

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Cinétique de la synthèse protéique dans les hépatocytes isolés: évaluation de l'intégrité métabolique des hépatocytes après stockage à -13° C

Dubois, Bernadette

Award date:
1988

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

1988



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

**Cinétique de la synthèse protéique
dans les hépatocytes isolés.
Evaluation de l'intégrité métabolique
des hépatocytes après stockage à -13°C.**

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

DUBOIS Bernadette

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

Facultés des Sciences

rue de Bruxelles 61, B-5000 NAMUR

Tél. 081-22.90.61 Télex 59222 facnam-b Téléfax 081-23.03.91

**Cinétique de la synthèse protéique dans les hépatocytes isolés.
Evaluation de l'intégrité métabolique des hépatocytes après
stockage à -13°C.**

DUBOIS BERNADETTE

Résumé.

Dans ce travail, un protocole d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines a été mis au point chez les hépatocytes fraîchement isolés. Ce protocole fonctionnant de manière concluante, il fut appliqué à des hépatocytes ayant été congelés. Les résultats obtenus, sont en accord avec les différents critères de viabilité cellulaire

Abstract.

An experimental protocole of incorporation of ³H Leucine into proteins of isolated rat hepatocytes has been focused. Then this protocole was applied to the cryopreserved rat hepatocytes. The results are concusive and fit in with the unlike criteria of cellular viability.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1988

Laboratoire de Biologie Quantitative

Promoteur. E. FEYTMANS

Copromoteur. E DEPIEREUX

Mes remerciements s'adressent tout naturellement à Monsieur DEPIEREUX qui, par ses nombreux conseils et ses remarques judicieuses, m'a permis de mener à bien une recherche scientifique.

Je remercie Monsieur FEYTMANS de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Mes remerciements s'adressent spécialement à Thierry COCHE et à Xavier DEROUBAIX pour leurs précieux conseils, ainsi que la bonne humeur qu'ils entretiennent quotidiennement au laboratoire.

Je tiens à remercier plus particulièrement Etienne Pirotte pour son étroite collaboration, sa gentillesse et sa disponibilité tout au long de cette année.

J'adresse mes remerciements aux laboratoires de Monsieur De SCHRYVER et de Monsieur et Madame WATTIAUX, pour le prêt de matériel.

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

Je tiens plus personnellement à remercier ma famille pour l'aide morale qu'elle m'a apportée tout au long de ces études.

TABLE DES MATIERES

| Introduction | pages |
|---|--------------|
| <u>1. Généralités</u> | 1 |
| <u>2. Le foie et l'hépatocyte</u> | 4 |
| 2.1. Le foie | 4 |
| 2.2. L'hépatocyte | 4 |
| <u>3. Matériel d'étude</u> | 6 |
| 3.1. Le foie in vivo | 6 |
| 3.2. Le foie isolé | 6 |
| 3.3. Les hépatocytes isolés | 6 |
| <u>4. Isolement des hépatocytes</u> | 9 |
| <u>5. Critères de viabilité des hépatocytes isolés</u> | 10 |
| 5.1. Intégrité structurelle | 10 |
| 5.1.1. Exclusion du colorant vital | 10 |
| 5.1.2. Morphologie | 11 |
| 5.1.3. Rétention des substances cellulaires | 11 |
| 5.2. Intégrité métabolique | 12 |
| 5.2.1. Respiration cellulaire | 12 |
| 5.2.2. Incorporation de métabolites radioactifs | 13 |
| 5.2.3. Le potentiel de membrane et la concentration intracellulaire en ions Na^+ et K^+ | 13 |
| <u>6. Fonctions des acides biliaires</u> | 15 |
| 6.1. Le cycle entérohépatique | 15 |
| 6.1.1. Synthèse | 15 |
| 6.1.2. Rôle physiologique | 15 |
| 6.1.3. Formation de la bile | 15 |
| 6.2. Transport du taurocholate | 16 |
| 6.2.1. Captation | 16 |
| 6.2.2. Excrétion | 17 |
| 6.2.3. Transport intracellulaire | 17 |
| 6.2.3.1. Marquage radioactif | 18 |
| 6.2.3.2. Analyse compartimentale | 18 |
| <u>7. Fonctions des acides aminés</u> | 20 |
| 7.1. Système de transport des acides aminés | 20 |
| 7.2. Transport de la leucine | 20 |
| <u>8. Fonction de synthèse protéique</u> | 23 |
| 8.1. Hépatocytes isolés et synthèse protéique | 23 |
| 8.2. Incorporation de leucine dans les protéines des hépatocytes isolés | 24 |
| 8.3. Métabolisme des acides aminés chez les hépatocytes isolés | 24 |
| 8.4. Sécrétion des protéines | 24 |
| 8.5. Effets de différentes substances | 25 |

| | |
|--|----|
| <u>9. Cryopréservation des hépatocytes</u> | 27 |
| 9.1. Conservation à basses températures: généralités | 27 |
| 9.2. Stockage des cellules en milieu liquide | 28 |
| <u>10. Objectifs</u> | 30 |

Matériel et méthodes

| | |
|--|----|
| <u>1. Animaux</u> | 32 |
| <u>2. Isolement des hépatocytes</u> | 32 |
| 2.1. Réactifs | 32 |
| 2.2. Séquence opératoire | 33 |
| <u>3. Tests de viabilité</u> | 36 |
| 3.1. Test à l'érythrosine | 36 |
| 3.2. Dosage de la Lactate déshydrogénase | 36 |
| 3.3. Cinétique du taurocholate | 37 |
| 3.3.1. Utilisation du compteur à scintillation β | 38 |
| 3.3.2. Modélisation du transport du taurocholate dans les hépatocytes | 38 |
| <u>4. Dosage des protéines</u> | 42 |
| <u>5. Cinétique d'incorporation de la leucine radioactive dans les protéines totales</u> | 43 |
| 5.1. Premier protocole d'incorporation | 43 |
| 5.2. Second protocole d'incorporation | 44 |
| 5.3. Chromatographie | 45 |
| <u>6. Cinétique d'entrée de leucine radioactive dans les cellules</u> | 46 |
| <u>7. Protocole de congélation</u> | 47 |
| 7.1. Solutions | 47 |
| 7.2. Congélation | 47 |
| 7.3 Réchauffement | 48 |

Résultats

| | |
|--|----|
| <u>1. Les hépatocytes fraîchement isolés</u> | 50 |
| 1.1. Tests de viabilité | 50 |
| 1.1.1. Tests de viabilité structurelle | 50 |
| 1.1.1.1. Test d'exclusion du colorant vital (érythrosine) | 50 |
| 1.1.1.2. Dosage de la Lactate Déshydrogénase | 50 |
| 1.1.2. Tests d'intégrité métabolique | 51 |
| 1.2. Incorporation de la leucine radioactive dans les protéines totales chez les hépatocytes isolés | 52 |
| 1.2.1. Premier protocole | 52 |
| 1.2.2. Modifications du premier protocole | 52 |
| 1.2.3. Second protocole | 54 |
| 1.2.4. Chromatographie | 54 |
| 1.2.5. Importance de la privation de leucine dans l'incorporation de leucine radioactive dans les protéines | 56 |

| | |
|---|----|
| 1.2.6. Emploi de la cycloheximide comme inhibiteur de la synthèse protéique | 56 |
| 1.3. Cinétique d'entrée de leucine dans les cellules | 57 |
| 1.3.1. Effet de la température sur l'entrée de la leucine radioactive dans les cellules | 57 |
| 1.3.2. Emploi de deux inhibiteurs de l'entrée de leucine radioactive dans les hépatocytes | 57 |
| <u>2. Les hépatocytes stockés à des températures négatives</u> | 59 |
| 2.1. Tests de viabilité | 59 |
| 2.1.1. Tests de viabilité structurelle | 59 |
| 2.1.1.1. Test à l'érythrosine | 59 |
| 2.1.1.2. Dosage de la Lactate déshydrogénase | 59 |
| 2.1.2. Tests d'intégrité métabolique | 60 |
| 2.1.2.1. Cinétique du transport du taurocholate | 60 |
| 2.2. Incorporation de leucine radioactive dans les protéines chez les hépatocytes isolés | 61 |
| Discussion | |
| <u>1. Tests de viabilité</u> | 64 |
| 1.1. Tests de viabilité structurelle | 64 |
| 1.1.1. Test à l'érythrosine | 64 |
| 1.1.2. Dosage de la Lactate Déshydrogénase | 65 |
| 1.2. Tests d'intégrité métabolique | 65 |
| 1.2.2. Cinétique du transport du taurocholate | 66 |
| <u>2. Incorporation de la leucine radioactive dans les protéines chez les hépatocytes fraîchement isolés</u> | 68 |
| 2.1. Choix du protocole | 68 |
| 2.2. Cinétique d'incorporation de la leucine radioactive dans les protéines (hypothèses et arguments) | 69 |
| 2.3. Importance de la privation de leucine non marquée avant l'addition de leucine radioactive dans l'incorporation de leucine dans les protéines | 71 |
| 2.4. Emploi d'un inhibiteur de la synthèse protéique | 72 |
| <u>3. Entrée de leucine radioactive dans les cellules</u> | 73 |
| 3.1. Effet de la température d'incubation sur l'entrée de leucine radioactive dans les cellules | 73 |
| 3.2. Emploi de deux inhibiteurs | 73 |
| 3.2.1. La cycloheximide | 73 |
| 3.2.2. L'ouabaïne | 74 |
| <u>4. Incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales chez les hépatocytes cryopréservés</u> | 75 |

Conclusions et perspectives

1. Conclusions 76

2. Perspectives 78

Références

INTRODUCTION

1 GENERALITES

Ce travail fait partie d'un projet de recherche à long terme, envisagé par l'ESA (European Space Agency) et la NASA, ayant comme objectif d'observer les modifications du matériel biologique en apesanteur donc dans un environnement spatial.

L'étude du métabolisme cellulaire dans un environnement de microgravité lors d'une mission de spacelab (laboratoire spatial), requiert deux facteurs :

- Le matériel biologique doit posséder des voies métaboliques caractérisables et diversifiées.
- Le matériel biologique doit être compatible avec des protocoles expérimentaux qui s'adaptent aux contraintes imposées par les instruments du spacelab et du "biorack" (élément multifonctionnel procurant l'environnement expérimental nécessaire aux recherches dans le domaine cellulaire et physiologique).

Le foie est un organe doté d'une grande variété de voies métaboliques. Il joue un rôle central dans la régulation de l'homéostasie chez les mammifères.

Le modèle expérimental proposé dans le spacelab est la suspension d'hépatocytes isolés. La principale raison qui suggère l'emploi du modèle des hépatocytes isolés est sa polyvalence. Ces hépatocytes peuvent être préparés à l'avance, manipulés quantitativement et facilement séparés du milieu d'incubation. Le processus d'incubation impliquant des radioisotopes, est facilement adaptable aux exigences du spacelab.

L'objectif de la recherche en microgravité est de localiser des modifications éventuelles pour des fonctions cellulaires choisies.

Les fonctions cellulaires sont:

Introduction

- 1) Le transport membranaire: le taurocholate est un acide biliaire, qui possède la propriété intéressante de ne pas être métabolisé par la cellule. L'activité des enzymes régulant le transport du taurocholate est très sensible aux changements des propriétés physicochimiques de son microenvironnement.
- 2) La synthèse protéique: c'est une fonction essentielle des hépatocytes. La synthèse de protéines par incorporation d'acides aminés radioactifs peut être mesurée.
- 3) La gluconéogenèse: ce procédé anabolique est souvent utilisé comme critère de viabilité pour les cellules isolées, car il fait intervenir des réactions enzymatiques complexes, les mitochondries et le cytosol.
- 3) Le métabolisme lipidique: Les lipides interviennent dans la fonction biologique de stockage et comme composants structurels des membranes.
- 4) La biotransformation: cet aspect du métabolisme du foie concerne un nombre de réactions incorporant les enzymes du réticulum endoplasmique rugueux. La conjugaison des acides choliques avec la glycine et la taurine est connue.
- 5) La synthèse de RNA: elle se situe essentiellement dans le noyau. Elle est un indicateur de la compétence métabolique.
- 6) Outre la gluconéogenèse, la consommation du glucose peut aussi être étudiée.

Dans ce travail nous étudions principalement la synthèse protéique : C'est un critère d'intégrité métabolique largement utilisé. Le taux de synthèse protéique peut être aisément mesuré par l'incorporation d'acides aminés radioactifs dans les protéines (ESA Bulletin 47, 1986).

Dans le cadre d'une mission spacelab, l'isolement des cellules en orbite n'est pas possible, les hépatocytes doivent donc être isolés avant le départ de la mission et conservés jusqu'à l'emploi en orbite. De plus, les échantillons cellulaires doivent être conservés dans des récipients sans

Introduction

apport d'énergie quelques heures avant d'être employés. Comme les cellules isolées ont une vie limitée de 4 heures à 0°C, se pose le problème de conserver des cellules vivantes pendant une durée suffisamment longue (quelques jours) ?

Dans un autre domaine, tel que l'embryologie, la cryopréservation est efficace et des résultats concluants ont été obtenus. Dans le domaine du foie, par contre, peu de résultats sont obtenus.

Les hépatocytes sont des cellules très spécialisées. Des essais pour refroidir ces hépatocytes à -190°C, ne donnent pas plus de 10 % de cellules vivantes après un réchauffement à 37°C (Fuller, 1982).

Ce faible rendement est probablement dû à la formation d'une phase solide pendant le refroidissement. Comme la durée de conservation des cellules nécessaires pour une mission spacelab n'est que de l'ordre de quelques jours, on peut envisager de conserver les cellules à des températures moins basses. Pour éviter la perte d'intégrité cellulaire due à la formation d'une phase solide, nous évaluerons la possibilité de conserver les cellules isolées en phase liquide. Dans cette approche, les cellules sont refroidies à des températures de l'ordre de -13°C, en présence de cryoprotecteur (DMSO) (Decat, 1987). De cette manière, les suspensions cellulaires restent en phase liquide, et on peut espérer que la perte de viabilité due au refroidissement sera réduite (Feytmans, 1987).

Dans ce chapitre introductif, nous allons tout d'abord décrire les caractéristiques du foie et le modèle expérimental choisi pour cette étude. Ensuite, nous passerons en revue les différents critères de viabilité avant d'en arriver à une description de la synthèse protéique et de la conservation hépatocytaire à basses températures.

2 LE FOIE ET L'HEPATOCTE

2.1. LE FOIE

Le foie se situe dans l'hypochondre droit de l'abdomen (Klaassen & al, 1984). Il est constitué de quatre lobes, qui sont entourés d'une enveloppe fibreuse appelée capsule de Glisson. Le foie se divise en lobules hexagonaux qui possèdent plusieurs types de cellules: les hépatocytes, les cellules endothéliales, les cellules de Kùpffer, les cellules de stockage des graisses (fat storing cells), et les "pits cells". Le foie est en relation étroite avec le système sanguin. Il reçoit le sang de deux sources différentes. L'artère hépatique et les artérioles terminales hépatiques transportent le sang hautement oxygéné tandis que la veine porte véhicule du sang chargé de nutriments (molécules organiques, acides aminés, molécules glucidiques et acides gras) en provenance de l'intestin. Ces deux systèmes vasculaires se ramifient à travers le foie, et sont accompagnés de faisceaux nerveux, de vaisseaux lymphatiques et biliaires, et de tissus fibreux, le tout formant "la triade porte". Le foie est un centre stratégique au niveau de l'organisme. Il régule la composition de nombreuses substances organiques dans le sang, et il est aussi le siège de la formation de la bile: solution aqueuse contenant des acides biliaires, des pigments, du cholestérol, des phospholipides, des protéines, et des enzymes (Fig 1).

2.2. L'HEPATOCTE

Les hépatocytes constituent 90 à 95% du poids total de l'organe (Klaassen, 1984). Les hépatocytes sont des cellules polarisées, en ce sens que chaque hépatocyte est en relation avec les capillaires sinusoides, par son pôle sinusoidal, et avec le canal biliaire, par son pôle canaliculaire. Le

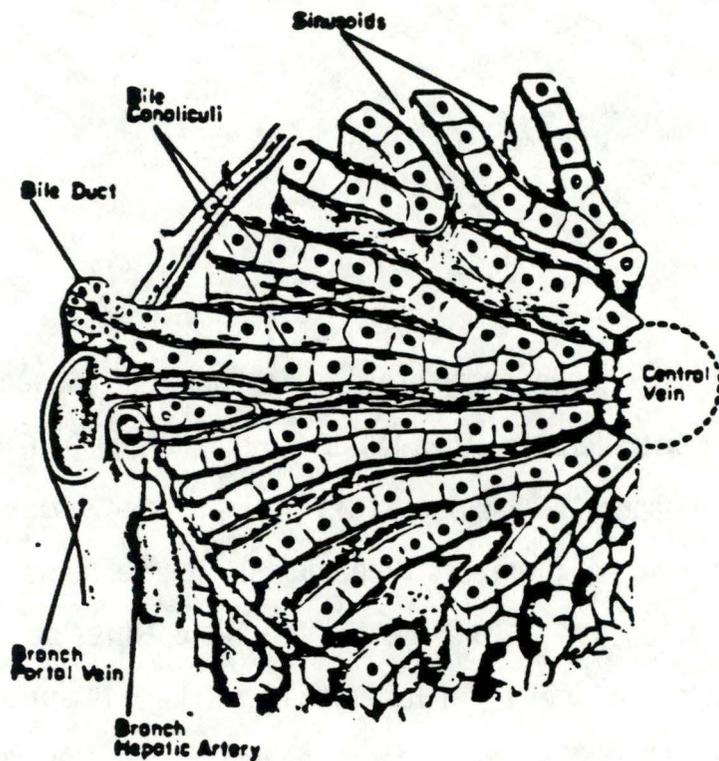


Figure n°1 : Agencement des hépatocytes en travées.
(Extrait de Bloom and Fawcett, 1975)

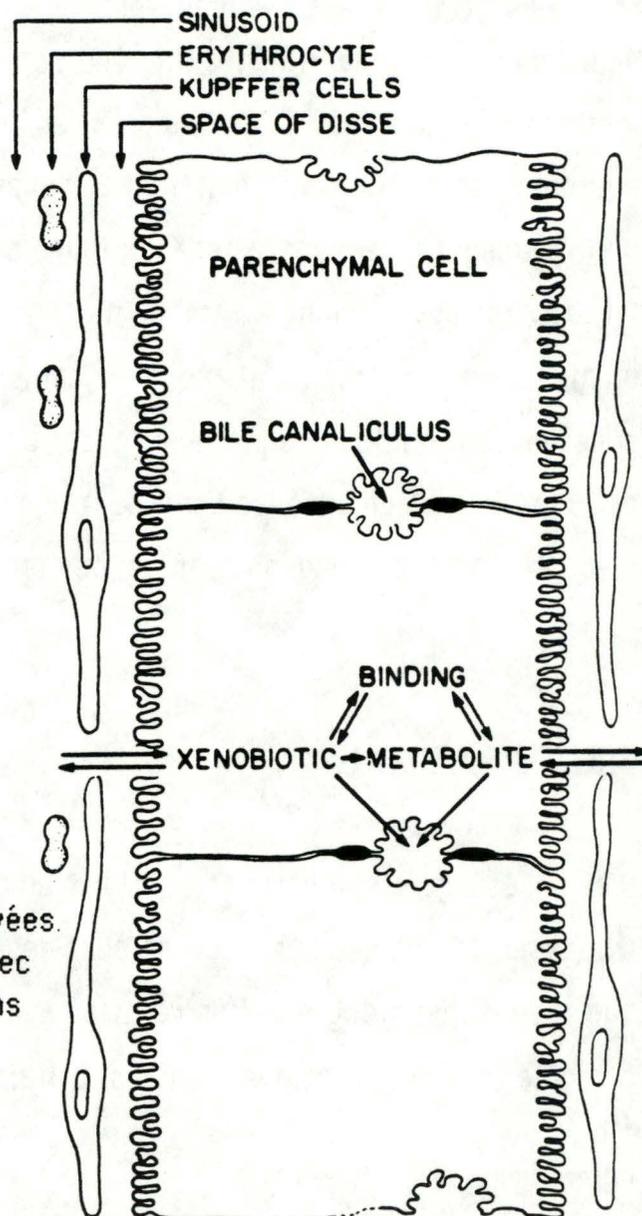


Figure n°2 : Organisation des hépatocytes en travées.
Le plasma sanguin est en relation avec
l'espace de Disse par des fenestrations
des cellules endothéliales.
(Klaassen, 1984)

sang arrivant 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 (Fig 2). L'hépatocyte est le siège de nombreuses fonctions métaboliques, comme la synthèse et la sécrétion de protéines plasmatiques, la synthèse de RNA, le métabolisme lipidique, et la gluconéogenèse. Mais la fonction la plus spécifique des hépatocytes est la sécrétion des acides biliaires.

3 MATERIEL D'ETUDE

Pour étudier différents paramètres métaboliques du foie, plusieurs modèles expérimentaux peuvent être proposés.

3.1. LE FOIE IN VIVO

Le modèle le plus proche de la réalité physiologique, est le foie étudié in vivo. Mais les contraintes matérielles du laboratoire spatial excluent à ce stade, l'utilisation d'animaux. En effet, les manipulations nécessaires à l'étude des fonctions du foie sur des animaux entiers semblent irréalisables dans le spacelab.

3.2. LE FOIE ISOLE

Cette méthode présente l'avantage d'être proche de la réalité physiologique mais présente aussi des inconvénients:

- 1° Difficultés d'étudier les propriétés du transport cellulaire.
- 2° Chaque animal présente un ou deux organes et comme on doit tenir compte de la variabilité biologique, plusieurs animaux doivent donc être utilisés pour obtenir un paramètre de contrôle valable.
- 3° Il est difficile d'évaluer la répercussion de facteurs tels que l'hétérogénéité cellulaire, l'influence hormonale et nerveuse, sur les résultats expérimentaux (Elliot K, 1979).
- 4° La mise en oeuvre d'un tel système dans le laboratoire spatial pose des problèmes techniques importants.

3.3 LES HEPATOCYTES ISOLES

Il est nécessaire de distinguer la mise en culture d'hépatocytes et la

suspension hépatocytaire. La suspension est souvent utilisée pour l'observation de courte durée, tandis que la mise en culture permet le maintien de cellules viables plus longtemps et la réorganisation en travées cellulaires.

Le modèle des hépatocytes isolés en suspension se prête mieux à des expériences en microgravité. En outre, il permet d'étudier plus facilement les fonctions métaboliques au niveau cellulaire (respiration, métabolisme des saccharides, des lipides et des acides nucléiques) (Schreiber, 1973).

Dans le cadre d'une mission spacelab, les suspensions de cellules offrent de nombreux avantages d'un point de vue expérimental:

1° Il offre à l'expérimentateur une simplicité de manipulation d'un système homogène tout en conservant aussi bien l'intégrité biochimique et physiologique de l'organe entier (ESA, Bulletin 47, 1986).

2° Plusieurs incubations peuvent être réalisées à partir d'une même suspension de cellules, ce qui réduit le coût, et élimine la variabilité inter-animale.

3° C'est un système idéal pour étudier les propriétés d'un transport cellulaire, car l'accès aux cellules est plus aisé que pour l'organe entier.

4° Les cellules semblent conserver leurs structures membranaires et leur organisation intracellulaire, intactes, mais celles-ci sont perdues si on travaille sur des homogénats et des tranches de tissus (Elliot, 1979). De plus, les suspensions de cellules fraîchement isolées semblent conserver les fonctions spécifiques que l'organe, par exemple: la synthèse de sérum albumine dans les hépatocytes de rat.

5° Le système biologique est simplifié et les problèmes liés à la diffusion de substrats vers, et à partir des cellules, sont minimisés.

6° Les hépatocytes isolés fournissent un système simplifié en respectant la compartimentation des acides aminés, parce que l'espace extracellulaire est réduit à un compartiment facilement contrôlable (Seglen, 1976).

L'isolement des hépatocytes présente plusieurs inconvénients:

1° Pour la suspension, on observe des altérations au niveau de la polarité membranaire, de l'ultrastructure ainsi que des divisions cellulaires amitotiques (Elliot, 1979).

2° Pour la culture cellulaire, il est nécessaire de travailler en milieu stérile pour éviter les problèmes de contaminations. De plus une dédifférenciation cellulaire progressive survient, ce qui entraîne une perte de forme physique, de polarité, et une altération de certaines voies métaboliques, comme le transport de différentes substances (Elliot, 1979).

4 ISOLEMENT DES HEPATOCYTES

Trois méthodes de base ont été employées pour la dissociation du tissu hépatique: la force mécanique, le traitement chimique et la digestion enzymatique. Nous ne retiendrons que la méthode enzymatique, les deux autres méthodes ne sont plus employées actuellement.

Plusieurs types de traitement enzymatique sont devenus des méthodes de choix pour la désagrégation des tissus (Seglen, 1973). La collagénase est une enzyme hydrolytique qui est utilisée avec succès pour dissoudre le collagène de la matrice tissulaire. Souvent (Zahlten, 1974) cette enzyme est employée en présence d'agents chélateurs permettant le retrait des ions Ca^{++} , ce qui facilite le détachement des desmosomes. L'isolement des cellules est réalisé avec seulement une légère action mécanique.

Actuellement, cette méthode enzymatique est la plus répandue et elle est utilisée au laboratoire (Berry, 1969). Elle permet d'obtenir des hépatocytes isolés dont la viabilité est de 90%. Cette viabilité sera déterminée selon différents critères dans le point suivant.

5 CRITERES DE VIABILITE DES HEPATOCYTES ISOLES

Le problème de la viabilité cellulaire a apparemment été ignoré dans le passé, par de nombreux chercheurs (Elliot K, 1979). Les cellules préparées selon les protocoles publiés ne sont pas systématiquement viables. On peut remarquer que de légères différences au niveau des animaux, des enzymes, et des conditions d'isolement, peuvent induire des altérations dramatiques de viabilité cellulaire. Pendant la procédure d'isolement, les cellules peuvent subir des dommages, par le stress mécanique, par l'action des enzymes lytiques, qui contaminent les préparations de collagénase, et le retrait des ions Ca^{++} (Baur, 1975).

Il existe deux classes principales de tests de viabilité:

- a) Ceux qui reflètent l'intégrité structurale. Par exemple: l'exclusion d'un colorant vital, la microscopie optique et électronique et la rétention des organites cellulaires.
- b) Ceux qui reflètent l'intégrité métabolique. Par exemple: gluconéogenèse, respiration cellulaire, synthèse protéique...

5.1. INTEGRITE STRUCTURELLE

5.1.1. Exclusion du colorant vital (érythrosine)

Les cellules vivantes excluent un colorant vital.

Cette méthode est la plus souvent utilisée et quelquefois même à l'excès. Comme colorant, on emploie principalement le trypan bleu et l'érythrosine. C'est un système simple d'indication de viabilité cellulaire, il est rapide et son coût est faible.

Mais il existe des controverses considérables au niveau des résultats obtenus avec le trypan bleu et d'autres méthodes, car des cellules qui sont

non viables selon un autre test semble exclure le trypan bleu. Le trypan bleu donne seulement une mesure de l'intégrité des membranes cellulaires et pas strictement la viabilité.

5.1.2. Morphologie

Les cellules isolées en suspension peuvent être rapidement examinées par diverses techniques microscopiques (fond clair, contraste de phase). Les observations microscopiques sont souvent réalisées en conjonction avec la méthode d'exclusion du colorant vital. Avec un peu d'expérience, il est facile d'estimer la qualité d'une préparation cellulaire, mais ce critère reste fort subjectif. Si les cellules sont endommagées, elles apparaissent ternes et plates, par rapport aux cellules vivantes qui sont brillantes. Pour un examen de routine on n'emploie pas le microscope électronique, mais celui-ci peut apporter des informations supplémentaires :

- les cellules isolées présentent des organites subcellulaires comparables à ceux d'un tissu intact.
- La membrane cellulaire intacte doit présenter beaucoup de microvillosités.
- Le noyau doit montrer des proportions identiques à celles d'un tissu intact, avec la même densité aux électrons (ME à transmission) pour le nucléoplasme et la matériel nucléaire.
- Le cytoplasme ne doit pas être vésiculé.
- Les mitochondries ne doivent pas être rondes (découplées) mais plutôt de forme et de taille irrégulière.
- Le réticulum endoplasmique ne peut pas être dispersé en vésicules.

5.1.3. Rétention des substances cellulaires

Les cellules intactes retiennent des molécules comme les enzymes, les métabolites et les petits ions inorganiques. La mesure du contenu cellulaire total d'une enzyme cytoplasmique, comme la lactate

déshydrogénase, par rapport aux valeurs observées dans l'organe entier permet donc d'apprécier "la viabilité" de la suspension globale. La comparaison du contenu cellulaire avec la quantité d'enzymes dans le milieu permet d'évaluer la perte d'enzymes suite à une perte d'intégrité de la membrane plasmique. Une autre manière d'utiliser l'activité des enzymes, est de mesurer la perte d'un enzyme dans le milieu durant la préparation, les lavages et l'incubation des cellules (Baur, 1975). En conclusion, le dosage d'un enzyme cytoplasmique est une technique intéressante : elle semble être plus objective que les techniques microscopiques et elle permet de suivre l'intégrité des cellules en fonction du temps. Elle permet aussi de juger si la perte de viabilité est un phénomène graduel, ou si elle se produit soudainement suite à une manipulation particulière.

5.2. INTEGRITE METABOLIQUE

5.2.1. La respiration cellulaire

La mesure du taux de respiration (consommation d'oxygène au cours du temps) est un test qui est facile à effectuer avec des suspensions cellulaires. Des expériences de stimulation de la respiration (Baur, 1975) ont été faites sur des cellules fraîches en ajoutant divers substrats comme de l'ADP, du calcium, et 1mM de succinate. En particulier, on ne constate pas de stimulation pour une concentration de succinate inférieure à 20mM chez les cellules "viables". Les cellules endommagées, au contraire, montrent une stimulation de respiration à partir de 1mM de succinate. A l'instar de la technique d'exclusion du colorant vital, les résultats de cette méthode doivent être considérés avec prudence: le taux de respiration peut varier suivant l'activité de la cellule et n'est donc pas directement dépendant de l'intégrité métabolique.

5.2.2. L'incorporation de métabolites radioactifs

Des métabolites radioactifs sont captés et employés par les cellules, pour alimenter leurs voies métaboliques.

- 1) L'incorporation d'acides aminés marqués comme la leucine, l'uridine et la phénylalanine dans des cellules précipitables à l'acide trichloroacétique est un phénomène complexe, dans lequel participent la membrane cellulaire, le noyau, les mitochondries et le cytoplasme. Leur action concertée est un critère important de viabilité et d'intégrité fonctionnelle.
- 2) Le transport du taurocholate radioactif chez les hépatocytes isolés fait intervenir différentes composantes de la cellule. Ce transport est bien caractérisé à l'heure actuelle (Coche, 1988). On peut envisager d'utiliser le critère de transport du taurocholate pour évaluer la viabilité des suspensions cellulaires.

5.2.3. Le potentiel de membrane et la concentration intracellulaire en ions Na^+ et K^+

Le potentiel de membrane et les concentrations en ions intracellulaires K^+ et Na^+ , sont des critères de viabilité cellulaire très sensibles (Baur, 1975). Le potentiel de membrane est évalué en mesurant la distribution passive d'ions Cl^- de part et d'autre de la membrane.

-Le potentiel de membrane E_{Cl} est calculé comme suit:

$$E_{\text{Cl}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[\text{Cl}]_i}{[\text{Cl}]_o}$$

où

R = Constante des gaz parfaits

T = Température en Kelvin

F = Constante de Faraday

$[\text{Cl}]_i$ = Concentration intracellulaire en ions Cl^-

$[\text{Cl}]_o$ = Concentration extracellulaire en ions Cl^-

-Les concentrations en ions intracellulaires K^+ et Na^+ sont déterminées par un spectrophotomètre de flamme.

Cette mesure permet d'observer l'influence d'un stockage à $0^{\circ}C$ et d'une incubation à $37^{\circ}C$, sur les paramètres de la viabilité cellulaire. Baur (1975) a, par exemple, montré qu'après 3 heures d'incubation à $37^{\circ}C$, le potentiel de membrane et la concentration en ions K^+ intracellulaire ont diminué, tandis que la concentration en ions Na^+ a augmenté.

Ce qui indique une croissance des altérations due à l'influence de l'incubation sur les paramètres cellulaires.

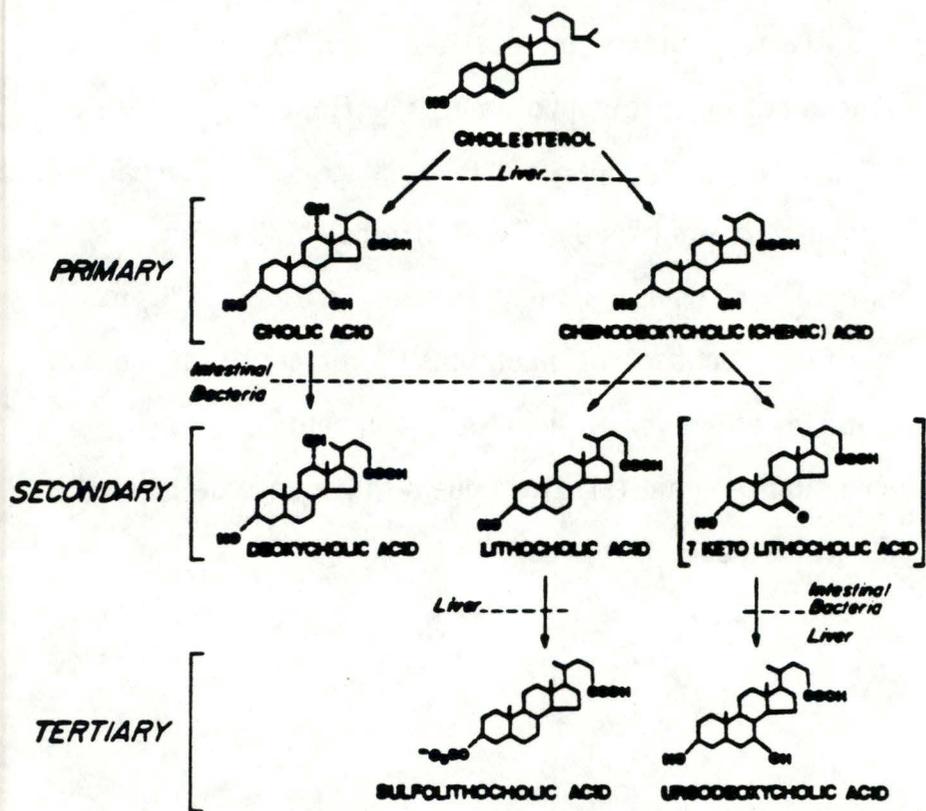
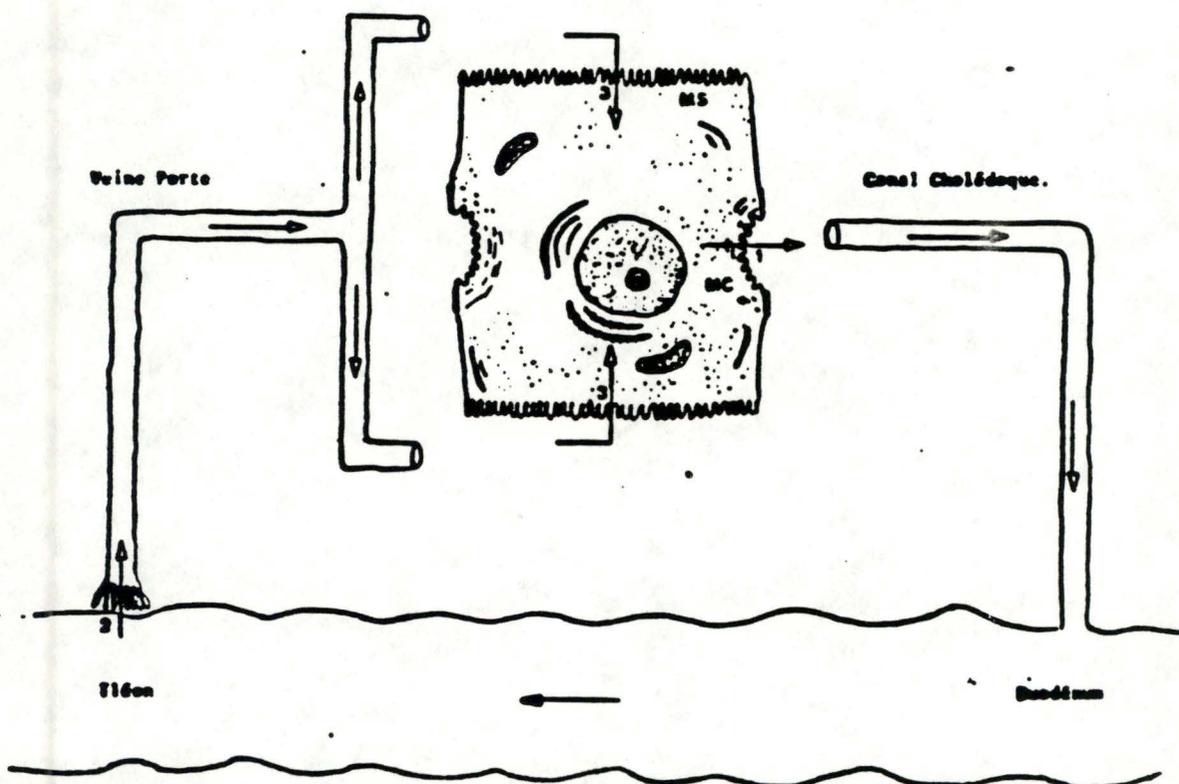


Figure n°3 : Sels biliaires primaires, secondaires et tertiaires. Transformations par des chaînes enzymatiques et des bactéries. (Erlinger, 1982)



MS Membrane sinusoidale
MC Membrane canaliculaire

Figure n°4 : Les trois transports des acides biliaires au cours du cycle entérohépatique: 1° Sécrétion dans la bile.
2° Réabsorption iléale.
3° Captation sinusoidale

(Coche, 1982)

6 FONCTIONS DE TRANSPORT DES ACIDES BILIAIRES

6.1. LE CYCLE ENTEROHEPATIQUE

6.1.1. Synthèse

Les acides biliaires sont des molécules dérivées du cholestérol, à partir du catabolisme hépatique (Fig 3). La synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol est catalysée par des chaînes enzymatiques, donnant les acides choliques et chénodéoxycholiques (Erlinger, 1982). Ensuite ces acides biliaires primaires sont transformés par l'action de bactéries intestinales en acides secondaires (par exemple : l'acide déoxycholique). Les acides tertiaires sont dérivés des acides secondaires par l'action de bactéries intestinales (par exemple : l'acide sulfolithocholique). Les réactions intervenant dans cette synthèse d'acides biliaires sont les sulfatations hépatiques et les réductions hépatiques et bactériennes.

6.1.2. Rôle physiologique des acides biliaires

Ils exercent une action détergente sur les lipides alimentaires dans l'intestin. Ils contribuent à la stabilisation du pH acide du chyme stomacal et à l'action de digestion et d'absorption intestinale des graisses (en solubilisant le cholestérol et formant des micelles, par leur structure amphiphile). Une des fonctions du cycle entérohépatique, est de détruire l'excès de cholestérol corporel.

6.1.3. Formation de la bile

Dans son rôle de glande exocrine, le foie sécrète de la bile (Carey, 1982). La bile contient, outre le cholestérol, des sels de sodium et de potassium, des

phospholipides (lécithine), des acides choliques hydroxylés, des protéines et 97% d'eau. La formation de la bile est un processus complexe, qui comprend l'absorption des graisses dans les cellules du foie, la séquestration intracellulaire, la biotransformation et le transport dans la bile. Avant leur sécrétion dans la bile, les acides biliaires sont conjugués à la taurine ou à la glycine. Chez le rat, la conjugaison de l'acide cholique et de la taurine forme l'acide le plus abondant: le taurocholate. Chez l'homme, l'acide le plus abondant est le glycocholate (acide cholique +glycine). Les acides biliaires sont excrétés dans le canal biliaire, ils passent dans le canal interlobulaire, et ensuite ils arrivent dans le duodénum par le canal cholédoque. Après avoir été réabsorbés activement au niveau de l'iléon, les acides biliaires regagnent le foie par la veine porte, et ils sont captés au niveau du pôle sinusoidal de l'hépatocyte (Fig 4). Le recyclage des acides biliaires permet de récupérer environ 90% de ceux-ci, les 10% restants sont perdus, par la dégradation bactérienne et l'élimination fécale.

6.2. TRANSPORT DU TAUROCHOLATE

Les acides biliaires sont fortement chargés au niveau de leurs groupements acides sulfoniques (Erlinger, 1982)(Fig 5), ce qui laisse supposer l'intervention de transporteurs spécifique dans la membrane cellulaire (Fig 6).

6.2.1. Captation

La captation du taurocholate est un processus dépendant de l'énergie métabolique, saturable et Na^+ -dépendant (Inoue, 1984) (Klaassen, 1984). Ce mécanisme transport porte le nom de: "symport" Na^+ / acide biliaire (Erlinger , 1982). La captation du taurocholate est fonction du potentiel de membrane, surtout pour les acides biliaires conjugués. Quand le potentiel de membrane est rendu plus négatif par remplacement d'un anion (Cl^- ou

Introduction

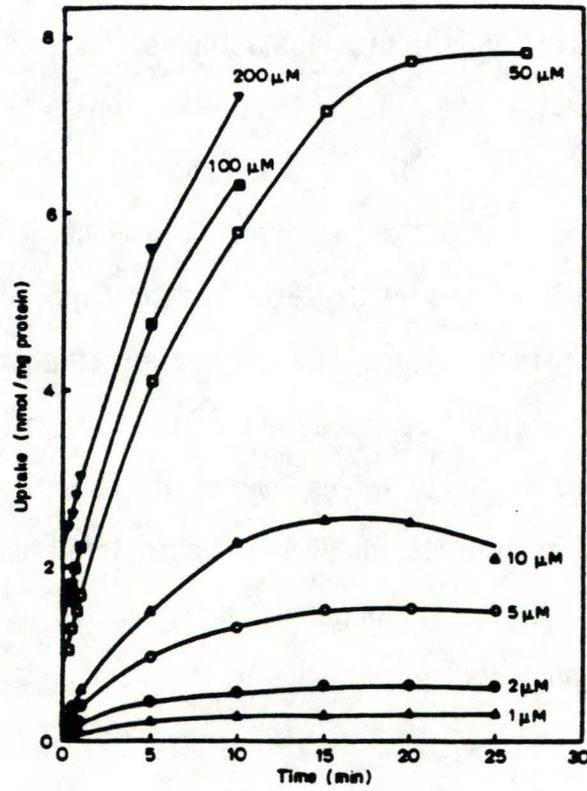


Figure n°7 : Absorption des acides taurocholiques, à des concentrations variables, par les hépatocytes isolés. (Schwarz, 1975)

HCO_3^-), la captation du taurocholate Na^+ -dépendant est stimulée (Erlinger, 1982). De plus, la captation est effectuée contre un gradient chimique (Fig7) (Schwarz, 1975). Cette captation est inhibée par l'ouabaïne. L'étude de la fonction de transport des acides biliaires est généralement effectuée au niveau cellulaire, en suivant la cinétique de transport du taurocholate radioactif par des cellules isolées. La captation du taurocholate radioactif peut se décomposer en trois parties:

- 1° Une captation à vitesse constante en absence d'excrétion simultanée. Il en résulte d'une augmentation linéaire de la quantité intracellulaire en sels biliaires. Cette portion initiale de la cinétique est courte (< 1 minute).
- 2° La vitesse de captation décroît, car la concentration en taurocholate dans le milieu diminue. La vitesse d'excrétion augmente car la concentration intracellulaire augmente.
- 3° La cinétique atteint un équilibre dynamique: le système est à l'état stationnaire, lorsque la vitesse de captation est égale à la vitesse d'excrétion.

6.2.2. Excrétion

L'excrétion (Schwarz, 1976) serait un processus saturable dont l'énergie d'activation est faible. Elle implique probablement la participation de transporteurs spécifiques. Les caractéristiques du phénomène d'excrétion seraient compatibles avec un mécanisme par diffusion facilitée, grâce à un transporteur de la membrane canaliculaire (Erlinger, 1982)(Coche, 1987). En fait, on ne sait pas si ce système est purement passif ou s'il utilise une source supplémentaire d'énergie (Erlinger, 1982).

6.2.3. Transport intracellulaire

Les acides biliaires étant captés par l'hépatocyte, transportés à l'intérieur

de la cellule vers le canalicule biliaire puis sécrétés dans la bile, leur transport est nécessairement transcellulaire. Il semble que cette migration cellulaire soit réalisée par des protéines spécifiques (Erlinger, 1982).

La fonction de transport du taurocholate par les hépatocytes isolés à l'état stationnaire a été modélisée au laboratoire (3.2.3.2) (Coche, 1988)

3.2.3.1. Marquage radioactif

Pour visualiser toute cinétique de transport ou d'incorporation d'une substance, il est nécessaire d'employer la technique du marquage radioactif

L'application de radioisotopes comme traceurs est une technique analytique largement répandue en biologie. Le traceur doit réagir de la même façon aux phénomènes métaboliques que la substance mère dans la suspension hépatocytaire. Le système ne doit pas incorporer différemment une molécule marquée et une molécule non-marquée. Au départ, on considère un état stationnaire (Coche, 1988): la concentration extracellulaire est en équilibre avec la concentration intracellulaire. Le traceur doit être ajouté en petite quantité pour ne pas perturber cet état stationnaire du système. Si on ajoute une faible quantité de traceur, il n'est pas en équilibre et on peut suivre sa variation au cours du temps. Le tritium ^3H est l'isotope le plus souvent utilisé. La mesure de la radioactivité β est détectée par scintillation liquide. Le comptage radioactif est décrit par la suite dans "Matériel et Méthodes".

6.2.3.2. Analyse compartimentale

L'analyse compartimentale est un modèle mathématique qui a été développé au laboratoire, pour décrire la cinétique du transport du taurocholate ^3H , à l'état stationnaire par les hépatocytes isolés en

Introduction

suspension.

Les cellules sont pré-incubées avec du taurocholate non marqué. Au terme de cette pré-incubation, la concentration extracellulaire en taurocholate est en équilibre avec la concentration intracellulaire. L'état est considéré stationnaire. Une faible quantité de taurocholate radioactif est ajoutée. On considère que le taurocholate marqué est un traceur parfait, c'est-à-dire qu'il se mélange de manière instantanée dans le milieu extracellulaire et que les cellules ne distinguent pas le taurocholate radioactif du non radioactif. Le traceur étant introduit dans le milieu, il n'est pas à l'état stationnaire. Son activité spécifique étant élevée, la quantité nécessaire à sa détection ne perturbe pas l'état stationnaire.

La cinétique d'échange du taurocholate marqué entre le milieu et les cellules est suivie au cours du temps. Cette cinétique est analysée par un modèle compartimental linéaire qui est décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

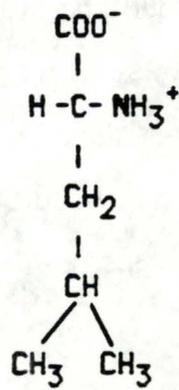


Figure n°8 : Leucine PM: 131.7

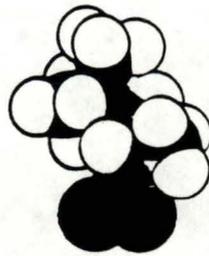


Figure n°9 : Représentation dans l'espace de la leucine
Modele d'acide aminé aliphatique.
(Stryer, 1988)

7 FONCTION DE TRANSPORT DES ACIDES AMINES

7.1. SYSTEME DE TRANSPORT DES ACIDES AMINES

Il existe différents systèmes de transport pour les acides aminés (Handlogten, 1982):

1. Transport Na^+ -dépendant: Système Gly (glycine), ASC (alanine, sérine, cystéine).
2. Transport Na^+ -indépendant: Système L (leucine, valine), BCH (2 aminobicyclo(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid) ou pour des acides aminés neutres.
3. Transport des acides aminés aromatiques: Système T (thyrosine, tryptophane).

7.2. TRANSPORT DE LA LEUCINE

C'est un acide aminé très hydrophobe, trouvé essentiellement à l'intérieur des chaînes globulaires. La leucine a une chaîne latérale (R) non polaire et une chaîne aliphatique (Lehninger, 1986) (Fig 8 et 9). Les protéines du foie contiennent 12% en poids de leucine (Schreiber, 1971).

Le transport de la leucine (système Na^+ -indépendant), est caractérisé par deux composantes d'affinités différentes (Weissbach 1982).

-a) Système L1 dont la constante d'affinité (K_m) est de l'ordre du $\mu\text{Molaire}$ ($44\mu\text{M}$).

-b) Système L2 dont l'affinité (K_m) est de l'ordre du mMolaire (8mM).

Le système L1 est inhibé partiellement par la cystéine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, l'histidine, le tryptophane, la thyrosine, la phénylalanine et le BCH. Ce transport est aussi bloqué par la cycloheximide et l'actinomycine-D.

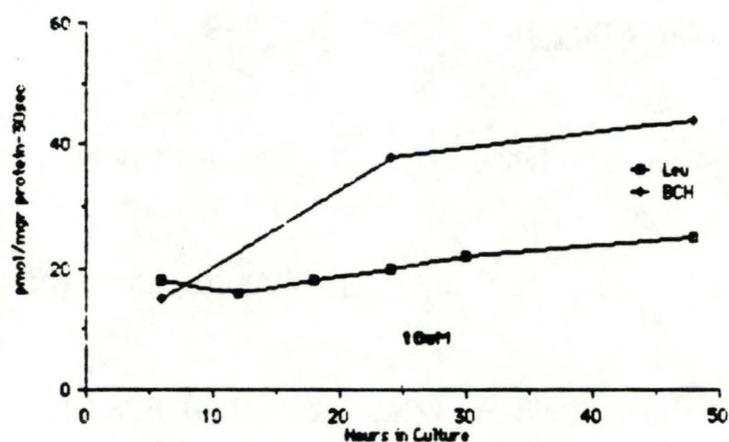


Figure n°10 : A une concentration faible de 10uM, l'absorption de ces deux acides aminés, augmente durant 48 heures. (Handlogten,1982)

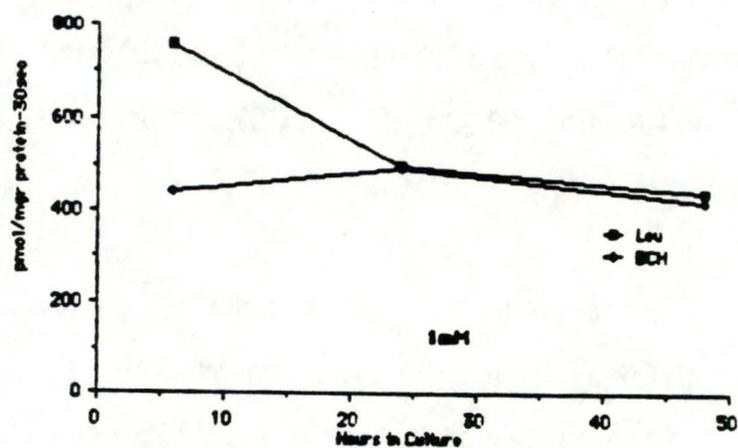


Figure n°11 : A une concentration élevée de 1mM, l'absorption de leucine diminue. Cependant, le transport de 1mM de BCH rest relativement inchangé. (Handlogten,1982)

Le second système L2 est inhibé complètement par l'isoleucine, la leucine, la phénylalanine et le BCH. Le système L1 apparaît au niveau foetal (dont l'activité est plus grande que chez la mère). La différence est due à une série de modifications qui ont lieu durant la maturation des cellules. Le système L1 n'est pas encore élucidé en ce qui concerne les facteurs de régulation. L'adulte possède les deux systèmes.

Le transport de la leucine présente en outre d'autres caractéristiques: il est dépendant d'un gradient de potentiel électrochimique, car Morhi (1983) a constaté, par des expériences sur les cellules de foie de singes Chang, que le potentiel électrochimique du proton peut servir de force motrice pour le transport de la leucine à travers la membrane cellulaire.

La mise en évidence des différentes composantes du système L et des caractéristiques de ce transport a été réalisée par trois approches:

-Une première approche est l'analyse cinétique de ce transport dans les hépatocytes isolés de rat (Handlogten, 1982).

$$\frac{V_{max} * S}{K_m + S} + K_{ds}$$

La composante : $V_{max} / K_m + S$ correspond à un transport saturable

K_{ds} correspond à un transport non-saturable

Pour une concentration de 10 μ M (Fig 10), l'absorption de leucine croît pendant 48 heures, mais pour une concentration de 1mM (Fig11) de leucine, la vitesse d'absorption diminue. Ces résultats suggèrent l'hétérogénéité du transport Na⁺-indépendant.

-Une seconde approche est l'étude par Takadera (1983) de l'effet des réactifs SH, comme le N-éthylmaléimide, sur le transport actif de la leucine (Fig12). Celui-ci stimule l'absorption de la leucine par le système Na⁺-indépendant, en augmentant la valeur de son V max. Cependant, l'effet du N-éthylmaléimide est dépendant de la concentration de leucine, et variable à une concentration élevée. L'effet stimulateur du N-éthylmaléimide sur le transport de la leucine peut être réduit par un traitement comprenant du 2-4 dinitrophénol, cependant le 2-4

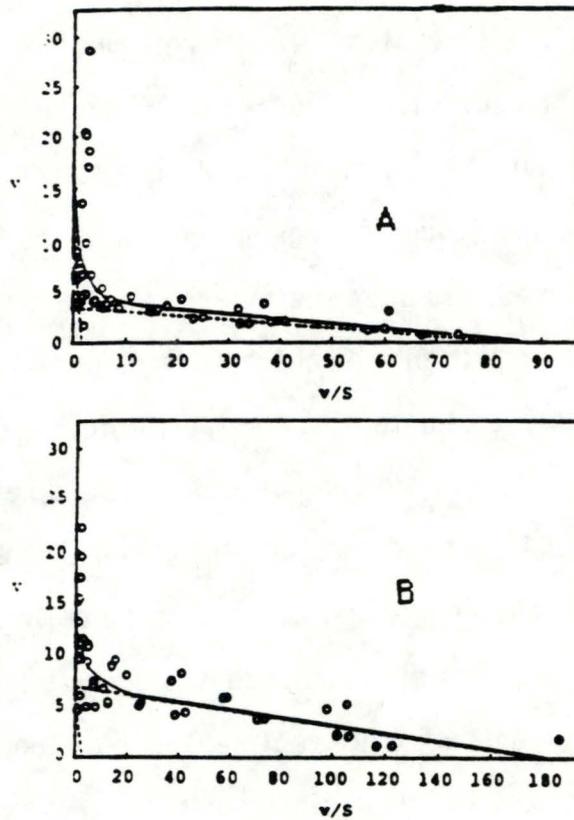


Figure n°12 : Effet de N-éthylmaléimide sur la cinétique du transport de la leucine.

Concentration de leucine marquée (0.01-10mM)

A : Absence de N-éthylmaléimide

B : Présence de N-éthylmaléimide

(Takadera, 1983)

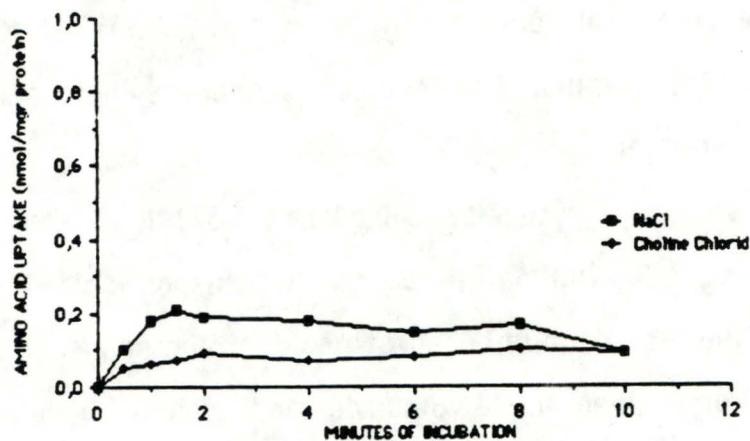


Figure n°13 : Absorption de L-(U¹⁴C)Leucine (0.17mM) mesurée en présence de 50mM de NaCl ou de Choline Chloride dans le milieu. (Mohri, 1983)

dinitrophénol n'agit pas sur l'inhibition même du système de captage (Na^+ indépendant) ni au niveau énergétique de la cellule. En fait l'effet dépresseur du N-éthylmaléimide sur le captage de la leucine serait dû à un effet sur la structure lipidique, et par modification de la fluidité des membranes.

-Une troisième approche est proposée par Morhi (1983), par des expériences sur les cellules de foie de singes Chang. Il a observé que le transport de la glycine ne se déroule qu'en présence de Na^+ , tandis que pour la leucine, une faible stimulation du transport est constatée en présence de Na^+ (Fig13).

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

8 FONCTION DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE

En fonction du contexte expérimental de la recherche menée par l'ESA et la NASA, nous nous sommes intéressés à l'incorporation de la leucine radioactive dans les protéines, comme paramètre métabolique essentiel. Le modèle des hépatocytes isolés en suspension a l'avantage de fournir un système simple pour l'incorporation d'acides aminés dans les protéines, car il réduit l'espace extracellulaire à un compartiment unique et contrôlable.

8.1. HEPATOCYTES ISOLES ET SYNTHÈSE PROTÉIQUE

Dans un contexte plus général, le processus de synthèse protéique a une très grande importance pour la maintenance et le fonctionnement des cellules et des tissus (Van Bezooijen, 1978). Une des fonctions spécialisées du foie est la synthèse et la sécrétion de protéines plasmatiques. Les protéines intracellulaires sont synthétisées et dégradées à des taux spécifiques, et les protéines le plus rapidement synthétisées doivent être aussi le plus rapidement dégradées. Le fibrinogène est une protéine stable. Elle joue un rôle important dans le système de coagulation sanguine (Crane, 1977). La synthèse d'albumine est réalisée exclusivement par le foie (Chen, 1973). La synthèse d'albumine dans les hépatocytes en suspension est semblable à celle du foie de rat intact in vivo (Weigand, 1978).

8.2. INCORPORATION DE LA LEUCINE DANS LES PROTÉINES DES HEPATOCYTES ISOLES.

L'incorporation de la leucine radioactive dans les protéines a été étudiées :
 -Le taux d'incorporation de leucine totale dans les protéines semble être

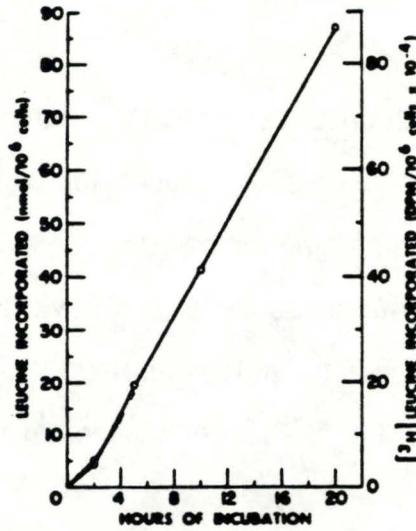


Figure n°14 : Incorporation de leucine totale dans les protéines précipitées au TCA. (³H) leucine: 1uCi/ml (Crane,1977)

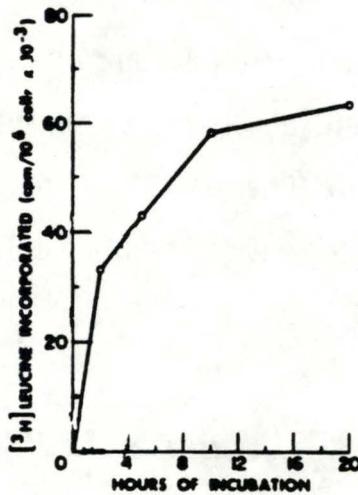


Figure n°15 : Incorporation de (³H) leucine dans les protéines intracellulaires (³H) leucine: 1uCi/ml Isolement des protéines par traitement au TCA. (Crane,1977)

presque constant pendant 24 heures (Fig14) (Crane,1977). Cette vitesse d'incorporation presque constante durant 24 heures indique que la leucine incorporée dans les protéines est en équilibre avec la leucine du milieu. Dans les protéines intracellulaires, elle est maximale pendant la première heure, et diminue ensuite durant les 24 heures restantes de l'incubation (Fig15)(Crane,1977). Ceci laisse supposer l'intervention de différents processus.

De même que Van Bezooijen (1978) a constaté une incorporation linéaire de leucine dans les protéines totales, pour une incubation d'hépatocytes isolés de 4 heures (Fig16).

8.3. METABOLISME DES ACIDES AMINES CHEZ LES HEPATOCYTES ISOLÉS

Les cellules du foie épuisent le milieu d'une large fraction d'acides aminés, initialement disponibles pendant 24 heures d'incubation. La leucine, l'isoleucine et la valine font exception à ce schéma général, et leurs concentrations augmentent dans le milieu, tout au long de l'incubation (Fig17) (Crane,1977).

Ce comportement indique que les protéines sont dégradées plus vite qu'elles ne sont synthétisées.

Cependant, l'existence d'une dégradation considérable des protéines en acides aminés par les cellules du foie, au cours d'une incubation de 20 heures, masquerait le catabolisme lent de la leucine (Crane,1977).

8.4. SECRETION DES PROTEINES

Les hépatocytes maintenus dans un milieu essentiel minimum, réduisent la concentration de tous les acides aminés dans le milieu sauf ceux qui sont lentement catabolisés comme la leucine, la valine et l'isoleucine dont la concentration augmente constamment, suite au taux de renouvellement des protéines. Ce processus serait le reflet d'une excrétion protéique

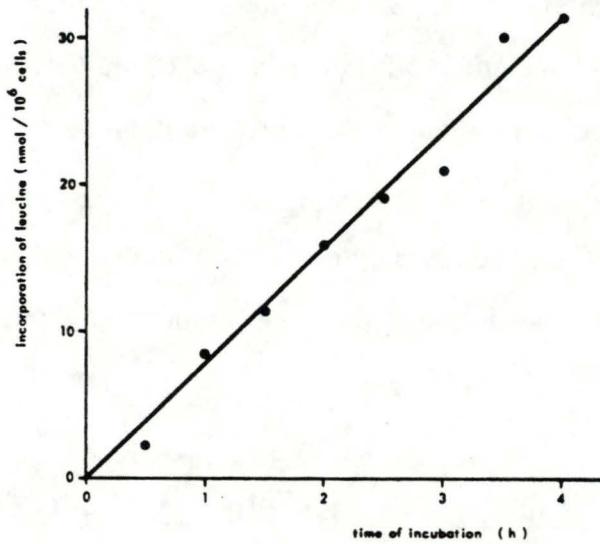


Figure n°16 : Incorporation de leucine dans les protéines chez les hépatocytes isolés. La suspension cellulaire est incubée avec 8µmoles de leucine/ml de milieu. (Van Bezooijen, 1978)

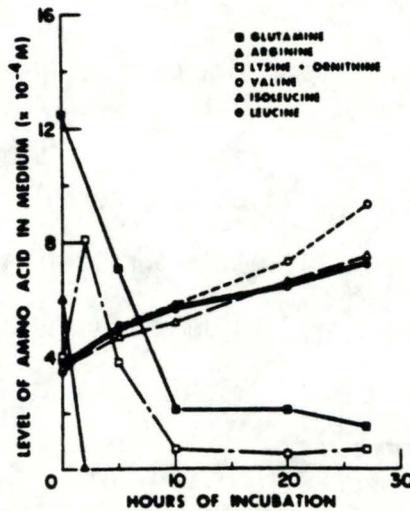


FIGURE 4 Utilization of amino acids by the hepatocyte suspension. (O—O) valine; (●—●) leucine; (Δ—Δ) isoleucine; (■—■) glutamine; (□---□) lysine + ornithine; (▲—▲) arginine.

Figure n°17 : Utilisation des acides aminés par une suspension hépatocytaire. (Crane, 1977)

simultanée à la synthèse (Crane, 1977).

Bien que les cellules du foie catabolisent 10 à 15% de leurs propres protéines pendant une incubation de 20 heures, les cellules continuent à sécréter les protéines de manière linéaire tout au long de cette période. Pour déterminer la protéolyse intracellulaire qui a lieu sans interruption du processus de sécrétion protéique, il est nécessaire de soustraire la quantité de leucine dans le milieu de départ de la somme de la leucine à la fin de l'incubation, de la leucine catabolisée et de la leucine incorporée dans les protéines. Cela nous donne la quantité de leucine libérée par les cellules, donc la protéolyse cellulaire (Crane, 1977).

En conclusion : la balance protéique chez les hépatocytes apparaît fortement négative (Schwarze, 1980).

8.5. EFFETS DE DIFFERENTES SUBSTANCES

L'effet de différentes substances sur l'incorporation de la leucine ont été étudiées : -L' *insuline* augmente la synthèse d'albumine et la synthèse protéique en général mais elle possède un faible effet au niveau de la synthèse de fibrinogène (Gordon, 1973).

-Le *cortisol* ne stimule ni la synthèse protéique intracellulaire, ni la sécrétion d'albumine. Par contre, la combinaison de *cortisol* et d'*épinéphrine* diminue fortement la synthèse d'albumine, donc le *cortisol* combiné à l'*épinéphrine* produit un effet (Crane, 1977).

-L' *actinomycine D* inhibe la synthèse protéique (Schreiber, 1973).

-Le *glucagon* inhibe la sécrétion d'albumine et l'incorporation de la leucine radioactive dans l'albumine et dans les protéines totales de la suspension cellulaire (Dich, 1976).

-La *puromycine* inhibe l'incorporation de 10%, 50%, 90%, pour des concentrations respectives en puromycine de 0.7uM, 2.57uM, 22.0uM (Schreiber, 1973).

-La *cycloheximide* est un antibiotique qui inhibe la synthèse

protéique au niveau des ribosomes 80S des eucaryotes. La *cycloheximide* diminue l'incorporation de la leucine avec une inhibition de 95 à 98% pour une concentration de 1mM (Seglen, 1976). Mais Schreiber (1973) prétend qu'il n'existe pas d'inhibition de l'incorporation de la leucine dans les protéines pour une concentration de 0.6mM.

-L' *éthanol* inhibe l'incorporation de leucine radioactive dans les protéines (Rosa, 1985), si les cellules sont incubées avec de l' *éthanol* pendant 1 heure, 5 heures ou encore 21 heures.

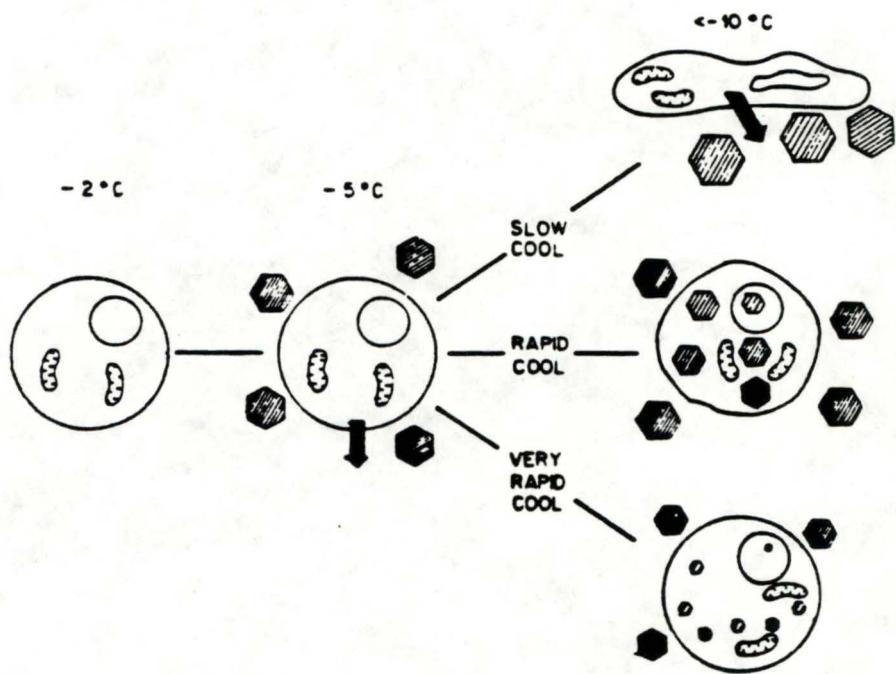


Figure n°18 : Schématisation des évènements physiques ayant lieu au cours du refroidissement. (Mazur, 1984)

9 CRYOPRESERVATION DES HEPATOCYTES ISOLÉS

Le stockage des cellules à 0°C se fait régulièrement avant leur utilisation à 37°C pour d'autres expériences, mais ce stockage n'est possible que pour 3 heures maximum (suivant les critères de viabilité) (Derême,1987 et Decat,1987).

Lors d'une mission spacelab, il n'est matériellement pas possible d'isoler les hépatocytes en orbite (utilisation du biorack), ceux-ci sont isolés avant le départ et conservés jusqu'à l'emploi. Cette conservation est de l'ordre de quelques jours d'où la nécessité de trouver un système de stockage des hépatocytes isolés à plus long terme en diminuant la température.

9.1. CONSERVATION A BASSES TEMPERATURES : GENERALITES

La cryopréservation présente quelques problèmes:

- 1) Comment les cellules peuvent survivre à un refroidissement à basse température et subir un retour ou réchauffement aux conditions physiologiques.
- 2) Un refroidissement trop rapide ou trop lent peut causer des dommages cellulaires (Mazur,1963):
 - Une vitesse de refroidissement trop lente provoque un accroissement de solutés qui deviennent toxiques pour la cellule (Locksley,1978).
 - Un refroidissement trop rapide entraîne la formation de cristaux intracellulaires (Fig18) (Mazur,1984).

Pour résoudre ces problèmes quelques solutions sont proposées:

- 1) Il faut une vitesse suffisamment lente pour éviter la formation de cristaux intracellulaires et suffisamment rapide pour éviter les effets

d'un accroissement en solutés qui deviennent toxiques dans la cellule (Farant, 1965).

2) L'addition d'agents cryoprotecteurs (Locksley, 1978): ils agissent sur la limitation de la formation de ces cristaux intracellulaires et sur une réduction de concentration en électrolytes dans la cellule altérant celle-ci. Généralement, lors de congélation hépatocytaire, le DMSO (diméthylsulfoxyde) est employé comme agent cryoprotecteur (Taylor, 1978, 1982), (Decat, 1987). Bien que les hépatocytes supportent des concentrations en DMSO élevées, ces concentrations deviennent toxiques pour les cellules, quand elles sont trop élevées (concentration en DMSO de 2 et 13%) (Dubisy, 1985), (Decat, 1987).

9.2. LE STOCKAGE EN MILIEU LIQUIDE

Selon les contraintes temporelles imposées par la mission spacelab, les hépatocytes ne doivent pas être conservés pendant des semaines, mais pendant quelques jours.

Le stockage à long terme peut être réalisé pour la conservation des embryons, à -196°C , en milieu solide (Mc Gann, 1976). L'hépatocyte est un type cellulaire plus spécialisé, dès lors il est plus difficile de le conserver à de basses températures (Feytmans, 1987). Les recherches se sont donc orientées vers une congélation liquide à -13°C , avec addition d'agents cryoprotecteurs (Decat, 1987).

Ce stockage en phase liquide consiste à ajouter, avant l'abaissement de température, du DMSO dans le milieu pour éviter l'augmentation de concentration en solutés dans le milieu et éviter l'endommagement des cellules par la formation de cristaux. L'abaissement de température s'effectue de manière graduelle (Novicki, 1982) de même que l'ajout de solution contenant du DMSO plus concentré. Il en résulte un échange d'eau tissulaire avec le DMSO. Ainsi la formation de cristaux de glace et l'endommagement dû à ceux-ci n'ont pas lieu durant le refroidissement.

Après une revue sommaire du cadre général dans lequel s'inscrit ce travail, les pages suivantes présentent les objectifs principaux de cette recherche et la démarche effectuée pour les atteindre.

10 OBJECTIFS

Ce travail s'insère dans le cadre de recherches qui visent à étudier les modifications éventuelles des différentes voies métaboliques de l'hépatocyte dans un environnement spatial.

1° L'objectif global de cette étude est de mettre au point un protocole d'étude de synthèse des protéines en suivant l'incorporation de la leucine radioactive dans les protéines, chez les hépatocytes isolés en suspension.

De façon plus particulière, il faudra:

- Détecter une incorporation de leucine chez les hépatocytes fraîchement isolés.
- Justifier par différents arguments expérimentaux, que la relation incorporation de leucine, telle qu'elle est énoncée, est bien une mesure du taux de synthèse protéique.
- Utiliser comme référence, les différents critères de viabilité (érythrocyte, LDH, et la fonction du transport du taurocholate radioactif à l'état stationnaire).
- Etudier la cinétique de captation de la leucine par les cellules, et l'influence qu'elle pourrait avoir sur le taux d'incorporation de leucine dans les protéines.

2° Le second objectif principal est d'appliquer ce protocole d'incorporation de leucine dans les protéines, à des hépatocytes ayant subi une congélation.

Si le taux de synthèse est modifié:

- Il permettra de calculer le rendement de synthèse des hépatocytes congelés.

- Il sera comparé aux mesures de viabilité, selon les différents critères (érythrosine, LDH, Taurocholate).

MATERIEL & METHODES

1 ANIMAUX

Les animaux employés sont des rats femelles de race Sprague Dawley, dont le poids varie entre 250 gr et 350 gr. Ils reçoivent ad libitum une nourriture standard et sont maintenus en régime d'illumination diurne. Ils sont mis à jeun 24 heures avant les expériences sauf pour l'expérience d'incorporation de leucine dans les protéines, qui ne nécessite pas particulièrement les rat à jeun.

2 ISOLEMENT DES HEPATOCYTES

2.1. REACTIFS

- Collagénase: -Gibco. Laboratories, Life technologies INC. Grand Island, New York, USA
- Collagénase: -Sigma Chemical Company. St Louis, USA.
- Cycloheximide, Janssen Chimica, Beerse Belgium.
- Folin réactif. E. Merck, Darmstadt, RFA.
- L-LDH, L lactate: NAD⁺ Oxydoréductase. Sigma Chemical Company, St Louis, USA.
- Liquide Scintillant Ready-solv EP de Beckman Irvine California, USA.
- L-Leucine radioactive (3,4,5-³H (N)), 140.5 Ci/mMole 5.0ml de 0.01 HCl, NEN Research Products, Boston, USA.
- L-Leucine, Janssen Chimica. Beerse, Belgium.
- Milieu nutritif de Leibovitz L-15, Flow Laboratories. UK.
- Milieu nutritif MEM (Eagle)sans L-Leucine avec de la L-Glutamine. Gibco, Schotland.
- Nembutal, Pentobarbital Sodique. Sanofi, Paris, France.
- Ouabaïne Octahydrate, Janssen Chimica, Beerse, Belgium.
- Protosol. New England Nuclear, Boston, USA.
- Serum Albumine Bovine. Sigma Chemical Company, St Louis, USA.

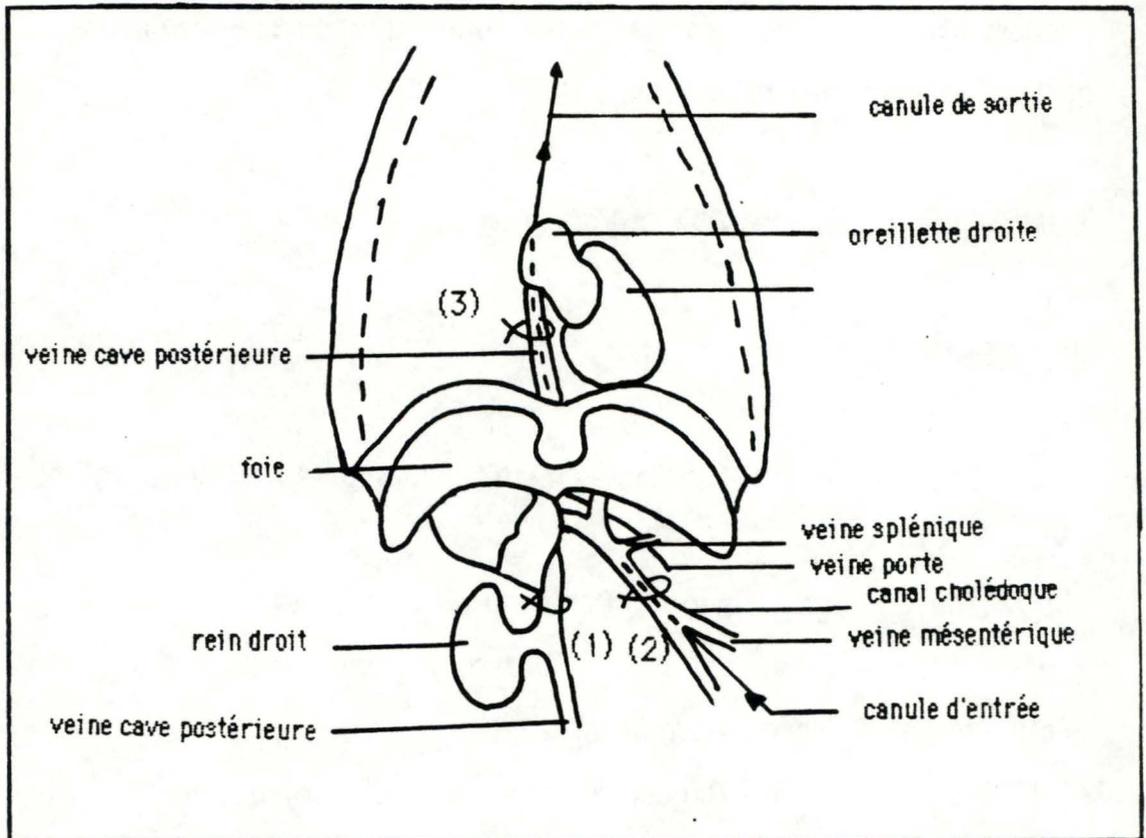


Figure n° 19 : Schéma général des différentes ligatures à effectuer et de la position des canules.

- Soluène-100 (0.5N Quaternary Ammodium Hydroxyde in Toluène), United Technologies Packard. Packard Instrument Company INC. Warrenville RD.
- Taurocholic Acid, (^3H) -99.96Bq/mmol (2.7Ci/mmol), 0.25ml de Méthanol:Ethanol, 1:3, NEN Research Products, Boston USA.
- Triton X100 E. Merck, Darmstadt, RFA.

2.2. SEQUENCE OPERATOIRE

Selon la méthode de Berry et Friend (1969), modifiée par Zahlten et Stratman (1974) et adaptée dans notre laboratoire par Thierry Coche (1982).

Le rat est anesthésié par une injection intrapéritonéale de Nembutal, 0.1ml pour 100mgr de poids de rat. Une première ligature lâche (1) est placée autour de la portion abdominale de la veine cave et une seconde ligature lâche (2) autour de la veine porte (Fig19). Un premier cathéter (16G, 21N; 1.7mm et 5.1cm. Angiocath. Deseret, Medical, Inc. Utah, USA.) venant du circuit de perfusion* est introduit dans la veine porte. La seconde ligature est serrée pour maintenir le cathéter placé.

Pour maintenir la pression constante, le trop plein de liquide de perfusion est ramené dans le cylindre. Le liquide de perfusion traverse un circuit de réchauffement (bain thermostatisé à 37°C) de sorte que ce liquide arrive à une température physiologique (Fig20). Ensuite ce liquide atteint le cathéter enfoncé dans la veine porte de l'animal, puis est récolté, à la sortie du foie, par un second cathéter qui est relié au cylindre gradué de départ.

On incise la veine cave postérieure en aval de la première ligature pour permettre l'écoulement de la solution Krebs-Ringer sans Ca^{++} . Ensuite la ligature est resserrée pour fermer le circuit.

*Le liquide de perfusion se trouve dans un cylindre gradué de 250ml. Il est aspiré par une pompe péristaltique (H.R.Flow Inducer, Watson Marlow limited, England), ensuite envoyé dans la colonne de vigreux, ce qui permettra une saturation en carbogène (95% O_2 et 5% CO_2), une

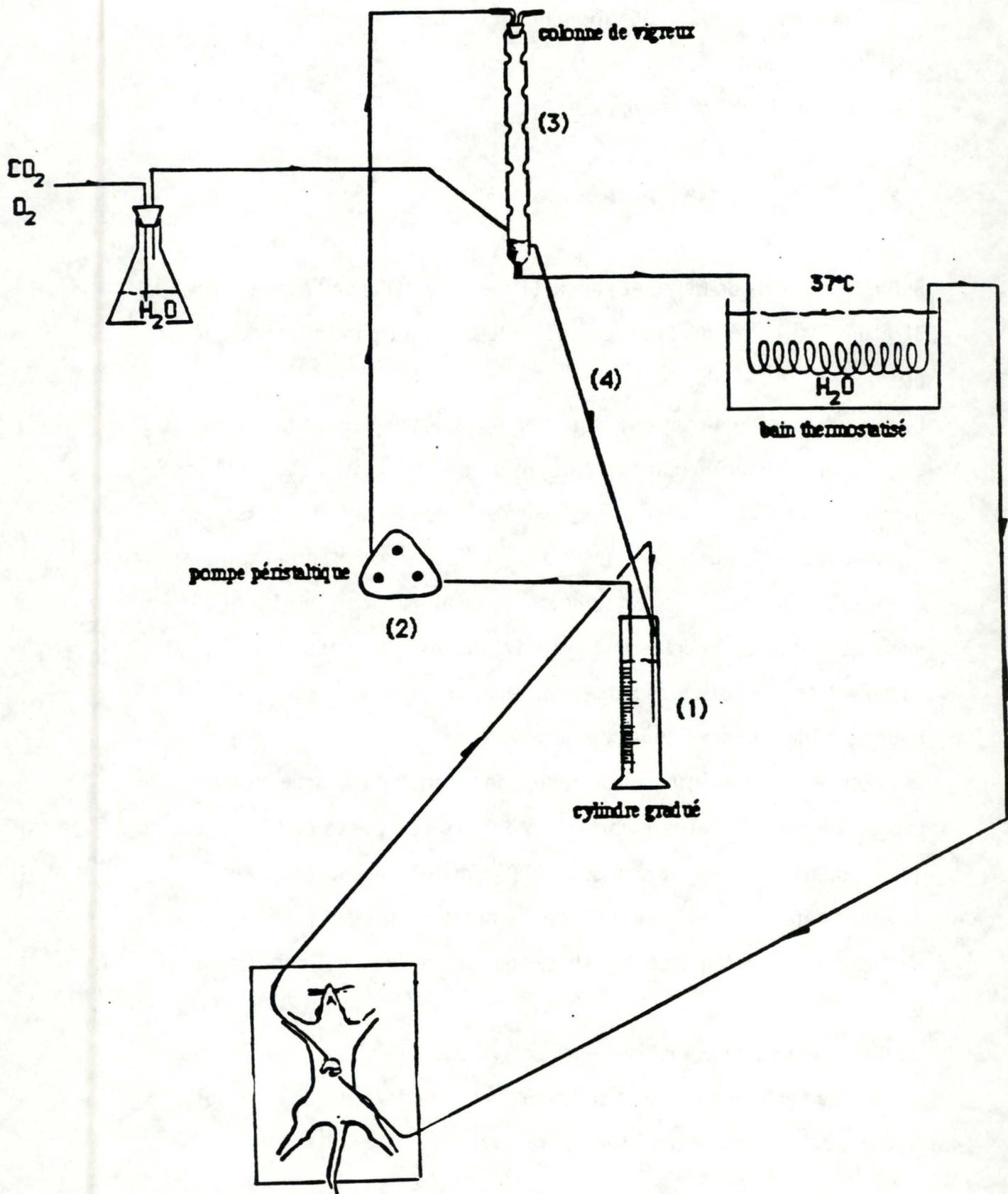


Figure n°20 : Schéma général de l'appareillage pour l'isolement des hépatocytes

humidification, une stabilisation de PH à 7.4, et l'apport d'O₂ pour les cellules.

1. Solution de pré-perfusion sans Ca⁺⁺

| | mM |
|--------------------------------------|-------|
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1.18 |
| KH ₂ PO ₄ | 1.18 |
| KCl | 4.75 |
| NaCl | 118 |
| NaHCO ₃ | 25 |
| Glucose | 11.10 |

Cette première solution sans calcium lave le foie de son sang et enlève les Ca⁺⁺ des desmosomes.

Une troisième ligature est placée autour de la veine cave au niveau thoracique. Un second cathéter est introduit sous l'oreillette droite jusque dans la portion thoracique de la veine cave. On serre successivement la troisième et la première ligature de manière à fermer le circuit, et on place le tuyau, venant de la veine cave thoracique, au cylindre gradué. On remonte la table d'opération pour éviter une surpression, celle-ci peut survenir quand la pression de perfusion se situe au delà de 10 à 15 cm H₂O, qui est plus ou moins la pression portale in vivo. Durant cette manipulation, la solution de préperfusion KRB sans CA⁺⁺, s'est écoulée, et dès que le cylindre est vide, on ajoute 90ml de la seconde solution ou solution de perfusion KRB avec Ca⁺⁺, plus 50 mgr de collagénase.

2. Solution de perfusion avec Ca⁺⁺.

Les cinq premières concentrations de la solution précédente restent identiques.

| | mM |
|-------------------|------|
| Glucose | 5.55 |
| CaCl ₂ | 1.23 |

Ce liquide circule dans le circuit 10 minutes (si emploi de la collagénase Sigma) et 20 minutes (si emploi de la collagénase Gibco), ce qui va nous permettre de recueillir les hépatocytes.

Au préalable, cette collagénase est dissoute dans la troisième solution ou solution de lavage KRB avec Ca^{++} , maintenue à 37°C. Car il a été démontré que l'action de la collagénase est accrue en présence d'ions Ca^{++} .

3. Solution de lavage avec Ca^{++} .

Les cinq premières concentrations de la solution précédente restent identiques.

| | mm |
|-----------------|------|
| Glucose | 5.55 |
| CaCl_2 | 2.50 |

Après 10 minutes de perfusion, le foie se ramollit et la capsule de Glisson devient perméable au liquide de perfusion. Le foie est ensuite excisé et il est déposé dans une boîte de Pétri contenant 10 à 15 ml de la troisième solution KRB (lavage). La capsule de Glisson est enlevée et les hépatocytes sont libérés dans la solution. On obtient alors une suspension hépatocytaire brute. Cette suspension est filtrée une première fois au travers de quatre épaisseurs de gaze (commercialisée en pharmacie). Le filtrat est recueilli dans deux tubes, ces derniers sont mis à niveau par ajout de la solution de lavage, et sont centrifugés à 25g, pendant une minute (centrifugeuse 4225 ALC). Le surnageant contenant les cellules mortes et les impuretés est retiré et le culot contenant normalement les hépatocytes vivants est resuspendu dans la solution de lavage. On répète le lavage une seconde fois. Les deux culots sont réunis et ajustés à une concentration voulue, suivant les exigences des expériences ultérieures. Les cellules sont conservées à 0°C dans la glace fondante (pendant trois heures maximum), jusqu'au moment de leur utilisation.

3 TESTS DE VIABILITE

3.1. TESTS A L'ERYTHROSINE

10µl d'érythrosine (3.6mgr/ml de NaCl 0.9%) sont ajoutés à 50 µl de suspension cellulaire. Après resuspension, les cellules sont comptées dans une cellule de Neubauer (Improved Neubauer. Hausser Scientific, USA). Cette cellule est divisée en 9 surfaces carrées, dont un de ces carrés est composé de 25 petits carrés. Les hépatocytes contenus dans 5 de ces carrés sont comptés. La moyenne calculée est exprimée en nombre de cellules / ml (densité cellulaire).

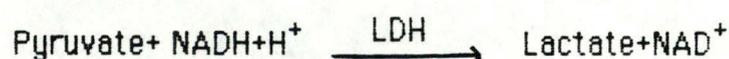
La viabilité est obtenue en calculant le rapport (en %)

$$\frac{\text{nombre de cellules excluant le colorant vital}}{\text{nombre de cellules total}}$$

3.2. DOSAGE DE LA LACTATE DESHYDROGENASE

Méthode de Bergmeyer (1974)

La Lactate Déshydrogénase est un enzyme cytoplasmique qui catalise la réaction suivante:



Solutions: NADH 1mM (7.36mgr dissous dans 10ml H₂O)

Tampon Tris 0.5M à PH 7.4

Pyruvate 10mM (10mgr d'acide pyruvique avec 10ml de Tampon Tris 50M àPH 7.4).

On introduit 0.8ml de solution Tris-Pyruvate, 0.1ml d'enzyme dilué de manière adéquate et 0.1ml de NADH. Le tout est mélangé, puis on mesure l'activité de la LDH à 340 nm, au spectrophotomètre.

$$\text{Activité de la LDH} = (\text{abs/min}) \times \text{dilution} \times 160.7$$

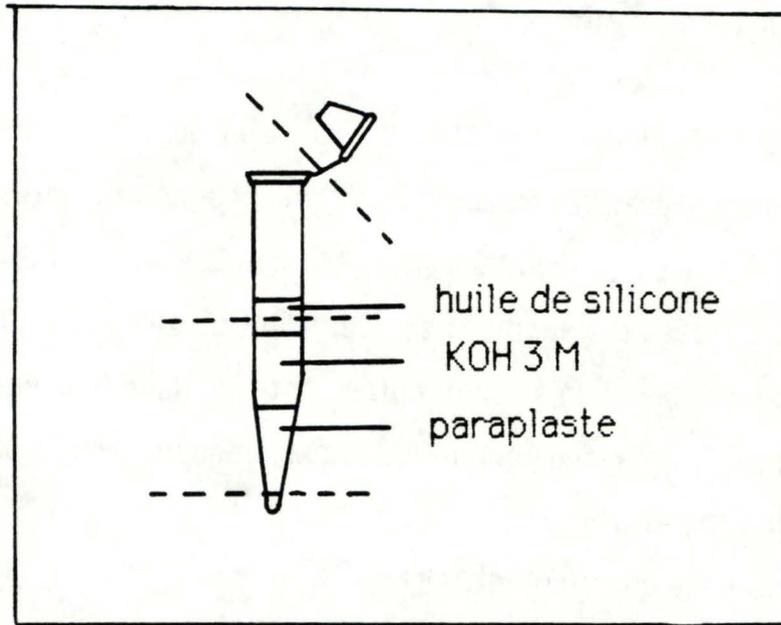


Figure n°21 : Cette figure illustre la préparation des Microtests Tubes pour les expériences de captation du taurocholate et l'entrée de leucine dans les cellules.

On peut mesurer une perte de quantité de LDH par les cellules, ou une augmentation de LDH dans le milieu. Ce rapport s'exprime en %.

$$\% = \frac{\text{quantité de LDH dans les cellules}}{\text{quantité de LDH dans les cellules et dans le surnageant}}$$

3.3. CINÉTIQUE DU TAUROCHOLATE

Dans 2ml de Leibovitz L-15, on incube 100 μ l de suspension cellulaire, dans lesquels on ajoute 50 μ l d'une solution de taurocholate non marqué (concentrations variables comprises entre 20 μ M et 200 μ M). Le tout est incubé pendant 20 minutes à 37°C (bain thermostaté), pour établir un état stationnaire. Au temps 0, on injecte 20 μ l de taurocholate tritié (NEN). Des échantillons de 150 μ l sont prélevés au cours du temps, et sont injectés dans des microtubes tests (Fig21).

Ces microtubes tests permettent par une technique de filtration-centrifugation de récupérer le culot contenant 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.

Après centrifugation à 13000rpm pendant 3 secondes (Microfuges B. Beckman Instruments), les cellules atteignent le KOH dans lequel elles éclatent. Pour séparer le culot contenant les cellules du surnageant, on sectionne le microtube au niveau du paraplaste et de l'huile de silicone (Fig21).

-On place le surnageant dans une fiole de comptage, on ajoute 4.5ml de liquide scintillant (Aquasol, NEN).

-Le culot contenant les cellules est placé dans une fiole de comptage, il est chauffé à 70°C pendant 15 minutes, de manière à faire fondre le paraplaste et ainsi libérer le KOH et le contenu cellulaire. On ajoute 500 μ l de Benzène (solvant) et 115 μ l de HCl, sous hotte aspirante, pour neutraliser le KOH et 4.5ml de liquide scintillant.

Les fioles sont mises à compter dans un compteur à scintillation β
(Beckman LS1801)

3.3.1. Utilisation du compteur à scintillation β

Ce compteur nous donne la mesure de radioactivité en Cpm et en Dpm.

Cpm: nombre de coups par minute indiqué par l'appareil de comptage.

Dpm: nombre de désintégration par minute des atomes radioactifs ou la désintégration réelle dans la fiole.

Efficiéce du comptage (%) : $\text{Cpm/Dpm} \times 100$

L'écart type est directement calculé et détermine le temps de comptage (entre une et deux minutes).

L'efficiéce de comptage diminue quand le "quenching" augmente. Le compteur à scintillation possède un système automatique de correction du comptage en fonction de ce quenching ce qui permet la conversion des Cpm en Dpm. A titre indicatif: certains facteurs influencent le comptage, comme le solvant utilisé, les impuretés et l'oxygène.

3.3.2. Modélisation du transport du taurocholate dans les hépatocytes

La modélisation compartimentale (Jacquez, 1972) représente un système sous forme de transferts de substance entre différents compartiments.

Un compartiment (ou pool) est une quantité de substance qui se comporte cinétiquement d'une manière distincte et homogène. Il est à distinguer d'un volume physique ou physiologique, bien que la quantité de matière dans un tel volume puisse être un compartiment.

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

Le modèle fermé à deux compartiments est utilisé pour caractériser le transport du taurocholate.

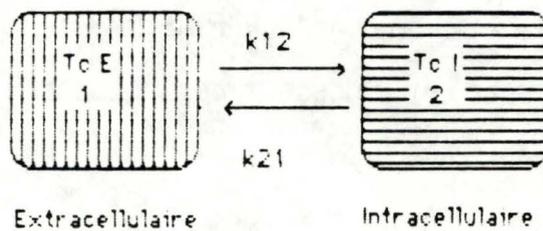


Figure n°22 : L'analyse compartimentale est décrite par un modèle fermé à deux compartiments, à l'état stationnaire par les hépatocytes isolés en suspension.

TcE: quantité de taurocholate non marqué dans le milieu extracellulaire.

TcI: quantité de taurocholate non marqué dans le milieu intracellulaire.

k12 et k21 sont des constantes de vitesse.

1. Les cellules sont en suspension dans le milieu. La concentration en taurocholate intracellulaire est en équilibre avec la concentration en taurocholate extracellulaire. Le système étant placé à l'état stationnaire, la vitesse d'entrée est égale à la vitesse de sortie.

Par convention, le milieu extracellulaire sera le compartiment 1 et contient une quantité X_1 (moles) de taurocholate non marqué. La cellule sera le compartiment 2 et contient une quantité X_2 de taurocholate non marqué. L'échange de taurocholate entre le milieu et la cellule, est caractérisé par des constantes de vitesse k_{21} et k_{12} (min^{-1}).

La constante de vitesse exprime la fraction du compartiment 1 transférée vers un autre compartiment 2 par unité de temps (Fig22).

A l'état stationnaire et à une concentration en taurocholate déterminée, la cinétique est considérée d'ordre 1 et la vitesse est proportionnelle à la quantité de substance présente dans le compartiment: $V = k * X$.

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

$$dX_1/dt = \text{vitesse d'entrée} - \text{vitesse de sortie} = 0 \quad (1)$$

$$dX_2/dt = \text{vitesse de sortie} - \text{vitesse d'entrée} = 0$$

$$\text{donc } dX_1/dt = k_{12} * X_1 - k_{21} * X_2 = 0 \quad (2)$$

$$dX_2/dt = k_{21} * X_2 - k_{12} * X_1 = 0$$

$$\text{et } k_{21}X_2 = k_{12}X_1$$

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

Nous admettons que le taurocholate est un traceur parfait, qu'il se mélange instantanément avec le taurocholate non marqué, et que la cellule ne distingue pas le taurocholate radioactif et le taurocholate non radioactif.

Le taurocholate va rapidement pénétrer dans la cellule.

Ensuite la vitesse d'excrétion du taurocholate radioactif va augmenter jusqu'à l'équilibre des vitesses d'entrée et de sortie.

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

-Détermination de k_{21} et k_{12}

Les équations explicites du modèle sont ajustées aux données par une méthode des moindres carrés non linéaires en utilisant l'algorithme de Levenberg-Maquardt(1963) et Jacquez(1972), des estimations pour les constantes k_{12} et k_{21} sont obtenues.

L'information de cette méthode en Fortran a été réalisée sur Apple Macintosh (Coche,1988).

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

milieu

$$X_1(t) = \frac{k_{12} * X_1(0)}{(k_{21} + k_{12})} + \frac{k_{21} * X_1(0)}{(k_{21} + k_{12})} * e^{-(k_{21} + k_{12})t}$$

cellules

$$X_2(t) = \frac{k_{21} * X_1(0)}{(k_{21} + k_{12})} (1 - e^{-(k_{21} + k_{12})t}) + X_2(0)$$

$$X_t = X_1 + X_2 \quad (3)$$

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

X_1 = quantité de taurocholate non marqué dans le milieu à l'équilibre.

X_2 = quantité de taurocholate non marqué dans la cellule à l'équilibre.

$$X_2 = X_t - X_1 \quad (4)$$

on remplace (4) dans (1)

$$k_{12} * X_1 = k_{21} * (X_t - X_1)$$

La vitesse d'incorporation du taurocholate est:

$$V = k_{12} * X_1$$

V est exprimé en nmoles de taurocholate transportées par minutes et par mgr de protéines.

En répétant l'expérience à différentes concentrations en taurocholate, on peut étudier la relation vitesse-concentration. Cette relation est décrite de manière adéquate par une hyperbole de Michaelis-Menten.

A partir de cette équation la constante d'affinité: K_m (μM) et la vitesse maximale de transport: V_{max} (moles/min) peuvent être déterminées par régression linéaire. Les altérations au niveau des transporteurs membranaires se répercuteront sur les valeurs de K_m (affinité modifiée) ou sur la V_{max} (nombre de transporteurs modifié).

4 DOSAGE DES PROTEINES

Les protéines ont été dosées par la méthode de Folin modifié, Miller(1959):

"Protein method". Anal. Chem.81,964

Réactifs: *solution A: 7ml de Na_2CO_3 14.3%

2.5ml NaOH 2N

0.5ml Tartrate 20%

=10ml

*solution B: 1ml CuSO_4

*solution C: 10ml de la solution A + 1ml de la solution B

1ml (ou 0.2ml) d'échantillon à doser (dilué de manière adéquate) est incubé avec 1ml (ou 0.2ml) de la solution C, pendant 10 minutes à température ambiante. Après 10 minutes, ajouter 3ml (ou 0.6ml) de folin (1ml porté à 1ml, par addition d' H_2O) et incuber le tout 10 minutes à 50°C . Lire à 660nm.

$$\text{Concentration inconnue} = \frac{\text{abs inconnue}}{\text{abs étalon}} \times \text{concentration étalon}$$

Concentration étalon: 0.1mgr/ml de Serum Albumine Bovine.

5 CINÉTIQUE D'INCORPORATION DE LA LEUCINE RADIOACTIVE DANS LES PROTÉINES TOTALES

5.1. PREMIER PROTOCOLE D'INCORPORATION

Ce protocole est inspiré de Van Bezooijen (1978).

Il nécessite une densité cellulaire de 10 à $20 \cdot 10^6$ (cellules/ml) $200 \mu\text{l}$ de suspension cellulaire et 1.5ml de Leibovitz L-15 "enrichi" (contenant 1mgr de Glutamine par ml de milieu), sont incubés à 37°C , pendant 20 minutes, sous une atmosphère de 95% O_2 et de 5% CO_2 .

Au temps 0, on ajoute de $20 \mu\text{l}$ de (^3H)leucine (diluée 2 fois).

Des échantillons de $100 \mu\text{l}$ sont prélevés au cours du temps. On ajoute à ces échantillons 1ml de TCA 10% (0°C) pour précipiter les protéines et arrêter la réaction. On centrifuge à 300g (centrifugeuse ALC). Le précipité restant est lavé 3 fois avec du TCA glacé (0°C) 5% . Le culot est dissous dans $200 \mu\text{l}$ de Soluène. On ajoute 4.5ml de liquide scintillant et la lecture de la radioactivité est faite au compteur à scintillation (3.3.1).

Essais de modifications de ce premier protocole par l'emploi d'un appareil de filtration sous vide: Millititer H.A, 96 well Filtration Plate, Millipore Corporation Bedford, Mass.

$200 \mu\text{l}$ de suspension cellulaire (densité: 10 à $20 \cdot 10^6$ cellules/ml) et 2ml de Leibovitz L-15 (contenant 1mgr de glutamine par ml de milieu et 1000mgr de leucine par ml) sont incubés à 37°C pendant 15 minutes. Au temps 0, on ajoute $40 \mu\text{l}$ de leucine radioactive.

1) Des échantillons de $150 \mu\text{l}$ sont prélevés au cours du temps et placés dans des microtubes tests. Ces tubes sont centrifugés pendant 30 secondes à 13000rpm , à la microfuge (Beckman). $100 \mu\text{l}$ du surnageant sont repris et placés dans un puits contenant au préalable $200 \mu\text{l}$ de TCA 20% à 0°C . On effectue dans ces puits, 4 lavages au TCA 5% à 0°C . Les filtres sont découpés et placés dans des fioles de comptage, dans lesquelles on ajoute

Matériel & Méthodes

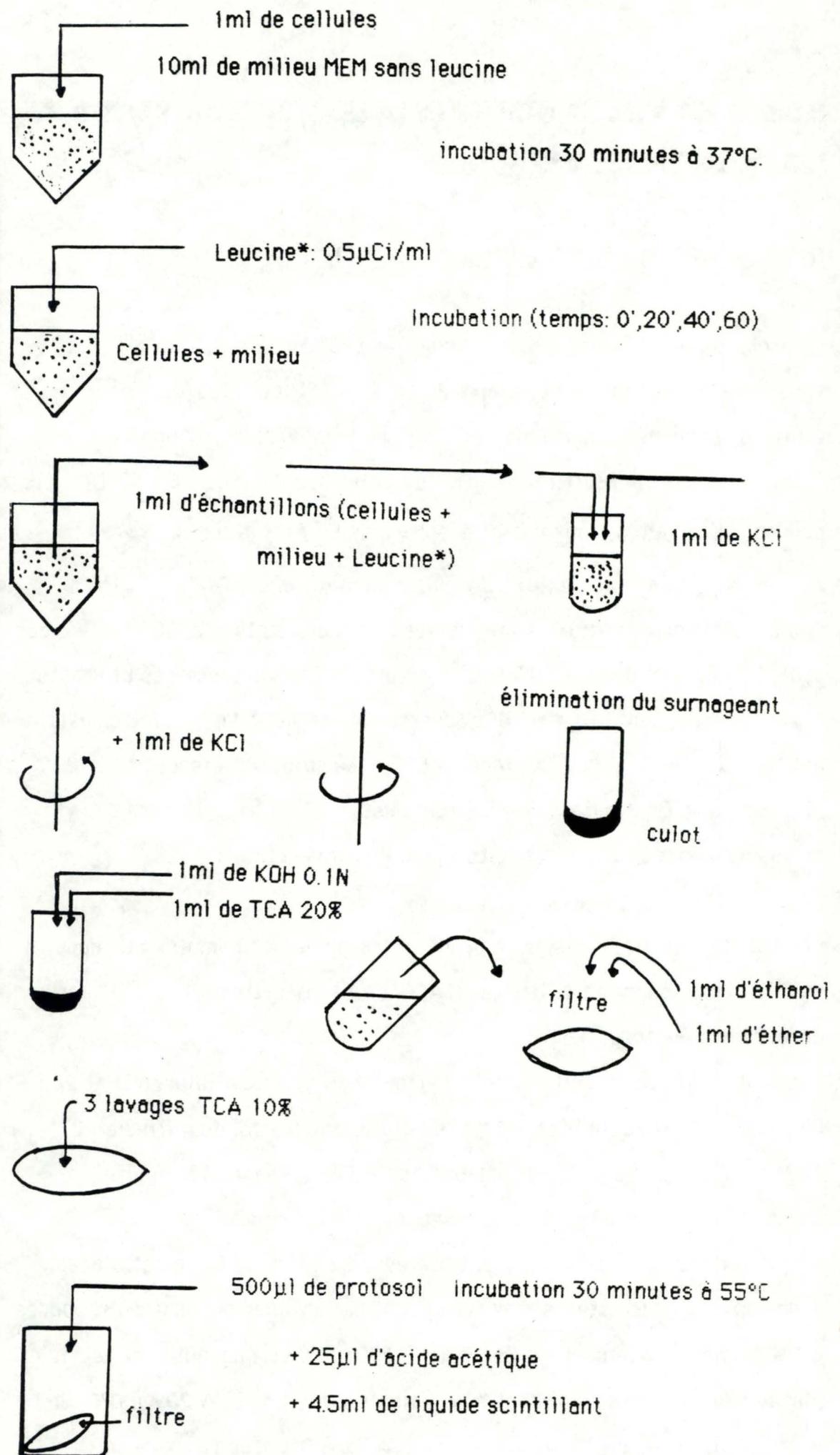


Figure n°23 : Schéma général du second protocole.

200 μ l de méthanol pour dissoudre la membrane, 50 μ l d'HCl et 4500 μ l de liquide scintillant, ensuite la lecture de la radioactivité est faite au compteur à scintillation.

2) Des échantillons de 100 μ l sont prélevés au cours du temps et placés dans des tubes contenant 50 μ l de Triton (X100) 1.1%. Les cellules atteignent le Triton et éclatent. 100 μ l de cette suspension sont repris et placés dans un puits contenant au préalable 200 μ l de TCA 20% (0°C). 4 lavages au TCA 5% (0°C) sont effectués dans ces puits. Les filtres sont découpés et placés dans des fioles de comptage, dans lesquelles on ajoute 200 μ l de méthanol, 50 μ l d'HCl, et 4,5ml de liquide scintillant. On lit la radioactivité au compteur à scintillation.

5.2. SECOND PROTOCOLE D'INCORPORATION

Il nous est fourni par communications personnelles du laboratoire de Monsieur et Madame Wattiaux. Il a été adapté de Sandvig (1976) et Van Deurs (1988) (Fig23).

1ml de suspension cellulaire ($20 \cdot 10^6$ cellules/ml) et 10ml de milieu MEM (sans leucine) sont incubés à 37°C, pendant 30 minutes. Au temps 0, on ajoute 5.5 μ l de leucine radioactive. Des échantillons de 1ml sont prélevés au cours du temps. A ceux-ci on ajoute 1ml de KCl 0.9% (premier lavage). Une première centrifugation est effectuée à 1000 rpm pendant une minute, le surnageant est enlevé et 1ml de KCl 0.9% (à 20°C) est rajouté au culot (second lavage). On centrifuge une deuxième fois, le surnageant est éliminé. A ce culot, on ajoute 1ml de KOH 0.1N pour dissoudre le culot et 1ml de TCA 20% (pour précipiter les protéines) à température ambiante. Le contenu du tube est versé sur un filtre (Whatman. Microfibres GF/B, diam: 2.5cm. Whatman International. Ltd. England) dans un appareil de filtration sous vide (Collecteur d'échantillons 1225. Millipore Corporation Bedford, Mass). Le tube est lavé 3 fois avec 1ml de TCA 10%, en versant chaque fois le contenu du tube sur le filtre. 1ml d'éthanol absolu et 1ml

d'éther sont versés sur le filtre pour le sécher. Les filtres sont placés dans des fioles de comptage, dans lesquelles on ajoute 500 μ l de protosol, ensuite ces fioles sont chauffées à 55°C pendant 30 minutes. Ces fioles sont refroidies. 25 μ l d'acide acétique sont ajoutés pour neutraliser le KOH. Après 4.5ml de liquide scintillant sont ajoutés, et les fioles sont mises à compter dans le compteur à scintillation.

5.3. CHROMATOGRAPHIE

Afin de vérifier que la leucine radioactive du surnageant se retrouve bien incorporée dans les protéines, le surnageant a été chromatographié

-Colonne K15/30 Pharmacia Fine Chemicals

-Gel Sephadex G50 (Pharmacia,Uppsala,Suède): longueur= 24cm

diamètre= 15mm

Chromatographie sur tamis moléculaire

-Eluants: Tris 0.1M

NaCl 0.05M

pH 8

Leucine non radioactive 3mM

1400 μ l de cellules (densité: $15 \cdot 10^6$ cellules/ml) et 14ml de milieu MEM sont incubés 30 minutes à 37°C, sous agitation. Au temps 0 minute, 7.5 μ l de leucine* sont ajoutés à la suspension cellulaire. Des échantillons de 3ml sont repris et centrifugés pendant 1 minute à 1000rpm.

2000 μ l de surnageant sont déposés sur la colonne. Le débit de la chromatographie (20cm/heure) est réglé à l'aide d'une pompe péristaltique.

La sortie de la colonne est raccordée à un appareil enregistrant

l'absorption des substances éluées à 280 nm. Le liquide élué est alors

recueilli dans les tubes collecteurs de fraction et la radioactivité est lue au compteur.

6 CINETIQUE D'INCORPORATION DE LA LEUCINE RADIOACTIVE DANS LES CELLULES

Pour séparer la leucine extracellulaire et la leucine cellulaire, des microtubes tests (3.3) sont employés. 200 μ l de suspension cellulaire et 50 μ l de leucine non radioactive sont ajoutés à 2ml de milieu MEM. Ces trois substances sont incubées pendant 20 minutes sous agitation. Au temps 0, on ajoute 50 μ l de leucine radioactive. Des échantillons de 150 μ l sont prélevés au cours du temps et sont déposés dans des microtests tubes. Ces tubes sont centrifugés pendant 30 secondes à 13000rpm, à la microfuge (Beckman). Le tube est sectionné au niveau de l'huile de silicone et du paraplaste.

- Le surnageant est introduit dans une fiole de comptage. On ajoute 4.5ml de liquide scintillant et on lit la radioactivité au compteur.
- Le culot est également placé dans une fiole de comptage, qui est chauffée à 70°C pendant 15 minutes. Dans cette même fiole, on ajoute 500 μ l de benzène (solvant) et 115 μ l d'HCl 2M (pour neutraliser le KOH). Finalement on ajoute 4.5 ml de liquide scintillant et on fait la lecture de la radioactivité.

7 PROTOCOLE DE CONGELATION

Ce protocole fut publié par Taylor (1982) pour les cellules de muscles lisses, et des essais d'adaptation aux hépatocytes furent effectués au laboratoire (Decat, 1987).

Le protocole est actuellement le suivant, son adaptation n'étant pas terminée.

7.1. SOLUTIONS

1. Solutions de Krebs 20% (poids/volume) DMSO utilisée pour un stockage à 0°C pendant 10 minutes.

| | | | |
|--------------------------------------|---------|--------------------|---------|
| NaCl | 0.1212M | KCl | 0.0054M |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0.0025M | MgCl ₂ | 0.0012M |
| NaH ₂ PO ₄ | 0.0012M | NaHCO ₃ | 0.015M |
| Glucose | 0.0115M | DMSO | 2.56M |

+carbogène

Le pH est maintenu à 8.6 pour des conditions optimales de refroidissement (Taylor, 1982)

2. La seconde solution est un tampon 30% (poids/volume) DMSO K⁺-Tricine, utilisé à des températures négatives.

| | | | | |
|----------------------------------|---------|-------------------|---------|----------------|
| NaCl | 0.0072M | KCl | 0.0423M | |
| CaCl ₂ | 0.0025M | MgCl ₂ | 0.0137M | |
| NaH ₂ PO ₄ | 0.0012M | KHCO ₃ | 0.0155M | PH=9.3 à -13°C |
| Glucose | 0.0155M | KOH | 0.0777M | (Taylor, 1982) |
| DMSO | 3.9M | Tricine | 0.100M | |

+ carbogène.

7.2. CONGELATION

La suspension contenant les hépatocytes, dont la densité est de 10×10^6 cellules/ml de solution Krebs-Ringer avec Ca⁺⁺, est gardée à 0°C. 500µl de

la suspension cellulaire sont prélevés et centrifugés à 50g. Le surnageant est enlevé et remplacé par une solution de Krebs 20% (P/V) DMSO. Les cellules restent dans ce milieu 10 minutes à 0°C. Une nouvelle centrifugation est effectuée à 50 g. Le surnageant est à nouveau enlevé et remplacé par un même volume de tampon 30% (P/V) DMSO K⁺-Tricine qui se trouve à une température de -7°C pendant une heure (Cryostat Lauda K 4 R). Après 60 minutes, un passage graduel est effectué, s'échelonnant de -7°C à -13°C, en diminuant de 2°C par minute. Les hépatocytes sont maintenus 30 minutes à -13°C.

7.3. RECHAUFFEMENT

Les cellules ayant sédimenté, le surnageant est enlevé (450 µl) et on ajoute au culot restant 4.5ml de solution de Krebs, contenant 1M de glucose, pour éviter les dommages causés par une dilution attribuée. Ce glucose semble empêcher une entrée massive d'eau qui provoquerait un déséquilibre entre le milieu intra- et extracellulaire (Fuller, 1982). Cette solution est portée à 37°C (dans un bain thermostatisé) pendant 10 minutes. On centrifuge à 50g pendant 1 minute. Le surnageant est éliminé et un volume de milieu MEM (ce volume est déterminé pour les expériences à suivre) est ajouté au culot.

Remarque

Les résultats obtenus devront être corrigés par un facteur de densité cellulaire, puisque la densité de la suspension cellulaire est plus faible que celle des hépatocytes fraîchement isolés (élimination de cellules mortes).

RESULTS

Suivant l'objectif principal de cette étude, un protocole d'étude de l'incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales pour les hépatocytes isolés sera mis au point.

Dans une première partie, l'efficacité des différents tests et protocoles sera évaluée sur **les cellules fraîchement isolées** ou cellules témoins, ensuite nous nous intéresserons à l'application de ces protocoles sur **les cellules stockées à des températures négatives.**

1 LES HEPATOCYTES FRAICHEMENT ISOLEES

Avant d'utiliser notre protocole d'incorporation de leucine dans les protéines des hépatocytes, la viabilité de ces cellules doit être contrôlée par différents tests de viabilité structurelle et d'intégrité métabolique.

1.1 TESTS DE VIABILITE

1.1.1. Tests de viabilité structurelle

Parallèlement au test d'exclusion du colorant vital, il est possible d'estimer la densité cellulaire ainsi que le nombre de cellules dans un volume choisi. La densité recherchée pour l'incorporation de la leucine dans les protéines est comprise entre $15 \cdot 10^6$ et $20 \cdot 10^6$ cellules /ml. Pour l'obtenir, on ajuste le volume cellulaire avec du tampon Krebs-Ringer Ca^{++} .

1.1.1.1. Test d'exclusion du colorant vital (érythrasine).

Cette viabilité cellulaire est estimée en %.

-Pour des cellules fraîchement isolées, le nombre de cellules n'excluant pas le colorant vital oscille entre 85 et 90% (Fig 24). Cette fraction d'hépatocytes viables ne diminue que très légèrement pendant la conservation de 3 heures à 0°C. De plus aucune altération membranaire n'est observée (Fig 25).

1.1.1.2. Dosage de la Lactate Déshydrogénase.

C'est un test complémentaire à celui de l'exclusion du colorant vital, pour estimer et évaluer l'intégrité membranaire. Il s'effectue par observation de l'augmentation de LDH dans le milieu ou par la quantité de LDH perdue

Résultats

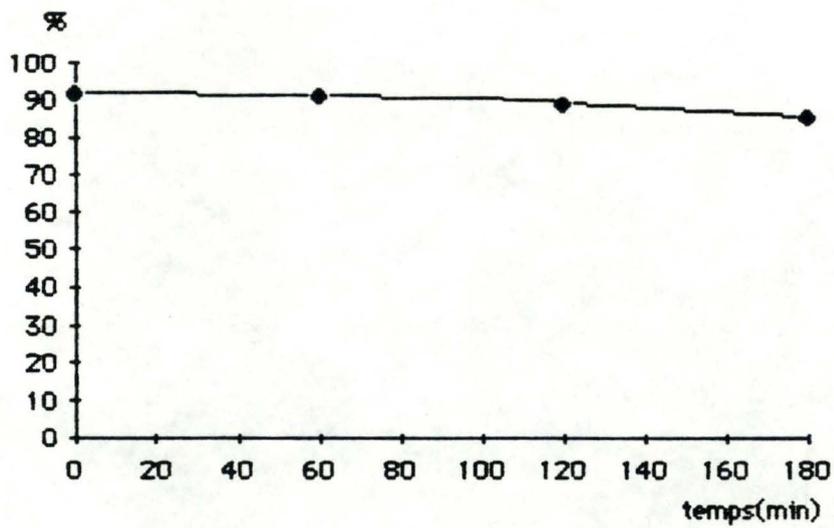


Figure n°24 : Estimation de la viabilité cellulaire par le test à l'érythrosine, chez les hépatocytes fraîchement isolés.

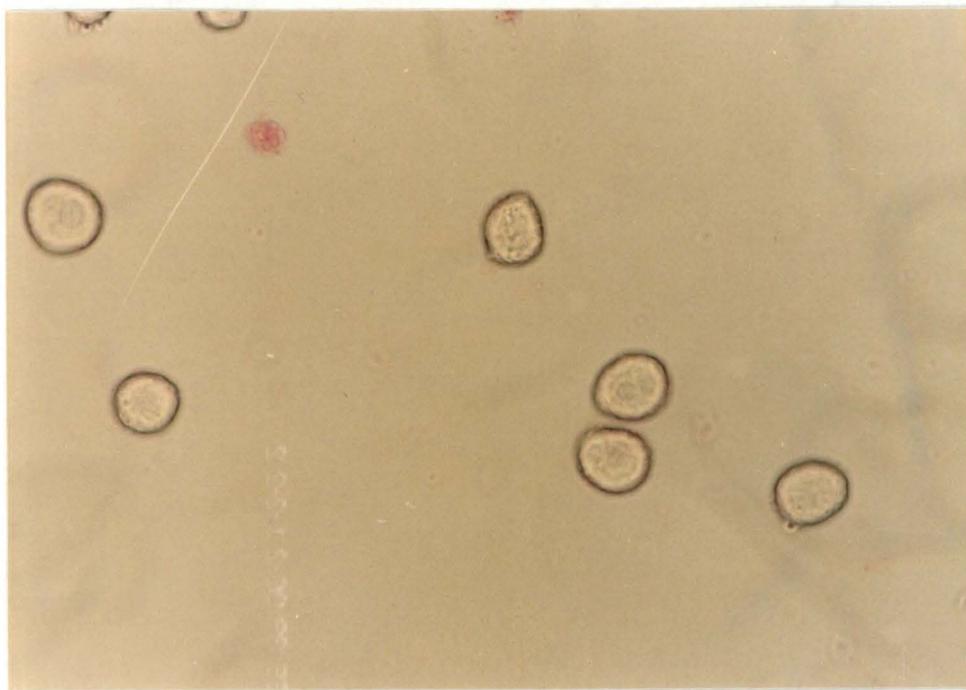


Figure n°25 : Suspension d'hépatocytes fraîchement isolés.
(microscope optique)

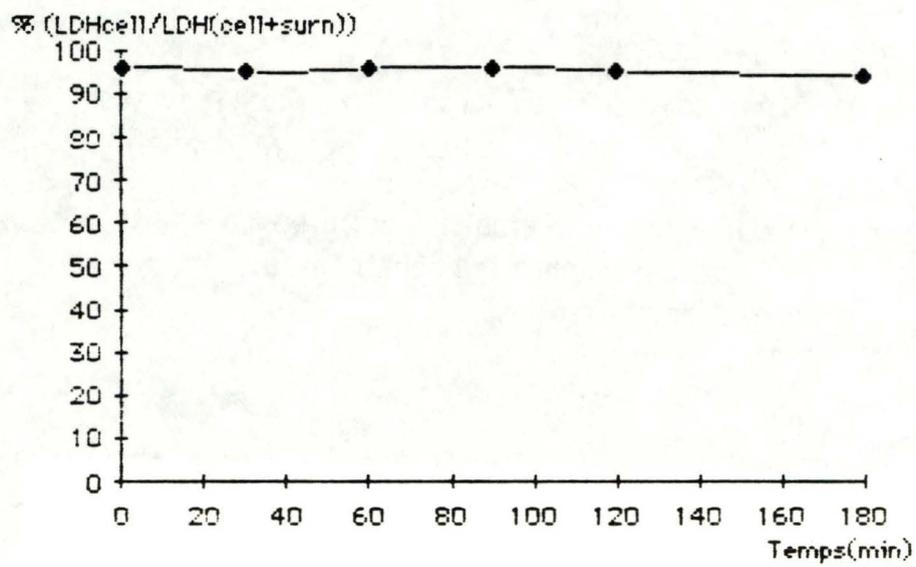


Figure n°26 : Estimation de la viabilité cellulaire à partir de la libération de LDH dans le milieu d'incubation, chez les hépatocytes fraîchement isolés.

par les cellules. Il s'exprime en %.

-Le pourcentage de viabilité est mesuré chez des cellules fraîchement isolées et gardées à 0°C pendant 3 heures. (Fig26) La diminution minimale de cette valeur au cours du temps (3% en 3 heures) suggère que les cellules stockées à 0°C conservent leur structure membranaire intacte.

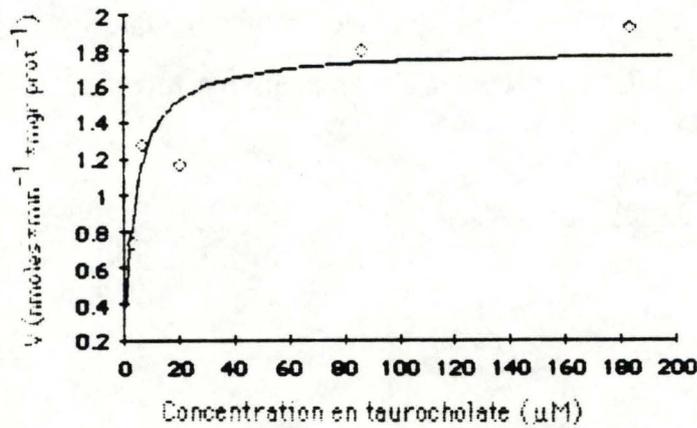
1.1.2. Tests d'intégrité métabolique

1.1.2.1. Cinétique du transport du taurocholate

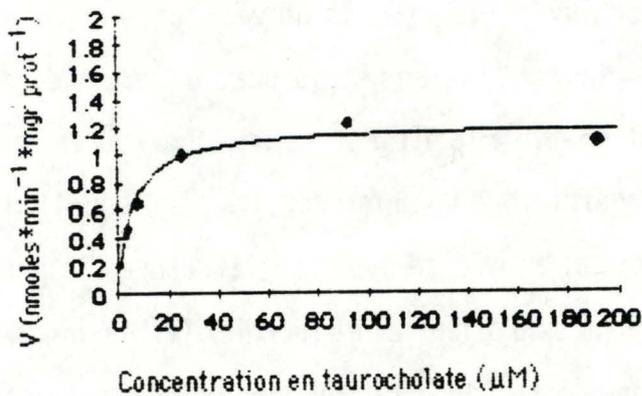
Habituellement, la cinétique du transport du taurocholate fait partie de l'étude du transport des acides biliaires. Nous pouvons dans cette étude l'incorporer dans les critères d'intégrité métabolique.

Ce critère est à mettre en rapport avec les deux tests précédents qui concernaient l'évaluation de l'intégrité membranaire.

-Pour les cellules fraîchement isolées et gardées à 0°C pendant 2 ou 3 heures (Fig27): la relation entre la vitesse de transport et la concentration en taurocholate est hyperbolique est bien décrite par l'équation de Michaelis-Menten. Ceci est en accord avec la littérature (Schwarz, 1975). La constante K_m (constante d'affinité) et la V_{max} (vitesse maximale de transport) sont des paramètres de la courbe Michaelis-Menten et peuvent être déterminés par ajustement de cette courbe sur les points expérimentaux. La nature saturable de cette relation suggère l'intervention d'un mécanisme actif dans la captation du taurocholate, et la présence de transporteurs membranaires spécifiques.

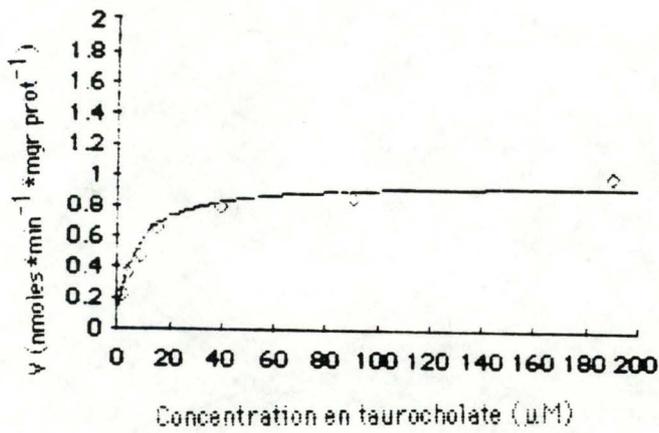


Cinétique du taurocholate, chez les hépatocytes fraîchement isolés
Rat 1

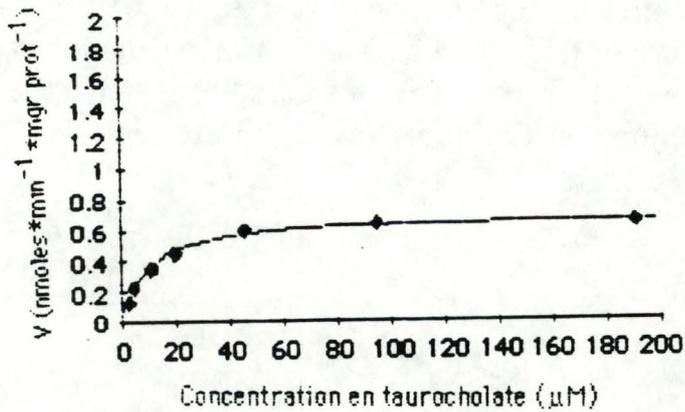


Cinétique du taurocholate, chez les hépatocytes cryopréservés.
Rat 1

Figure n°27 : Transport du taurocholate: cinétique par ajustement d'une Michaelis-Menten. Vitesse de transport à l'état stationnaire du taurocholate en fonction de sa concentration dans le milieu.
 Ces expériences ont été réalisées sur des suspensions hépatocytaires de deux rats, avant et après congélation.



Cinétique du taurocholate, chez les hépatocytes fraîchement isolés
Rat 2



Cinétique du taurocholate, chez les hépatocytes cryopréservés
Rat 2

| Paramètres | K _m (μM) | V _{max} (nM.min ⁻¹ .mgr prot ⁻¹) |
|-----------------------------|------------------------|---|
| Hépatocytes gardés à 0°C | 3.7 | 1.8 Rat 1 |
| | 6.4 | 0.95 Rat 2 |
| Hépatocytes congelés | 5.7 | 1.1 Rat 1 |
| | 9 | 0.69 Rat 2 |

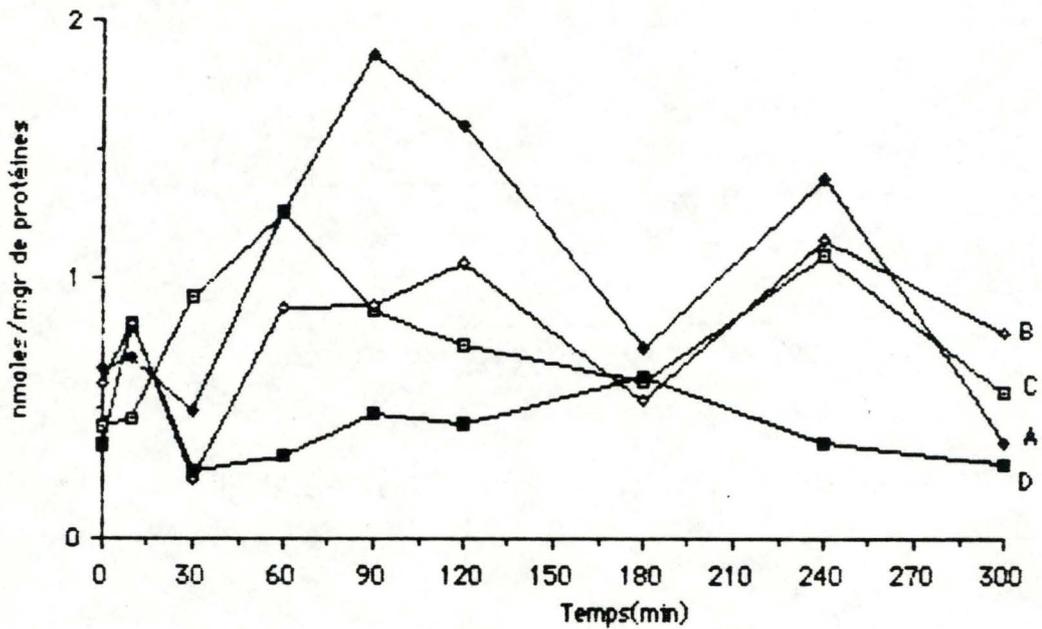


Figure n°28 : Premier protocole (Van Bezooijen, 1978)
 Incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales. La concentration en leucine non marquée est $0.95\mu\text{moles}$. Ces expériences ont été réalisées en 4 réplicats.

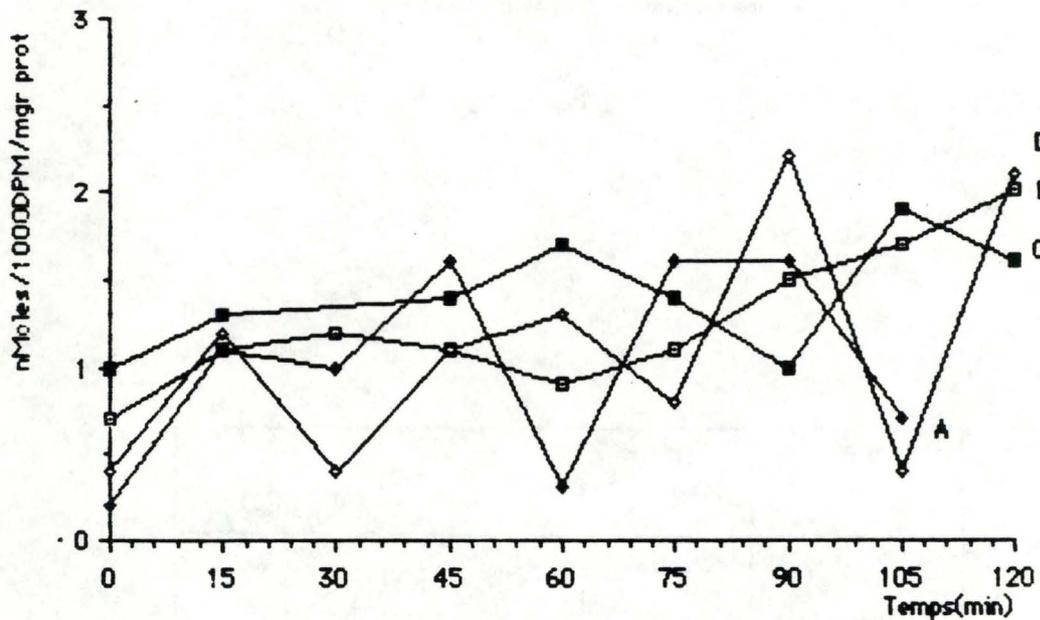


Figure n°29 : Premier protocole (Van Bezooijen, 1978)
 Incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales. La concentration en leucine non marquée est $8\mu\text{moles}$. Ces expériences ont été réalisées en 4 réplicats.

1.2 INCORPORATION DE LA LEUCINE RADIOACTIVE DANS LES PROTEINES TOTALES CHEZ LES HEPATOCYTES ISOLES

Les différents critères de contrôle de la viabilité cellulaire étant mesurés, nous pouvons maintenant appliquer un protocole d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales, chez les hépatocytes isolés.

1.2.1. Premier protocole (Van Bezooijen, 1978).

La figure (28) montre qu'aucune incorporation dans les protéines totales n'est obtenue, pour ce protocole appliqué pendant 2 heures. Ceci contraste avec les résultats de Van Bezooijen, qui trouve une cinétique d'incorporation croissant linéairement pendant 4 heures (Fig 16).

Une expérience a été réalisée en augmentant la concentration en leucine pour atteindre une concentration de 8 μ moles/ml, pour laquelle Van Bezooijen trouve une incorporation maximale dans les protéines totales. La figure (29) nous montre de nouveau que même dans ces conditions spéciales, aucune incorporation mesurable n'est obtenue dans les protéines totales.

1.2.2. Modifications du premier protocole

Certains problèmes spécifiques au protocole lui-même, ont contribué à augmenter la variabilité des résultats. Ces problèmes semblent résulter de lavages au TCA 5% trop peu précis, car réalisés dans des tubes (de 3ml).

Cette étape de séparation a été réalisée par une filtration sous vide après séparation du surnageant et du culot cellulaire par l'emploi de microtests tubes (Matériel et Méthodes 3.3).

Les échantillons sont déposés dans des puits contenant des filtres. Ceux-ci

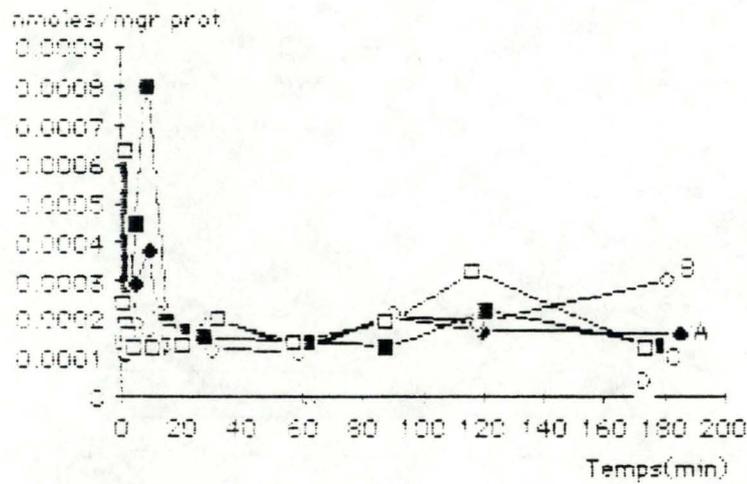


Figure n°30 : Premier protocole modifié.
 Incorporation de la leucine radioactive dans les protéines des surnageants.
 Les suspensions cellulaires A et B sont incubées à 37°C.
 Les suspensions cellulaires C et D sont conservées à 0°C.

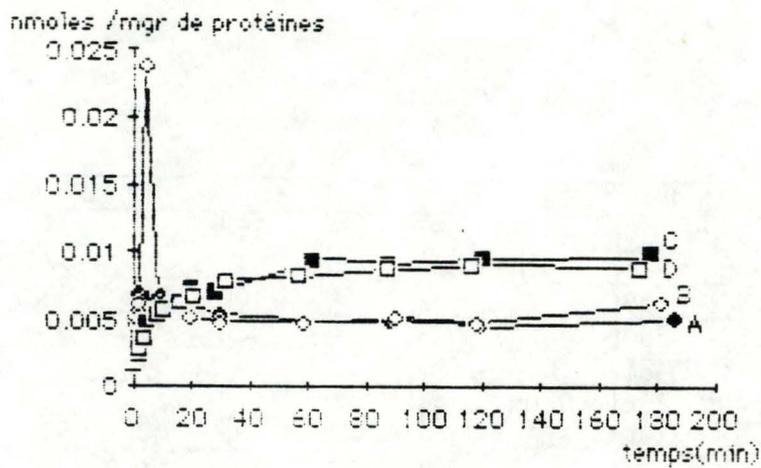


Figure n°31 : Premier protocole modifié.
 Incorporation de la leucine radioactive dans les protéines des cellules.
 Les suspensions cellulaires A et B sont incubées à 37°C.
 Les suspensions cellulaires C et D sont conservées à 0°C.

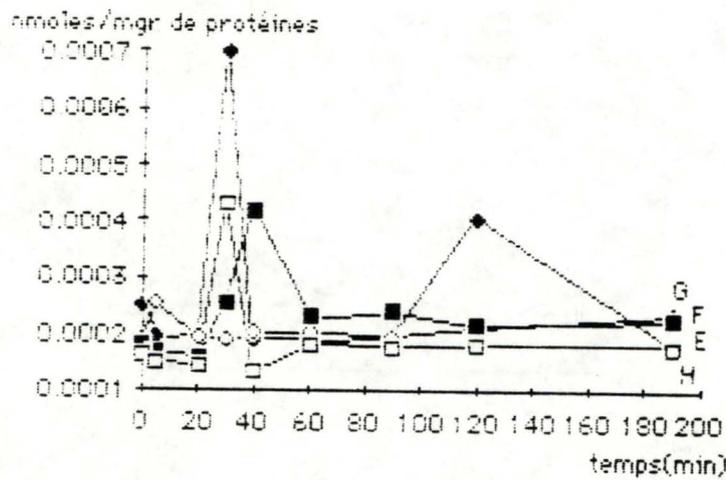


Figure n°32 : Premier protocole modifié.
 Incorporation de la leucine radioactive dans les protéines totales après addition de Triton X100.
 Les suspensions cellulaires E et F sont incubées à 37°C.
 Les suspensions cellulaires G et H sont conservées à 0°C.

| | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L |
|---|-----|------|-----|-----|-----|----|----|----|----|------|-----|
| 1 | 47 | 57 | 100 | 46 | 56 | 56 | 55 | 55 | 64 | 4123 | 111 |
| 2 | 95 | 446 | 211 | 162 | 59 | 56 | 44 | 44 | 52 | 73 | 50 |
| 3 | 291 | 6136 | 389 | 72 | 51 | 74 | 39 | 52 | 58 | 75 | 41 |
| 4 | 79 | 652 | 204 | 85 | 72 | 62 | 42 | 40 | 41 | 38 | 53 |
| 5 | 240 | 73 | 433 | 163 | 205 | 52 | 64 | 54 | 55 | 47 | 49 |
| 6 | 61 | 340 | 228 | 830 | 245 | 39 | 59 | 34 | 47 | 75 | 56 |
| 7 | 55 | 41 | 340 | 305 | 234 | 47 | 45 | 40 | 50 | 43 | 48 |
| 8 | 56 | 54 | 66 | 148 | 339 | 89 | 60 | 56 | 42 | 144 | 41 |

mesure en DPM

Figure n°33 : Test plaque Millititer.
 Des échantillons (H_2O et (^3H) Leucine) sont déposés dans les puits: C3 et E6. Diffusion du traceur entre les puits.

ne sont pas découpés mais ils sont normalement séparés de manière étanche.

- Pour les surnageants des cellules incubées à 37°C, on observe une augmentation rapide de l'incorporation de leucine marquée dans les protéines jusqu'à 0.0007 nmoles/mgr de protéines, à 10 minutes. Ensuite une diminution rapide puis une légère augmentation est obtenue jusqu'à 200 minutes (Fig 30).

-Pour les surnageants des cellules maintenues à 0°C, on observe aussi une augmentation rapide de l'incorporation de leucine marquée dans les protéines jusqu'à 0.0008 nmoles/mgr de protéines, à 10 minutes. Ensuite une diminution rapide puis une légère augmentation est aussi observée (Fig 30).

-Dans les culots cellulaires des cellules incubées à 37°C, une augmentation de l'incorporation est observée jusqu'à 15 minutes, suivie d'une diminution de l'incorporation jusque 200 minutes (Fig 31).

-Dans le culot cellulaire des cellules maintenues à 0°C (température où le métabolisme cellulaire est ralenti), une augmentation continue de l'incorporation est observée jusqu' à 90 minutes, suivie d'un plateau (Fig 31).

Nous pouvons ainsi constater que: -1°) L'incorporation de leucine radioactive dans les protéines cellulaires est réalisée aussi bien à 0°C, qu'à 37°C.

-2°) Le taux d'incorporation est plus faible à 37°C qu'à 0°C.

-Les protéines totales sont obtenues par addition de triton X100 (celui-ci fait éclater les cellules). La figure (32) ne nous permet pas de donner une interprétation valable de l'incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales.

Cette variabilité est expliquée par diffusion entre les puits de l'appareillage de filtration (dû à un manque d'étanchéité des puits).

-Une expérience supplémentaire a été réalisée pour tester cette étanchéité. Des échantillons contenant de l'H₂O et de la leucine radioactive

Résultats

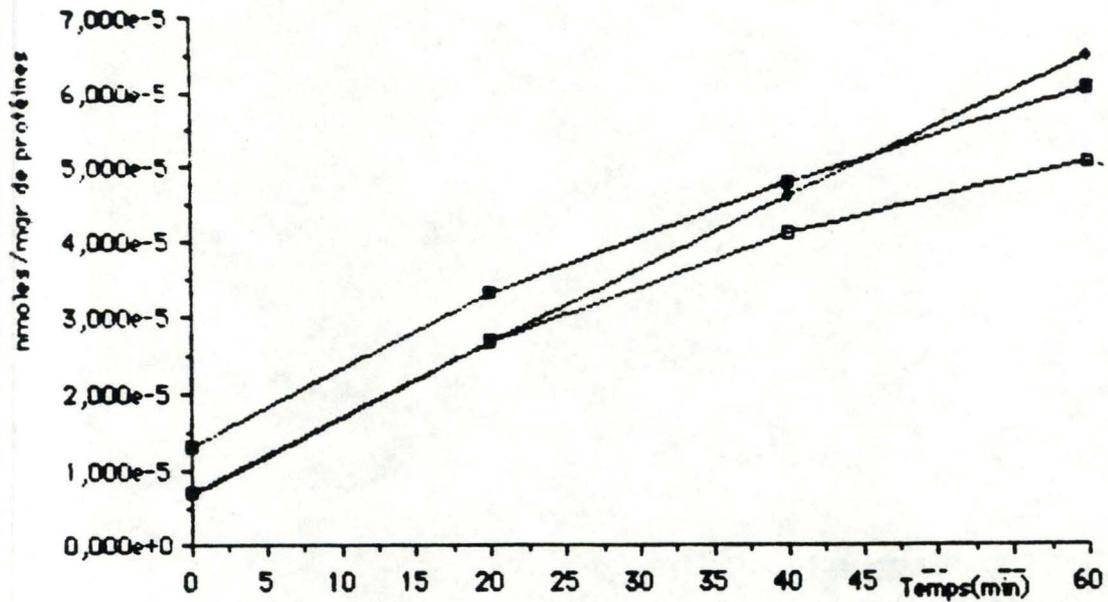


Figure n°34 : Second protocole (Wattiaux adapté de Sandvig(1976) et de Van Deurs(1988)
 Incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales, pour les hépatocytes fraîchement isolés.
 (^3H) leucine: $0.5\mu\text{Ci/ml}$. 3 réplicats.

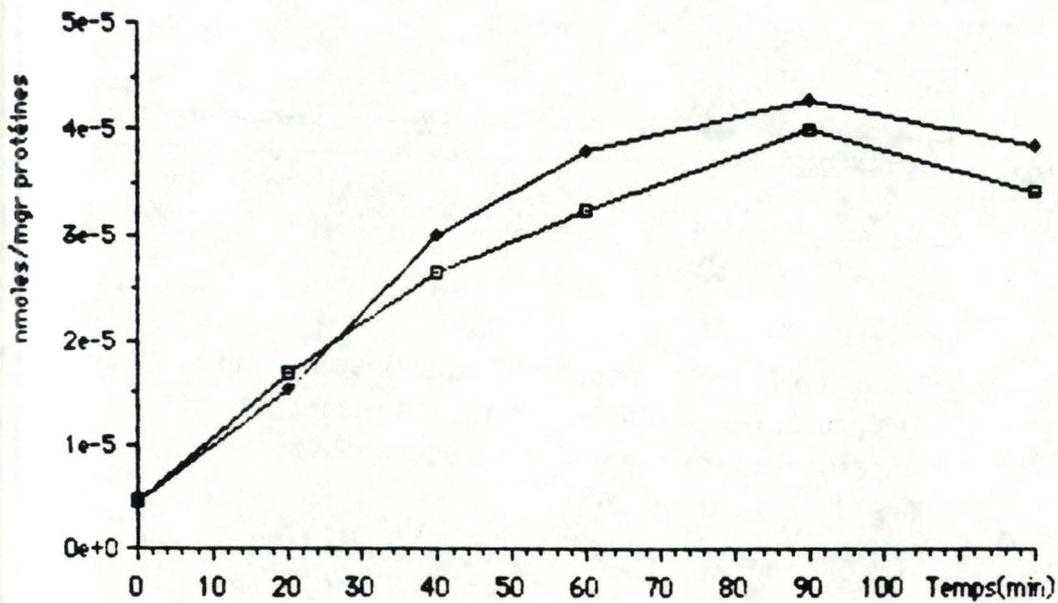


Figure n°35 : Second protocole. Incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales, jusque 120 minutes, pour les hépatocytes fraîchement isolés
 (^3H) leucine: $0.5\mu\text{Ci/ml}$. duplicats.

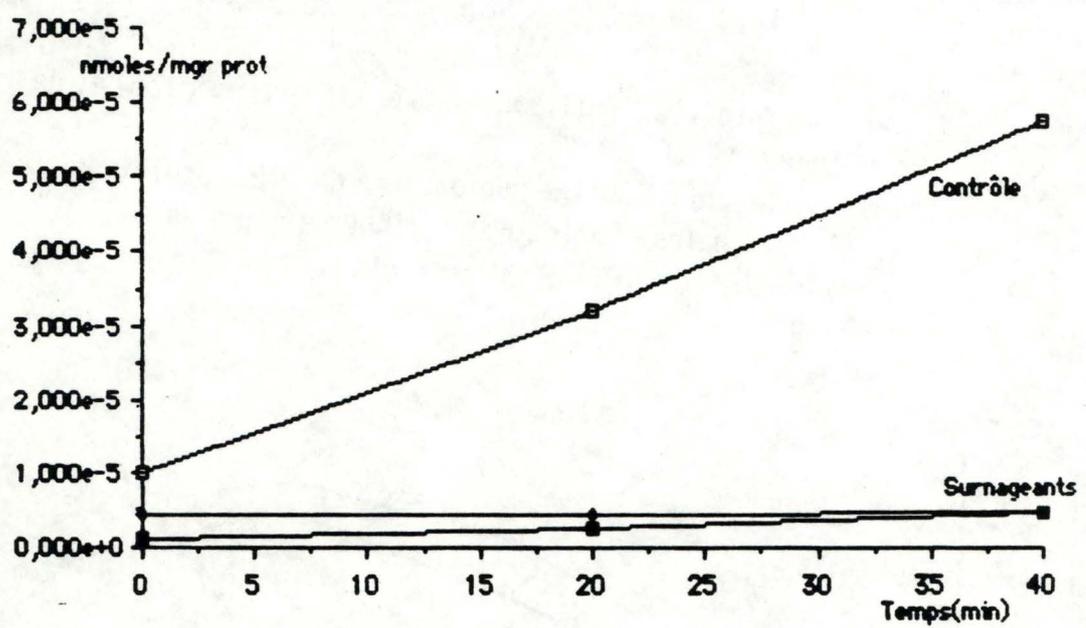


Figure n°36 : Second protocole. Incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales et dans les surnageants, pour les hépatocytes fraîchement isolés
 (^3H) leucine: $0.5\mu\text{Ci/ml}$.

(NEN) ont été disposés aléatoirement dans les puits et filtrés. Par comptage de la radioactivité adsorbée sur les filtres nous avons pu observer une diffusion du traceur entre les puits (Fig 33).

1.2.3. second protocole (Wattiaux, adapté de Sandvig(1976) et de Van Deurs(1988))

Ce problème mettant en question la totalité des résultats précédents, une ultime modification du protocole a été réalisée.

Pour éliminer les problèmes de lavage survenus dans le protocole précédent, les échantillons sont déposés sur des filtres (Whatman), qui permettent une meilleure séparation entre le surnageant (aspiré par une pompe à vide) et le culot (adsorbé sur le filtre).

Les résultats suivants ont été obtenus:

-Une incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales (Fig 34). Ces résultats sont standardisés en nmoles / mgr de protéines. Cette incorporation est linéaire jusqu'à 60 minutes.

-Quand l'incorporation de leucine dans les protéines totales est réalisée jusqu'à 120 minutes, on note un ralentissement de l'incorporation (Fig 35).

-De plus, il existe dans le surnageant une faible radioactivité (0.5 nmoles/mgr de protéines) précipitable, et donc associée à des protéines (Fig 36).

1.3.4. Chromatographie

Afin de vérifier si cette quantité de leucine marquée est incorporée dans les protéines ou y est simplement associée (par adsorption), nous avons procédé à la chromatographie des fractions contenant le surnageant.

Dès l'addition de leucine radioactive (au temps 0 minutes), les échantillons sont déposés sur la colonne:

La fig(37) nous permet d'observer 3 pics.

Résultats

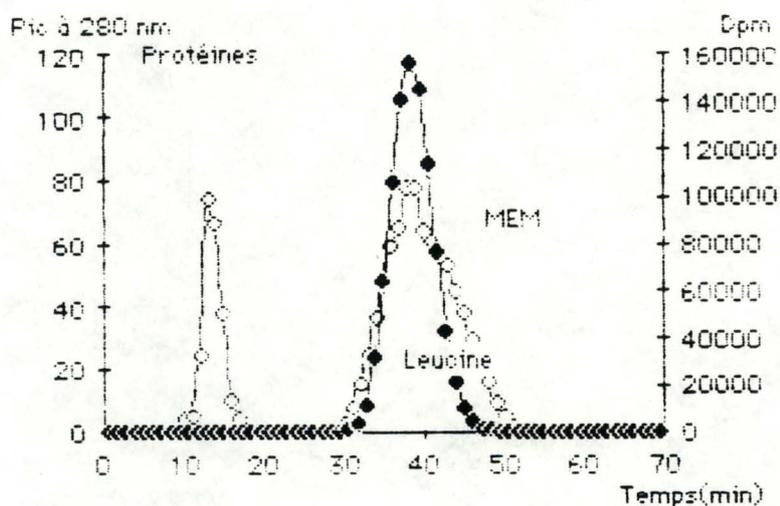


Figure n°37 : Chromatographie au temps 0 minutes, pour les surnageants.

1° pic: élution des protéines (32% du pic MEM)

2° pic: élution de leucine non incorporée

3° pic: élution du colorant du MEM

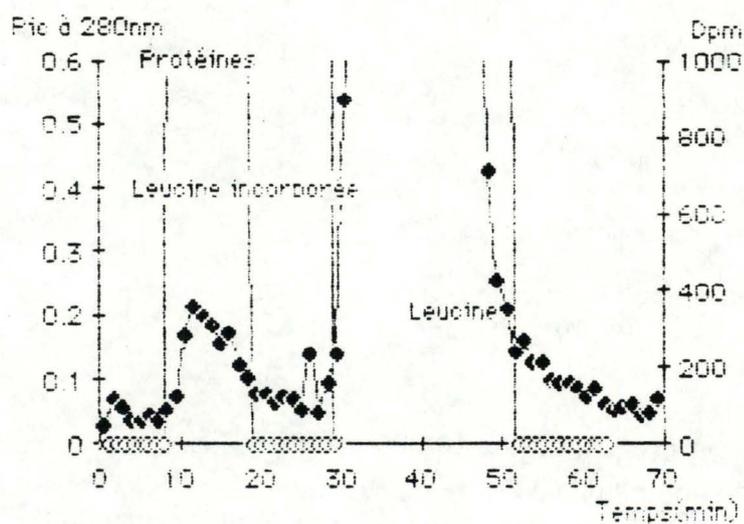


Figure n°38 : Chromatographie au temps 0 minutes.

Changement d'échelle

1° pic: élution des protéines, à l'intérieur duquel existe un pic correspondant à la leucine radioactive incorporée

2° pic: élution de leucine non incorporée

3° pic: élution du colorant du MEM

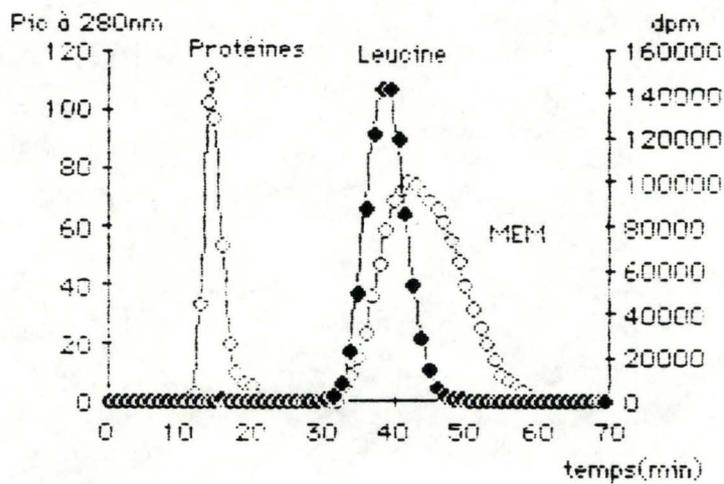


Figure n°39 : Chromatographie au temps 30 minutes, pour les surnageants.

- 1° pic: élution des protéines (34% du pic MEM)
- 2° pic: élution de leucine non incorporée
- 3° pic: élution du colorant du MEM

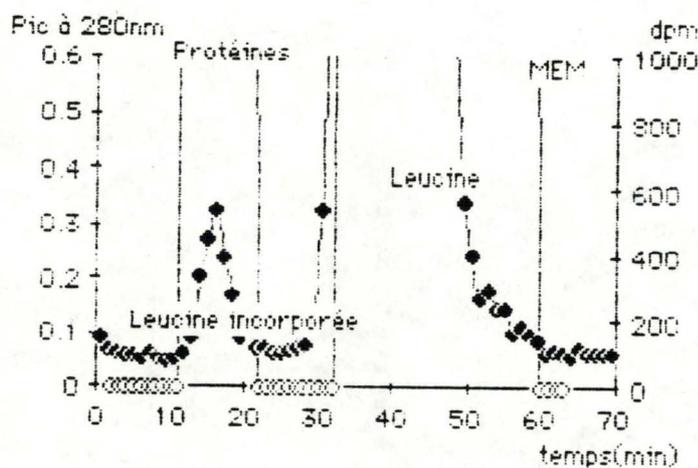


Figure n°40: Chromatographie au temps 30 minutes.

Changement d'échelle

- 1° pic: élution des protéines, à l'intérieur duquel existe un pic correspondant à la leucine radioactive incorporée
- 2° pic: élution de leucine non incorporée
- 3° pic: élution du colorant du MEM

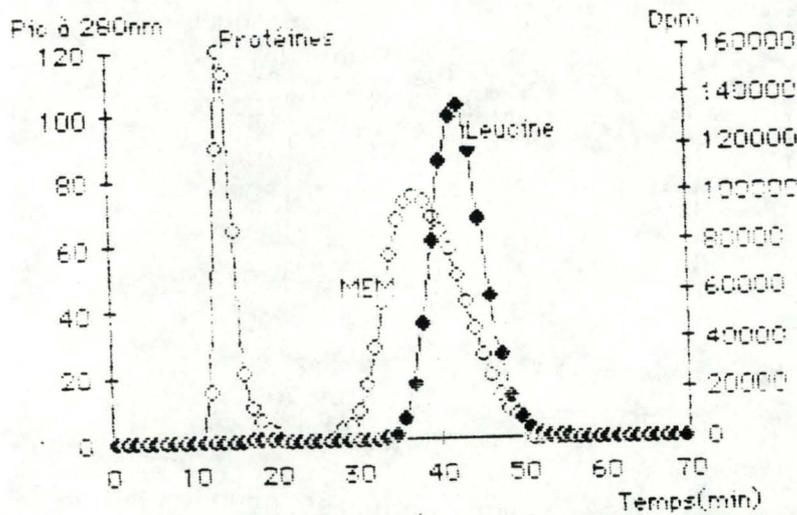


Figure n°41 : Chromatographie au temps 60 minutes, pour les surnageants.

- 1° pic: élution des protéines (37% du pic MEM)
- 2° pic: élution de leucine non incorporée
- 3° pic: élution du colorant du MEM

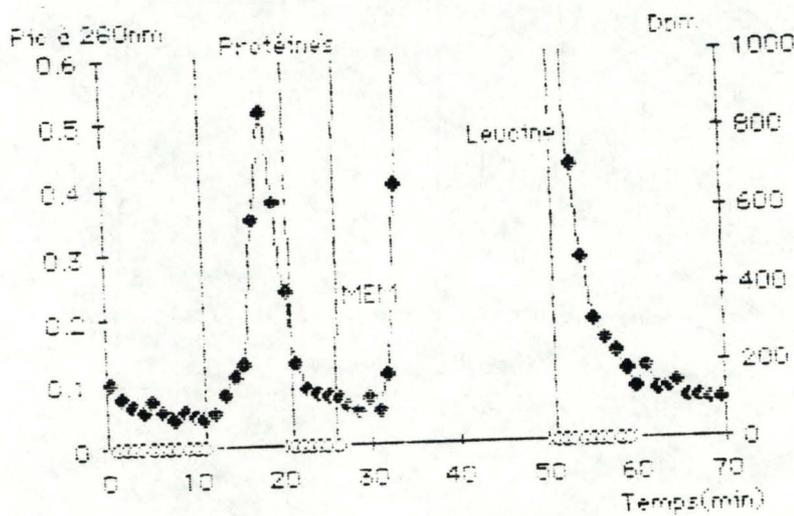


Figure n°42 : Chromatographie au temps 60 minutes.

Changement d'échelle

- 1° pic: élution des protéines, à l'intérieur duquel existe un pic correspondant à la leucine radioactive incorporée
- 2° pic: élution de leucine non incorporée
- 3° pic: élution du colorant du MEM

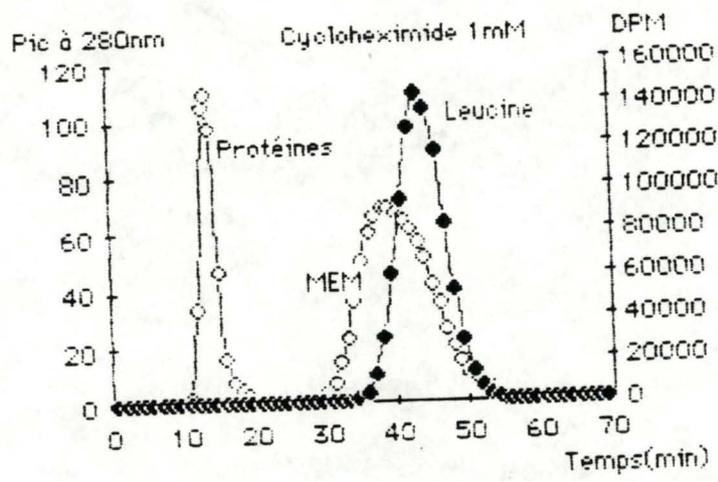


Figure n°43 : Chromatographie au temps 0 minutes, pour les surnageants.
 Addition de cycloheximide: 1mM
 1° pic: élution des protéines (35.8% du pic MEM)
 2° pic: élution de leucine non incorporée
 3° pic: élution du colorant du MEM

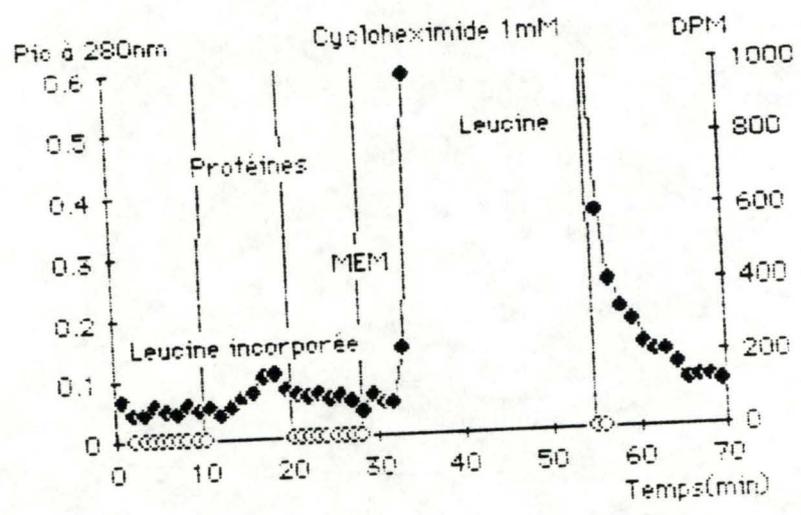


Figure n°44 : Chromatographie au temps 0 minutes. Addition de cycloheximide: 1mM
 Changement d'échelle
 1° pic: élution des protéines, à l'intérieur duquel existe un pic correspondant à la leucine radioactive incorporée
 2° pic: élution de leucine non incorporée
 3° pic: élution du colorant du MEM

- Le premier pic représente l'élution des protéines.
- Le second pic représente l'élution de la leucine non incorporée.
- Le troisième pic correspondrait au milieu MEM ou plutôt à l'élution du colorant indicateur qui se trouve dans ce milieu. La surface de ce pic ne varie pas car la quantité de milieu MEM est fixée au départ. Il peut donc servir de référence pour calculer la proportion du pic des protéines par rapport au pic de milieu MEM (32% du pic MEM).

La modification de l'échelle permet de visualiser un pic de radioactivité qui s'élue en même temps que les protéines (Fig38).

L'addition de leucine non radioactive lors de la chromatographie ne permet pas de déplacer le pic (de leucine marquée incorporée dans les protéines). Il semble donc que la leucine radioactive ne soit pas adsorbée de manière non spécifique sur les molécules du milieu (MEM) mais bien incorporée dans les protéines de ce milieu.

L'échantillon est déposé 30 minutes après l'addition de leucine radioactive. On observe sur les figures (39 et40) , une élévation du pic des protéines (34% du pic MEM), de même qu'une élévation du pic de leucine radioactive incorporée dans les protéines et une diminution du pic de leucine marquée libre.

L'échantillon est déposé 60 minutes après l'addition de leucine marquée. Une élévation du pic de protéines (37% du pic MEM) et du pic de leucine radioactive incorporée dans les protéines est constatée. On observe de même une diminution du pic de leucine radioactive libre (Fig 41et42).

1mM de cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique: § 1.2.6) est ajoutée à la suspension cellulaire lors de l'incubation de 30 minutes à 37°C avant l'addition de la leucine marquée. Les figures(43 et44) permettent d'observer une diminution du pic résultant de l'incorporation de leucine radioactive dans les protéines. Mais une élévation du pic de protéines (35.8% du pic de MEM) est constatée.

Résultats

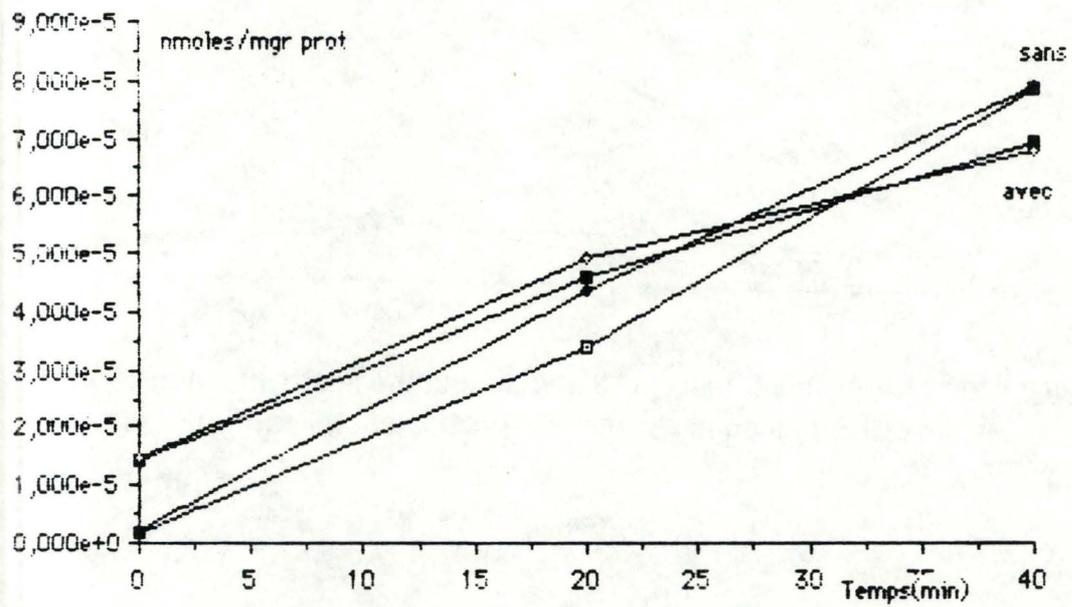


Figure n°45 : Effet de la privation de leucine non marquée dans le protocole d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines.

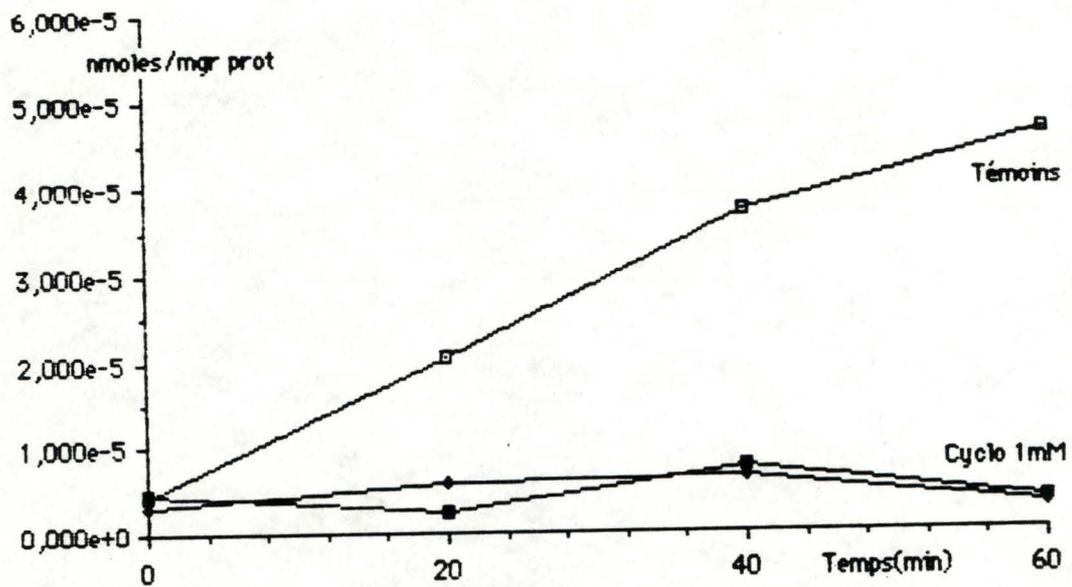


Figure n°46 : Cinétique d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines en présence de 1mM de cycloheximide.

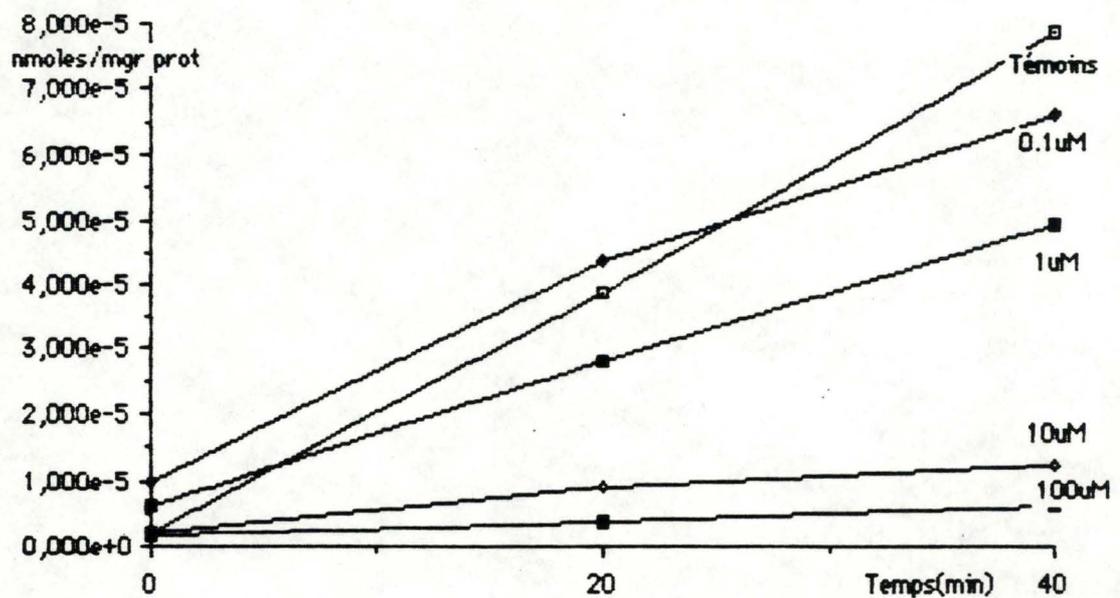


Figure n°47 : Cinétique d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines en présence d'une gamme de concentration de 0.1uM à 100uM en cycloheximide.

1.2.5. Importance de la privation de leucine dans l'incorporation de la leucine radioactive dans les protéines

Une différence entre les deux protocoles est la privation de leucine pour les cellules pendant 30 minutes avant l'addition de leucine radioactive (second protocole).

La fig(45) nous montre que les cellules incubées dans un milieu MEM et privées de leucine pendant 30 minutes possèdent une cinétique d'incorporation semblable aux hépatocytes qui n'ont pas subi cette privation.

1.2.6 Emploi de la Cycloheximide comme inhibiteur de la synthèse protéique.

Pour déterminer si la leucine radioactive est incorporée dans les protéines ou adsorbée sur des molécules cellulaires, il est utile d'employer des inhibiteurs de la synthèse protéique.

Plusieurs substances inhibent la synthèse protéique chez les hépatocytes isolés.

Seglen (1976) a constaté qu'une concentration de 1mM en cycloheximide inhibait la synthèse protéique jusqu'à 98%.

La figure (46) montre que la cinétique d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines dans les cellules incubées en présence de la cycloheximide (1mM) est très faible et proche de 0. Ce qui laisse supposer que l'inhibition est presque totale.

La figure (47) montre que l'inhibition de l'incorporation de leucine marquée dans les protéines est dépendante de la dose de cycloheximide dans une gamme de concentration de 0.1 μ M à 100 μ M.

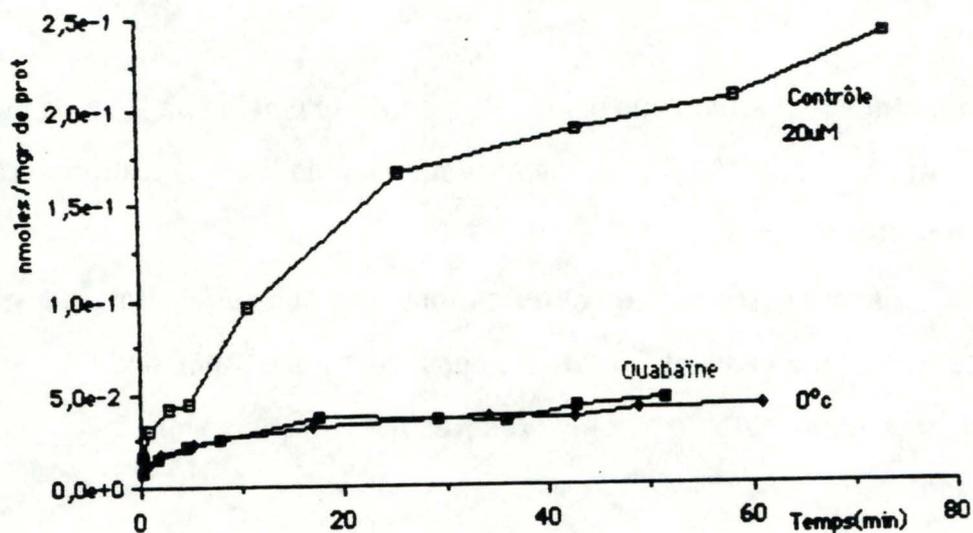


Figure n°48 : Entrée de leucine radioactive dans les cellules pour des hépatocytes contrôles incubés à 37°C, gardés à 0°C, et à 37°C en présence de 1mM d'ouabaine. Concentration en leucine 20uM.

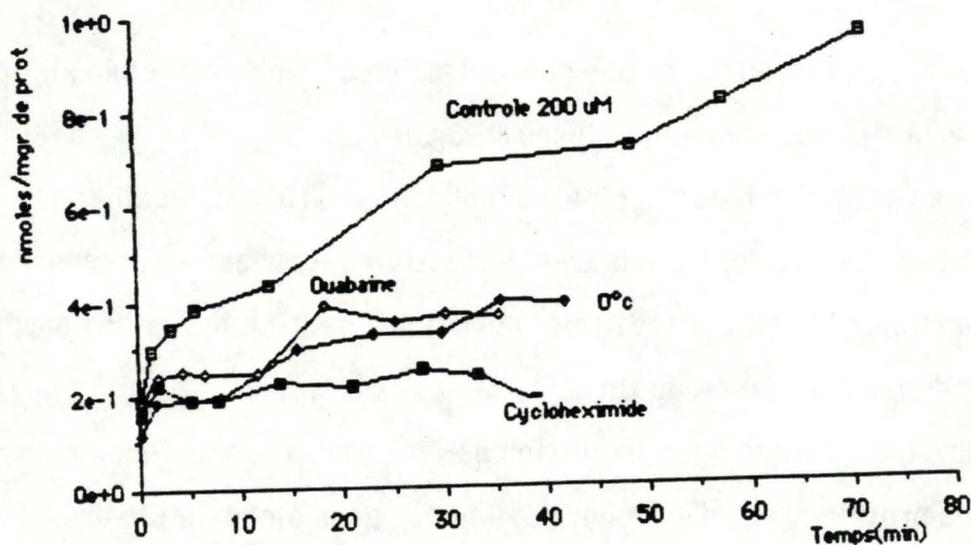


Figure n°49 : Entrée de leucine radioactive dans les cellules pour des hépatocytes contrôles incubés à 37°C, gardés à 0°C et à 37°C en présence de 1mM d'ouabaine et de 0.1mM de cycloheximide. Concentration en leucine 200uM.

1.3 CINETIQUE D'ENTREE DE LEUCINE DANS LES CELLULES

Afin de mesurer séparément la leucine cellulaire de la leucine totale, des microtests tubes sont utilisés.

La figure (48) nous montre que la quantité de leucine radioactive dans les cellules augmente jusqu'à 40 minutes.

Après ce laps de temps, un ralentissement de l'entrée de leucine marquée dans les cellules est mise en évidence pour une période de 60 minutes.

1.3.1. Effet de la température sur l'entrée de leucine radioactive dans les cellules.

L'entrée leucine dans les cellules est mesurée à 37°C et à 0°C.

-A 0°C, le métabolisme cellulaire est ralenti.

La figure (48) permet de remarquer que pour une concentration en leucine de 20 μ M, la quantité de leucine, qui est entrée dans les cellules, est plus faible d'environ 80% pour les cellules à 0°C, par rapport aux cellules à 37°C.

De même que pour une concentration de 200 μ M, l'entrée de leucine dans les cellules est réduite de 50% pour les hépatocytes à 0°C, par rapport aux hépatocytes à 37°C (Fig49).

1.3.2. Emploi de deux inhibiteurs de l'entrée de leucine radioactive dans les hépatocytes.

-La cycloheximide est utilisée comme premier inhibiteur. La figure (49) nous permet de constater que pour une concentration en cycloheximide de 0.1mM, l'entrée de leucine est inhibée à 65% par rapport aux cellules témoins.

-Le second inhibiteur employé est l'ouabaïne (1mM) (Fig48 et 49). C'est un stéroïde cardiotonique qui inhibe la réaction de déphosphorylation de

$\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPases (Stryer L, 1988).

Remarque:

Caractérisation des pompes à sodium: le transport actif de Na^+ vers l'extérieur de la cellule permet d'abaisser sa concentration intracellulaire. Le gradient transmembranaire fournirait l'énergie nécessaire au transport actif des acides aminés et des acides biliaires (Coche, 1988) vers l'intérieur de la cellule de K^+ et des aminoacides (Lehninger, 1976). Selon Stryer (1988), cette inhibition est maximale pour une concentration en ouabaïne de 10^{-8}M .

La figure (49) nous montre que pour une concentration en leucine froide de $20 \mu\text{M}$, et une concentration en ouabaïne de 1mM , l'entrée de leucine dans les hépatocytes est presque totalement inhibée à 75% par rapport aux cellules témoins.

Tandis que pour une concentration en leucine froide de $200 \mu\text{M}$, l'inhibition par l'addition d'ouabaïne 1mM est de 50%.

Un bref récapitulatif de ces résultats:

- Un protocole est sélectionné, grâce auquel on mesure une incorporation de leucine radioactive dans les protéines.
- Il semble que la leucine radioactive est incorporée dans les protéines et non adsorbée sur celles-ci. Plusieurs arguments, tels que la chromatographie et l'emploi de la cycloheximide, tendent à confirmer cette hypothèse.
- L'emploi de la cycloheximide dans la captation de leucine marquée, par les cellules, suggère quelques questions quant à son niveau d'action.

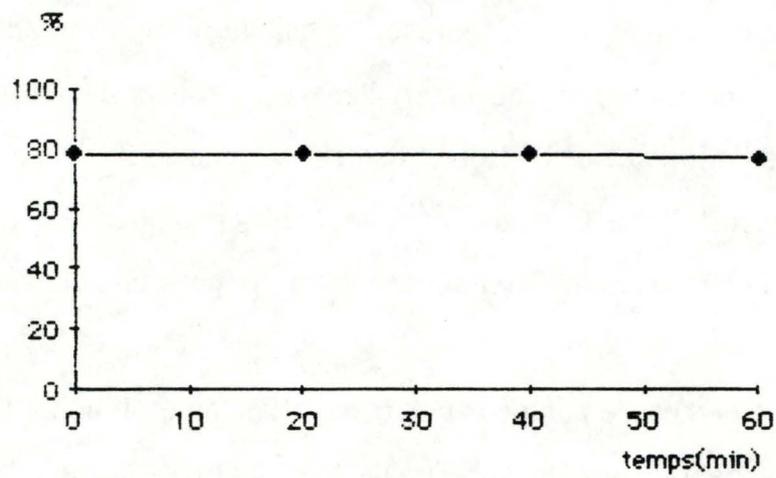


Figure n°50 : Estimation de la viabilité. Test à l'érythrosine chez des hépatocytes cryopréservés. (même suspension cellulaire de départ que figure24).

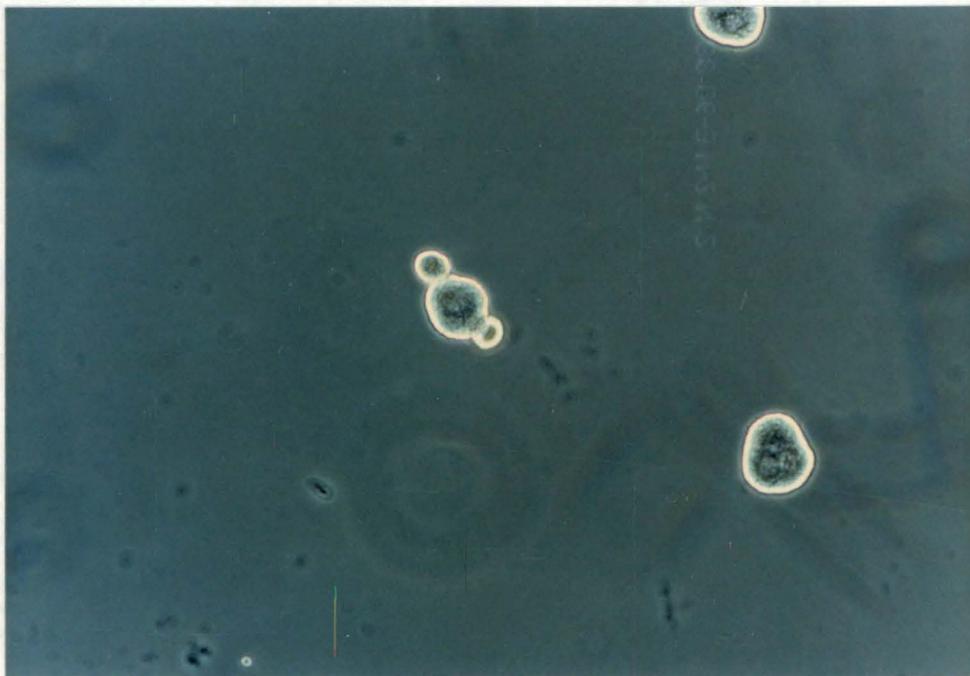


Figure n°51 : Suspension d'hépatocytes ayant été congelés 30 minutes à -13°C et réchauffés à 37°C .(microscope optique en contraste de phase)

2 LES HEPATOCYTES STOCKES A DES TEMPERATURES NEGATIVES

Les cellules ont été congelées selon un protocole décrit précédemment: elles sont stockées 30 minutes à -13°C et réchauffées à 37°C .

2.1 TESTS DE VIABILITE

Le stockage à basses températures peut provoquer certaines altérations membranaires et métaboliques. L'application de tests de viabilité est nécessaire pour dépister ces altérations avant de poursuivre des autres expériences.

2.1.1. Tests de viabilité structurelle

2.1.1.1. Tests à l'érythrosine

-Pour les cellules congelées 30 minutes à -13°C (avec cryoprotecteur), puis réchauffées, le nombre de cellules non colorées varie de 77 à 80 %. Il est à remarquer qu'un rendement peut être calculé à partir du pourcentage de cellules non colorées dans une suspension d'hépatocytes fraîchement isolés par rapport aux hépatocytes conservés 30 minutes à -13°C (Fig 50).

La congélation est efficace, au niveau viabilité structurelle, à 85%. Ces hépatocytes ayant été congelés peuvent présenter, au microscope optique, des expansions de la membrane cellulaire (Fig 51).

2.1.1.2. Dosage de la Lactate Déshydrogénase.

Il est intéressant d'observer d'une part, l'effet d'un stockage à des températures négatives en comparaison avec les hépatocytes conservés à 0°C , et d'autre part l'effet du réchauffement à 37°C pour des cellules

Résultats

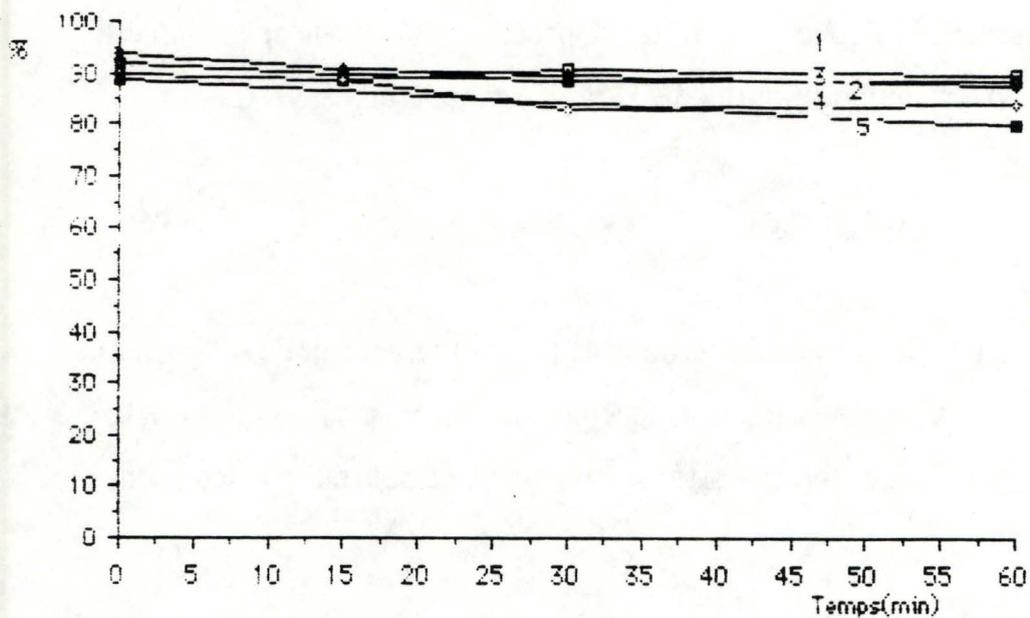


Figure n°52 : Estimation de la viabilité cellulaire à partir de la libération de LDH dans le milieu d'incubation, chez les hépatocytes cryopréservés (même suspension cellulaire de départ que figure 26)

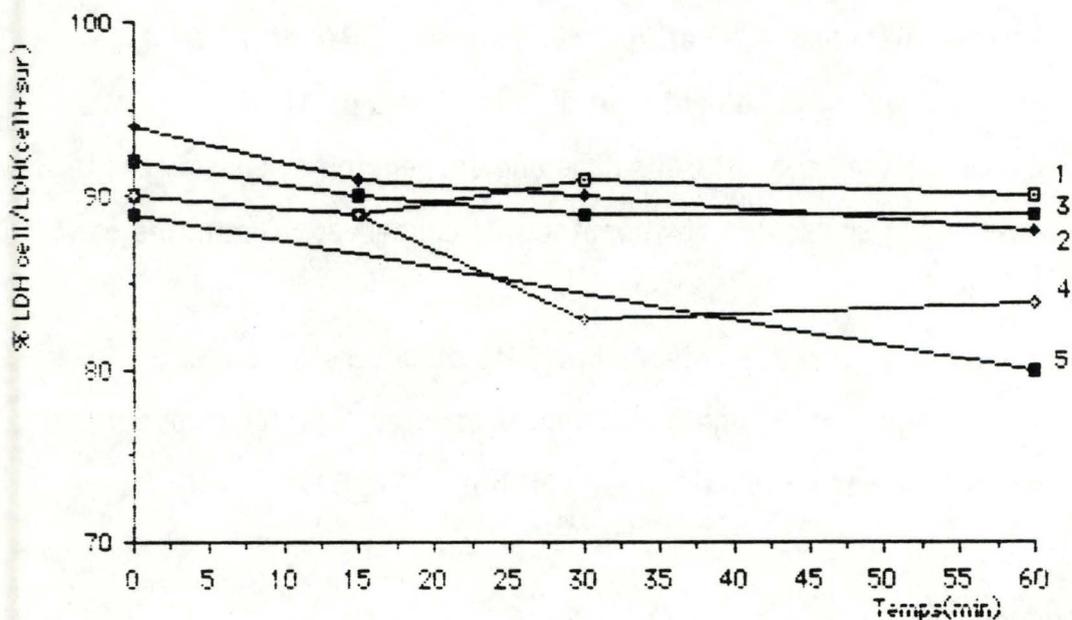


Figure n°52b : Estimation de la viabilité cellulaire à partir de la libération de LDH dans le milieu d'incubation, chez les hépatocytes congelés. (changement d'ordonnée)

stockées à -13°C pendant un laps de temps déterminé.

-Les mesures suivantes ont été réalisées (Fig 52 et 52b):

1°. Les cellules stockées à -13°C pendant 30 minutes, puis réchauffées à 37°C . On constate une perte de 2 % de LDH par les cellules

2°. Les cellules stockées à -13°C pendant 30 minutes, réchauffées à 37°C pendant 10 minutes et ensuite gardées à 0°C . Une perte de 6 % est observée.

3°. Les cellules stockées à -13°C pendant 20 heures et réchauffées à 37°C . On observe une perte de 4 % par les hépatocytes.

4°. Les cellules stockées à -13°C pendant 20 heures, réchauffées à 37°C pendant 10 minutes et ensuite maintenues à 0°C . On observe une baisse de 4%.

5°. Les cellules stockées à -13°C pendant 24 heures et réchauffées à 37°C . Une diminution un peu plus importante est constatée: 7%.

Pour ces cellules conservées à des températures négatives, la durée de leur stockage provoque au maximum une perte de 8% de LDH par les cellules, pour une conservation de 24 heures. Par ailleurs l'effet d'un réchauffement à 37°C ne semble peu affecter la perte de LDH par les hépatocytes.

2.1.2. Test d'intégrité métabolique

2.1.2.1. Cinétique du transport du taurocholate

-La cinétique du transport du taurocholate est réalisée également sur les hépatocytes stockés 30 minutes à -13°C . Par rapport aux cellules témoins, on observe une diminution de la "Vmax" de 61% et une augmentation du "Km" de 28% (Fig 27).

La modification de la cinétique de transport du taurocholate dans les cellules congelées en comparaison avec les cellules non congelées suggère

que les cellules refroidies captent moins le taurocholate que les cellules témoins, ou qu'il se produit une diminution du nombre de cellules vivantes. La différence entre les V_{max} de captation, suggère l'inactivation de certains transporteurs membranaires. La différence entre les constantes d'affinité: K_m , semble indiquer que l'affinité des transporteurs pour leur substrat a diminué chez les cellules congelées.

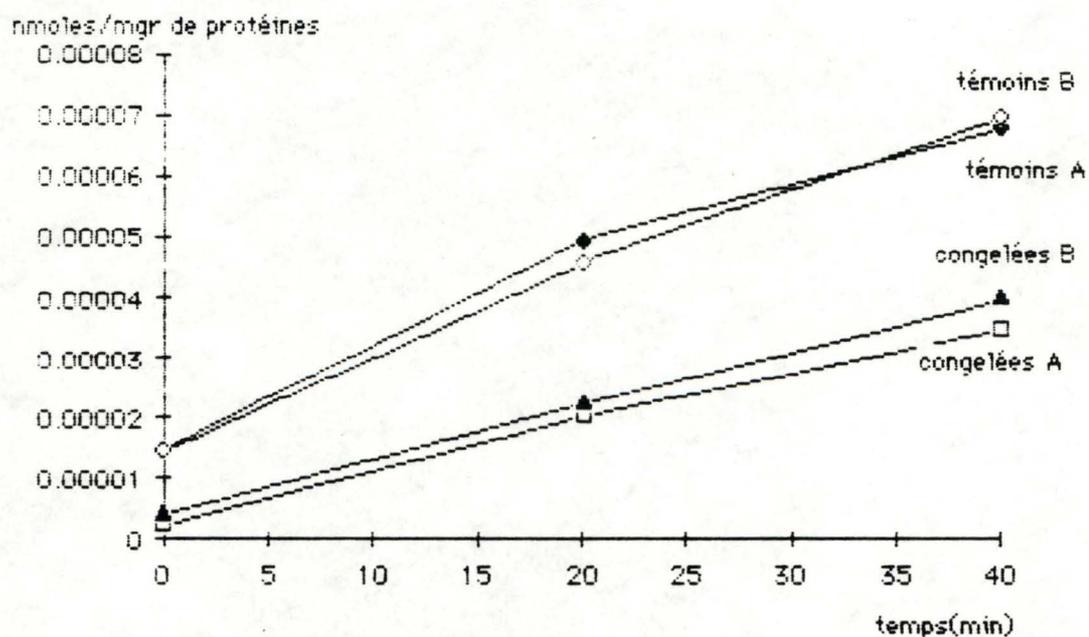


Figure n°53 : Cinétique d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines pour les hépatocytes congelés (30min à -13°C).
 Correction des résultats par un facteur de densité ou par standardisation par les mgr de protéines.
 (^3H) leucine: $0.5\mu\text{Ci/ml}$.
 Duplicats témoins A et B
 Duplicats congelés A et B

2.2 INCORPORATION DE LEUCINE RADIOACTIVE DANS LES PROTEINES CHEZ LES HEPATOCYTES CONGELES

Après un processus de cryopréservation et la mesure de la viabilité cellulaire décrite par les différents tests, le protocole d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales est appliqué.

La figure (53) permet de constater que le taux d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales des cellules stockées 30 minutes à -13°C , est réduit de 30% par rapport aux cellules non congelées.

Il semble donc, qu'à l'instar des autres tests de viabilité (intégrité membranaire et métabolique), les performances de synthèse protéique des hépatocytes soient altérées de façon minimale par une congélation de 30 minutes à -13°C .

Dans un premier temps, la mise au point d'un protocole d'incorporation de leucine radioactive a été réalisée pour des hépatocytes fraîchement isolés. Ce protocole fonctionnant de manière concluante, nous l'avons ensuite appliqué à des hépatocytes ayant été congelés. Nous avons obtenu des résultats en accord avec les différents tests de viabilité cellulaire.

DISCUSSION

Le but de ce travail était d'étudier la voie métabolique de synthèse protéique. Plus particulièrement, ceci consistait à mettre au point un protocole d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines chez les hépatocytes fraîchement isolés et appliquer ce protocole aux hépatocytes cryopréservés.

Dans un premier temps, nous nous intéresserons aux critères de viabilité des hépatocytes fraîchement isolés et des hépatocytes cryopréservés. Nous aborderons, par la suite, la problématique liée au choix du protocole et les arguments motivant ce choix. D'une part, nous évaluerons l'incorporation de la leucine radioactive dans les protéines ainsi que l'entrée de la leucine chez les hépatocytes fraîchement isolés, d'autre part, nous effectuerons une comparaison entre les cellules témoins et les hépatocytes congelés, au niveau de l'incorporation de leucine dans les protéines.

1 TESTS DE VIABILITE

Après un processus d'isolement des hépatocytes, une évaluation critique de leur viabilité est nécessaire avant de continuer un autre protocole d'expérience comme l'incorporation de la leucine radioactive dans les protéines.

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

1.1. TESTS DE VIABILITE STRUCTURELLE

1.1.1. Test à l'érythrosine rouge

Le test à l'érythrosine est un test qui permet d'apprécier rapidement la viabilité cellulaire. Les cellules viables excluent le colorant vital tandis que les cellules endommagées se colorent. Les cellules maintenues à 0°C, ne peuvent être stockées plus de trois heures, et sont employées après 30 minutes maximum, pour des expériences ultérieures.

Certains problèmes concernant la collagénase (enzyme employée lors la perfusion pour dissocier les tissus fibreux entourant les hépatocytes) se sont présentés au laboratoire: la collagénase Sigma, employée dans un premier temps, donnait une viabilité élevée :95%, mais avec un certain risque de floculation cellulaire. La collagénase Gibco, utilisée par la suite, a donné une viabilité de 80 à 90 % mais sans risque de floculation .

L'observation des hépatocytes fraîchement isolés nous indique que les cellules viables ont une forme sphérique, sans aucune altération membranaire détectable.

-Le stockage des hépatocytes à 0°C pendant quelques heures, ne provoque qu'une légère diminution de la viabilité, mais pas d'altération membranaire

-Après une congélation de 30 minutes à -13°C et un réchauffement, on

observe que les cellules viables excluant le colorant, ne présentent plus des formes parfaitement sphériques, et on constate une apparition d'expansions membranaires.

Ce test de viabilité à l'érythrosine est un peu subjectif car il demande une certaine habitude et il n'est pas toujours facile de décider si une cellule est colorée ou pas. Selon Elliot (1979), ce test peut être contesté, car il ne permet de détecter que des altérations graves dans les cellules, donc il est nécessaire d'employer un test complémentaire.

1.1.2. Dosage de la LDH

Ce dosage permet d'estimer la quantité de LDH perdue par les cellules. Il peut être considéré comme un second critère pour l'évaluation de l'intégrité membranaire

-On observe que pour des cellules témoins conservées à 0°C pendant 3 heures, l'activité de la LDH cellulaire ne diminue que très légèrement, ce qui suggère qu'il n'y a pas d'altérations membranaires.

Ce dosage confirme donc les résultats obtenus par le test d'exclusion du colorant vital.

-L'activité de la LDH des hépatocytes congelés est évaluée après réchauffement à 37°C, ou après un réchauffement à 37°C suivi d'un stockage à 0°C, et ceci après des périodes de congélation différentes. Des résultats similaires ont été obtenus pour des périodes de congélation de 30 minutes et 20 heures, ainsi que pour des cellules réchauffées à 37°C et pour des cellules stockées à 0°C après réchauffement à 37°C. La perte d'intégrité membranaire pour ces hépatocytes est de l'ordre de 3 à 6 % tandis que pour les cellules stockées 24 heures à -13°C, cette perte d'intégrité membranaire est de 7 %.

Cette diminution de LDH dans les cellules est graduelle. Si une décroissance soudaine apparaît, elle résulte d'une manipulation particulière, lors de l'excision du foie et du traitement mécanique pour

retirer la capsule de Glisson et récolter les hépatocytes (Baur, 1975). Pour les expériences ultérieures, il est important de choisir des conditions pour lesquelles moins de 10 % des enzymes cytoplasmique sont libérés. Ce dosage est très précis, mais il n'est pas forcément fiable, car il ne peut permettre vraisemblablement qu'apprécier l'intégrité membranaire, qui ne fait pas à elle seule, qu'une cellule est viable. Il faut donc compléter notre caractérisation des cellules par un test d'intégrité métabolique.

1.2. TEST D'INTEGRITE METABOLIQUE

1.2.1. Cinétique du transport du taurocholate

Les paramètres métaboliques sont primordiaux dans le cadre de cette recherche. Nous avons employé la cinétique du transport du taurocholate.

Ce processus implique des voies métaboliques spécifiques:

1°. La captation du taurocholate (Schwarz, 1975) est un processus dépendant de l'énergie métabolique. Elle est réalisée par des transporteurs, contre un gradient de concentration.

2°. Ce transport est saturable et peut être caractérisé par une courbe de Michaelis-Menten. Le calcul de V_{max} et de K_m permet de caractériser le transport du taurocholate dans des conditions expérimentales particulières.

3°. Il semble que l'excrétion au niveau canaliculaire, se fasse également par des transporteurs spécifiques (Schwarz, 1976).

Il s'agit donc d'un transport impliquant la membrane et des protéines cytoplasmiques. Il implique également des facteurs énergétiques.

L'étude du transport du taurocholate permet de mettre en évidence à la fois une altération des transporteurs membranaires et cytoplasmiques.

Ce critère ne permet pas d'apprécier le pourcentage de viabilité des cellules contrôles seules, mais bien des cellules congelées par rapport aux cellules contrôles.

Nous avons constaté que la vitesse maximale (V_{max}) du transport est plus faible pour les cellules congelées que pour les cellules témoins, tandis que le K_m est plus élevé pour les cellules stockées à des températures négatives.

L'abaissement de la V_{max} pourrait résulter d'une perte de transporteurs spécifiques. Cette augmentation du K_m pourrait résulter, quant à elle, d'une moindre affinité des transporteurs pour leur substrat. Toute altération de la viabilité cellulaire et des voies métaboliques se répercute sur le transport du taurocholate, car celui-ci fait aussi intervenir des transporteurs cytoplasmiques.

C'est donc un critère intéressant pour étudier l'effet d'un stockage à plus ou moins long terme, puisque la membrane, à elle seule, ne reflète pas toutes les altérations cellulaires. En outre, il est nécessaire de posséder un autre test d'intégrité métabolique, tel que la synthèse protéique.

2 INCORPORATION DE LA LEUCINE RADIOACTIVE DANS LES PROTEINES

2.1. CHOIX DU PROTOCOLE

-Le premier protocole (Van Bezooijen) fut rapidement abandonné, car on n'a pu détecter aucune incorporation de leucine marquée dans les protéines. Cette divergence par rapport à la littérature s'expliquerait par la grande variabilité induite par le lavage au TCA (trop aléatoire). Il semble impossible d'obtenir une séparation nette entre le surnageant et le culot après centrifugation et donc d'estimer de manière reproductible la quantité de leucine dans les protéines précipitées.

Ces problèmes ne nous permettent pas de continuer dans cette voie, et nous avons décidé de modifier ce protocole initial.

Les modifications de ce protocole furent: - a) d'employer des microtests tubes pour séparer le surnageant du culot cellulaire et de précipiter séparément ces fractions sur des filtres (Millititer H.A, 96 well Filtration Plate, Millipore). - b) d'employer du triton X100 pour labiliser les membranes des cellules et mesurer de cette manière l'incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales, après une précipitation au TCA sur les filtres.

Dans ces conditions, on remarque que:

a) L'incorporation de leucine radioactive dans les cellules est plus faible pour les cellules incubées à 37°C, que pour les cellules gardées à 0°C. Ces résultats suggèrent que les composantes du transport actif de la leucine dans les cellules seraient altérées. Selon Schreiber (1973), il existerait un échange libre de leucine entre les compartiments intra- et extra-cellulaires avec une rapide pénétration de la leucine et un équilibre entre les pools existants.

Discussion

b) La non linéarité de l'incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales, ne nous permet pas de donner une interprétation valable. Cette difficulté d'interprétation nous a justement poussé à soupçonner un nouveau problème technique: l'existence d'une diffusion entre les puits du système de filtration.

Cette diffusion interpuits fut observée par une expérience

complémentaire, qui consistait à déposer dans les puits de l' H_2O et de la leucine radioactive. Nous avons pu constater l'existence d'une diffusion latérale due à un manque d'étanchéité entre les puits.

Dès lors, ces résultats ne sont pas interprétables et il nous est impossible d'en tenir compte.

-Le second protocole ne présente pas de problèmes inhérent au lavage, car l'utilisation des tubes est remplacée par l'emploi de filtres (Wathman), ces filtres sont séparés de manière distincte les uns des autres, ce qui évite les problèmes d'étanchéité. La séparation est également plus fiable entre le surnageant et les cellules adsorbées sur le filtre.

2.2. CINÉTIQUE D'INCORPORATION DE LEUCINE RADIOACTIVE DANS LES PROTÉINES (HYPOTHÈSE ET ARGUMENTS)

L'incorporation de leucine marquée dans les protéines est linéaire jusqu'à 60 minutes. L'augmentation graduelle de la quantité de protéines marquées peut être due à une réelle stimulation de la synthèse protéique par les acides aminés, elle dépendrait du fait que: - soit le pool des acides aminés total est le pool précurseur pour la synthèse des protéines. - soit le pool extracellulaire est le précurseur de cette synthèse.

Puisque un milieu dépourvu de leucine est employé (MEM), et que les cellules sont privées de leucine pendant 30 minutes, il est vraisemblable que le pool intracellulaire d'acides aminés diminue avant l'addition de leucine radioactive. Dans ces conditions, le pool de leucine extracellulaire serait donc le précurseur de la synthèse protéique.

Discussion

Cette incorporation linéaire aboutit à un plateau, puis décroît après 120 minutes. Donc, un taux négatif d'incorporation est observé au bout de ces 2 heures.

Trois hypothèses sont émises pour expliquer ces observations :

-Une première hypothèse serait l'excrétion protéique, car les hépatocytes incorporent l'isotope radioactif et secrètent des protéines néoformées.

-Selon Crane L (1977), cette diminution progressive du taux d'incorporation serait due à l'intervention de différents processus de dégradation et de synthèse protéique à des taux variables. La leucine est incorporée dans des protéines qui sont lentement catabolisées. Néanmoins, les hépatocytes possèdent un taux de conversion considérable de leurs propres protéines pendant 20 heures (Crane, 1977).

-Une troisième hypothèse est émise, ne tenant plus compte du taux de synthèse, d'excrétion et de dégradation. Il est impossible de conserver des hépatocytes viables à 37°C pendant de longues périodes dans un milieu d'incubation et de surcroît sous agitation mécanique. Suivant le second protocole, les cellules restent 150 minutes dans le milieu d'incubation. La viabilité cellulaire baisse fortement suite à l'accumulation de produits résultant du catabolisme cellulaire, à l'épuisement du milieu, et à la diminution de la quantité d'oxygène.

La première hypothèse semble devoir être écartée, puisque les protéines nouvellement synthétisées sont récupérées dans le milieu, de sorte que l'isotope radioactif incorporé dans les protéines totales devrait continuer à croître et non se stabiliser.

L'étude de la chromatographie pour les surnageants présente un argument en faveur de l'hypothèse de l'excrétion protéique dans le milieu.

L'augmentation du pic de protéines au cours du temps, pourrait être due:

-soit à une augmentation de l'excrétion protéique. -soit à une libération accrue de protéines cellulaires (constitutives) par les cellules (comme la LDH).

Par ailleurs, l'étude chromatographique des surnageants avec addition de leucine non marquée, a permis d'observer une incorporation de leucine radioactive dans les protéines et non une adsorption non spécifiques de la leucine sur des molécules contenues dans le milieu. En effet, l'addition de leucine non marquée ne parvient pas à déplacer le pic d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines.

De plus, l'emploi de la cycloheximide comme inhibiteur de la synthèse protéique montre une diminution du pic d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines du surnageant. Mais en présence de cycloheximide, le pic de protéines s'élève.

Il faut émettre quelques réserves quant à l'interprétation de ce résultat. En effet, le surnageant a été élué immédiatement après l'ajout de leucine radioactive, de sorte que nous ne pouvons pas dans ce cas-ci parler d'une inhibition de synthèse protéique. Cette inhibition serait beaucoup trop rapide; dès lors, il s'agirait plutôt d'un artéfact expérimental.

2.3. IMPORTANCE DE LA PRIVATION DE LEUCINE NON MARQUEE AVANT L'ADDITION DE LEUCINE RADIOACTIVE DANS L'INCORPORATION DE LEUCINE DANS LES PROTEINES TOTALES

Le second protocole requiert une privation de leucine pendant 30 minutes avant l'addition de leucine radioactive, alors que le premier protocole ne l'impose pas. Cette différence nous a amenés à réfléchir sur la nécessité de cette privation de leucine. Il n'a pas été possible de mettre en évidence une différence notable d'incorporation chez les cellules ayant jeûné et n'ayant pas jeûné. Le fait d'imposer un jeûne aux cellules ne semble donc pas influencer la cinétique d'incorporation. Une supposition était émise concernant le jeûne cellulaire: sans leucine pendant 30 minutes, les

cellules réduirait leur pool intracellulaire de leucine en synthétisant des protéines à partir de ce pool.

La différence essentielle entre les deux protocoles employés, semble résulter dans l'utilisation d'un milieu d'incubation. Le Leibovitz L-15(1° protocole), enrichi en Glutamine contient 125mgr/ml de leucine tandis que le milieu MEM (2° protocole) ne contient pas du tout de leucine. Cette différence de milieu avec et sans leucine peut résoudre le problème de la privation de leucine.

2.4 . EMPLOI D'UN INHIBITEUR DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE

La cycloheximide est un antibiotique qui inhibe la synthèse protéique au niveau des ribosomes 80S des eucaryotes sans affecter les ribosomes 70S des procaryotes (Lehninger, 1984).

Une distinction doit être effectuée entre l'inhibition de la synthèse protéique et l'inhibition de l'entrée de leucine dans les cellules.

L'emploi de cycloheximide comme inhibiteur est controversé par certains auteurs (Schreiber, 1973). En effet, Schreiber n'observait pas de réduction de l'incorporation pour une concentration de 600 μM .

Une première expérience employant une concentration de 1mM a permis de constater une inhibition pratiquement totale de la synthèse protéique. De même, pour une concentration 100 μM , l'inhibition est presque totale. Cette inhibition est dose-dépendante de l'incorporation de leucine marquée dans les protéines dans une gamme de concentrations de 0.1 μM à 100 μM de cycloheximide. Ces résultats vont à l'encontre des observations de Schreiber (1973).

3 ENTREE DE LEUCINE RADIOACTIVE DANS LES CELLULES

L'utilisation des microtest tubes a permis une séparation nette entre le surnageant et le culot contenant les cellules. Dans ces conditions, le taux d'entrée de leucine dans les cellules est constant jusqu'à 40 minutes, ensuite il décroît progressivement. Ce taux décroissant d'entrée de leucine pourrait être le résultat d'un établissement de l'équilibre entre la captation et l'excrétion de leucine par les cellules.

3.1. EFFET DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION SUR L'ENTREE DE LEUCINE RADIOACTIVE DANS LES CELLULES

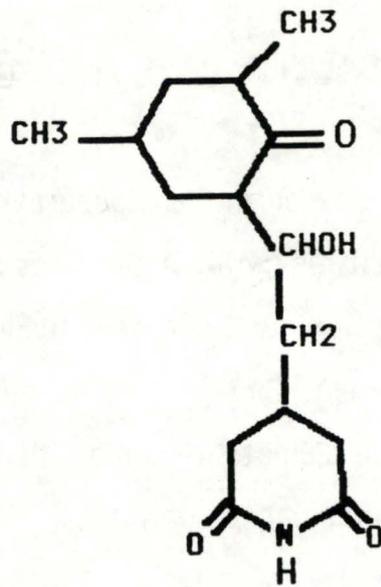
L'entrée de leucine radioactive dans les cellules incubées à 0°C est plus faible que dans les cellules incubées à 37°C.

Ces résultats sont compatibles avec l'existence d'un système de transport actif pour la L-leucine (Handlogten, 1982) qui n'est pas altéré lors de la perfusion avec de la collagénase. Or Schreiber (1973) a suggéré qu'il s'agissait d'un phénomène passif, d'un échange libre de leucine entre le pool intracellulaire et extracellulaire, et que le système de transport actif était perdu lors de la perfusion avec de la collagénase ou de l'hyaluronidase. D'autres auteurs (Takadera, 1983. Mohri, 1983 et Handlogten, 1982) ont démontré de différentes manières l'hétérogénéité du transport de la L-leucine, ce qui semble s'accorder avec nos résultats.

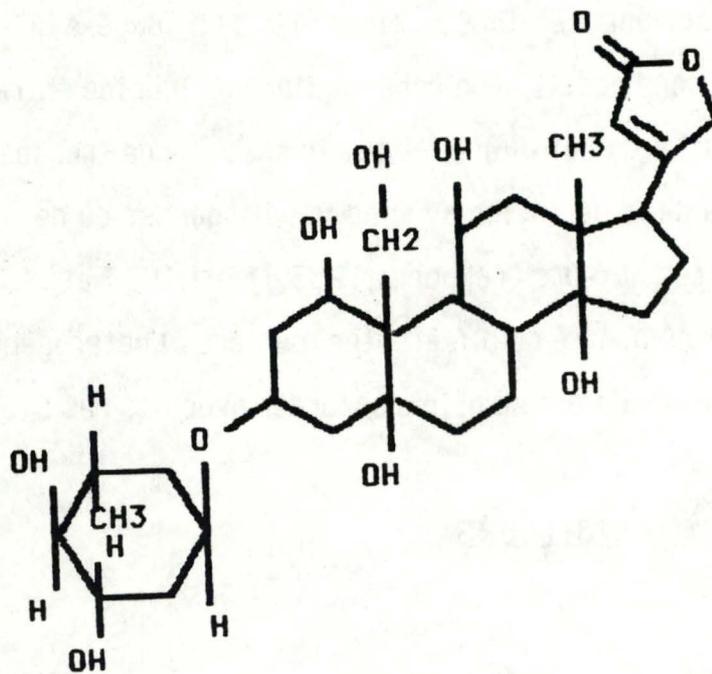
3.2. EMPLOI DE DEUX INHIBITEURS

3.2.1. La cycloheximide

Selon Seglen (1976), la cycloheximide inhibe la synthèse protéique. Nos résultats suggèrent que cette substance peut aussi agir en inhibant l'entrée de leucine radioactive dans les cellules:



Cycloheximide



Ouabaine

1° On a pu constater précédemment qu'à de faibles concentrations déjà, elle inhibait la synthèse protéique.

2° Pour des concentrations identiques (0.1mM), nous observons une inhibition de l'entrée de leucine dans les cellules, de même qu'une inhibition de l'incorporation de leucine radioactive dans les protéines. En fait, l'effet d'inhibition de synthèse pourrait être dû à un artéfact résultant d'une inhibition d'entrée. Mais, même si on considère que l'entrée de leucine est partiellement inhibée, cette inhibition ne serait pas limitante pour l'approvisionnement de la synthèse protéique.

3.2.2. L'ouabaïne

C'est un inhibiteur spécifique qui bloque la pompe Na^+K^+ ATPasique. L'adjonction de 1mM d'ouabaïne dans le milieu d'incubation inhibe partiellement l'entrée de la leucine marquée dans les hépatocytes. On peut donc penser que cette incorporation est caractérisée par une composante active, qui requiert une pompe ATPasique, et par une composante passive, qui n'est pas inhibée par l'ouabaïne. Mais certains auteurs (Schreiber 1973), montrent que les caractéristiques du transport actif seraient perdues lors de l'incorporation d'acides aminés, car les membranes cellulaires deviennent perméables aux différents composants. Cette inhibition de la pompe ATPasique par l'ouabaïne est à mettre en rapport avec l'inhibition du transport du taurocholate par l'ouabaïne (Coche, 1988).

4 INCORPORATION DE LEUCINE RADIOACTIVE DANS LES PROTEINES TOTALES CHEZ LES HEPATOCYTES CRYOPRESERVES

Les tests permettant d'estimer l'intégrité structurelle des cellules congelées étant concluants, on pouvait penser que les cellules stockées à des températures négatives étaient toujours capables d'incorporer des acides aminés et de synthétiser des protéines. Des tests d'intégrité métabolique devaient être fournis de surcroît. Les résultats obtenus nous permettent d'observer une incorporation de leucine radioactive dans les protéines, plus faible pour les cellules congelées que pour les cellules témoins. Cette diminution par rapport au contrôle est en accord avec les résultats obtenus par les différents tests d'intégrité membranaire, qui pour l'exclusion du colorant vital, montraient une légère diminution du pourcentage de viabilité et pour le dosage de la LDH, montraient une perte assez faible de l'activité de LDH cellulaire.

Cette diminution d'incorporation de leucine dans les protéines totales est aussi à mettre en rapport avec un autre critère métabolique: le taurocholate, dont le V_{max} diminue et le K_m augmente pour des cellules stockées à -13°C .

Cette diminution d'incorporation, chez les hépatocytes congelés, suggérait une altération au niveau membranaire plus faible qu'au niveau énergétique.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

1 CONCLUSIONS

L'objectif de ce travail était de mettre au point un protocole d'incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales pour les hépatocytes isolés.

Par plusieurs essais et modifications, nous avons pu mettre en évidence un protocole d'incorporation de leucine dans les protéines, fiable et reproductif.

1° La cinétique de leucine radioactive incorporée dans les protéines totales est linéaire jusqu'à 60 minutes, pour des cellules fraîchement isolées. Par chromatographie, nous avons pu observer que la leucine extracellulaire était incorporée dans les protéines et non adsorbée sur celles-ci.

Mais cette incorporation linéaire aboutit à un plateau après 120 minutes d'incubation. Cette diminution d'incorporation résulterait soit: de différents processus de dégradation et de synthèse protéique à des vitesses variables (Crane, 1977); soit d'une diminution de la viabilité cellulaire lors d'une incubation longue.

L'entrée de leucine radioactive dans les cellules est linéaire jusqu'à 40 minutes.

L'emploi d'un inhibiteur tel que l'*ouabaine* pour l'entrée de leucine dans les hépatocytes, a permis selon les résultats de suggérer une composante active inhibée par l'*ouabaine* et une composante passive, car l'*ouabaine* n'inhibe pas complètement l'entrée de leucine dans les cellules. Ces résultats sont en accord avec l'hétérogénéité du transport de la leucine, proposée par Takadera (1983), Mohri (1983) et Handlogten (1982).

L'emploi de la *cycloheximide* englobe deux phénomènes distincts:

l'inhibition de l'incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales et l'inhibition de l'entrée de leucine marquée dans les hépatocytes.

2° L'incorporation de leucine radioactive dans les protéines totales pour des hépatocytes stockés à -13°C pendant 30 minutes puis réchauffés à 37°C , est plus faible que pour les cellules conservées quelques heures à 0°C .

Cette diminution d'incorporation est à mettre en rapport avec les différents tests de viabilité cellulaire qui furent effectués.

-Les tests d'exclusion du colorant vital et le dosage de LDH, qui mettent en évidence l'intégrité membranaire, suggère que les cellules conservées quelques heures à 0°C ou stockées plus longtemps à des températures négatives, ne présentent que de faibles altérations membranaires et donc une faible mortalité cellulaire.

-La cinétique de transport du taurocholate radioactif est employée comme critère d'intégrité métabolique. Le transport du taurocholate pour les cellules congelées présente un V_{max} plus faible et un K_m plus élevé que pour les cellules témoins. Une hypothèse est formulée concernant l'inactivation des transporteurs spécifiques et la diminution d'affinité des transporteurs pour leur substrat.

2 PERSPECTIVES

Ce protocole d'incorporation a été mis au point dans les conditions d'un laboratoire terrestre. Il serait intéressant, maintenant, de l'adapter aux contraintes du laboratoire spatial, en employant des petits volumes et en travaillant en microgravité.

Une étude plus approfondie du transport spécifique de la leucine serait nécessaire. En effet, celui-ci est composé de différents mécanismes non encore bien définis.

Il serait aussi intéressant dans le cadre de recherche de L'ESA et la NASA: - d'étudier d'autres voies métaboliques telles que la gluconéogenèse. En effet, ce procédé anabolique fait intervenir des réactions enzymatiques spécifiques.

- d'améliorer ou de s'orienter vers un autre protocole de cryopréservation, car celui-ci n'est efficace que pour une congélation de 30 minutes. Or, les contraintes du spacelab nécessite un stockage des cellules à température négative pendant quelques jours.

REFERENCES

- Baur H., Kasperek S., Pfaff E. (1975)
 "Criteria of Viability of isolated liver cells."
 Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem 356 827-838
- Berry NM., Freind DS. (1969)
 "High-Yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells."
 The Journal of Cell Biology 43 507-520
- Bezooijen C.F.A. Van. (1978)
 "Cellular Basis of Liver Aging with Isolated Hepatocytes."
 Thesis for Doctoral Degree at the University of Utrecht.
- Carey MC. (1982)
 "The Enterohepatic Circulation."
 The Liver: Biology and pathobiology. 27 430-458
- Chen J C., Ove P., Lansing A. (1973)
 "In vitro synthesis of microsomal protein and albumin in young and old Rats."
 Biochimica et biophysica Acta 312 598-607
- Coche Thierry. (1982)
 "Les hépatocytes en suspension comme modèle expérimental pour l'étude cinétique des acides biliaires chez le Rat."
 Mémoire FNDP Namur
- Coche Thierry. (1988)
 Thèse de Doctorat FNDP Namur.
- Crane L J. Miller D L. (1977)
 "Plasma proteins synthesis by isolated Ray hepatocytes."
 J. Cell. Biol. 72 11-25
- Decat André . (1987)
 "Recherche d'un protocole de cryprotection des hépatocytes isolés, en vue de leur stockage pour l'étude de leur métabolisme dans le cadre du laboratoire spatial Européen."
 Mémoire FNDP Namur
- Derême Dominique. (1987)
 "Caractérisation des voies métaboliques de l'hépatocyte isolé en suspension dans le cadre des contraintes spécifiques du laboratoire spatial Européen.
 Incorporation de la leucine marquée dans les protéines."
 Mémoire FNDP Namur
- Dich J., Glud CN. (1976)
 "Effect of Glucagon on cyclic AMP, Albumin Metabolism and Incorporation of ¹⁴C-Leucine into Proteins in isolated Parenchymal Rat Liver Cells."
 Acta Physiol. 97 457-469
- Dubisy Françoise (1985)
 "Modification du transport des acides biliaires par des inhibiteurs du cytosquelette: étude morphologique et cinétique sur des hépatocytes isolés."
 Mémoire FNDP Namur
- Edwards K., Fleischer B., Dryburgh H., Fleischer S., Schreiber G. (1976)
 "The distribution of albumin precursor protein and albumin the liver."
 Biochemical and Biophysical Research Commun. 72(1)310-318

- Elford BC., Walter CR. (1972)
 "Effects of Electrolyte Composition and pH on the Structure and Function of Smooth Muscle Cooled to -79°C in Unfrozen Media."
 Cryobiology 9 82-100.
- Elliot Keith RF. (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."
 Gastroentérol. Clin. Biol. 6 500-508
- Erlinger S. (1982)
 "Bile Flow".
 The Liver: Biology and Pathobiology. 26 407-421
- Farrant J. (1977)
 "Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention."
 Cryobiology. 14 273-286
- Feytmans E., Coche t., Depiereux E. (1987)
 "Cryopreservation of Isolated Rat Hepatocytes for future Use in Spacelab Experiments - Preliminary Results."
 ESA SP-271 295-297
- Fuller B J., Grout BW., Woods RJ. (1982)
 "Biochemical and Ultrastructural Examination of cryopreserved Hepatocytes in Rat."
 Cryobiology. 19 493-502
- Gordon AH. (1973)
 "Factors Influencing Plasma Protein Synthesis by the Liver."
 Biochem. J. 90 18
- Handlogten ME., Weissbach L., Kilberg MS. (1982)
 "Heterogeneity of Na^+ -independent
 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid and leucine transport in isolated Rat hepatocytes in primary culture."
 Biochemical and Biophysical Research Commun.
- Inoue M., Kinne R., Tran T., Arias M. (1984)
 "Taurocholate Transport by Canalicular Membrane Vesicles. Evidence for the Presence of an Na-independent Transport System."
 J.Clin. Invest. 73 659-663
- Jacquez JA. (1972)
 "Kinetics of distribution of tracer-labeled materials."
 Compartmental Analysis in Biology and Medicine. 1 1-12
- Klaasen CD., Watkins JB. (1984)
 "Mechanisms of Bile Formation, Hepatic Uptake, and biliary Excretion."
 Pharmacological Reviews. 36 (1) 1-44
- Lehninger AL. (1985)
 Biochimie
 Flammarion Méd. Sc.
- Locksley E., Mc Gann. (1978)
 "Differing Actions of Penetrating and Nonpenetrating Cryoprotective Agents."
 Cryobiology. 15 382-390
- Locksley E., Mc Gann., Walterson MM. (1987)
 "Cryoprotection by Dimethyl Sulfoxide and Dimethyl Sulfone."
 Cryobiology. 24 11-16

- Mazur P. (1963)
"Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing."
The Journal of General Physiology. 47 347-365
- Mazur P. (1977)
"The Role of Intracellular Freezing in the Death of Cells Cooled at Supraoptimal Rates."
Cryobiology. 14 251-272
- Mazur P. (1984)
"Freezing of Living cells: Mechanisms and Implications."
Am. J. Physiol. 247 c-125 à c-142
- Mesland D. (1986)
"Flight result from the Biorack Experiments on the Spacelab D-1 Mission."
ESA Bulletin N° 47
- Miller JL. (1959)
"Protein Method."
Anal. Chem. 81 954
- Mohri T., Mitsumoto Y., Ohyashiki T. (1983)
"Leucine transport coupled to proton movement in membrane vesicles from Chang liver cells."
Biochemistry International. 7 (2) 159-167
- Novicki D., Irons GP., Strom SC., Jirtle R., Micalopoulos G. (1982)
"Cryopreservation of isolated Rat hepatocytes."
In Vitro 18(4) 393-399
- Reichen J., Simon FR. (1982)
"Cholestasis."
The Liver: Biology and Pathobiology. 46 785-797
- Rosa J., Rosa Ja., Fister v. (1985)
"Effects of Ethanol on AIB and Leucine Uptake, and on Leucine Incorporation into Protein in Cultured Hepatocytes."
Iugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta. 21 (2) 261-264
- Sandvig K., Olsnes S., Phil A. (1976)
"Kinetics of Binding of Toxic Lectins Abrin and Ricin to Surface Receptors of Human Cells."
J. of Biological Chemistry. 252 3977-3984
- Schreiber G., Schreiber M. (1973)
"The Preparation of Single Cell Suspension from Liver and their use for Study of Proteins."
Sub. Cell. Biochem. 2 321-383
- Schwarz LR., Buur R., Schwenk U., Pfaff E., Greim H. (1975)
"Uptake of Taurocholic Acid into Isolated Rat Liver Cells."
Eur. J. Biochem. 55 617-623
- Schwarz LR., Schwenk M., Pfaff E., Greim H. (1976)
"Excretion of Taurocholate from Isolated Hepatocytes."
Eur. J. Biochem. 71 369-373
- Schwarze PE., Seglen PO. (1980)
"Protein metabolism and survival of rat hepatocytes in early culture."
Experimental cell Research. 130 185-190
- Seglen PO. (1973)
"Preparation of Rat liver cells: II Effects of Ions and Chelators on Tissue Dispersion."
Experimental cell Research. 76 25-30

- Seglen PO. (1973)
 "Preparation of rat liver cells: III Enzymatic Requirements for Tissue Dispersion."
 Experimental Cell Research. 82 391-398
- Seglen PO. (1976)
 "Incorporation of radioactive amino acids into protein in isolated rat hepatocytes."
 Biochimica et Biophysica Acta. 442 391-404
- Stryer L. (1988)
 "Biochemistry."
 Library of Congress Cataloging-in-Publication Data
- Takadera T., Mohri T. (1982)
 "Effect of N-ethylmaleimide on leucine transport in Chang liver cell."
 Biochimica et Biophysica Acta. 691 293-299
- Takadera T., Mohri T. (1983)
 "Effect of N-ethylmaleimide on leucine transport in Chang liver cell."
 Biochimica et Biophysica Acta. 735 197-202
- Taylor MJ., Walter CR., Elford BC. (1978)
 "The pH-dependent Recovery of Smooth Muscle from Storage at -13°C in Unfrozen Media."
 Cryobiology. 15 452-460
- Taylor MJ., Pignat Y. (1982)
 "Practical Acid Dissociation Constants, Temperature Coefficients, and Buffer Capacities for some Biological Buffers in Solutions containing Dimethyl Sulfoxide between 25 and -12°C."
 Cryobiology. 19 99-109
- Taylor MJ. (1982)
 "The Role of pH and Buffer Capacity in the Recovery of Function of Smooth Muscle cooled to -13°C."
 Cryobiology. 19 585-601
- Van Deurs B., Sandvig K., Petersen OW., Olsnes S., Simons K. (1988)
 "Estimation of the Amount of Internalized Ricin That Reaches the trans-Golgi Network."
 J. of Cell Biology. 106 253-267
- Weigand K., Müller M., Orban J., Schreiber G. (1971)
 "Intact Endoplasmic Reticulum and Albumin Synthesis in Rat Liver Cell Suspensions."
 Experimental Cell Research. 67 27-32
- Weissbach L., Handlogten ME., Christensen HH., Kilberg MS. (1982)
 "Evidence for Two Na⁺-independent Neutral Amino Acid Transport Systems in Primary Cultures of Rat Hepatocytes."
 J. of Biological Chemistry. 257 (20)12006-12011
- Zahlten RM., Stratman FW. (1974)
 "The Isolation of Hormone-sensitive Rat Hepatocytes by a Modified Enzymatic Technique."
 Arch. of Bioch. and Biophys. 163 600-608