par sa facilité, son faible coût et sa visualisation rapide, cette méthode est encore fréquemment utilisée actuellement.

Cependant, il reste encore beaucoup d'objections quant à la validité des résultats obtenus.

Par exemple, des cellules non viables par d'autres critères peuvent exclure le colorant: après chauffage à 60 °C pendant trois minutes, on observe encore 80 % d'exclusion du colorant vital (Tennant, 1964).

Ceci est probablement dû au fait que le trypan bleu donne une mesure d'intégrité de la membrane et non de viabilité en tant que telle. De plus, il est assez difficile de décider objectivement de l'absorption du colorant par une cellule. Aucune conclusion ne peut donc être tirée sur seule base de cette méthode quant à la viabilité des cellules.

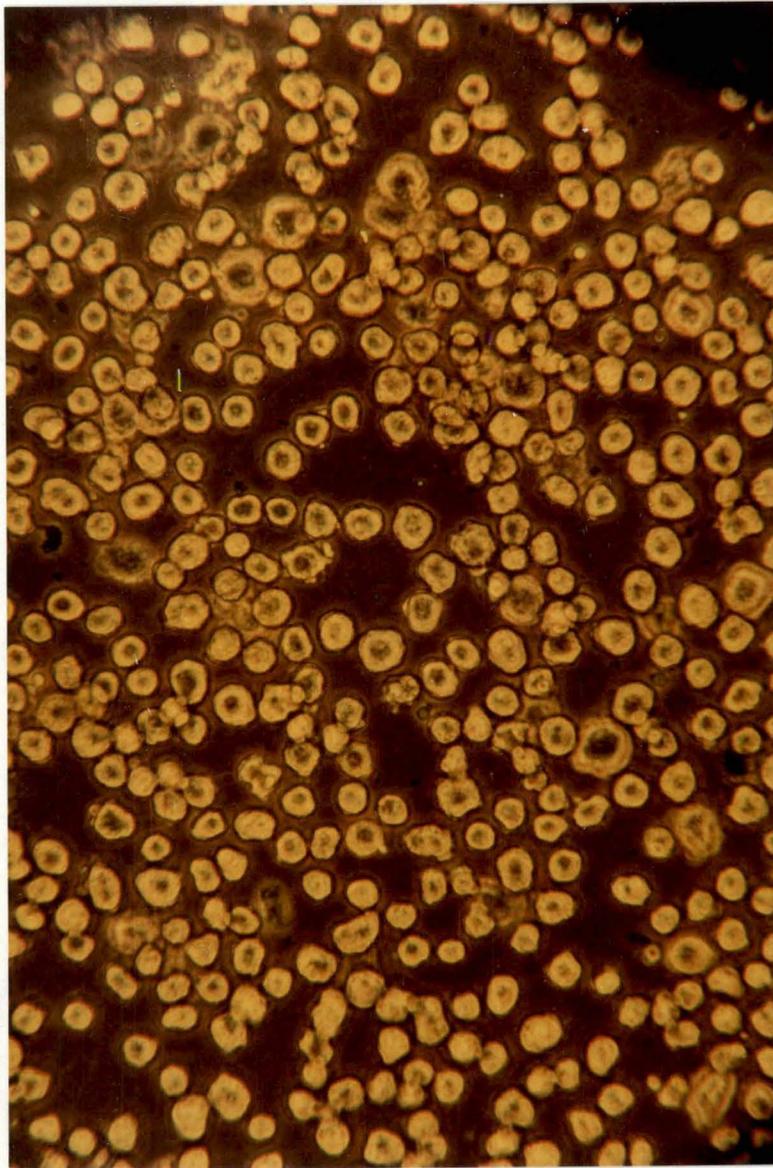


Figure n°5: Suspension d'hépatocytes de rat fraîchement isolés observés au microscope optique à contraste de phase (grossissement approximatif 400 x).
(T. Coche, Communication personnelle).

Ce test convient, de ce fait, beaucoup mieux comme test de "mortalité" en permettant une visualisation rapide du pourcentage de cellules laissant pénétrer le colorant vital. Remarquons cependant que même si les cellules rejettent ce colorant, aucune conclusion ne peut être tirée quant à leur intégrité.

3.1.2. Morphologie.

Le microscope optique, nécessaire pour examiner l'exclusion du colorant, peut aussi être employé en contraste de phase: les cellules endommagées apparaissent alors très plates et plus ternes (Figure n° 5).

Le microscope électronique n'est pas utilisé en routine mais il peut apporter une information supplémentaire: la membrane doit apparaître intacte et présenter de nombreuses microvillosités. Le noyau doit être dans les proportions normales avec la même densité de coloration pour le nucléoplasme et le matériel nucléaire. Le cytoplasme ne doit pas contenir de grandes vésicules d'origine inexplicable. Les mitochondries doivent être régulières en forme et en taille, non uniformément rondes. Le RER ne doit pas être cassé en vésicules.

Berry (1974) montra de nombreuses différences entre hépatocytes viables ou non.

3.1.3. Conservation et rétention de certaines substances.

Les cellules intactes sont capables de retenir des molécules comme les enzymes, les métabolites et les petits ions inorganiques.

La mesure du taux enzymatique a comme avantage qu'elle peut se faire à la fois dans la cellule (pour indiquer le contenu total en enzyme) et dans le

milieu (pour indiquer les pertes de cet enzyme dû au problème de contamination du matériel utilisé et du milieu).

Les résultats obtenus sont difficilement interprétable^s dans la mesure où cette méthode est assez incertaine. En effet elle tend à mettre de côté la grande variabilité biologique dans les niveaux enzymatiques et tissus hétérogènes, contenant différents types de cellules avec du matériel non cellulaire, alors qu'une suspension de cellules isolées est homogène.

Cependant, la mesure de la perte d'un enzyme dans le milieu, durant la préparation, le lavement et l'incubation des cellules, permet à l'expérimentateur de voir, de façon relative, si la détérioration est graduelle ou apparaît soudainement comme le résultat d'une manipulation particulière.

La mesure de métabolites clés ou petits ions inorganiques peut être assez précise car de légers dégâts provoquent leur perte (Krebs et al, 1974). Le K^+ cellulaire est un bon paramètre de mesure car il est ± 20 fois plus concentré dans la cellule que dans le milieu. Il est possible de déterminer la concentration de K^+ et la concentration de Na^+ grâce au photomètre à flamme. Pour une cellule fraîchement isolée, la concentration de K^+ intracellulaire est égale à 109.0 ± 9.1 mM et la concentration de Na^+ intracellulaire à 47.0 ± 13.4 mM (Hartmut Baur & al, 1975).

Il est également possible de mesurer le potentiel de membrane par $^{36}Cl^-$ car il fut démontré que E_M est similaire à E_{Cl} équivalent $RT/F * \ln [Cl]_i/[Cl]_o$

Le potentiel de membrane d'une cellule fraîchement isolée étant de 36.4 ± 3.4 mV (Hartmut Baur & al, 1975).

3.1.4. Respiration.

Un test assez performant est la stimulation de la respiration par le succinate.

Seule une membrane endommagée aura un taux de perméabilité suffisant pour l'entrée du succinate et la cellule verra donc sa respiration s'accroître.

La technique de Mapes & Harris (1975) mesure la conversion du succinate en malate, et la compare avec celle de cellules traitées à la digitonine (détergent rendant la membrane plasmique perméable).

En utilisant le rapport des deux taux de production de malate, on peut estimer la proportion de cellules endommagées.

Certaines précautions sont à prendre car la respiration est souvent variable et ne dépend pas uniquement de l'intégrité cellulaire.

Mais de nouveau, comme pour l'érythrosine, il s'agit d'une mesure d'intégrité de la membrane et non vraiment de viabilité cellulaire.

3.2. Intégrité métabolique.

La mesure d'incorporation de radioactivité dans les grandes voies métaboliques consiste à fournir aux cellules isolées des éléments radioactifs qu'elles sont capables d'assimiler et d'employer dans leurs voies métaboliques. En étudiant la cinétique d'incorporation de la radioactivité dans les produits formés on pourra estimer de façon assez précise l'intégrité fonctionnelle des hépatocytes.

Il s'agit, dans le cadre de ce travail, de rechercher des modifications éventuelles du métabolisme cellulaire dû à l'environnement spatial et plus particulièrement à la microgravité. Ce dernier point, concernant une mesure d'incorporation d'isotopes radioactifs dans les grandes voies métaboliques, se révèle être assez précis quant à l'objectif visé, et sera donc développé dans le paragraphe suivant.

4. MARQUAGE DES GRANDES VOIES METABOLIQUES PAR DES ISOTOPES RADIOACTIFS.

4.1. Notions sur le marquage radioactif.

Le traceur doit subir les mêmes transformations métaboliques que la substance mère et il doit être ajouté en petite quantité afin de ne pas troubler l'état stationnaire existant dans le système.

Le traceur, quand on l'ajoute au système, n'est pas à l'équilibre au départ et on peut analyser mathématiquement ses changements et les décrire au cours du temps.

L'unité de radioactivité est le becquerel (Bq) et correspond à une désintégration par seconde.

$$1 \text{ Bq} = 27.03 \text{ picocuries} \quad 37 \text{ KBq} = 1 \text{ microcurie.}$$

Une curie représente la quantité de matière produisant le même nombre de désintégration par unité de temps qu'un gramme de radium, soit $2,2 \cdot 10^{12}$ désintégrations par minute.

L'incorporation (proportion de radioactivité totale du produit sur la radioactivité totale des précurseurs.) dépend de nombreux facteurs comme par exemple: le système biologique utilisé, le temps de réaction, le mode d'administration, la taille du pool d'intermédiaire et de produits, les taux de turn over, la nature et la quantité de précurseur, la présence ou non de barrière de perméabilité et d'un système de transport,...(E.Anthony Evans & al, 1977)

4.1.1. Mesure de la radioactivité β par scintillation liquide.

Livre de référence: "The current status of liquid scintillation counting" (E.D.Bransome & al, 1970).

Il s'agit d'une mesure de la lumière émise par les photons provenant d'atomes excités directement ou non par le rayonnement β .

a) Le solvant.

- Il doit pouvoir dissoudre l'échantillon et les substrats scintillants.
- Il doit être excité par les rayonnements β et transformer cette énergie cinétique en énergie électronique d'excitation.
- Il doit savoir transférer l'énergie à d'autres molécules.

Le substrat scintillant, quand il retombe au niveau fondamental, émet des photons qui seront mesurés.

Les meilleurs solvants sont des substances aromatiques auxquelles on peut ajouter un solvant supplémentaire comme un diluant (alcool), ou contre des agents quenchants (CCl_4).

Les agents quenchants sont des substances étrangères réduisant le transfert d'énergie du solvant aux molécules de scintillant.

Exemple: l'oxygène diminue de $\pm 20\%$ l'excitation du comptage.

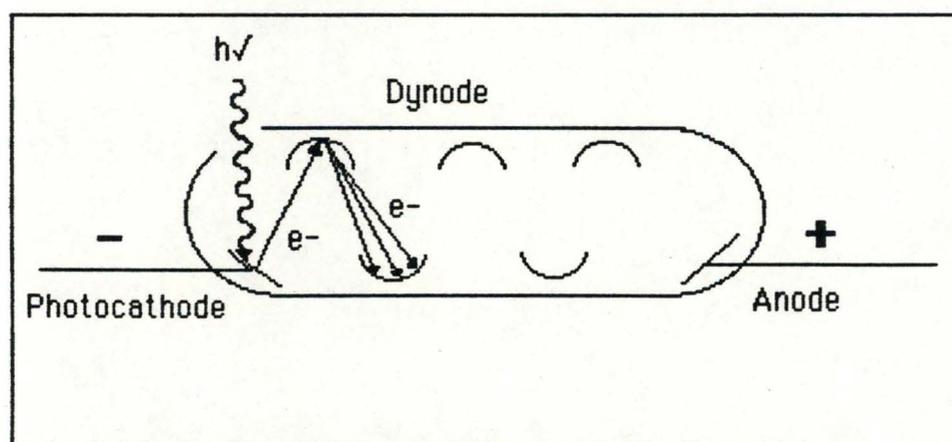
La migration de l'état d'excitation du solvant aux molécules de scintillants (la descente des différents états excités vers le premier état excité) se fait en général sans émission de lumière mais le passage du premier état excité au niveau fondamental fournit des photons.

L'étape limitante d'une mesure de radioactivité est la transformation de l'énergie cinétique en énergie d'excitation des atomes du solvant où on observe un rendement de 3 à 4 % à partir d'un rayonnement β de 154 Kev (^{14}C) 1980 photons.

Les photons émis sont alors mesurés par un photomultiplicateur.

b) Le photomultiplicateur.

Le photomultiplicateur est une cellule photoélectrique transformant l'énergie photonique en énergie électrique. Il contient une photocathode recouverte de SbCS_2 émettant des électrons sous l'action des photons. Les électrons sont alors attirés par une série de dynodes de potentiel croissant. Les électrons ainsi accélérés frappent la dynode avec réémission d'un nombre plus important d'électrons et ceci jusqu'à l'anode.



Inconvénients de ce système :

1. Les électrons thermiques produits par échauffement du système forment en grande partie le bruit de fond (background). Celui-ci peut être éliminé de différentes façons:

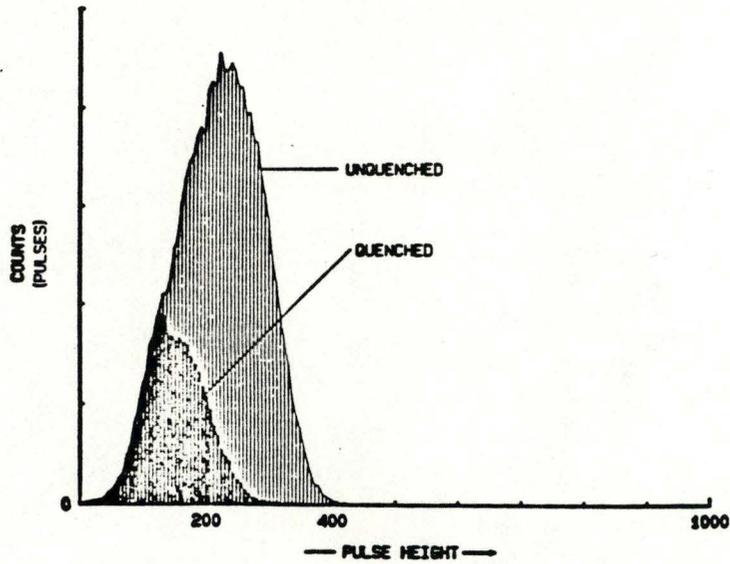


Figure n°6 : Effet du Quenching sur un échantillon au Tritium.

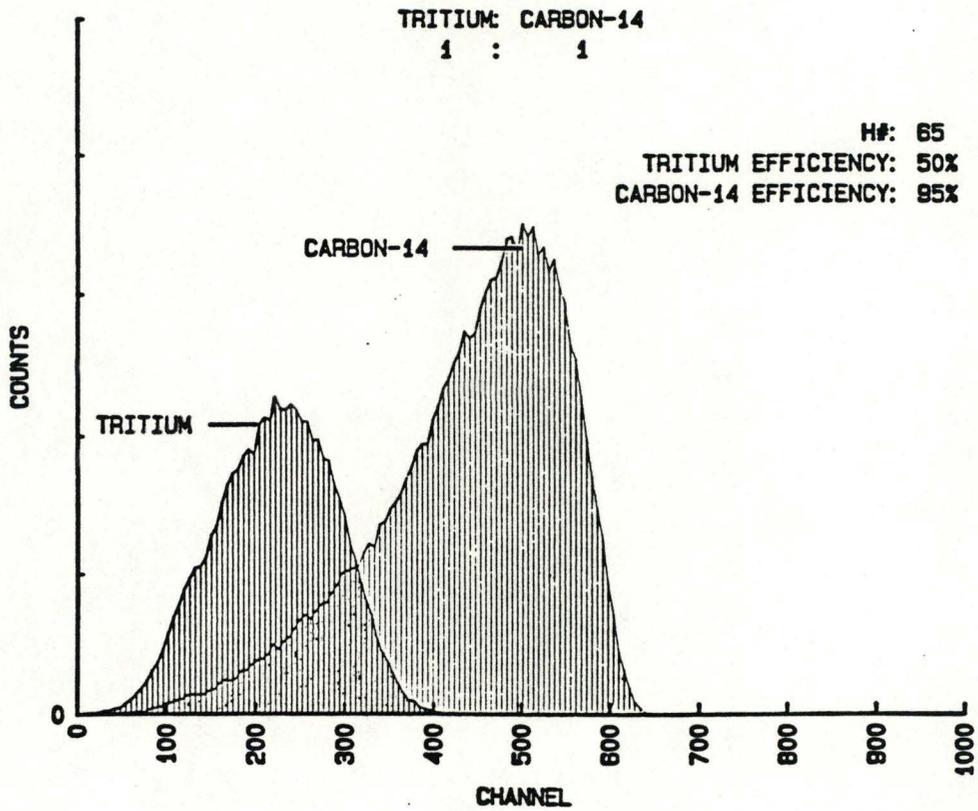


Figure n°7 : Exemple de résultat d'un double comptage.

- par refroidissement : utilisé fréquemment il y a plusieurs années.
- par discrimination : les courants parasites étant en général plus faibles que ceux provoqués à partir d'un rayonnement β , il suffit de ne compter que les impulsions contenant un nombre suffisamment élevé d'électrons. Ces discriminateurs sont aussi appelés des fenêtres car on peut sélectionner des impulsions comprises entre deux valeurs données.

En choisissant des fenêtres adéquates, on pourra distinguer et compter simultanément 2 ou 3 isotopes différents.

- par coïncidence : la solution scintillante est placée entre deux photomultiplicateurs. Ce système ne laisse passer que les impulsions provenant des deux tubes endéans un laps de temps très court (10^{-8} secondes) appelé temps de révolution. Le background est alors réduit à 20 CPM.

2. Le phénomène du quenching : la scintillation liquide est donc basée sur la relation directe entre la radioactivité de l'échantillon et la quantité de lumière émise par la fiole. En pratique, un grand nombre de facteurs diminuent cette quantité de lumière émise. Ce phénomène est appelé le "quenching" et donne deux effets (Figure n° 6).

- réduction de la mesure des CPM dans l'échantillon.
- déplacement du spectre du pulse vers des valeurs plus basses.

Pour permettre une comparaison entre résultats (c'est à dire indépendamment du niveau de quench.) les données doivent être converties de CPM en DPM (désintégrations réelles ayant lieu dans la fiole.).

L'efficacité de comptage définit le rapport des CPM sur DPM (c'est à dire le résultat observé par l'appareil par rapport aux désintégrations réelles.)

Les DPM pourront donc être calculés à partir des CPM obtenus, l'efficacité de comptage étant déterminée par une "courbe de quench" établie par référence à des standards étalonnés.

Sur le compteur Beckman LS 1801, la différence entre les points d'inflexion du standard non quenchant et l'échantillon est quantifiée par une valeur numérique appelée "H-number". Une courbe de quench peut être stocké dans la mémoire de l'appareil en comptant un ensemble d'échantillons standard de l'isotope, ce qui permet par la suite d'obtenir automatiquement des mesures de DPM.

Double et triple comptage radioactif.

Il s'agit d'un processus dans lequel 2 ou 3 isotopes différents sont utilisés simultanément dans une expérience. Les résultats devront pouvoir être pris séparément pour chacune des substances.

D'après les isotopes utilisés, des "fenêtres" seront définies pour donner la meilleure séparation possible entre les coups dûs à un isotope ou à un autre (Figure n°7).

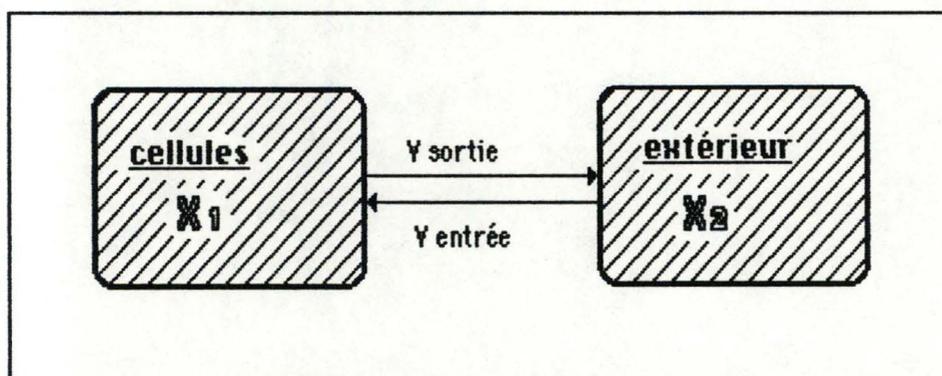
4.2 Analyse compartimentale.

Un système compartimental est un système fait d'un nombre fini de sous-systèmes macroscopiques homogènes appelés compartiments et interagissant les uns avec les autres en échangeant de la matière.

Il peut y avoir entrée de substances de l'environnement dans les compartiments ou bien "excrétion" d'un ou plusieurs compartiments vers l'extérieur. S'il n'y a pas d'échange avec l'environnement, le système est dit fermé, dans le cas contraire, il est dit ouvert. La théorie mathématique pour le comportement de tels systèmes est appelée "analyse compartimentale" ou "théorie des systèmes compartimentaux" (J.A. Jacquez, 1972).

L'exemple du transport du taurocholate est exposé ci-dessous afin de mieux visualiser cette analyse mathématique d'un phénomène biologique.

Le modèle utilisé pour décrire la cinétique du taurocholate est un modèle fermé à deux compartiments.



X_1 = quantité de taurocholate à l'intérieur des cellules
 X_2 = quantité de taurocholate à l'extérieur des cellules

La variation de quantité de taurocholate à l'intérieur de la cellule sera, à tout moment, égale à la différence entre la vitesse d'entrée et la vitesse de sortie, ce qui revient à écrire:

$$dX1(t)/dt = V_{\text{entrée}} - V_{\text{sortie}}$$

De même, pour le compartiment X2:

$$dX2(t)/dt = V_{\text{sortie}} - V_{\text{entrée}}$$

Si au temps 0, du taurocholate est ajouté au milieu extérieur, les cellules auront tendance à accumuler cet acide biliaire; donc

$$dX1(t)/dt > 0$$

$$dX2(t)/dt > 0$$

$$\text{et } V_{\text{entrée}} > V_{\text{sortie}}.$$

Après un certain temps, un équilibre dynamique va s'établir et le système sera alors en équilibre avec $V_{\text{entrée}}$ égale à V_{sortie} :

$$dX1(t)/dt = 0 \text{ donc } X1(t) = \text{constante} = X1s$$

$$dX2(t)/dt = 0 \text{ donc } X2(t) = \text{constante} = X2s$$

Les quantités de taurocholate à l'intérieur et à l'extérieur des cellules seront donc égales, le système travaillant à vitesse constante.

Si du taurocholate radioactif est alors ajouté au milieu extérieur en très faible quantité, la vitesse du transfert du taurocholate n'en sera pas perturbée. La vitesse du taurocholate radioactif ($V_{\text{entrée}^*}$) sera donc égale à celle de l'état statique, multipliée par la proportion de molécules de taurocholate marquées.

$$V_{\text{entrée}^*} = V_{\text{entrée}} \cdot X2(t)/X2s$$

$$\text{ou encore } V_{\text{entrée}^*} = k_{21} \cdot X2(t)$$

(k_{21} : étant une constante de vitesse ayant pour unité t^{-1} et correspondant à une $V_{\text{entrée}}/X2s$).

Un système d'équations peut dès lors être établi pour la variation de la quantité de traceur en fonction du temps dans les cellules et le milieu:

$$dx_1(t)/dt = V_{\text{entrée}^*} - V_{\text{sortie}^*} \neq 0$$

$$dx_2(t)/dt = V_{\text{sortie}^*} - V_{\text{entrée}^*} \neq 0$$

ou encore

$$dx_1(t)/dt = k_{21} x_2(t) - k_{12} x_1(t)$$

$$dx_2(t)/dt = k_{12} x_1(t) - k_{21} x_2(t)$$

La résolution de ce système donne l'évaluation de la quantité de traceur à l'intérieur et à l'extérieur des cellules au cours du temps.

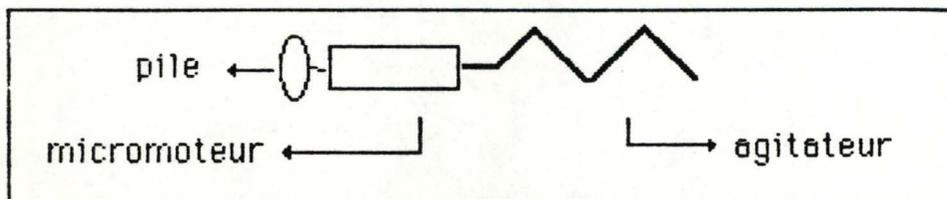
$$x_1(t) = \frac{k_{21} x_{20}(1 - e^{-(k_{12} + k_{21})t})}{(k_{12} + k_{21})}$$

$$x_2(t) = \frac{k_{12} x_{20}}{k_{12} + k_{21}} + \frac{k_{21} x_{20} e^{-(k_{12} + k_{21})t}}{k_{12} + k_{21}}$$

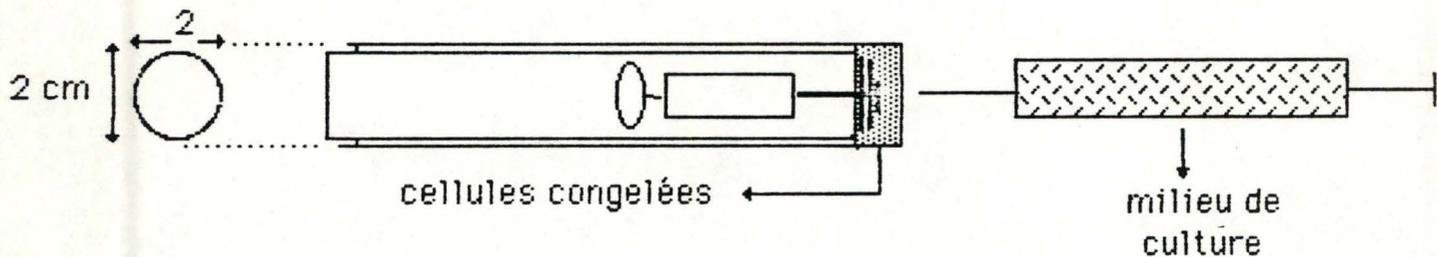
La quantité de taurocholate radioactif dans les cellules et dans le milieu extérieur sera mesurée dans une suspension d'hépatocytes au cours du temps, ce qui fournit des valeurs expérimentales.

L'ajustement des équations aux valeurs expérimentales, selon l'algorithme Levenberg-Marquardt (1963) des moindres carrés non linéaire, permet d'obtenir les valeurs des paramètres k_{12} et k_{21} . Les meilleures estimations de ces constantes de vitesse caractérisent la dynamique du système au moment de l'adjonction du traceur radioactif.

micromoteur + pile → autonomie souhaitée 1 heure



1. AVANT L'EXPERIENCE



2. PENDANT L'EXPERIENCE

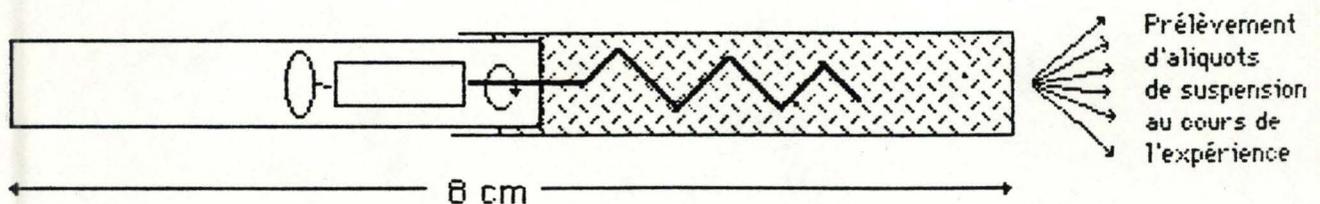


Figure n°8 : Schéma représentant la cuvette d'incubation dans le biorack et ses différents paramètres.

Cet exemple assez simple d'une analyse compartimentale montre bien l'intérêt d'études cinétiques avec des prises de mesure dans divers compartiments. Ceci justifie donc pour une grande part le choix du modèle des hépatocytes en suspension.

4.3. Conditions d'expérimentation.

Après cette description sommaire des techniques acquises sur la suspension cellulaire, les tests de viabilité, le marquage radioactif et l'analyse compartimentale, les contraintes et les conditions d'une expérimentation en vol peuvent être détaillées.

4.3.1 Petits volumes d'échantillons.

Le projet de la cuvette d'incubation est représenté à la figure n° 8.

Cette cuvette comprend un petit moteur permettant le fonctionnement d'un agitateur afin d'obtenir la même homogénéisation de la suspension, aussi bien à 0 G (pas de décantation) qu'à 1 G (décantation).

Les cellules congelées sont conservées dans un compartiment perméable à l'O₂ et au CO₂ mais imperméable aux liquides. Ce compartiment a la possibilité de s'allonger ou de se compresser selon que l'on ajoute ou retire une certaine quantité de fluide. Le milieu de culture ainsi que les isotopes radioactifs seront donc injectés en vol afin de commencer les expériences. L'agitateur se mettra dès lors automatiquement en marche.

Différents prélèvements au cours du temps pourront être réalisés et ceux-ci seront suivis d'une centrifugation ainsi que d'une congélation permettant le retour au sol avant de poursuivre le protocole expérimental envisagé.

4.3.2. Le marquage multiple.

Celui-ci prend tout son intérêt dans ce genre d'expérience où ne sont accessibles que de très petits volumes cellulaires, plusieurs cinétiques pourront donc être suivies simultanément dans un même incubateur.

4.3.3. Manipulations minimales.

Comme nous l'avons vu précédemment, la manipulation en vol se limite à une injection du milieu d'incubation suivie d'une injection des traceurs radioactifs et d'une série de prélèvements à des temps donnés. Ces prélèvements sont suivis d'une centrifugation et d'un stockage. La suite des manipulations se déroulera au sol après le retour.

4.4. Objectifs.

Le cadre de ce travail étant maintenant clairement établi, les objectifs plus précis concernant la recherche effectuée peuvent être détaillés.

Nous savons déjà (objectifs généraux) qu'il s'agit de rechercher des modifications éventuelles dans les fonctions cellulaires fondamentales dues à l'environnement spatial et plus spécifiquement à la microgravité. Le modèle expérimental sera celui des hépatocytes isolés en suspension et le test d'investigation, celui de l'incorporation de marqueurs radioactifs dans les grandes voies métaboliques.

Il s'agit donc, dans un premier temps, de rechercher quelle voie métabolique pourrait être choisie afin de permettre ce genre de test d'incorporation.

Dans un second temps, on cherchera à adapter le protocole d'incorporation trouvé aux contraintes spécifiques du biorack et de la cuvette d'incubation, en particulier.

5. LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE.

lecture De nombreux échantillons homogènes pouvant être obtenus à partir d'une même mixture et les conditions d'incubation pouvant être adaptées aux besoins de l'expérimentateur, le modèle des hépatocytes isolés en suspension se prête bien aux études cinétiques.

En fonction du contexte expérimental décrit et de ses contraintes, l'incorporation de leucine marquée dans les protéines a particulièrement retenu notre intérêt parmi les voies métaboliques essentielles.

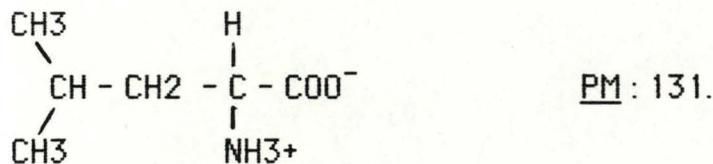
Une des fonctions caractéristiques du foie est en effet la synthèse et la sécrétion d'un grand nombre de protéines plasmatiques dont, notamment, celles incluses dans le processus de coagulation comme le fibrinogène (Miller & al, 1954).

De plus, le modèle des hépatocytes isolés en suspension offre un avantage pour l'étude de l'incorporation des acides aminés dans les protéines. En effet, ce modèle fournit un système simple pour l'interprétation des données d'incorporation en réduisant l'espace extracellulaire à un compartiment unique facilement contrôlable. Par contre des études *in vivo* (Airhart & al, 1974) et avec un foie perfusé (Mortimore & al, 1972) ont indiqué une compartimentation complexe du pool des acides aminés hépatiques.

L'incorporation d'acides aminés radioactifs dans les protéines sera donc détaillée dans ce chapitre avant d'en arriver au protocole choisi pour explorer cette voie métabolique.

5.1. Généralités concernant la leucine et son transport.

La leucine est un acide aminé avec une chaîne R non polaire ou hydrophobe tout comme l'alanine, l'isoleucine, la valine et la proline.



Les protéines du foie contiennent environ 12 % en poids de leucine (Schreiber G. & al, 1971).

Le système de transport pour les acides aminés s'avère être un système actif. Une pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ semble essentielle pour le fonctionnement des pompes pour les acides aminés.

Le transport actif des acides aminés montre un certains nombre d'analogie avec le transport actif du glucose. Il est particulièrement important dans l'épithélium intestinal où il permet l'absorption des acides aminés et dans les tubules re~~n~~aux où il provoque la récupération des acides aminés à partir de l'urine tubulaire.

Les cinétiques de transport et les études de compétition entre les différents acides aminés pour l'entrée dans la cellules indiquent qu'il existe au moins cinq systèmes de transport différents, chacun ne pouvant transporter qu'un petit nombre d'acides aminés.

Ces systèmes sont spécifiques pour : les acides aminés neutres de petites tailles (dont la leucine), les acides aminés neutres de grandes tailles, les acides aminés basiques, les acides aminés acides et les iminoacides.

(A.L. Lehninger, 1979).

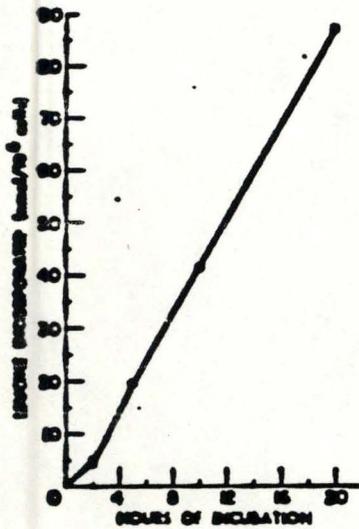


Figure n°9 : Incorporation de leucine totale dans les protéines intracellulaires précipitées au TCA.
 $[3H]$ -leucine $1\mu\text{Ci/ml}$ (1cpm/pmol)
 (extrait de l'article de L.J. Crane et D.L. Miller, 1976).

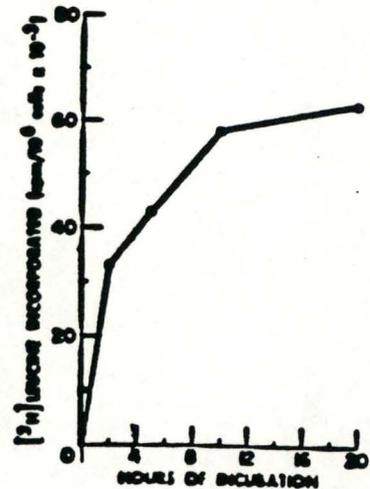


Figure n°10: Incorporation de $[3H]$ leucine dans les protéines intra-cellulaires.
 $1\mu\text{Ci/ml}$ (1cpm/pmol).
 Isolation des protéines radioactives par précipitation au TCA.
 (extrait de l'article de L.J. Crane et D.L. Miller, 1976).

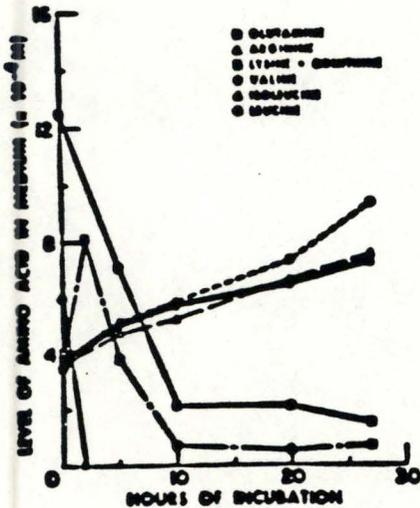


Figure n°11 : Utilisation des acides aminés par une suspension hépatocytaire.
 (extrait de l'article de L.J. Crane et D.L. Miller, 1976).

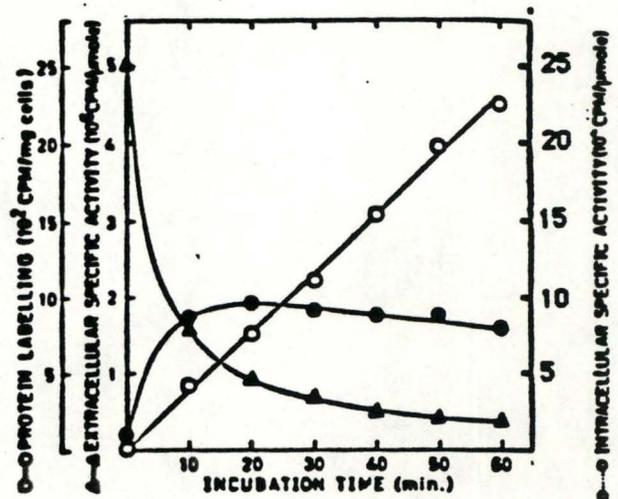


Figure n°12 : Changement en fonction du temps de l'action spécifique des acides aminés extra- et intra-cellulaire.
 115 mgr cellules/ml.
 Acides aminés marqués au ^{14}C ($1.5\mu\text{Ci/ml}$).
 (extrait de l'article de O. Slegen, 1976).

5.2. Incorporation de leucine dans les protéines.

Le taux d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines obtenu par L.J. Crane & D.L. Miller (1976) est de l'ordre de 90 pmoles/min/mgr protéines (Ce taux a été calculé a partir de la figure n°9).

L'incorporation de leucine radioactive est maximum pendant la première heure et diminue ensuite pendant les 24 heures d'incubation (Figure n°10), ce qui suggérerait l'intervention de différents processus.

Notons encore que de considérables variations dans le taux de synthèse comme fonction du temps furent observées dans des préparations cellulaires différentes (L. J. Crane & D. L. Miller, 1976).

La synthèse protéique devrait théoriquement être inhibée par les deux inhibiteurs puissants que sont la cycloheximide et la puromycine. Cependant, les observations de différents auteurs semblent assez contradictoires : Certains montrent une inhibition alors que d'autres n'en observent aucune.

- Schreiber & Schreiber (1973) : non inhibition de l'incorporation de leucine dans les protéines par 1 mM de puromycine ou par 0.6 mM de cycloheximide.
- Schreiber & Schreiber (1972) : inhibition de l'incorporation de 10%, 50% et 90% par la puromycine aux concentrations de 0.7 μ M, 2.57 μ M et 22.0 μ M respectivement.
- Inoue & al (1965) : inhibition à 50% et 90% par 0.21 μ M et 2.24 μ M de cycloheximide.
- O. Seglen (1976) : maximum d'inhibition pour 1 μ M de cycloheximide.
- Schreiber (1973) et Friedman (1967) : insensibilité de l'incorporation de leucine dans les protéines envers la puromycine et la cycloheximide.

Toutes ces informations apportent des doutes quant au mécanisme d'incorporation protéique de la leucine qui semble d'ailleurs très complexe comme nous nous en rendrons compte ci-après.

5.3. Perte de leucine radioactive.

Les hépatocytes épuisent le milieu d'une grande fraction des acides aminés pendant l'incubation. Cependant, l'isoleucine, la leucine et la valine sont des exceptions et leur concentration augmente dans le milieu d'incubation (Figure n° 11). Ce phénomène semble être le reflet d'une excrétion de protéines simultanée à la synthèse.

Les hépatocytes isolés consomment donc l'isotope et relâchent continuellement les protéines pendant l'incubation. La consommation de l'isotope provoque une perte très rapide de la radioactivité spécifique du pool des acides aminés extra-cellulaires et, une croissance rapide de l'activité spécifique intra-cellulaire vers un maximum.

L'excrétion simultanée des protéines dans le milieu provoque alors une diminution lente de l'activité spécifique intra-cellulaire (O. Seglen, 1976).
(Figure n° 12)

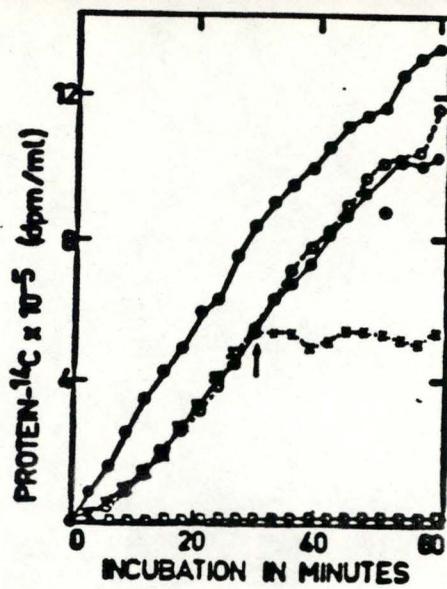


Figure n°13 : Incorporation de L-[1-¹⁴C]-leucine dans les protéines en fonction du temps d'incubation.

●—● incubation sous air. □—□ incubation sous N₂.

Les autres courbes sont incubées sous 95 % O₂ + 5% CO₂.

●—● pré-incubation de 25 minutes.

Pour la courbe x—x—x addition de 3.1 mM L-[¹²C]-leucine après 30 minutes (flèche).

(extrait de l'article de G. Schreiber et M. Schreiber, 1973).

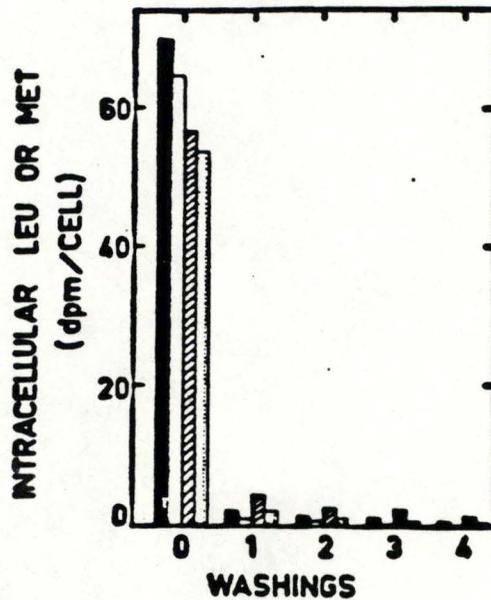


Figure n°14 : Elimination de L-leucine et de L-méthionine par la suspension d'hépatocytes lavées dans du NaCl 0.9%.

Cellules incubées 35 minutes à 37 °C avec 0.016 mM L-leucine (colonne noire) ou 1.6 mM L-leucine (colonne blanche) ou 0.018 mM L-méthionine (colonne hachurée) ou 1.8 mM L-méthionine (colonne pointillée).

Chaque préparation comprend 1 μCi/ml de l'acide aminé marqué [1-¹⁴C] correspondant.

(extrait de l'article de G. Schreiber et M. Schreiber, 1972 a).

5.4. Système de transport passif de la leucine dans les hépatocytes isolés en suspension.

Schreiber & Schreiber (1973) firent différentes expériences sur l'incorporation de leucine dans les protéines d'hépatocytes isolés en suspension, avant de conclure que la leucine ainsi que la méthionine diffusent de façon passive entre les compartiments extra- et intra-cellulaires. La cessation instantanée d'incorporation de leucine dans les protéines après addition d'un excès de leucine non radioactive (Figure n° 13), suggère une rapide pénétration ainsi qu'une rapide équilibration avec les pools de leucine existants.

Différentes expériences ont été réalisées pour mettre en évidence ce transport passif de leucine dans les hépatocytes isolés en suspension:

1)-Des cellules ayant un système de transport actif pour des composés de faible P.M., montrent le phénomène de prise concentrée et, si de telles cellules sont lavées dans un milieu salin, les acides aminés intra-cellulaires sont lentement relâchés dans le milieu.

Exemple: les érythrocytes de canard perdent de cette façon 60 % de la glycine intra-cellulaire en six lavages d'une heure de 20 volumes chacun avec un milieu $\text{NaCl}-\text{CaCl}_2-\text{NaHCO}_3$ (Christensen, Riggs & Ray, 1952).

Mais, contrairement à de telles cellules, les hépatocytes préparés par perfusion enzymatique, auxquels on ajoute de la leucine, perdent les acides aminés intra-cellulaires immédiatement après lavage dans une solution saline à 0,9 % (Figure n°14).

Ceci suggère donc une perte de la capacité des hépatocytes aux prises actives de leucine (G. & M. Schreiber, 1973).

Les expériences sur la cinétique et la température pour la pénétration de leucine ont renforcé cette idée d'échanges libres entre les compartiments extra- et intra-cellulaires.

2)-Un autre type d'expérience consiste à préincuber les hépatocytes avec deux isotopes différents de leucine pendant plusieurs minutes à 37 °C. Les résultats obtenus montrent un rapport ^{14}C dpm/ ^3H dpm constant, indépendamment de la température et de la concentration en acides aminés (G. & M. Schreiber, 1973). Ceci est incompatible avec l'existence d'un système de transport actif intact et suggère un échange libre de la leucine entre les pools extra- et intra-cellulaires.

Durant l'isolation, les membranes cellulaires semblent donc devenir perméables à beaucoup de composés, et les caractéristiques d'un transport actif sont perdues pour la prise d'acides aminés. Ceux-ci semblent pénétrer dans la cellule par diffusion passive (G. & M. Schreiber, 1973).

5.5. Protocole d'incorporation de leucine dans les protéines.

Le protocole choisi est celui de Seglen (1976) et est présenté dans ce paragraphe sans aucune modifications de volumes.

- incubation des hépatocytes en présence de l'acide aminé radioactif.
- prélèvement d'aliquots de 4 ml au cours du temps.
- centrifugation à 400 rpm pendant une minute.
- addition de 0.4 ml d' H_2O et précipitation des protéines par addition de 0.1 ml de TCA 10%.

- lavage à froid 2 fois avec 4 ml de TCA 2% et 1 fois avec 4 ml d'H₂O.
- le culot est dissout dans 0.5 ml de NaOH.
- neutralisation par 0.1 ml d'HCl 1N.
- prélèvement de 0.5 ml auquel on ajoute 10 ml de scintillateur avant de compter la radioactivité dans un compteur à scintillation liquide.

MATERIEL ET METHODES.

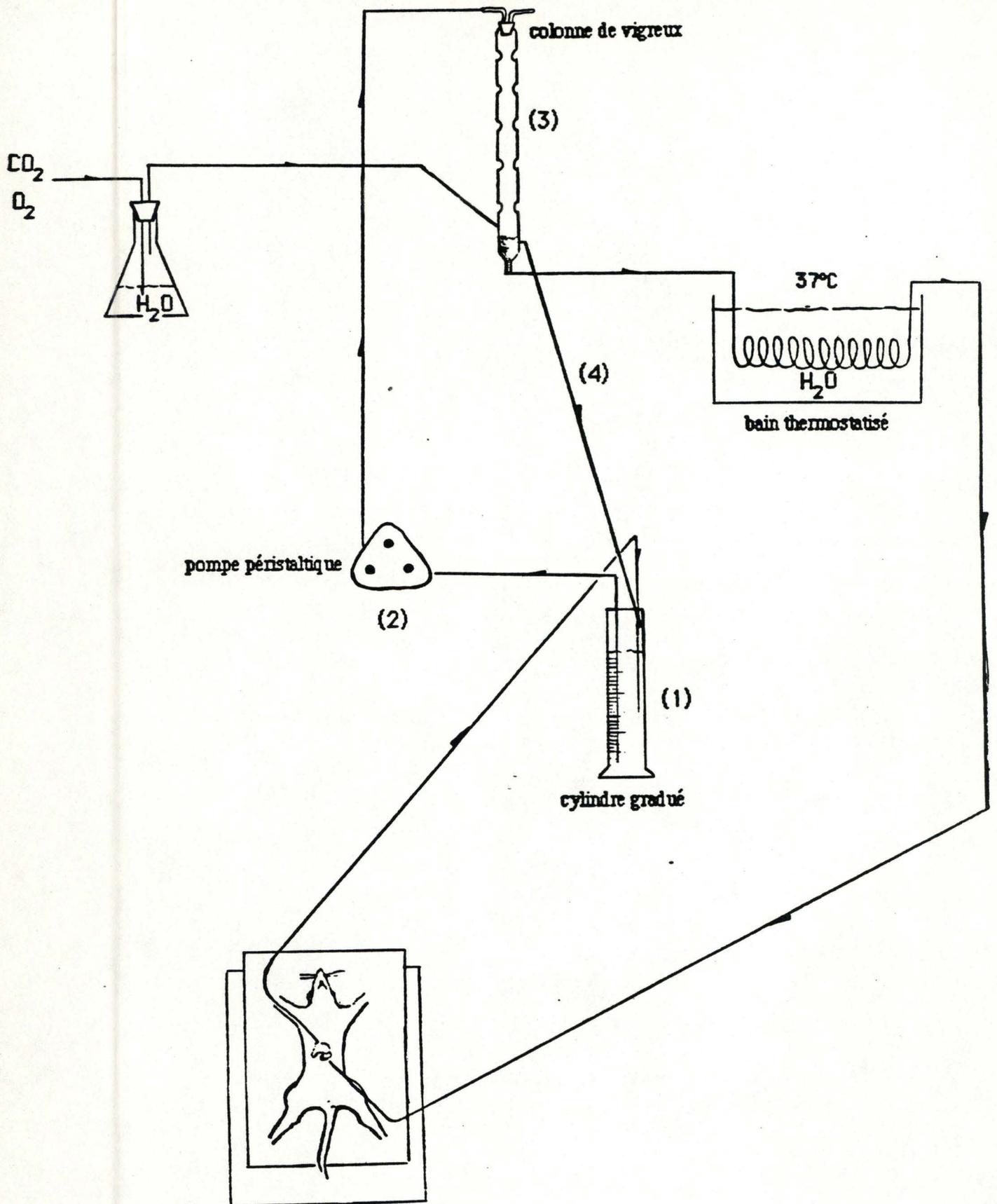


Figure n°16: Schéma général de l'appareillage pour l'isolation des hépatocytes.

1. ANIMAUX.

Rats femelles Sprague Dawley pesant en moyenne 200 à 280gr. Ces rats reçoivent ad libitum une nourriture standard (U.A.R A 04) et sont maintenus en régime d'illumination diurne.

2. REACTIFS.

- Collagénase; Gibco Laboratories, Ohio, U.S.A.
Collagénase; Sigma Chemical Compagny, St Louis, U.S.A.
- Acide taurocholique, ($^3\text{H(G)}$), 2.7 Ci/mmol, 0.25 mCi, New England Nuclear, Boston, U.S.A.
- Milieu nutritif Leibovitz L-15, Flow Laboratories (Figure n°15).
- Leucine, L-(3,4,5- $^3\text{H(N)}$), 110.0 Ci/mmol, 5.0 mCi, New England Nuclear, Boston, U.S.A.
- Scintillant Ready-solv EP de Beckman Irvine, California, U.S.A.
- Cycloheximide, Janssen Chimica, Beerse, Belgium.

3. ISOLEMENT DES HEPATOCYTES.

3.1 Appareil de perfusion.

L'appareil utilisé est représenté à la figure n°16.

Le perfusé se trouve dans un cylindre gradué de 500ml (1), il est aspiré par une pompe péristaltique (2) et amené au sommet d'un oxygénateur (colonne de vigreux) (3).

La hauteur entre cette colonne et l'animal est telle que la pression de perfusion soit de 10 à 15 cm H₂O c'est à dire plus ou moins la pression portale in vivo. Cette pression est maintenue constante grâce au trop plein (4) ramenant l'excès de perfusat dans le récipient.

Le milieu s'écoulant de la colonne passe à travers une spirale de verre dans un bain thermostatisé (37°C) afin d'amener le perfusat à température physiologique. A sa sortie du foie, le perfusat est collecté dans le cylindre gradué de départ.

Le mélange gazeux (95% O₂, 5% CO₂) est saturé en eau par passage dans un flacon laveur et pénètre dans le circuit au niveau inférieur de la colonne de vigreux.

3.2 Milieu de perfusion.

Tampon Krebs-Ringer bicarbonate sans Ca⁺⁺

	<u>P.M.</u>	<u>mM</u>	<u>mgr/L</u>
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.48	1.18	290.9
KH ₂ PO ₄	136.09	1.18	160.6
KCl	74.56	4.75	354.2
NaCl	58.44	118	6895.9
NaHCO ₃	84.01	25	2100.0
Glucose	180.16	11.10	2000.0

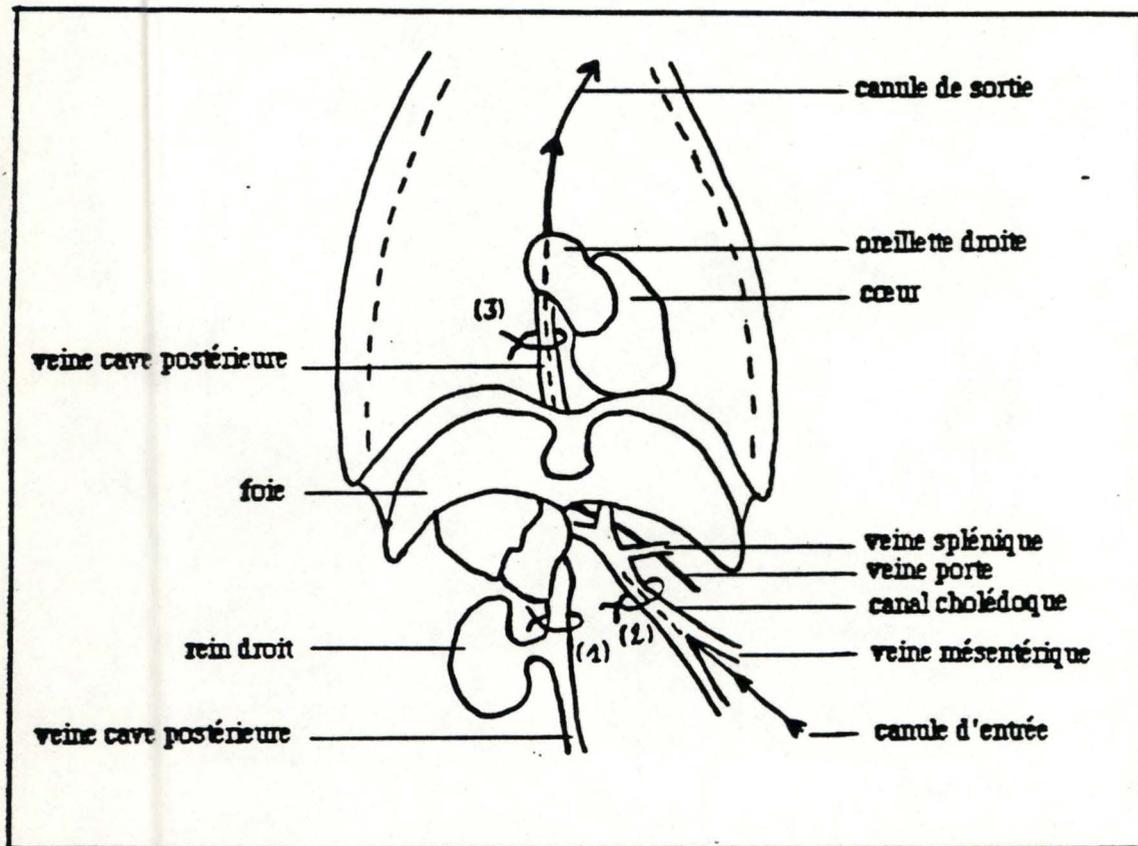


Figure n°17: Schéma général des différentes ligatures à effectuer et de la position des canules.

Avec Ca⁺⁺;

idem pour les 5 premiers points

	<u>P.M.</u>	<u>mM</u>	<u>mgr/L</u>
Glucose	180.16	5.55	1000.0
CaCl ₂	147.02	2.50	367.6

Avant usage le liquide de perfusion circule dans l'appareil pendant environ trente minutes afin d'être amené à la température de 37°C et d'être équilibré avec le mélange gazeux amenant son pH vers 7.4.

3.3 Préparation du rat.

Les hépatocytes sont isolés à partir du foie de rat par la méthode de Berrus et al (1960) modifiée par Zahlten et Stratman (1974) et adaptée dans notre laboratoire (Gohy, Coche, communications personnelles).

- Rats femelles de souche Sprague Dawley.
- Anesthésie par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (60 mg/kg de rat).
- Incisions longitudinales et transversales de la peau et des muscles.
- Déplacement des viscères sur la droite pour dégager la veine porte et le hile du foie.
- La canule d'entrée, connectée au réservoir, est introduite dans la veine porte. Le foie entièrement vidé de son sang s'éclaircit après quelques secondes.
- Fermer la ligature lâche (2) (Figure n°17).
- Couper la veine cave postérieure sous les reins pour éviter un gonflement du foie et faciliter le lavage.

- Ouverture du thorax, ligature lâche au niveau de la veine cave postérieure.
- Incision de l'oreillette droite.
- Pousser la canule de sortie jusqu'à la veine cave postérieure.
- Fermer la ligature (3) ainsi que la (1) (Figure n°17).

Le liquide s'écoule par la portion thoracique de la veine cave postérieure.

- Ajouter le milieu avec Ca^{++} dans le cylindre gradué. Les premiers ml sont éliminés à la sortie du foie.
- Aux 100 ml restants, ajouter 50 mg de collagenase et fermer le circuit de perfusion.

Dix minutes après, le foie se ramollit et le perfusé s'échappe par toute sa surface.

- Après 15 minutes, séparation douce du foie.
 - Eliminer la capsule et les impuretés par des forces mécaniques dans un milieu frais avec Ca^{++} .
 - Ajouter 50 mg de collagenase, oxygéner et incuber 10 minutes dans un bain d'eau agité à 37 °C.
 - Filtrer sur nylon pour éliminer les masses de cellules non dissociées et le tissu de connection. (diamètre des mailles supérieur à 60 μm pour ne pas endommager les cellules et inférieur à 500 μm pour ne pas laisser passer les gros agrégats).
 - Les cellules isolées sont récoltées par centrifugation et lavées de toutes les cellules détruites. (force de centrifugation assez faible: 500 tours par minute et temps de centrifugation le plus court possible: 60 secondes).
 - Après deux ou trois lavages: resuspension dans le milieu d'incubation.
- Les cellules ainsi obtenues peuvent être conservées quelques heures à 0 °C dans la glace fondante.

De plus amples informations concernant l'isolation des hépatocytes peuvent être fournies grâce au film vidéo disponible au laboratoire de biologie quantitative des Facultés.

4. TESTS DE VIABILITE.

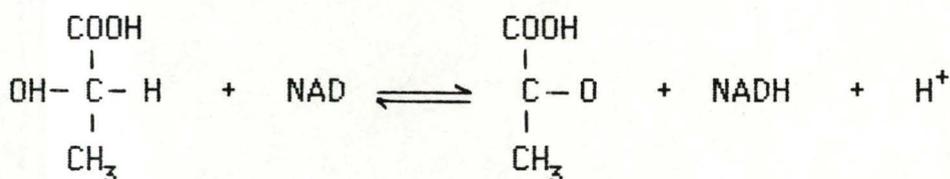
4.1. Test à l'érythrosine.

Pour ce test 50 μ l de la suspension cellulaire sont mélangés à 10 μ l d'érythrosine (3.6 mg par ml de NaCl 9 ‰). Après homogénéisation et oxygénation, les cellules sont comptées sur une cellule de Neubauer (Improved Neubauer, Hausser Scientific USA).

Estimation de la viabilité (%) = nombre de cellules rejetant l'érythrosine/nombre de cellules totales.

2. Test L.D.H.

La lactate déshydrogénase est une enzyme cytoplasmique nécessaire à la réduction de l'acide pyruvique en acide lactique.



Solutions stocks:

- Pyruvate: 10 mM (10 mg d'acide pyruvique dans 10 ml de tampon Tris 50 mM pH 7.4).
- Tampon Tris 0.5 M pH 7.4.
- NADH 1mM (7.36 mg dans 10 ml H₂O).

Pour 100 tests:

10 ml de Tris 0.5 M	Concentration finale: 0.05 M
10 ml Pyruvate	1 mM
60 ml H ₂ O	

80 ml	

Pipeter 0.8 ml de mixture avec 0.1 ml d'enzyme dilué adéquatement. Y ajouter 0.1 ml de NADH (concentration finale 0.1 mM). Mesurer l'activité à 340 nm.

Références:

Bergmeyer, Bernt : "UV-essay with pyruvate and NADH." Method of enzymatic analysis. edited by : Bergmeyer H.U. Verlag Chemie, Academic Press, Inc.

Annex ?

4.3. Dosage des protéines : Folin modifié - MillerRéactifs:

- 7 ml Na₂CO₃ 14.3 %
- 2.5 ml NaOH 2 N
- 0.5 ml tartrate 20 %
-
- 10 ml
- CuSO₄ 0.5 %
- 10 ml de la première solution + 1 ml de la seconde

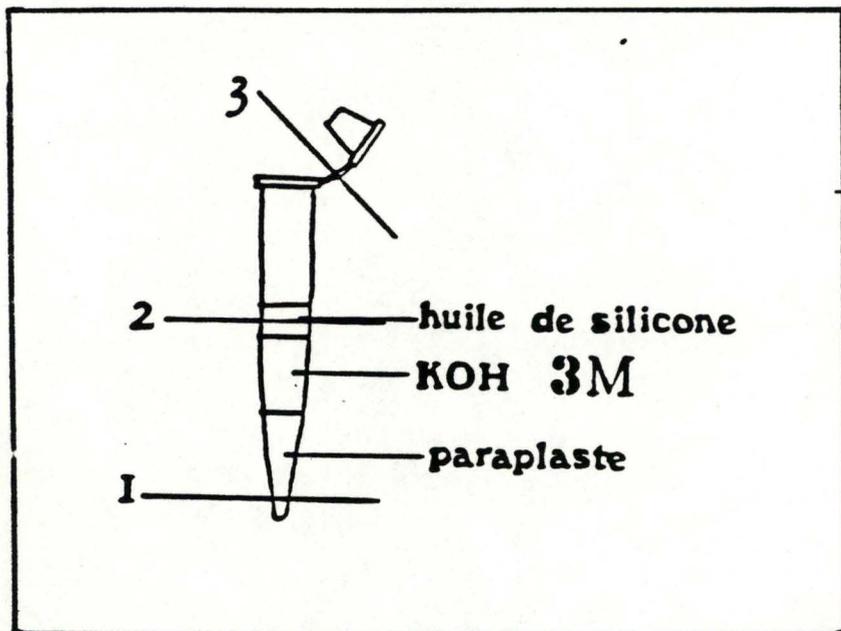


Figure n°18 : Cette figure illustre la préparation des microtests tubes pour les expériences de captation du taurocholate et d'incorporation de leucine radioactive.

Incuber, 10 minutes à température ambiante, 1 ml de l'échantillon à doser avec 1 ml de la troisième solution.

Après les 10 minutes, ajouter 3 ml de folin (1 ml porté à 11 ml) et incuber le tout 10 minutes à 50 °C. Lire à 660 nm.

Référence:

Miller (1959): "Protein method" Anal. Chem. 81, 964

4.4. Cinétique d'incorporation de leucine radioactive dans les cellules.

- 3.5 ml de milieu Leibowitz L-15 enrichi en glutamine.
- 350 µl de la suspension cellulaire. Oxygéner.
- incuber 20 minutes à 37 °C avec agitation.
- au temps zéro, rajouter 16 µl de ³H leucine (dilué deux fois).
- prélever des échantillons de 150 µl au cours du temps.
- centrifuger à la microfuge (microfuge B. Beckman instruments).
- congeler.
- lire la radioactivité au compteur à scintillation (Beckman, LS1801).

Les tubes utilisés sont les mêmes que pour les expériences de captation du taurocholate effectuées en routine dans le laboratoire, si ce n'est que dans ce cas, le KOH 3M est remplacé par du TCA 10 % ne nécessitant pas de neutralisation par HCl, avant le comptage de la radioactivité (50 µl de TCA à 10 % dans 4 ml de liquide scintillant donnent 54.37 dpm).

Tubes à centrifuger: (Figure n°18).

Tube de 400 µl en polyéthylène (Kartell) rempli de 50 µl de paroplaste (Lancer Scherwood Medical), puis de 50 µl de KOH 3 M, ensuite 100 µl d'huile de silicone AR 200 et enfin de l'échantillon de 150 µl.

Après centrifugation et congélation, on coupe au niveau de l'huile de silicone et du paraplaste. Le haut (surnageant) est placé directement dans une fiole à scintillation liquide en polyéthylène (Milli-6, Lumac).

Le bas (culot) est placé dans une autre fiole qui est passée à l'étuve (70 °C pendant 10 minutes) afin de faire fondre le paraplaste et à laquelle on ajoute 0.5 ml de benzène pour solubiliser ce paraplaste. 4.5 ml de liquide scintillant (Aquasol, NEN) sont ajoutés aux fioles qui sont comptées dans le Beckman LS-1801.

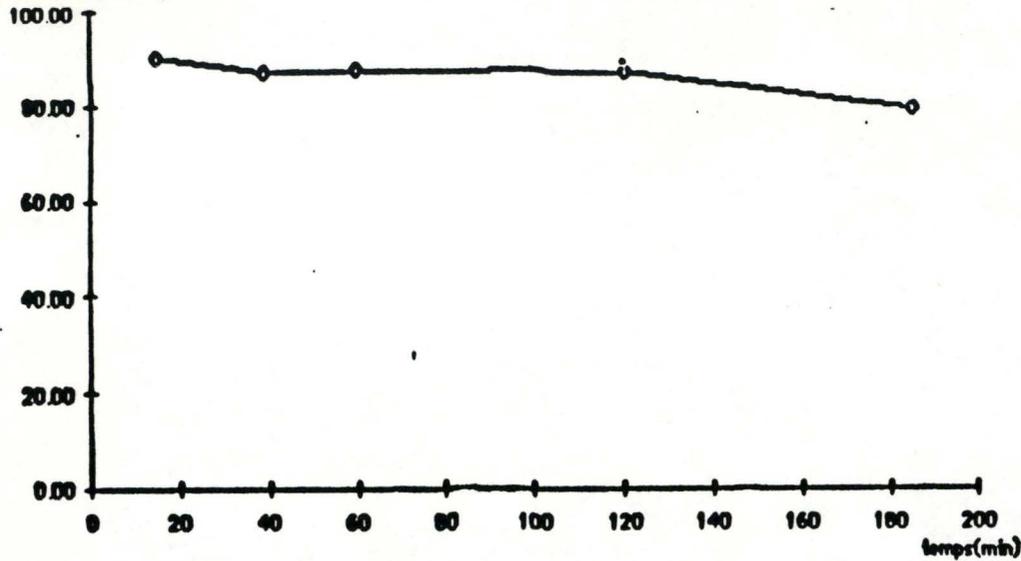
4.5. Cinétique d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines.

Seglen (1976b) modifié d'après les contraintes rencontrées dans le Biorack.

- les hépatocytes sont incubés en présence de ^3H leucine comme dans le cas précédent.
- prélever au cours du temps 150 μl d'échantillons.
- centrifuger.
- éliminer le surnageant (milieu d'incubation).
- ajouter 0.1 ml d' H_2O .
- ajouter 25 μl de TCA 10 % (provoquant une précipitation des protéines).
- laver le précipité deux fois avec 1 ml de TCA 2 % et une fois avec 1 ml d' H_2O .
- dissoudre le culot dans 0.125 ml de NaOH 0.3 N.
- neutraliser par 25 μl de HCl 1 N.
- ajouter 4 ml de liquide scintillant et lire la radioactivité au compteur à scintillation.

RESULTS

% de viabilité à l'érythroscine

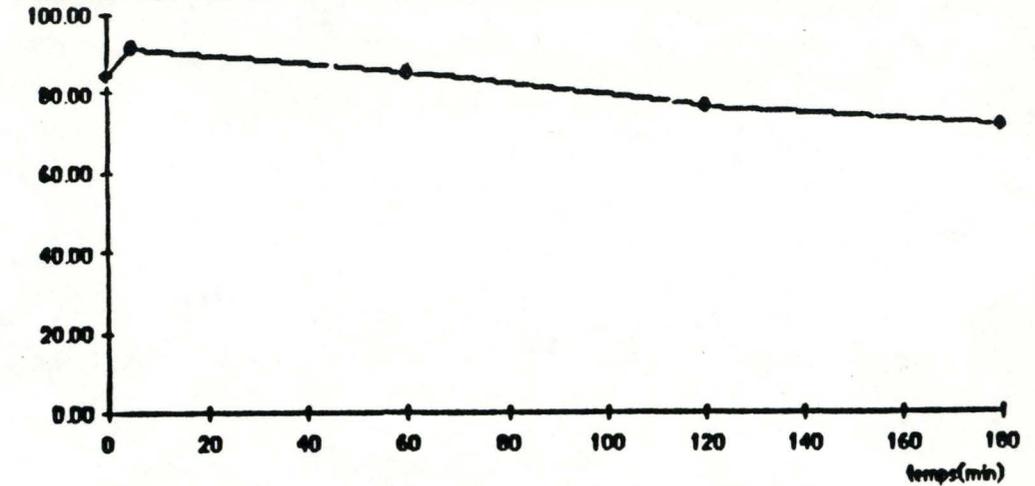


ESTIMATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE PAR L'ERYTHROSINE

temps (min)	oel. vivantes	oel. mortes	total oel.	% viabilité
15	260	29	289	89.97
39	321	49	370	86.76
60	301	43	346	86.99
120	289	41	330	87.58
185	213	54	267	79.70

Figure n°19 : Estimation de la viabilité cellulaire par le test à l'érythroscine.

$1 - (LDH \text{ surn} / LDH \text{ tot}) * 100$



ESTIMATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE PAR LIBERATION DE LDH

temps (min)	LDH tot	LDH surn	% de viabilité	temps (min)	mesure %
0	2924.42	406.57	86.10	0	84.33
0	2826.07	493.03	82.55	5	91.19
5	3355.42	197.66	94.11	60	85.46
5	2571.52	301.47	88.28	120	76.95
60	2835.59	500.74	86.94	180	72.27
60	3861.62	619.02	83.97		
120	2962.02	691.01	76.67		
120	3462.44	788.72	77.22		
180	2371.93	578.52	75.61		
180	2860.46	888.67	68.93		

% de viabilité = $1 - (LDH \text{ surn} / LDH \text{ tot}) * 100$

Figure n°20 : Estimation de la viabilité cellulaire à partir de la libération de L.D.H dans le milieu d'incubation.

1. RESULTATS DES DIFFERENTS TESTS DE VIABILITE.

1.1. Test à l'érythrosine.

Une estimation du % de viabilité peut être établie par l'érythrosine rouge (figure n°19).

Nous avons observé la viabilité des hépatocytes placés durant plusieurs heures à 0°C et nous pouvons constater que celle-ci oscille entre 80 et 90%.

Le comptage des cellules colorées se fait sur la cellule de Neubauer.

Ce type d'observation permet aussi d'estimer la densité cellulaire en ramenant le nombre de cellules par ml et de connaître ainsi le rendement d'une isolation. Ce rendement est assez variable d'une expérience à l'autre pour de nombreuses raisons dues à la technique d'isolation. Cependant, la dernière dilution dans le Krebs nous permet de ramener la densité cellulaire finale à une valeur comprise entre 15 et 25.10⁶ cellules/ml nécessaire aux expériences d'incorporation de leucine.

1.2. Test LDH.

L'estimation de l'intégrité structurale peut se faire en recherchant l'augmentation graduelle ou soudaine de LDH dans le milieu.

La mesure de LDH, faite pour des cellules stockées durant trois heures à 0 °C, montre une libération de cet enzyme d'environ 20% (Figure n°20).

Ces deux premiers tests (érythrosine et LDH) ayant été réalisé à partir d'une même suspension cellulaire, une comparaison des résultats peut aisément se faire. Il apparait donc que le test à l'érythrosine soit moins sensible à une perte de viabilité cellulaire.

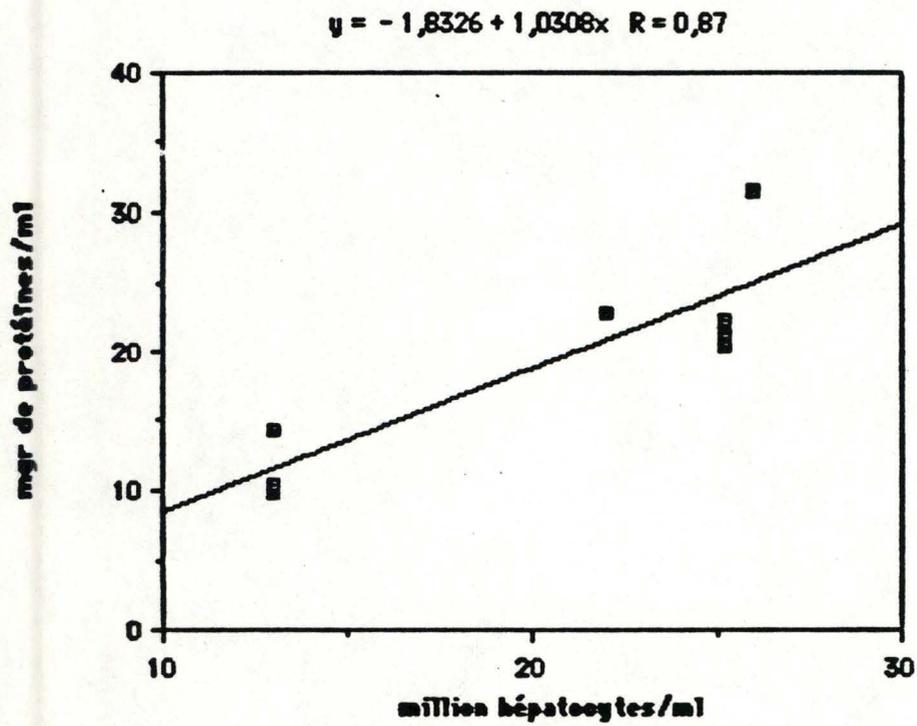


Figure n°21: Schéma établissant la corrélation entre les mgr de protéines et les millions de cellules.

1.3. Dosage des protéines.

Le dosage des protéines a été fait en parallèle avec le comptage à l'érythrosine afin d'établir une relation entre les millions de cellules et les mg de protéines. Les résultats obtenus sont représentés à la figure n°21 .

Cette corrélation: $y = -1.8326 + 1.0308 x$

$y = \text{mgr protéines}$

$x = 10^6 \text{ hépatocytes/ml}$

a été nécessaire pour les expériences d'incorporation de leucine où le dosage des protéines n'avait pas réalisé fait en parallèle. Grâce à cette corrélation, les échelles des expériences d'incorporation ont pu être normalisées afin de permettre une comparaison entre elles.

2. RESULTATS DE L'INCORPORATION DE LEUCINE RADIOACTIVE.

Nous allons dans un premier temps aborder l'historique des résultats, c'est-à-dire la séquence suivie pour les différentes expériences et les problèmes rencontrés au cours du travail.

2.1 Incorporation de leucine dans les cellules.

Afin d'adapter le protocole d'incorporation de leucine radioactive dans les cellules à de petits volumes, des microtest tubes (comme décrit à la figure n°18) ont été employés.

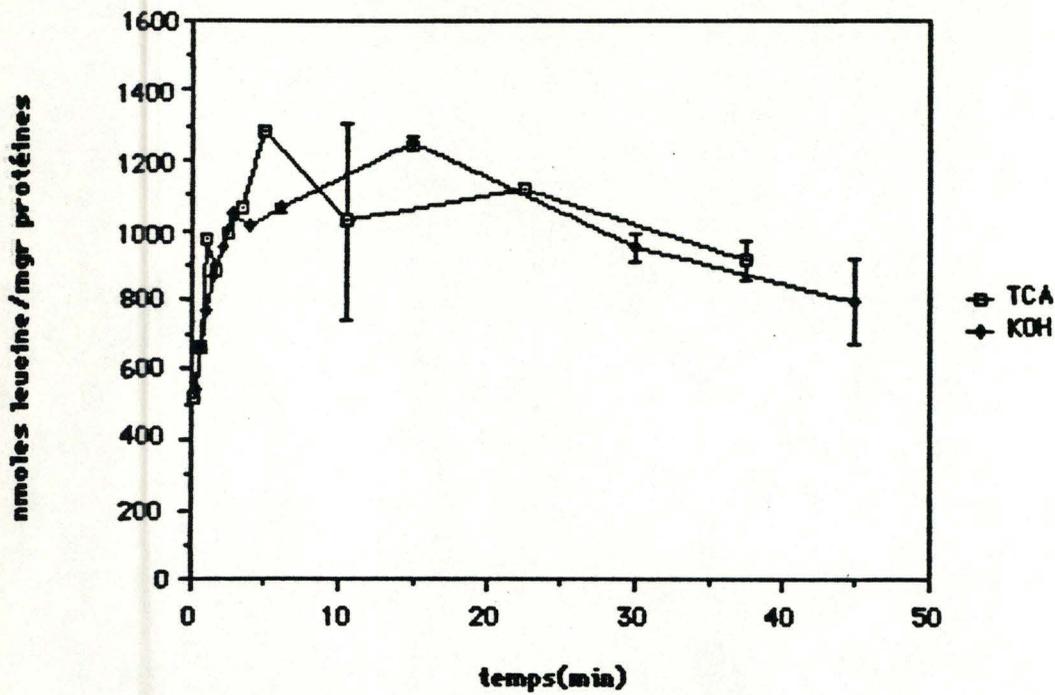


Figure n°22 : Comparaison de l'effet du TCA et du KOH pour la désorganisation cellulaire afin d'étudier ultérieurement l'incorporation de leucine dans les protéines en adaptant le protocole aux contraintes de volume du Biorack. Les écarts type pour les 7 premiers points ne sont pas représentés afin de ne point encombrer le graphique.

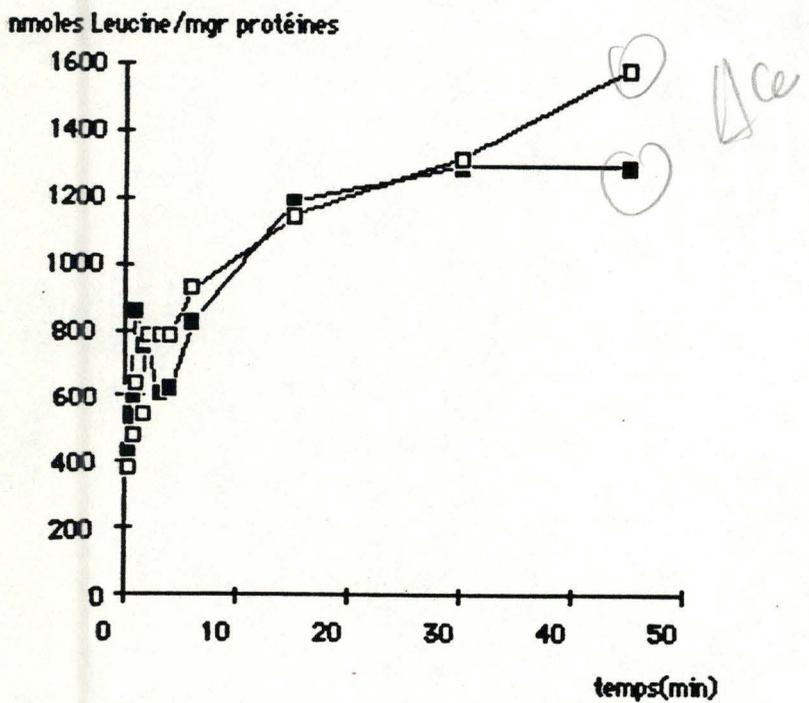


Figure n°23 : Cinétique d'incorporation de leucine dans les cellules placées à 0°C dans la glace fondante.

Ils permettent en effet de n'utiliser que 150 μ l de la mixture d'incubation, de récupérer un culot de quelques centaines de milliers de cellules grâce au fond de paraplaste qui empêche son tassement dans la pointe du cône, et d'éviter des échanges entre le culot et le surnageant grâce à l'huile de silicone.

2.1.1. Effet du KOH et du TCA.

La première expérience réalisée a pour but de vérifier si le KOH 3M utilisé dans le protocole de référence pour faire éclater les cellules, peut être remplacé par le TCA 10% nécessaire à la précipitation des protéines. Ceci implique que la densité de la solution de TCA soit adéquate, et que l'éclatement des cellules ainsi que l'arrêt de la réaction par le TCA puissent être observés.

Dans l'affirmative, une étape pourra être gagnée dans le protocole en ce sens que l'utilisation des microtests tubes pourra se poursuivre, et que la congélation après la centrifugation sera possible.

Les résultats présentés à la figure n° 22 montrent la superposition des courbes, et nous laisse supposer que le TCA 10 % joue un rôle équivalent à celui du KOH 3M.

Remarquons dès à présent que les résultats obtenus reflètent une assez grande variabilité qui caractérisera l'ensemble de nos expériences.

Nous pouvons aussi observer dans ce premier graphique ~~une certaine~~ tendance à la diminution, après une vingtaine de minutes, de la radioactivité incorporée dans les cellules; cette observation sera confirmée par les expériences suivantes.

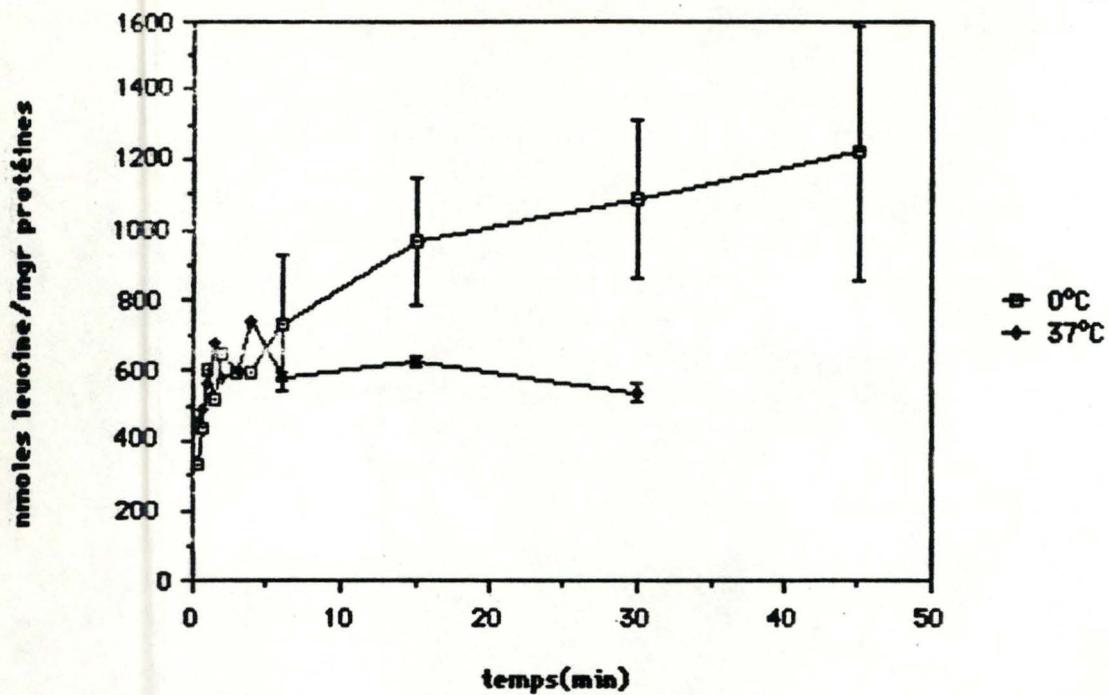


Figure n°24 : Comparaison de l'incorporation de leucine dans les cellules conservées à 0 et à 37°C. Chacune des expériences a été réalisée en duplicata. (Les écarts types ne sont pas représentés pour les 6 premiers points afin de ne pas encombrer le graphe.)

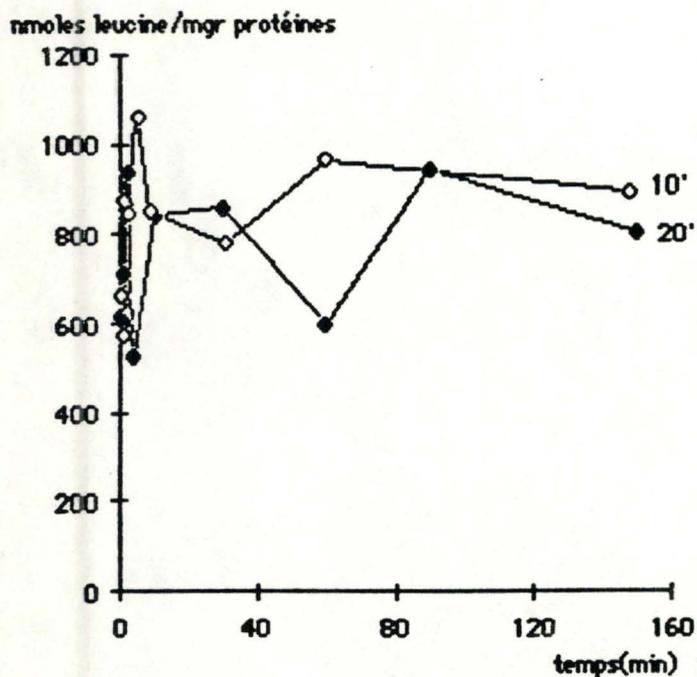


Figure n°25 : Effet du temps de préincubation sur l'incorporation de leucine radioactive dans les cellules. Cette expérience fut réalisée à 37°C et chaque courbe représente la moyenne de deux séries d'observation. (Les écarts types ne sont pas représentés afin de ne pas encombrer le graphe.)

Dans la suite du protocole, nous utiliserons donc le microtest tube avec le TCA, ce qui répond à deux contraintes essentielles du Biorack:

- petits prélèvements d'échantillons qui se réduisent ici à 150 μ l,
- congélation immédiate dans ces microtest tubes après la centrifugation.

2.1.2. Effet de la température sur l'incorporation de leucine dans les cellules.

L'incorporation de leucine dans les cellules a été mesurée à 0°C (température où le métabolisme cellulaire est fortement ralenti) et à 37°C. La figure n° 23 montre une incorporation dans les cellules à 0°C, la figure n° 24 montre que cette incorporation est maintenue à un niveau plus bas par le métabolisme cellulaire à 37°C.

L'influence de la température sur le phénomène étudié montre que la mesure obtenue n'est pas seulement le reflet d'une adsorption de la leucine sur la membrane plasmique, puisque les deux courbes ne sont pas superposables et qu'elles s'écartent de façon très visible pour des temps plus éloignés.

Nous pouvons donc remarquer grâce à ces résultats que,

- l'incorporation cellulaire de la leucine se fait aussi bien à 0 qu'à 37°C,
- le niveau d'incorporation à 37°C est plus faible que celui à 0°C,
- l'incorporation à 0°C ne présente pas de plateau comme c'est le cas à 37°C.

ce n'est pas un plateau!

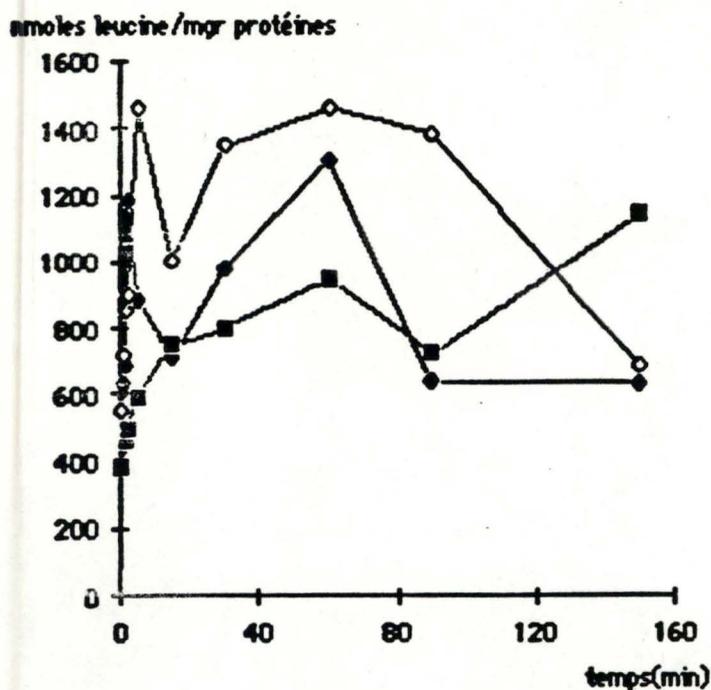


Figure n°26 : Exemple de courbe obtenue pour l'incorporation de leucine dans les cellules à 0°C lors des problèmes rencontrés pour l'isolation des hépatocytes céd flocculation des cellules lors de la dispersion dans le Krebs.

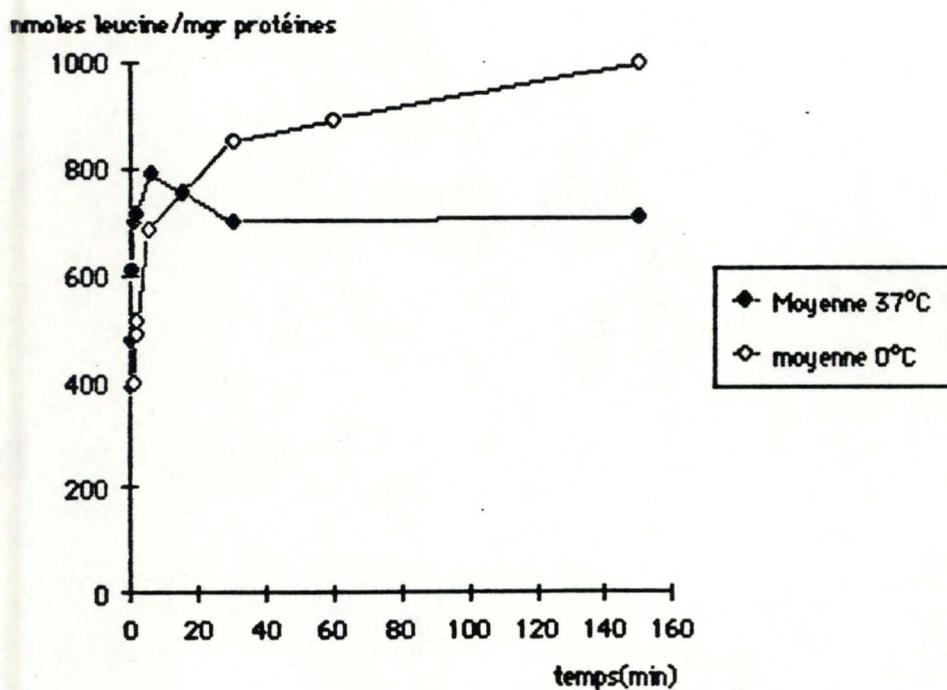


Figure n°29 : Schéma établissant l'effet général de la température sur l'incorporation de leucine dans les cellules. La courbe à 0°C est la moyenne de 4 expériences et celle à 37°C est la moyenne de 5 expériences.

2.1.3. Effet du temps de pré-incubation sur l'incorporation de leucine dans les cellules.

L'effet du temps de pré-incubation a été étudié afin de vérifier si la baisse d'incorporation observée à la figure n° 22 n'était pas le reflet d'une mortalité cellulaire excessive. En effet, si nous réduisons le temps de pré-incubation à 10 minutes, la tendance à la diminution du taux d'incorporation dans les cellules ne devrait être visible qu'une dizaine de minutes plus tard.

La figure n° 25 montre le même type de résultats pour les deux temps de pré-incubation.

Cependant, nous ne pouvons tirer aucune conclusion de cette expérience car elle fut réalisée dans des conditions expérimentales défavorables.

En effet, c'est à cette période que nous avons commencé à rencontrer certains problèmes lors de l'isolation des hépatocytes. Au lieu d'obtenir une suspension bien homogène des cellules, les hépatocytes floclaient au moment de la resuspension du culot cellulaire dans le Krebs. Les résultats obtenus avec ces hépatocytes montrèrent une telle variabilité qu'aucune observation ni conclusion ne purent être tirées de plusieurs expériences.

Ce problème explique donc la variabilité fort importante obtenue dans cette figure n°25. Un autre exemple d'expérience faite à ce moment est donné à la figure n°26 pour différentes courbes d'incorporation de leucine dans les cellules à 0°C.

Suite à de nombreux essais pour diagnostiquer la cause de cette flocculation, la collagénase Gibco fut remplacée par de la collagénase Sigma, ce qui nous a permis de poursuivre le cours des expériences.

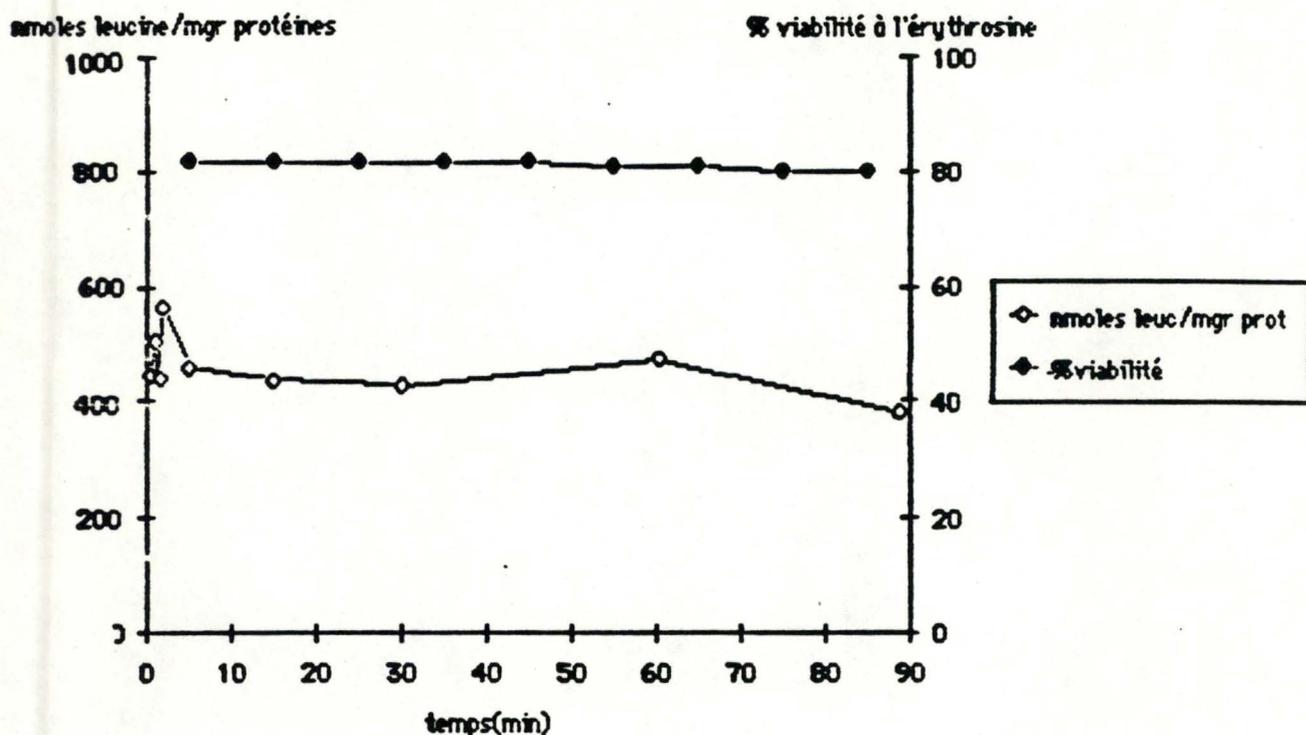


Figure n°27 : Etude simultanée de la viabilité cellulaire à l'érythrosine, et de l'incorporation de leucine dans les cellules à 37°C.

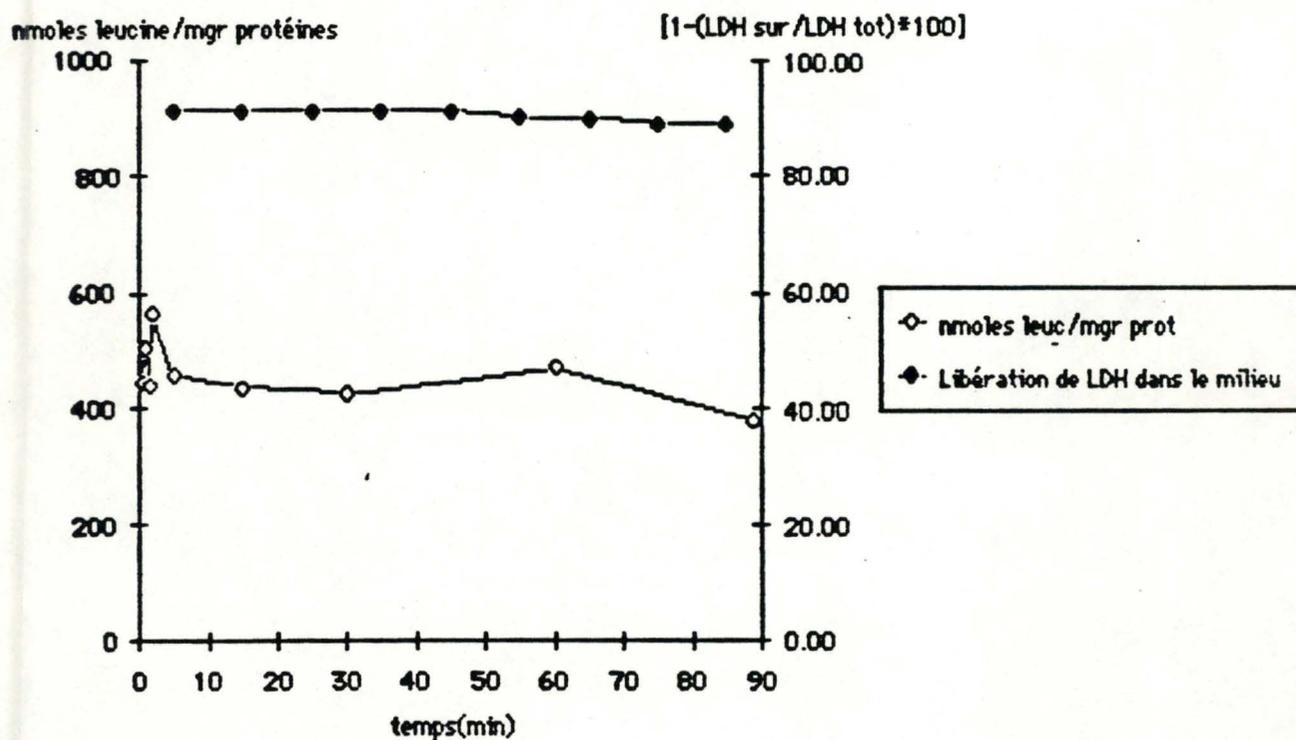


Figure n°28 : Etude simultanée de la libération de LDH dans le milieu d'incubation, et de l'incorporation de leucine dans les cellules à 37°C.

Il est cependant à remarquer qu'une légère floculation était encore présente pour les expériences du point 2.1.4., ce qui explique l'allure peu typique des courbes d'incorporation de leucine dans les cellules.

2.1.4. Incorporation de leucine et tests de viabilité.

Des expériences mesurant en parallèle l'incorporation de leucine dans les cellules et le % de viabilité à l'érythrosine ont été réalisées pour écarter l'hypothèse que la diminution d'incorporation observée à 37°C serait due à une perte progressive de viabilité cellulaire (figure n°27).

Ceci apporterait donc un complément d'information au point 2.1.3.

Le même contrôle fut effectué, non plus avec l'érythrosine, mais avec le test à la LDH (figure n°28).

Nous pouvons observer qu'aucune mortalité excessive n'intervient puisque la viabilité cellulaire se maintient d'une façon assez stable aux alentours de 80%.

Remarquons également qu'une cinétique d'incorporation de leucine dans les cellules n'a pas été décelée au cours de cette expérience. Ceci étant probablement du aux problèmes cités ci-dessus.

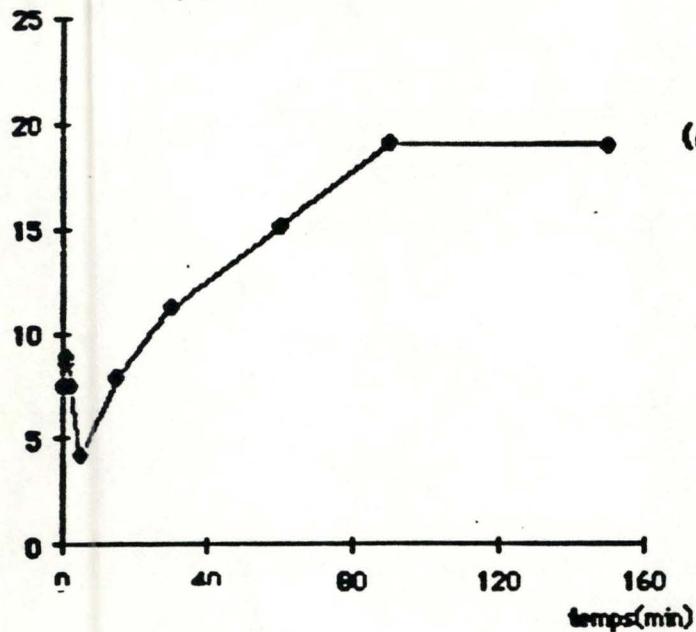
Suite à cette première série d'expériences concernant l'incorporation de leucine dans les cellules, quelques conclusions peuvent être tirées quant aux résultats obtenus.

Tout d'abord notons qu'une grande variabilité caractérise l'ensemble des résultats. Nous nous attendions au départ, à observer une cinétique précise et reproductible comparable à celle du taurocholate mais ce ne fut guère le cas. Les causes de cette variabilité ne sont pas clairement définies.

Afin d'illustrer les résultats obtenus, la figure n°22 reprend le schéma type de l'incorporation de leucine dans les cellules à 37 °C et la figure n° 29 présente les courbes moyennes de 5 observations à 37 °C et de 4 observations à 0 °C:

- la leucine semble entrer dans les cellules aussi bien à 0°C qu'à 37°C;
- à 37 °C, un plateau est très rapidement atteint, et le niveau d'incorporation dans les cellules diminue après quelques minutes;
- le niveau d'incorporation dans les cellules à 37 °C se stabilise à un niveau plus faible que celui à 0 °C;
- aucune baisse sensible de la viabilité n'est observée pendant la période d'incubation.

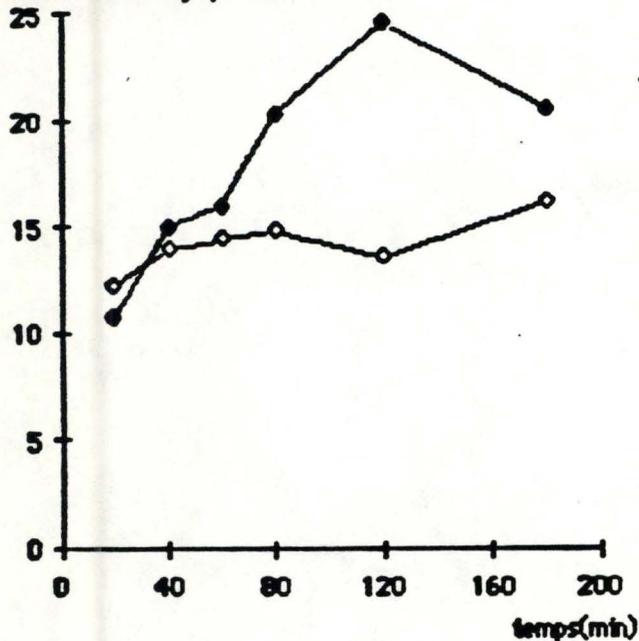
amoles leucine / mgr protéines



(A)

temps(min)	am leuc./mgr prot	dpm calcul
0.25	7.52	71.61
0.63	8.66	82.51
1.00	8.92	84.94
2.00	7.49	71.31
5.02	4.18	39.79
15.03	7.82	74.46
30.00	11.24	107.03
60.00	15.14	144.20
90.03	19.14	182.32
150.00	19.07	181.66

amoles leucine / mgr protéines



(B)

temps(min)	am leuc./mgr prot	dpm calcul
20	10.75	135.81
40	14.99	189.43
60	15.99	202.11
80	20.30	256.53
120	24.52	309.91
180	20.50	259.06

(C)

temps(min)	am leuc./mgr prot	dpm calcul
20	12.28	155.19
40	13.99	176.78
60	14.42	182.24
80	14.81	187.12
120	13.57	171.45
180	16.17	204.32

Figure n°30 : Cinétique d'incorporation de leucine dans les protéines à 37°C. Les protéines ont été isolées d'après Slegen (1976) par lavage successif à l'eau et au TCA. Les deux graphes ont été réalisés à partir de deux suspension hépatocytaires différentes.

nmoles leucine/mgr protéines

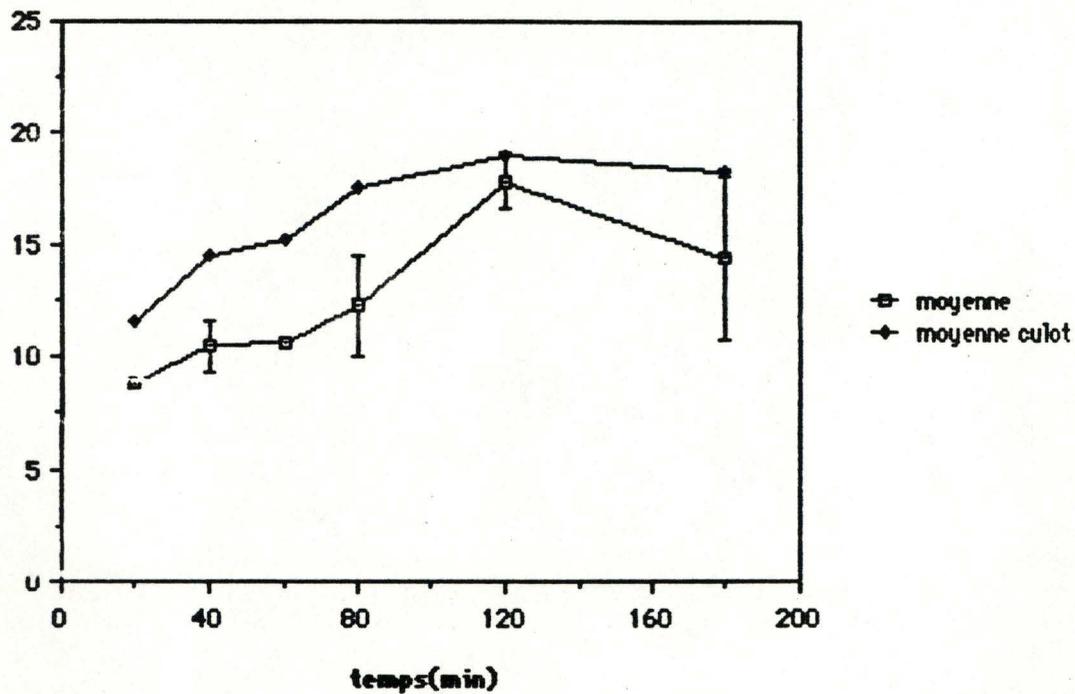


Figure n°31 : Effet de la cycloheximide (1mM) sur l'incorporation de leucine dans les protéines à 37°C.

nmoles leucine/mgr protéines

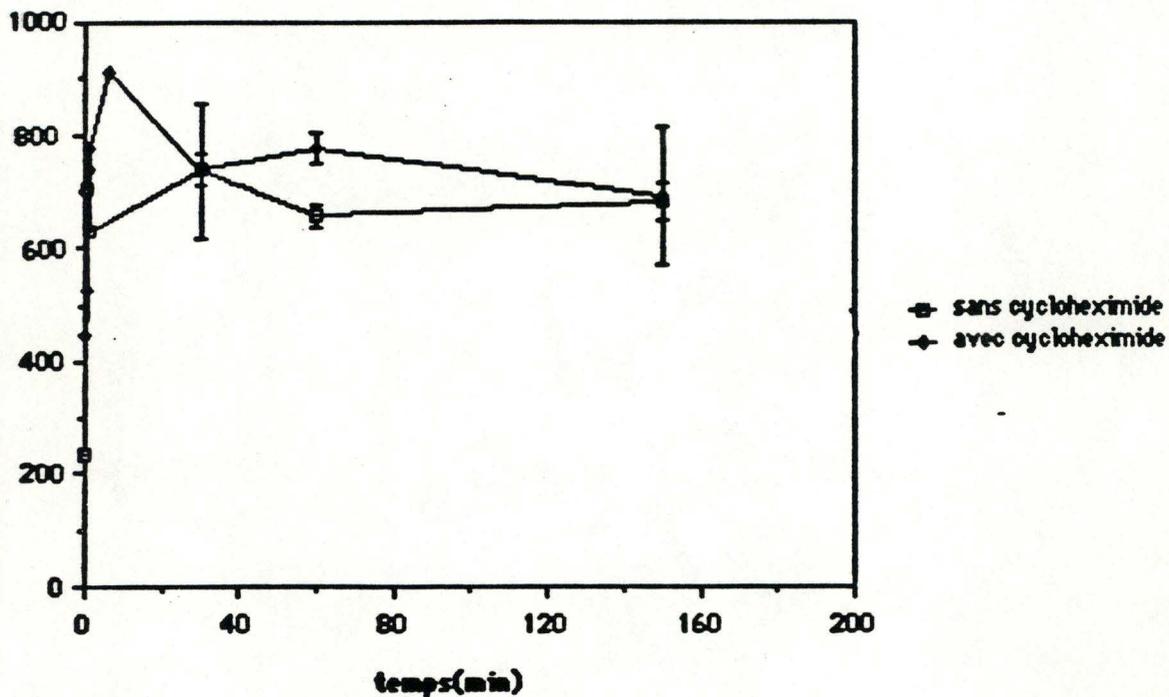


Figure n°32 : Effet de la cycloheximide(1mM) dans les cellules à 37 °C. Les courbes obtenues sont le résultat de la moyenne de deux séries d'observations; les écarts type ne sont représentés que pour les 3 derniers points.

2.2. Incorporation de leucine dans les protéines.

Après avoir établi l'incorporation de leucine dans les cellules, le protocole complet d'incorporation dans les protéines a été appliqué (précipitation et lavages successifs au TCA et à l'eau), pour donner les résultats présentés à la figure n°30. Nous pouvons remarquer que l'incorporation dans les protéines est assez rapide et qu'elle aboutit à un plateau après environ deux heures d'incubation.

La série (A) a été réalisée pour observer plus spécifiquement le début de l'incorporation alors que les séries (B) et (C) ont été réalisées afin de confirmer le plateau déjà présent après 100 minutes dans la série (A).

Il est à noter que les résultats des deux dernières séries sont peu satisfaisants et ne reflètent pas l'allure typique de l'incorporation de leucine dans les protéines comme pour la série (A).

A priori, il semble vraisemblable que le schéma type d'une incorporation protéique intracellulaire soit celui de la série (A).

2.2.1. Effet de la cycloheximide.

Une expérience a ensuite été réalisée afin d'observer un effet éventuel de la cycloheximide 1mM sur la synthèse protéique (figure n° 31).

Nous pouvons observer que la courbe des cellules incubées en présence de l'inhibiteur est un peu décalée vers le bas, ce qui laisse supposer une certaine inhibition, mais contrairement à l'effet attendu (Seglen, 1976), celle-ci n'est pas totale.

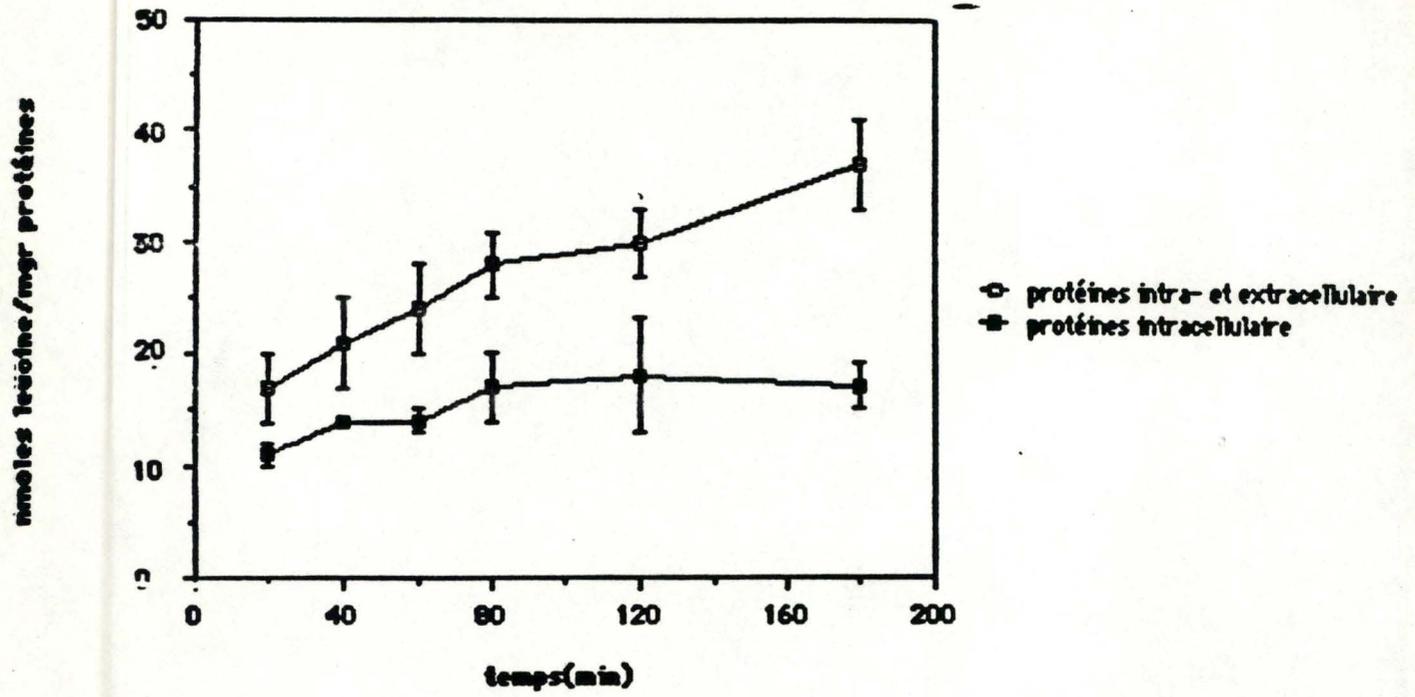


Figure n°33: Comparaison des cinétiques d'incorporation de leucine (à 37°C) dans les protéines du culot, et dans les protéines totales.

L'effet de la cycloheximide a aussi été observé sur l'incorporation de leucine dans les cellules à 37 °C (figure n°32) et nous pouvons remarquer que les deux courbes sont comparables qu'il y aie ou non un inhibiteur.

La cycloheximide ne semble donc pas interférer avec le processus d'incorporation de leucine dans les cellules et les résultats de la figure n°31 sont donc bien le reflet d'une inhibition de la synthèse protéique et non d'une diminution au niveau de l'incorporation cellulaire.

2.2.2. Incorporation de leucine dans les protéines cellulaires et dans les protéines totales (cellules + milieu).

Afin d'expliquer la baisse d'incorporation de leucine dans les cellules à 37 °C après quelques minutes, nous avons réalisé une expérience où l'incorporation de leucine a été mesurée dans les protéines cellulaires d'une part et dans les protéines totales d'autre part (figure n°33).

Nous observons un écart progressif des deux courbes après une trentaine de minutes. La courbe d'incorporation dans le culot semble se stabiliser à un plateau, celle d'incorporation dans le milieu total continue de croître.

DISCUSSION

1. HEPATOCYTES ISOLEES EN SUSPENSION.

Le choix du modèle des hépatocytes isolés en suspension a été dicté par les avantages suivants:

- contrôle des paramètres extérieurs,
- possibilité de nombreuses incubations à partir d'une même isolation d'hépatocytes,
- un seul type de cellule est obtenu à partir d'un organe complexe,
- système adéquat pour l'étude des propriétés de transport cellulaire,
- les cinétiques d'incorporation peuvent être suivies dans les cellules et le milieu simultanément.

La méthode d'isolation est performante et fournit des hépatocytes viables qui conservent leur structure membranaire (O. Slegen, 1976).

Notons toutefois que les hépatocytes semblent perdre leur polarité après l'isolement. Le canalicule biliaire disparaissant, l'hépatocyte adopte une configuration sphérique et les appareils de Golgi, rassemblés autour du canalicule *in vivo*, se dispersent (Gebbart, 1984). Mais on ne sait encore avec exactitude si cette perte de polarité est seulement structurelle ou si elle est aussi fonctionnelle (Vonck & al, 1978).

2. VIABILITE.

Les hépatocytes isolés en suspension étant destinés à l'étude de la cinétique d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines, il était nécessaire d'effectuer certains tests de viabilité afin de s'assurer de leur intégrité structurelle et métabolique.

Les tests structurels ont été fournis par le test à l'érythrosine rouge et le test de LDH. Les tests métaboliques ont été réalisés par des cinétiques d'incorporation de taurocholate dans le cadre d'un travail parallèle au notre (Decat, 1987).

2.1. Erythrosine rouge.

Les hépatocytes fraîchement isolés se présentent sous forme de cellules sphériques au contour défini ne manifestant aucun signe de dégénérescence nucléaire ou cytoplasmique.

Cependant, certains hépatocytes présentent des "bourgeoisements". Ils seraient dus à un manque de carbogène dans la suspension cellulaire, ce qui provoque une variation du pH.

L'appréciation de la viabilité par simple examen de la suspension, colorée à l'érythrosine rouge, nécessite une certaine habitude et est assez subjective. La méthode d'exclusion des colorants vitaux est contestée par certains auteurs (Pfaff & al, 1980; Bauer & al, 1975), car elle ne permettrait de détecter que des lésions graves et irréversibles des cellules. Aucune conclusion ne peut donc être tirée à partir de cette seule méthode et un complément d'information est nécessaire afin de décider plus objectivement de la qualité des cellules.

2.2. Dosage de la LDH.

Ce test de LDH convient mieux pour mettre en évidence des variations éventuelles de la viabilité au cours du temps. Nous pouvons observer une augmentation de ± 10 à 20% de libération de LDH après trois heures de stockage à 0°C (figure n°20).

Les suspensions cellulaires destinées à l'étude d'incorporation de leucine sont employées dans un intervalle de 2 à 3 heures; on peut donc remarquer qu'aucune diminution de viabilité excessive ne pouvait troubler ces expériences (H. Baur & al, 1975).

Nous pouvons conclure que les cellules semblent très bien résister à l'incubation comme l'ont déjà observé différents auteurs (Anwer M.S. & al, 1976a; Anwer M.S. & al, 1979; Schwarz L.R. & al, 1979b et c; Schwenk M. & al, 1979b).

En comparant les résultats obtenus pour ces deux premiers tests de viabilité, on peut remarquer que l'estimation au départ d'une libération de LDH semble plus précise bien que la différence entre les résultats des deux tests ne soit guère importante.

Il semble donc que le test à la LDH ne fasse que confirmer l'estimation de viabilité déjà obtenue par l'érythrosine, ces deux méthodes d'appréciation membranaire étant assez semblables quant aux résultats qu'elles fournissent (H. Baur & al, 1975). Le test à l'hérythrosine présente deux avantages supplémentaires, en particulier la rapidité des manipulations et l'appréciation morphologique simple, mais son principal inconvénient est la subjectivité même des observations.

3. INCORPORATION DE LEUCINE RADIOACTIVE.

Le but du projet dans lequel s'inscrit ce travail, est de mettre au point et d'adapter aux contraintes matérielles du Biorack un test d'intégrité métabolique pour les hépatocytes isolés en suspension.

A cette fin, c'est la voie métabolique de synthèse protéique qui fut choisie et c'est en particulier l'incorporation de leucine qui a été étudiée dans ce travail.

3.1. Incorporation dans les cellules.

La première partie de cette discussion concerne l'incorporation de leucine radioactive dans les cellules. Aucun article consulté n'a pu nous renseigner quant au taux d'incorporation intracellulaire, mais, si nous reprenons les résultats de la figure n°22, nous pouvons en conclure que le taux d'incorporation à 37°C est de l'ordre de 21 nm/min/mgr dans une première phase ascendante, et de 11 nm/min/mgr dans une deuxième phase descendante.

Le problème que soulève cette baisse sensible de l'incorporation de leucine dans les cellules sera discuté ultérieurement.

L'incorporation de leucine a ensuite été réalisée à 0°C (Figure n°23) avec le même protocole. A 0°C, le métabolisme cellulaire se trouve fortement ralenti; le potentiel de membrane passe de 35.9 ± 3.1 à 18.6 ± 2.1 mV; la concentration de Na^+ intracellulaire passe de 37.2 ± 3.6 mM à 117.0 ± 6.6 mM; l'incorporation d'uridine passe de 5800 cpm/(mg.min) à

1600 cpm/(mg.min); la respiration endogène passe de 5.2 nmole O_2 /(mg.min) à 5.0 nmole O_2 /(mg.min)(H.Baur & al, 1975).

D'après ces renseignements, on s'attendait à ne plus observer qu'une faible incorporation de leucine dans les cellules. Or nous pouvons constater que ce n'est pas le cas.

Cette observation laisse suggérer qu'il s'agisse d'un phénomène passif pouvant se dérouler aussi bien à 0°C qu'à 37 °C.

En effet G. et M. Schreiber (1973) avaient déjà relevé cette particularité en supposant un échange libre de leucine entre les compartiments intra- et extra-cellulaires avec une rapide pénétration de leucine et un équilibre tout aussi rapide entre les pools existants.

Les résultats obtenus à 0°C nous permettent donc de tirer les renseignements suivants: les caractéristiques d'un transport actif pour les acides aminés semblent être perdues et la membrane cellulaire semble y devenir plus perméable.

Une augmentation de la perméabilité avait déjà été observée pour le sucrose dans les cellules de rat embryonnaires. Cette augmentation était causée par un traitement à la trypsine et était détectable après une culture des cellules de 22 jours (Günther & al, 1966).

L'incorporation de leucine dans les cellules étant essentiellement un phénomène passif pour les hépatocytes isolés en suspension, la voie métabolique de la synthèse protéique présente l'intérêt particulier de fournir une mesure de l'intégrité métabolique, indépendamment des propriétés de transport de la membrane.

3.2. Incorporation dans les protéines.

La deuxième partie de cette discussion concerne plus spécifiquement l'incorporation de leucine dans les protéines intra-cellulaire. Si on prend la moyenne des résultats obtenus pour la figure n°30, le taux d'incorporation de leucine dans les protéines est de 90 ± 8 pmole/min/mgr. (La série C n'a pas été prise en considération pour cette mesure car elle ne représente pas l'incorporation typique de leucine dans les protéines).

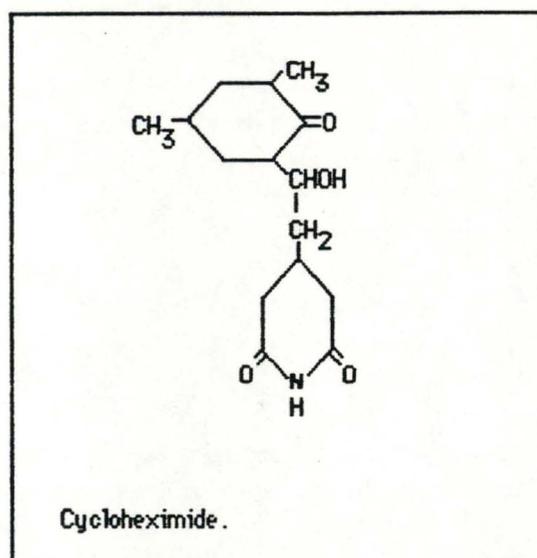
Si nous comparons ce taux à celui trouvé par J.L. Crane et D.L. Miller (1976) (figure n°9) qui est également de 90 pmole/min/mgr, nous pouvons en conclure que la cinétique observée est bien le résultat d'une incorporation dans les protéines.

Un maximum d'incorporation avait été observé pour une incubation sous une atmosphère de 95 % O_2 et 5% CO_2 à pH proche de 7 et à la température de 37 °C (G. et M. Schreiber, 1973). Ces conditions furent reprises dans les expériences pour obtenir la meilleure incorporation possible.

Nous avons par la suite testé l'effet d'un inhibiteur de la synthèse protéique sur la cinétique d'incorporation obtenue dans les protéines.

La cycloheximide est un antibiotique, inhibiteur spécifique de la synthèse protéique en ce sens qu'il empêche la formation du lien peptidique, au niveau des ribosomes 80 S des eucaryotes.

Par contre, il n'affecte pas la synthèse protéique au point de vue des ribosomes 70 S des procaryotes ou des mitochondries (Lehninger, 1982).



Cet inhibiteur a été utilisé à la concentration de 1mM sur l'incorporation de leucine dans les protéines et les résultats obtenus ne sont guère concluants quant à son effet même si une légère inhibition peut être observée (Figure n°31).

L'effet de la cycloheximide semble d'ailleurs très controversé, ainsi, Schreiber & Schreiber (1973), trouvent une insensibilité de l'incorporation de leucine envers 0.6 mM de cycloheximide alors que Inoue & al (1965) montrent une inhibition à 90 % de l'incorporation par 2.24 μ M de ce même inhibiteur.

La concentration utilisée était ici de 1 μ M comme pour l'expérience de O. Slegen (1976) qui trouva un maximum d'inhibition à cette concentration.

La cycloheximide a aussi été utilisée pour l'incorporation dans les cellules à 37°C et aucune inhibition d'incorporation ne fut observée. La leucine entre donc dans les cellules de la même façon, qu'il y ait ou non un inhibiteur de synthèse protéique ce qui semble d'ailleurs logique.

La courbe obtenue en présence de cycloheximide à la figure n° 31 est donc le résultat d'une inhibition partielle de la synthèse protéique et non d'une inhibition éventuelle de l'incorporation dans les cellules.

Comme nous l'avons vu précédemment dans les résultats obtenus à 37 °C, la radioactivité incorporée dans les protéines intracellulaires se stabilise après quelques minutes.

Ce phénomène laisse supposer que les protéines néosynthétisées soient excrétées dans le milieu d'incubation ou qu'elles soient rapidement métabolisées par les hépatocytes isolés.

L'expérience concernant l'incorporation de leucine dans le milieu total (protéines intra- et extra-cellulaires) appuie la première hypothèse d'excrétion protéique, en ce sens que, le taux d'incorporation reste constant alors qu'il baisse après 80 minutes si on ne mesure que l'incorporation dans les protéines intra-cellulaires. Les hépatocytes consomment donc l'isotope et relâchent continuellement les protéines néoformées, ceci résultant en une diminution progressive de l'activité spécifique intra-cellulaire (O. Slegel, 1976).

Cette diminution du taux d'incorporation laisse supposer l'intervention de différents processus de synthèse et de dégradation des protéines à des taux variables (L.J. Crane & D.L. Miller, 1976).

Si la mesure d'incorporation de leucine se fait dans les protéines intracellulaires, elle nous permet de visualiser, en plus de la synthèse protéique, l'excrétion des protéines dans le milieu. Une même expérience permet donc de cerner deux phénomènes distincts: synthèse et excrétion protéique.

CONCLUSIONS

& PERSPECTIVES

1. CONCLUSIONS.

L'objectif de ce travail est d'adapter un protocole étudiant l'intégrité métabolique des hépatocytes, aux contraintes du spacelab afin d'observer les effets de l'apesanteur.

A ce sujet, nous savons que seul des petits volumes peuvent être utilisés et qu'un minimum de manipulation est requis, la suite des opérations devant se poursuivre au sol après le retour de la navette.

X -Le protocole d'incorporation de leucine dans les protéines a été adapté aux petits volumes puisque seul ³350 µl de suspension hépatocytaire suffisent à l'expérience. Après addition du marqueur, la première centrifugation est suivie d'une congélation permettant donc le retour au sol avant l'extraction des protéines par lavages successifs à l'eau et au TCA.

X -La leucine semble pénétrer dans la cellule de façon passive, les propriétés d'un transport actif étant vraisemblablement perdues lors de la technique d'isolation. Certains auteurs attribuent cette perte du système de transport actif pour les acides aminés à la perfusion enzymatique avec collagénase (Schreiber & Schreiber, 1973).

! | Un transport passif de la leucine permet une étude de l'intégrité métabolique indépendante de l'intégrité membranaire. L'incorporation de leucine dans les protéines se révèle donc être un test de choix pour rechercher des modifications éventuelles du métabolisme cellulaires en condition de microgravité.

-Les hépatocytes semblent continuellement relacher les protéines néosynthétisées dans le milieu d'incubation. Ceci permet donc l'étude simultanée d'une synthèse et d'une excrétion protéique à partir d'un même culot cellulaire.

Cependant, nous avons encore la possibilité de réduire le nombre de manipulations expérimentales. En effet, seul un prélèvement après plusieurs heures d'incubation en présence du traceur s'avère être utile. Ce prélèvement ne nécessitera plus aucune séparation entre culot et surnageant car la mesure de radioactivité pourra se faire dans les protéines intra-et extracellulaires. En comparant la valeur obtenue à une valeur de référence au même temps et dans les mêmes conditions expérimentales, l'effet éventuel d'un paramètre extérieur pourra être mis en évidence.

2. PERSPECTIVES.

Le protocole expérimental étant adapté aux contraintes spatiales, l'on pourrait envisager de simuler les différentes conditions du vol en laboratoire. Par exemple, une différence de pression, une accélération ou l'effet de radiation peuvent être testés sur l'incorporation de leucine dans les protéines.

Il serait aussi très intéressant de mettre à profit la possibilité du double et triple marquage radioactif pour les expériences envisagées.

En effet, différentes voies métaboliques pourraient être suivies simultanément dans une même suspension hépatocytaire.

Ceci est rendu possible par le fait que seul un prélèvement est nécessaire à la mesure d'incorporation de leucine dans les protéines. Une autre étude cinétique (nécessitant plusieurs prélèvements) pourrait donc se réaliser à partir du même milieu d'incubation. A ce sujet, diverses recherches bibliographiques ont déjà été effectuées sur l'incorporation de glucose radioactif dans le glycogène (cfr thèse de Françoise BONTEMPS, 1979, "Régulation du métabolisme du glycogène dans les hépatocytes isolés de rats.")

REFERENCES

- Anwer M.S., Kroker R. and Hegner D.; 1975 - "Bile Acids secretion and synthesis by isolated rat hepatocytes"
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1477
- Anwer M.S. and Hegner D.; 1979 - "Study of cholic and conjugation by isolated hepatocytes"
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 512 - 522
- Baur H., Kasperek S. & Pfaff E.; 1975 - "Criteria of Viability of isolated liver cells"
Hoppe-Seyler's Z. Physio. Chem. M.356, S.827-838.
- Bergmeyer, Bernt; 1978 - "UV-assay with pyruvate and NADH"
Method of enzymatic analysis
Bergmeyer H.U. Verlag Chemie, Academic Press, Inc.
- Bontemps F.; 1979 - Thèse : "Régulation du métabolisme du glycogène dans les hépatocytes isolés du rat"
- Berry N.M.; 1974 - "High-Yield preparation of morphologically intact isolated parenchymal cells from rat liver"
Fleisher's and Packer L. (Eds) Methods in Enzymol., 32, 625-632
Academic Press New York
- Berry N.M. & Friend D.S.; 1969 - "High-Yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells"
J. of Cell. Biol. Vol. 43
- Bontemps F.; 1979 - Thèse : "Régulation du métabolisme du glycogène dans les hépatocytes isolés du rat"
- Chan T.M. & Exton J.M.; 1976 - "Méthode rapide de détermination du glycogène et de la radioactivité en petite quantité dans les tissus ou les hépatocytes isolés"
Analytical biochemistry 71
- Coche T.; 1982 - "Les hépatocytes en suspension comme modèle expérimental pour l'étude de la cinétique des acides biliaires chez le rat"
Memoire FNDP - Namur

- Coligi A., Tschopp A., Fuchs-Bislin P.; 1984 - "Cell sensitivity to Gravity"
Science, vol. 225
- Crane L.J. & Miller D.L.; 1975 - "Synthesis and Secretion of Plasma Proteins by Isolated rat Hepatocytes"
Fed. Proc. 34:620
- Crane L.J. & Miller D.L.; 1977 - "Plasma protein synthesis by isolated rat hepatocytes"
J. of Cell Biol., Vol. 72; 11-25
- Dubisy F.; 1985 - "Modification du transport des acides biliaries par des inhibiteurs du cytosquelette: étude morphologique et cinétique sur des hépatocytes isolés"
Mémoire FNDP - Namur
- Elliot Keith R.F.; 1979 - "The preparation, characterization and use of isolated cells for metabolic studies"
Techn. in Metab. Res., B 204, 1-20
- Erlinger S.; 1982 - "Cholérèse et cholestase"
Gastroenterol Clin. Biol., 6, 500-508
- Erlinger S.; 1982 - "Does Na⁺-K⁺-ATPase have any role in bile secretion?"
AM. J. Physiol., 243:G243-G247
- Evans E.A. & Muramatsu M.; 1977 - "Radiotracers techniques and applications"
Marcel Dekker, INC / New-York
- Goldsmith MA Huling S. Jones AL.; 1983 - "Hepatic handling of bile salts and protein in the rat during intrahepatic cholestasis"
Gastroenterology 84:978-986
- Gordon A.H.; 1964 - "Factors influencing Plasma Protein Synthesis by the Liver"
Biochem. J. 90:18P
- Jacquez J.A.; 1972 - "Compartmental Analysis in Biology and Medicine; Kinetics of distribution of tracer-labeled materials"

- Lehninger A.L.; 1979- "Bases moléculaires de la structure et des fonctionnements cellulaires"
Flammarion Med. Sc.
- Lester R. Pyrek J.S. Little J.M. Adcock E.W.; 1983 - "What is meant by the term bile acid?"
Am. J. Physiol. 244: G107-G110
- Longdon N.; 1983
Spacelab data book, Esa BR-14
- Mesland D.; 1986 - "Flight result from the Biorack Experiments on the spacelab D-1 Mission"
Esa Bulletin n° 47
- Mesland D.; 1983 - "The scientific utilisation of biorack"
Esa Bulletin n° 36
- Miller; 1959 - "Protein method"
Anal. Chem. 81, 964
- Pfaff E., Schuler S., Krell H. and Höte H.; 1980 - "Control and Special features of isolated hepatocytes"
Arch. Toxicol., 44, 3-21
- Reichen J. Simon Fr.; 1982 - "Cholestasis"
Arias IM Popper M. Schachter D Shafritz DA
The liver; biology and pathobiology
Rasen Press New-York, pp 785-800
- Schreiber G. & M.; 1973- "The preparation of Single Cell Suspensions from liver and their use for the Study of Protein Synthesis"
Sub. Cell. Biochem., 2, 321-383
- Schwarz R. Burr, Schwenk R., Pfaff M., Greim E.; 1975 - "Uptake of taurocholic acid into isolated rat liver cells"
Eur. J. Biochem. 55:617-623

- Schwarze E. & Slegen O.; 1980 - "Protein metabolism and survival of rat hepatocytes in early culture"
Exp. Cell. Res. 130:185-190
 - Seglen P.O.; 1973 - "Preparation of rat liver cells"
Experimental Cell. Res. 76:25-30
 - Seglen O.; 1976 - "Incorporation of radioactive amino acids into protein in isolated rat hepatocytes"
BBA 98673
 - Soini F.; 1978 - "Radioisotope counting techniques for analytical applications in Biology and Medicine"
Sc. Tools, Vol. 25, n° 3
 - Weigand K., Müller M., Urban J. & Schreiber G.; 1971 - "Intact endoplasmic reticulum and albumin synthesis in rat liver cells suspensions"
Exp. Cell Research 67 (1971) 27-32
 - Wroblewski & Ladue J.S.; 1955 - "Lactic Dehydrogenase Activity in Blood"
P.S.E.B.M., Y90
-