

50.376
1964
14.1

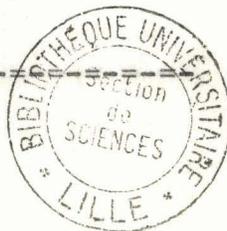
Exclu du prêt

50376
1964
14-1

MEMOIRE PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION
DU GRADE DE DOCTEUR-ès-SCIENCES D'ETAT
(Mention Chimie)

par

Monsieur Emile S E G A R D



1ère Thèse :

ETUDE SUR LES CELLULES LIBRES

- 1^o - Description d'un procédé original de préparation d'hépatocytes du foie de Rat .
- 2^o - Applications biochimiques .

2ème Thèse :

ETUDE CRITIQUE DES PROCÉDES DE PERMETHYLATION DES GLUCIDES - QUELQUES APPLICATIONS .

Ce travail a été effectué à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Laboratoire des Hétéroprotéides (Professeur J. MONTREUIL) du Service de Biochimie Cellulaire (Professeur P. BOULANGER) et Laboratoire de Microscopie Electronique (Professeur A. DUPONT) du Service de Biologie Cellulaire (Professeur J. DRIESSENS)) et dans le Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille (Professeur J. MONTREUIL) .

Il a pu être mené à bien grâce à l'aide de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique à laquelle nous adressons nos plus vifs remerciements.

LISTE DES PROFESSEURS DE LA FACULTE
DES SCIENCES DE LILLE

M.M. PARREAU, Doyen, Mathématiques
M.M. DURCHON, Assesseur, Zoologie

M.P. BACCHUS, Astronomie
M.R. BERKER, Mécanique des fluides
M.P. BONNEMAN-BEMIA, Chimie
M.A. BONTE, Géologie Appliquée
M.S. BOUISSET, Physiologie Animale
Melle C.CHAMFY, Mathématiques
M.P. CORSIN, Paléobotanique
M.M. DECUYPER, Mathématiques
M.P. DEDECKER, Mathématiques
M.R. DEFRETIN, Biologie marine
M.R. DEHORS, Physique industrielle
M.C. DELATRE, Géologie
M.P. DELEAU, Géologie
M.R. DESCOMBES, Calcul différentiel et intégral
M.R. GABILLARD, Radioélectricité et Electronique
M.J.E. GERMAIN, Chimie générale et Chimie Organique
M.Z. GLACET, Chimie
M.G. GONTIER, Mécanique des Fluides
M.H. HEIM DE BALSAC, Zoologie
M.J. HEUBEL, Chimie minérale
M.M. HOCQUETTE, Botanique
M.J. KAMPE DE FERIET, Mécanique des Fluides
M.A. LEBEGUE, Botanique
M.A. LEBRUN, Radioélectricité et Electronique
Melle J.LENOBLE, Physique
M.M.LUCQUIN, Chimie
M.E. MARION, Chimie
Melle S.MARQUET, Mathématiques
M.A. MARTINOT-LAGARDE, Mécanique des Fluides

M.R. MAUREL, Chimie
M.G. MENNESIER, Géologie
M.J. MONTRBUIL, Chimie Biologique
M.J.P. PEREZ, Physique
M. PHAM MAU QUAN, Mathématiques et Mécanique générale
M.G. POITOU, Algèbre supérieure
M.E. ROUELLE, Physique et Electricité industrielles
M.J. SAVARD, Chimie générale
M.F. SCHALLER, Zoologie
M.J. TILLIEU, Physique
M.G. TRIDOT, Chimie minérale appliquée
M.G. VIVIER, Zoologie
M.G. WATERLOT, Géologie et minéralogie
M.R. WERTHEIMER, Physique

LISTE DES MAITRES DE CONFERENCES DE LA
FACULTE DES SCIENCES DE LILLE

M.J. ANDRE, Zoologie
M.M. BECART, Physique
M. J.M. BLANCHARD, Chimie appliquée
M.V. BLOCH Psychophysiologie
M.P. BOILLET, Physique
M.P. BOURRIQUET, Botanique
M. BUI TRONG LIEU, Mathématiques
M.P. CELET, Géologie
M.E. COMBET, Mathématiques
M.M. DELHAYE, Chimie
Mme G. LEBEGUE, Physique
M.R. FOURET, Physique
M.J.C. HERZ, Calcul Numérique
M.P. HUARD DE LA MARRE, Calcul Numérique
M.D. LACOMBE, Mathématiques
M.J. DANZE, Géologie

M.R. LIEBART, Radioélectricité
M.R. LINDER, Botanique
M.F. MONTARIOL, Métallurgie
M.M. MORIAMEZ, Physique
M.J. POLVECHE, Géologie (détaché à Alger)
M.P. POUZET, Mathématiques
M.J. PROUVOST, Géologie
M.N. ROBY, Analyse Numérique
M.R. SCHILTZ, Physique
M.B. VAZART, Botanique

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION	1
INTERET DE L'ETUDE CHIMIQUE ET BIOCHIMIQUE DES CELLULES ISOLEES A PARTIR DES TISSUS	3
- <u>ETUDE BIOCHIMIQUE DES TISSUS TOTAUX</u>	4
DIFFICULTES RENCONTREES DANS L'ETUDE DES TISSUS TOTAUX	5
- <u>ETUDE DES FRACTIONS CELLULAIRES</u>	7
A - <u>HETEROGENEITE MORPHOLOGIQUE</u>	7
1°- <u>LE NOYAU</u>	7
2°- <u>LE CYTOPLASME ET SES INCLUSIONS</u>	9
3°- <u>LA MEMBRANE ET LA ZONE PERICELLULAIRE</u>	10
B - <u>HETEROGENEITE CHIMIQUE DE LA CELLULE</u>	12
1°- <u>LES METHODES DE FRACTIONNEMENT CELLULAIRE</u>	12
2°- <u>ETUDE CHIMIQUE DES FRACTIONS CYTOPLASMIQUES</u>	15
C - <u>BIOCHIMIE DES FRACTIONS CELLULAIRES</u>	16
D - <u>DIFFICULTES RENCONTREES AU COURS DE L'ETUDE DES FRACTIONS CYTOPLASMIQUES</u>	19
- <u>INTERET DE L'ETUDE DE LA CELLULE ISOLEE</u>	21
 BIOCHIMIE DE LA COHESION TISSULAIRE	 23
- <u>LA MEMBRANE CELLULAIRE ANIMALE</u>	25
A - <u>LA MEMBRANE DES CELLULES LIBRES DES MILIEUX BIOLOGIQUES</u>	26
1 - <u>LA MEMBRANE DE L'HEMATIE</u>	26
2 - <u>LA MEMBRANE DE LA CELLULE EN CULTURE</u>	28
B - <u>LA MEMBRANE DES CELLULES CONSTITUANT LES TISSUS</u>	29
1 - <u>HYPOTHESE DE LA COUCHE LIPOPROTEIQUE UNIQUE</u>	30
2 - <u>HYPOTHESE DE LA DOUBLE COUCHE LIPOPROTEIQUE</u>	33
- <u>MECANISMES DE L'ADHESION DES CELLULES DANS LES TISSUS ANIMAUX</u>	35
I - <u>L'ADHESION DES CELLULES PAR EFFETS DE MEMBRANE</u>	35
A - <u>THEORIE DE LA SUPPER-ACTION DE SCHMITT</u>	36
B - <u>THEORIE DE L'ADHESIVITE SPECIFIQUE DE WEISS</u>	38

	Pages
<u>II - L'ADHESION DES CELLULES PAR CIMENT INTERCELLULAIRE</u>	38
<u>A - ETUDE DU TISSU CONJONCTIF</u>	40
<u>1 - LES FIBRES CONJONCTIVES</u>	42
<u>2 - LA SUBSTANCE AMORPHE</u>	43
<u>B - ROLE DU CIMENT INTERCELLULAIRE DANS L'ADHESIVITE DES CELLULES</u>	45
<u>1 - INFLUENCE DU MILIEU SUR LA COHESION TISSULAIRE</u>	45
a - <u>Rôle des sels minéraux</u>	45
b - <u>Rôle des protéides</u>	46
c - <u>Influence du pH</u>	47
d - <u>Influence des détergents et de diverses substances</u>	47
<u>2 - HYPOTHESES CONCERNANT LE ROLE DU CIMENT INTERCELLULAIRE</u>	47
CONCLUSION	49
LES METHODES DE PREPARATION DE CELLULES A PARTIR DES TISSUS ANIMAUX ET LEURS APPLICATIONS - REVUE GENERALE	50
- <u>METHODES DE DISSOCIATION DES TISSUS ANIMAUX</u>	51
<u>I - METHODES DE DISSOCIATION ENZYMATIQUE</u>	52
<u>A - UTILISATION D'ENZYMES AGISSANT SUR LES FORMATIONS FIBREUSES PROTEIQUES</u>	52
<u>B - UTILISATION D'ENZYMES HYDROLYSANT LA SUBSTANCE FONDAMENTALE</u>	53
1 - <u>Action des mucoses</u>	53
2 - <u>Action des protéoses</u>	54
<u>II - METHODES DE DISSOCIATION CHIMIQUE</u>	57
<u>A - AGENTS COMPLEXANT LE CALCIUM</u>	57
<u>B - AGENTS PHYSICOCHEMISQUES DIVERS</u>	59
<u>III - METHODES DE DISSOCIATION MECANIQUE</u>	61

	<u>Pages</u>
- <u>APPLICATIONS DES METHODES DE DISSOCIATION TISSULAIRE</u>	63
<u>I - ETUDES BIOLOGIQUES</u>	63
<u>A - TRAVAUX CONCERNANT L'ADHESION CELLULAIRE</u>	64
<u>1 - Les facteurs de la dissociation spontanée des tissus et le problème de la métastase</u>	64
<u>2 - La réassociation des cellules "libres" et la reconstitution des tissus</u>	66
<u>B - TRAVAUX ORIENTES VERS L'ETUDE DES MEMBRANES CELLULAIRES</u>	69
<u>C - ETUDE DE LA PROLIFERATION EN CULTURE DES CELLULES ISOLEES</u>	71
<u>II - ETUDES BIOCHIMIQUES</u>	73
<u>A - ETUDE DE LA RESPIRATION CELLULAIRE</u>	74
<u>B - ETUDE DU METABOLISME DES ACIDES NUCLEIQUES</u>	76
<u>C - ETUDE DU METABOLISME DES PROTEINES</u>	77
<u>D - ETUDE DU METABOLISME DE DIVERSES SUBSTANCES</u>	78
1 - Métabolisme des anticorps	78
2 - Métabolisme des constituants sériques	79
- <u>CONCLUSIONS</u>	79
TRAVAUX PERSONNELS	82
- <u>ETUDE CRITIQUE DES METHODES CLASSIQUES DE DISSOCIATION DES TISSUS</u>	84
<u>I - PROTOCOLES EXPERIMENTAUX</u>	85
<u>A - METHODES DE DIGESTION TRYPSIQUE</u>	85
1 - Méthode de DULBECCO et VOGT	85
2 - Méthode de ESSNER et coll.	85
<u>B - METHODES DE DISSOCIATION PAR AGENTS CHIMIQUES</u>	86
1 - Méthode de perfusion par le citrate de sodium ou le versène de ANDERSON	86
2 - Méthode de perfusion de BRANSTER et MORTON	86
3 - Méthode d'incubation de LONGMUIR et REES	86
<u>C - METHODE DE DILACERATION MECANIQUE DE KALTENBACH</u>	87
<u>II - CRITIQUE DES PROTOCOLES EXPERIMENTAUX</u>	
<u>CHOIX DE LA METHODE DE LONGMUIR ET REES</u>	88

	<u>Pages</u>
<u>A - DESCRIPTION DES CRITERES TECHNIQUES</u>	88
1 - Temps de préparation	88
2 - Rendement	88
3 - Pureté des préparations	89
4 - Généralisation de la méthode	89
<u>B - RESULTATS</u>	90
<u>III - ETUDE DE L'INTEGRITE DES CELLULES OBTENUES PAR LA METHODE</u> <u>DE LONGMUIR ET REES</u>	91
<u>A - DESCRIPTION DES CRITERES D'INTEGRITE</u>	91
<u>1 - CRITERES MORPHOLOGIQUES</u>	91
a - OBSERVATIONS AU MICROSCOPE PHOTONIQUE	92
b - OBSERVATIONS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE	92
<u>2 - CRITERES BIOCHIMIQUES</u>	93
a - MESURE DE L'ACTIVITE RESPIRATOIRE DES CELLULES	93
b - DETERMINATION DE LA COMPOSITION MOLLAIRE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES	94
c - ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES	95
<u>3 - CRITERES BIOLOGIQUES</u>	97
<u>B - RESULTATS CONCERNANT L'ETUDE DE L'INTEGRITE DES CELLULES</u> <u>OBTENUES PAR LA METHODE DE LONGMUIR ET REES</u>	97
<u>1 - ETUDE MORPHOLOGIQUE</u>	97
<u>CONCLUSIONS CONCERNANT LES OBSERVATIONS</u> <u>MICROSCOPIQUES</u>	104
<u>2 - ETUDE BIOCHIMIQUE</u>	106
<u>3 - ETUDE BIOLOGIQUE</u>	110
<u>C - TENTATIVES D'AMELIORATION DE LA METHODE DE LONGMUIR</u> <u>ET REES</u>	110
<u>D - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA METHODE DE LONGMUIR</u> <u>ET REES</u>	111
<u>- MISE AU POINT ET DESCRIPTION DE METHODES PERSONNELLES</u>	115
<u>I - METHODE DE DISSOCIATION DES TISSUS DANS UNE SOLUTION SALINE</u> <u>"METHODE AU RINGER-CITRATE-HYALURONIDASE"</u>	116
<u>A - MODE OPERATOIRE</u>	116
<u>B - RESULTATS CONCERNANT L'ETUDE DE L'INTEGRITE DES CELLULES</u> <u>OBTENUES PAR LA "METHODE AU RINGER-CITRATE-HYALURONIDASE"</u>	116

	Pages
<u>1 - ETUDE MORPHOLOGIQUE</u>	116
<u>CONCLUSIONS CONCERNANT LES OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES</u>	123
<u>2 - ETUDE BIOCHIMIQUE</u>	123
<u>3 - ETUDE BIOLOGIQUE</u>	123
<u>C - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA "METHODE AU RINGER-CITRATE-HYALURONIDASE"</u>	124
<u>II - METHODES DE DISSOCIATION DES TISSUS DANS LE SERUM</u>	125
<u>1 - METHODE AU SERUM CITRATE</u>	125
<u>A - MODE OPERATOIRE</u>	125
<u>B - RESULTATS CONCERNANT L'INTEGRITE DES CELLULES OBTENUES</u>	125
<u>1 - ETUDE MORPHOLOGIQUE</u>	125
<u>CONCLUSIONS CONCERNANT LES OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES</u>	130
<u>2 - ETUDE BIOCHIMIQUE</u>	130
<u>3 - ETUDE BIOLOGIQUE</u>	130
<u>C - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA METHODE AU SERUM-CITRATE</u>	131
<u>2 - METHODE AU SERUM CITRATE-ATP-Mn⁺⁺</u>	132
<u>A - MODE OPERATOIRE</u>	132
<u>B - RESULTATS CONCERNANT L'INTEGRITE DES CELLULES OBTENUES</u>	132
<u>1 - ETUDE MORPHOLOGIQUE</u>	132
<u>2 - ETUDE BIOCHIMIQUE</u>	135
<u>3 - ETUDE BIOLOGIQUE</u>	135
<u>C - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA METHODE AU SERUM-CITRATE-ATP-Mn⁺⁺</u>	136
<u>D - TENTATIVES DE GENERALISATION DE LA METHODE</u>	136
<u>- APPLICATIONS BIOCHIMIQUES</u>	138
<u>I - ETUDES SUR LA RESPIRATION DES CELLULES ISOLEES</u>	139
UTILISATION PAR LES CELLULES LIBRES DU GLUCOSE ET DES CONSTITUANTS DE LA CHAINE D'EMBDEN-MEYERHOF ET DU CYCLE DE KREBS	139
<u>A - UTILISATION DU GLUCOSE</u>	139
<u>B - UTILISATION DES CONSTITUANTS DE LA CHAINE D'EMBDEN-MEYERHOF ET DU CYCLE DE KREBS</u>	146

	Pages
<u>C - RECHERCHES SUR LE METABOLISME DE L'ACIDE SUCCINIQUE</u>	152
1°- Influence de la concentration en succinate	152
2°- Influence des cations divalents	152
3°- Influence de l'ATP et de l'ADP	152
4°- Influence du mélange ATP + ions Mn ⁺⁺	156
5°- Influence de la composition et de la nature des milieux d'incubation	158
<u>II - ETUDES SUR LE METABOLISME DES ACIDES NUCLEIQUES</u>	161
<u>A - EXPERIMENTATION AVEC L'ACIDE RADIOPHOSPHORIQUE</u>	161
1 - <u>ETUDE DE L'INCORPORATION DE L'ACIDE RADIOPHOSPHORIQUE DANS LES ACIDES RIBONUCLEIQUES D'HEPATOCYTES ISOLES PAR DIFFERENTS PROCEDES</u>	161
2 - <u>ETUDE DES CONDITIONS D'INCORPORATION DE L'ACIDE RADIOPHOSPHORIQUE DANS LES HEPATOCYTES LIBRES</u>	164
a - <u>Influence de l'oxygène</u>	164
b - <u>Influence du Sérum</u>	164
<u>B - ESPERIMENTATIONS AVEC LE ¹⁴C-ACIDE OROTIQUE - HISTORADIOGRAPHIE DES HEPATOCYTES MARQUES</u>	166
1 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	166
a - <u>Incubation des hépatocytes</u>	166
b - <u>Préparation des historadiogrammes</u>	166
2 - <u>RESULTATS</u>	168
3 - <u>CONCLUSIONS</u>	168
<u>III - ETUDES SUR LE METABOLISME DES PROTEINES</u>	170
1 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	170
a - <u>Incubation des hépatocytes</u>	170
b - <u>Préparation des autoradiographies d'électrophorégrammes</u>	170
2 - <u>RESULTATS</u>	171
a - <u>Autoradiographie des électrophorégrammes</u>	171
b - <u>Historadiographie</u>	171
3 - <u>CONCLUSIONS</u>	171
 CONCLUSIONS	 174
 BIBLIOGRAPHIE	 179

I N T R O D U C T I O N

Les recherches sur la morphologie, l'organisation et la physiologie des tissus, puis des cellules, furent d'abord purement biologiques. Plus tard, la biochimie s'est intéressée aux mêmes problèmes et cette science nouvelle qu'est la biochimie cellulaire s'est rapidement développée en quelques années.

L'analyse chimique, appliquée aux tissus, a permis d'étudier la composition, la structure et le métabolisme des constituants totaux des organes. Puis, grâce à la mise au point de méthodes de fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle, le rôle exact de chacune des inclusions cytoplasmiques a été précisé. Depuis quelques années, une nouvelle tendance se manifeste : on cherche, en effet, à isoler des cellules vivantes par des méthodes dites de dissociation tissulaire.

Devant l'intérêt considérable que représente l'étude biochimique et biologique des cellules isolées (ou cellules libérées), nous avons entrepris, depuis plusieurs années, une série de recherches sur ce matériel intéressant.

Avant de rendre compte de notre contribution personnelle à ce travail de mise au point, nous en exposerons les bases théoriques et historiques. Nous envisagerons donc successivement :

- 1°- l'intérêt de l'étude chimique et biochimique de la cellule isolée ;
- 2°- les données actuelles concernant la cohésion tissulaire ;
- 3°- l'historique des méthodes de dissociation tissulaire.

Nous exposerons ensuite notre travail personnel. Dans un premier chapitre, nous apporterons les résultats de l'étude critique des différentes méthodes classiques de dissociation tissulaire que nous avons effectuée. Nous décrirons ensuite une méthode personnelle de dissociation des tissus que nous

avons été amené à mettre au point et qui nous fournit - contrairement aux autres procédés - des cellules biologiquement et biochimiquement intactes. Enfin, nous préciserons les résultats d'ordre biochimique que nous avons obtenus avec nos préparations de cellules isolées, ainsi que les perspectives que nous offrent l'étude de ces dernières.

On a depuis longtemps caractérisé, par les méthodes classiques d'analyse élémentaire, les différents constituants de la matière vivante. A côté de l'eau et des sels minéraux, trois classes de substances spécifiquement biologiques ont été mises en évidence : les glucides, les lipides et les protides. Sur ces bases, les travaux se poursuivent depuis près d'un siècle en suivant une double orientation. L'une est purement chimique : elle concerne l'identification, la répartition et la localisation de ces substances dans les organismes ; l'autre est biochimique : elle concerne le métabolisme de ces substances, c'est-à-dire l'ensemble des réactions de dégradation (catabolisme) et de synthèse (anabolisme) qui se réalisent continuellement chez l'être vivant.

Les études ont porté principalement, jusqu'à présent, sur les tissus totaux, dans le but de localiser et d'expliquer les fonctions propres de ces derniers. Plus récemment, les travaux se sont orientés vers l'étude des inclusions cytoplasmiques et peu à peu ont été connues des réactions métaboliques qui s'effectuent à l'intérieur même de la cellule. Ainsi se précise le fonctionnement interne de celle-ci.

ETUDE BIOCHIMIQUE DES TISSUS TOTAUX

Un tissu est essentiellement une association de cellules qui possède une ou plusieurs fonctions biologiques spécifiques qui lui permettent de jouer un rôle précis dans les mécanismes vitaux de l'organisme. Les cellules sont, en général, associées très étroitement pour former des organes, que le sang, tissu liquide de relation, vient irriguer. Il leur apporte ainsi des éléments nutritifs et permet, en outre, les échanges avec le reste de l'organisme. Les tissus renferment donc toujours des quantités variables de sang, auquel on réserve, pour cette raison, la dénomination générale de "milieu intérieur". On sait, par exemple, que le foie renferme environ 30 p.100 de sang.

DIFFICULTES RENCONTREES DANS L'ETUDE DES TISSUS TOTAUX1°- Etudes chimiques

L'étude chimique spécifique des constituants totaux d'un tissu n'est possible qu'à la condition d'éliminer, au préalable, les composés sanguins. Cette condition est plus impérative encore dans le cas où certaines substances sont présentes, à la fois, dans le sang et dans les tissus. Il est, par exemple, extrêmement difficile, sinon impossible, d'étudier les protéides spécifiques d'un tissu, car l'extrait protéique fournit toujours un mélange de protéides sériques et de protéides tissulaires, dont la séparation est pratiquement irréalisable. De même, une partie des constituants de la fraction acido-soluble d'un tissu est toujours souillée de composés sériques dont la présence fausse les résultats. Enfin, l'étude très intéressante de la localisation intracellulaire du lieu de synthèse des protéides sériques demeure impossible à partir d'un tissu, s'il n'a pas été préalablement débarrassé du sang qu'il contient.

L'élimination totale du sang d'un tissu est très difficilement réalisable. On peut la tenter en perfusant l'organe. Malheureusement les méthodes de perfusion, - qui ne sont d'ailleurs pas toujours possibles, notamment dans le cas d'organes "clos" comme le muscle - , restent incomplètes. Des modifications biochimiques peuvent, en outre, se produire pendant le temps parfois très long de la perfusion. Enfin, une perfusion, en supposant qu'elle soit parfaite, ne parviendra jamais à éliminer l'armature conjonctive qui assure la forme et l'organisation du tissu et la présence des constituants protéiques de ce tissu conjonctif sera une nouvelle cause d'interférence au cours des études chimiques.

2°- Etudes métaboliques

La présence de constituants sériques sera bien plus gênante encore pour les études métaboliques réalisées in vitro.

Il serait, par exemple, important de pouvoir étudier le métabolisme endocellulaire des organes à l'abri de l'influence de l'ensemble de l'organisme, de manière, en particulier, à préciser le rôle exact des divers activateurs et inhibiteurs métaboliques. L'obtention d'un matériel vivant, totalement

débarrassé du sang, permettrait, en outre, de préciser le rôle exact de chacun des constituants sériques dans la vie cellulaire. On sait, d'autre part, que les études de respiration, réalisées sur des coupes de tissus, sont fortement influencées par la présence du sang et ne rendent pas compte de la respiration proprement endocellulaire. En effet, l'hémoglobine agit sur les échanges respiratoires en fixant l'oxygène dans une proportion beaucoup plus importante que celle de l'oxygène dissous dans le milieu liquide. Elle fixe l'oxygène par ses atomes de fer et possède une capacité respiratoire (pouvoir oxyphorique) qui est directement liée aux pressions partielles d'oxygène et de gaz carbonique et, corrélativement, à l'équilibre acido-basique. On conçoit ainsi très aisément que, dans les mesures manométriques, la présence d'une proportion toujours variable de sang interfère fortement avec le milieu artificiel choisi sans qu'il soit possible de préciser quantitativement les influences réciproques de l'un et de l'autre vis-à-vis des échanges gazeux entre l'atmosphère et les cellules. En outre, la présence, dans le sang, du glucose, de l'acide lactique, de l'acide pyruvique et de divers enzymes modifie la composition en substances énergétiques du milieu respiratoire expérimental.

Enfin, il paraît impossible de prétendre réaliser in vitro des études du métabolisme spécifique d'une substance déterminée dans un organe. C'est ainsi, par exemple, que l'étude du métabolisme du lactose par la glande mammaire est rendue impossible par suite de la présence dans le sang de certains produits de son métabolisme intermédiaire comme le glucose, l'acide pyruvique, les phosphatases.

Il serait donc souhaitable d'éliminer totalement le sang et le tissu conjonctif d'un organe, de manière à obtenir des cellules entièrement "déconnectées" du reste de l'organisme et à permettre d'effectuer des études plus rigoureuses, autant du point de vue chimique que du point de vue métabolique.

La découverte des méthodes de "fractionnement cellulaire" a contribué à résoudre certaines de ces questions particulières. Nous verrons cependant que de nombreuses difficultés subsistent.

ETUDE BIOCHIMIQUE DES INCLUSIONS CYTOPLASMIQUES

Les méthodes de fractionnement cellulaire, dont l'idée première revient à MIESCHER (1871) (1), ont fait apparaître l'hétérogénéité biochimique de la cellule qui s'est précisée simultanément du point de vue morphologique, notamment depuis l'application de la microscopie électronique qui a révélé la présence, dans le cytoplasme des cellules, de nombreuses particules de types différents. Ces particules sont extrêmement sensibles à l'action des substances habituellement utilisées dans les expériences de dissociation des tissus. La conservation de leur morphologie est un excellent critère d'intégrité de la cellule auquel nous avons eu recours dans notre expérimentation. C'est pourquoi il ne nous a pas paru superflu de préciser la terminologie et les principales propriétés des inclusions cytoplasmiques.

A - HETEROGENEITE MORPHOLOGIQUE DE LA CELLULE

On retrouve pratiquement dans toutes les cellules animales étudiées in situ les mêmes inclusions cytoplasmiques. Leur forme peut varier d'un type cellulaire à un autre, mais leur diversité est immuable. La figure 1 nous montre les différentes particules cytoplasmiques de la cellule hépatique du Rat normal, telles qu'elles apparaissent à l'examen au microscope électronique. On peut essentiellement y distinguer les trois zones suivantes :

- 1) le noyau et la zone périnucléaire , 2) le cytoplasme et ses inclusions,
- 3) la membrane externe et l'espace péricellulaire (Figure 1 a).

1 - LE NOYAU ET LA ZONE PERINUCLEAIRE

Pour une cellule d'environ 30 μ , le noyau présente un diamètre d'environ 6 à 7 μ . On observe dans le nucléoplasme un ou plusieurs nucléoles (figure 1 b; 1) de 1 à 2 μ qui présentent un aspect granuleux, sans limite individualisée. Des zones diffuses, moins denses que la zone nucléolaire,

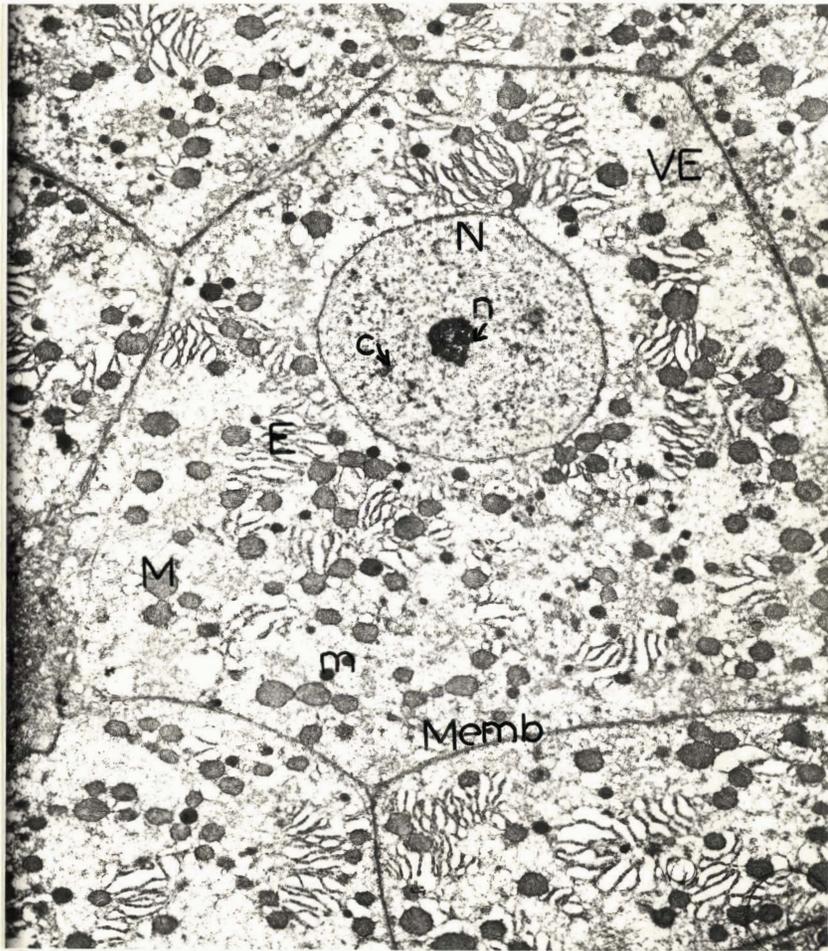


Figure 1a

Observation au microscope électronique de cellule normale du foie de Rat.

C : chromatine
 E : ergastoplasme
 M : mitochondries
 m : "microbodies"

Memb. : membrane cellulaire
 N : noyau
 n : nucléole
 VE : vésicules ergastoplasmiques

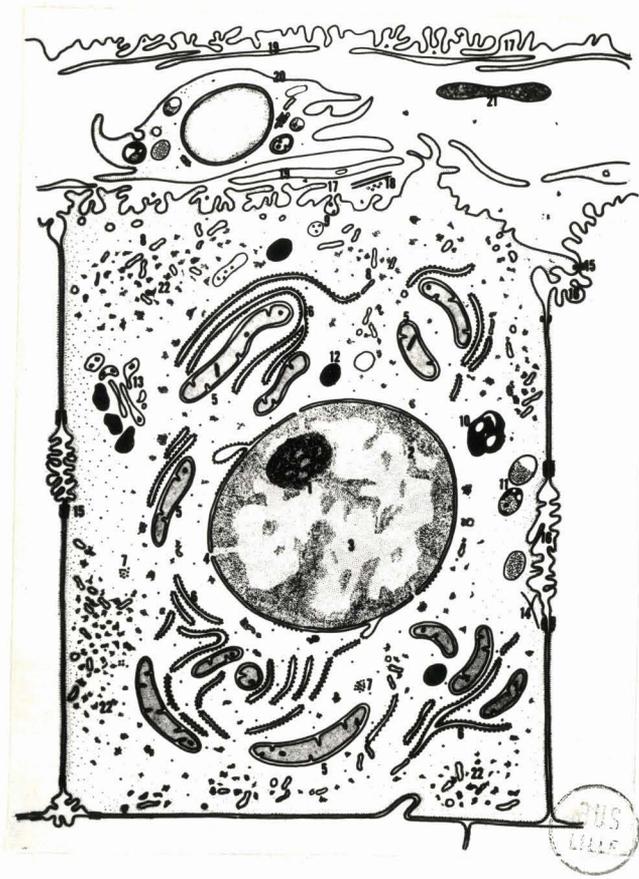


Figure 1b

Schéma de l'ultrastructure d'une cellule
hépatique de Rat normal en "phase active"
(d'après JEZEQUEL, 1962) (2) .

se répartissent dans le noyau : il s'agit de la chromatine qui semble baigner dans une substance moins dense appelée substance interchromatinienne. En outre, la double membrane nucléaire est interrompue par endroits par des pores et sa couche externe forme très souvent des expansions dans le cytoplasme sur le pourtour desquelles sont accolés des granules denses : les grains de PALADE ou ribosomes.

Dans la zone périnucléaire, on note la présence de nombreuses formations membraneuses qui ont la forme de canalicules limités par une double membrane apparemment identique à la membrane nucléaire. Des grains de PALADE s'alignent sur la face externe de ces canalicules. Il s'agit des canalicules ergastoplasmiques périnucléaires, dont les formations viennent souvent s'accoler aux expansions intracytoplasmiques de la membrane nucléaire.

2 - LE CYTOPLASME ET SES INCLUSIONS

Le cytoplasme est formé d'une substance amorphe dans laquelle baigne un très grand nombre d'inclusions de formes variées : il s'agit des inclusions cytoplasmiques. On distingue :

a- Le groupe des membranes et vacuoles intracytoplasmiques.

Elles apparaissent sous deux formes nettement différentes :

- un système de canalicules à double membrane, à contours sinueux, plus ou moins ramifiés et bordés, sur leurs faces externes, de granules denses : c'est l'ergastoplasme (figure 1b; 6)

- d'autres formations, plus ou moins allongées et vacuolisées, forment le réticulum agranulaire (figure 1b; 8) (Note) .

En outre, une zone particulière apparaît souvent au voisinage du noyau. Elle prend l'aspect de vacuoles plus ou moins allongées parallèlement

Note.- Signalons que ces termes d'ergastoplasme et de réticulum agranulaire (ou encore réticulum endoplasmique) prennent une signification différente selon les auteurs et ont souvent été confondus dans la littérature. Le terme de vacuole ergastoplasmique est, par exemple, très souvent employé pour désigner des formations sphériques qui sont, en fait, du réticulum agranulaire.

et contenant de gros granules "intracisternaux" : il s'agit de la zone de Golgi (figure 1b; 13) qui est considérée comme un ergastoplasme spécialisé dans le transfert et l'élaboration de produits particuliers dont on ignore encore la nature exacte.

b- Le groupe mitochondrial

Ce groupe comprend trois types de particules dont les dimensions varient de 0,5 à 1 μ :

- les mitochondries (figure 1b; 5) ont une structure caractéristique en boudins. Elles sont plus ou moins allongées et limitées par une double membrane dont la couche interne s'invagine dans le corps mitochondrial sous forme de crêtes internes (cristae). Le chondrioplasme, moyennement dense, contient des granules internes, très denses au microscope électronique.

- les lysosomes (ou corps denses péribiliariaires) se localisent au voisinage des membranes, dans la zone des canaux biliaires et se présentent sous la forme de particules généralement sphériques, avec un contenu dense irrégulièrement réparti. Leur taille est nettement inférieure à celle des mitochondries vraies.

- les microgranules (ou microbodies) (figure 1b; 12) sont des organites sphériques, extrêmement denses, considérés classiquement comme les précurseurs des mitochondries.

Certains auteurs suggèrent une analogie étroite de ces deux derniers types d'inclusions.

c- Le groupe microsomal

Ce groupe est représenté par les microsomes (60 à 200 m μ) et par des granules denses, de 12 à 15 m μ , indistinctement appelés ribosomes ou grains de PALADE ou encore particules ribonucléoprotéiques. Ces granules se présentent, soit sous la forme de ribosomes libres (figure 1b; 7), soit associés au système ergastoplasmique.

3 - LA MEMBRANE EXTERNE ET LA ZONE PERICELLULAIRE

La limite cellulaire se présente sous forme d'un film continu, difficilement identifiable, dont la morphologie pourrait se rapprocher de

celle d'une simple membrane de l'ergastoplasme. Nous discuterons plus loin de la nature exacte de cette membrane (voir pages 29 à 34). Néanmoins, les points les plus intéressants à noter dès à présent sont les suivants :

a- Il existe de nombreuses villosités au voisinage des travées hépatiques. Ces villosités forment des invaginations caractéristiques : ce sont les espaces de DISSE (figure 1b; 17) qui joueraient un rôle important dans la perméabilité cellulaire. Parfois, ces invaginations se referment et forment des vacuoles intracytoplasmiques qui s'appliquent contre la limite externe. Ce sont les vacuoles de pinocytose (figure 1b; 9).

b- Dans les travées hépatiques existent des fibres de réticuline (figure 1b; 19) dont nous discuterons également plus loin la signification éventuelle dans la cohésion tissulaire (voir page 38) .

c- Les zones de contact entre les hépatocytes possèdent un aspect caractéristique. Les deux limites cellulaires s'accolent, en effet, en laissant apparaître une zone intercellulaire amorphe dont il est impossible de préciser s'il s'agit d'un espace "vide" ou d'un film de substance formant un ciment intercellulaire (voir page 30) . On remarque, en outre, que les limites de deux cellules voisines s'encastrent très souvent l'une dans l'autre en un système assurant la cohésion mécanique de l'ensemble. Les canalicules biliaires, enfin, ne possèdent pas de membranes propres : ils sont délimités simplement par des invaginations des membranes cytoplasmiques de cellules voisines.

Cet ensemble de données ultrastructurales a permis l'éclosion de nombreuses hypothèses sur le fonctionnement de la cellule.

Il existerait un système circulatoire intracytoplasmique, par l'intermédiaire des canalicules ergastoplasmiques, qui assureraient la relation entre le noyau (contacts des canalicules avec la membrane nucléaire), les mitochondries (englobées très souvent dans des replis de l'ergatoplasme) et les ribosomes (en contact direct avec les parois des canaux). Les relations avec l'extérieur seraient assurées par les villosités des membranes, tandis que les lysozomes seraient les responsables de la "voirie" cellulaire. Ils sont, en effet, très riches en hydrolases, enzymes assurant la destruction des substances à éliminer.

Cette hypothèse, purement morphologique, permettrait de compléter les données biochimiques recueillies par l'étude des inclusions cytoplasmiques obtenues par les méthodes de fractionnement cellulaire.

B - HÉTÉROGÉNÉITÉ CHIMIQUE DE LA CELLULE

L'hétérogénéité chimique de la cellule a été démontrée grâce à la mise au point d'une méthode d'isolement des particules intracytoplasmiques par centrifugation différentielle. La préparation, en grandes quantités, des constituants cellulaires a permis de préciser leur composition chimique et enzymatique et de mieux connaître ainsi leur rôle dans la vie de la cellule.

1 - LES MÉTHODES DE FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

Depuis les premières tentatives d'isolement de noyaux par MIESCHER en 1871 (3) et de mitochondries par BENSLEY en 1934 (4), l'avènement de la microscopie électronique a permis à CLAUDE de jeter les bases des méthodes de fractionnement cellulaire. Depuis les travaux de CLAUDE (5), un grand nombre de revues techniques, parues depuis 1940, permettent de suivre l'évolution de ces méthodes (DOUNCE (6) ; HOGEBOOM et SCHNEIDER (7) ; de DUVE (8) ; ANDERSON (9) ; MONTREUIL (10) ; HOGEBOOM et al.(11) ; ALLFREY (12) ; CHAUVÉAU (13)). Le principe général est illustré par la figure 2 : l'examen au microscope électronique, d'un tissu préalablement soumis à une ultracentrifugation (18.000 g), montre une séparation remarquable des inclusions cytoplasmiques à l'intérieur de chaque cellule ; la séparation est réalisée dans le champ de gravitation d'après les tailles respectives des particules. Sans entrer dans les détails, précisons simplement que, sur cette observation, les méthodes de fractionnement cellulaire se sont développées conformément au schéma suivant :

a- le broyage et l'homogénéisation du tissu dans un milieu de viscosité convenable sont tout d'abord effectués : l'homogénéisation consiste à provoquer l'éclatement de toutes les cellules, sans altérer les inclusions cytoplasmiques, de manière à obtenir une suspension homogène des contenus cellulaires.

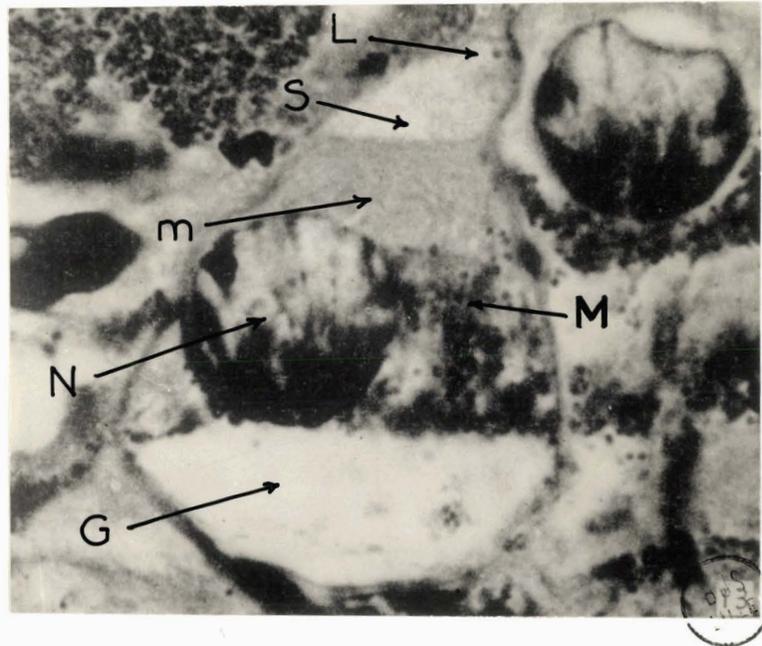


Figure 2

Examen au microscope électronique d'une
 cellule préalablement soumise à une ultracentrifugation
 effectuée à 40.000 g
 (d'après CLAUDE) (14)

Gly : glycogène ; N : noyau ; M : mitochondries ;
 m : microsomes ; S : solution cytoplasmique ; L : lipides .

b- La séparation des inclusions cytoplasmiques est ensuite réalisée en faisant appel à différentes techniques : centrifugation différentielle, partage entre deux phases (ALBERTSON) (15), action de champs électromagnétiques (KOLIN et KADO) (16), précipitation saline (FALCONER) (17), effet du pH (CLAUDE) (18), variations de pression (MASHERPA) (19). La première est la plus généralement utilisée.

Les techniques de centrifugation s'appuient sur le fait que des particules de densités différentes, en suspension dans un milieu de viscosité et de densité déterminées, présentent des coefficients de sédimentation caractéristiques (Note 1) . Ces coefficients de sédimentation sont directement proportionnels à la vitesse et inversement proportionnels à l'accélération. Il existe ainsi une relation étroite entre la vitesse de sédimentation des particules et leurs dimensions, d'une part, la viscosité du milieu, d'autre part. Pour un mélange de particules de coefficients de sédimentation différents, il sera ainsi possible de les séparer, soit par centrifugation différentielle en utilisant des vitesses et des accélérations croissantes (Note 2), soit par différence de densité (la densité du milieu d_m étant intermédiaire entre les densités d_1 et d_2 des particules à séparer) .

Les méthodes de fractionnement cellulaire ont d'abord fourni quatre fractions : 1°) les noyaux, 2°) les gros granules (fraction mitochondriale), 3°) les petits granules (fraction microsomale), 4°) la solution cytoplasmique non sédimentable.

L'application plus récente de méthodes de sous-fractionnement combinées aux études de microscopie électronique, permet actuellement d'étudier les fractions et sous-fractions suivantes (voir en particulier De DUVE (20) et BEAUFAY et coll.(21) :

Note 1 : Le coefficient de sédimentation s est donné par la formule :

$$\frac{(d_p - d_m) D^2}{18 \eta}$$

où d_p = densité de la particule
 d_m = densité du milieu
 D = diamètre de la particule
 η = viscosité du milieu

Note 2 : La force centrifuge g se calcule selon la formule :

$$g = \frac{N^2 r}{89500}$$

où N = vitesse en t/min et r = rayon du rotor

- 1 - fraction nucléaire
- 2 - fraction mitochondriale : mitochondries vraies,
lysosomes,
microgranules .
- 3 - fraction microsomale : membranes "rough" granulaires,
membranes "smooth" agranulaires,
ribosomes libres.
- 4 - solution cytoplasmique : précipité pH 5 ,
solution surnageante.

Malgré les nombreuses améliorations des techniques, le problème de la pureté et de l'intégrité des fractions obtenues subsiste. Après avoir résumé les acquisitions fondamentales recueillies par l'application de ces méthodes, nous discuterons la rigueur des résultats obtenus, en tenant compte, à la fois, de la pureté et de l'intégrité du substrat recueilli.

2 - ETUDE CHIMIQUE DES FRACTIONS CYTOPLASMIQUES.

L'analyse de la composition chimique des fractions cytoplasmiques a permis de caractériser essentiellement quatre groupes importants de composés qui présentent une activité biologique prépondérante dans la cellule.

a- Un groupe de micromolécules phosphorées, comprenant, outre l'acide phosphorique libre, des esters phosphoriques des oses provenant du métabolisme des glucides, des nucléosides et des nucléotides libres impliqués dans le métabolisme des acides nucléiques (figure 3) .

b- des phospholipides qui entrent dans la constitution des membranes (voir pages 30 à 35) .

c- des protéides de deux types : les uns, métaboliquement inertes, forment les structures ; les autres constituent les enzymes qui règlent l'ensemble des réactions vitales. Les deux classes de protéides se rencontrent dans les cellules : les holoprotéides ou protéines, constitués uniquement de chaînes polypeptidiques et les hétéroprotéides qui résultent de l'association d'une fraction polypeptidique avec un radical de nature étrangère.

Ce radical, appelé groupement prosthétique, peut être de nature lipidique (lipoprotéides), glucidique (glycoprotéides) ou peut encore être constitué de molécules d'acides nucléiques (nucléoprotéides).

d- des acides nucléiques appartenant aux deux classes : les acides désoxyribonucléiques (ADN) et les acides ribonucléiques (ARN). Il s'agit de chaînes polynucléotidiques dont la composition, la répartition et le rôle sont donnés dans le tableau I. Nous avons précisé dans la figure 3 les formules des constituants des acides nucléiques.

C - BIOCHIMIE DES FRACTIONS CELLULAIRES

Les études chimiques ont été complétées par la détermination des activités enzymatiques des différentes fractions. Ainsi a été précisé le fonctionnement métabolique de la cellule. Les résultats peuvent être résumés de la manière suivante.

1°- Les macromolécules se répartissent préférentiellement dans les inclusions et les substances micromoléculaires dans la fraction soluble dont se précise ainsi le rôle de "milieu de relation".

2°- La totalité de l'acide désoxyribonucléique se trouve dans le noyau, tandis que l'acide ribonucléique se localise essentiellement dans le nucléole et dans les microsomes. Un acide ribonucléique de faible poids moléculaire se trouve en outre dans la fraction soluble. Il joue un rôle dans le transfert des acides aminés vers les ribosomes. Il s'agit de l'acide ribonucléique soluble (ARNS).

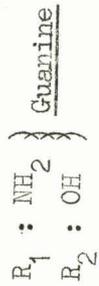
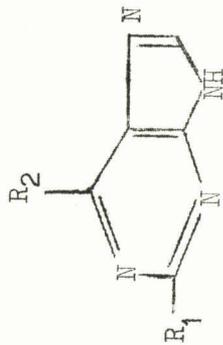
3°- Les noyaux sont particulièrement riches en enzymes du métabolisme des acides nucléiques. Ce résultat n'a rien de surprenant puisque les noyaux renferment des quantités élevées d'acides nucléiques et qu'ils sont le lieu de la synthèse des acides nucléiques cellulaires.

4°- Les microsomes sont pauvres en enzymes et riches en acides ribonucléiques et en protéines. On sait, à présent, qu'ils sont le siège des synthèses des protéines cellulaires.

T a b l e a u I

Composition, répartition et rôle des acides nucléiques

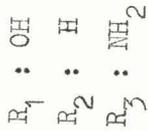
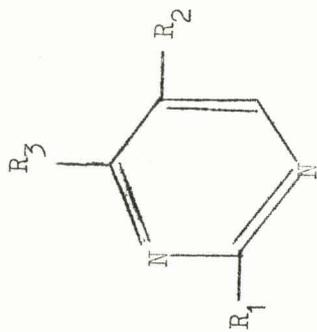
		Acides ribonucléiques (ARN)	Acides désoxyribonucléiques (ADN)
COMPOSITION	Bases	Guanine Adénine Cytosine Uracile	Guanine Adénine Cytosine Thymine
	Glucide Acide phosphorique	D - ribose Acide orthophosphorique	2 - désoxy-D-ribose Acide orthophosphorique
REPARTITION		Partout dans la cellule mais principalement dans le nucléole et les microsomes	Exclusivement dans le noyau
ROLE		Synthèse des protéines	Support de l'hérédité



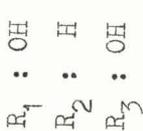
Guanine



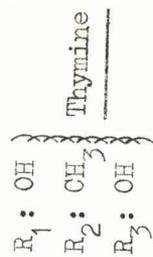
Adénine



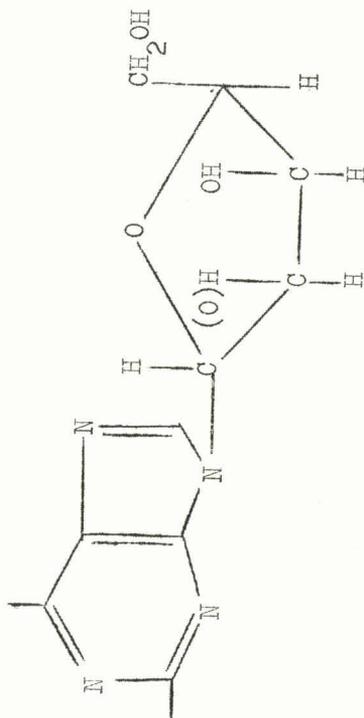
Cytosine



Uracile

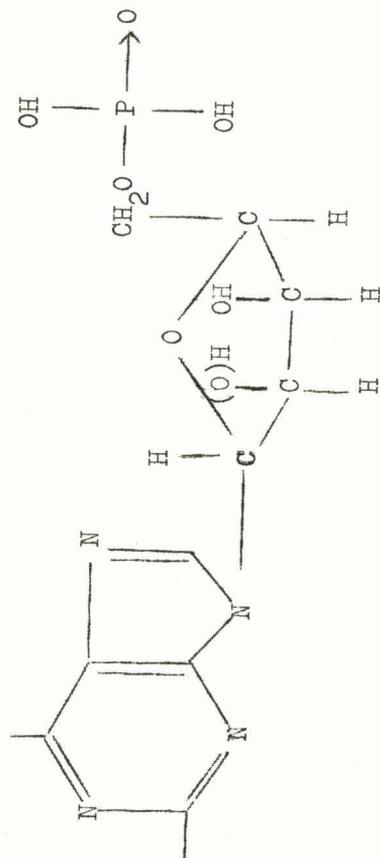


Thymine

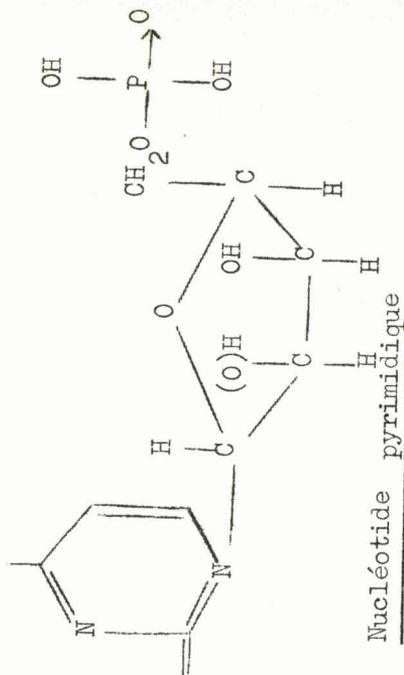


Nucléoside purique

Nucléoside pyrimidique



Nucléotide purique



Nucléotide pyrimidique

Figure 3

Formule des bases, des nucléosides et des nucléotides constituant les acides nucléiques

4°- Les mitochondries possèdent l'équipement enzymatique le plus riche. Elles renferment la majeure partie de l'adénosine-triphosphatase et des enzymes respiratoires. Elles sont, en outre, le support exclusif de la cyclophorase, complexe qui groupe tous les enzymes nécessaires au fonctionnement du cycle de KREBS. Les mitochondries sont, par conséquent, le centre respiratoire et énergétique de la cellule.

D - DIFFICULTES RENCONTREES AU COURS DE L'ETUDE DES FRACTIONS CYTOPLASMIQUES

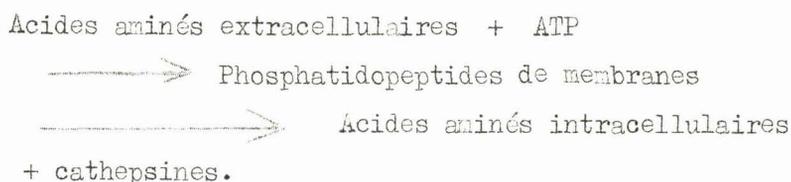
Malgré la somme considérable des résultats recueillis par l'application des méthodes de fractionnement cellulaire, deux problèmes importants se posent actuellement dans ce domaine.

Le premier concerne la pureté et l'intégrité des fractions cytoplasmiques. On conçoit aisément, en effet, les difficultés que l'on rencontre pour isoler des particules absolument pures. En outre, les milieux de dispersion utilisés, ainsi que les conditions mécaniques de l'homogénéisation provoquent en général des altérations des fractions, à la fois morphologiques et chimiques. Une étude critique de l'intégrité morphologique et chimique des fractions obtenues par différentes méthodes de centrifugation différentielle nous a permis de poser récemment ce problème (MONTREUIL et al.) (22). Une étude est actuellement en cours (MONTREUIL et al.) (23) pour tenter de résoudre cette question.

Le deuxième problème a été récemment soulevé par les travaux de HENDLER (24), qui font ressortir l'importance des membranes dans le fonctionnement métabolique de la cellule. De nombreux auteurs (LITTLEFIELD et al. (25) ; SACHS (26) ; SIEKEVITZ (27) ; ZAMECNIK (28) ; ZAMECNIK et KELLER (29)) ont, en effet, constaté que l'activité in vitro des systèmes acellulaires représentait en fait 1/100 à 1/1000 de l'activité totale des cellules intactes. D'autres travaux concernant les cellules microbiennes et bactériennes (HALWORSON (30) ; KIPNIS (31) ; KEMPNER (32) ; HUNTER (33) ; GABY (34) ; BARNABEI (35) ; TRIA (36) ; HOKIN et HUKIN (37)) ont, eux aussi, souligné

le rôle des membranes dans le fonctionnement interne de la cellule. Selon HENDLER (38), le système de biosynthèse des protéines décrit par HOAGLAND (39) à la suite d'incubations de fractions cellulaires, ne représenterait que 1 p.100 de l'activité métabolique totale du système protéosynthétique. Un nouveau système a donc été proposé : il fait intervenir les phospholipides des membranes intracytoplasmiques et cellulaires qui agiraient dans le mécanisme d'activation et de polymérisation des acides aminés par l'intermédiaire de complexes phospholipides-acides aminés.

Selon TRIA (40) et BARNABEI (41), les cathepsines joueraient un rôle dans la pénétration des acides aminés dans la cellule. Les acides aminés se fixeraient sur la membrane périphérique, sous forme de phosphatidopeptides pour être ensuite libérés de ce support par les cathepsines et pénétrer à l'intérieur de la cellule. Ces réactions se schématisent de la manière suivante :



L'obtention de cellules animales intactes permettrait d'étudier in vitro ces nouveaux mécanismes métaboliques dont la connaissance exacte est fondamentale du point de vue du fonctionnement interne de la cellule.

Enfin, l'objection principale, que nous avons formulée à propos des études métaboliques sur les tissus totaux, subsiste. Si l'isolement des fractions permet, en effet, d'obtenir des particules débarrassées des constituants sériques (quoique l'éventualité d'une adsorption à la surface des particules ne puisse être écartée a priori (voir VON DER DECKEN (42)), le problème se pose de nouveau à propos de la solution cytoplasmique qui est en fait un mélange de la fraction soluble endocellulaire et des constituants du sang présent dans le tissu. Il sera donc impossible d'obtenir par ce procédé un système cellulaire exempt des activateurs du sang. L'étude des métabolismes in vitro à partir d'homogénats et de fractions cellulaires doit donc tenir compte de ce facteur. En outre, la localisation du lieu de synthèse intracytoplasmique des protéides sériques ne se trouvera pas à l'abri de souillures éventuelles par adsorption : les travaux de VON DER DECKEN et CAMPBELL (43)

sur la synthèse de la sérumalbumine par les ribosomes se sont heurtés à ces difficultés. L'isolement de fractions cytoplasmiques à partir de cellules isolées totalement débarrassées du plasma sanguin pourra seul permettre de résoudre ce problème de la contamination de la solution cytoplasmique par les protéides plasmatiques.

INTERET DE L'ETUDE DE LA CELLULE "ISOLEE"

Il apparaît donc que les études métaboliques réalisées in vitro, ainsi que certains travaux chimiques, - notamment sur la localisation intracellulaire des lieux de synthèse - , demeurent discutables aussi bien dans le cas des tissus totaux que dans celui des inclusions cytoplasmiques. Certaines des causes d'erreur que nous avons signalées seront éliminées par l'expérimentation sur la cellule isolée. Par exemple, les méthodes de dissociation tissulaire permettront d'étudier la cellule animale libérée de l'influence de l'organisme dont elle provient et de rechercher les facteurs exogènes de régulation sécrétés par l'organisme et présents dans le sang. Ce dernier pourra donc être considéré de nouveau comme un facteur métabolique aisément contrôlable et non plus comme une souillure dont il est pratiquement impossible de priver le milieu. En outre, l'analyse des constituants spécifiques de la cellule, ainsi que la détermination de leurs lieux de synthèse, pourront être réalisées à partir d'un matériau "biologiquement pur" . Enfin, l'influence sur le métabolisme cellulaire des structures intracytoplasmiques, comme les membranes, pourra être étudiée. En plus de ces perspectives séduisantes, les suspensions de cellules isolées permettront d'étudier in vitro l'influence de nombreux agents de modification du métabolisme cellulaire comme les antimétabolites, les antimitotiques, les antinéoplasiques et les virus.

Dans le domaine de la Cancérologie, l'expérimentation sur les cellules isolées pourrait être très fructueuse . Elle permettrait, par exemple, de résoudre certains problèmes délicats concernant la "pureté" des tissus

cancéreux de référence. On sait, en effet, qu'il est pratiquement impossible d'obtenir du tissu cancéreux "pur" : ainsi, dans le cas de l'hépatome "in situ", le tissu cancéreux est toujours souillé de tissu précancéreux, de tissu hyperplasique et de tissu resté sain, sans qu'il soit possible d'estimer les proportions relatives de chacun d'eux. Au contraire, les cellules libres de l'hépatome ascitique sont quantitativement des cellules cancéreuses dont le comportement pourra être comparé avec celui de cellules hépatiques normales préparées à partir de foie sain. En outre, l'étude expérimentale du mécanisme de la diffusion métastatique, qui préside à la "généralisation" du cancer par essaimage de cellules cancéreuses libérées dans l'organisme, sera elle aussi réalisable avec des cellules cancéreuses "marquées" par des isotopes radioactifs.

Sur un plan plus purement biologique, la pratique des dissociations tissulaires pourrait apporter des renseignements précieux sur les problèmes très discutés de la cohésion des tissus et de l'adhésivité des cellules. Enfin, nous évoquerons plus loin (page 66) l'intérêt que pourrait présenter la mise en culture de cellules adultes libres dans les études de réassociations cellulaires.

L'exposé rapide que nous venons d'effectuer montre que l'expérimentation sur le tissu total, qu'elle s'adresse à des coupes de tissus ou à des fractions cytoplasmiques, est entachée d'erreur, essentiellement à cause de la présence du sang dont les constituants, - plastiques ou biocatalyseurs - , ne permettent pas de saisir le métabolisme propre de la cellule.

L'isolement, en grandes quantités, de cellules libres et vivantes s'impose donc. Avant de décrire les procédés de préparation des cellules à partir des organes, il nous a paru nécessaire d'exposer la biochimie de la cohésion des tissus de manière à mieux comprendre le mécanisme de leur dissociation.

BIOCHIMIE DE LA

COHESION TISSULAIRE

On peut considérer très schématiquement un tissu comme un édifice constitué par la juxtaposition d'unités cellulaires. L'adhésion des cellules les unes aux autres est une nécessité évidente pour que soit assurée la cohésion même des tissus. Du point de vue purement statique de la structure des organes, on a mis en évidence des ciments intercellulaires, des membranes basales et aussi, très souvent, des capsules conjonctives. Cependant, d'un point de vue plus dynamique, les mouvements morphogénétiques qui président aux phénomènes de différenciation au cours du développement embryonnaire prouvent l'existence d'une adhésivité cellulaire, probablement due à des effets de membrane et indépendante de ciments intercellulaires qui ont un caractère définitif.

Si nous nous limitons à l'observation d'un organe différencié, organisé de façon stable et possédant ses fonctions propres, on peut se demander comment est réalisée la cohésion des éléments cellulaires du tissu. En effet, si, dans certains cas, il existe une grande quantité de ciment intercellulaire, dans d'autres cas, il est pratiquement impossible d'identifier par des observations morphologiques, - même au microscope électronique - , une substance interstitielle : seule apparaît une zone frontière intercellulaire qui résulte apparemment de la simple juxtaposition des deux membranes cellulaires. Ainsi, la question se pose actuellement encore de savoir si, dans un tissu organisé, l'adhésion des cellules est due à de simples phénomènes d'attraction de membrane à membrane ou à un ciment intercellulaire qui pourrait se réduire, dans certains cas, à un simple film monomoléculaire.

Nous exposerons donc successivement l'état de nos connaissances concernant :

- 1 - la structure et les propriétés des limites cellulaires,
- 2 - l'adhésivité des cellules due, soit à de simples effets de membrane, soit à la présence d'un ciment intercellulaire.

Ces notions sont, en effet, nécessaires à la compréhension des mécanismes de la dissociation tissulaire. Elles nous permettront, à la fois, d'introduire notre travail et de discuter, à la lumière des résultats que nous avons obtenus, les hypothèses encore très controversées qui concernent la cohésion des tissus.

LA MEMBRANE CELLULAIRE ANIMALE

Les cellules végétales et les bactéries possèdent des parois visibles et nettement individualisées. Au contraire, les cellules animales ne présentent généralement qu'une simple limite, appelée plasmolème. L'existence même de cette membrane est très discutée par de nombreux auteurs car elle est très difficilement visible au microscope électronique. Cependant, la mise au point des procédés d'isolement des membranes cellulaires est un excellent argument en faveur de leur existence (NEVILLE) (44). En outre, un autre argument - d'ordre physiologique - semble, lui aussi, constituer une preuve favorable : les échanges de la cellule avec le milieu extérieur sont effectués selon un processus de perméabilité sélective qu'il est difficile de concevoir sans la présence d'un "filtre".

Nous n'aborderons que très accessoirement dans notre étude ces questions de perméabilité cellulaire et nous renvoyons le lecteur aux nombreux ouvrages qui font le point sur ce sujet (voir en particulier, RACHEVSKY et LANDAHL (45) ; DERVICHIAN (46)). Nous nous limiterons à l'exposé des diverses hypothèses qui concernent la nature et le rôle de la membrane des cellules animales .

Bien que de très nombreux travaux aient été effectués sur les membranes des cellules animales, aucune conclusion définitive ne peut encore être tirée quant à leur existence. Cependant, la présence d'une membrane semble se manifester dans des cas bien particuliers comme celui des cellules "libres" dans les milieux biologiques : hématies, leucocytes, cellules en culture. Au contraire, l'énigme reste totale en ce qui concerne les cellules qui sont associées en tissus. Nous pouvons donc établir une distinction entre ces deux types cellulaires et nous nous proposons de résumer nos connaissances concernant leur membrane.

A - LA MEMBRANE DES CELLULES LIBRES DES MILIEUX BIOLOGIQUES

Les cellules animales qui vivent isolées dans les milieux biologiques montrent au microscope électronique une membrane qui, sans posséder les caractéristiques de la solide paroi des bactéries, se révèle néanmoins sous la forme d'un liseré dense.

1 - LA MEMBRANE DE L'HEMATIE

La membrane de l'hématie montre une structure double analogue à celle de la membrane nucléaire ou mitochondriale (figure 4 b) (47). En outre, la lyse des globules rouges en milieu hypotonique provoque la libération de l'hémoglobine dans le milieu extérieur et permet d'isoler les membranes hématiques ou stroma (figure 4 a) (48) dont l'ultrastructure a été bien étudiée au microscope électronique. La surface de ces membranes est constituée par la juxtaposition de petits granules de 500 à 1000 Å (BESSIS et coll. (49) ; WOLPERS (50)) et, après un traitement par les solvants organiques, elle donne une structure en nids d'abeilles dont les pores correspondraient à l'emplacement de lipides. Cette observation serait en faveur d'une structure discontinue donnée par une disposition en mosaïque de granules protéiques et de granules lipidiques. Cependant, les études effectuées au microscope polarisant par SCHMITT, BEAR et PONDER (51) ont amené ces auteurs à admettre l'existence de couches lipidiques et protéiques superposées. Ce schéma a été confirmé par MITCHISON (52) qui introduit, en outre, la notion supplémentaire d'une chaîne polypeptidique repliée en accordéon sous une double couche lipidique externe.

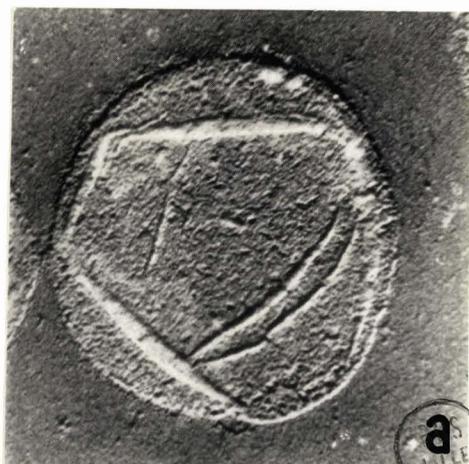
On voit donc que, même dans le cas où une membrane est considérée comme une entité, - puisqu'elle peut être isolée - , l'accord est loin d'être fait en ce qui concerne sa nature et sa structure. Le problème est encore compliqué par l'opinion apportée par certains auteurs selon laquelle la membrane même de l'hématie serait un artéfact et ne préexisterait pas ! C'est ainsi que DERVICHIAN (53), se fondant sur les propriétés des associations lipo-protéiques en présence de deux phases liquides en équilibre (coacervation),

Figure 4 a

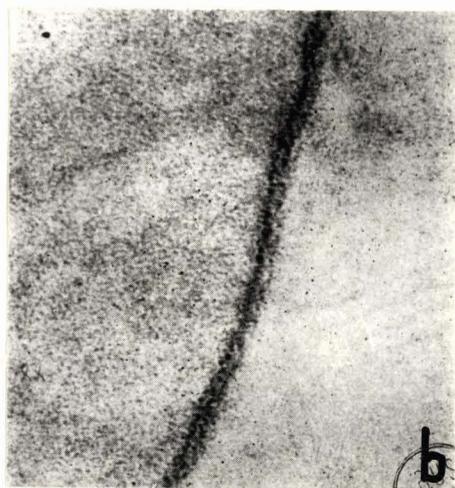
Aspect au microscope électronique d'une membrane
hématique (ou stroma) obtenue par hémolyse
(d'après BESSIS et BRICKA) (48)

Figure 4 b

Aspect au microscope électronique d'une portion
de membrane hématique (le cytoplasme se trouve
à droite). On remarquera la structure en "double
membrane" analogue à celle de la membrane
nucléaire ou mitochondriale.
(d'après ROBERTSON) (47)



a



b

conclut que le stroma provient d'une précipitation provoquée par une nouvelle répartition des molécules entre deux phases : la phase externe et le cytoplasme. Selon cet auteur, la notion de membrane hématique individualisée ne repose pas sur des preuves suffisamment concordantes pour pouvoir être admise a priori. Seule peut donc être retenue actuellement l'existence d'une concentration lipoprotéique à la surface de l'hématie qui s'individualise après l'hémolyse, mais qui pourrait ne pas préexister.

2 - LA MEMBRANE DE LA CELLULE EN CULTURE (Revues générales : DERVICHIAN (54); DANIELLI et HARVEY (55))

Les observations réalisées à propos des cellules en culture parviennent aux mêmes résultats ambigus. Le microscope électronique révèle la présence d'une limite cellulaire plus dense dont les études microcinématographiques montrent la mobilité et la plasticité qui se manifestent par l'apparition et la disparition de pseudopodes et de bourgeonnements. Il semble donc qu'une sorte de sac résistant entoure le cytoplasme de ce type de cellules.

Cependant, des expériences montrent qu'il n'est pas nécessaire d'invoquer la présence d'une membrane pour expliquer que le contenu des cellules en culture ne s'échappe pas dans le milieu extérieur. Par exemple, la section et la séparation de la cellule en deux parties n'amène pas l'effusion du cytoplasme en dehors du corps cellulaire. D'ailleurs, même dans le cas où le contenu cytoplasmique d'une cellule s'échappe, on n'observe pas de dissolution dans le milieu extérieur et on note au contraire l'apparition d'un contour net, comme si une nouvelle membrane s'était instantanément reformée (HEILBRUNN) (56) . TAUC (57) rapporte, à ce propos, une observation particulièrement suggestive : en mesurant le potentiel électrique de repos entre l'intérieur d'un filament de Myxomycète et le milieu ambiant, il constate qu'à la suite de la lésion locale provoquée par l'introduction de l'électrode, le cytoplasme forme en quelques minutes une nouvelle limite autour de l'électrode et tend à séparer la cellule de ce corps étranger. L'isolement, une fois réalisé, le potentiel d'électrode devient nul.

Si, après la stabilisation du potentiel, on pousse de nouveau l'électrode dans le cytoplasme, le même phénomène se reproduit, tout à fait

comme si le cytoplasme réagissait une nouvelle fois pour reconstituer une nouvelle membrane à l'endroit où l'électrode l'avait de nouveau traumatisé.

L'exploration de la structure de la membrane des cellules en culture qui semblaient représenter un matériel de choix pour l'expérimentateur a, jusqu'à présent déçu tous les espoirs et la connaissance qu'on en possède est encore du domaine de l'hypothèse. Il semble toutefois qu'il existe une concentration élevée en lipides à la surface de séparation entre le cytoplasme et le milieu extérieur. Cette conception avait poussé de nombreux auteurs à comparer la cellule en culture dans un milieu liquide à une goutte d'huile en suspension dans l'eau. Cependant, les études de perméabilité s'opposent absolument à cette interprétation. Par ailleurs, HARVEY et SCHAPIRO (58) ont montré que la membrane cellulaire présentait une tension superficielle pratiquement identique à celle de l'eau et très différente de celle d'une goutte d'huile placée dans les mêmes conditions. Les auteurs émirent l'hypothèse, - reprise par DANIELLI et HARVEY (59)-, qu'il existait une couche protéique externe, disposée parallèlement à la surface des cellules et adsorbée sur la couche lipidique en position interne.

En conclusion des nombreux travaux qui ont été réalisés sur les membranes des cellules libres dans les milieux biologiques, nous soulignerons les discordances qui se manifestent entre les résultats obtenus par les différents auteurs et l'incertitude dans laquelle on se trouve toujours de l'existence d'une membrane "vraie". Cependant, la plupart des auteurs s'accordent pour admettre la nature lipoprotéique de la "limitante" de ces cellules. Nous retrouvons le même concept à propos des cellules constituant les tissus.

B - LA MEMBRANE DES CELLULES CONSTITUANT LES TISSUS

L'application des méthodes classiques de microscopie électronique apporte une reproductibilité parfaite des résultats à un point tel qu'il

semble que l'on puisse écarter l'hypothèse d'artéfacts soulevée par DERVICHIAN (60). En effet, l'observation au microscope électronique des tissus préalablement fixés par l'acide osmique ou par le permanganate de potassium révèle toujours la même disposition de la zone de contact des cellules : deux liserés très denses bordent chacune des deux cellules et délimitent une zone plus claire (figure 5 a) (61).

On interprète actuellement ce résultat en invoquant une structure lipoprotéidique de la membrane pour laquelle plusieurs schémas ont été proposés (figure 6) (62). D'après ceux-ci, on voit qu'il existe deux hypothèses : celle d'une couche lipoprotéique unique (figure 6 a) et celle d'une double couche lipoprotéique (figure 6 b) .

1 - HYPOTHESE DE LA COUCHE LIPOPROTEIQUE UNIQUE

La couche monomoléculaire lipidique externe serait principalement constituée de molécules de lécithines en disposition radiale. Les chaînes aliphatiques hydrophobes des acides gras seraient orientées vers l'extérieur de la cellule, tandis que les groupes ionisés de la phosphocholine seraient tournés vers l'intérieur. L'azote quaternaire de la choline permettrait l'établissement de liaisons d'ionovalence avec des charges négatives de la couche protéique interne.

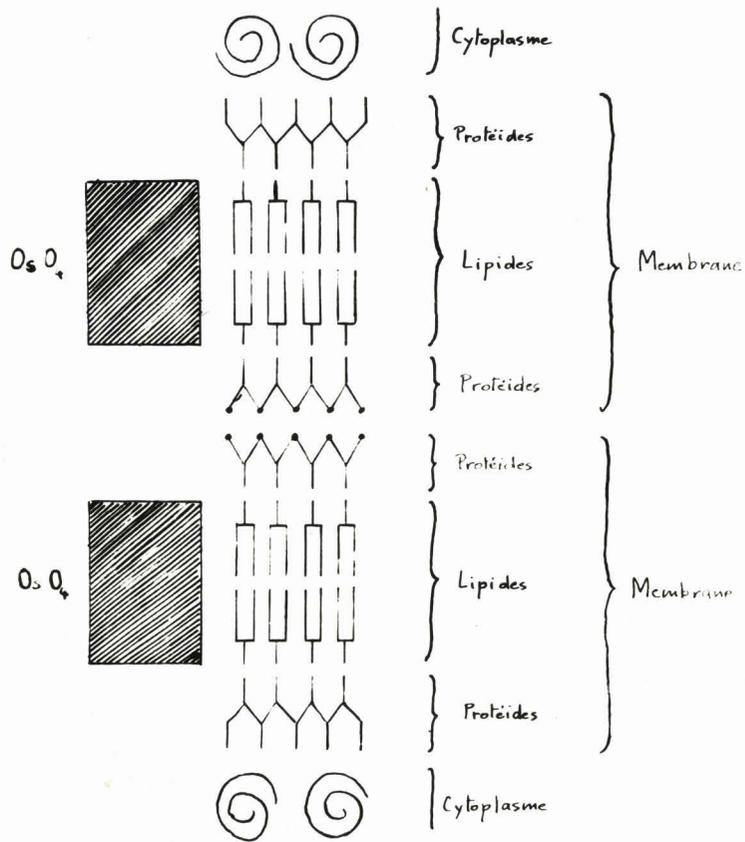
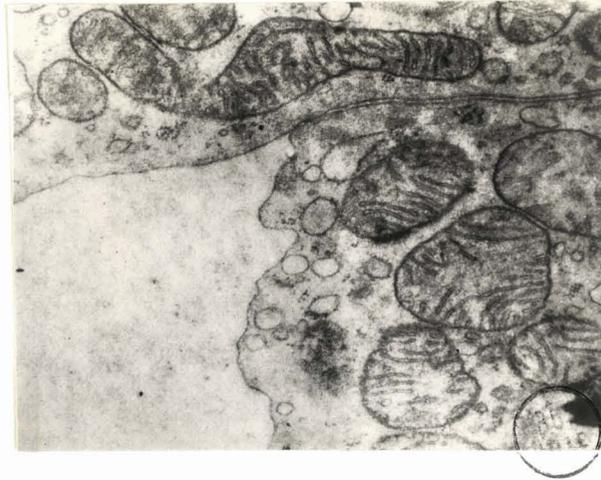
La couche monomoléculaire protéique interne serait constituée de molécules de protéines liées les unes aux autres par des liaisons ioniques ou par l'intermédiaire de groupements polyosidiques. La couche protéique serait elle-même liée à la couche lipidique par des liaisons ioniques unissant, par exemple, l'azote quaternaire de la choline avec les groupements carboxyliques en α ou en γ des acides aspartique ou glutamique.

Figure 5 a

Observation au microscope électronique (après fixation osmique) de la juxtaposition de deux cellules de tubules rénaux. On observera qu'un liseré plus dense limite chacune des deux cellules entre lesquelles une zone plus claire est visible. Le schéma de la figure 5 b explique cette disposition (STADHOUDERS ; in KUYPER) (61)

Figure 5 b

Schéma de l'ultrastructure de la membrane de deux cellules juxtaposées montrant le point d'action de l'acide osmique. Ce schéma permet d'interpréter la figure 5 a (schéma modifié de SJÖSTRAND ; in KUYPER) (61)



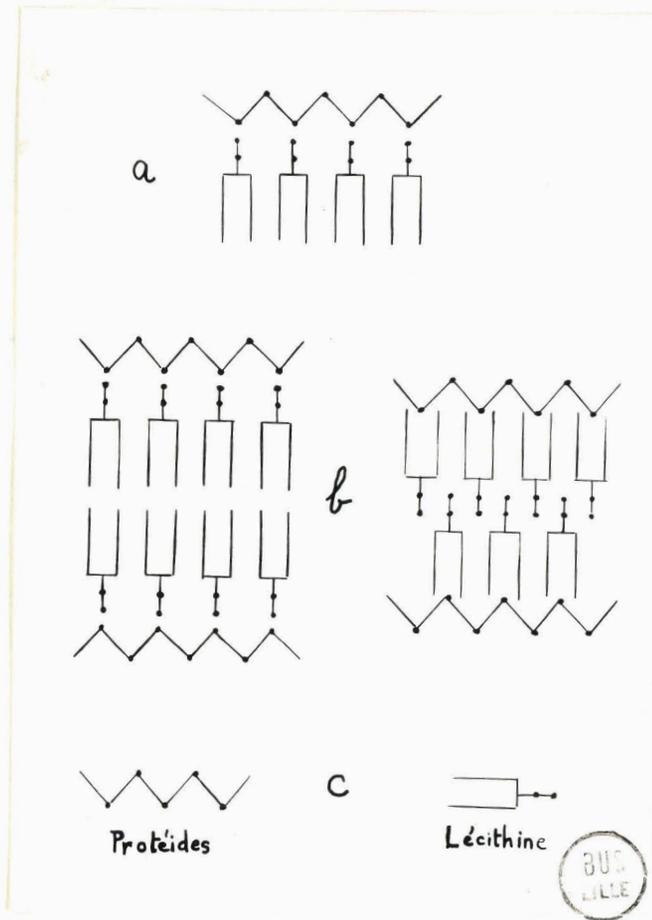


Figure 6

Différents schémas d'ultrastructure de la membrane cellulaire

- a) - Couche monomoléculaire unique constituée de lipides (lécithines) associés à des protéines.
- b) - Deux dispositions possibles d'une double couche monomoléculaire de lipides emprisonnée entre deux couches monomoléculaires de protéines.
- c) - Signification des symboles .

(d'après KUYPER) (62)

2 - HYPOTHESE de LA DOUBLE COUCHE LIPOPROTEIQUE

Selon de nombreux auteurs, la membrane des cellules animales serait constituée par une double couche lipoprotéique dont chacune posséderait la disposition précédente. On trouverait donc, en allant de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane cellulaire, une couche protéique (ou glycoprotéique) interne unie par des liaisons ioniques à une couche lipidique monomoléculaire, puis une nouvelle couche lipidique monomoléculaire disposée parallèlement à la précédente et soudée par des liaisons ioniques à une couche monomoléculaire externe de protéines ou -selon BELL (63) - de glycoprotéides.

L'hypothèse de la double couche lipoprotéique, dans laquelle l'une des couches protéiques se trouve en position externe, rend compte des observations effectuées en microscopie électronique après une fixation osmique (figure 5 a) : la couche lipidique osmiophile donne un liseré très dense, tandis que la couche protéique externe - non osmiophile - se manifeste par la zone claire qui sépare les deux membranes cellulaires. Le schéma de la figure 5 b illustre cette conception.

Il est évident que l'interprétation des observations faites au microscope électronique demeure du domaine de l'hypothèse. Cependant, il faut reconnaître qu'elle est en parfait accord - quant à la nature lipoprotéique de la membrane cellulaire - avec les résultats apportés par l'analyse chimique et qu'elle explique la grande fragilité du plasmolemme.

Du point de vue chimique, TRIA et BARNABEI (64) ont, en effet, démontré que les membranes des cellules hépatiques isolées par la méthode de NEVILLE (65) avaient une composition chimique très voisine de celle des parois hématisques : protéines 59,6 p.100 ; lipides 22,1 p.100 ; phosphatidopeptides 18,3 p.100 (du poids sec) .

D'autre part, d'un point de vue "mécanique", le plasmolemme est extrêmement fragile. En effet, selon les schémas d'ultrastructure qui ont été proposés jusqu'à présent, on voit que la limite cellulaire est un édifice moléculaire dont la résistance mécanique doit être faible. La cohésion des couches lipoprotéiques n'est, en effet, assurée que par des liaisons

d'ionovalence qui sont parmi les liaisons les plus fragiles. Alors que les bactéries présentent, grâce à leur paroi qui est une membrane "vraie", une résistance mécanique surprenante, les cellules animales, - comme, d'ailleurs, les protoplastes qui sont des bactéries à plasmolème, dépouillées expérimentalement de leur paroi - , éclatent très facilement. Il suffit, pour cela, de placer les cellules dans des solutions hypotoniques ou de les forcer au travers de l'aiguille d'une seringue à injections ou encore de les soumettre, dans un tube, à l'action d'un piston tournant rapidement, pour faire éclater la totalité des membranes cellulaires. Cette dernière opération constitue l'homogénéisation, première étape du fractionnement cellulaire.

Cependant, dans la cellule vivante, la cohésion du plasmolème est renforcée par la présence de membranes intracytoplasmiques, de nature protéidique, qui unissent des points éloignés du plasmolème, au travers du cytoplasme. Ces membranes internes forment un réseau visible au microscope électronique et décrit sous le nom de réticulum endoplasmique. Selon SJÖSTRAND, les "membranes" du réticulum endoplasmique proviendraient d'invaginations du plasmolème qui formeraient donc dans le cytoplasme un réseau de canalicules en relation directe avec l'extérieur. Ce réseau assurerait les échanges entre le cytoplasme et l'extérieur de la cellule.

En conclusion de cette étude rapide de la structure morphologique et chimique de la membrane des cellules constituant les tissus animaux, nous ferons ressortir l'aspect encore très hypothétique du problème. En effet, la seule certitude que nous ayons concerne la nature lipoprotéidique du plasmolème.

Mais, quelle que soit la structure exacte du plasmolème, qu'il préexiste ou non, qu'il s'agisse d'une limite différenciée ou d'une organisation géométrique de molécules cytoplasmiques, il n'en demeure pas moins qu'il possède un caractère d'extrême fragilité. Cette propriété laisse présager des grandes difficultés auxquelles se heurtent les méthodes de préparation des cellules libérées. En effet, la dissociation des tissus doit être effectuée dans des conditions extrêmement douces de façon à maintenir l'intégrité du plasmolème. En outre, il est évident que les cellules "libres" seront plus sensibles à l'action du milieu extérieur car elles auront perdu

la protection dont elles jouissaient au sein du tissu par le seul fait de l'association avec d'autres cellules. Le choix de la composition du milieu d'isolement sera donc déterminant.

Enfin, l'exposé des hypothèses et des certitudes concernant la nature du plasmolème va nous permettre de mieux comprendre le mécanisme de l'association des cellules d'un tissu - soit par effet de membrane, soit par la présence d'un ciment intercellulaire.

MECANISMES DE L'ADHESION DES CELLULES DANS
LES TISSUS ANIMAUX

I - L'ADHESION DES CELLULES PAR EFFETS DE MEMBRANE

Une série de résultats expérimentaux, obtenus principalement sur les cellules embryonnaires en cours de différenciation et sur les cellules en culture, révèle l'existence de forces de cohésion au niveau des membranes cellulaires elles-mêmes : forces de COULOMB et forces de VAN DER WAALS.

Les forces de COULOMB font intervenir les charges ioniques comme, par exemple, celles des cations bivalents. Les forces de VAN DER WAALS, au contraire, s'appliquent à des molécules apolaires : forces de LONDON, dans le cas de particules apolaires comme les atomes ; forces de DEBYE dans le cas de distribution asymétrique des charges dans les molécules ; forces de KEESOM enfin, dans le cas des dipôles permanents. Par ailleurs, les liaisons "pont hydrogène", qui jouent un rôle essentiel dans la cohésion moléculaire de nombreux composés d'importance biologique comme, par exemple, les acides désoxyribonucléiques, interviennent également dans la cohésion des cellules.

Ces différents facteurs sont, naturellement, dénués de toute spécificité et n'expliquent pas les variations d'adhésivité qui apparaissent si fréquemment au sein d'un édifice cellulaire en cours de différenciation. Plusieurs théories ont été émises pour tenter d'expliquer ces nuances que l'on observe dans la cohésion des tissus.

A - THEORIE DE LA ZIPPER-ACTION DE SCHMITT

La théorie de la "Zipper-action" de SCHMITT (66) tente d'expliquer les variations d'adhésivité en faisant intervenir un mécanisme de "solvation" des membranes. Selon SCHMITT, les groupes polaires des molécules constituant la membrane déclencheraient la formation d'une couche d'eau d'hydratation autour de celle-ci. Cette couche s'opposerait à toute liaison de la cellule avec ses voisines et l'adhésion de deux cellules ne se réaliserait que par la disparition de la majeure partie de l'eau intercellulaire sous l'action de substances, - comme les sels de calcium ou les protéines basiques - , apparues spontanément ou ajoutées au milieu. Il s'agirait donc, en fait, d'un mécanisme de cohésion dû à la formation d'un ciment déposé en une couche monoionique ou monomoléculaire.

Cette hypothèse expliquerait le rôle du calcium dans l'adhésion cellulaire : par son affinité pour l'eau et par sa bivalence, ce cation ferait disparaître la couche d'hydratation et permettrait aux molécules de deux membranes voisines de s'unir par son intermédiaire (figure 7). Il jouerait donc le rôle d'un "ciment ionique". Ainsi s'expliquerait le mode d'action des agents complexant le calcium dans la dissociation tissulaire.

En outre, selon SCHMITT, dans certains cas, la substance responsable de la cohésion des cellules serait une protéine basique, une histone par exemple, qui formerait un film monomoléculaire entre les deux membranes et assurerait l'adhésion des cellules par l'intermédiaire de ses groupements ionisés.

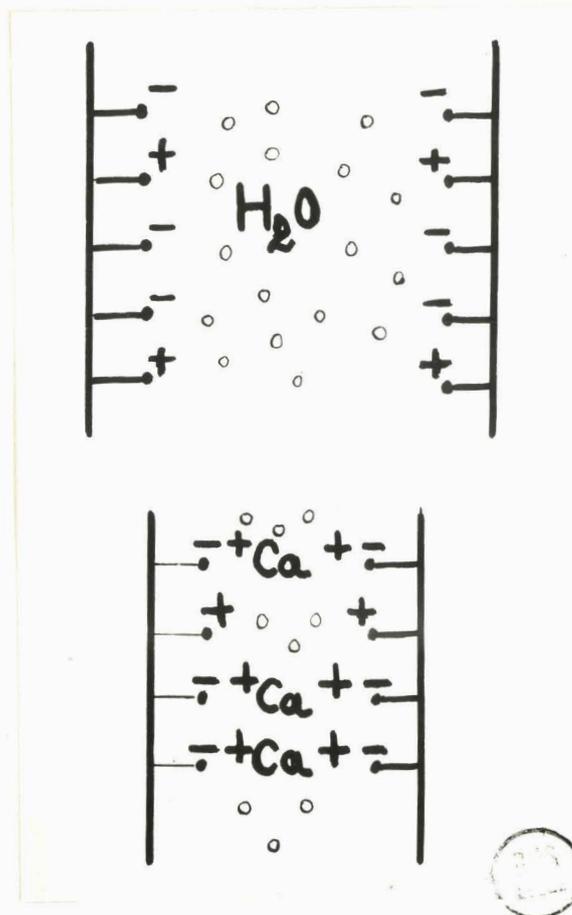


Figure 7

Mécanisme de l'action de l'ion calcium, selon la théorie de la "Zipper action" de SCHMITT, dans la cohésion tissulaire.

- A - Les molécules d'eau d'hydratation empêchent ou diminuent la cohésion des cellules.
- B - Les ions Ca^{++} , après avoir diminué la teneur en eau des espaces intercellulaires, agissent comme "ciment ionique" pour renforcer l'adhésion des cellules.

B - THEORIE DE L'ADHESIVITE SPECIFIQUE DE P.WEISS

Selon P.WEISS (67) la spécificité de l'adhésion, dont les expériences de réassociations cellulaires ont démontré l'importance, serait due à un mécanisme de complémentarité stérique spécifique des molécules de deux membranes voisines (figure 8). Cette notion s'appuie sur les considérations de PAULING (68) à propos de l'importance de la configuration spatiale des molécules dans les réactions du type enzyme-substrat ou antigène-anticorps. On voit, d'après les schémas proposés par les auteurs, que la complémentarité pourrait être soit directe (figure 8 a) soit indirecte (figure 8 b) grâce à l'intervention d'une substance étrangère à la membrane, comme le calcium ou des protéines ou encore un ciment intercellulaire de toute autre nature. Des modifications de la composition moléculaire des membranes au cours de la différenciation expliqueraient les remaniements cellulaires, aboutissant à la formation de tissus organisés et stables. L'hypothèse de P.WEISS explique à la fois le rôle de facteurs de cohésion tels que le calcium et la spécificité de l'association des cellules dans la formation des tissus. Il est malheureusement difficile d'entrevoir l'apport de preuves directes à ce mécanisme d'action.

II - L'ADHESION DES CELLULES PAR CIMENT INTERCELLULAIRE

Les cellules de certains tissus, - comme le tissu conjonctif, par exemple - , sont manifestement associées les unes aux autres par un "ciment intercellulaire" : les cellules conjonctives sont, en effet, noyées dans une substance amorphe, appelée substance fondamentale, qui est parcourue par un réseau plus ou moins dense de fibres protéiques de trois types différents: réticuline, élastine, collagène.

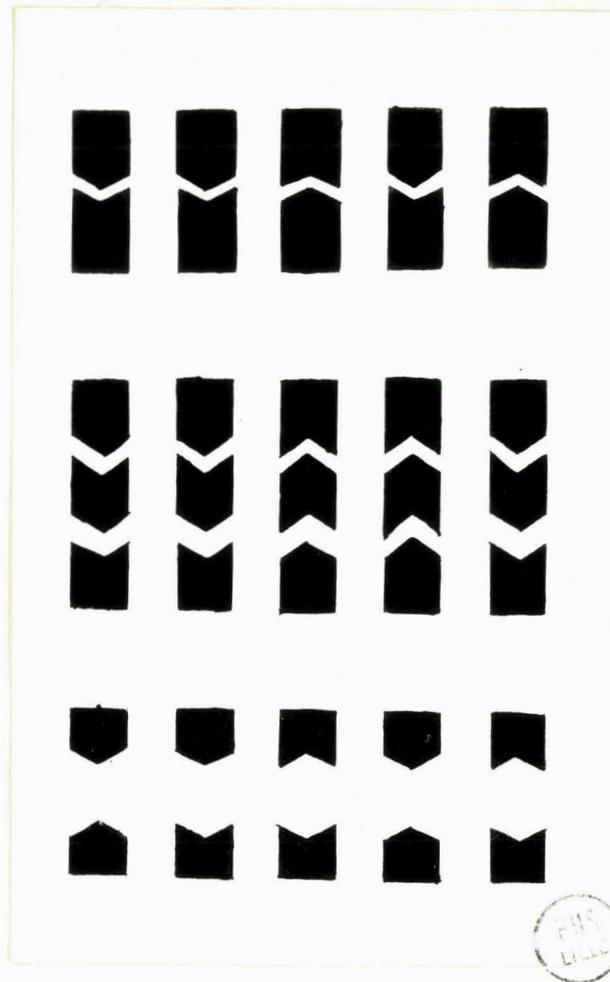


Figure 8

Illustration de la théorie de la complémentarité de P.WEISS

- A : Disposition de molécules complémentaires sur la partie extérieure de deux plasmolèmes : l'association des cellules est possible par complémentarité directe .
- B : Disposition de molécules sur la partie extérieure de deux plasmolèmes. Elles sont unies par l'intermédiaire d'un ciment intermoléculaire : l'association des cellules est possible par complémentarité indirecte .
- C : Disposition de molécules non complémentaires sur la partie extérieure de deux plasmolèmes : l'association des cellules est impossible.

(d'après P.WEISS) (67)

Dans d'autres tissus, au contraire, le "ciment intercellulaire" est beaucoup moins abondant et n'est pas uniformément réparti. Par exemple, l'organisation générale et la morphologie du parenchyme hépatique sont assurées par une enveloppe conjonctive et l'organisation interne montre des travées de cellules hépatiques délimitées par du tissu conjonctif dans lequel on met en évidence des fibres de réticuline. Mais à l'intérieur de chaque travée hépatique, on voit au microscope électronique que les hépatocytes sont accolés les uns aux autres sans qu'il soit possible d'observer la présence d'un "ciment intercellulaire". On ne peut cependant pas exclure a priori l'existence d'un film moléculaire de substance fondamentale qui serait responsable de l'adhésion des cellules.

L'hypothèse de l'existence, dans le cas du foie, d'un ciment intercellulaire avait déjà été émise vers 1910 par plusieurs auteurs comme RINGER, HERBST, GUERTON, LILLIE, CHAMBERS, ZWEIFACH qui admettaient que les cellules étaient associées les unes aux autres par un ciment riche en protéinates, en pectinates et en savons de calcium (sur ce sujet, voir HÖBER) (69).

En 1943, RÜNNSTROM et HOLTFRETER (70) avançaient que, dans les tissus, les cellules étaient enveloppées d'un film périphérique de nature protéique (hyaline layer ou coat).

Les hypothèses les plus récentes admettent l'existence d'un ciment intercellulaire de nature conjonctive. Cette substance jouerait dans le tissu un rôle essentiel de cohésion, en même temps qu'elle constituerait l'élément de soutien des capillaires sanguins. En outre, elle assurerait les échanges entre les cellules.

Nous nous proposons donc d'exposer rapidement l'état actuel de nos connaissances concernant la nature chimique et l'ultrastructure du tissu conjonctif et d'expliquer son rôle éventuel dans la cohésion tissulaire.

A - ETUDE DU TISSU CONJONCTIF

Le tissu conjonctif se montre constitué, au microscope photonique, d'un réseau de fibres noyées dans une substance amorphe (figure 9) .

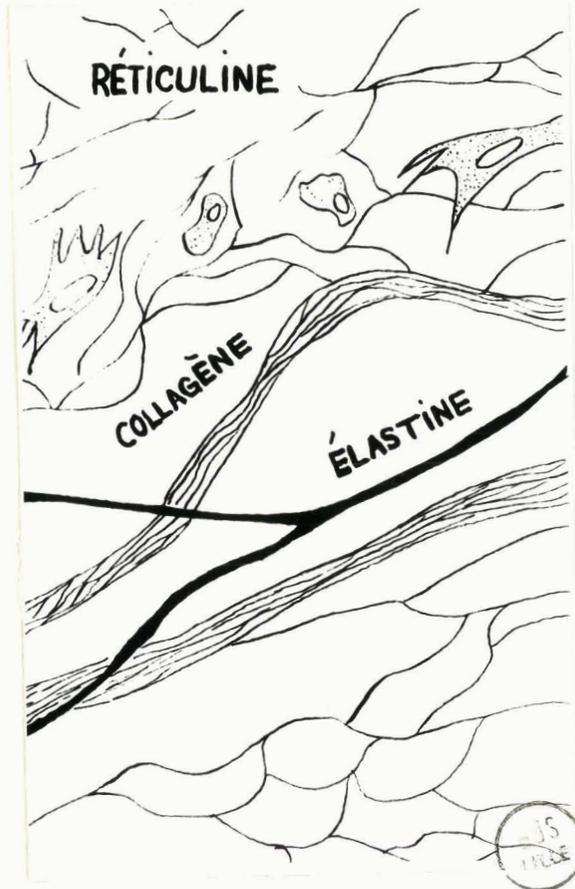


Figure 9

Représentation schématique du tissu conjonctif

(d'après KUYPER) (71)

1 - LES FIBRES CONJONCTIVES : COLLAGÈNE, RETICULINE, ELASTINE.

La nature exacte de ces fibres est encore discutée. Elles semblent être, cependant, de nature glycoprotéidique. Parmi elles, les fibres de collagène ont été les mieux étudiées jusqu'à présent.

a - Le collagène.

NEUBERGER et al. (72) ont établi que le collagène représentait approximativement le tiers des protéines totales des Mammifères. Isolé à partir des tendons, il est caractérisé par une richesse particulière en glyco-colle, en proline et en hydroxyproline et par l'absence totale d'acides aminés soufrés. BOWES et MOSS (73) ont montré qu'il renfermait une proportion faible de polysides. Actuellement, la nature glycoprotéidique du collagène est bien démontrée (VERZAR) (74). On explique d'ailleurs sa résistance particulière à l'hydrolyse par les enzymes protéolytiques par la présence des groupes mucopolysaccharidiques protecteurs.

Le collagène peut se présenter en fibrilles simples, mais il forme souvent des faisceaux plus épais résultant de l'association d'un certain nombre de ces fibrilles élémentaires. L'observation au microscope électronique des fibrilles montre une répétition régulière de striations espacées par des intervalles de 640 \AA . L'observation des fibrilles associées montre, selon HALL (75), la présence de faisceaux de fibrilles noyées dans une substance amorphe et limitées par une enveloppe qui est hydrolysable par l'élastase ou par la collagénase. La présence de cette substance amorphe, riche en polysides, dans les faisceaux de fibrilles, expliquerait la réaction positive des fibres de collagène vis-à-vis du réactif à l'acide périodique-fuchsine de SCHIFF, spécifique des groupements glucidiques.

Des travaux récents (voir VERZAR) (76) ont montré que les fibres de collagène étaient constituées par la juxtaposition de molécules de collagène dont chacune est formée par l'association de trois chaînes glycoprotéidiques. Chacune de ces chaînes est composée de molécules polypeptidiques de 640 \AA de longueur unies les unes aux autres en longs filaments par des unités polysaccharidiques.

b - La réticuline et l'élastine.

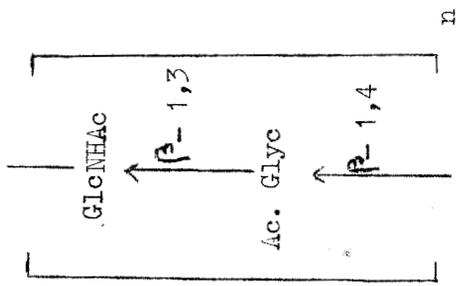
La nature chimique des fibres de réticuline et d'élastine est encore très mal connue. La réticuline semble posséder une composition très voisine de celle du collagène (BOWES, ELLIOTT et MOSS (77) ; EASTOE (78)) et se classe dans le même groupe chimique. L'élastine est une scléroprotéine fibreuse dont la composition chimique est peu différente de celle des deux composés précédents. Riche en glycoColle et en proline, comme les collagènes, elle s'en distingue par une proportion non négligeable d'acides aminés soufrés (0,35 p.100 de cystine). La présence de glucosamine et de galactosamine dans sa molécule permet cependant de la classer parmi les glycoprotéides. Elle est plus résistante à la protéolyse que les collagènes mais elle est totalement hydrolysée par un enzyme spécifique : l'élastase, qui est une mucase et qui libèrerait les sous-unités protéidiques associées à des mucopolysaccharides, en hydrolysant ces derniers.

2 - LA SUBSTANCE AMORPHE

Contrairement aux fibres conjonctives qui renferment une faible proportion de glucides, la substance amorphe est extrêmement riche en polysaccharides du groupe des mucopolysaccharides acides. Ces composés sont des polymères d'unités diholosidiques, comportant une hexosamine et un acide uronique ou un ose ; les fonctions alcooliques restées libres sont parfois estérifiées par de l'acide sulfurique dont la présence, associée à celle de l'acide uronique, confère à la molécule mucopolyosidique un caractère fortement acide. Dans la substance amorphe, ces mucopolysaccharides acides sont associés par ionovalence à des molécules protéiques pour former des mucoprotéines (selon la nomenclature de MEYER) (79). Ces dernières formeraient des gels fortement hydratés et de viscosité élevée.

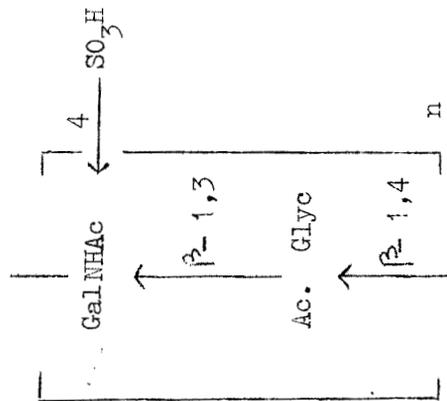
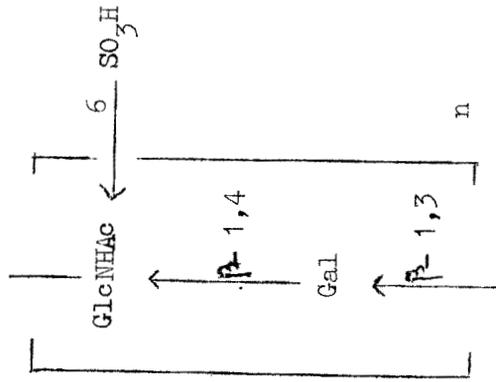
Nous avons rassemblé dans la figure 10 les formules chimiques des mucopolysaccharides acides actuellement connus.

Des enzymes, comme la hyaluronidase, hydrolysent plus ou moins spécifiquement les mucopolyosides. Ce sont les mucopolyosidases.

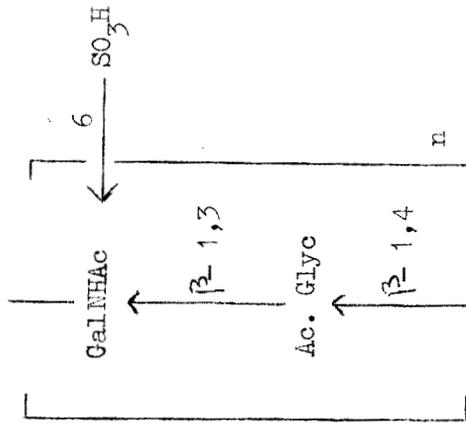


Acide hyaluronique

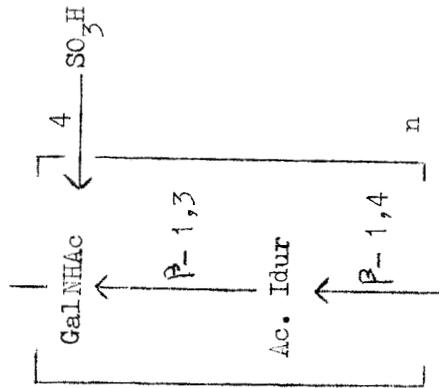
Acide kératosulfurique



Acide chondroïtine-sulfurique A



Acide chondroïtine-sulfurique C



Acide chondroïtine-sulfurique B

Figure 10

Formules des principaux mucopolysides de la substance fondamentale et du tissu conjonctif.

GlcNHAc = N-acétyl-D-glucosamine ; Gal NHAc = N-acétyl-D-galactosamine ; Ac. Glyc. = acide D-glycouronique ; Ac. Idur = acide L-iduronique ; Gal = D-galactose.

B - ROLE DU CIMENT INTERCELLULAIRE DANS L'ADHESIVITE
DES CELLULES

En admettant que les cellules sont associées par de la substance fondamentale, déposée en film ou en couche épaisse, qui les cimente les unes aux autres, on apporte une explication séduisante à l'adhésivité cellulaire et à la cohésion tissulaire. Il devient, en outre, possible d'interpréter des résultats acquis dans les domaines de la physiologie et de la biochimie à propos de l'influence du milieu et d'échafauder des hypothèses pour expliquer le rôle du ciment intercellulaire.

1 - INFLUENCE DU MILIEU SUR LA COHESION TISSULAIRE

a - Rôle des sels minéraux.

BOHEM et SALM-HORSTMAR, en 1856 (cités par CHAMBERS) (80) puis WILLE, en 1897 (81) et BENECKE en 1898 (82) furent les premiers à soupçonner l'importance du calcium dans la cohésion des tissus. RINGER, en 1890 (83) observa que le bicarbonate de calcium empêchait la dissolution dans l'eau distillée du ciment intercellulaire des algues *Laminaria*. HERBST, en 1900 (84) obtint la dissociation des blastomères de l'oeuf d'Echinus microtuberculatus dans de l'eau de mer privée de calcium. Plus tard, GRAY, en 1924 (85) et d'autres auteurs comme MOORE (86) et HEILBRUNN (87) en 1928, CHAMBERS en 1940 (88) précisèrent que la couche hyaline des oeufs fertilisés, dont la nature est voisine de celle du ciment intercellulaire, se dissout dans les solutions aqueuses dépourvues de sels de calcium. Au contraire, un excès d'ions calcium renforce l'adhésivité (ZWEIFACH) (89). Cependant nous ne possédons actuellement aucune donnée quantitative sur les relations entre les forces d'adhésion et la teneur en calcium

Le magnésium semble également jouer un rôle important dans la cohésion. C'est du moins la conclusion à laquelle parvient GRAY (90) à la suite de ses travaux sur le tissu branchial de Mytilus.

De nombreux auteurs ont noté que certains anions possédaient un effet dispersant vis-à-vis des cellules. Les ions PO_4^{-----} , par exemple, favorisent en général la dissociation des tissus. HARKNESS (91) a démontré que les ions PO_4^{-----} provoquent à pH 9 une solubilisation des collagènes de la substance conjonctive de la peau. ESSNER et coll. (92) ont observé que les phosphates favorisaient l'action dispersante de la trypsine dans le cas des tissus tumoraux. MANDL et coll. (93) ont étudié les caractères de solubilité des protéines et des mucopolysaccharides acides dans divers tampons phosphates et précisé que les ions PO_4^{-----} favorisaient à la fois la dissolution des substances intercellulaires et la préservation des propriétés de perméabilité des membranes cellulaires.

b - Rôle des protéides.

L'étude de l'action des enzymes protéolytiques, - principalement l'action de la trypsine - , sur le ciment intercellulaire a permis de démontrer que les protéines jouaient un rôle important dans la cohésion tissulaire.

Dès 1772, HUNTER (94), puis Claude BERNARD, en 1856 (95), HARLEY, en 1860 (96) et SCHIFF, en 1868 (97) s'étaient intéressés à l'auto-digestion de la paroi de l'estomac par les enzymes gastriques, après la mort. A partir de ces travaux, FERMI (98) posa, en 1910, le problème de la résistance de la membrane cellulaire vis-à-vis des enzymes protéolytiques. Les résultats obtenus par cet auteur démontrent que, d'une part, la digestion tryptique provoque la séparation des cellules d'un tissu par dissolution du ciment intercellulaire et que, d'autre part, les cellules ne sont pas digérées si elles sont vivantes. Au contraire, les cellules mortes sont totalement lysées par l'enzyme. On peut donc conclure que la mort de la cellule provoque des altérations profondes de sa membrane qui modifient totalement la perméabilité sélective de cette dernière. NORTHROP (99), MELAWAR (100), MEYER et RAPPORT (101), RUNNSTROM, MONNE et BROMAN (102) ont, eux aussi, observé la résistance particulière des cellules vivantes à l'action de la trypsine. Il est d'ailleurs intéressant de signaler que RINALDINI (103) met à profit cette propriété pour contrôler la survie des cellules en culture.

C'est essentiellement sur ces deux séries d'observations concernant l'adhésivité des cellules : influence des ions calcium et phosphates et rôle important des protéides, que sont fondés les principes de la plupart des méthodes de dissociation des tissus.

c - Influence du pH.

Le pH possède, lui aussi, une action énergique sur les forces de cohésion des cellules. C'est ainsi que l'alcalinisation du milieu à des pH variant de 9 à 11 provoque rapidement la dispersion des oeufs d'Amphibiens (voir DEVILLERS) (104) et l'acidification jusqu'à pH 4,4 produit une dissociation des tissus (HOLTFRETER) (105). Cependant, l'influence du pH est souvent très différente suivant les organismes : ESSNER et coll. (106) ont, par exemple, précisé que l'alcalinisation à pH 8,8 dégrade le ciment intercellulaire de certaines tumeurs dont les cellules sont libérées. Au contraire, les pH inférieurs à 6,4 provoquent des traumatismes graves, sans effet net sur la dissociation.

d - Influence des détergents et de diverses substances.

Les détergents, à très faible concentration, possèdent un effet anti-adhésif vis-à-vis des édifices cellulaires (DEVILLERS) (107), ainsi que des solutions molaires de non-électrolytes comme l'urée, le glycérol et le glucose (GRAY) (108).

2 - HYPOTHESES CONCERNANT LE ROLE DU CIMENT INTERCELLULAIRE

Il apparaît ainsi que l'élimination du calcium, dont la substance fondamentale est très riche, l'attaque des protéines par les enzymes et les modifications de pH sont parmi les moyens de dissociation des tissus les plus efficaces.

L'action de ces différents facteurs peut s'expliquer grâce aux hypothèses que nous avons citées plus haut.

Dans le cas où les cellules sont associées par des protéinates, pectinates et savons de calcium, l'élimination de l'ion calcium, les modifications de pH et l'action des enzymes protéolytiques provoquent une dissolution de ces composés. RINALDINI (109) signale à ce propos que les pectinases attaquent les structures intercellulaires de coupes de tissus animaux fixés par l'acétone. Au contraire, si on admet avec HOLTFRETER l'existence d'une couche péricellulaire essentiellement protéique, on pourra expliquer seulement l'action des enzymes protéolytiques.

Les observations de RINALDINI (110) à propos de l'action bénéfique, sur la dissociation des tissus animaux, des enzymes spécifiques des constituants chimiques de la substance fondamentale sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle la cohésion tissulaire est assurée par une substance interstitielle dont la nature chimique est analogue ou identique à celle du tissu conjonctif. En effet, l'auteur observe que la hyaluronidase testiculaire est un agent de dissociation dont l'action est malheureusement très lente, principalement sur le coeur, le muscle et la peau. D'autre part, les enzymes qui attaquent les structures fibreuses du tissu conjonctif provoquent également une dissociation nette des tissus : par exemple la collagénase de Clostridium Welchii (OAKLEY) (111) dissocie de nombreux tissus animaux ; l'élastase possède la même activité sur les tissus épithéliaux.

L'action dispersante des facteurs d'élimination des ions calcium, des modifications du pH et des protéolyses enzymatiques peut, elle aussi, s'expliquer si l'on invoque une structure conjonctive du ciment intercellulaire.

Les cations divalents, dont la substance amorphe est très riche, assurent, en effet, la cohésion moléculaire du milieu en formant des "ponts" entre les groupements prosthétiques des mucoprotéines de la substance amorphe : des liaisons d'ionovalence s'établissent entre les deux charges positives du calcium et les charges négatives des groupes carboxyles ou sulfuryles de deux molécules voisines de mucopolysaccharides acides. L'élimination du calcium dissocie cette trame moléculaire et provoque une dissolution du gel amorphe. Les modifications du pH provoquent également une dissolution de la substance amorphe en modifiant les cohésions ioniques internes. Enfin, les enzymes protéolytiques agissent directement sur la partie protéique des mucoprotéines et provoquent l'hydrolyse du ciment.

Selon cette dernière hypothèse, il faut donc considérer, de façon générale, un organe comme un édifice constitué par une juxtaposition de cellules, maintenues en place par un réseau de nature conjonctive et qui entoure, suivant les tissus, chacune des cellules ou des groupes de cellules. La dissociation du tissu impliquera alors une dissolution de ce ciment conjonctif par hydrolyse ou par déséquilibre ionique.

CONCLUSION

Malgré le grand intérêt que présentent ces études, il est fondamental de souligner, à la fin de cette mise au point, que ces nombreuses théories biologiques reposent sur des bases expérimentales physico-chimiques encore trop rares. En outre, la nature chimique exacte du ciment intercellulaire reste à définir et le problème même de son existence subsiste toujours. S'agit-il d'un revêtement protéique ou d'un "film ionique" ? Les organes sont-ils formés d'amas cellulaires retenus dans un "sac" conjonctif ou s'agit-il d'édifices complexes dont chaque cellule adhère à ses voisines par un jeu de forces multiples d'adhésion ? La membrane cellulaire animale est-elle nettement individualisée, forme-t-elle une couche moléculaire organisée ou n'est-elle qu'une limite fluctuante en perpétuel renouvellement ?

Malgré les très nombreux travaux entrepris jusqu'à présent, ces questions demeurent sans réponse et il faut bien reconnaître que nous en sommes actuellement encore réduits à invoquer de pures hypothèses. C'est pourquoi l'un des buts principaux de notre travail était de trouver une réponse à certaines de ces énigmes en recherchant méthodiquement les meilleurs procédés de dissociation des tissus. Dans le chapitre suivant, nous exposons les principes et l'historique des techniques de préparation de cellules libérées, à partir des tissus animaux ainsi que les applications biologiques et biochimiques auxquelles ces méthodes ont donné lieu.

LES METHODES DE PREPARATION
DE CELLULES A PARTIR DES TISSUS
ANIMAUX ET LEURS APPLICATIONS

REVUE GENERALE

Au moment où nous avons repris la question des cellules isolées, plusieurs méthodes avaient été décrites. Elles avaient fait l'objet d'applications dans les domaines de la Biologie et de la Biochimie. Nous nous proposons de résumer dans ce chapitre les techniques qui ont été les plus couramment utilisées et les résultats auxquels elles ont conduit.

Les travaux effectués sur les cellules libérées à partir des tissus ont suivi, depuis 1850, une évolution en deux étapes bien nettes. Pendant près d'un siècle, les études ont été essentiellement d'ordre biologique. Elles ont permis, comme nous l'avons vu, de jeter les bases des hypothèses concernant la cohésion tissulaire. Mais il a fallu attendre les années 1952 - 1954 pour voir apparaître les premières méthodes de dissociation tissulaire. Actuellement, le problème qui se pose est essentiellement celui de l'intégrité des cellules obtenues, car il ne semble pas que les procédés de préparation décrits jusqu'ici fournissent des cellules libres vivantes dont l'intégrité chimique et biologique soit préservée. A ce problème s'ajoute celui du rendement.

Ces problèmes multiples peuvent se résumer dans la formule suivante : les méthodes de dissociation des tissus doivent fournir rapidement des quantités importantes de cellules libres, vivantes et intactes du double point de vue de la morphologie et de la biochimie.

Après avoir brièvement exposé les travaux antérieurs à 1950, nous décrirons les différentes méthodes qui ont été proposées depuis cette date pour préparer des cellules libérées à partir des tissus animaux.

Nous précisons ensuite les principales applications auxquelles ont donné lieu les suspensions de cellules libérées, de manière à faire ressortir, d'une part, l'intérêt que présente la technique de préparation de cellules intactes à partir des tissus et, d'autre part, le manque d'unité des résultats acquis jusqu'à présent par suite des imperfections des méthodes.

METHODES DE DISSOCIATION DES TISSUS ANIMAUX

A partir de travaux qui précisèrent l'influence des enzymes protéolytiques sur les tissus, ROUS et JONES en 1916 (112) tentèrent les premiers de réaliser la dissociation de tissus en culture par des incubations effectuées avec de la trypsine purifiée à 37°C pendant 1 heure. Ils obtinrent de cette manière des groupes de cellules "viabiles", à partir de cultures de tissus d'Oiseaux et de Mammifères (rate, tissu conjonctif, endothélium et tissus tumoraux). Ces études furent reprises beaucoup plus tard, en 1940-1945, par LATER et MEDAWAR (113) et par WILLMER (114) avec des cultures de coeur d'embryon de poulet.

En 1926, PRINGSHEIM (115) proposa, le premier, une méthode de dissociation qui faisait appel à un agent complexant le calcium : l'oxalate d'ammonium. Il réussit de cette manière à dissocier des tissus végétaux. Cette méthode fut reprise par NORTHGRAFT (116) en 1951.

Plus tard, GRAY (117) démontra que des solutions molaires de non-électrolytes, comme l'urée, le glycérol et le glucose, provoquaient une dissolution du ciment intercellulaire.

Cette première série de travaux n'apportait certes pas la solution du problème mais permettait cependant d'entrevoir la possibilité de dissocier les tissus animaux par des agents chimiques ou enzymatiques. Jusqu'en 1950, les auteurs s'attachèrent à préciser l'action des enzymes sur le ciment

intercellulaire et sur les membranes cellulaires, ainsi que les effets du pH et des ions minéraux sur la cohésion tissulaire. Les expérimentations furent essentiellement réalisées à partir d'embryons ou de tissus en culture. Enfin, les années 1952-1954 virent l'apparition d'un grand nombre de méthodes de dissociation de tissus prélevés sur l'animal lui-même.

Les différentes méthodes qui ont été proposées depuis 1952 sont fondées sur l'un des trois principes suivants :

1°- Dissolution du ciment intercellulaire par les enzymes protéolytiques ou glycolytiques. C'est la dissociation enzymatique.

2°- Destruction de la cohésion tissulaire sous l'action d'agents chimiques divers. C'est la dissociation chimique.

3°- Dispersion des cellules par des moyens purement mécaniques. C'est la dissociation mécanique.

I - METHODES DE DISSOCIATION ENZYMATIQUE

L'action d'un grand nombre d'enzymes sur le ciment intercellulaire a été étudiée. On peut considérer, d'une part, les enzymes qui attaquent les formations fibreuses protéidiques et, d'autre part, ceux qui hydrolysent la substance fondamentale en agissant soit sur les groupements prosthétiques de nature glucidique (mucases), soit sur la copule protéique (protéases) des glycoprotéides.

A - UTILISATION D'ENZYMES AGISSANT SUR LES FORMATIONS FIBREUSES PROTEIDIQUES

Les fibres sont en général très résistantes vis-à-vis des enzymes protéolytiques. Seul le collagène est attaqué par la pepsine à des pH très acides. Au contraire, deux enzymes désorganisent de façon identique le

collagène et l'élastine : il s'agit de la collagénase et de l'élastase.

RINALDINI (118) a étudié l'action sur différents tissus embryonnaires de préparations purifiées de collagénases obtenues à partir de Clostridium Welchii, Type A . Par des incubations effectuées pendant des temps variant entre 30 minutes et 2 heures dans des solutions contenant de 0,1 à 1 mg d'enzyme p. ml de solution TYRODE, il obtint des cellules libres dont le cytoplasme était très endommagé et qui ne survivaient pas en culture. Selon le même auteur, l'élastase, après une incubation dans des solutions de 0,02 g d'enzyme p 100 ml , provoque une excellente dissociation des embryons de poulet de 13 jours. L'épithélium se dissocie très vite tandis que le muscle cardiaque et le foie sont attaqués très lentement. L'étude des cellules isolées n'a pas été réalisée par l'auteur.

B - UTILISATION D'ENZYMES HYDROLYSANT LA SUBSTANCE FONDAIMENTALE

1°- Action des mucases.

RINALDINI (119) a signalé que les hyaluronidases, à la concentration de 0,1 à 1 mg. p. ml , ont une action beaucoup trop lente pour être utilisées dans les méthodes de dissociation tissulaire. DAY (120) avait fait antérieurement la même observation. Au contraire, les mucoprotéïnases extraites du pancréas par les méthodes de BALO (121) et BANGA (122) provoquent une dissociation satisfaisante du coeur, du muscle et du foie des embryons de poulet. L'auteur précise, en outre, que les gels mucoïdiques qui se forment au cours de la digestion trypsique des tissus se dissolvent parfaitement sous l'action de l'élastomucase du pancréas.

Ces travaux n'ont pas reçu d'application, probablement à cause des difficultés que présente l'isolement des enzymes. En outre, aucune recherche concernant l'intégrité des cellules et leur pouvoir de survie n'a été effectuée.

2°- Action des protéases.

Les protéases ont été largement employés pour réaliser la dissociation des tissus en raison de leur activité élevée et de leur spécificité. Parmi elles, la trypsine est le plus couramment utilisée.

a- Action de la pepsine et de la papaïne.

On avait démontré, en 1926, que la pepsine ne digérait pas les cellules vivantes. Mais son pH d'activité très bas (1,5 à 2,5) l'a fait exclure des méthodes de dissociation tissulaire. On sait, en effet, que les pH très acides provoquent des altérations graves des cellules.

RINALDINI (123) a obtenu d'excellentes dissociations de nombreux tissus sous l'action de solutions de papaïne à 0,1 ou 1 g p. 100 ml, activée par le chlorhydrate de cystéine (0,02 g p.100 ml). Les cellules ainsi obtenues paraissaient morphologiquement intactes au microscope photonique, mais aucune observation au microscope électronique n'a été effectuée et leur activité biochimique et biologique n'a pas été étudiée.

b- Digestion par la trypsine.

La trypsine est l'enzyme de choix pour réaliser des dissociations de tissus, grâce à son pH d'action voisin de la neutralité, compatible avec la vie cellulaire.

En 1952, DULBECCO et VOGT (124) ont proposé une première méthode de dissociation d'embryons de poulet entier par des incubations répétées en présence de trypsine et ont obtenu des suspensions contenant de nombreux amas cellulaires et une proportion faible de cellules "libres". La méthode était donc très imparfaite d'autant plus que les rares cellules obtenues étaient mortes, tuées par la brutalité du procédé.

Simultanément MOSCONA et al. (125) préparaient des cellules libres par désagrégation de fragments embryonnaires au moyen de solutions salines isotoniques exemptes de calcium et de magnésium et contenant 3 g de trypsine p.100 ml. Les suspensions de cellules obtenues se développaient en cultures.

L'état de pureté des suspensions n'a cependant pas été rigoureusement contrôlé. En particulier, l'absence d'amas cellulaires n'a pas été vérifiée. En outre, aucun contrôle au microscope électronique n'a été effectué.

En 1953, RINALDINI (126) reprenait cette technique en l'appliquant à la dissociation de divers tissus embryonnaires, adultes et tumoraux (coeur, foie, peau, muscle, cerveau, intestin, rate) et signalait que seules les cellules embryonnaires isolées se développaient en culture de façon satisfaisante. L'auteur (127) présentait, en outre, un procédé simple de contrôle de la vitalité des cellules en culture, fondé sur une observation antérieure de NORTROP (128), selon laquelle la trypsine ne détruit que les cellules mortes : l'addition d'enzyme au milieu de culture permet donc de vérifier aisément si les cellules sont restées vivantes.

En 1954, DULBECCO et VOGT (129) présentaient une nouvelle méthode de digestion tryptique du foie de Rat, qui leur fournissait des cellules hépatiques libres. SAINT-AMAND et TIPTON (130) obtenaient par ailleurs la séparation de neuroblastes et d'autres cellules embryonnaires par action combinée de la trypsine et de la hyaluronidase en l'absence d'ions calcium : les cellules ainsi isolées conservaient leur activité mitotique et leur activité respiratoire. ESSNER et al. (131) contrôlèrent l'action des divers enzymes sur la dissociation de cellules tumorales à partir d'hépatomes ascitiques. Ils étudièrent l'action, à des concentrations de 1 mg p. ml, à 37°C et pendant 1 heure, des enzymes suivants : trypsine, chymotrypsine, papaïne (activée par le glutathion), ribonucléase, lipase pancréatique, amygdaline, hyaluronidase, lysozyme, amylases et enzymes végétaux. Seules la trypsine cristallisée et la chymotrypsine provoquaient une dissociation. Avec les autres enzymes, un voile diffus apparaissait sans aucune dissociation notable. Les auteurs précisèrent, en outre, que des pH légèrement alcalins amélioraient les rendements. Aucune observation de la morphologie et de la viabilité des cellules n'accompagnait la description de la méthode.

Les méthodes de digestion tryptique furent très souvent appliquées durant cette période, notamment par YOUNGER et al. (132) ; MELNICK et al. (133)

et plus particulièrement encore par SCHERER et al. (134) dont la méthode est encore utilisée pour préparer des cellules de type HeLa.

LONGMUIR et REES (135) ont repris la méthode de DULBECCO et VOGT et ont obtenu des cellules libres à partir de l'épiderme du Rat et du Cobaye. Une étude de l'activité respiratoire des cellules ainsi préparées, les amenèrent à conclure à une détérioration de l'équipement en enzymes respiratoires de la cellule, consécutif à la dissociation. En 1958, WARBURG et al. (136) ont appliqué la même méthode pour obtenir avec succès des cultures de cellules libres à partir de divers organes du Chien et du Rat.

Dans un travail récent, GARVEY (137) présente d'intéressantes conclusions. L'auteur réalise la séparation et la culture in vitro des deux types de cellules hépatiques. Les cellules parenchymateuses sont obtenues par dissociation mécanique. Les cellules réticulo-endothéliales de KUPFER sont préparées sélectivement par une digestion enzymatique réalisée en deux temps : une incubation de fragments de foie dans un milieu de culture synthétique contenant 0,3 g de trypsine p.100 permet d'abord de dissocier totalement le tissu hépatique ; les cellules de KUPFER sont ensuite obtenues à partir de cette suspension par digestion des cellules parenchymateuses par la collagénase à la concentration de 0,01 g p.100 ml. Les cellules réticulo-endothéliales résistent à l'action de cet enzyme et conservent leurs propriétés de prolifération en cultures. La contamination par les hépatocytes n'excède pas 1 p.100 . Selon l'auteur, le sérum de Rat est indispensable à la prolifération des cellules de KUPFER qui présentent des figures mitotiques après 10 jours de culture dans le milieu commercial "HYPROTYGEN", additionné de 15 p.100 de sérum de Rat. L'auteur signale, enfin, que la mise en culture simultanée des deux types de cellules montre un ralentissement du développement des cellules parenchymateuses qui sont étouffées par les cellules de KUPFER dont les mitoses sont plus actives et qui se transforment très vite en fibroblastes. L'auteur ne fait mention cependant d'aucun contrôle de la morphologie et de l'activité biochimique des cellules.

Enfin, le tout récent mémoire de SHAH (138) décrit une technique de dissociation des cellules rénales de Grenouille par des incubations

réalisées entre 12 et 15°C dans un tampon minéral contenant 0,25 g de trypsine et 0,1 g de glucose p.100 ml. Les cellules obtenues possèdent une activité mitotique nette après 7 à 10 jours de culture et les cultures primaires ont été conservées environ trois mois.

Ce rapide exposé des techniques de dissociation des tissus par des enzymes montre que la trypsine est l'enzyme protéolytique qui donne les meilleurs résultats. Les suspensions de cellules obtenues par de nombreux auteurs semblent avoir conservé leurs propriétés vitales, mais la rigueur des contrôles de pureté habituellement réalisés ne permet pas de conclure sans ambiguïté à la viabilité des cellules libres obtenues : en particulier, la présence d'amas cellulaires n'a pas été systématiquement recherchée et ne peut donc être exclue a priori.

II - METHODES DE DISSOCIATION CHIMIQUE

A - AGENTS COMPLEXANT LE CALCIUM

En 1952, ANDERSON (139) a étudié l'action de divers agents complexant le calcium sur la dissociation du tissu hépatique de la Souris : citrate trisodique, pyrophosphate de sodium, "versène", sel de sodium de l'ATP, glycérophosphate de sodium. La méthode consiste à perfuser le foie de l'animal par une solution de LOCKE (note) sans calcium, contenant, en outre, l'agent complexant à des concentrations variant de 0,030 à 0,005 M. Le tissu est prélevé aussitôt après la perfusion et dissocié par une homogénéisation douce. Les rendements sont déterminés par comptage en établissant le rapport du nombre de cellules entières au nombre total de noyaux présents. Les solutions citratées donnent le meilleur rendement (45 à 67 p.100) et les solutions de

Note.- Composition de la solution de LOCKE : NaCl 9 g , K Cl 0,42 g ,
Ca Cl₂ 0,24 g , Na H CO₃ 0,20 g , eau bidistillée q.s.p. 1000 ml .

glycérophosphate fournissent le rendement le plus faible (15 à 17 p.100) . La vitalité des cellules obtenues n'a pas été contrôlée, mais LAWS et STICKLAND (140) précisèrent, l'année suivante, que cette méthode fournissait des cellules bien individualisées, exemptes d'amas cellulaires, mais qui avaient perdu leur activité respiratoire en milieu privé de succinate, même après l'addition à la solution d'incubation de substances les plus diverses comme le glucose, le pyruvate de sodium, le citrate de sodium, le cytochrome c , l'ATP, du sérum, des extraits de foie avec leurs microsomes ou le 2,4-dinitro-phénol.

Le principe de la perfusion par des solutions d'agents complexant les ions calcium fut repris par WATTIAUX (141) qui appliqua la méthode de perfusion (à l'aide de solutions de versène) décrite par SAINT-GEORGE, FRIEDMAN et BYERS (142), elle-même inspirée des études d'ANDERSON. La dissociation du tissu hépatique est obtenue après une perfusion réalisée avec une solution de saccharose 0,25 M et de versène 0,01 M . La séparation des deux types de cellules hépatiques (cellules parenchymateuses et cellules de KUPFFER) est fondée sur l'attraction magnétique que subissent les cellules de KUPFFER préalablement chargées en fer, grâce à l'injection d'une suspension de fer colloïdal dans du sérum physiologique. L'étude morphologique au microscope photonique, réalisée par l'auteur, lui a permis de noter une vacuolisation importante du cytoplasme. Les conclusions de nos travaux apporteront une explication à cette altération.

CHEVALIER (143), après avoir réalisé la séparation des deux types de cellules hépatiques à l'aide du mode opératoire précédent, a montré que les cellules avaient perdu toute activité respiratoire, que l'incorporation d'acétate marqué par le ^{14}C dans le cholestérol était nulle, mais que l'incorporation de glyocolle marqué dans les protéines était 7 à 10 fois supérieure à celle de tranches de tissu.

Récemment, enfin, RUTTER et BROSEMER (144) ont étudié le métabolisme glucidique endocellulaire des cellules hépatiques isolées par une perfusion réalisée à l'aide d'une solution de saccharose 0,24 M contenant du citrate de sodium à la concentration 0,0135 M , suivie d'une digestion

trypsique selon la méthode de DULBECCO et VOGT. Le rendement était de l'ordre de 10 à 30 p.100 .

Parallèlement à ces travaux, inspirés de ceux d'ANDERSON et fondés sur l'élimination du calcium par des agents le complexant, d'autres méthodes, proposées à la même époque, firent appel à l'effet du pH , à celui de sels divers ou encore à l'action de produits neutres.

B - ACTION D'AGENTS PHYSICOCHEMISTIQUES DIVERS

BRANSTER et MORTON, après avoir réalisé, en 1956 (145), une étude critique de l'isolement de cellules intactes dans des solutions physiologiques contenant enzymes et agents complexants à des pH divers, choisissaient, en 1957 (146), une méthode de perfusion par le liquide de NOVIKOFF (147) à base de polyvinylpyrrolidone, de saccharose et de sels de magnésium. Les cellules obtenues après une homogénéisation douce étaient plus ou moins lysées, mais le rendement était satisfaisant. Des contrôles systématiques de l'intégrité des cellules obtenues n'ont cependant pas été effectués.

LONGMUIR et REES (148) ont décrit, en 1956, une méthode originale de dissociation du foie de Rat par des incubations réalisées in vitro dans du tampon phosphate à pH 5 . Les auteurs avaient constaté que la méthode de DULBECCO et VOGT n'était pas applicable à l'étude de la respiration car les cellules obtenues par ce procédé étaient endommagées. Il existait, en outre, dans les suspensions, une proportion importante de mitochondries libres. A la suite de l'observation que des pH relativement faibles étaient susceptibles de provoquer la dissociation des tissus, ces auteurs effectuèrent des essais systématiques de dissociation dans des solutions tamponnées de phosphates de sodium à des pH compris entre 2,3 et 7,2 .

A pH 2,3 le rendement était optimum, mais les cellules respiraient mal. Au contraire, pour des pH du milieu compris entre 4 et 6 , la respiration devenait identique à celle de fragments de tissu hépatique. Finalement, LONGMUIR

et REES proposèrent une méthode de dissociation du tissu hépatique qui consiste à réaliser des incubations à 37°C de fragments de tissu dans une solution tamponnée de phosphate de sodium à pH 5 pendant 10 minutes. Après une dilacération par des aspirations et des refoulements successifs dans une pipette retournée, la suspension de cellules hépatiques libres obtenue est purifiée par plusieurs centrifugations de 2 minutes à 50 g dans du tampon phosphate à pH 7,3. Des examens morphologiques furent réalisés par les auteurs après des colorations vitales au rouge neutre et des colorations à l'hématoxyline-éosine. L'activité respiratoire, en présence de succinate, fournissait une valeur identique à celle que KREBS a trouvée (149) pour les homogénats de tissu hépatique. D'autres contrôles biochimiques d'activité métabolique n'ont pas été effectués.

STERZL (150) a mis également à profit l'action des solutions de phosphate pour isoler des cellules spléniques. Le tissu est mis en suspension dans une solution isotonique de phosphate de sodium à pH 7,3 contenant 0,2 g de gélatine p.100 ml. Selon l'auteur, les cellules de rate obtenues sont susceptibles de synthétiser des anticorps par incubation in vitro avec divers antigènes comme le sérum de cobaye ou le sérum d'individus paratyphiques.

Il convient, enfin, de signaler les études systématiques réalisées par HOLTFRETER (151), MOSCONA (152) et ESSNER (153) sur l'influence du pH sur la cohésion tissulaire. Il ressort de ces travaux que l'alcalinisation du milieu provoque une dégradation nette du ciment intercellulaire. ESSNER précise que des dégradations importantes se manifestent dans les cellules pour des pH inférieurs à 6,4 mais que des pH alcalins ne détériorent pas les structures cellulaires. Il réalise la dissociation totale des amas cellulaires qui persistent après la dissociation du tissu avec des solutions de pH 8,8. Au cours de la dissociation, le pH revient à la neutralité. Les cellules paraissent morphologiquement intactes mais leur vitalité n'a pas été étudiée.

III - METHODES DE DISSOCIATION MECANIQUE

GUZMAN-BARON et KIT (154) avaient réalisé, en 1952, des dissociations de thymus de Rate, d'appendice et de lymphosarcome en forçant les tissus au travers de tamis de finesse croissante. Les cellules ne présentaient aucune altération de la biosynthèse protéique qui était étudiée par la mesure de l'incorporation du glyco-colle marqué.

En 1954, KALTENBACH (155) proposa une méthode de dissociation du tissu hépatique par simple dilacération mécanique. Des tranches fines de foie étaient pressées, au moyen d'un piston en caoutchouc, au travers d'un tamis de "mesh" 14-16 et le broyat, recueilli dans une solution isotonique, était purifié par des passages successifs au travers de filtres de "mesh" croissant de 24 à 60, puis à 80. Après 5 centrifugations de 1 minute à 30 g, les cellules obtenues étaient parfaitement dissociées. Les examens morphologiques au microscope photonique montraient des cellules intactes. L'auteur présentait, en outre, un contrôle d'intégrité cytochimique fondée sur la méthode du "quotient cytolytique" de UMBREIT et al. (156) (détermination de l'activité succinoxydasique en présence de cytochrome c). L'auteur concluait à une intégrité biochimique des cellules obtenues et la confirmait par la détermination des vitesses d'incorporation dans les protéines de glyco-colle marqué : l'activité métabolique était environ 7 fois supérieure à celle des homogénats du même tissu.

Cependant LAWS et STICKLAND (157) démontrèrent, après une étude critique de cette méthode, que l'activité respiratoire en milieu exempt de succinate était nulle, que l'activité glycolytique était totalement abolie et que les processus métaboliques ne s'effectuaient que dans le sens du catabolisme. LAWS et STICKLAND émettaient l'opinion que l'activité respiratoire et l'activité succinoxydasique étaient en fait celles de mitochondries libres.

Une méthode analogue fut appliquée par HARRIS et al. (158) à la séparation de cellules de ganglions lymphatiques de Lapin à l'aide d'une solution de TYRODE (note) contenant 7,5 ml de sérum de Rat p.100 ml . Les auteurs concluaient à la survie des cellules qui ont, en effet, conservé la propriété de provoquer l'apparition d'anticorps quand on les injecte à des Rats. Cependant, la valeur de ce critère est contestable depuis les récentes acquisitions réalisées en immunologie : il est, en effet, établi que l'injection de cellules mortes suffit à provoquer la formation d'anticorps.

Le principe de la dilacération mécanique fut également appliqué par BUCHER (159) qui réalisa ensuite des contrôles biochimiques identiques à ceux de KALTENBACH et de GUZMAN-BARON et KIT : la consommation d'oxygène et la vitesse d'incorporation des acides aminés se révélaient supérieures à celles de fragments de tissus, mais cependant nettement inférieures à celles des homogénats du même tissu.

En 1958, KNISELY et MAHALEY (160) pour étudier la diffusion métastatique préparèrent des cellules libres tumorales en mettant à profit la filtration sélective sur des filtres calibrés. Mais les auteurs doutaient de la vitalité des cellules ainsi isolées.

C'est en 1960 qu'un important travail consacré à des études comparées de la biosynthèse des protéines dans les cellules normales et tumorales fut présenté par ROOF et AUB (161). Le métabolisme protéique des cellules d'ascite de YOSHIDA et d'ascite d'EHRlich fut comparé à celui de cellules libres de thymus, préparées par une méthode de filtration sélective inspirée de celle de HARRIS et al. (162).

Les opérations d'isolement ainsi que les incorporations in vitro d'acides aminés marqués étaient réalisées dans du sérum de Rat. Les auteurs signalaient que l'incubation des cellules dans la solution de TYRODE, additionnée de 7,5 p.100 de sérum de Rat, permettait un métabolisme protéique nettement supérieur à celui que donne une incubation effectuée dans le milieu

Note.- Composition de la solution de TYRODE : NaCl 8 g , KCl 0,2 g ,
CaCl₂ 0,2 g , MgCl₂ 0,1 g , NaH₂PO₄ 0,05 g , NaH CO₃ 1 g , glucose 1 g ,
eau bidistillée q.s.p. 1000 ml.

de ALLFREY et MIRSKY (163) (note). ROOF et AUB concluait à la survie des cellules obtenues, sur la base d'un métabolisme protéique intact, d'une teneur normale en acide ribonucléique et de colorations vitales par l'éosine Y. Ils précisait, en outre, que l'intégrité des cellules était liée à la présence du sérum de Rat et à des temps de lavage courts, l'activité diminuant avec le nombre et la durée des lavages.

Enfin, récemment, KIMURA et al. (164) ont comparé la teneur en hexosamines et en acides sialiques de cellules d'ascites, de cellules de type Hela et de cellules hépatiques de Souris, préparées par un passage au travers de filtres de finesse croissante.

APPLICATIONS DES METHODES
DE DISSOCIATION TISSULAIRE

Malgré les doutes qui planent à propos de l'intégrité des cellules libres obtenues par les différentes méthodes que nous venons d'exposer, de nombreux résultats qui suffisent à justifier l'intérêt de l'étude des cellules "libres" ont été recueillis par l'application de ces techniques.

I - ETUDES BIOLOGIQUES

Les études entreprises sur les suspensions de cellules isolées ont apporté une contribution importante à la solution de problèmes concernant la physiologie cellulaire, la culture des tissus et la cancérologie. En outre, la question de l'adhésion cellulaire a pu être explorée efficacement grâce à l'application des procédés de dissociation des tissus. Nous avons exposé dans le chapitre précédent consacré à la cohésion tissulaire les diverses hypothèses qui ont été émises jusqu'à présent concernant cette dernière.

Note : la solution de ALLFREY et MIRSKY contient du saccharose, du chlorure de calcium et des phosphates de sodium.

Grâce aux études réalisées sur les suspensions de cellules isolées, de nombreuses précisions ont été apportées concernant les modalités des dissociations et des réassociations cellulaires, les mécanismes de l'adhésion et les propriétés des membranes comme la mobilité de certaines cellules et les effets de surface. Enfin, la mise en culture des cellules libres adultes est un pas vers la résolution du problème fondamental qui concerne l'obtention de populations cellulaires à partir de cellules libres adultes et dont l'importance biologique est considérable du point de vue de la survie de la cellule isolée et de l'étude des mécanismes de la mitose et de la différenciation.

A - TRAVAUX CONCERNANT L'ADHESION CELLULAIRE

Dans ce domaine, deux séries de travaux ont été réalisées : les uns concernent les facteurs de dissociation spontanée ; les autres, les réassociations cellulaires.

1°- Les facteurs de la dissociation spontanée des tissus et le problème de la métastase.

Nous avons vu que de très nombreuses études ont précisé l'influence des facteurs externes sur la dissociation (voir page 45) et ont ainsi permis la mise au point des techniques de dissociation tissulaire.

Il convient de préciser cependant quelques points importants concernant l'existence de facteurs de dissociation spontanée dont la connaissance a été rendue possible par l'étude des cellules isolées. Le processus le plus caractéristique à cet égard est, sans aucun doute, celui qui provoque la dissociation spontanée d'une tumeur cancéreuse et déclenche la diffusion métastatique. Ce mécanisme n'a pas encore reçu d'explication biologique satisfaisante. Cependant, COMAN (165) a montré que les substances cancérigènes provoquaient une chute de l'adhésivité de tissus normaux : par exemple, le 7,12-diméthyl-benzanthracène, qui est une substance cancérigène, provoque une libération de cellules épidermiques par simple agitation, tandis que

l'anthracène, qui n'est pas cancérigène, est sans effet. COMAN et ANDERSON (166) ont suggéré que la diminution de l'adhésivité des cellules pourrait bien être due à une modification de leur surface.

D'autres facteurs internes peuvent agir spontanément sur l'adhésivité des cellules et provoquer ainsi des modifications de la cohésion tissulaire. Par exemple, selon WEISS (167), le sérum serait un facteur important d'adhésion dans le cas de cellules dissociées par la trypsine : l'addition de sérum et, plus particulièrement, de la fraction lipoprotéique, est nécessaire pour restaurer l'adhésivité des cellules. Un chauffage de 30 minutes à 56°C détruit totalement cette propriété du sérum. D'autre part, WEISS a montré l'influence très nette de la fraction α_2 -globulinique du sérum sur l'adhésivité des cellules sur le verre. En conclusion, il semble donc que le sérum, s'il ne provoque pas à proprement parler de réassociations des cellules, est cependant indispensable à la préservation de l'adhésivité des cellules qui est elle-même étroitement liée à l'intégrité de la membrane de ces dernières.

Récemment, MOSCONA (168) a montré l'influence importante de la température sur la cohésion des tissus et sur les propriétés d'adhésion des cellules. Des températures inférieures à 15°C suppriment totalement l'adhésivité de cellules libres en culture et 40 p.100 seulement des cellules retrouvent leurs propriétés d'adhésion à 25°C, la température optimale étant de 38°C . Par exemple, des agrégats de cellules obtenues par réassociation de cellules isolées, maintenus à 38°C, se dissocient totalement par une simple diminution progressive de la température jusqu'à 15°C .

D'autre part, une modification pathologique du taux des cations divalents est également susceptible de provoquer des dissociations spontanées étant donné le rôle de ces ions dans la cohésion des tissus (voir page 45) . Or BEEBE(169) a montré, dès 1904, que la diminution du taux du calcium et l'augmentation du taux du potassium étaient une caractéristique des cellules cancéreuses. De LONG et al. () précisèrent plus tard que si l'augmentation du taux de potassium dans les cellules tumorales pouvait être considérée comme une conséquence de l'accroissement de l'activité mitotique de ces cellules, la chute des taux de calcium et de sodium restaient, au contraire, spécifiques

de l'état cancéreux. A cause de l'importance fondamentale des ions calcium dans la cohésion des tissus, on peut donc se demander si la diminution du taux de calcium dans les tumeurs malignes ne serait pas responsable de la dissociation spontanée du tissu cancéreux et de l'essaimage métastatique des cellules néoplasiques ainsi libérées.

A propos de la diffusion métastatique, on peut actuellement considérer, grâce aux résultats fournis par l'étude réalisée in vitro des cellules libres, que la constance du taux de protéides sériques et des cations minéraux est indispensable pour maintenir la cohésion des tissus normaux. Toute modification pathologique de ces constantes est susceptible d'avoir une répercussion sur l'adhésivité des cellules. Enfin, il est hors de doute que l'étude de l'influence des substances cancérigènes sur la cohésion des tissus apportera de précieux renseignements sur le mode d'action de ces composés.

2°- La réassociation des cellules "libres" et la reconstitution des tissus.

Les travaux qui ont été réalisés sur la reconstitution des tissus à partir des cellules libres permettent de suivre et de mieux comprendre les mécanismes de la formation d'organes qui possèdent une unité, une cohésion et une structure spécifique. En outre, en provoquant la réassociation de populations cellulaires différentes, on peut prétendre déterminer de façon plus précise jusqu'où va la spécificité des cellules différenciées. L'un des buts pratiques de ce genre de recherches est de définir les principes fondamentaux qui permettront de résoudre les difficultés rencontrées au cours des greffes d'organe. Les expériences que nous allons rapidement exposer et dont l'importance biologique est évidente n'ont pu être entreprises que grâce à la mise au point des techniques de préparation de cellules isolées à partir de tissus. Elles sont le fruit des remarquables travaux de HOLTFRETER, de MOSCONA et de WOLFF.

TOWNES et HOLTGRETER (171) ont étudié les mécanismes de réassociation spécifique des cellules en voie de différenciation d'un embryon de Batracien au stade de la neurula, qui possédait donc au moins une plaque neurale différenciée et des cellules mésodermiques. Après avoir réalisé la dissociation complète de l'embryon par la trypsine, les auteurs placèrent les cellules dans un milieu nutritif et observèrent qu'elles se regroupaient par familles correspondant à leur destinée embryologique et reconstituaient des tissus. Par exemple, à partir d'un mélange homogène de cellules isolées de la plaque neurale et de cellules épidermiques, il se forme d'abord une sphérule, dans laquelle les cellules nerveuses donnent de nouveau une gouttière, ébauche du tube nerveux. Il existe donc une spécificité d'organe qui est très stricte et les cellules d'un même type se reconnaissent, en quelque sorte, entre elles. Ce mécanisme ferait intervenir des forces spécifiques d'adhésion, mais aussi des forces de répulsion entre les cellules de destinée différente (voir page 38 de la théorie de l'adhésivité spécifique de WEISS).

MOSCONA (172) a réussi la même expérience, mais en la réalisant avec des cellules isolées à partir de tissus d'embryon de poulet parvenus à un stade ultime de différenciation. Le rein embryonnaire, dissocié par la trypsine, se reconstitue pratiquement identique à lui-même : les figures 11, 12 et 13 sont à cet égard très démonstratives. En outre, un mélange de cellules de rein et de cellules de cartilage forment un tissu mixte qui n'est pas constitué d'une mosaïque des différentes cellules réparties au hasard, mais de zones nettement individualisées de cartilage et de tubes urinifères. De nouveau, la "spécificité cellulaire" des organes est, dans ce cas, très stricte. D'autre part, en procédant à des mélanges de cellules de même type, provenant d'animaux différents, on peut montrer qu'il n'existe pas, du moins dans une certaine mesure, de spécificité d'espèce. On obtient, en effet, aisément un cartilage mixte à partir de cellules cartilagineuses libérées à partir d'embryons de Souris et de Poulet. En outre, le mélange des cellules dissociées de deux tissus différents comme les tissus cartilagineux et rénal provenant d'embryons de Poulet et de Souris fournit un tissu qui possède des zones cartilagineuses mixtes et des zones de tubes urinifères mixtes. MOSCONA, à

F i g u r e 11

Aspect microscopique du tissu rénal d'embryon
de Poulet.

Tub : tubules urinifères.

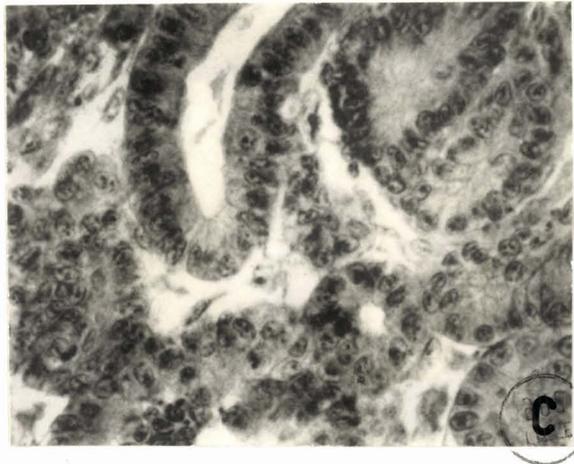
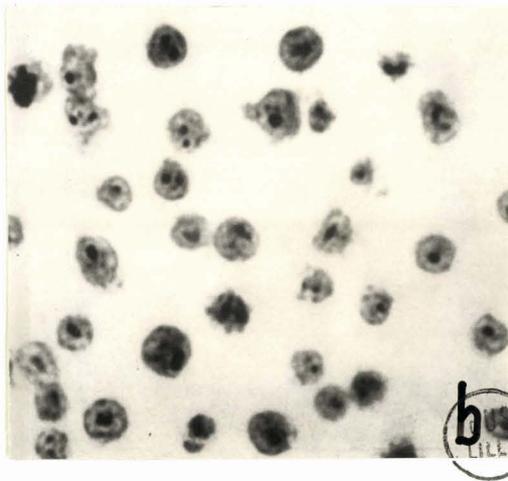
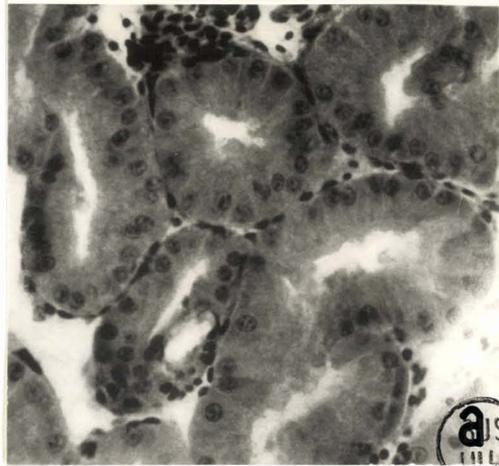
F i g u r e 12

Aspect microscopique d'une suspension de cellules
du tissu rénal d'embryon de Poulet, dissocié par
les enzymes.

F i g u r e 13

Aspect microscopique du tissu rénal d'embryon
de Poulet après la réassociation des cellules de
la suspension précédente. On observera que la
reconstitution du tissu est parfaite et que les
tubules urinifères (Tub), en particulier, ont
retrouvé leur morphologie.

(in MOSCONA) (172)



partir de ces observations, envisage la possibilité de réaliser in vivo des reconstitutions d'organes lésés par injection des cellules isolées correspondantes. Sur le même principe, WOLFF a obtenu des bronches mixtes de Poulet et de Souris et même des tubes séminifères mixtes dans lesquels les cellules des deux espèces différentes se disposent régulièrement les unes à côté des autres "comme si elles reconnaissaient leur parenté" (173) .

On conçoit aisément l'importance de ces expériences, aussi bien du point de vue purement biologique comme la spécificité de l'adhésion cellulaire ou les mécanismes morphogénétiques que de celui de la réalisation des greffes : en effet, un organisme ne tolère que les autogreffes ou greffes de ses propres tissus. Les homogreffes ou greffes de tissus d'une même espèce, d'un individu à un autre, ne réussissent que très exceptionnellement, tandis que les hétéro-greffes ou transplantations de tissus d'une espèce à une autre ne sont jamais tolérées (voir à ce propos les travaux de DURCHON sur les Annélides Polychètes) (174). L'obtention de cellules adultes libres et vivantes devrait permettre de faire progresser cette question, car on sait actuellement que les hétéro-greffes ne sont possibles qu'à partir d'organes embryonnaires. Ceux-ci n'ont pas encore élaboré les anticorps spécifiques qui se forment après la naissance et dont le rôle est d'interdire l'implantation de cellules ou de tissus étrangers à l'organisme. La production in vitro de réassociations de cellules isolées adultes, si elle se réalisait, laisserait entrevoir la possibilité des hétérogreffes après avoir inhibé sélectivement les anticorps spécifiques.

Ce problème particulier suffirait à lui seul à justifier l'intérêt de la préparation de cellules adultes intactes à partir d'un organe vivant qui n'aurait pas subi l'adaptation préalable aux conditions artificielles de la culture in vitro.

B - TRAVAUX ORIENTES VERS L'ETUDE DES MEMBRANES CELLULAIRES

Depuis quelques années, les suspensions de cellules libres ont été largement utilisées à des études de mobilité cellulaire et de modification de

surface en fonction de divers états pathologiques dans le but d'expliquer certaines modifications de l'adhésivité par des altérations ou des remaniements des membranes des cellules.

AMBROSE, JAMES et LOWICK (175) établissaient ainsi, en 1956, que la mobilité électrophorétique des cellules rénales normales représentait environ la moitié de celle des cellules néoplasiques correspondantes. Ces modifications de surface étaient en relation avec les études de l'école de COMAN (voir Mac CUTCHEON et al. (176), COMAN et ANDERSON (177) et COMAN (178)) qui mirent en évidence au microscope électronique une altération nette de l'ultrastructure de la surface de cellules d'épithélioma du Lapin. PURDOM et al. (179) et AMBROSE (180) expliquaient, en 1960, les modifications de la mobilité des cellules tumorales par l'apparition de charges négatives nouvelles, en relation directe avec la malignité et provenant d'une altération de la membrane. Depuis, BENOR et al. (181) ont montré, par des études comparatives entreprises sur des cellules libres isolées par perfusion du foie normal et du foie en régénération avec des solutions de versène, que l'augmentation de la mobilité était en relation directe avec l'activité mitotique et non pas avec la malignité. En outre, BANGHAM et PETHICA (182), ayant suggéré, en 1960, que l'augmentation de la mobilité des cellules d'ascite d'EHRlich pouvait provenir de la présence de groupes phosphatidiques ionisés identiques à ceux de la surface des leucocytes circulant dans le sang, BANGHAM et GLOVER (183) ont récemment comparé la mobilité des cellules d'EHRlich avec celle des érythrocytes et des cellules hépatiques libres normales. Ils ont montré que les cellules vivantes à l'état libre (leucocytes et cellules d'ascite) possédaient des mobilités électrophorétiques identiques - mais différentes de celles des cellules normalement associées en tissus. Ce résultat démontre les différences structurales des deux types de cellules, mais ils n'ont pas reçu, jusqu'à présent, d'explication biochimique. Enfin, HOLLINGSHEAD et THOMASON (184) ont signalé récemment que les rayons X ne provoquaient pas de diminution notable de la mobilité électrophorétique de cellules d'EHRlich, mais aucune interprétation rigoureuse n'a été proposée par les auteurs.

On voit donc combien ces études de mobilité restent très fragmentaires et spéculatives. Elles n'apportent aucun renseignement précis sur la nature et les modifications que subissent les membranes cellulaires. Il semble bien que les techniques utilisées soient encore bien imparfaites et qu'il est prématuré de mettre en oeuvre les méthodes biophysiques pour tenter d'élucider ces problèmes. HAYDON (185) signalait d'ailleurs très récemment que les équations utilisées pour la détermination des mobilités et des potentiels de membrane n'étaient applicables que si les surfaces sont impénétrables aux ions minéraux, ce qui n'est pas le cas des surfaces cellulaires. L'auteur proposait une équation (équation du potentiel dzéta) adaptée au cas de ces membranes vivantes. Il nous paraît hasardeux de tenter des interprétations mathématiques du matériel biologique et de mettre la Vie en équations : les essais de ce genre n'ont pas toujours été très concluants en matière de Biologie.

C - ETUDES DE LA PROLIFERATION EN CULTURE DES
CELLULES ISOLEES

L'évolution des idées sur les conditions de prolifération en culture des cellules isolées a été fortement influencée par les travaux de l'école de EARLE.

En 1925, FISHER (186) constatait que des cellules libres de sarcome de ROUS, mises en culture, ne présentaient des divisions cellulaires qu'en présence de cellules d'autres tissus. MOEN (187) parmi d'autres, émettait la même opinion quelques années plus tard à propos de cellules de leucocytes mononucléaires en précisant toutefois, conformément à l'objection toute récente de EARLE (188), que les milieux de culture employés pouvaient ne pas être convenables. Néanmoins, l'hypothèse la plus couramment admise à cette époque était que les cellules possédaient une autonomie limitée et une individualité physiologique restreinte. La division cellulaire dans un tissu devait être liée à un système d'échanges intercellulaires par l'intermédiaire de "ponts protoplasmiques". L'éventualité d'une individualité

cellulaire qui se serait manifestée, pour une cellule, par la possibilité de vivre totalement isolée de ses congénères, paraissait inconcevable.

EARLE (189) eut le premier le mérite, dès 1931, de supposer que seul le milieu de culture était à incriminer : les cellules libérées présentaient une modification de leur métabolisme, dont il fallait obligatoirement tenir compte pour préparer les milieux de culture. Tandis que OLIVO (190) affirmait, en 1932, que la prolifération in vitro n'était possible qu'avec un minimum de 26 cellules associées, les travaux ultérieurs de l'école de EARLE s'orientèrent vers la recherche de milieux de culture spéciaux, mieux adaptés à la culture in vitro de cellules isolées. EVANS et EARLE (191) recherchèrent systématiquement les supports solides qui permettraient aux cellules libres de proliférer dans les meilleures conditions. En 1949, SANFORD, EARLE et LIKELY (192) proposèrent un milieu de culture destiné aux cellules libres et EVANS et al. (193) décrivirent en 1951 une méthode de culture de quantités élevées de cellules libres obtenues par dissociation mécanique à partir d'un tissu, lui-même maintenu préalablement en culture (note) .

À partir de ces travaux, et parallèlement aux études des techniques de dissociation tissulaire, on parvint à obtenir des souches de cellules libres en culture dont les conditions de vie sont si parfaitement déterminées, qu'elles en ont permis la commercialisation. Le grand intérêt de ces travaux est de permettre l'entretien de souches de cellules libres cancéreuses comme les cellules de type Hela constamment à la disposition des laboratoires de Cancérologie. Malheureusement, ces cellules isolées de tissus préalablement adaptés à la vie in vitro ne sont plus comparables en rien aux cellules isolées de tissus "natifs" car elles se sont plus ou moins profondément différenciées.

On peut donc considérer actuellement que l'individualité cellulaire stricte existe, qui implique une vie indépendante de la cellule libérée de son tissu d'origine. Cependant, si l'on obtient aisément des cultures de cellules libérées à partir d'un tissu préalablement adapté à la culture in vitro, la multiplication in vitro de cellules libérées à partir de tissus directement prélevés sur des animaux reste problématique.

Note.— La dissociation était réalisée en forçant les tissus, préalablement maintenus un certain temps en culture, au travers d'un tube capillaire.

WOLF (194) et GARVEY (195) ont décrit des techniques de culture de cellules isolées à partir d'organes de Vertébrés. GARVEY signale qu'il observe des images de mitose, après 10 jours de culture, dans des cellules parenchymateuses et des cellules de KUPFER, isolées de foies les unes par dissociation mécanique et les autres par l'action combinée de la trypsine et de la collagénase.

Les travaux très récents de SANTUCCI et al. (196), de HAAG et SANTUCCI (197) et de JACQUET et STEEG (198) ont apporté un résultat très intéressant : des cellules isolées par la trypsine à partir de l'épithélioma atypique T₃ du Rat ou épithélioma de GUERIN fournissent, en effet, des cultures supportant plusieurs repiquages sans perte appréciable de leur vitalité et de leur malignité.

Il apparaît fondamental actuellement, autant du point de vue strictement de la biologie que du point de vue de la biochimie cellulaire, d'obtenir aisément des cultures de cellules isolées à partir de tissus vivants. Cela implique nécessairement la mise au point de techniques parfaites de dissociation tissulaire qui conduisent à l'isolement de suspensions de cellules vivantes rigoureusement exemptes d'amas cellulaires. Le contrôle des préparations à l'aide des microscopes photonique et électronique est donc un impératif absolu.

II - ETUDES BIOCHIMIQUES

Les travaux d'ordre biologique que nous venons d'exposer sont complétés par un certain nombre d'études biochimiques qui ont apporté leur contribution à l'exploration de certains métabolismes, concernant notamment

- 1°- la respiration cellulaire et la production et le stockage de l'énergie,
- 2°- le métabolisme des acides nucléiques,
- 3°- le métabolisme des protéines,
- 4°- la localisation intracytoplasmique des biosynthèses de substances diverses.

La création de cultures standardisées de cellules cancéreuses libres, comme les cellules Hela, l'existence de tumeurs expérimentales ascitiques (suspensions de cellules et d'amas cellulaires cancéreux obtenus in vivo par injection intrapéritonéale de broyats tumoraux à des animaux d'expérience), la préparation, enfin, de suspensions de cellules obtenues par dissociation des tissus vivants, ont permis d'utiliser les méthodes d'étude in vitro du métabolisme bactérien.

A - ETUDE DE LA RESPIRATION CELLULAIRE

Les techniques classiques de détermination de la respiration cellulaire des tissus ont été appliquées aux cellules isolées (cellules en culture, cellules d'ascites et cellules isolées des tissus vivants). Les résultats qui ont été obtenus peuvent être résumés de la manière suivante .

1 - En 1930, WARBURG et al. (199) formulaient l'hypothèse selon laquelle les tissus cancéreux présentaient une glycolyse plus importante que les tissus normaux et ils affirmaient, en 1955, que ces propriétés particulières étaient dues à une lésion irréversible, caractéristique de l'état cancéreux. Cette opinion déclencha une somme considérable de recherches comparées sur la glycolyse et la respiration des cellules normales et cancéreuses. Rapidement, les travaux s'orientèrent vers l'étude du métabolisme des cellules isolées. Ils ont permis de montrer que, contrairement à la théorie de WARBURG, il semble que la respiration et la glycolyse soient étroitement liées à la composition du milieu environnant. Dans une mise au point récente de cette question, PAUL (200) a bien mis en lumière l'influence de "l'environnement" sur les métabolismes des cellules normales et cancéreuses en culture :

a)- Les deux types de cellules, normales et cancéreuses, possèdent pratiquement le même comportement.

b)- Au moment de la mise en culture, l'activité glycolytique est prépondérante. Elle fait place progressivement à un métabolisme aérobie qui tend vers un état stationnaire. Ce phénomène pourrait s'expliquer par un dérèglement

passager du cycle de KREBS et une modification temporaire du pH. En effet, les pH alcalins favorisent la glycolyse, tandis que la respiration est accrue en milieu acide.

c)- Une augmentation de la concentration du milieu en glucose inhibe la respiration (effet CRABTREE).

d)- Une diminution de la tension d'oxygène favorise la glycolyse (effet PASTEUR).

e)- Enfin, chaque variation des facteurs d'environnement précédents s'accompagne toujours de modifications des métabolismes.

Ainsi, on peut considérer actuellement que les caractéristiques métaboliques des cellules cancéreuses proviennent de l'influence de l'environnement et ne sont probablement pas dues à une variation fondamentale et irréversible du métabolisme glucidique. A cela s'ajoute le fait qu'il s'agit de cellules qui possèdent une très forte activité mitotique et qui exigent, par conséquent, une plus grande quantité d'énergie nécessaire aux synthèses protéiques qui déclenchent les mitoses.

L'isolement à partir de tissus vivants, de cellules libres normales s'impose donc également, dans ce cas, pour permettre une comparaison poussée de ces mécanismes énergétiques dans des conditions évitant l'adaptation à la culture.

2 - Jusqu'à présent, les recherches concernant l'activité respiratoire des cellules isolées à partir des tissus vivants sont très fragmentaires. Elles ont été principalement effectuées par LONGMUIR et REES (201) et par KALTENBACH (202). LAWS et STICKLAND (203) ont présenté une critique objective des travaux des auteurs précédents et concluent qu'il n'est pas encore possible d'obtenir actuellement des cellules libres dont les mécanismes énergétiques soient entièrement préservés car les cellules ne respirent qu'en présence d'acide succinique. Ce comportement peut s'expliquer par un blocage des réactions métaboliques du cycle tricarboxylique ou par un dysfonctionnement de la chaîne des cytochromes, ou encore par des perturbations dans les réactions de couplage de la phosphorylation oxydative. LONGMUIR et coll. (204) ont émis l'opinion que la séparation des cellules semblaient invariablement détériorer l'appareil respiratoire. Selon ces auteurs, la séparation des cellules pourrait provoquer l'inactivation de certaines oxydases.

B - ETUDE DU METABOLISME DES ACIDES NUCLEIQUES

L'étude in vitro du métabolisme des acides nucléiques fait appel aux techniques classiquement appliquées dans l'expérimentation in vivo. Elle utilise des phosphates marqués par le ^{32}P et des précurseurs marqués par le ^{14}C ou le ^3H : acide orotique ^{14}C , nucléotides ^{14}C ou ^3H .

Les recherches sur le métabolisme des acides nucléiques furent initialement effectuées sur des Bactéries et sur des tissus totaux, des homogénats, des coupes de tissus ou des fractions cytoplasmiques. Depuis 1960, on leur adjoint une expérimentation sur les cellules libres ou libérées à partir des tissus vivants.

BURDON et SMELLIE (205) ont isolé, en 1961, à partir de cellules ascitiques du carcinome d'EHRlich, un enzyme susceptible de provoquer l'incorporation d'uridine triphosphate marqué par le ^{32}P dans les acides ribonucléiques. Les auteurs précisait que la réaction était stimulée par la présence des trois autres nucléosides triphosphates. HADJIULOV et IRKOV (206) réalisaient, la même année, des cinétiques d'incorporation in vitro du radiophosphore dans les cellules de l'ascite d'EHRlich et précisait que la biosynthèse des acides ribonucléiques ne se réalisaient qu'en aérobiose. Ces études, encore fragmentaires, marquent une nouvelle orientation dans la recherche des modalités de synthèse des acides ribonucléiques.

L'utilisation des suspensions de cellules libres normales se révèle de nouveau importante pour ce travail particulier.

Un ensemble de travaux récents ont, en outre, montré l'intérêt de travailler sur des suspensions de cellules, pour tenter de localiser les relations métaboliques entre les acides nucléiques des différentes inclusions cytoplasmiques.

Grâce à une étude cinétique de l'incorporation in vitro de cytidine tritiée dans des cellules amniotiques en culture, PING YAO-CHENG (207) démontrait récemment qu'un acide ribonucléique micromoléculaire très instable se marquait dans les cinq premières minutes, tandis que l'acide ribonucléique ribosomal de haut poids moléculaire et l'acide ribonucléique soluble ne se marquaient qu'après 40 minutes. L'auteur suggérait que l'acide ribonucléique

rapidement marqué correspondait à l'acide ribonucléique "messager" et passait du noyau dans les ribosomes pour leur apporter l'information génétique de l'acide désoxyribonucléique des gènes. En outre, une étude cinétique de l'incorporation de cytidine tritiée dans les acides ribonucléiques de cellules Hela, incitait PERRY (208) et ERRERA (209) à penser que la majeure partie de l'acide ribonucléique cytoplasmique était synthétisé dans le nucléole. GOLDSTEIN et coll. (210) parviennent à la même conclusion dans le cas de cellules humaines en culture. Une étude analogue, réalisée par SCHULTZE et coll. (211) sur divers organes du Rat et de la Souris donnait des résultats identiques. Plus récemment encore, les travaux de SRINIVASAN (212) sur les modalités d'incorporation de la cytosine tritiée et de l'adénine ^{14}C dans les cellules Hela l'amenaient à considérer l'existence d'une synthèse de l'acide ribonucléique cytoplasmique dans le nucléole. Signalons enfin, que OTAKA et coll. (213) ont, eux aussi, précisé que, chez les Bactéries, l'acide ribonucléique ribosomal se synthétisait dans les noyaux. Ces auteurs ont même isolé par chromatographie sur DEAE-cellulose des extraits microbiens un complexe ADN-ARN qu'ils considèrent comme un intermédiaire de la synthèse des acides ribonucléiques à partir des acides désoxyribonucléiques.

C - ETUDE DU METABOLISME DES PROTEINES

LEPAGE (214) fut le premier à réaliser une étude comparée de l'incorporation du glycolle ^{14}C dans les cellules de l'hépatome ascitique et dans les hépatocytes libres obtenus par la méthode de KALTENBACH (215).

ROOF et AUB (216) ont étudié comparativement la biosynthèse des protéines dans les cellules libres normales et cancéreuses. Ils ont démontré que les cellules de thymus préparées par dissociation mécanique en présence de sérum de Rat, incorporent les amino-acides à une vitesse inférieure à celle des cellules de l'ascite de YOSHIDA incubées, dans les mêmes conditions, dans une solution de Tyrode après un lavage avec du sérum. Les auteurs ont, en

outre, étudié l'influence de détergents et de divers constituants du milieu sur les synthèses protéiques de ces deux types de cellules. Ce mode opératoire et les résultats obtenus permettent de prévoir un nombre important de travaux sur les cellules isolées du point de vue des mécanismes des biosynthèses protéiques dans les cellules normales et néoplasiques. Récemment, des travaux ont montré le rôle important que jouent les membranes phospholipidiques dans ces mécanismes (voir HENDLER (217), cité page 19) et il serait intéressant d'expérimenter sur les cellules animales isolées dans le but de préciser le mode d'action des phospholipides dans certaines étapes de la synthèse protéique.

D - ETUDE DU METABOLISME DE DIVERSES SUBSTANCES

1°- Etude du métabolisme des anticorps.

Les travaux de STERZL (218) sur la production in vitro d'anticorps dans les cellules spléniques ouvrent la voie à une série importante de travaux immunologiques.

HELMREICH (219) a réalisé récemment, dans ce domaine, des tentatives pour préciser le mécanisme sélectif de la synthèse des Y-globulines par les cellules lymphatiques isolées en reprenant les travaux de HARRIS et al. (220) .

OGATA et al. (221) ont présenté, en 1961, une étude importante de la biosynthèse des anticorps en incubant des coupes de tissu splénique en présence d'acides aminés marqués et ont montré que la synthèse de ces composés s'effectuait dans les microsomes. Ces études, réalisées à partir de coupes de tissus, ne sont évidemment pas à l'abri de dangereuses interférences du sang et elles auraient été plus démonstratives si elles avaient été effectuées sur des suspensions de cellules isolées, débarrassées du sang par des lavages soigneux.

2°- Etude du métabolisme des constituants sériques.

La localisation du lieu de synthèse de constituants sériques, en particulier de la sérumalbumine, a fait l'objet de nombreux travaux. Nous citerons ceux de GORDON et al. (222) réalisés sur le foie perfusé et ceux de VON DER DECKEN (223), de LINGREL et WEBSTER (224) et de CAMPBELL et KERNOFF (225) sur les fractions cytoplasmiques isolées. Ces auteurs ont démontré que la sérumalbumine était synthétisée dans les microsomes des hépatocytes. Une étude électrophorétique des protéides des fractions cytoplasmiques du foie de Rat perfusé a été réalisée par GAZZANIGA et coll. (226).

Ces travaux ne mettent pas les auteurs à l'abri de souillures apportées par le sang (VON DER DECKEN) (227) et ils demanderaient à être repris avec des cellules isolées.

Récemment, RUTTER et BROSEMER (228) ont entrepris une série de travaux sur le métabolisme glucidique de cellules hépatiques isolées.

Enfin, TONG et al. (229) ont étudié le métabolisme de l'iode dans les cellules thyroïdiennes isolées par "trypsination" continue de la thyroïde.

C O N C L U S I O N S

Des travaux portant, depuis un siècle, sur le comportement du ciment intercellulaire vis-à-vis des enzymes, des agents chimiques et du pH des milieux d'incubation ont abouti, depuis dix ans, à la mise au point de nombreuses méthodes de dissociation tissulaire qui se répartissent en trois groupes:

- a)- les méthodes de digestion enzymatique ,
- b)- les méthodes de dissociation par perfusion ou par incubation in vitro dans des solutions de substances chimiques les plus variées,
- c)- les méthodes de dilacération mécanique.

Les méthodes de dissociation chimique semblent provoquer plus d'altérations sérieuses (vacuolisation cytoplasmique, troubles respiratoires et métaboliques) que les méthodes de dissociation trypsique et certains procédés de dissociation mécanique.

Il faut cependant constater que des contrôles sévères n'ont jamais été systématiquement effectués. La morphologie des cellules isolées n'a jamais été étudiée qu'au microscope photonique, à l'exception d'une seule expérimentation dans laquelle le microscope électronique a été utilisé (BUCCIOLINI et MARSILI) (230). En outre, l'intégrité biochimique des cellules n'a été explorée que dans des cas très rares et parfois les critères utilisés sont discutables comme, par exemple, la mesure de l'incorporation des acides aminés dans les protéines cellulaires : en effet, l'incorporation des acides aminés peut parfaitement être réalisée in vitro avec des systèmes acellulaires et même par des acides ribonucléiques, comme l'acide ribonucléique soluble (ARNS), en présence d'extraits cellulaires.

Aucune des études que nous venons de présenter ne permet donc de conclure définitivement à l'intégrité totale des cellules libérées des tissus. Il était donc indispensable d'effectuer une étude critique systématique de l'intégrité morphologique, biochimique et biologique des cellules libérées à partir des tissus vivants par les méthodes classiques au moment où nous entreprenions ce travail, car le problème de l'isolement de cellules vivantes à partir de tissus animaux n'était pas résolu. En outre, la plupart des méthodes qui ont été décrites ne fournissent que de faibles quantités de cellules, insuffisantes pour entreprendre des recherches biochimiques. Le premier but de nos recherches était donc de modifier l'une des techniques déjà proposées ou de mettre au point une méthode originale pour obtenir rapidement des quantités élevées de cellules morphologiquement et biochimiquement intactes.

La seconde conclusion que nous pouvons tirer de notre étude bibliographique est que la majeure partie des recherches ont porté sur des cellules libres d'ascites et de cultures de tissus, donc sur des cellules pathologiques et sur des cellules vivant dans des conditions physiologiques anormales. Le second but de notre travail était donc d'étendre largement le champ de l'expérimentation aux cellules vivantes normales aussitôt après leur isolement à partir des tissus.

Nous nous proposons d'exposer dans le chapitre suivant les résultats de nos recherches qui ont porté sur l'isolement des cellules du foie de Rat et sur les applications biochimiques auxquelles a donné lieu, jusqu'à présent, la mise au point d'une méthode originale de dissociation tissulaire.

T R A V A U X

P E R S O N N E L S

Nous avons entrepris nos recherches essentiellement dans un but biochimique. Il nous fallait donc déterminer, parmi toutes les méthodes proposées, celles qui seraient susceptibles de nous fournir rapidement et en grandes quantités, des cellules parfaitement dissociées et vivantes. C'est pourquoi nous avons effectué une étude critique des différentes méthodes qui avaient été proposées jusqu'à présent en nous intéressant essentiellement à deux critères fondamentaux : le rendement et la pureté des suspensions obtenues. Seule, parmi les procédés actuellement décrits, la méthode de LONGMUIR et REES a répondu à ces deux critères.

Nous avons alors étudié l'intégrité des cellules isolées par cette technique. L'imperfection des résultats que nous avons obtenus nous a incité à étendre les recherches concernant la préparation des cellules libres. Nous avons été ainsi amené à mettre au point des protocoles expérimentaux personnels qui nous fournissent rapidement des cellules isolées, dont la morphologie et l'intégrité biochimique sont respectées. Sur ces cellules vivantes, nous avons entrepris une série d'études métaboliques portant essentiellement sur la respiration de la cellule et sur le métabolisme des acides ribonucléiques et des protéines.

Nous avons divisé l'exposé de nos travaux et de nos résultats en trois chapitres qui sont les suivants :

1°)- Etude critique des méthodes classiques. Dans ce chapitre, nous décrivons :

- I - les différentes méthodes que nous avons appliquées,
- II - les résultats que nous avons obtenus et qui nous ont conduit à ne retenir que la méthode de LONGMUIR et REES,
- III - l'étude de la morphologie et des propriétés biochimiques des cellules préparées par cette dernière technique.

2°)- Mise au point et description de deux méthodes personnelles.

La dissociation des tissus est effectuée, dans l'une, en milieu minéral, dans l'autre, en présence de sérum.

3°) - Applications biochimiques des méthodes que nous avons mises au point.

<p>ETUDE CRITIQUE DES METHODES CLASSIQUES DE DISSOCIATION DES TISSUS</p>
--

Quel que soit le procédé de dissociation des tissus, la libération des cellules implique toujours les étapes suivantes :

1 - Destruction de la cohésion tissulaire par perfusion ou incubation en présence d'enzymes ou d'agents chimiques divers.

2 - Dissociation par dilacération mécanique, par homogénéisation douce, par aspirations et refoulements successifs dans une pipette épointée ou par passage au travers des tamis calibrés.

3 - Purification de la suspension de cellules par des filtrations ou par des centrifugations réalisées à très faible vitesse.

Nous avons appliqué les méthodes suivantes :

1°- Méthodes de digestion trypsique :

- a) Méthode de DULBECCO et VOGT (231) .
- b) Méthode d'ESSNER et coll. (232) .

2°- Méthodes de dissociation par agents chimiques :

- a) Méthode d'ANDERSON (233) : perfusion par des solutions de citrate de sodium ou de versène .
- b) Méthode de BRANSTER et MORTON (234) : perfusion par le liquide de NOVIKOFF (235), à base de polyvinylpyrrolidone .
- c) Méthode de LONGMUIR et REES (236) : incubation in vitro dans une solution tamponnée de phosphates à pH 5 .

3°- Méthodes de dilacération mécanique :

- Méthode de KALTENBACH modifiée (237) .

I - PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

A - METHODES DE DIGESTION TRYPSIQUE

1°- Méthode de digestion trypsique de DULBECCO et VOGT (238)

Deux foies de rat sont prélevés et immergés instantanément dans une solution PBS (*) à 37°C. Le tissu, débarrassé des fragments de conjonctif, est découpé au scalpel en petits morceaux de quelques millimètres cubes. Plusieurs lavages sont réalisés par simple décantation, jusqu'à ce que le surnageant soit parfaitement clair. Les fragments sont ensuite placés dans 60 ml de solution PBS additionnée de 150 mg de trypsine cristallisés DIFCO et maintenus à 37°C, sous agitation lente, pendant 10 minutes. On élimine le surnageant par décantation et le résidu est remis en suspension dans 20 ml de solution PBS contenant 0,25 mg pour 100 ml de trypsine. On maintient à 37°C, sous agitation lente, pendant 30 minutes. La suspension est alors soumise à une vingtaine d'aspirations et refoulements successifs dans une pipette présentant un orifice de 3 mm de diamètre. Après une décantation rapide, on recueille le surnageant trouble et le résidu est repris une nouvelle fois par 20 ml de solution trypsique à 0,25 p.100. Le procédé est répété 15 à 20 fois, jusqu'à ce que les fragments de tissu aient pratiquement disparu. Les liquides surnageants troubles contiennent des cellules libres et des débris cellulaires. Plusieurs centrifugations lentes de 2 minutes à 50 g permettent d'éliminer les débris cellulaires et les noyaux libres.

2°- Méthode de digestion trypsique de ESSNER et coll. (239)

Le mode opératoire est identique au précédent à la différence près que la concentration en trypsine est plus élevée (1 g p.100 ml au lieu de 0,25 g p.100 ml et que les temps d'incubation sont plus longs (3 heures au lieu de 30 minutes).

(*) - Composition de la solution PBS :

solution 1 : NaCl 8 g ; KCl 0,2 g ; $\text{PO}_4^{\text{HNa}_2}$ 1,15 g ; $\text{PO}_4^{\text{H}_2\text{K}}$ 2 g ;
eau q.s.p. 800 ml .

solution 2 : CaCl_2 0,1 g ; eau q.s.p. 100 ml .

solution 3 : MgCl_2 , 6 H_2O 0,1 g ; eau q.s.p. 100 ml .

Les solutions sont mélangées après stérilisation .

B - METHODE DE DISSOCIATION PAR AGENTS CHIMIQUES1°- Méthode de perfusion par le citrate de sodium ou par le versène d'ANDERSON(240)

Les rats sont décapités et les foies sont perfusés pendant 3 à 4 minutes, par la veine porte, avec une solution de RINGER sans calcium, contenant du citrate trisodique (ou du versène : éthylène-diamine-tétraacétate de sodium) à la concentration de 0,027 M . La perfusion est facilitée par un léger massage du foie, jusqu'à ce que le tissu ait perdu sa coloration rougeâtre. Les foies sont alors prélevés et découpés en fragments de quelques millimètres cubes. L'ensemble est mis en suspension dans une solution de RINGER sans calcium et homogénéisé (15 à 20 allers et retours dans un appareil de POTTER-ELVEHJEM présentant un jeu du piston de 0,3 à 0,5 mm) . La suspension obtenue est filtrée sur plusieurs épaisseurs de gaze pour éliminer les fragments de tissu conjonctif. Le filtrat est ensuite centrifugé plusieurs fois pendant 5 minutes à 50 g . Les centrifugations sont poursuivies jusqu'à ce que le liquide surnageant soit limpide, témoin d'une élimination maximale des hématies et des fractions cytoplasmiques libres.

2°- Méthode de perfusion de BRANSTER et MORTON (241)

Les rats sont anesthésiés et les foies sont perfusés par la veine porte (l'artère hépatique étant sectionnée) au moyen de 50 à 100 ml de liquide de NOVIKOFF (*) (242) porté préalablement à 37°C . Les foies sont alors prélevés et plongés dans le liquide de NOVIKOFF. Le procédé est ensuite identique au précédent. La suspension finale de cellules libres est effectuée dans du liquide de NOVIKOFF .

3°- Méthode d'incubation de LONGMUIR et REES (243)

Les foies, immédiatement prélevés après la mort des animaux, sont découpés en fragments de quelques millimètres cubes et lavés dans du tampon phosphate 0,02 M à pH 7,3 , pour éliminer le sang. Une incubation de 10 minutes à 37°C est ensuite réalisée dans du tampon phosphate 0,02 M à pH 5 .

(*) - Composition du liquide de NOVIKOFF : 7,3 g de polyvinylpyrrolidone sont dissous dans 100 ml de solution de saccharose 0,25 M contenant 0,001 M de Cl_2Mg , 6 H_2O

Le tampon est éliminé par décantation et remplacé par une solution fraîche de même pH . On dilacère ensuite le tissu par un grand nombre d'aspirations et de refoulements dans une pipette épointée. Après une filtration sur gaze, on recueille les cellules par une centrifugation de 30 secondes à 1800 g . Le culot de centrifugation est remis en suspension dans du tampon phosphate à pH 7,3 par simple agitation manuelle avec une tige de verre gainée de caoutchouc. Plusieurs centrifugations de 5 minutes à 50 g permettent d'éliminer les noyaux libres, les hématies et les débris cellulaires. La suspension finale est effectuée dans le tampon phosphate à pH 7,3 .

C - METHODE DE DILACERATION MECANIQUE DE KALTENBACH (244)

Les foies sont placés dans une solution de KREBS-RINGER ou de saccharose isotonique maintenue à 10°C . Les lobes sont coupés en tranches fines entre deux plaques de verre et les surfaces de coupe sont placées sur un tamis de "mesh" 14 à 16 . Le tissu, pressé au travers du tamis au moyen d'un tampon de caoutchouc, est recueilli dans 5 ml de tampon isotonique. Les fragments restés sur le tamis sont ajoutés à la suspension et on agite l'ensemble. On passe ensuite le "broyat" sur un tamis de "mesh" 24 et le résidu est éliminé. Le filtrat est ensuite passé au travers de tamis de "mesh" 60, 80 puis 100 . Trois centrifugations de 1 minute à 30 g permettent d'obtenir une suspension de cellules libres.

Modification personnelle de la méthode de KALTENBACH

Nous avons modifié la technique de KALTENBACH de manière à améliorer le rendement en cellules :

Les foies découpés en fragments de quelques millimètres cubes sont mis en suspension dans une solution de RINGER sans calcium et broyés dans l'appareil de FISCHER. Le broyat est soumis à une homogénéisation lente de 1 minute dans un appareil de POTTER présentant un jeu du piston de 0,5 à 1 mm . Après une filtration sur plusieurs épaisseurs de gaze, la suspension est diluée 5 fois et passée sur un jeu de filtres MILLIPORE de 500 à 50 μ . Les résidus de chaque filtre, rassemblés et homogénéisés à nouveau, sont soumis à un nouveau cycle de filtrations. La suspension finale est enfin centrifugée 3 à 5 fois pendant 5 minutes à 50 g pour éliminer les fractions cytoplasmiques libres.

II - CRITIQUE DES PROTOCOLES EXPERIMENTAUX .

CHOIX DE LA METHODE DE LONGMUIR et REES .

Nous avons précisé plus haut que nous recherchions une méthode de dissociation des tissus qui soit rapide, d'application simple et qui fournisse des cellules libres avec un rendement élevé. Nous avons comparé les méthodes précédentes en prenant les trois critères techniques suivants : temps de préparation, rendement et pureté des cellules.

A - DESCRIPTION DES CRITERES TECHNIQUES

1°- Temps de préparation

Il est indispensable que la méthode de préparation des cellules libres soit rapide pour permettre de réaliser dans la même journée les expérimentations biochimiques et la longue préparation des cellules pour l'observation au microscope électronique. En outre, le temps est un facteur de dégradation des cellules. En effet, plusieurs auteurs, - ROOF et AUB (245) en particulier - , ont signalé que l'activité des cellules diminue rapidement avec le temps. On sait, d'autre part, que l'activité in vitro des systèmes enzymatiques est toujours très sensible aux variations de la température. Pour ces raisons nous avons systématiquement écarté les méthodes qui demandaient plus de deux heures de préparation .

2°- Rendement

Ce critère est fondamental en matière de Biochimie. En effet, si l'étude de la respiration ne nécessite pas de grandes quantités de matériel, au contraire l'expérimentation in vitro concernant les acides nucléiques et les protéines exige des quantités importantes de cellules.

ANDERSON (246) précise le rendement de ses préparations en pourcentage de cellules par rapport au nombre total de noyaux présents dans la suspension avant la purification. On peut discuter la valeur de cette expression, en considérant qu'une proportion non négligeable de noyaux se trouve

éliminée au cours des premiers stades de l'opération, comme le découpage du tissu et la filtration sur gaze. LAWS et STICKLAND (247) préfèrent exprimer les rendements en milligrammes de poids sec par gramme de tissu frais. Ce procédé de calcul nous a semblé présenter des inconvénients importants dans le cas où le milieu de suspension contiendrait des substances macromoléculaires. Nous avons finalement adopté la méthode de comptage des cellules, telles qu'elle est employée en hématologie, en exprimant nos résultats en nombre de cellules par gramme de tissu frais. La détermination, par comptage, de la quantité théorique de cellules par gramme de foie frais, nous a fourni une valeur moyenne de $2,5 \times 10^7$ cellules .

3°- Pureté des préparations

L'état de pureté des suspensions cellulaires est, en outre, d'une importance fondamentale, non seulement pour les études chimiques mais encore, et surtout, pour les études de respiration car la présence de mitochondries libres dont l'activité respiratoire est intense représente un grave risque d'erreur. En outre, il est important pour les expériences de cultures in vitro de vérifier que les tissus sont parfaitement dissociés et qu'il n'existe pas, en particulier, d'amas cellulaires importants.

C'est pourquoi, nous avons systématiquement effectué des frottis à partir des suspensions homogènes obtenues et des observations minutieuses au microscope photonique afin d'évaluer la proportion d'amas cellulaires par rapport à la quantité de cellules libres.

4°- Généralisation de la méthode

Il importait, enfin, de ne retenir que les procédés susceptibles d'être appliqués ultérieurement à n'importe quel type de tissu, en particulier à des tumeurs cancéreuses expérimentales qui sont toujours très mal irriguées. Cette condition excluait toute pratique de perfusion. Nous avons néanmoins contrôlé deux des méthodes de dissociation par perfusion pour le cas où elles se seraient révélées exceptionnellement efficaces.

B - RESULTATS

Nous avons appliqué les méthodes de dissociation que nous avons décrites plus haut à l'isolement des cellules du foie de Rat. Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

- 1°- Les méthodes de perfusion ont un rendement très faible, toujours inférieur à $0,1 \times 10^7$ cellules par gramme de foie frais et nous les avons écartées.
- 2°- La méthode de KALTENBACH, malgré la modification que nous avons introduite, est longue (4 à 5 heures) à cause du colmatage très rapide des filtres. Elle a, en outre, un rendement faible par suite de l'éclatement d'une proportion importante de cellules au cours des nombreuses contraintes mécaniques auxquelles elles sont soumises.
- 3°- Appliquées au tissu hépatique, les méthodes de digestion trypsique ont été très décevantes. La méthode de ESSNER et coll. ne fournit pas de cellules libres : après dissociation à la pipette, nous avons toujours obtenu une suspension qui révélait la présence d'un réseau très dense de fibres, prenant l'aspect d'un voile, impossible à éliminer, même après l'addition de hyaluronidase. On obtient finalement un véritable homogénat constitué d'inclusions cytoplasmiques libres et de débris cellulaires retenus dans le réseau fibreux. Le temps très long d'incubation provoque vraisemblablement la mort des cellules qui sont alors digérées par l'enzyme. En outre, la concentration de la trypsine (1 g p.100 ml) est trop élevée et provoque une lyse des membranes des hépatocytes dès les premiers temps de l'incubation.

La méthode de DULBECCO et VOGT qui utilisent des concentrations plus faibles de trypsine (0,25 g p.100) et un temps d'incubation de 30 minutes, permet d'obtenir des cellules libres, mais seulement après une dissociation à la pipette. Le rendement reste, cependant, faible après l'élimination des amas cellulaires par centrifugation à faible vitesse. Si la méthode rend des services appréciables pour la mise en culture de souches cellulaires, elle ne paraît pas devoir convenir à des études biochimiques in vitro. Il subsiste, en outre, après la dissociation, un voile fibreux, témoin indirect d'une digestion profonde.

Nous avons utilisé des concentrations plus faibles de trypsine (0,1 p.100 ml) . Elles semblent mieux convenir à la dissociation du tissu hépatique et se sont révélées très efficaces pour la préparation de suspensions de cellules cancéreuses libres à partir de sarcome polymorphe provoqué par l'injection de Bleu de Trypan.

- 4°- De toutes les méthodes classiques que nous avons étudiées, seule la méthode de LONGMUIR et REES obéissait aux impératifs que nous avons énoncés plus haut. Le temps de préparation des cellules ne dépasse pas 60 à 90 minutes et la suspension finale ne présente plus que de rares noyaux libres. Les amas cellulaires sont peu nombreux et ne dépassent pas 2 à 4 cellules : la proportion de ces amas est toujours inférieure à 1 pour 10.000 cellules libres. Le rendement est satisfaisant et fournit de 0,3 à 0,5 . 10⁷ cellules par gramme de tissu frais. Du point de vue technique, la méthode est donc a priori applicable à des études biochimiques à la condition, toutefois, que l'intégrité biochimique, biologique et morphologique des cellules ait été préservée.

L'étude poussée des cellules obtenues par la méthode de LONGMUIR et REES nous a malheureusement montré qu'elles ne possédaient aucune de ces trois qualités.

III - ETUDE DE L'INTEGRITE DES CELLULES OBTENUES PAR LA METHODE DE LONGMUIR ET REES.

Les cellules isolées par la méthode de LONGMUIR et REES ont été étudiées du triple point de vue de la morphologie, de la biochimie et de la culture in vitro .

A - DESCRIPTION DES CRITERES D'INTEGRITE

1 - CRITERES MORPHOLOGIQUES

Nous avons étudié la morphologie des cellules isolées au microscope photonique et au microscope électronique.

a- OBSERVATIONS AU MICROSCOPE PHOTONIQUE

Les observations au microscope photonique ont été réalisées sur des suspensions cellulaires, sur des frottis ou sur des coupes. Dans ces deux derniers cas, une fixation au formol ou à l'alcool-éther et une coloration à l'hémalin-éosine ou à l'héματοxyline étaient effectuées. A titre comparatif, l'aspect morphologique de coupes du tissu de départ, fixées et colorées dans les mêmes conditions, a été systématiquement contrôlé.

Outre les renseignements apportés sur la morphologie interne des cellules isolées, ces observations ont permis de juger, sur un grand nombre d'observations, de l'état de pureté des suspensions cellulaires et de la présence éventuelle et de l'importance d'amas cellulaires.

b- OBSERVATIONS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

Chaque préparation de cellules isolées a été observée systématiquement au microscope électronique. Le mode opératoire est le suivant :

Une petite partie de la suspension est introduite dans un tube à centrifuger conique et fixée, pendant une heure à +4°C, par une solution d'acide osmique à 2 g p.100 ml, tamponnée à pH 7,4 en milieu acétate. Après 3 lavages de 5 minutes dans le sérum physiologique, les cellules sont progressivement déshydratées par des bains successifs dans des solutions alcooliques de concentrations croissantes (éthanol à 50 p.100 pendant 15 minutes - éthanol à 70 p.100 pendant 15 minutes - éthanol à 90 p.100 pendant 30 minutes - éthanol absolu pendant 60 minutes) .

Après un bain intermédiaire dans le mélange de méthacrylate de butyle-éthanol absolu (v/v), on réalise 2 bains d'imprégnation de 60 minutes dans du méthacrylate pur. Enfin, après un dernier bain de 60 minutes dans du méthacrylate additionné de catalyseur de polymérisation, on dispose un petit fragment du culot de centrifugation dans le fond d'une capsule de gélatine contenant le mélange de méthacrylate-catalyseur. Les capsules sont placées 24 à 48 heures dans une étuve à 50°C de façon à réaliser la polymérisation.

Des coupes ultrafines sont ensuite effectuées, à partir des blocs obtenus, avec un ultramicrotome PORTER et BLUM. Les coupes sont enfin montées sur des grilles recouvertes d'une membrane de "formar".

Les examens microscopiques sont réalisés au microscope électronique PHILIPS EM 100 ou SIEMENS-ELMISKOP I à divers grossissements. L'interprétation des résultats est faite sur des reproductions photographiques.

2 - CRITERES BIOCHIMIQUES

Nous avons limité notre exploration biochimique des cellules obtenues par la méthode de LONGMUIR et REES, d'une part, à l'étude des enzymes respiratoires et, d'autre part, à l'étude chimique et biochimique des acides ribonucléiques. Ces deux groupes de substances jouent, en effet, un rôle fondamental dans la vie cellulaire et leur intégrité est nécessaire pour assurer la survie des cellules.

Nous décrirons donc successivement les modes opératoires que nous avons suivis pour déterminer l'activité respiratoire des cellules et la composition et le métabolisme des acides ribonucléiques qu'elles contiennent.

a - MESURE DE L'ACTIVITE RESPIRATOIRE DES CELLULES

La détermination cinétique de la consommation d'oxygène est réalisée avec un appareil de WARBURG, en l'absence de substrat (respiration endogène) et en présence de substances qui interviennent dans la chaîne des oxydations cellulaires. Le mode opératoire est le suivant :

Une suspension homogène, contenant 20 g de cellules isolées pour 100 ml de solution de KREBS-RINGER ou de sérum, préalablement filtrés sur une bougie de CHAMBERLAND, est réalisée à partir d'un culot de centrifugation obtenu après une purification de la préparation effectuée sous contrôle morphologique. 2,5 ml de cette suspension sont introduits dans des fioles de WARBURG et 0,5 ml d'une solution contenant le substrat à étudier est placé dans l'anse latérale. Un courant d'oxygène est envoyé dans l'ensemble manométrique pendant 10 minutes. Après une période de stabilisation de la température dans le bain-marie à 37°C, le contenu des anses est introduit dans les fioles. La consommation d'oxygène est suivie pendant 90 à 120 minutes et la courbe cinétique de la consommation d'oxygène exprime le nombre de microlitres d'oxygène consommé en fonction du temps.

Les volumes d'oxygène consommé se calculent par la formule :

$$x = h k$$

où : x = volume (en μ l) d'oxygène consommé

h = divisions du manomètre (déclivité par rapport à 150)

k = constante manométrique, tenant compte du volume mort de la fiole et du manomètre, de la température et du coefficient de solubilisation de l'oxygène dans la solution :

$$k = \frac{V_g \times \frac{273}{T} + V_f \times \alpha}{P_o}$$

où : P_o = pression standard du liquide manométrique (10.000 pour le liquide de BRODIE)

T = température absolue

V_g = volume total - volume du fluide

V_f = volume du fluide

α = solubilité du gaz dans le liquide de suspension
(0,031 à 20° pour l'oxygène dans le liquide de RINGER)

Le coefficient respiratoire Q_{O_2} est exprimé en millilitre d'oxygène par heure et par gramme de cellules fraîches ou encore en millilitre d'oxygène par heure et par cellule.

b - DETERMINATION DE LA COMPOSITION MOLLAIRE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

On sait que les acides ribonucléiques se définissent comme des hauts polymères des quatre nucléotides suivants : acides guanylique, adénylique, cytidylique et uridylique. Les rapports molaires de ces derniers varient avec la nature et l'origine des acides nucléiques. Il était donc intéressant de déterminer la composition nucléotidique des acides ribonucléiques des cellules isolées du foie de Rat et de la comparer à la composition bien connue des acides ribonucléiques du foie de départ. En effet, des variations dans la composition des acides ribonucléiques des cellules isolées auraient révélé d'éventuelles dégradations de ces derniers.

Le principe du dosage des nucléotides constituant les acides ribonucléiques tissulaires ou cellulaires est le suivant : le précipité obtenu par une défécation trichloracétique est dilipidé puis hydrolysé par la soude. Les ribonucléotides libérés sont purifiés sur un échangeur de cations et soumis à l'analyse électrophorétique quantitative.

Le mode opératoire est le suivant :

Les suspensions de cellules ont été traitées selon la méthode de SCHNEIDER (248) et la composition nucléotidique des acides ribonucléiques déterminée selon la méthode de MONTREUIL, DERUMEZ et BOULANGER (249) .

On traite la suspension de cellules par 10 volumes d'une solution d'acide trichloracétique à 10 g p.100 ml qui précipite la fraction macromoléculaire. Après deux lavages du précipité par l'acide trichloracétique et 3 lavages par l'alcool absolu, on effectue 3 délipidations successives à reflux avec un mélange d'alcool et d'éther (v/v).

Le résidu, qui contient les protéines et les acides désoxyribo- et ribonucléiques, est hydrolysé par la soude 0,5 N à 37°C pendant 18 heures. Seuls les acides ribonucléiques sont hydrolysés et les ribonucléotides libérés quantitativement sont recueillis dans la fraction surnageante à pH 4 obtenue par l'addition d'acide formique. La solution est purifiée par un passage sur des colonnes d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 4) et les nucléotides sont dosés au spectrophotomètre JOBIN et YVON en lumière ultraviolette après séparation électrophorétique sur papier d'Arches, dans le tampon de DAVIDSON et SMELLIE (250) (citrate de sodium 0,05 M , pH 3,5 - 15 volts/cm - 6 heures) .

Les valeurs obtenues ont été comparées avec celles des ARNs tissulaires totaux, déterminées par MONTREUIL, DERUMEZ et BOULANGER (251) .

c - ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES.

La mesure de l'activité métabolique des acides ribonucléiques a été déterminée par l'étude de la vitesse d'échange de l'acide phosphorique radioactif dans les quatre nucléotides constituant les acides ribonucléiques. On sait, en effet, que l'incorporation d'un composé marqué s'effectue d'une manière d'autant plus intense que les processus de biosynthèse sont plus actifs. Dans le cas des acides ribonucléiques, on sait que l'incorporation du phosphore

radioactif dans les nucléotides se réalise de façon préférentielle, selon une séquence nucléotidique qui varie avec le temps. Les études de BOULANGER, MONTREUIL et MASSE (254) et de BOULANGER et MONTREUIL (255), réalisées sur le foie de rat in vivo, ont permis de préciser la vitesse d'incorporation du ^{32}P dans chaque nucléotide constituant les acides ribonucléiques du foie normal. L'étude de la vitesse d'échange et la détermination de la "séquence" de radioactivité nucléotidique permet donc de comparer le métabolisme in vitro des acides ribonucléiques cellulaires avec le métabolisme in vivo des acides ribonucléiques tissulaires et de saisir d'éventuels troubles métaboliques.

Le principe de la mesure de la radioactivité spécifique des ribonucléotides est le suivant : les cellules isolées sont incubées dans un milieu renfermant de l'acide phosphorique radioactif. Les nucléotides constituant les acides ribonucléiques sont ensuite séparés selon le mode opératoire précédent et leur radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur de GEIGER-MULLER. Un microdosage de phosphore permet ensuite de calculer la radioactivité spécifique qui est exprimée en nombre de coups par minute et par milligramme de phosphore nucléotidique.

Le mode opératoire est le suivant :

Les cellules libres, isolées dans des conditions stériles (*) sont incubées pendant une heure, sous courant de carbogène (95% de O_2 ; 5% de CO_2), dans du sérum de boeuf stérile ou dans une solution de KREBS-RINGER bicarbonatée. De l'acide phosphorique marqué au ^{32}P est ajouté au milieu, à des doses variant de 1 à 10 microcuries par ml. L'incubation est arrêtée par l'addition d'acide trichloracétique glacé et l'extraction des ribonucléotides constituant les acides ribonucléiques est réalisée par l'application du mode opératoire décrit ci-dessus.

Après une séparation électrophorétique des nucléotides, on procède au comptage de la radioactivité de pastilles découpées à l'emplacement de chacun d'eux. Le phosphore des pastilles est dosé, après le comptage, par la méthode de microdosage de ALLEN (252) modifiée par BOULANGER et MONTREUIL (253). La radioactivité est exprimée en coups-minute par milligramme de phosphore et pour 1 mC, ramené au jour d'étalonnage à la pile.

(*) - Il est important de réaliser les incubations dans des conditions stériles de façon à éviter l'interférence des bactéries, dont l'activité métabolique est très importante.

Nous avons généralement évalué la quantité de phosphore incorporé dans les acides ribonucléiques après 1 heure d'incubation.

3 - CRITERES BIOLOGIQUES.

ETUDE DE LA VIABILITE DES CELLULES EN CULTURE .

Nous avons procédé à la mise en culture des suspensions pures de cellules débarrassées de fractions cytoplasmiques libres et d'amas cellulaires supérieurs à 4 cellules, de façon à contrôler la survie des cellules obtenues et à évaluer, éventuellement, leur capacité de prolifération.

Les études ont été effectuées dans les conditions suivantes :

Les opérations de dissociation sont effectuées dans des conditions rigoureusement stériles. L'appareillage est stérilisé à l'autoclave à 135°C pendant 1 heure et toutes les opérations d'isolement sont réalisées en chambre stérile. Les foies utilisés sont extraits chirurgicalement, découpés et lavés dans le milieu nutritif TC.199 de MORGAN, MORTON et PARKER (256) additionné de 10 p.100 de sérum de veau et des antibiotiques suivants : Pénicilline, Streptomycine, Néomycine et Mycostatine. Après la dissociation, les cellules sont mises en suspension dans 5 ml de milieu de culture et comptées. La culture est réalisée en flacons de ROUX de 600 ml dans chacun desquels ont introduit 60 ml d'une suspension contenant 200.000 cellules par millilitre.

B - RESULTATS CONCERNANT L'ETUDE DE L'INTEGRITE DES CELLULES OBTENUES PAR LA METHODE DE LONGMUIR et REES

Nous avons appliqué aux suspensions de cellules du foie de Rat obtenus par la méthode de LONGMUIR et REES les critères d'intégrité morphologique, biochimique et biologique que nous venons de décrire.

1 - ETUDE MORPHOLOGIQUE

a - OBSERVATIONS AU MICROSCOPE PHOTONIQUE

Les examens au microscope photonique effectués à faible grossissement montrent des suspensions de cellules bien dissociées et apparemment intactes

(figure 14). L'observation à l'objectif à immersion révèle que les contours cellulaires sont nets et que les noyaux sont homogènes. Cependant, le cytoplasme est fortement vacuolisé (figure 15) .

L'observation au microscope électronique devait confirmer ces aspects morphologiques.

b - OBSERVATIONS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

Les examens au microscope électronique confirment ou révèlent des altérations profondes des cellules isolées (figure 16) .

La membrane cytoplasmique présente de nombreuses ruptures.

Les noyaux sont très granuleux à cause de l'agglutination de la chromatine. En outre, la membrane nucléaire est très altérée : dans la plupart des noyaux, elle est, en effet, très contractée.

Le cytoplasme présente une dégénérescence vacuolaire profonde qui était déjà visible au microscope optique. Les vacuoles possèdent des tailles variables, parfois petites (figure 17), parfois gigantesques (figure 18). Leur forme est tantôt ovalaire, tantôt "en sablier". Toujours, elles sont bordées sur leur face externe de grains de PALADE qui montrent leur nature ergastoplasmique.

A côté de ces vésicules ergastoplasmiques profondément altérées subsistent des plages d'ergastoplasme dont l'aspect est sensiblement normal (figure 16) .

Les mitochondries, elles aussi, ont perdu leurs caractéristiques morphologiques : elles sont gonflées et sont, en général, optiquement vides (figure 16) . Leur forme est voisine de celle des vacuoles ergastoplasmiques: seuls l'aspect caractéristique de leur double membrane et l'absence de grains de PALADE permet d'établir la distinction, car rares sont les mitochondries qui possèdent encore quelques vestiges de crêtes internes.

Nous pouvons donc conclure que les cellules isolées par la méthode de LONGMUIR et REES ont subi de profondes altérations morphologiques et que la "clarification du cytoplasme", déjà visible au microscope optique, s'explique par une dilatation parfois considérable des mitochondries et des vacuoles ergastoplasmiques.

Figure 14

Aspect au microscope photonique d'une suspension de cellules libérées du foie de Rat par la méthode de LONGMUIR et REES. On observera que la dissociation est satisfaisante et qu'il n'existe pas d'amas cellulaires importants.



BUS
L1252

F i g u r e 15

Observation à l'objectif à immersion
de cellules libérées du foie de Rat par la méthode
de LONGMUIR et REES. Les cellules ont conservé leurs
contours polyédriques mais le cytoplasme est très
vacuolisé.

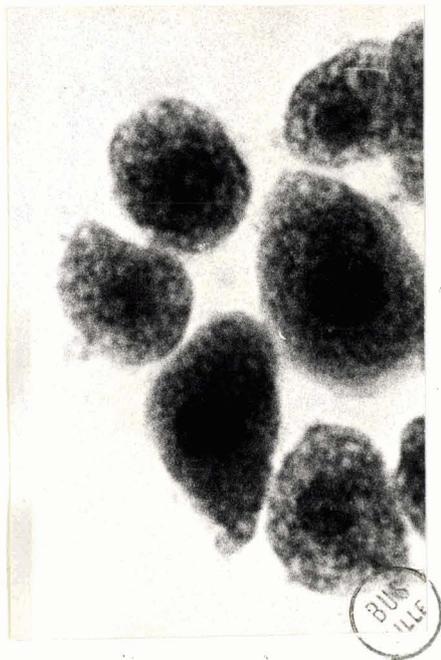


Figure 16

Aspect au microscope électronique PHILIPS EM 100
d'une cellule libérée du foie de Rat par la méthode
de LONGMUIR et REES.

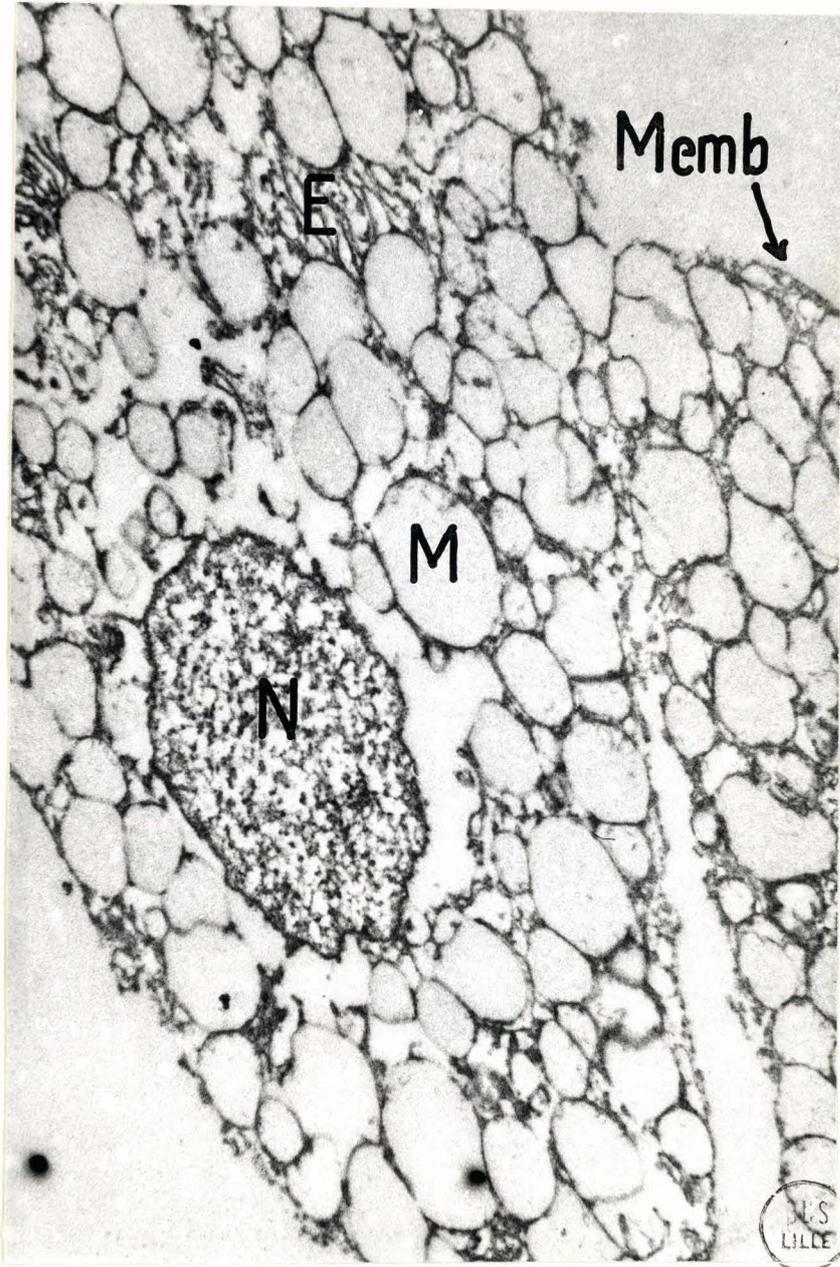
N = noyau : la chromatine est condensée
et la membrane est contractée

M = mitochondries

E = plages ergastoplasmiques

Memb. = parties restées intactes de la membrane
cellulaire

On comparera la morphologie de cette cellule à celle
de la cellule hépatique "in situ" reproduite à la
page 8 (figure 1 a) .

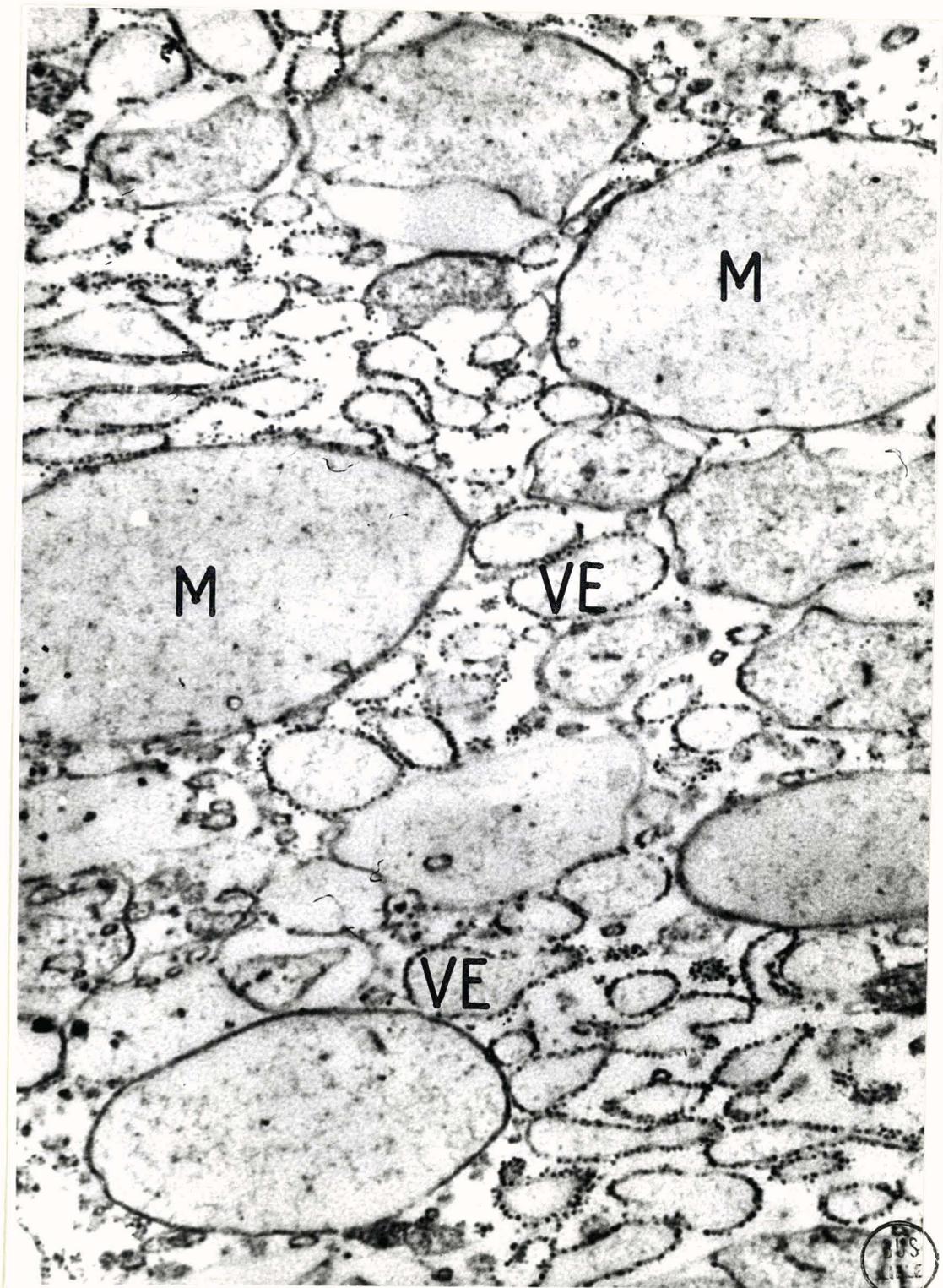


F i g u r e 17

Observation au microscope électronique (SIEMENS-ELMISKOP I) de mitochondries (M) et de vésicules ergastoplasmiques (VE) de cellules du foie de Rat isolées par la méthode de LONGMUIR et REES.

Les mitochondries sont gonflées et ont perdu leurs crêtes internes.

Les vésicules ergastoplasmiques sont bordées de grains de PALADE.



105
111

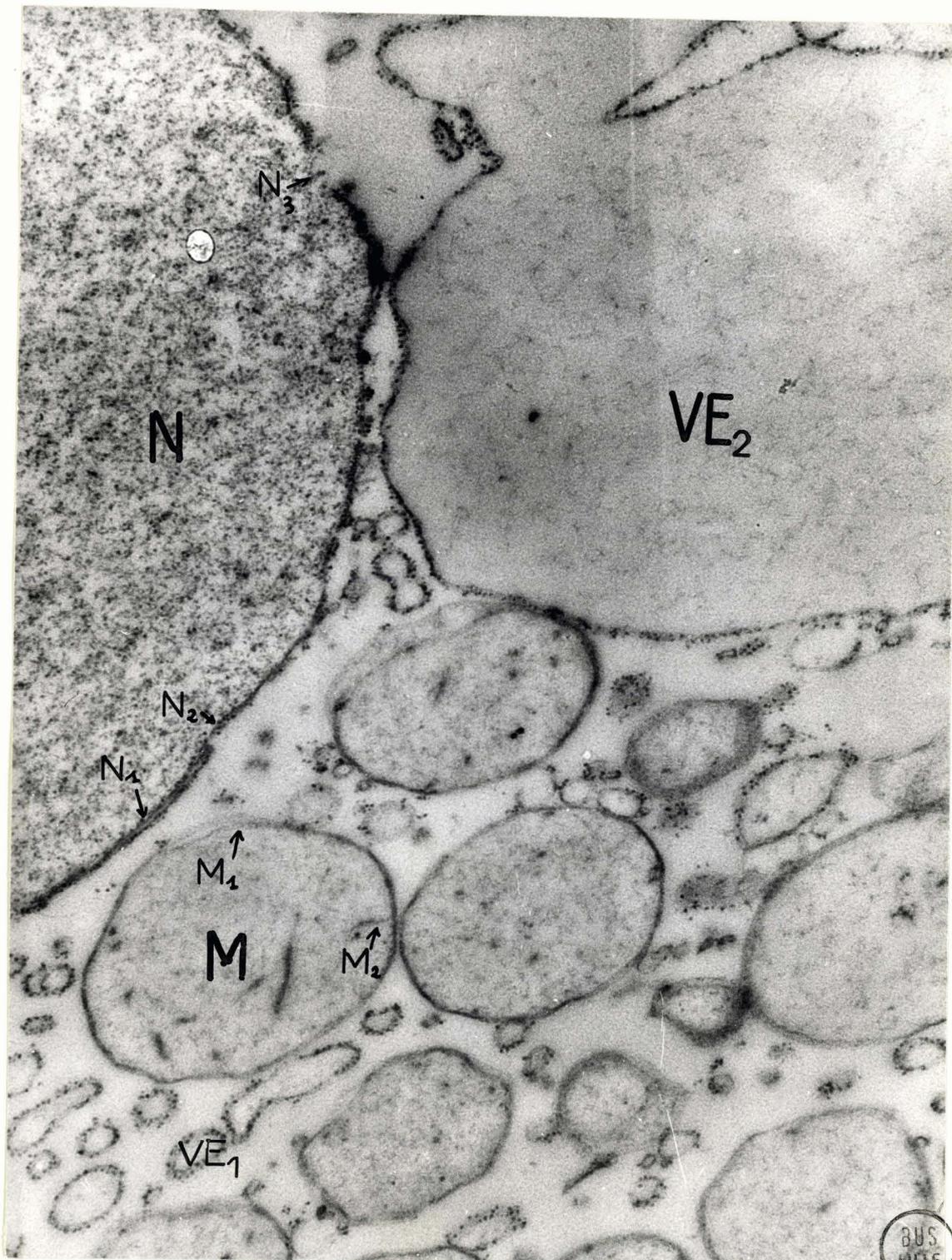
F i g u r e 18

Observation au microscope électronique (SIEMENS-ELMISKOP I) d'une partie de cellule de foie de Rat isolée par la méthode de LONGMUIR et REES.

N = noyau dont on observera la double membrane (N1) et les altérations de celle-ci : disparition de l'un des deux feuilletts (N2) ; rupture (N3) .

M = mitochondries. On observera la persistance de la double membrane (M1) et de fragments de crêtes internes dans quelques mitochondries (M2)

VE = vésicules ergastoplasmiques, les unes petites (VE1), une autre, gigantesque (VE2) .



BUS
MSE

Pour préciser quelle étape de la méthode de dissociation était agressive, nous avons étudié la morphologie de la cellule après chacune d'elle. Nous avons observé que les lésions morphologiques apparaissaient dès la première étape, dès que le tissu entrainé en contact avec la solution de phosphate à pH 7,3 (voir p.86 la description de la méthode de LONGMUIR et REES) . La figure 19 est, à cet égard, démonstrative. On voit, en effet, que l'aspect morphologique est identique à celui que nous avons décrit plus haut : la membrane cytoplasmique est préservée, mais les noyaux sont contractés, les mitochondries sont gonflées et le cytoplasme est vacuolisé. De rares plages d'ergastoplasme sont encore visibles.

CONCLUSIONS CONCERNANT LES OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

De cette étude morphologique, nous pouvons dégager les conclusions suivantes :

1- Une simple observation au microscope optique ne suffit pas à déceler les altérations cytoplasmiques profondes qui ne peuvent apparaître que lors des examens systématiques au microscope électronique.

2- Les altérations du noyau et la vacuolisation du cytoplasme des cellules isolées par la méthode de LONGMUIR et REES sont provoquées par les ions phosphates.

Le gonflement tout à fait caractéristique des mitochondries par les phosphates explique l'abolition totale de certains métabolismes comme nous le verrons plus loin. En outre, ces résultats apportent une confirmation "visuelle" des résultats de LEHNINGER (257) et de CHAPPELL et GREVILLE (258) sur le gonflement des mitochondries sous l'action des phosphates. Ces auteurs ont, en effet, précisé que ces modifications morphologiques étaient directement liées à un découplage du système des phosphorylations oxydatives. Ce blocage du système de production d'énergie cellulaire suffit à expliquer l'inhibition totale des métabolismes. La cellule, ayant perdu la possibilité de synthétiser ses enzymes, peut être considérée comme morte. L'absence de survie des cellules en culture confirmait cette dernière conclusion.

Figure 19

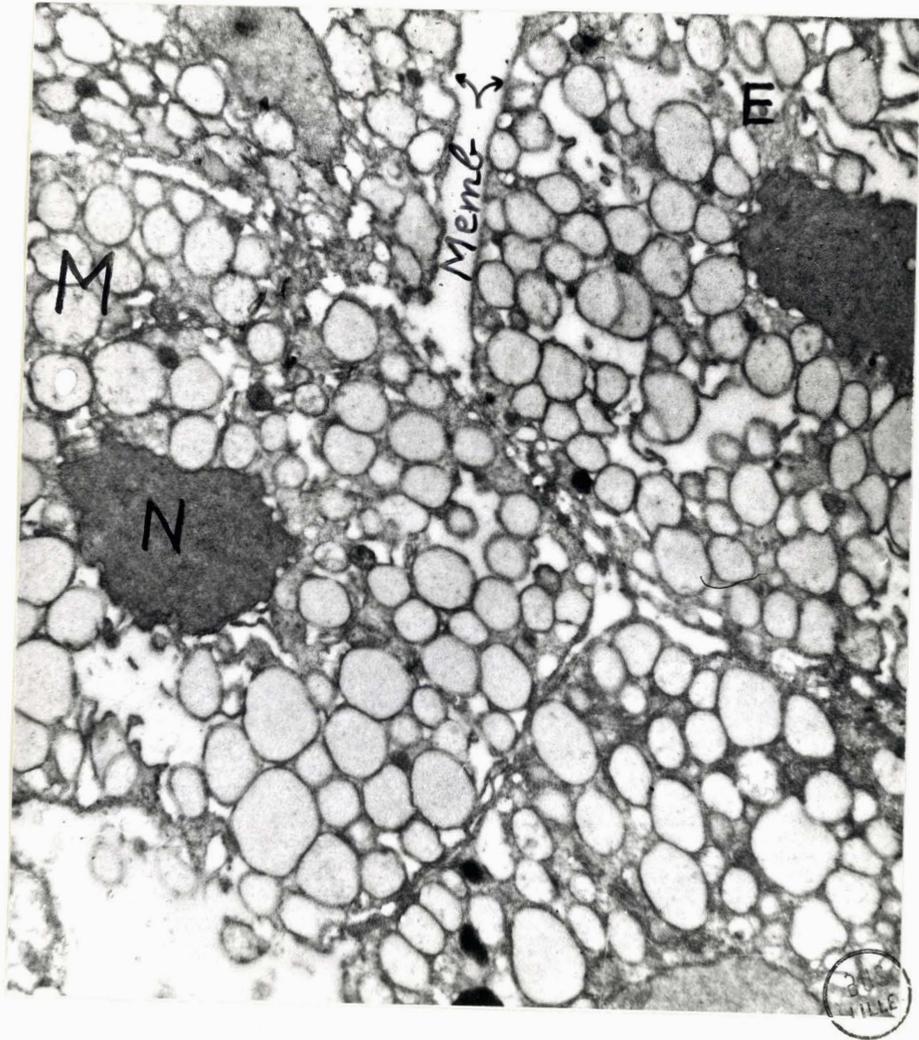
Aspect morphologique au microscope électronique PHILIPS EM 100 du tissu hépatique de Rat traité par une solution de phosphate de sodium 0,02 M de pH 7,3. (Première étape de la méthode de dissociation tissulaire de LONGMUIR et REES) (voir p. 86) .

N = noyau

M = mitochondries

E = ergastoplasme

Memb. = membrane cellulaire



2 - ETUDE BIOCHIMIQUE

a - Activité respiratoire

Les résultats que nous a apportés l'étude de l'activité respiratoire des cellules sont illustrés par la figure 20. On voit que les cellules présentent une respiration endogène très faible ($Q_{O_2} = 0,1$ à $0,2$ ml d'oxygène par heure et par gramme de cellules), confirmant en cela les résultats obtenus par LAWS et STICKLAND (259).

En présence de succinate 40 mM, le coefficient respiratoire atteint, pendant les 30 ou 40 premières minutes, des valeurs supérieures à celui du tissu de référence ($Q_{O_2} = 1,4$ à $1,6$ pour les cellules et $1,2$ à $1,4$ pour le tissu). Cependant, la courbe de consommation d'oxygène montre un ralentissement très net, après 40 minutes de contact avec le substrat.

L'addition d'ATP ou du mélange ATP + DPN provoque une inhibition nette. L'addition de DPN ne modifie pratiquement pas la cinétique en présence de succinate. Ces résultats s'accordent donc parfaitement avec ceux de LONGMUIR et REES.

En présence de glucose, pour des concentrations allant de 1 à 10 mM, la respiration reste toujours nulle bien que des doses décroissantes de glucose aient été employées pour éliminer un éventuel effet CRABTREE. Les cellules isolées par la méthode de LONGMUIR et REES sont donc incapables d'utiliser le glucose.

b - Détermination de la composition des acides ribonucléiques

La composition nucléotidique des acides ribonucléiques reste inchangée par rapport à celle du foie de référence. Nos résultats sont rassemblés dans le tableau II. On voit que les rapports molaires des nucléotides gardent la même valeur que dans le tissu total et que les rapports $\frac{\text{purines}}{\text{pyrimidines}}$ et $\frac{6\text{-CO}}{6\text{-NH}_2}$ restent voisins de l'unité.

c - Etude de la biosynthèse des acides ribonucléiques.

Bien que la structure moléculaire des acides ribonucléiques ne semble pas avoir subi de profondes modifications, leur biosynthèse est cependant bloquée.

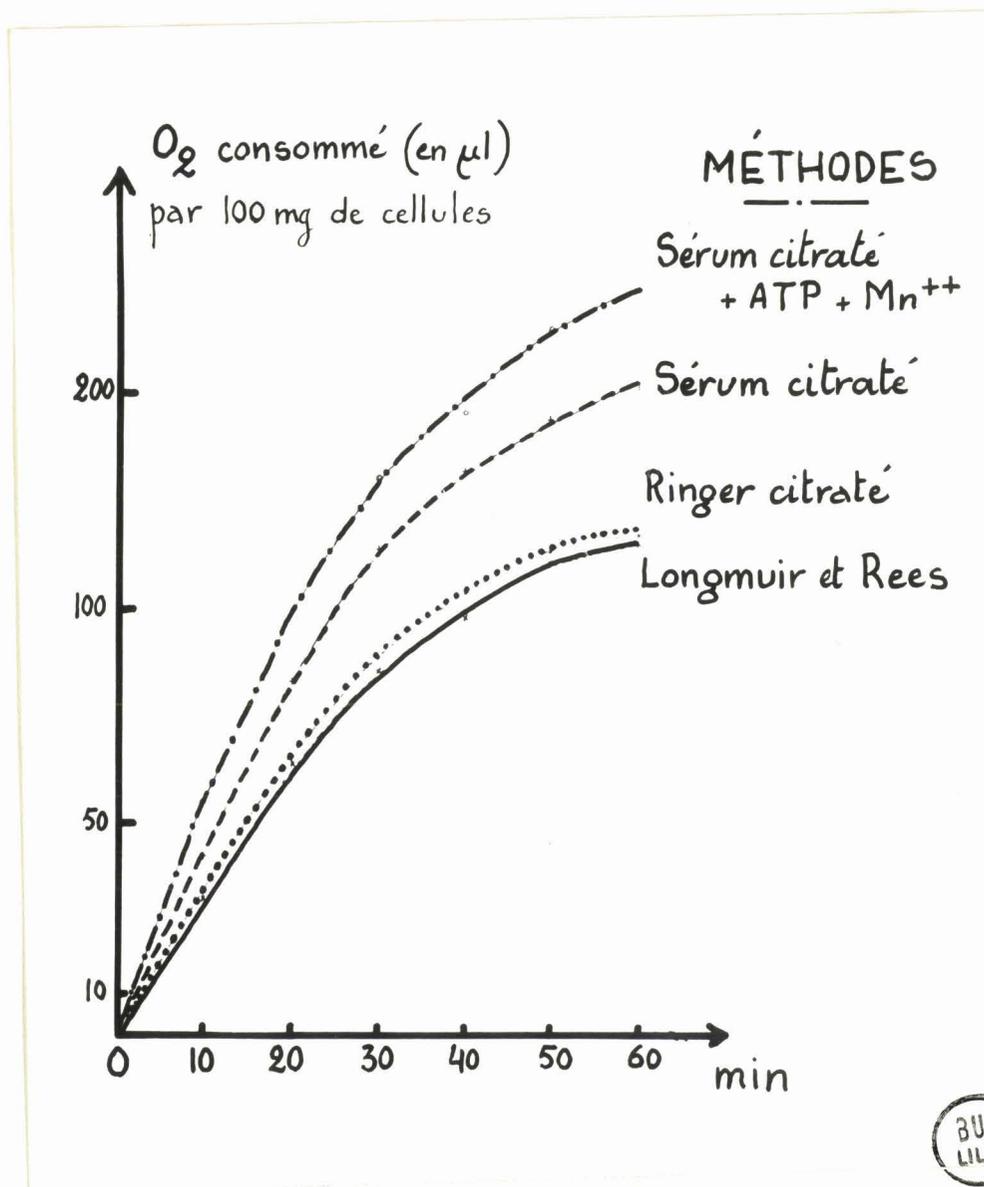


Figure 20

Courbes de respiration données par des quantités égales de cellules isolées à partir du foie de Rat par différentes méthodes. Le milieu d'incubation est 40 mM en succinate de sodium. La détermination de l'activité respiratoire est effectuée selon le mode opératoire décrit à la page 93 .

T A B L E A U I I

Composition nucléotidique (résidus nucléotidiques pour
100 nucléotides totaux) des acides ribonucléiques du foie de Rat total
et des cellules isolées du foie de Rat par différentes méthodes .

Origine des acides ribonucléiques	Composition molaire (*)				Purines	$\frac{6 \text{ NH}_2}{6 \text{ CO}}$
	G	C	A	U	Pyrimidines	
Foie total	29,9	30,9	19,2	20	0,97	1
Cellules isolées						
Méthode de LONGMUIR et REES	31	30,4	19,1	19,5	1	0,98
Méthode au "RINGER citraté- hyaluronidase"	29,6	31,3	18,2	20,9	0,91	0,98
Méthode au "sérum citraté"	30,6	32,6	18,3	18,5	0,96	1,04

(*) G, C, A, U = respectivement, acides guanylique, cytidylique, adénylique et uridylique .

T A B L E A U III

Radioactivité spécifique (*) des ribonucléotides (**)
constituant les acides ribonucléiques des cellules isolées
par différentes méthodes

Méthode de préparation des cellules	A	U	C	G
LONGMUIR et REES	0	0	0	0
RINGER citraté-hyaluronidase	15.900	31.000	17.200	11.900
Sérum citraté-hyaluronidase	53.000	96.000	30.600	71.200
Sérum citraté - ATP - Mn ⁺⁺	336.000	510.000	183.000	330.000

(*) Exprimée en coups/minute par milligramme de phosphore nucléotidique et ramenée au jour d'étalonnage à la pile. Les incubations ont toutes été réalisées dans des conditions rigoureusement identiques : 5 g de cellules libres en suspension dans 50 ml de solution de KREBS-RINGER contenant 1 mC de

$^{32}\text{P}\text{O}_4\text{H}_3$; incubation à 37°C pendant 2 h sous un courant de "Carbogène" .

(**) A, U, C, G, = respectivement, acides adénylique, uridylique, cytidylique et guanylique

En effet, ils ont perdu la propriété d'"échanger" leur radical phosphoryle et la radioactivité spécifique des nucléotides est nulle, quelle que soit la nature des milieux d'incubation (sérum, solutions de saccharose ou solutions de KREBS-RINGER), la concentration en radiophosphore (1,5 , 10 , 25 ou 50 μ C p. ml) et les conditions de l'expérience (aérobiose ou anaérobiose).

Nous pouvons donc conclure que, du point de vue biochimique, les cellules isolées par la méthode de LONGMUIR et REES ont subi de graves lésions. En particulier, les enzymes responsables de la biosynthèse des acides ribonucléiques sont inhibés ou détruits. Eu égard à l'importance biologique fondamentale de des composés, il n'est pas surprenant que le critère biologique de survie des cellules ait, lui aussi, été négatif.

3 - ETUDE BIOLOGIQUE

Mises en culture dans les conditions que nous avons décrites plus haut (voir p. 97), les cellules isolées par la méthode de LONGMUIR et REES ont perdu toute capacité de survie. Dès le 3ème jour de la culture, on constate, en effet, l'apparition de zones nécrotiques, indiquant que les cellules ont perdu toute leur activité vitale.

C - TENTATIVES D'AMELIORATION DE LA METHODE DE LONGMUIR et REES

Nous avons tenté de remédier aux imperfections de la méthode de LONGMUIR et REES de manière à améliorer, non pas la pureté des cellules et le rendement qui sont satisfaisants, mais la morphologie des cellules puisqu'il semblait exister, a priori, une corrélation entre l'intégrité morphologique , d'une part, et l'intégrité biochimique et biologique, d'autre part.

Nous avons, en particulier, remplacé, pour effectuer le lavage final des cellules isolées, la solution phosphatée de pH 7,3 (voir p. 86) par une solution de saccharose ou par une solution de RINGER dans l'espoir de restaurer la morphologie des cellules en éliminant une solution dont l'agressivité avait été démontrée.

1 - Lavage des cellules avec une solution saccharosée

Les solutions de saccharose 0,25 M , loin d'améliorer la morphologie des cellules, accentuent encore les altérations : le gonflement des mitochondries et des vésicules ergastoplasmiques devient tel qu'elles occupent la totalité du cytoplasme (figure 21) .

Ce résultat est en accord avec les observations de HUMPHREY (260) à propos de coupes de foie traitées par des solutions de saccharose. En outre, l'agressivité de ces dernières a été observée par l'équipe des chercheurs qui travaillent à l'Institut de Recherches sur le Cancer sur la question du fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle.

2 - Lavage des cellules avec une solution de KREBS-RINGER

Les solutions de KREBS-RINGER préservent, au contraire, les structures mitochondriales inaltérées, à condition, toutefois, que les lavages soient effectués à 37°C (figure 22a), car des lavages effectués à basse température accentuent ces altérations (figure 22b) .

D - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA METHODE DE LONGMUIR et REES

1°) - La méthode de dissociation tissulaire de LONGMUIR et REES fournit rapidement et en quantités élevées des cellules parfaitement isolées.

2°) - Elle ne répond, cependant, à aucun des trois critères que nous avons déterminés :

a) La morphologie est profondément altérée. Les noyaux sont contractés et la chromatine est, généralement, agglutinée. Les vacuoles ergastoplasmiques sont considérablement dilatées. Mais la lésion la plus importante se manifeste au niveau des mitochondries qui sont gonflées et, en général, optiquement vides. Leurs crêtes internes ont, en outre, disparu ou sont très réduites.

b) Les cellules ont, cependant, conservé une certaine activité respiratoire. Ce résultat n'est pas surprenant, car on fait la même observation à propos des mitochondries isolées par la méthode de centrifugation différentielle. Ces dernières, en effet, bien qu'elles apparaissent très altérées au microscope électronique, n'ont pas entièrement perdu leur capacité respiratoire. Il est probable, cependant, que certains enzymes de la chaîne des oxydations cellulaires soient inhibés ou détruits car les cellules isolées par la méthode de LONGMUIR et REES n'utilisent plus certains substrats d'oxydation comme le glucose.

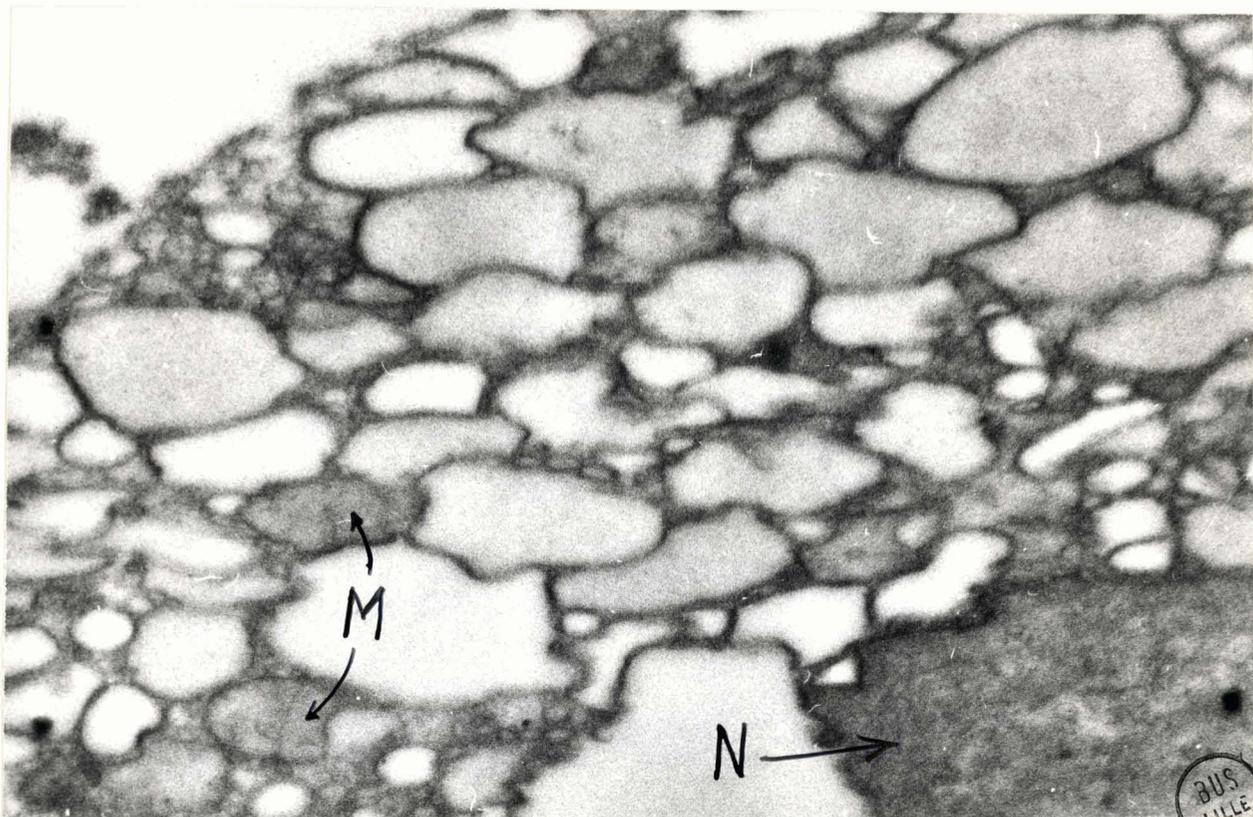
Figure 21

Aspect au microscope électronique PHILIPS EM 100 d'une cellule du foie de Rat isolée par la méthode de LONGMUIR et REES et lavée avec une solution de saccharose 0,25 M .

N = noyau

M = rares mitochondries intactes

La vacuolisation du cytoplasme est importante. On la comparera à celle de la cellule représentée à la figure 16 .



BUS
VILLE

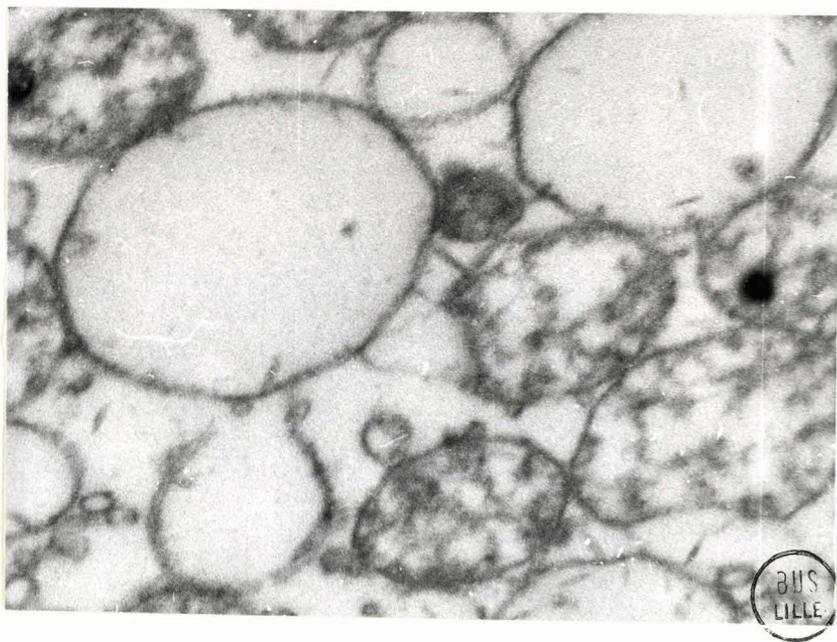
F i g u r e 22

Aspect au microscope électronique PHILIPS EM 100 de cellules de foie de Rat isolées par la méthode de LONGMUIR et REES et lavées avec une solution de KREBS-RINGER à 37°C (figure 22a) et à 0°C (figure 22b).

Dans le premier cas, la morphologie des mitochondries intactes est préservée. Elle est détruite dans le second.

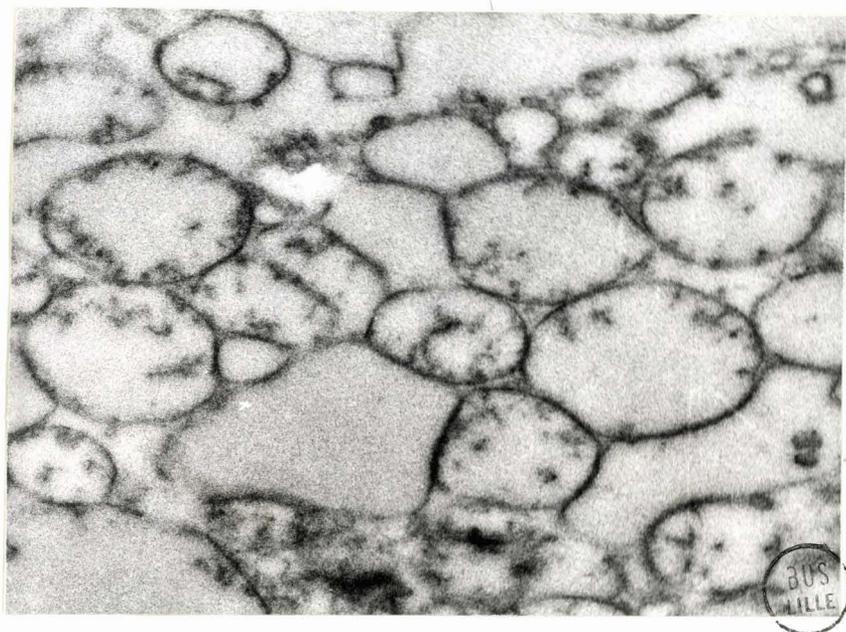
Figure

22 a



Figure

22 b



c) D'autres systèmes enzymatiques ont, en outre, disparu. C'est le cas, par exemple, des enzymes responsables de la biosynthèse des acides ribonucléiques qui est totalement inhibée. Les acides ribonucléiques ont, en effet, perdu la propriété d'incorporer les phosphates marqués au ^{32}P .

d) Il n'est donc pas surprenant que les cellules mises en culture soient incapables de survivre.

La méthode de LONGMUIR et REES fournit donc des cellules isolées "mortes" et impropres à toute expérimentation biologique ou biochimique. L'action létale est due aux ions phosphates. Il faut, en effet, remarquer que l'isolement des cellules est effectué dans des conditions "non physiologiques" de concentration élevée en phosphates et de valeur basse de pH.

Nous fondant sur cette observation, nous avons tenté de mettre au point des méthodes d'isolement des cellules à partir des tissus en nous plaçant dans des conditions plus "physiologiques", en travaillant, en particulier, à pH 7,3 - 7,4 et en présence de sérum.

<p>MISE AU POINT ET DESCRIPTION DE METHODES PERSONNELLES</p>
--

Dans la série de recherches dont nous venons d'exposer les résultats, nous avons montré que la méthode de libération des cellules la plus satisfaisante était celle de LONGMUIR et REES, mais seulement du point de vue du rendement et de l'état de pureté des produits obtenus car, sous l'angle de la conservation de l'intégrité morphologique et biochimique, cette méthode s'est révélée franchement mauvaise et son emploi, en vue d'applications biologiques, biochimiques et cancérologiques, ne peut être envisagé.

Dans une deuxième série de travaux, nous nous sommes efforcé de mettre au point une technique nouvelle qui satisfasse à la fois les critères techniques, morphologiques, biochimiques et biologiques que nous avons décrits plus haut (voir pages 88 et suivantes). Nous avons cherché à remédier aux défauts que nous avons signalés en portant notre attention sur divers facteurs d'altération des structures cellulaires. C'est ainsi que :

- 1) nous avons opéré à des pH neutres, particulièrement favorables à la conservation de la morphologie de la cellule,
- 2) nous avons éliminé les phosphates dont nous avons démontré, avec LEHNINGER (261) et avec CHAPPELL et GREVILLE (262), l'agressivité et nous les avons remplacés par le citrate de sodium, en nous inspirant de la méthode de dissociation du tissu hépatique d'ANDERSON (263) (perfusion du foie par une solution de citrate de sodium ; voir page 86) ;
- 3) nous avons amélioré le rendement par l'addition de hyaluronidase, "facteur de diffusion" et d'hydrolyse de la substance fondamentale,
- 4) nous avons recherché systématiquement les meilleures conditions de dissociation en faisant varier la température de 4 à 37°C, le pH de 6,6 à 7,5, la concentration en citrate de sodium de 0,015 à 0,030 M et en hyaluronidase de 5 à 10 unités par millilitre, la durée d'incubation de 30 à 120 minutes.

Ces divers essais nous ont permis de mettre au point une première technique que nous appellerons "méthode au RINGER citraté-hyaluronidase". Ce procédé marque un progrès très net sur celui de LONGMUIR et REES, sans être toutefois pleinement satisfaisant. Aussi avons-nous été amené à remplacer la solution saline par du sérum, milieu plus "biologique" dans des procédés que nous appellerons "méthodes au sérum citraté".

I - METHODE DE DISSOCIATION DES TISSUS DANS UNE
SOLUTION SALINE
"METHODE AU RINGER CITRATE-HYALURONIDASE"

A - MODE OPERATOIRE

Le foie découpé en petits fragments à l'aide d'une lame de rasoir est maintenu pendant une heure à 37°C, sous agitation lente, dans du liquide de RINGER, dépourvu de phosphates et de chlorure de calcium et renfermant du citrate trisodique à une concentration 0,025 M et 8 unités de hyaluronidase testiculaire par ml .

Le tissu est ensuite dilacéré, à l'aide d'une pipette épointée, par aspirations et refoulements successifs.

Après une filtration sur gaze de la suspension de cellules, les noyaux et les fragments de cellules sont éliminés par 3 ou 4 centrifugations de 5 minutes à 100 g dans le milieu d'incubation.

Le temps de préparation est de 2 heures environ et le rendement en cellules est de 0,4 à $0,6 \times 10^7$ cellules par gramme de foie frais. Il n'est que de $0,7 \times 10^6$ cellules par gramme de foie frais en l'absence de hyaluronidase.

B - RESULTATS CONCERNANT L'ETUDE DE L'INTEGRITE
DES CELLULES OBTENUES PAR LA "METHODE AU RINGER
CITRATE-HYALURONIDASE" .

1 - ETUDE MORPHOLOGIQUE

a) - Observations au microscope photonique

Le microscope photonique montre que les cellules sont parfaitement dissociées (figure 23 a) et que les suspensions sont pratiquement exemptes d'amas cellulaires de plus de 4 cellules. Les cellules ont conservé leurs contours polyédriques et présentent un cytoplasme vacuolisé, mais la vacuolisation est moins importante que dans le cas des cellules isolées par la méthode de LONGMUIR et REES (figure 23 b) .

b) - Observations au microscope électronique

Le noyau possède sa forme normale. Il n'est pas contracté comme dans les cellules isolées par la méthode de LONGMUIR et REES et la chromatine est, en général, uniformément répartie dans le nucléoplasme. La membrane nucléaire est intacte (figure 24) .

Les mitochondries sont légèrement gonflées (figures 24 et 25) . Les unes sont morphologiquement intactes, d'autres sont très fortement vacuolisées et, parfois, optiquement vides (figures 24, 25, 26 et 27). Entre ces deux formes extrêmes, on observe tous les stades intermédiaires de la dégénérescence mitochondriale décrits par ROUILLIER (264) .

L'ergastoplasme est généralement bien visible mais les vésicules ergastoplasmiques sont toujours gonflées (figure 24) mais d'une manière moins importante que dans le cas des cellules isolées par la méthode de LONGMUIR et REES (voir pages 17 et 18). Ainsi s'explique la vacuolisation qui se manifestait déjà au microscope optique.

Nous avons tenté de préciser quelle étape de la dissociation du foie provoquait les lésions morphologiques que nous observions et nous avons démontré que ces lésions apparaissaient dès que le tissu entrainé en contact avec la solution de dissociation (figure 25). Ainsi était une seconde fois démontrée l'importance de la composition du milieu d'incubation. Cette observation fut déterminante dans le choix ultérieur que nous avons fait des milieux à base de sérum.

Nous avons essayé, d'autre part, de vérifier si les lésions des mitochondries n'étaient pas provoquées par une asphyxie de la cellule au cours de la dissociation et nous avons appliqué le mode opératoire dans des conditions d'aérobiose sous courant de "Carbogène", en l'absence et en présence d'ATP . Les figures 26 et 27 montrent que le maintien de la cellule dans son activité respiratoire n'améliore pas la morphologie des mitochondries. Les lésions sont donc bien provoquées par le milieu de dissociation et elles sont irréversibles. L'ATP détermine, en outre, un gonflement des vésicules ergastoplasmiques.

Figures 23

Aspect au microscope photonique (à deux grossissements différents de l'objectif à immersion) de cellules de foie de Rat isolées par la méthode au RINGER citraté-hyaluronidase.

Les cellules ont conservé leurs contours polyédriques mais le cytoplasme est vacuolisé.

(Comparer avec les cellules obtenues par la méthode de LONGMUIR et REES ; figures 14 et 15, pages 99 et 100)

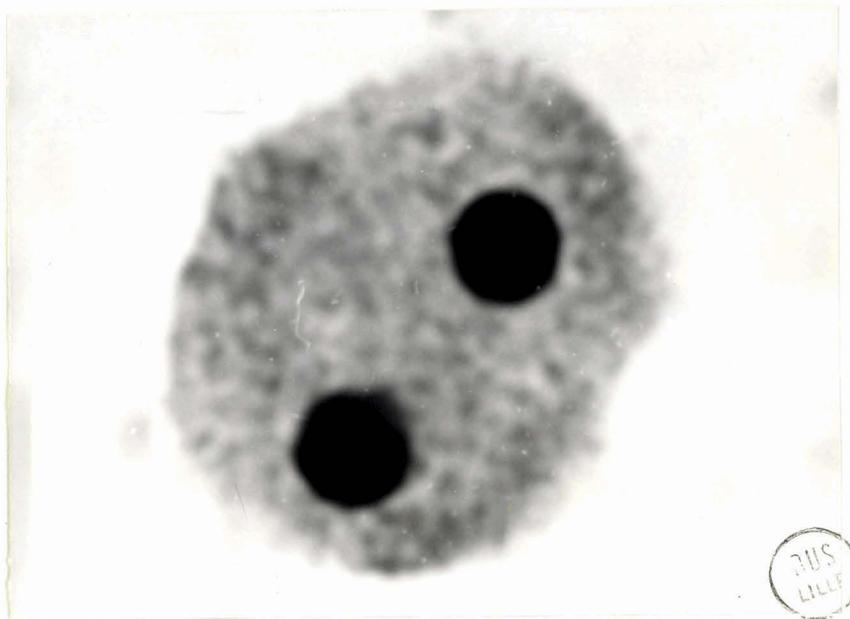
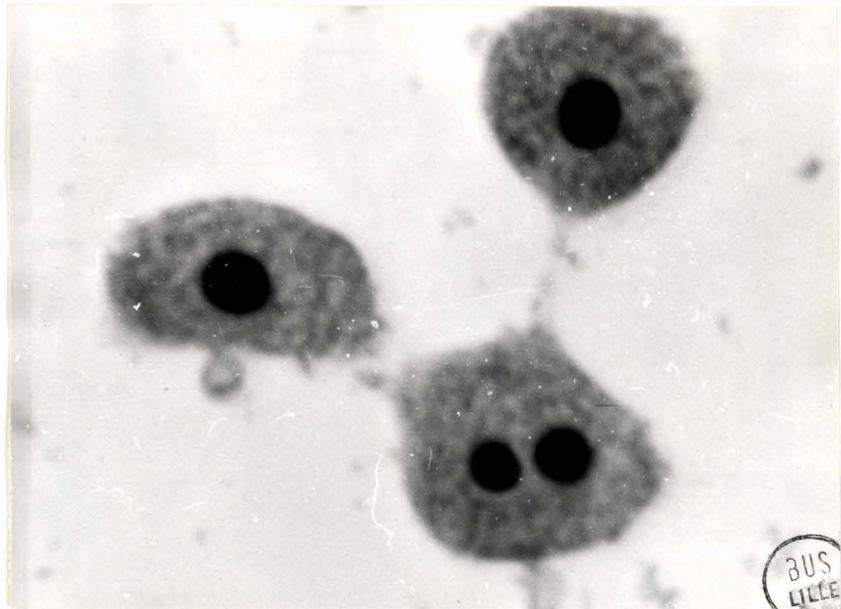


Figure 24

Aspect morphologique au microscope électronique
SIEMENS ELMISKOP I d'un fragment de cytoplasme
d'une cellule isolée par la méthode au RINGER
citraté-hyaluronidase.

N = noyau dont on observera la
double membrane intacte

M = mitochondries

E = ergastoplasme



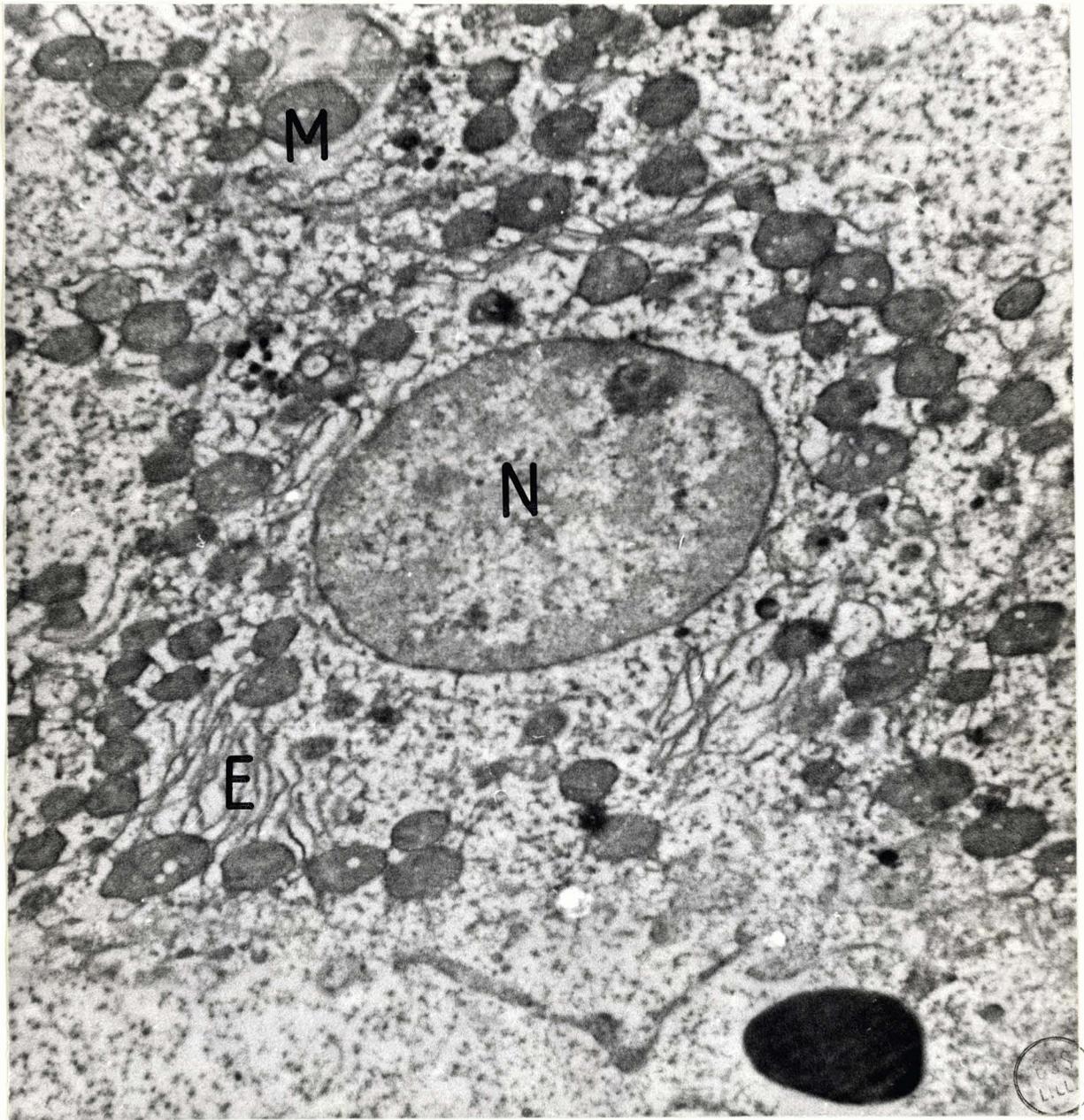
F i g u r e 25

Aspect morphologique au microscope électronique
PHILIPS EM 100 du tissu hépatique de Rat traité
par une solution de "RINGER citraté-hyaluronidase".

N = noyau

M = mitochondries dont on observera la
vacuolisation

E = ergastoplasme

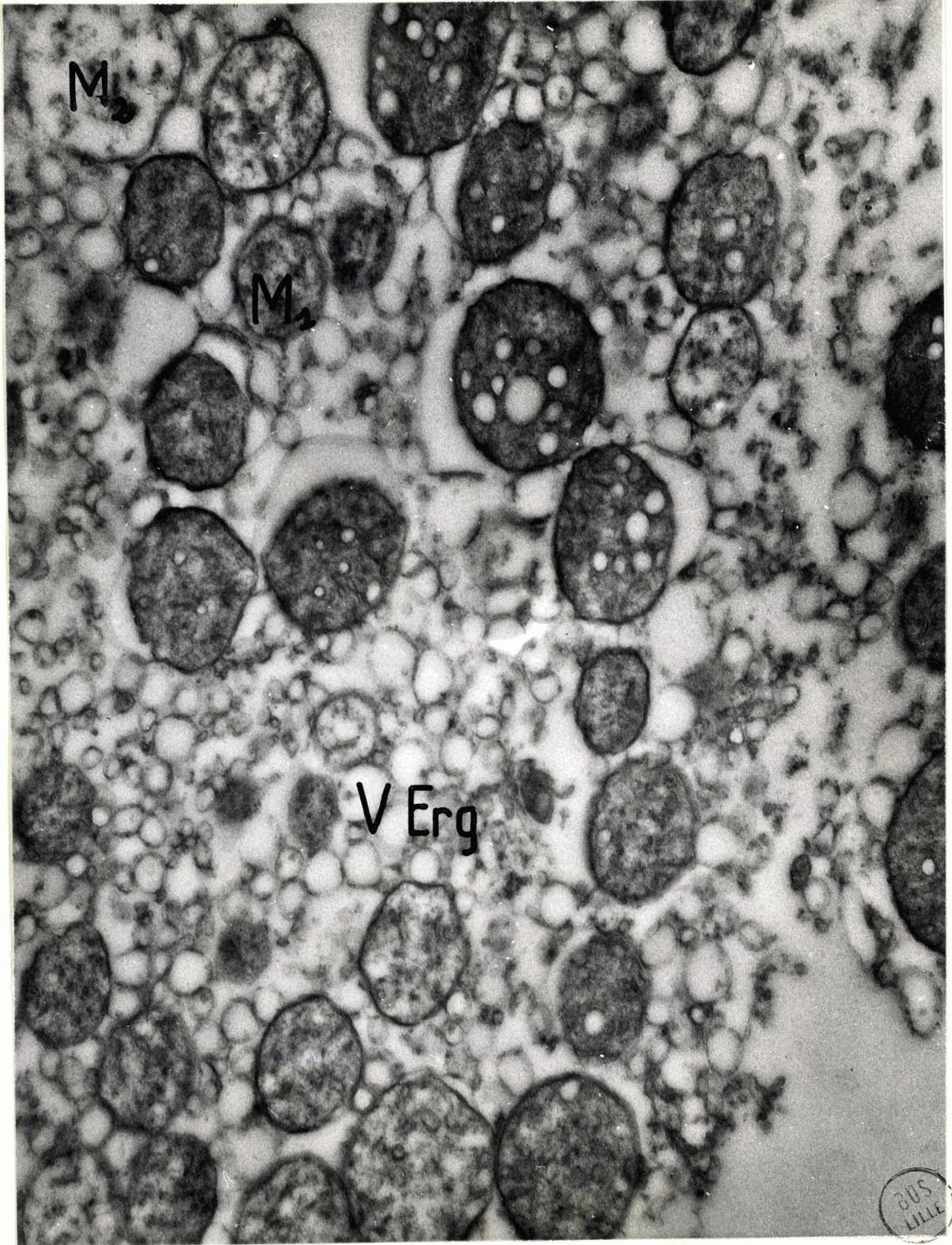


MS
L.L.L.

F i g u r e 26

Aspect morphologique au microscope électronique PHILIPS EM 100 de mitochondries d'une cellule du foie de Rat isolée par la méthode au "RINGER citraté-hyaluronidase" et maintenue pendant une heure en aérobiose ("carbogène") .

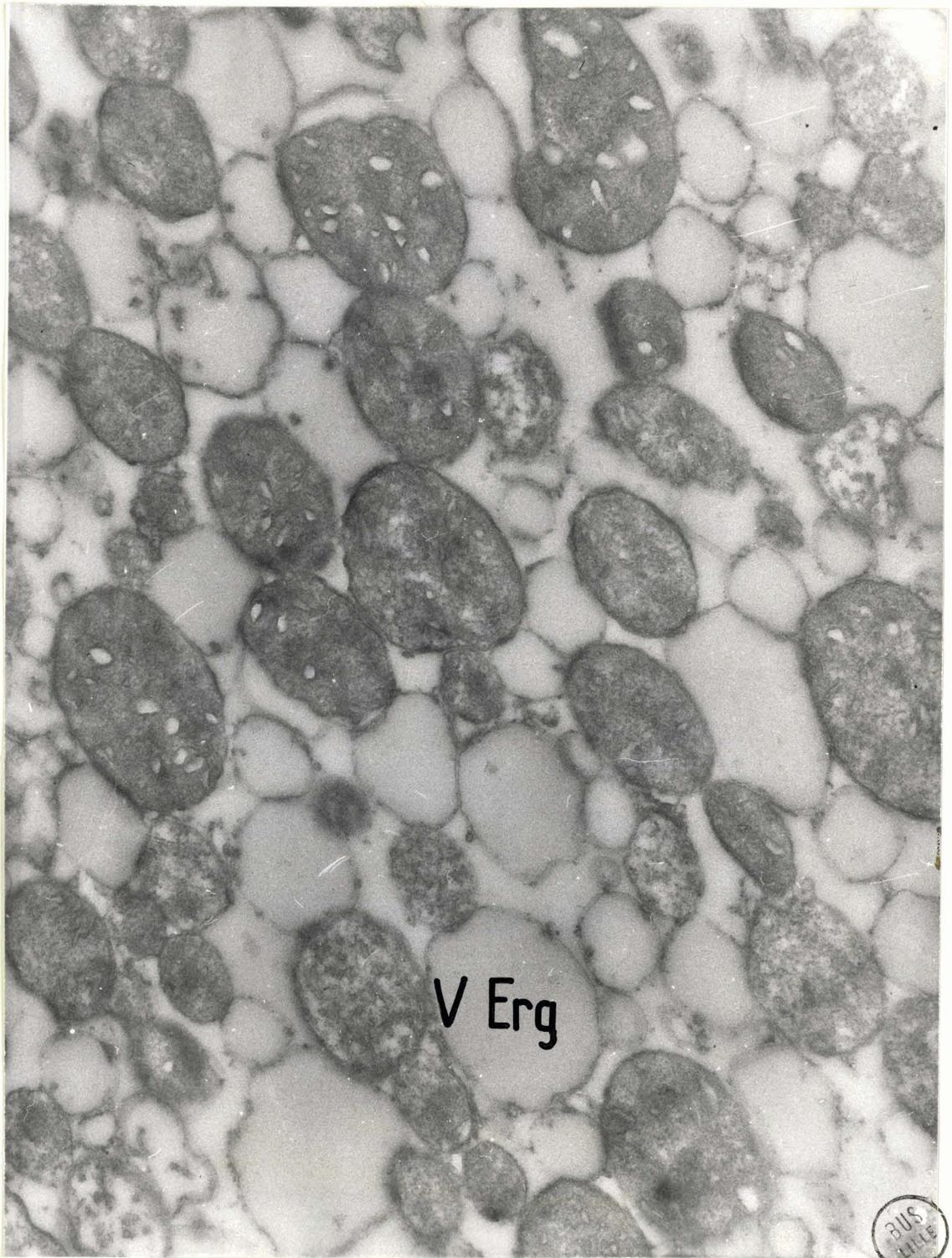
On observera que les mitochondries sont parfois intactes (M₁) , parfois très vacuolisées (M₂) et que les vésicules ergastoplasmiques (V. Erg.) ne sont pas exagérément gonflées



F i g u r e 27

Aspect morphologique au microscope électronique
SIEMENS ELMISKOP I de mitochondries d'une cellule
du foie de Rat isolée dans une solution de
"RINGER citraté-hyaluronidase" additionnée d'ATP
(adénosine triphosphate) .

La morphologie des mitochondries est voisine de
celle des cellules des figures 24 et 26, mais les
vésicules ergastoplasmiques (V.Erg.) sont considé-
rablement gonflées.



V Erg

BUS
11/12

CONCLUSIONS CONCERNANT LES OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

La dissociation du tissu hépatique dans des conditions plus "physiologiques" de composition saline et de pH représente un progrès très net sur la méthode de LONGMUIR et REES. La morphologie du noyau est préservée, mais on retrouve les mêmes types d'altérations que nous avons signalés à propos de la méthode de LONGMUIR et REES, mais avec une intensité beaucoup plus faible : gonflement et vacuolisation des mitochondries, gonflement des vésicules ergastoplasmiques.

Cette amélioration nette de la morphologie de la cellule devait avoir comme conséquence une reprise des activités métaboliques des cellules isolées.

2 - ETUDE BIOCHIMIQUE

L'activité respiratoire, en présence de succinate, est légèrement supérieure à celle des cellules préparées par la méthode de LONGMUIR et REES (figure 20 ; page 107). Cependant, le quotient respiratoire est plus élevé.

La composition nucléotidique des acides ribonucléiques est identique à celle du tissu frais (Tableau II ; page 108) et la biosynthèse des acides ribonucléiques, qui était abolie dans les cellules isolées par la méthode de LONGMUIR et REES, est effective : les cellules ont, en effet, conservé la propriété d'incorporer les radiophosphates dans leurs acides nucléiques (Tableau III ; page 109) .

3 - ETUDE BIOLOGIQUE

ETUDE DE LA VIABILITE DES CELLULES EN CULTURE

Ensemencées dans les conditions décrites à la page 97, les cellules du foie de Rat isolées par la "méthode au RINGER citraté-hyaluronidase" survivent difficilement et pendant quelques jours seulement.

C - CONCLUSIONS GÉNÉRALES CONCERNANT LA
"MÉTHODE AU RINGER CITRATE-HYALURONIDASE"

Des recherches que nous avons effectuées sur les cellules libérées du foie de Rat par notre méthode personnelle au "RINGER citraté-hyaluronidase", nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1°) - La méthode fournit rapidement des quantités élevées de cellules pures. Elle répond donc aux critères techniques que nous avons définis plus haut (page 88) .

2°) - L'observation microscopique des cellules isolées révèlent des lésions des inclusions cytoplasmiques essentiellement localisées au niveau des mitochondries et de l'ergastoplasme qui sont plus ou moins gonflés et vacuolisés. Cependant, ces lésions sont beaucoup plus discrètes que dans le cas des cellules isolées par la méthode de LONGMUIR et REES.

3°) - L'amélioration de la morphologie des cellules s'accompagne d'une reprise d'activités métaboliques fondamentales comme la biosynthèse des acides ribonucléiques. Nous démontrons ainsi que la préservation des structures cellulaires est indispensable au maintien de la vie de la cellule et qu'il existe un parallélisme étroit entre l'intégrité morphologique d'une part et l'intégrité biochimique et biologique, d'autre part.

4°) - La composition du milieu de dissociation est déterminante pour maintenir l'intégrité des cellules. C'est pourquoi, nous avons remplacé, dans des expériences ultérieures, le milieu minéral par du sérum de veau ou de boeuf, milieu plus biologique que les solutions salines, ce qui nous a amené à mettre au point de nouvelles méthodes de dissociation dont nous nous proposons, à présent, de décrire le mode opératoire et les résultats auxquels elle nous ont conduit.

II - METHODES DE DISSOCIATION DES TISSUS DANS LE SERUM

Nous avons mis au point deux méthodes de dissociation des tissus dans du sérum. Dans l'une, le milieu de dissociation est du sérum citraté et nous l'appellerons : "Méthode au sérum citraté". Dans l'autre, nous utilisons le sérum citraté additionné d'adénosine triphosphate (ATP) et d'un sel de manganèse et nous l'appellerons : "Méthode au sérum citraté - ATP - Manganèse".

I- METHODE AU SERUM CITRATE

A - MODE OPERATOIRE

Le mode opératoire que nous appliquons est identique à celui que nous avons décrit à propos de la "méthode au RINGER citraté" (p. 116). La seule modification concerne la composition du milieu de dissociation qui est constitué de sérum de Boeuf additionné de citrate trisodique pour obtenir une concentration finale 0,029 M. Le milieu est stérilisé par filtration sur bougie de CHAMBERLAND. L'addition de hyaluronidase n'augmente pas notablement le rendement.

Le temps de préparation n'excède pas 90 minutes. Le rendement en cellules est supérieur à celui que fournissent les autres méthodes : 1,3 à $1,4 \times 10^7$ cellules par gramme de foie frais, soit 50 p.100 environ du rendement théorique.

B - RESULTATS CONCERNANT L'ETUDE DE L'INTEGRITE DES CELLULES OBTENUES PAR LA "METHODE AU SERUM CITRATE

1 - ETUDE MORPHOLOGIQUE

a - Observations au microscope photonique

Le microscope photonique montre que les cellules sont parfaitement dissociées (figure 28 a) et qu'il ne subsiste que de très rares amas cellulaires

dont le nombre n'excède pas 1 pour 1000 cellules. La proportion de noyaux libres est du même ordre.

Les cellules ont gardé leurs contours polyédriques. La membrane paraît intacte et le contenu cellulaire est homogène (figure 28 b).

b - Observations au microscope électronique

Les membranes cellulaires sont généralement bien visibles sur le pourtour des cellules. Elles présentent toutefois des degrés d'intégrité variable. Elles sont tantôt intactes, tantôt partiellement rompues (figure 29).

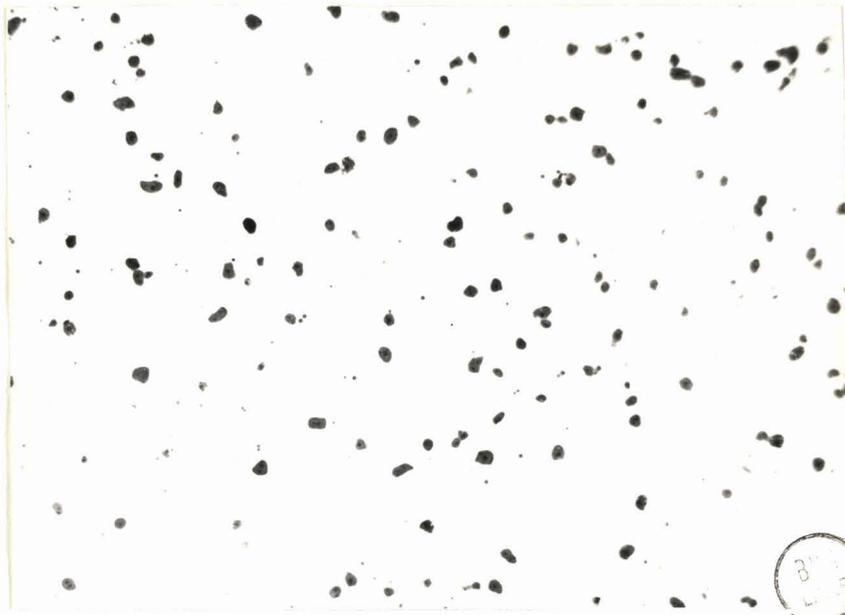
Les noyaux sont profondément altérés (figures 29 et 30). La chromatine, en effet, est condensée par endroits, faisant apparaître des zones vides. Les nucléoles ont disparu.

Les mitochondries sont intactes et présentent un chondrioplasme uniformément dense dans lequel les crêtes internes se dessinent parfaitement. Elles sont, cependant, légèrement gonflées (figures 29 et 30).

Le cytoplasme présente un aspect sensiblement normal, avec des vésicules ergastoplasmiques à peine gonflées. On ne trouve cependant que très peu de cellules dans lesquelles l'ergastoplasme reste visible.

Nous avons vérifié que les altérations du noyau sont réversibles et qu'elles sont dues à une "asphyxie" de la cellule pendant la période d'isolement qui s'effectue en phase anaérobie. En effet, quand les cellules sont maintenues pendant une heure en présence d'oxygène (carbogène) et de succinate, les noyaux retrouvent leur morphologie normale (figure 31). Cette réanimation de la cellule est très spectaculaire et montre qu'il existe une relation étroite entre la morphologie et le fonctionnement de la cellule.

Nous avons observé un phénomène analogue à propos de l'ergastoplasme dont la disparition peut, elle aussi, s'expliquer par l'apparition de troubles métaboliques au cours de l'isolement des cellules. En effet, si le temps de préparation est diminué (aux dépens du rendement), l'ergastoplasme subsiste. Sa vacuolisation est donc une fonction du temps. A l'inverse des noyaux, elle est irréversible car l'oxygénation des cellules ne le régénère pas.



Micrograph showing numerous small, dark, irregularly shaped particles scattered across a light background.

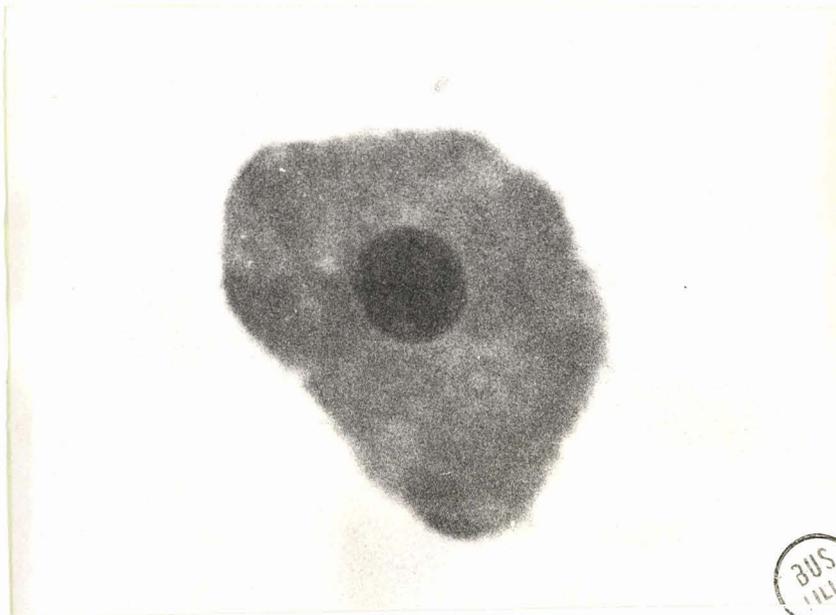


Figure 29

Aspect au microscope électronique SIEMENS -
ELMISKOP I de cellules libérées du foie de
Rat par la "méthode au sérum citraté" .

Memb. = membrane cellulaire

N = noyau

M = mitochondries

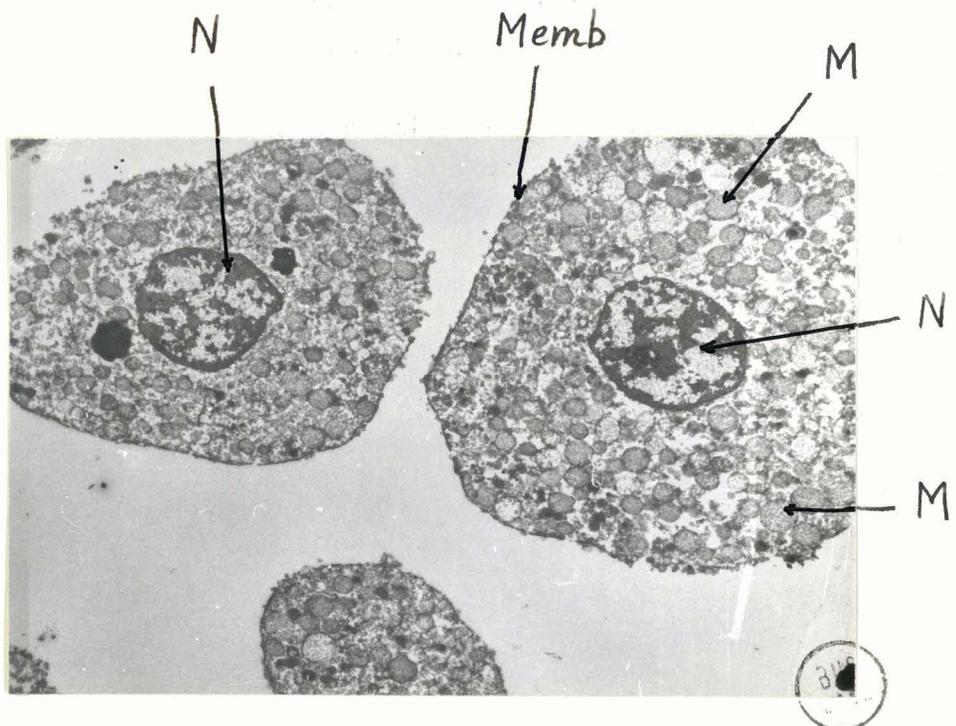


Figure 30

Aspect au microscope électronique PHILIPS EM 100
d'une portion de cellule du foie de Rat isolée
par la "méthode au sérum citraté".

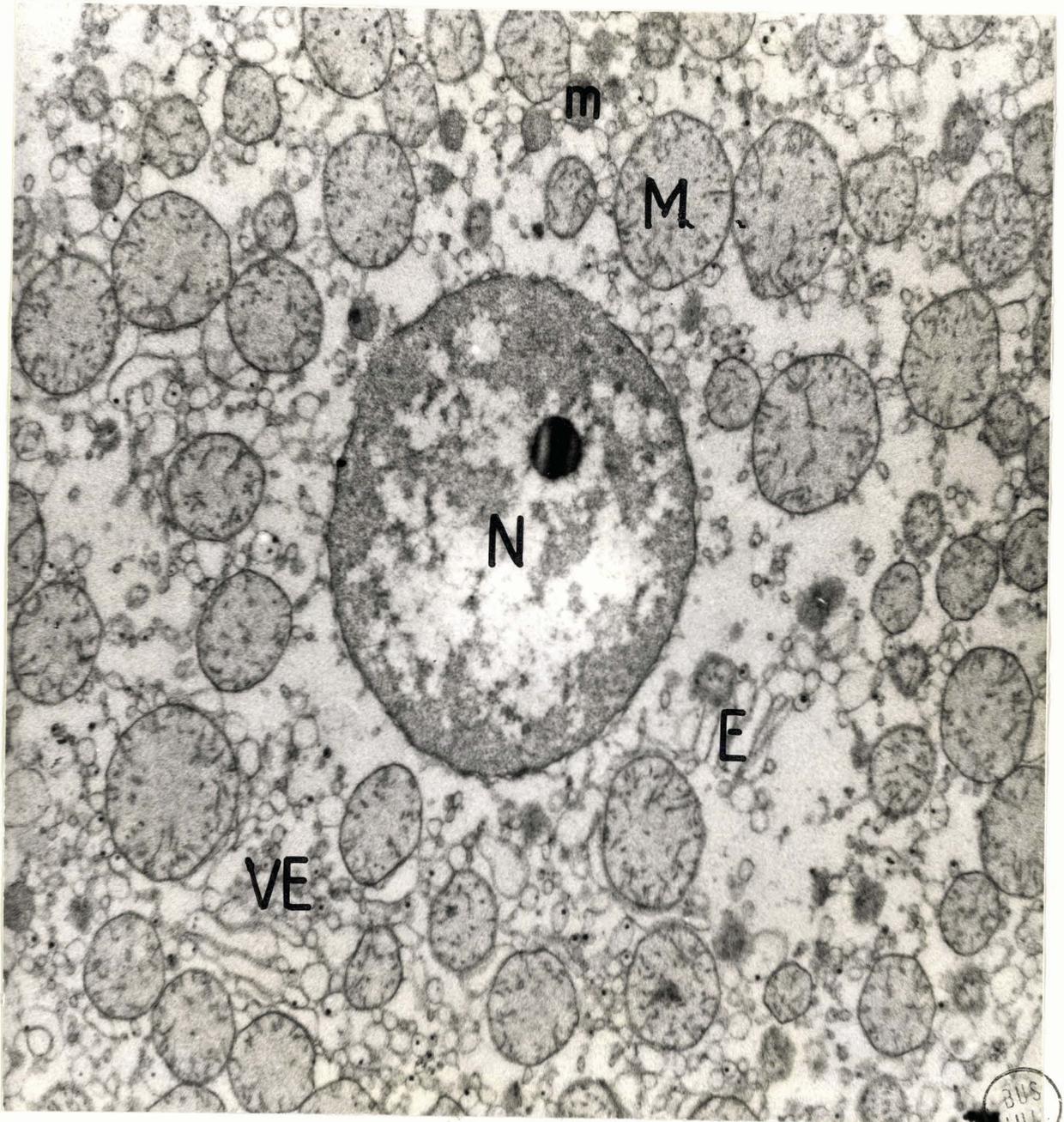
N : noyau. On remarquera la condensation de la
chromatine.

M : mitochondries.

m : microbodies.

E : restes d'ergastoplasme.

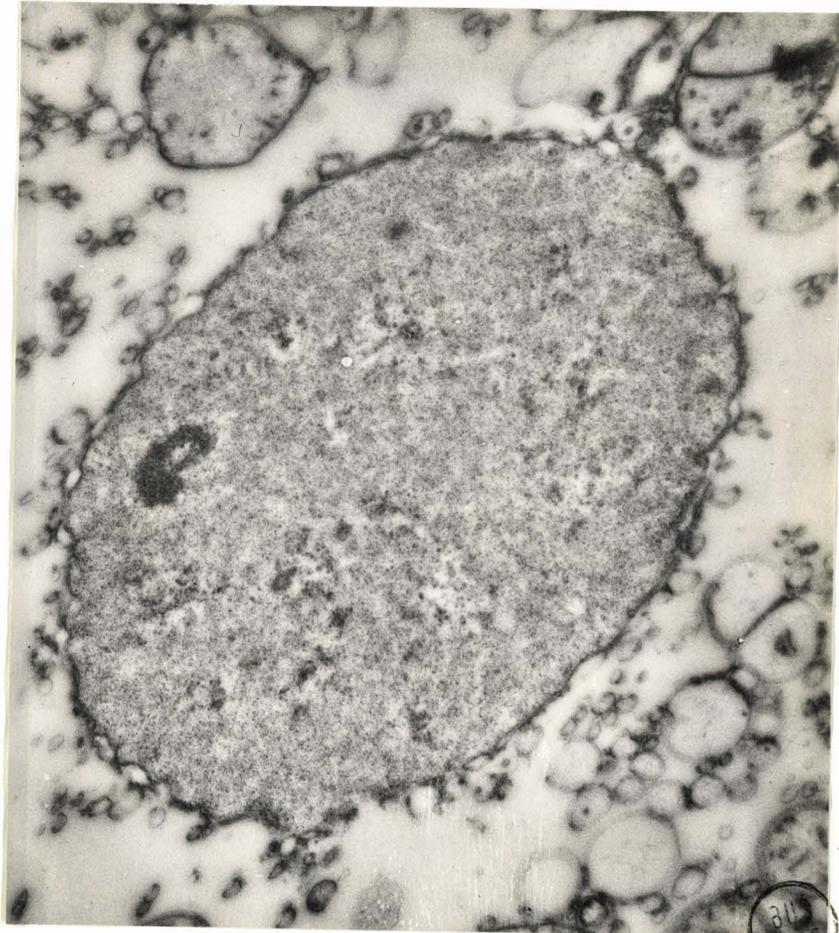
V.E : vésicules ergastoplasmiques.



BUS
LILL

F i g u r e 31

Aspect au microscope électronique SIEMENS-ELMISKOP I d'une cellule de foie de Rat isolée par la "méthode au sérum citraté", puis incubée pendant une heure en aérobiose ("carbogène"). Les mitochondries et le cytoplasme montrent de profondes altérations, mais le noyau a repris son aspect normal, avec sa chromatine uniformément répartie dans le nucléoplasme.



F i g u r e 28 a

Aspect au microscope photonique d'une suspension de cellules libérées du foie de Rat par la "méthode au sérum citraté". On observera que la dissociation est parfaite et qu'il ne subsiste pas d'amas cellulaires.

F i g u r e 28 b

Aspect au microscope photonique (objectif à immersion) de cellules de foie de Rat isolées par la "méthode au sérum citraté". Les contours des cellules sont polyédriques et le cytoplasme ne présente aucune trace de vacuolisation. On comparera avec l'aspect morphologique des cellules obtenues par la méthode de LONGMUIR et REES (figure 15 ; p. 100) et par la méthode au RINGER citraté-hyaluronidase (figure 23 ; p. 118) .

CONCLUSIONS CONCERNANT LES OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

Le morphologie des cellules du foie de Rat isolées par la "méthode au sérum citraté" marque un progrès très net de la technique par rapport au procédé de LONGMUIR et REES et à la méthode au "RINGER citraté-hyaluronidase". L'aspect des cellules n'est cependant pas encore normal. Le noyau est très altéré, montrant une chromatine agglutinée en plaques, mais cette modification est réversible et l'aspect classique réapparaît dès que le métabolisme cellulaire reprend. L'ergastoplasme est généralement absent et les vésicules ergastoplasmiques sont légèrement gonflées. Seule, la structure des mitochondries est conservée : le chondrioplasme est dense et les crêtes internes sont bien visibles. Cependant, un léger gonflement de la mitochondrie se manifeste.

L'amélioration de la morphologie des cellules isolées par la "méthode au sérum citraté" a comme conséquence une augmentation de l'activité métabolique par rapport aux cellules isolées par la méthode de LONGMUIR et REES et par la "méthode au RINGER citraté-hyaluronidase".

2 - ETUDE BIOCHIMIQUE

L'activité respiratoire, en présence de succinate, reste du même ordre que celle des cellules préparées par les deux méthodes précédentes (figure 20 ; p. 107). Cependant, le quotient respiratoire est plus élevé et la respiration endogène plus intense.

La composition nucléotidique des acides ribonucléiques est identique à celle du tissu frais (Tableau II ; p. 108) et la biosynthèse des acides ribonucléiques est très active puisqu'elle atteint des valeurs de 60.000 coups/minute par milligramme de phosphore nucléotidique (tableau ; p. 109) .

3 - ETUDE BIOLOGIQUE.

ETUDE DE LA VIABILITE DES CELLULES EN CULTURE.

Ensemencées dans les conditions décrites à la page 97, les cellules du foie de Rat isolées par la "méthode au sérum citraté" survivent de 10 jours à 6 semaines suivant les préparations .

C - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA
"METHODE AU SERUM CITRATE"

La dissociation du foie de Rat dans le sérum citraté conduit à l'isolement de cellules dont la morphologie, sans toutefois être parfaite, est cependant meilleure que celle des cellules isolées par la méthode de LONGMUIR et REES et par la "méthode au RINGER citraté-hyaluronidase". Les mitochondries, en particulier, sont toutes pratiquement normales, montrant seulement un léger gonflement.

L'amélioration de l'aspect des cellules se traduit immédiatement par une augmentation de l'activité métabolique des cellules par rapport aux cellules isolées par les deux procédés précédents. En outre, les cellules sont vivantes et sont capables de survivre pendant de nombreux jours dans des milieux nutritifs.

Ces résultats étaient donc des arguments supplémentaires en faveur de notre hypothèse de travail selon laquelle il existe une relation étroite entre la morphologie de la cellule et son activité métabolique. C'est pourquoi, à la suite des travaux de LEHNINGER (265) et de CHAPPEL, GREVILLE et BICKNELL (266) concernant l'influence d'ions divers sur le gonflement des mitochondries (mesurés spectrophotométriquement), nous avons étudié l'action sur les structures cellulaires de différents ions comme les ions Mg^{++} et Mn^{++} . Nous avons constaté que leur addition au milieu de dissociation n'améliorait nullement la morphologie. Mais, LEHNINGER (267) ayant observé que l'addition d'ATP et d'ions Mn^{++} au milieu d'incubation de tissus augmentait l'activité respiratoire de ces derniers, nous avons pensé qu'il s'agissait peut-être là d'une action protectrice sur les structures cytoplasmiques du mélange ATP- Mn^{++} . En effet, ni l'ATP seul, ni les ions Mn^{++} seuls n'améliorent la morphologie des cellules isolées. Or utilisés seuls, ils n'augmentent pas significativement l'activité respiratoire des tissus. C'est pourquoi nous avons ajouté de l'ATP et des sels de manganèse au sérum citraté dans l'espoir d'observer une amélioration de la morphologie et de l'activité métabolique des cellules isolées. Les résultats que nous avons obtenus ont entièrement confirmé notre hypothèse.

II - METHODE AU SERUM CITRATE-ATP-Mn⁺⁺

A - MODE OPERATOIRE

Voir aussi page 137 .

Le mode opératoire est identique au précédent (voir p. 125) à la différence près que le sérum, - 0,029 M en citrate trisodique - , est additionné d'adénosine triphosphate (ATP) et de chlorure manganéux à une concentration finale de 1 mM pour chacun des deux composés. 7,5 unités de hyaluronidase sont, en outre, ajoutées par millilitre de sérum.

Le temps de préparation des cellules est de l'ordre de 90 minutes et le rendement est identique à celui que fournit la "méthode au sérum citraté": 1,3 à $1,4 \times 10^7$ cellules par gramme de foie frais.

B - RESULTATS CONCERNANT L'ETUDE DE L'INTEGRITE DES CELLULES OBTENUES PAR LA "METHODE AU SERUM CITRATE-ATP-Mn⁺⁺"

1 - ETUDE MORPHOLOGIQUE

a - Observations au microscope photonique

Les caractéristiques des suspensions de cellules isolées par la "méthode au sérum citraté-ATP-Mn⁺⁺" sont identiques à celles que nous avons décrites à propos des cellules isolées par la "méthode au sérum citraté" (voir p. 125) .

b - Observations au microscope électronique

L'observation au microscope électronique montre que l'aspect morphologique des cellules est normal (figures 32 et 33).

Le noyau est absolument intact. La chromatine est uniformément diffuse dans le nucléoplasme. Le nucléole est parfaitement visible (figure 32) et la double membrane ne présente aucune rupture ni déformation (figures 32 et 33) .

Figure 32

Aspect au microscope électronique PHILIPS ER 100
d'une cellule isolée du foie de Rat par la
"méthode au sérum citraté-ATP-Mn⁺⁺" .

N = noyau

n = nucléole

M = mitochondrie

m = microbodies

E = ergastoplasme

VE = vésicules ergastoplasmiques

On comparera la morphologie de cette cellule avec
celle de la cellule in situ (figure 1 a ; p. 8)

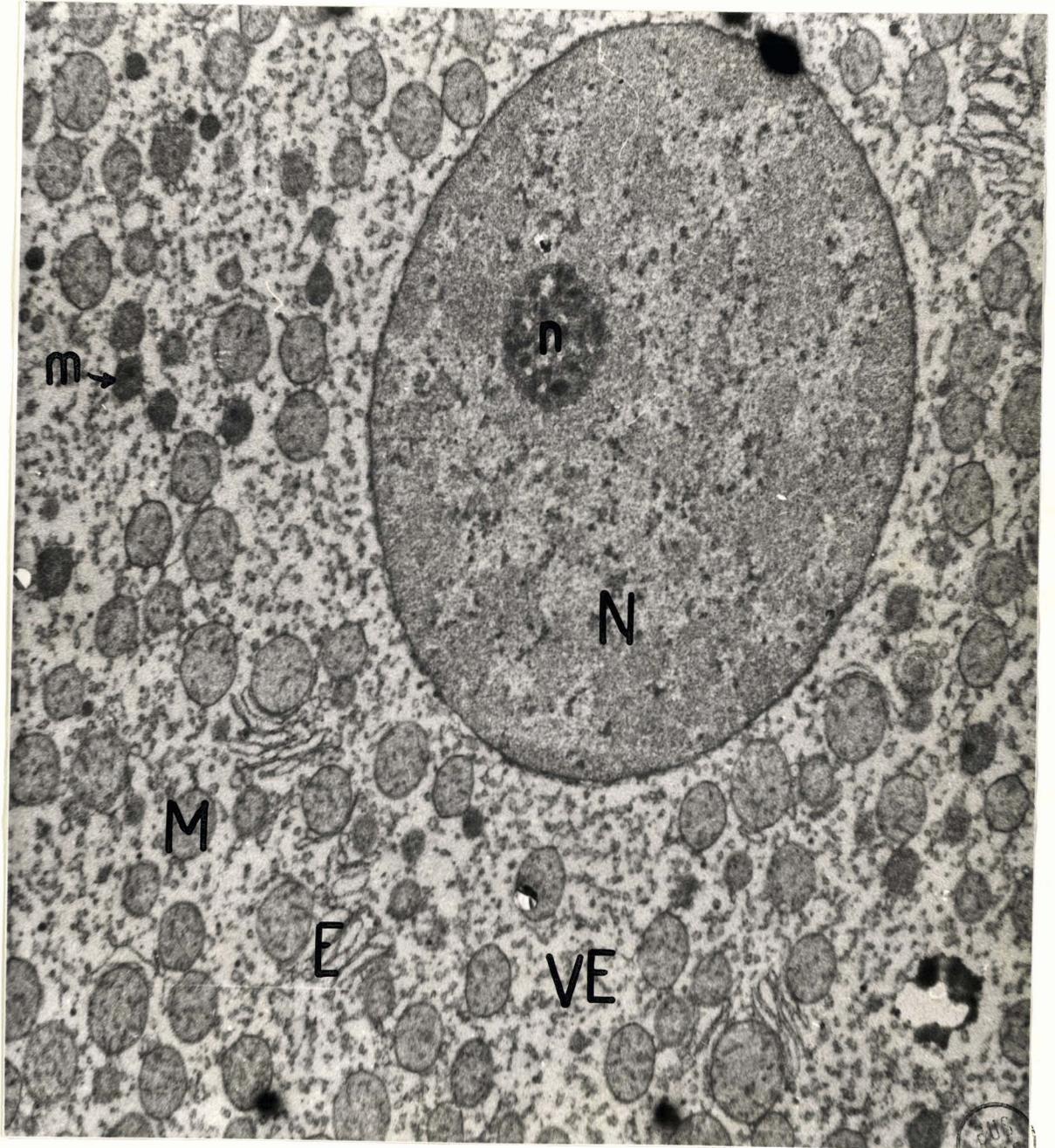


Figure 33

Aspect au microscope électronique SIEMENS-ELMISKOP I
d'une cellule de foie de Rat isolée par la "méthode
au sérum citraté-ATP-Mn⁺⁺" .

N = noyau

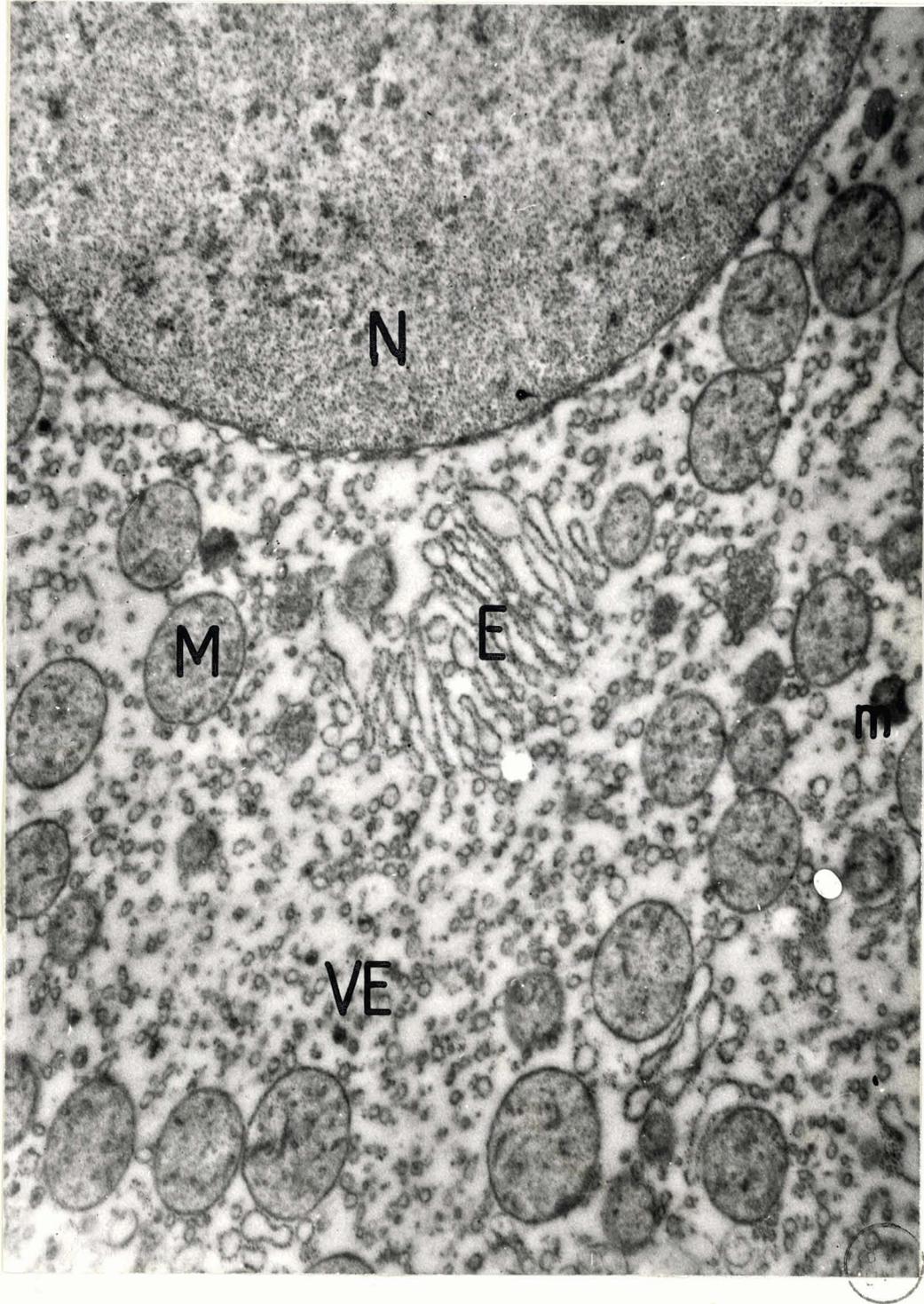
M = mitochondries

m = microbodies

E = ergastoplasme avec ses grains de
PALADE

VE = vésicules ergastoplasmiques

208



Les mitochondries sont toutes morphologiquement intactes et nullement gonflées. Le chondrioplasme est dense et les crêtes internes sont nettement dessinées.

L'ergastoplasme est préservé (figure 32) avec des grains de PALADE bien visibles (figure 33) et les vésicules ergastoplasmiques ne présentent aucun phénomène de gonflement.

CONCLUSIONS CONCERNANT LES OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

La méthode de dissociation du foie de Rat dans du sérum citraté additionné d'ATP et de sels de manganèse permet d'obtenir des cellules libres dont la morphologie est identique à celle de la cellule in situ.

2 - ETUDE BIOCHIMIQUE

L'activité respiratoire des cellules isolées par la méthode au sérum citraté-ATP-Mn⁺⁺ est supérieure à celle des cellules isolées par les procédés que nous avons décrits précédemment (figure 20 ; p. 107) .

La composition nucléotidique des acides ribonucléiques est identique à celle des acides ribonucléiques du tissu total (Tableau II, p.108) et l'activité des échanges des radiophosphates minéraux est très élevée (80.000 coups / minute environ par milligramme de phosphore nucléotidique) .

3 - ETUDE BIOLOGIQUE.

ETUDE DE LA VIABILITE DES CELLULES EN CULTURE .

Ensemencées dans les conditions décrites à la page 97, les cellules du foie de Rat isolées par la "méthode au sérum citraté-ATP-Mn⁺⁺" se maintiennent en survie pendant des temps variant de 10 jours à 6 semaines suivant les préparations . Il ne nous a pas été possible de préciser sans ambiguïté si les cellules possédaient une activité mitotique car nous n'avons saisi aucune figure de mitose par l'observation microscopique d'étalements effectués à partir des suspensions de cellules en culture ou par la microcinématographie.

C - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA
"METHODE AU SERUM CITRATE-ATP-Mn⁺⁺"

La méthode de dissociation du foie de Rat dans du sérum citraté, additionné d'ATP et de sels manganoux (et de hyaluronidase, bien que le rôle bénéfique de cet enzyme ne soit nullement démontré) fournit rapidement des cellules vivantes, morphologiquement intactes et métaboliquement actives. Ce procédé original répond donc entièrement aux conditions et aux critères que nous avons énoncés plus haut (p.88 et 89 ; p. 91 et suivantes) .

C'est pourquoi, nous avons fixé notre choix sur cette méthode dont le protocole expérimental est schématisé dans la figure 34 (page 137)

D - TENTATIVES DE GENERALISATION DE LA METHODE

Nous avons appliqué notre méthode personnelle à la dissociation de divers tissus : rein, rate, pancréas et tumeurs expérimentales du Rat (chloroleucémie T₅₈, hépatome au jaune de beurre et sarcome polymorphe provoqué par injection de Bleu de Trypan).

A partir du sarcome au bleu de trypan, nous avons obtenu une suspension de cellules avec un rendement extrêmement faible, une proportion importante de cellules éclatant durant la dissociation. Au contraire, les organes très différenciés, comme le rein, se sont opposés jusqu'à présent à toute dissociation par cette méthode. Cette difficulté de généraliser la méthode semble être due à la complexité des tissus. L'application de notre méthode se limite donc, pour l'instant, aux seuls tissus parenchymateux homogènes comme le foie.

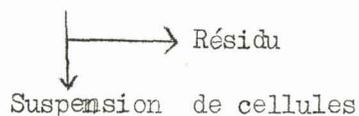
Il semble, a priori, que notre méthode ne soit pas susceptible d'application générale à tous les tissus et qu'elle devra être modifiée ou remplacée par d'autres procédés. Nous avons, par exemple, observé que la trypsine, à la concentration de 1 p.1000, dissociait des tissus différenciés comme le rein, le pancréas, la rate et des tumeurs cancéreuses comme le sarcome au Bleu de Trypan. Les rendements restent, cependant, faibles et nous ignorons encore si les cellules ainsi obtenues répondront aux critères d'intégrité que nous exigeons d'elles.

- Un foie de Rat est plongé dans du sérum de Boeuf maintenu à 37°C et découpé par petites portions avec une lame de rasoir en fragments de quelques mm^3 .
- Plusieurs lavages sont effectués par décantation dans du sérum.



Fragments débarrassés des inclusions cytoplasmiques provenant des cellules rompues par la lame de rasoir .

- Incubation, pendant 1 h. à 37°C, sous agitation lente, dans 40 ml de sérum de Boeuf, (30 mM en citrate trisodique, 1 mM en ATP et 1 mM en MnCl_2 et additionnés de 7,5 unités / ml de hyaluronidase testiculaire) .
- Dissociation du tissu par aspirations et refoulements successifs à l'aide d'une pipette épointée (*).
- Filtration sur gaze chirurgicale (4 épaisseurs)



- Le résidu est de nouveau dissocié dans une faible quantité de sérum citraté-ATP- Mn^{++} . La suspension est filtrée et une nouvelle dissociation est effectuée sur le résidu .
- Les suspensions cellulaires sont réunies et centrifugées pendant 5 min à 150 g



- Le sédiment est lavé 4 à 5 fois avec le milieu de dissociation et centrifugé chaque fois pendant 5 min à 50 g .

F i g u r e 34

Protocole expérimental de la dissociation du tissu hépatique dans le "sérum citraté-ATP- Mn^{++} "

(*) - La dissociation peut aussi être effectuée à l'aide d'un homogénéisateur "Ultra-turrax", type TP 18/2 (1 à 2 secondes d'homogénéisation) .

APPLICATIONS BIOCHIMIQUES

Les applications de la méthode de dissociation des tissus sont très nombreuses et les travaux que nous avons effectués sur la biochimie des cellules isolées et dont nous nous proposons d'exposer, à présent, les résultats, servent d'introduction à un vaste programme de recherches dont nous tracerons les grandes lignes en guise de conclusion.

Notre étude biochimique sur les hépatocytes isolés a essentiellement porté sur les processus métaboliques suivants :

- 1°- La respiration cellulaire
- 2°- Le métabolisme des acides nucléiques
- 3°- Le métabolisme des protéines.

L'importance de ces trois séries de réactions métaboliques nous paraissait, en effet, fondamentale pour la poursuite de nos travaux. Au cours des contrôles de l'intégrité biochimique des cellules libres, nous avons observé que certains substrats, comme l'acide succinique, étaient préférentiellement oxydés et que d'autres, comme le glucose, n'était nullement utilisés par la cellule. Il devenait donc indispensable d'effectuer une étude systématique des conditions d'oxydation de tous les métabolites intermédiaires qui jalonnent la voie du catabolisme du glucose afin de préciser si la non-utilisation de certains d'entre eux était due à une simple question de perméabilité sélective de la membrane cellulaire ou à la disparition de systèmes enzymatiques au cours des opérations d'isolement des cellules. En outre, il convenait de préciser la nature du substrat le plus "énergétique" dont l'addition aux milieux d'incubation exalterait le plus la synthèse, par la cellule, de composés comme les acides nucléiques ou les protéines.

Quant à nos recherches sur les acides nucléiques et sur les protéines, elles sont amplement justifiées par le rôle déterminant que jouent ces substances dans la mitose et vraisemblablement dans l'évolution du processus cancéreux.

I - ETUDES SUR LA RESPIRATION DES CELLULES ISOLEES

Nous avons systématiquement étudié l'utilisation par la cellule, en phase aérobie, des constituants de la "chaîne d'EMBDEN-MEYERHOF" qui conduit du glycogène ou du glucose à l'acide pyruvique et des constituants du "cycle de KREBS", métabolites intermédiaires dans la dégradation de ce dernier composé. Nous avons schématisé dans les figures 35 et 36 (pages 140 et 141) les différentes étapes du catabolisme du glycogène et du glucose, sans tenir compte des réactions métaboliques annexes.

La détermination cinétique de la consommation d'oxygène a été effectuée à l'aide d'un appareil de WARBURG suivant les modalités que nous avons précisées à la page 93. Le coefficient respiratoire Q_{O_2} a été calculé pour chacun des substrats et exprimé en millilitres d'oxygène consommé par heure et par gramme de cellules fraîches ou par cellule.

UTILISATION PAR LES CELLULES LIBRES DU GLUCOSE ET DES CONSTITUANTS DE LA CHAINE D'EMBDEN-MEYERHOF ET DU CYCLE DE KREBS

A - UTILISATION DU GLUCOSE

La figure 37 (page 142) illustre les résultats que nous avons obtenus au cours de notre étude comparative de l'utilisation du glucose par des coupes et des homogénats de tissu hépatique et par des cellules isolées. On voit que, à concentrations de glucose égales, la consommation d'oxygène par le tissu entier est supérieure à celle de l'homogénat, elle-même supérieure à celle des cellules isolées dont l'activité respiratoire est, d'ailleurs, pratiquement nulle et qui semblent donc, a priori, incapables d'utiliser le glucose comme substrat d'oxydation.

Cependant, quatre hypothèses peuvent être invoquées pour expliquer ce résultat :

- 1 - Le glucose serait consommé par voie anaérobie.
- 2 - Les cellules seraient plus sensibles que le tissu à l'effet inhibiteur du glucose vis-à-vis de la respiration (effet CRABTREE) .

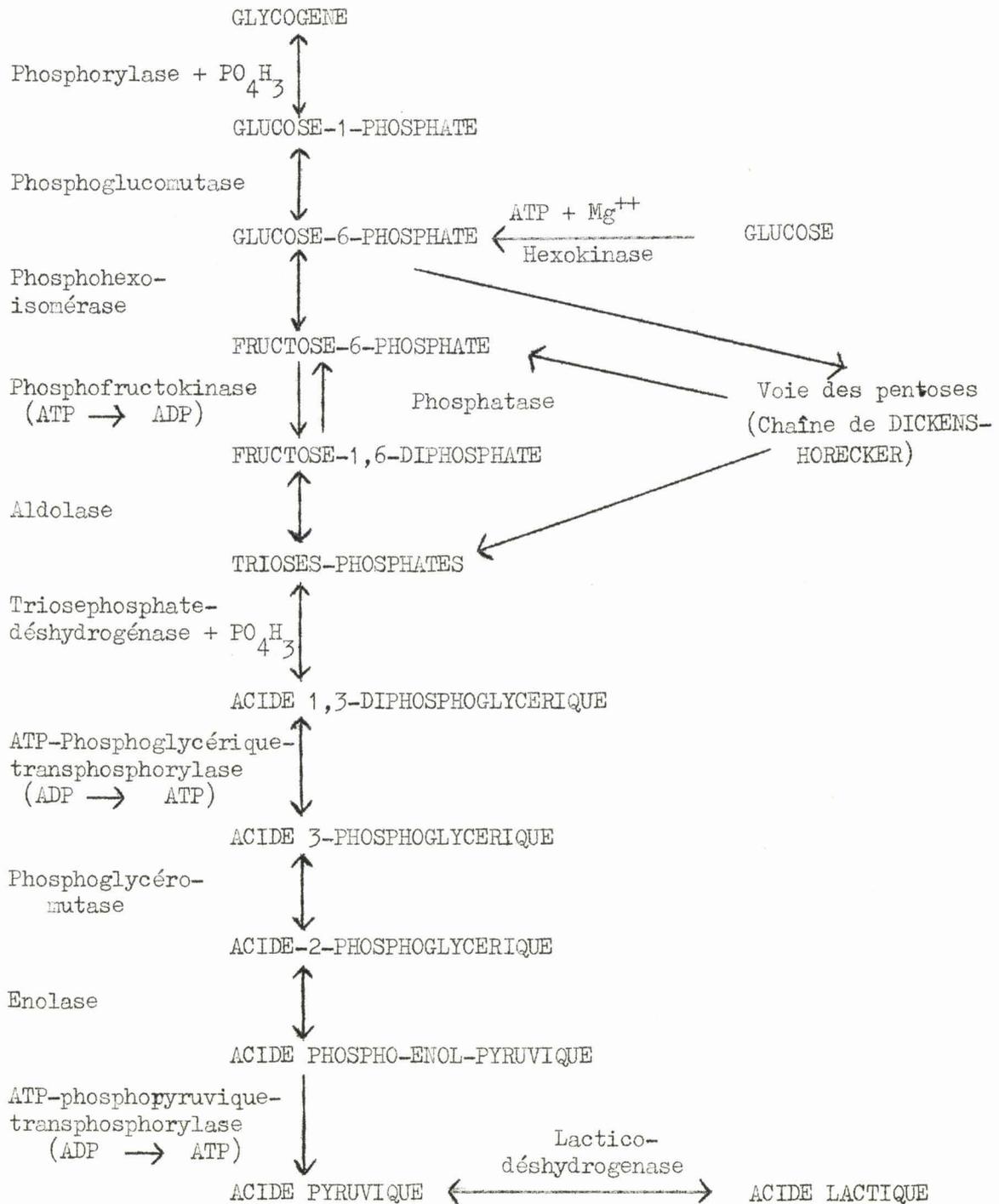


Figure 35

Principales étapes de la chaîne d'EMBDEN-MEYERHOF

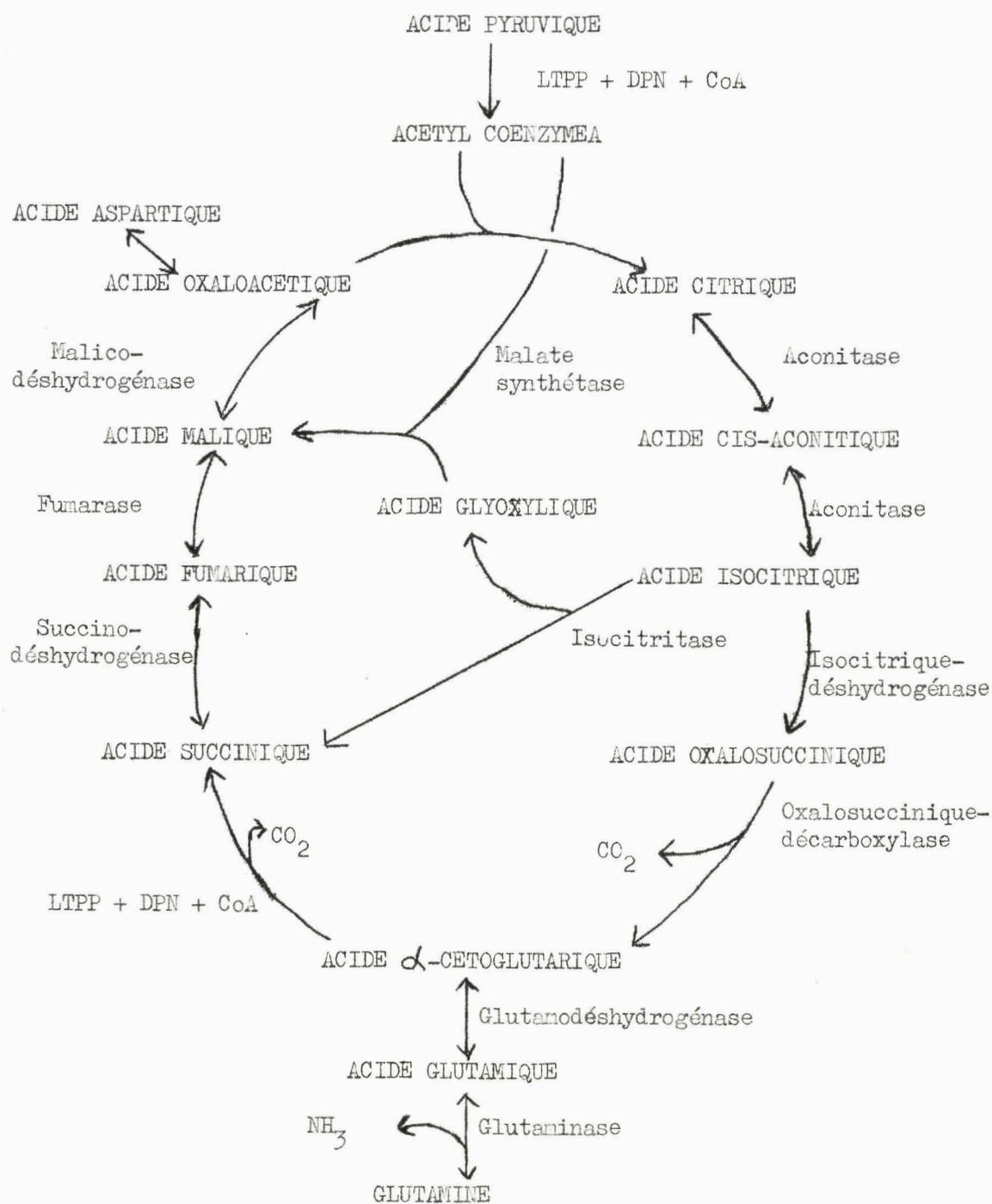


Figure 36

Schéma de fonctionnement du cycle de KREBS

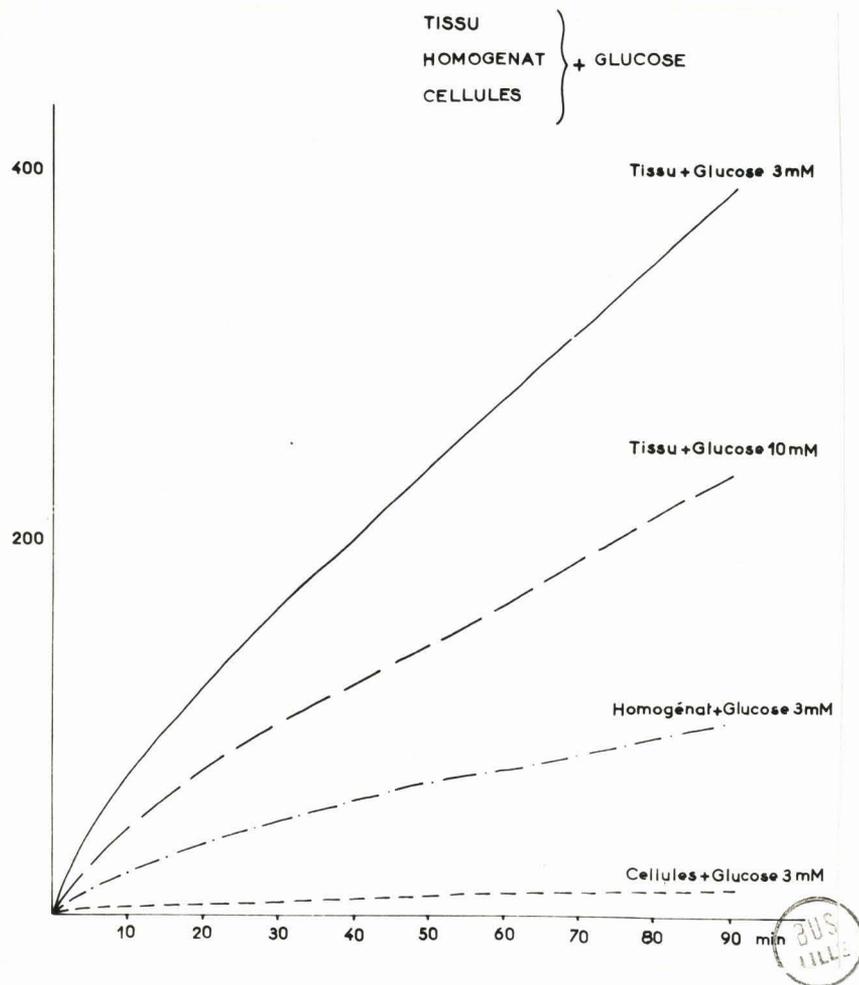


Figure 37

Courbes cinétiques de la consommation d'oxygène
(en microlitres p.100 mg)
de tissu, d'homogénat et de cellules libres de foie
de Rat incubés en présence de glucose

3 - Certains enzymes de la chaîne d'EMBDEN-MEYERHOF et du cycle de KREBS seraient inhibés ou détruits dans les cellules libres ce qui aurait pour effet de bloquer le fonctionnement de ces chaînes métaboliques.

4 - La membrane de la cellule serait imperméable au glucose qui ne pourrait la traverser qu'après avoir subi une phosphorylation.

Pour vérifier l'exactitude de l'une de ces hypothèses, nous avons effectué les expériences suivantes :

1°- INFIRMATION DE LA PREMIERE HYPOTHESE : ETUDE DE LA CONSOMMATION DU GLUCOSE

L'hypothèse d'une consommation du glucose par une voie anaérobie ne peut être retenue. En effet, nous avons dosé le glucose par la méthode colorimétrique à l'orcinol de TILLMANS et PHILIPPI (268) avant et après incubation en présence et en l'absence d'oxygène et vérifié que la concentration en glucose de la solution d'incubation n'avait pas varié dans l'un et l'autre cas.

Les hépatocytes libérés du foie de Rat sont donc bien incapables d'utiliser le glucose aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose.

2°- INFIRMATION DE LA SECONDE HYPOTHESE : ETUDE DE L'EFFET CRABTREE

La figure 37 (page 142) montre que dans le cas des coupes de tissu hépatique, l'effet CRABTREE se manifeste pour une concentration 10 mM en glucose de la solution d'incubation.

Nous avons fait décroître progressivement de 10 mM à 0,1 mM la concentration en glucose des milieux d'incubation des cellules libres sans observer d'augmentation de l'activité de la respiration qui reste voisine de la "respiration endogène" (*).

L'absence d'activité respiratoire des cellules libres du foie de Rat en présence de glucose n'est donc pas due à l'"effet CRABTREE".

3°- INFIRMATION DE LA TROISIEME HYPOTHESE : UTILISATION DES HEXOSES-PHOSPHATES

Nous démontrons plus loin (voir pages 146 à 152) que les constituants de la chaîne glycolytique d'EMBDEN-MEYERHOF et du cycle de KREBS sont utilisés, à des degrés variables, par les hépatocytes libres comme substrats d'oxydation. En

(*) On appelle "respiration endogène", la respiration des cellules en l'absence de tout substrat.

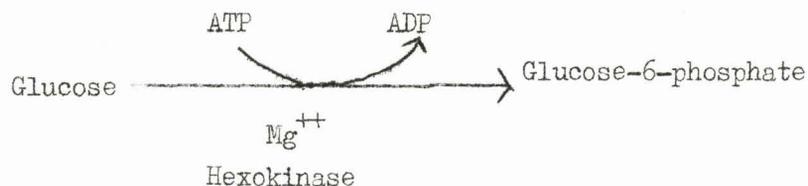
particulier, le glucose-1-phosphate, le glucose-6-phosphate et le fructose-1,6-diphosphate sont facilement oxydés (voir page 146). On observe, en effet, que les courbes cinétiques de l'oxydation de ces composés par les cellules libres sont très voisines de la courbe d'oxydation du glucose lui-même par des tranches de tissu hépatique.

Ce résultat permet de conclure que la non-utilisation du glucose par l'hépatocyte libéré du foie de Rat n'est pas provoquée par une "lésion biochimique" de la chaîne d'EMBDEN-MEYERHOF ou du cycle de KREBS puisque les hexoses-phosphates sont parfaitement utilisés et dégradés.

4°- QUATRIEME HYPOTHESE : UTILISATION DU GLUCOSE EN PRESENCE D'HEXOKINASE.

La non-utilisation du glucose par les hépatocytes libres paraissait donc liée à un phénomène d'imperméabilité sélective de la membrane de l'hépatocyte libre qui est, au contraire, parfaitement perméable aux hexose -phosphates .

Ce dernier résultat semblait confirmer l'hypothèse émise par de nombreux auteurs selon laquelle le glucose ne pénétrerait dans l'hépatocyte qu'après avoir subi une phosphorylation préalable en glucose-6-phosphate conformément au schéma suivant :



Selon certains auteurs, l'hexokinase serait un enzyme exocytoplasmique qui serait donc perdu au cours de la dissociation du tissu et du lavage des cellules. Nous pouvons donc poser en hypothèse que le glucose ne peut être utilisé par l'hépatocyte libre que dans la mesure où l'on a reconstitué le système exocellulaire tel qu'il existe dans l'organe entier : glucose + ATP + hexokinase.

C'est pourquoi, nous avons étudié la respiration des hépatocytes libres

- 1) en présence de glucose seul (concentration finale : 2 et 10 mM) ,
- 2) en présence de glucose + ATP (concentrations finales, respectivement, 2 et 10 mM),
- 3) en présence de glucose + ATP + hexokinase (concentrations finales, respectivement 10 mM, 2 mM et 1 ng p.ml) et
- 4) en présence de glucose + hexokinase (concentrations finales, respectivement, 10 mM et 1 ng p. ml) .

Nos résultats sont illustrés par la figure 38 (page 145) .

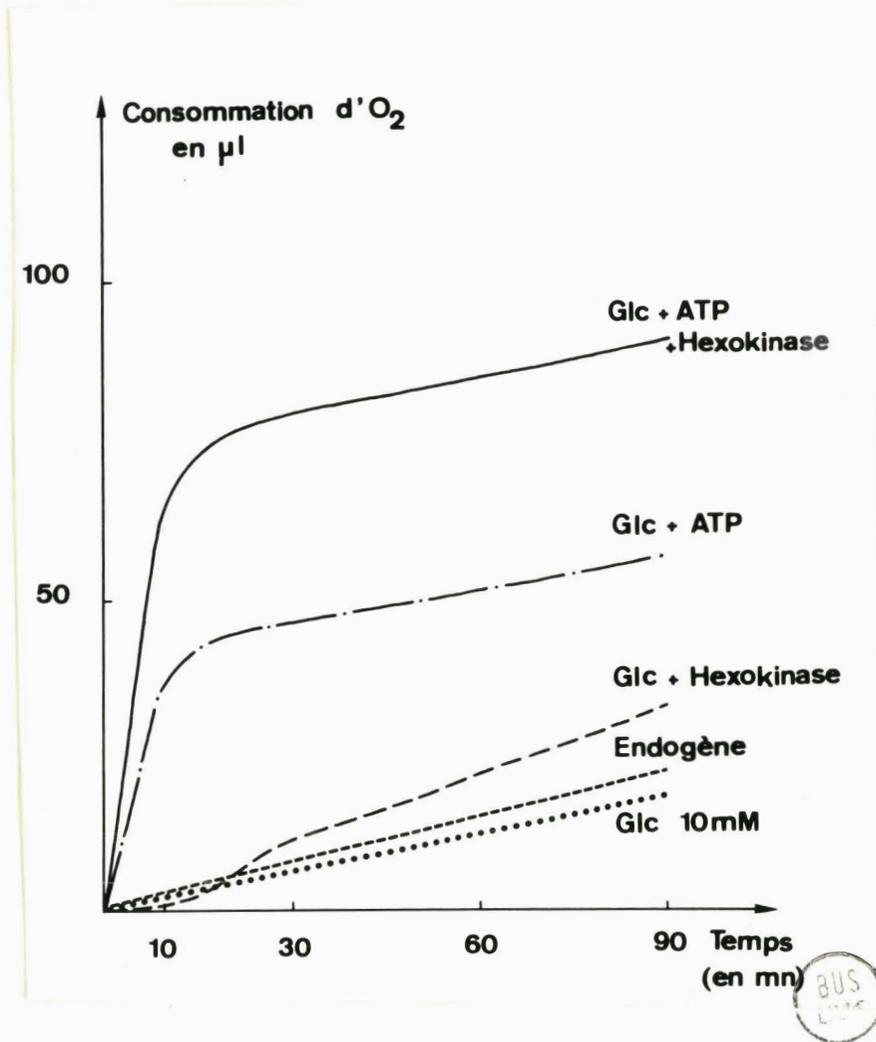


Figure 38

Courbes cinétiques de la consommation d'oxygène en présence de glucose (Glc) seul, de glucose + ATP, de glucose + hexokinase et de glucose + hexokinase + ATP

On voit que le tracé des courbes présente une anomalie dans le cas des incubations effectuées en présence de glucose + ATP et de glucose + ATP + hexokinase: en effet, la fraction de courbe correspondant au début de l'expérience présente une pente très accusée qui correspond à un phénomène classique de "contraction" dès la fin duquel, le tracé des courbes redevient normal et se superpose alors à la courbe correspondant au glucose seul.

Nous pouvons donc conclure que les hépatocytes libres sont incapables d'utiliser le glucose en phase aérobie même en présence d'ATP et d'hexokinase.

Pour tenter de résoudre cette énigme, nous avons fait incuber des homogénats d'hépatocytes, préalablement libérés, dans des solutions de glucose à des concentrations variables. Nous n'avons ^{pas} observé de consommation d'oxygène, alors que des homogénats de foie utilisent le glucose (figure 37 ; p.142).

Jusqu'à présent, il nous a été impossible d'expliquer l'absence de respiration chez les cellules maintenues en présence de glucose seul.

B - UTILISATION DES CONSTITUANTS DE LA CHAÎNE D'EMBDEN-MEYERHOF ET DU CYCLE DE KREBS

Nous avons rassemblé dans le tableau IV et illustré par les figures 39 et 40 les résultats que nous avons obtenus dans nos études cinétiques de la consommation d'oxygène par les hépatocytes libres. Nous pouvons tirer les observations et conclusions suivantes .

1 - Les substrats peuvent être classés en quatre groupes :

a - substrats non utilisés

glucose
acide pyruvique
acide citrique
acide α -cétoglutarique
acide fumarique
acide malique

b - substrats faiblement utilisés

acide L - glutamique
acide oxalo-acétique
acide L - aspartique

TABLEAU IV

Activité respiratoire des hépatocytes libres
en présence de divers substrats

S U B S T R A T S	CONCENTRATION FINALE	Q_{O_2}	
		p.g de cellules (*)	p. cellule. (**)
<u>CHAINE D'EMBDEN-MEYERHOF</u>			
D-Glucose	3 mM	0,05	5
D-Glucose-1-phosphate	3 mM	0,53	55,20
D-Glucose-6-phosphate	3 mM	0,49	51
D-Fructose-1,6-diphosphate	3 mM	0,30	31,20
Phospho-énol-pyruvate	5 mM	0,17	17,70
	10 mM	0,35	36,40
Pyruvate	5 et 10 mM	0,015	1,56
Pyruvate + CoA	5 et 10 mM	0,015	1,56
<u>CYCLE DE KREBS</u>			
Citrate	5 mM	0,01	1,50
α -cétoglutarate	10 mM	0 à 0,11	0 à 11,40
L- Glutamate	5 mM	0,12	12,50
	10 mM	1 ^o heure: 0,18 2 ^o heure: 0,52	17,70 54,10
L-Glutamine	10 mM	0,14	14,70
Succinate	20 mM	1,56(***)	160,40
	40 mM	2,66(***)	277,10
Fumarate	10 mM	0	0
Malate	10 mM	0,03	3,12
Oxalo-acétate	10 mM	0 à 0,15	0 à 17,7
L-Aspartate	10 mM	0,12	12,50
		puis 0,42(****)	puis 43,90
L-Asparagine	10 mM	0,12	12,50

(*) en ml d'oxygène consommé par heure

(**) en ml $\times 10^{-10}$ d'oxygène consommé par heure

(***) la première demi-heure

(****) 0,12 pendant la première demi-heure,
0,42 au-delà

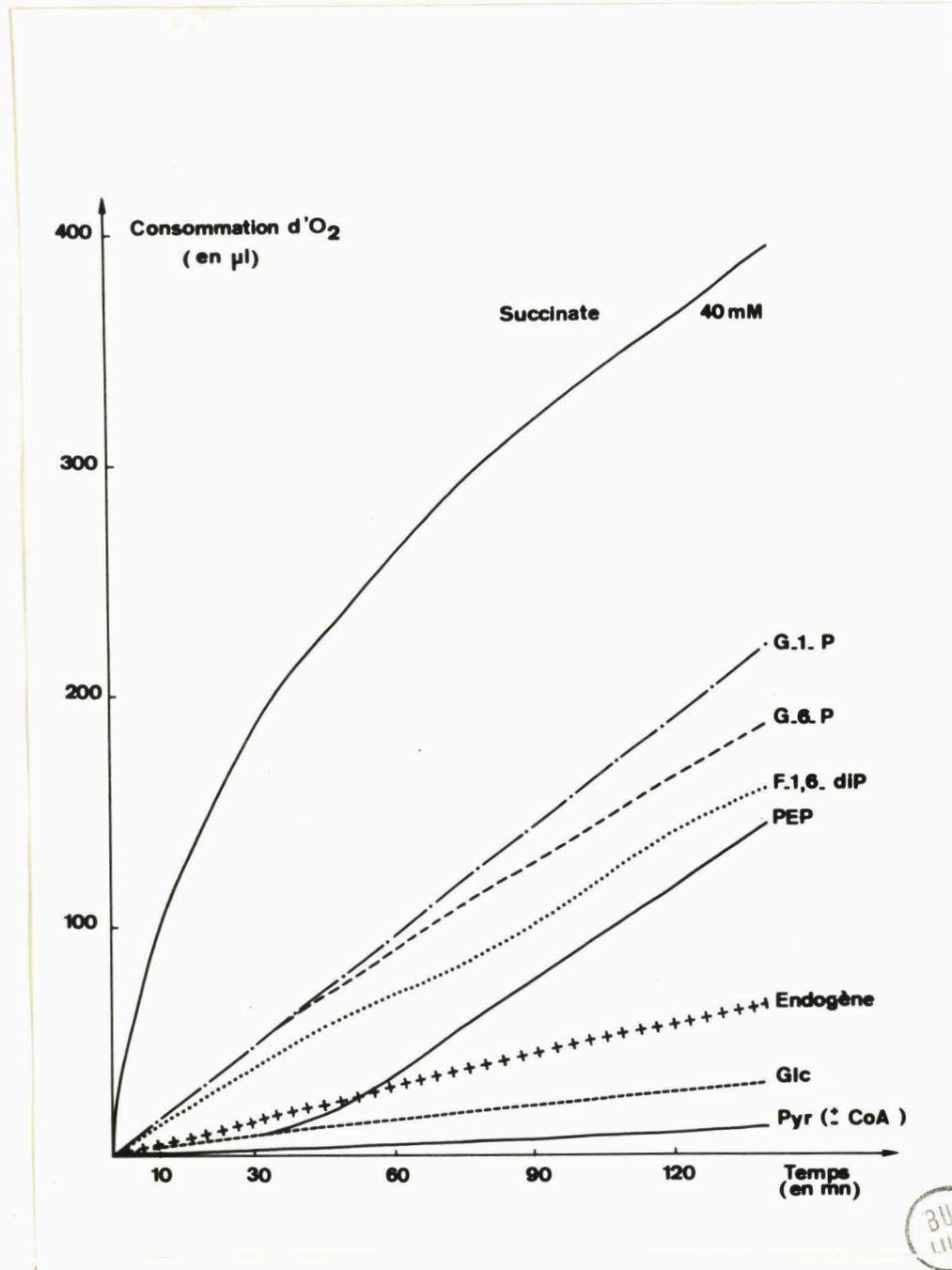


Figure 39

Courbes cinétiques de la consommation d'oxygène (en microlitres p. g de cellules libres de foie de Rat) en présence de substrats de la chaîne d'EMBDEN-MEYERHOF.

G-1-P = glucose-1-phosphate ; G-6-P = glucose-6-phosphate ;
 F-1,6-diP = fructose-1,6-diphosphate ; PEP = acide phospho-énol-pyruvique ;
 Glc = glucose ; Pyr = acide pyruvique

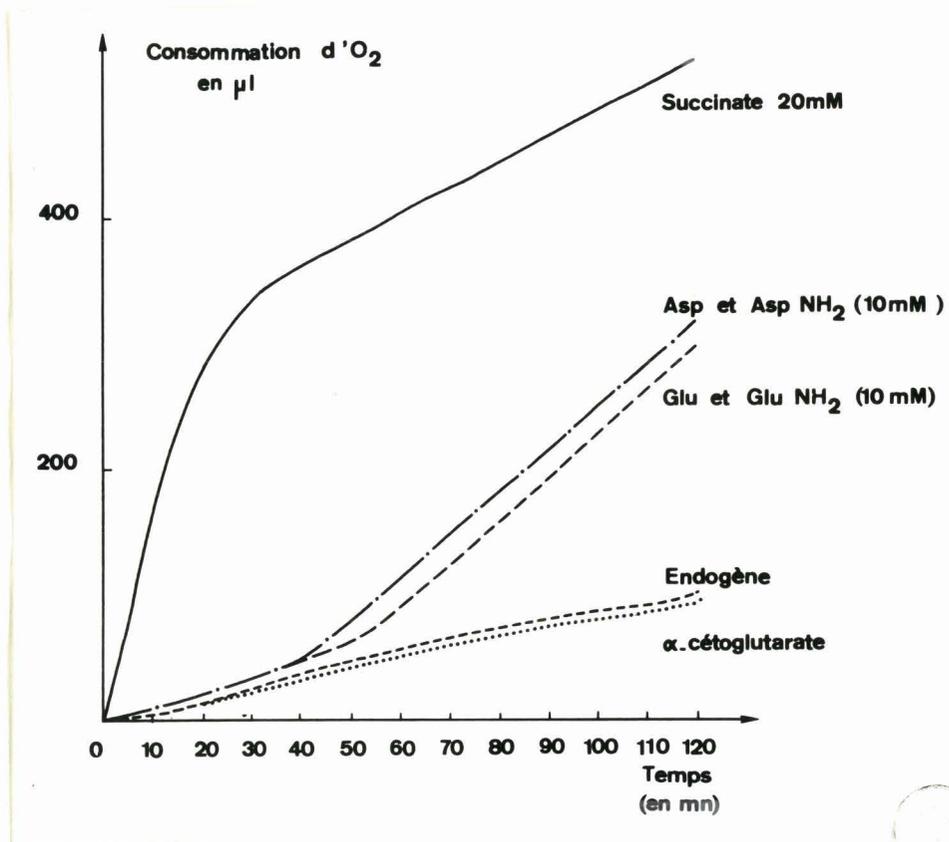


Figure 40

Courbes cinétiques de la consommation d'oxygène par les hépatocytes libres en présence de divers substrats du cycle de KREBS et de substrats "satellites".

Asp, AspNH₂ = respectivement acide aspartique et asparagine

Glu, GluNH₂ = respectivement acide glutamique et glutamine

c - substrats bien utilisés

glucose-1-phosphate

glucose-6-phosphate

fructose-1,6-diphosphate

acide phospho-énol-pyruvique

d - substrat utilisé "explosivement"

acide succinique

2 - La non-utilisation de certains substrats n'implique pas pour autant la disparition de systèmes enzymatiques. Nous pensons plutôt que l'oxydation de ces substrats est essentiellement liée à des phénomènes de perméabilité sélective de la membrane et les observations suivantes nous paraissent, à cet égard, démonstratives :

a - L'acide pyruvique n'est pas utilisé, même en présence de coenzyme A . Au contraire, son précurseur métabolique direct, l'acide phospho-énol-pyruvique, est très facilement oxydé.

Ce résultat peut s'expliquer par une diffusion aisée du dérivé phosphorylé (ce qui semble d'ailleurs être une règle générale) au travers de la membrane.

On ne peut toutefois éliminer l'éventualité d'une utilisation de l'acide phospho-énol-pyruvique par une des voies de WOOD et WERKMANN : en effet, l'acide phospho-énol-pyruvique peut emprunter deux voies cataboliques : celle de l'acide pyruvique (figure 35 ; p.140) et celle de l'acide oxaloacétique (figure 41) que la cellule peut parfaitement utiliser après sa pénétration sous la forme d'un précurseur, comme l'acide aspartique.

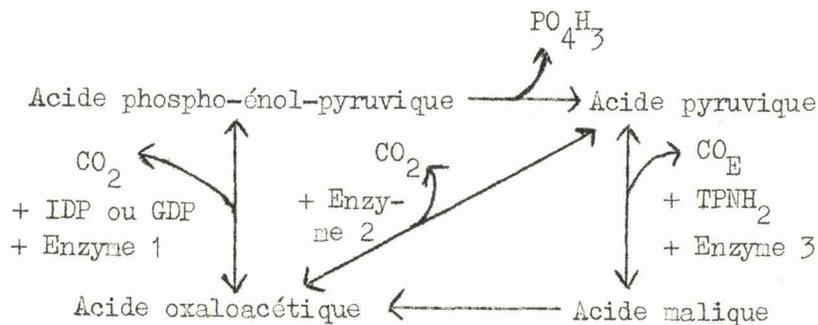


Figure 41

Métabolisme de l'acide phospho-énol-pyruvique

Enzyme 1 : Oxaloacétate synthétase ou phospho-énol-pyruvate carboxykinase

Enzyme 2 : Oxaloacétate carboxylase

Enzyme 3 : Enzyme malique

b - L'acide α -cétoglutarique est peu ou pas utilisé, mais l'acide glutamique est consommé. Or ce dernier est le précurseur direct du premier (figure 36;p.141) .

c - Les acides aspartique, glutamique et phospho-énol-pyruvique ne sont utilisés qu'après un certain temps de latence (voir les courbes des figures 39 et 40 ; p.148 et 149), ce qui explique pourquoi le coefficient respiratoire (exprimé en ml d'oxygène consommé par g de cellules) passe de la première à la deuxième heure de 0,18 à 0,52 pour l'acide glutamique et de 0,12 à 0,42 pour l'acide aspartique.

3 - Le problème de la non-utilisation de certains substrats est, en réalité, très complexe et ne doit vraisemblablement pas être rattaché à une simple question de perméabilité de membrane. Nous avons, en effet, observé que l'association de certains substrats non utilisés par la cellule provoquait une consommation d'oxygène très nette. Il nous est impossible d'entrer dans les détails d'expériences dont les résultats soulèvent de nombreux problèmes et posent autant d'énigmes et nous nous bornerons à donner, sans pouvoir les interpréter, les résultats caractéristiques suivants :

Après 100 minutes d'incubation, les coefficients respiratoires (en ml d'oxygène par g de cellules fraîches) de substrats simples ou combinés sont les suivants :

acide succinique	20 mM	:	1,7
acide fumarique	10 mM	:	0
acide malique	10 mM	:	0,08
acide pyruvique	10 mM	:	0
acide fumarique	10 mM	}	0,37
acide pyruvique	10 mM		
acide fumarique	10 mM	}	0,34
acide malique	10 mM		

En outre, l'acide α -cétoglutarique est parfaitement utilisé par le tissu hépatique. Il faudrait donc admettre l'existence de "facteurs de diffusion" au travers de la membrane, de "perméases" qui permettraient la pénétration des substrats dans la cellule.

5 - L'acide succinique est de loin le substrat le plus facilement et le plus rapidement oxydé par les hépatocytes libres pour lesquels il représente donc le substrat énergétique de choix pour la réalisation de synthèses. C'est pourquoi nous avons effectué une étude poussée des modalités de son utilisation par les cellules hépatiques libres.

C - RECHERCHES SUR LE METABOLISME DE L'ACIDE SUCCINIQUE PAR LES HEPATOCYTES LIBRES

1°- Influence de la concentration en succinate

Nous avons étudié la cinétique de la consommation de l'oxygène par les hépatocytes libres pour des concentrations d'acide succinique variant de 1 mM à 40 mM . Nos résultats sont illustrés par la figure 42 (p. 153) .

On voit 1) que, pour les concentrations utilisées, l'acide succinique n'exerce aucun effet inhibiteur, 2) que la consommation d'oxygène est une fonction de la concentration en acide succinique, 3) que l'utilisation de ce dernier est très rapide et que, dès qu'elle est totale, la pente de la courbe devient parallèle à celle de la respiration endogène, 4) que l'oxydation de l'acide succinique est plus rapide qu'avec le tissu lui-même (figure 44; p. 155), cette propriété s'expliquant aisément par une diffusion plus facile du composé par la totalité de la surface de la membrane des cellules dont chacune se trouve immédiatement en contact avec le milieu d'incubation.

2°- Influence des cations bivalents

De nombreux auteurs ont étudié, avec des résultats très variables, l'action sur les respirations des cations bivalents. Nous avons pu vérifier que les ions Ca^{++} , Mg^{++} et Mn^{++} n'ont pratiquement aucun effet sur la respiration des hépatocytes car l'emploi de milieux d'incubation dépourvus de Ca^{++} et de Mg^{++} ou additionnés de Mn^{++} ne modifie pas l'activité respiratoire (figure 43 ; p.154) .

3°- Influence de l'ATP et de l'ADP

L'ATP exerce une action inhibitrice sur l'oxydation de l'acide succinique qui est proportionnelle à sa concentration (figure 44; p.155), tandis que le mélange ADP + acide phosphorique ne modifie pas le coefficient respiratoire des cellules.

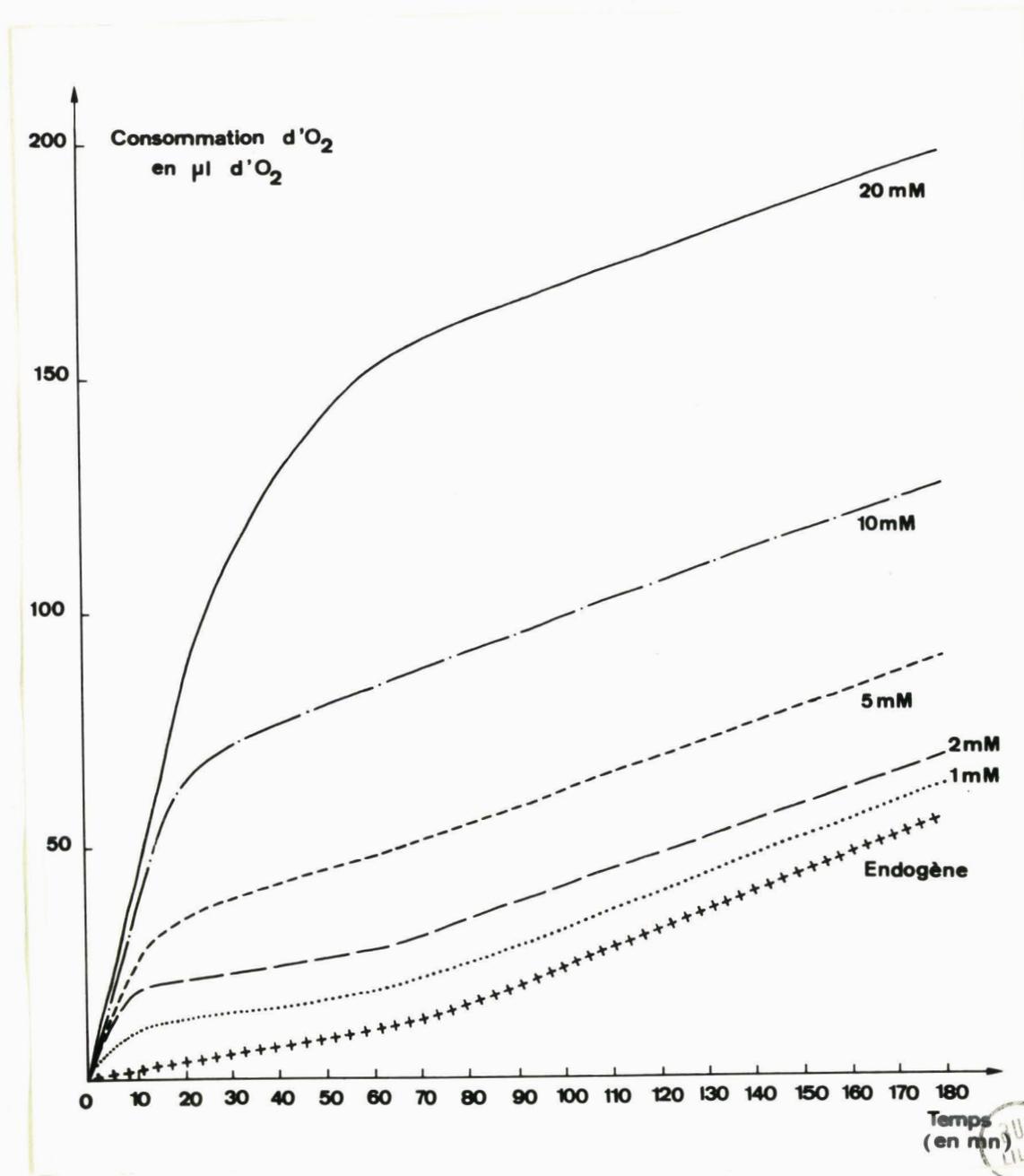


Figure 42

Consommation de l'oxygène (en ml p.100 ng de cellules)
par les hépatocytes libres en fonction de la concentration du
milieu d'incubation en acide succinique

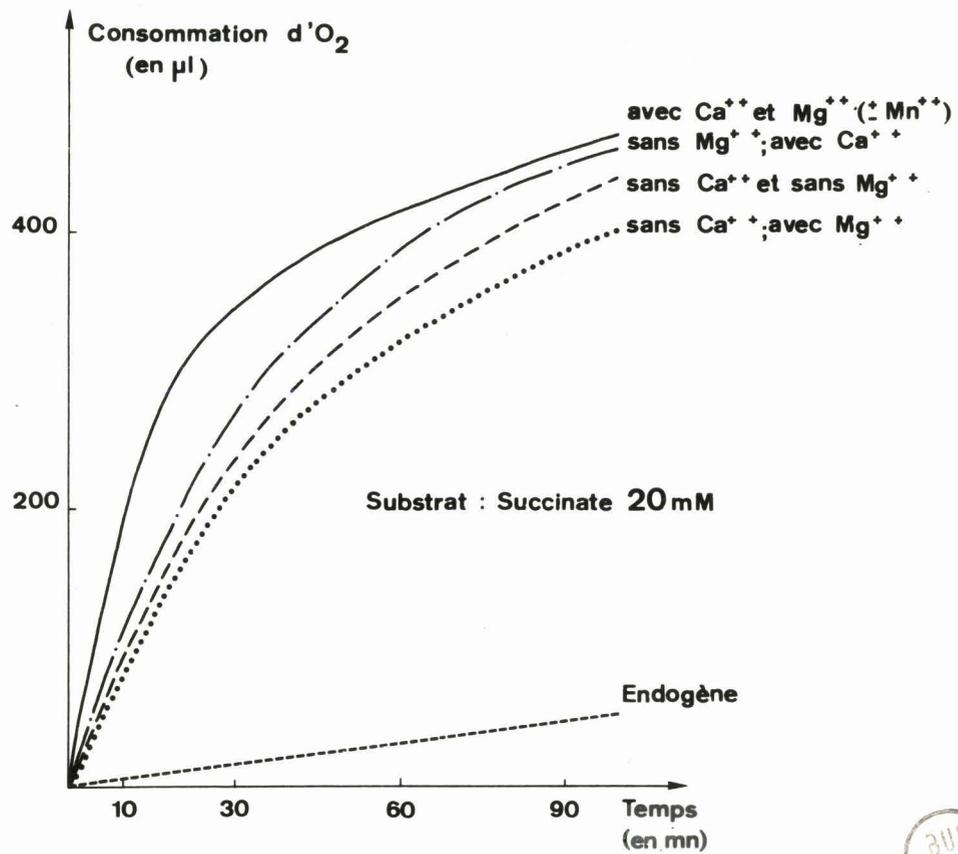


Figure 43

Influence des ions bivalents sur l'activité
respiratoire des hépatocytes libres, en présence de succinate.

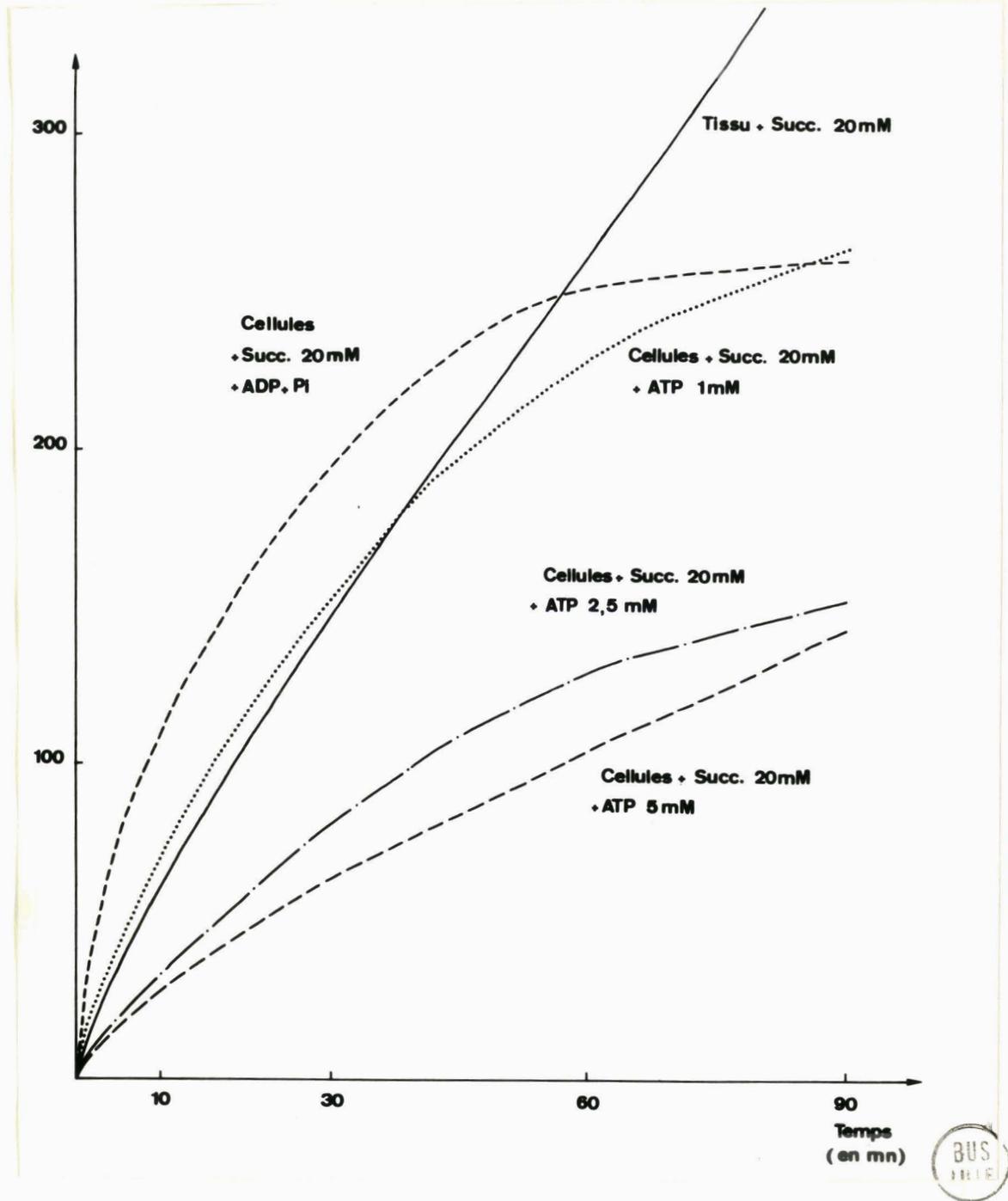


Figure 44

Influence de l'ADP et de la concentration en ATP
sur l'oxydation de l'acide succinique par les hépatocytes
libres .

Ce résultat peut être considéré comme un argument en faveur de l'intégrité du système de phosphorylation. Il est, en effet, classiquement admis que les systèmes mitochondriaux dont le couplage de la phosphorylation oxydative est préservé, accuse une inhibition partielle de leur activité respiratoire en présence d'un excès d'ATP, tandis que l'ADP est sans action. Au contraire, le découplage du système des phosphorylations oxydatives, par exemple, dans des mitochondries "vieillies", se traduit par une stimulation nette de l'oxydation du succinate par l'ATP (AZZONE et ERNSTER (269) ; SEVERIN et coll. (270) ; CHANCE et HAGIHARA (271) ; SKULACHEV (272) .

4°- Influence du mélange ATP + ions Mn^{++}

Si l'ATP freine l'utilisation de l'acide succinique par les hépatocytes libres et si les ions manganoux, employés seuls, sont sans action, au contraire, associés à l'ATP, il lèvent l'inhibition de la respiration par ce dernier et, en outre, la régularisent. L'observation de la figure 45 (page 157) montre, en effet,

a - que l'utilisation du succinate seul est "explosive" et qu'elle est totale en moins de 30 minutes (courbe 1) ,

b - que l'addition d'ATP diminue notablement la consommation du succinate (courbe 2) ,

c - que l'addition de sels manganoux au milieu d'incubation s'oppose à l'effet freinateur de l'ATP puisque, finalement, la totalité de l'acide succinique est consommé au bout de 80 minutes et que l'utilisation du substrat est régularisée puisque la consommation d'oxygène en fonction du temps s'inscrit sur une droite (courbe 3) .

Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse de LINDBERG et ERNSTER (273) (1954) selon laquelle les ions manganoux permettraient la formation d'un complexe actif assurant la relation entre les systèmes d'oxydation et le système de phosphorylation à ATP. Selon les auteurs, une modification de la concentration du milieu en ATP et en ions Mn^{++} provoquerait une dissociation des complexes selon la réaction suivante :



L'addition au milieu d'ATP et de sels manganoux permet donc un déplacement de la réaction dans le sens de la reconstitution du complexe actif responsable du couplage entre la phosphorylation et l'oxydation.

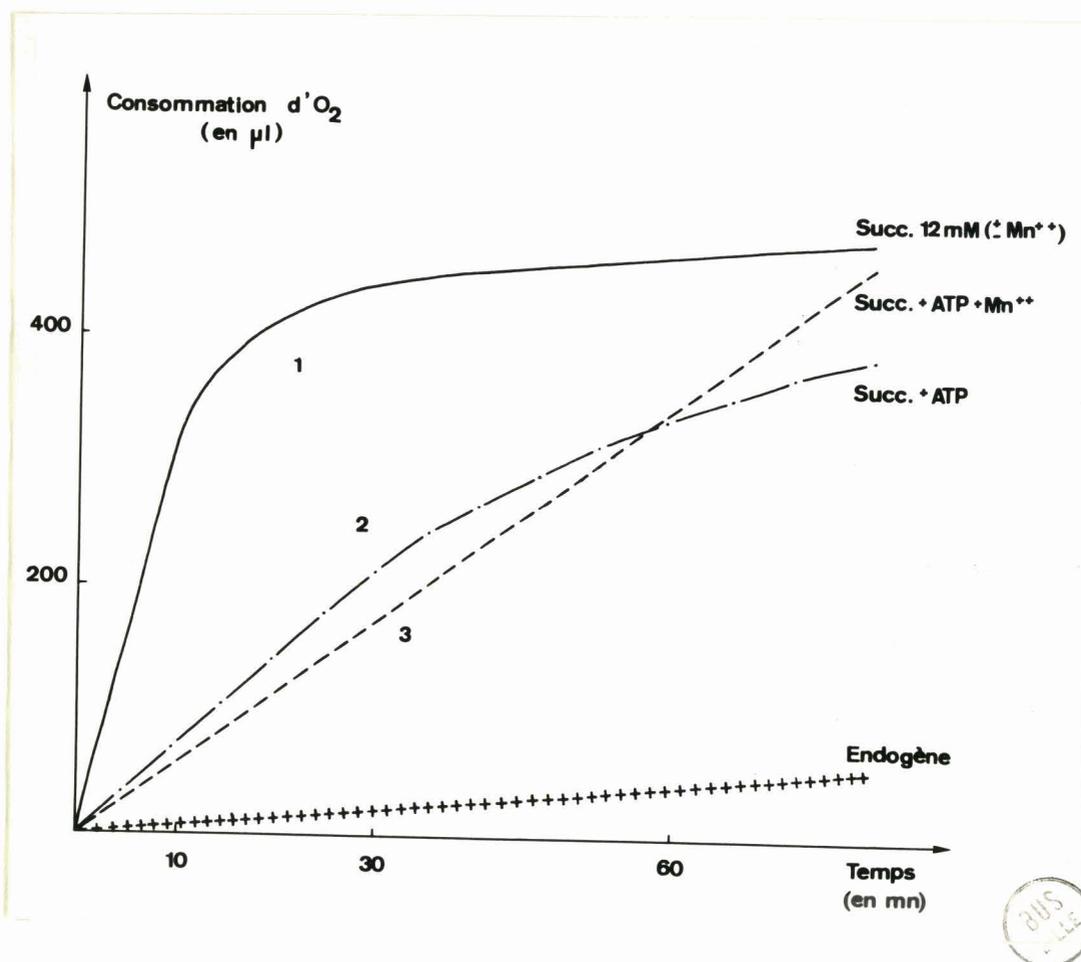


Figure 45

Etude cinétique de la consommation en aérobiose, par les hépatocytes libres, de l'acide succinique (Succ.) (12,5 mM) en l'absence d'ATP et en présence d'ATP (2,5 mM) et du mélange ATP (2,5 mM) - sels manganéux (0,6 mM).

Nous reprendrons, à ce propos, l'opinion des auteurs qui attirent l'attention sur la nécessité d'utiliser le mélange ATP + Mn^{++} dans les milieux d'incubation employés pour étudier la respiration des mitochondries isolées ou des cellules, car si les ions Mn^{++} employés seuls sont capables, dans certains cas, de rétablir la respiration mais non la phosphorylation, le mélange ATP + Mn^{++} (avec ou sans DPN, selon les cas) rétablit simultanément la phosphorylation et la respiration.

Enfin, nous établirons une relation entre, d'une part, le fait que l'addition d'ATP et de sels manganésiques dans notre milieu de dissociation nous fournit des cellules dont la morphologie des mitochondries est préservée et, d'autre part, l'action bénéfique du mélange ATP- Mn^{++} sur la respiration cellulaire, sans toutefois pouvoir faire un choix entre ces deux éventualités : l'activité respiratoire des hépatocytes libres est-elle préservée parce que le mélange ATP- Mn^{++} protège les structures mitochondriales - ou bien, celles-ci sont-elles maintenues grâce à la persistance des complexes de LINDBERG et ERNSTER ?

5°- Influence de la composition et de la nature des milieux d'incubation

Nous avons étudié l'influence des milieux d'incubation sur l'utilisation de l'acide succinique par les hépatocytes en présence d'oxygène de manière à obtenir une activité respiratoire maximale.

Comparativement au liquide de KREBS-RINGER, le sérum total de Boeuf exerce sur le tissu hépatique, comme sur les hépatocytes libres du foie de Rat, une action inhibitrice de la respiration qui est de l'ordre de -15 p.100 (figure 46; p.159). Nous avons observé que l'emploi de la fraction adialysable du même sérum restaurait, en partie, l'activité respiratoire sans toutefois la ramener à la normale. L'action inhibitrice du sérum peut s'expliquer par la présence de glucose responsable d'un effet CRABTREE discret ; celle des macromolécules adialysables s'explique plus difficilement. Toutefois, il faut remarquer que l'addition de sérum-albumine au liquide de KREBS-RINGER provoque une légère inhibition

CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA RESPIRATION DES HEPATOCYTES LIBERES DU FOIE DE RAT

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude de l'activité respiratoire des hépatocytes libres et des facteurs qui l'influencent sont les suivants :

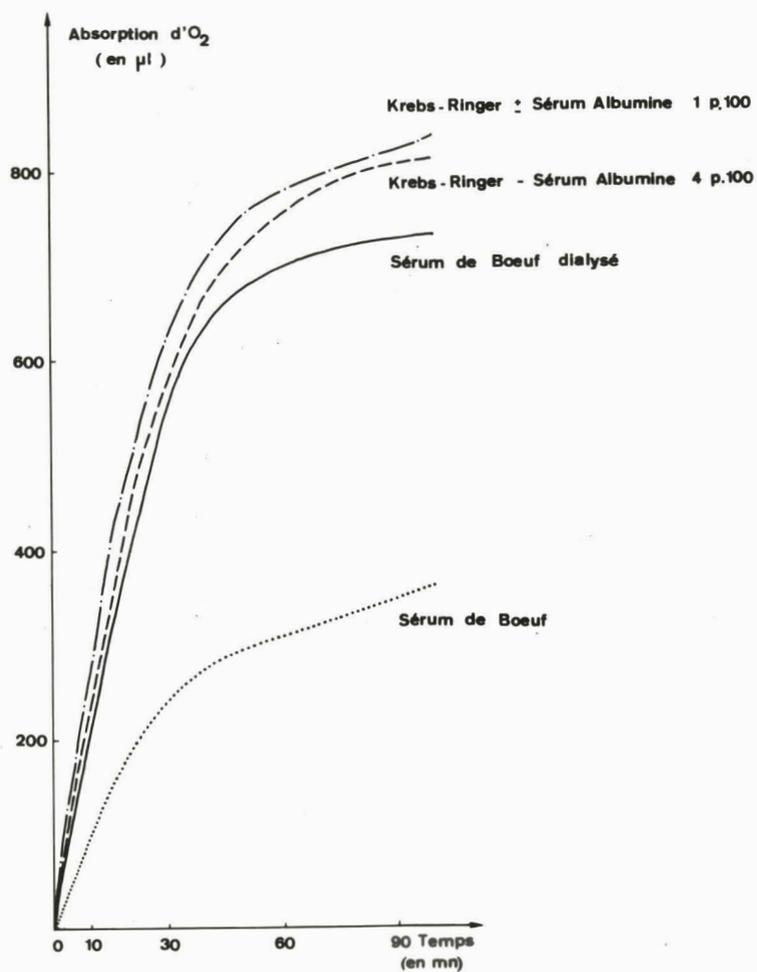


Figure 46

Influence du sérum total, du sérum dialysé
et de la solution de KREBS-RINGER sur la respiration
des hépatocytes libres du Rat .

1 - L'activité respiratoire des hépatocytes isolés du foie de Rat semble préservée, bien que certains substrats ne soient pas oxydés au cours des expériences d'incubations. Cependant, la non-utilisation de ceux-ci n'implique pas a priori la disparition de systèmes enzymatiques. Il semble plutôt qu'elle soit liée à des phénomènes d'imperméabilité sélective de la membrane des hépatocytes. L'exemple du glucose est, à cet égard, démonstratif puisque ce composé n'est pas utilisé par la cellule alors que ses dérivés phosphorylés le sont parfaitement.

L'imperméabilité absolue des hépatocytes vis-à-vis de certains substrats peut, d'autre part, s'expliquer par un "tannage" de leur membrane dès leur libération dans le milieu d'incubation. Nous avons, en effet, observé que la rupture de la membrane des hépatocytes libres à l'aide d'un homogénéiseur de POTTER-ELVEHJEM est pratiquement irréalisable tandis qu'elle est aisément effectuée lorsqu'il s'agit de tissu hépatique intact.

Enfin, l'existence de "perméases" exocellulaires, perdues au cours de la dissociation peut être invoquée pour expliquer la non-utilisation par les cellules libres de substrats comme l'acide α -cétoglutarique qui est parfaitement oxydé par le tissu total.

2 - L'acide succinique est le substrat d'oxydation le mieux utilisé par l'hépatocyte libre. Il représente donc "l'aliment énergétique" de choix pour ce dernier.

3 - La composition des milieux d'incubation des cellules est très importante. On évitera l'addition de sérum ou de protéides sériques, au profit de solutions minérales isotoniques comme le liquide de KREBS-RINGER auquel on ajoutera éventuellement de l'ATP et des sels manganoux dont nous avons démontré l'action bénéfique.

4 - L'action inhibitrice de l'ATP sur la respiration des cellules libres et l'activité bénéfique de l'association $ATP - Mn^{++}$ est en faveur du maintien du système couplé des oxydations phosphorylantes, dont l'une des conséquences serait le respect de la morphologie des mitochondries.

II - ETUDES SUR LE METABOLISME DES ACIDES NUCLEIQUES

Nous avons entrepris une seconde série de recherches qui ont porté sur le métabolisme des acides ribonucléiques. On connaît, en effet, le rôle fondamental que jouent ces composés dans la vie de la cellule et il était évident que les chances de survie des hépatocytes libres étaient d'autant plus grandes que les synthèses des acides ribonucléiques étaient plus élevées.

Nous avons étudié, d'une part l'incorporation de l'acide radiophosphorique ($^{32}\text{PO}_4\text{H}_3$) et, d'autre part, de l'acide crotonique marqué par le carbone -14 dans les acides ribonucléiques.

Nous avons décrit plus haut les méthodes que nous avons appliquées (voir p. 94 à 97) et une partie des résultats que nous avons obtenus et dont l'exposé était indispensable dans notre argumentation concernant la mise au point de procédés de dissociation des tissus (voir p. 108, 109, 123, 130 et 135) .

A - EXPERIMENTATION AVEC L'ACIDE RADIOPHOSPHORIQUE

Les hépatocytes libres sont mis à incuber dans différentes conditions en présence de phosphates radioactifs. A la fin de l'incubation, les suspensions sont déféquées par l'acide trichloracétique, délipidées par l'éthanol, puis par le mélange éthanol-éther et, enfin, hydrolysées par la soude. Après une élimination des protéines et de l'acide désoxyribonucléique par acidification à pH 4 - 4,5 , l'hydrolysate est purifié sur un échangeur de cations (Dowex 50) et le liquide effluent est soumis à l'électrophorèse sur papier. On sépare, ainsi, les quatre ribonucléotides radioactifs (Figure 47 ; p. 162) constituant les acides ribonucléiques et on détermine leur radioactivité spécifique. Les détails opératoires ont été décrits à la page 95. Nous sommes parvenu à standardiser la méthode en appliquant toujours les mêmes conditions d'expérience. De cette manière, les résultats sont reproductibles et comparatifs.

1 - ETUDE DE L'INCORPORATION DE L'ACIDE RADIOPHOSPHORIQUE DANS LES ACIDES RIBONUCLEIQUES D'HEPATOCYTES ISOLES PAR DIFFERENTS PROCEDES

Nous avons rassemblé dans le tableau III (p.109) les résultats de l'étude de l'incorporation de l'acide radiophosphorique dans les acides

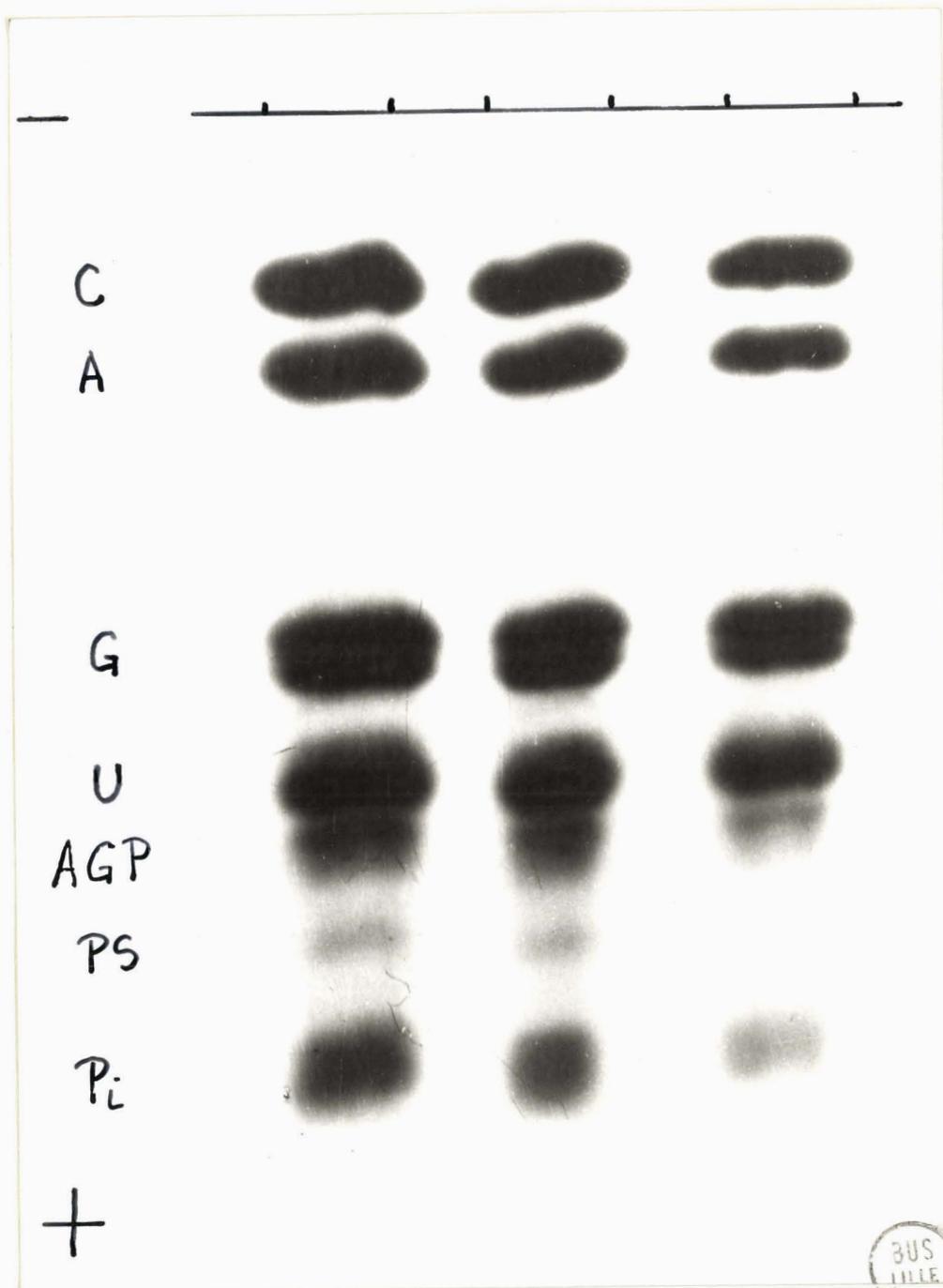


Figure 47

Autoradiographie de l'électrophorégramme d'un hydrolysat sodique d'hépatocytes libres incubés en présence de $^{32}\text{PO}_4^{---}$, préalablement déféqués et délipidés .

Electrophorèse en tampon citrate 0,05 M de pH 3,5 (14 volts/cm pendant 5 heures)

C, A, G, U : acides cytidylique, adénylique, guanylique, uridylique ;

AGP : acide glycérophosphorique ; PS : phosphosérine ; Pi : acide orthophosphorique.

ribonucléiques des hépatocytes obtenus par la méthode de LONGMUIR et REES aux phosphates alcalins à pH 5 et par nos trois méthodes originales : méthodes au RINGER citraté, au sérum citraté et au sérum citraté-ATP-Mn⁺⁺. Nous avons déjà discuté les résultats que nous avons obtenus et nous nous bornerons à rappeler que l'amélioration de la morphologie des cellules s'accompagne d'une augmentation des synthèses des acides ribonucléiques. Les cellules isolées par la méthode de LONGMUIR et REES, dont les structures cellulaires sont détruites, n'incorporent pas d'acide phosphorique. Dans le cas des cellules isolées par la méthode au RINGER citraté, l'amélioration de la morphologie cellulaire s'accompagne d'une reprise de la synthèse des acides ribonucléiques. Cette synthèse est plus nette encore avec les cellules isolées par le procédé au sérum citraté qui respecte mieux la morphologie des structures cellulaires, en particulier des mitochondries. Elle est maximale avec les cellules préparées par la méthode au sérum citraté-ATP-Mn⁺⁺. Le tableau III est très démonstratif : on voit, en effet, que l'introduction de l'ATP et des ions manganéux dans le milieu de dissociation à base de sérum citraté fournit des cellules qui incorporent dans leurs acides ribonucléiques 5 fois plus de radiophosphates.

Ce résultat peut d'expliquer de deux manières :

1 - Nous verrons plus loin (page 164) que les synthèses des acides ribonucléiques sont plus intenses en phase aérobie et que, en conséquence, l'intégrité du système enzymatique respiratoire est indispensable à la cellule pour les réaliser. Or, nous savons que l'ATP et les ions Mn⁺⁺ protègent les mitochondries et les systèmes couplés des oxydations phosphorylantes.

2 - Les ions Mn⁺⁺ exaltent les synthèses des acides ribonucléiques (FOX et coll.) (274) et on peut admettre que, pendant l'incubation dans le milieu de dissociation, les cellules se sont enrichies en ions manganéux.

CONCLUSION

Les hépatocytes préparés par la méthode au sérum citraté-ATP-Mn⁺⁺ incorporent le mieux les radiophosphates dans leurs acides ribonucléiques dont les synthèses sont donc maximales. C'est pourquoi, nous avons choisi de les utiliser dorénavant dans nos expériences portant sur le métabolisme des acides nucléiques.

2 - ETUDE DES CONDITIONS D'INCORPORATION DE L'ACIDE RADIOPHOSPHORIQUE DANS LES HEPATOCYTES LIBRES

a - Influence de l'oxygène

L'une des premières applications de notre procédé d'étude du métabolisme des acides ribonucléiques dans les hépatocytes libres a été de rechercher l'influence des respirations sur la synthèse de ces composés.

Nous avons ainsi été amené à comparer la vitesse d'incorporation de l'acide radiophosphorique dans les acides ribonucléiques d'hépatocytes maintenus les uns en anaérobiose (sous courant de "Nitrogène" ($N_2 + CO_2 : 195 : 5$)), les autres, en aérobiose (sous courant de "Carbogène" ($O_2 + CO_2 : 95 : 5$)).

Nos résultats sont rassemblés dans le tableau V (page 165). On voit que l'incorporation des radiophosphates dans les acides ribonucléiques est 20 fois plus importante en aérobiose. On comprend donc aisément pourquoi, dans l'expérience décrite dans le paragraphe précédent, l'amélioration de la morphologie des mitochondries s'accompagnait, à la fois, d'une augmentation de l'activité respiratoire et des synthèses d'acides nucléiques.

CONCLUSION

Les expériences concernant le métabolisme des acides ribonucléiques dans les hépatocytes libres doivent être effectuées en aérobiose. A cet effet, un courant de "Carbogène" passe dans le milieu d'incubation avec un débit constant (50 ml/ min dans 50 ml de liquide d'incubation).

b - Influence du sérum

Nous avons effectué des incubations d'hépatocytes libres dans les conditions indiquées dans la note 1 du tableau III (p.109) en remplaçant la solution de KREBS-RINGER par du sérum de Boeuf. Les résultats sont précisés dans le tableau V.

On observe que le sérum possède un effet freinateur sur la biosynthèse des acides nucléiques. Cette action peut s'expliquer soit par la présence d'un facteur plasmatique de régulation, soit par une diminution de l'activité respiratoire de la cellule. Nous avons, en effet, montré que le sérum non dialysé possédait un effet inhibiteur sur la respiration cellulaire (voir figure 46 ; page 159).

CONCLUSION

L'incorporation des phosphates radioactifs dans les acides ribonucléiques des hépatocytes est maximale en présence de solutions minérales comme le liquide de KREBS-RINGER que nous avons choisi comme milieu d'incubation pour nos expériences futures.

T A B L E A U V

Radioactivité spécifique (*) des ribonucléotides (**)
 constituant les acides ribonucléiques des hépatocytes libres (***) incubés
 en l'absence et en présence d'oxygène dans différents
 milieux

Milieu d'incubation	Conditions d'incubation	A	U	C	G
Solution de KREBS-RINGER	Anaérobiose	24.140	37.000	10.600	27.500
	Aérobiose	535.000	770.000	215.000	570.000
Sérum de Boeuf	Aérobiose	212.000	313.000	102.000	244.000

(*) Les conditions d'incubation sont décrites dans le tableau III

(**) A, U, C, G : respectivement, acides adényliques, uridyliques, cytidyliques et adényliques

(***) Isclés par la méthode au sérum citraté-ATP-Mn⁺⁺

B - EXPERIMENTATION AVEC LE ^{14}C -ACIDE OROTIQUE.
HISTORADIOGRAPHIE DES HEPATOCYTES MARQUES.

L'acide orotique est le précurseur des bases pyrimidiques des acides nucléiques, ribo- ou désoxyribonucléiques. Nous avons précisé dans la figure 48 (p.167) les étapes métaboliques qui conduisent de l'acide orotique aux précurseurs pyrimidiques de la synthèse des acides nucléiques.

Marqué par le radiocarbone 14, l'acide orotique est un composé précieux dans l'étude du métabolisme des acides nucléiques par le procédé d'historadiographie dont le principe est le suivant : les cellules ou les coupes de tissus radioactifs sont déposées sur une lame de microscope et recouvertes d'une pellicule de gélatine prélevée sur des films spécialement destinés à la méthode historadiographique. Après un temps de contact variable, on révèle le film photographique, puis on colore la préparation de manière à faire apparaître les structures cellulaires. L'observation au microscope optique permet de repérer les impacts des particules radioactives et de localiser des molécules marquées dans les cellules.

1 - MODE OPERATOIRE

a - Incubation des hépatocytes

1 g d'hépatocytes isolés par la méthode au sérum citraté-ATP-Mn⁺⁺ sont suspendus dans 6 ml de solution de KREBS-RINGER contenant 50 μC de ^{14}C -acide orotique. Après une incubation de 2 heures effectuée en aérobose, les cellules sont centrifugées et lavées plusieurs fois avec une solution de KREBS-RINGER. Après le dernier lavage, elles sont suspendues dans un peu de solution de KREBS-RINGER et étalées sur des lames de microscope .

b - Préparation des historadiogrammes

Le frottis de cellules est fixé dans un mélange d'éthanol et d'éther (v:v) pendant 3 jours. Il est ensuite recouvert, en chambre noire, d'un film spécial pour autoradiographies (KODAK A.R. 10). L'exposition est effectuée à 2°C dans une boîte métallique contenant un déshydratant (CaCl_2) pendant une période variant de 3 à 4 semaines. Le film est alors révélé en trempant la préparation recouverte du film, dans une solution à base d'amidol (amidol : 1,85 g ; sulfite de sodium anhydre : 4,5 g ; bromure de potassium : 0,2 g ; eau q.s.p. 250 ml ; temps de révélation : 5 min à 22°C). Il est ensuite fixé par une solution d'hyposulfite de sodium à

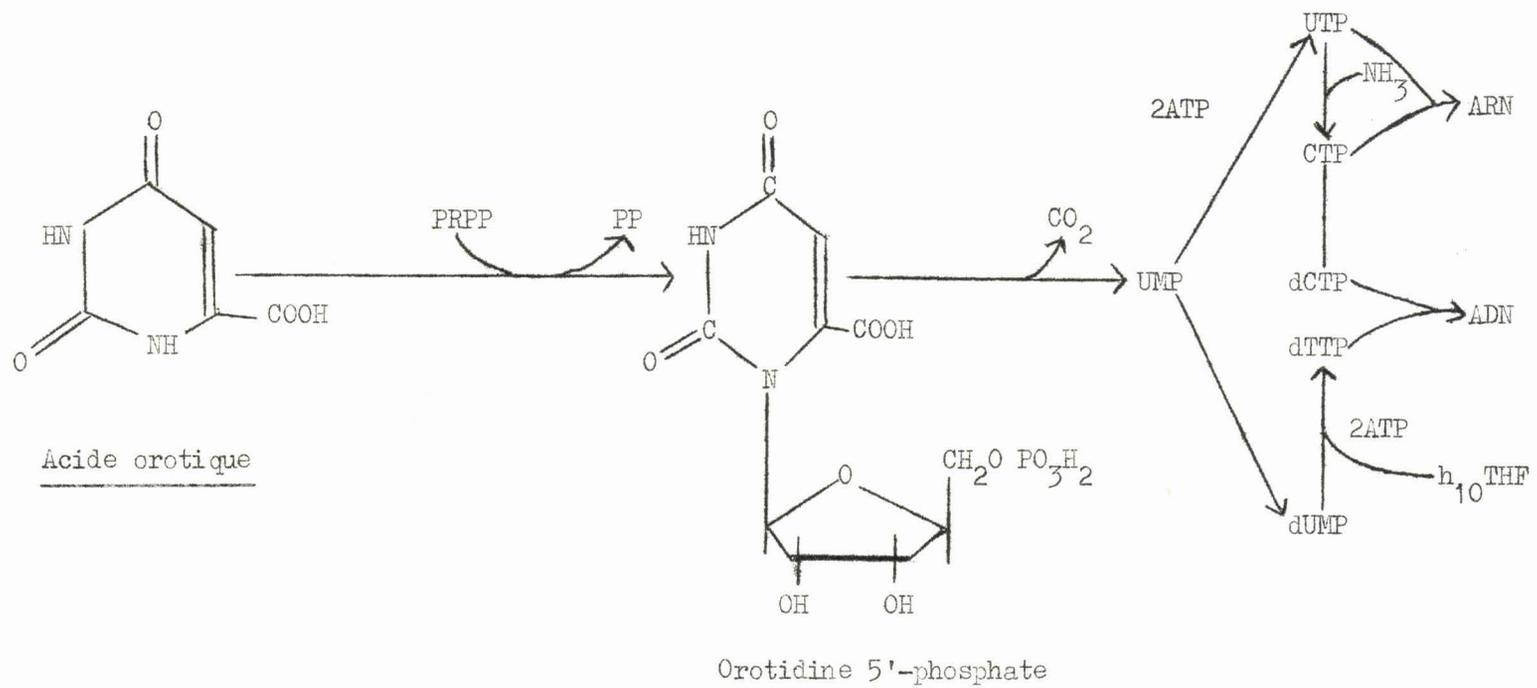


Figure 48

Métabolisme des nucléotides pyrimidiques précurseurs des acides nucléiques

PRPP : 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate ; PP : acide pyrophosphorique ;
 UMP, UTP : uridine mono- et triphosphates ; CTP : cytidine triphosphate ;
 dCTP : désoxycytidine triphosphate ; dUMP : désoxyuridine monophosphate ;
 dTTP : thymidine triphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; h₁₀ THF : acide
 10-hydroxyméthyl-tétrahydrofolique ; ARN : acides ribonucléiques ; ADN : acides
 désoxyribonucléiques.

30 p.100 (p:v) . Après un lavage à l'eau courante d'une heure, les préparations sont séchées et colorées par un colorant nucléaire (à l'hénalun de MEYER) pour éviter une surcoloration nuisible à la bonne observation des traces laissées sur le film par les particules émises par les molécules marquées.

2 - RESULTATS

La figure 49 (p. 169) illustre les résultats que nous avons obtenus. On voit que la radioactivité de l'acide orotique se retrouve en totalité dans la cellule et qu'elle est localisée dans le cytoplasme tantôt autour du noyau et tantôt dans tout le territoire cytoplasmique. Ce résultat peut s'expliquer par la brièveté de l'incubation qui n'a pas permis à l'acide désoxyribonucléique, dont le métabolisme est lent, "d'échanger" ses composés pyrimidiques. La radioactivité se trouve donc seulement dans les ARN cytoplasmiques, la durée de vie des ARN nucléaires étant trop brève pour que nous puissions observer une localisation nucléolaire. L'importance variable des territoires cytoplasmiques radioactifs peut s'expliquer par des nuances dans les vitesses de diffusion vers le cytoplasme des ARN nucléaires. Elle est le reflet d'activités métaboliques différentes d'une cellule à l'autre.

3 - CONCLUSIONS

Ces résultats confirment ceux que nous avions apportés à l'étude de l'incorporation des radiophosphates : les hépatocytes libres sont capables de réaliser des synthèses d'acides nucléiques.

En outre, ils nous mettent à l'abri d'une cause d'erreur apportée par la présence éventuelle de bactéries dans nos milieux d'incubation. En effet, malgré les précautions de stérilité que nous observons, nous n'étions pas entièrement à l'abri d'une contamination bactérienne et nos résultats d'incorporation apportés par les méthodes chimiques pouvaient s'expliquer par la présence de bactéries dans nos milieux d'incubation et non par l'intégrité biochimique des hépatocytes libres. L'expérimentation réalisée avec l'acide orotique marqué prouve qu'il n'en est rien puisque la totalité de la radioactivité est localisée à l'intérieur des cellules.

Enfin, cette expérience est le prélude à de nombreuses autres qui nous permettront d'explorer le métabolisme des acides nucléiques cellulaires.

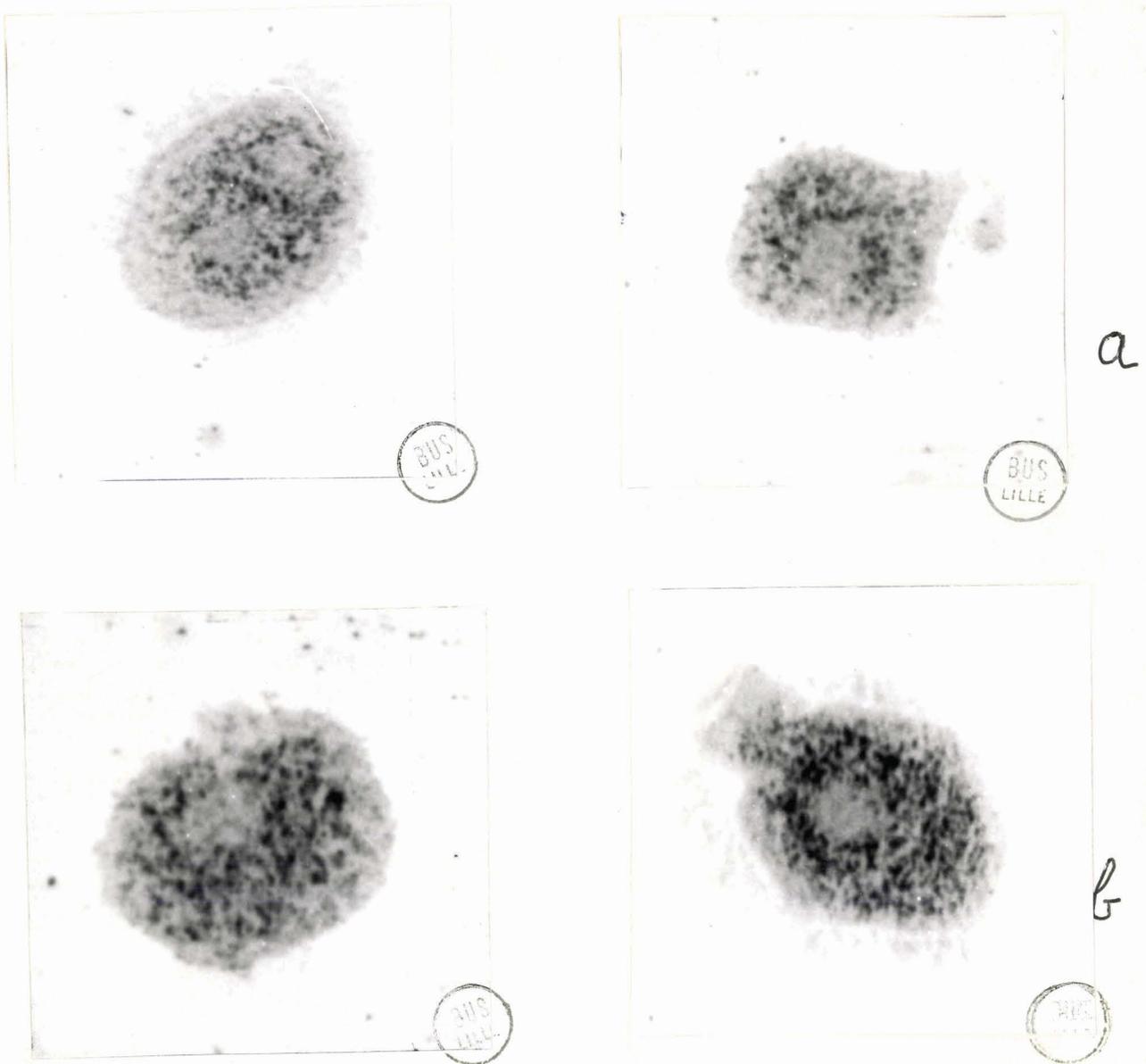


Figure 49

Historadiographie d'hépatocytes incubés en présence de ^{14}C -acide oxotique. On observera les différences dans la localisation de la radioactivité dans les cellules : elle est tantôt localisée autour du noyau (cellule a) et tantôt elle s'étend dans tout le cytoplasmique (cellule b).

La localisation "en auréole" des acides ribonucléiques cytoplasmiques autour du noyau et l'absence de sa radioactivité dans ce dernier permettent de supposer que la durée de l'incubation a dépassé la durée de vie des acides ribonucléiques nucléolaires qui ont déjà diffusé dans le cytoplasme. Peut-être avons-nous saisi le premier stade de cette diffusion qui se limite encore à l'espace péri-nucléaire ? Des expériences cinétiques sont actuellement en cours qui devraient nous permettre d'observer "in situ" les différentes étapes de la synthèse des acides nucléiques cellulaires.

III - ETUDES SUR LE METABOLISME DES PROTEINES

Dans une troisième série de travaux, nous avons voulu vérifier que les hépatocytes préparés par notre méthode originale avaient conservé la propriété de synthétiser des protéines.

Nous avons effectué cette étude à l'aide d'acides aminés marqués par le carbone 14. Nos observations ont ensuite porté sur des autoradiographies d'électrophorogrammes des protéides cellulaires et sur des autoradiographies des cellules marquées.

1 - MODE OPERATOIRE

a - Incubation des hépatocytes

2 g de cellules sont suspendues dans 25 ml de solution de KREBS-RINGER contenant 10 μ C d'un mélange d'acides aminés uniformément marqués par du carbone 14 (hydrolysate d'algues vertes ayant incorporé du $^{14}\text{C} - \text{CO}_2$, fourni par le CEA). Après 2 heures d'incubation en aérobose, les cellules, soigneusement lavées, sont utilisées pour la préparation des autoradiographies d'électrophorogrammes et des autoradiographies.

b - Préparation des autoradiographies d'électrophorogrammes

Après avoir, sans succès, tenté de mettre en solution les protéides cytoplasmiques par un "sonnage" des hépatocytes, nous sommes parvenu à ce résultat en perméabilisant les membranes avec des sels biliaires.

Les cellules ont été maintenues à 4°C pendant 24 heures dans une solution de sels biliaires à 1 p.100 (p:v). La solution est dialysée sous agitation pendant 4 à 5 jours et lyophilisée. Une solution du résidu est réalisée dans un tampon véronal de pH 8,2 (10 g de protéides totaux p.100 ml de tampon) et des électrophorèses sont effectuées sur papier et en gélose.

Après séchage des électrophorégrammes, ceux-ci sont maintenus pendant 10 à 30 jours sur une surface sensible (film radiographique KODIREX) qui est alors révélée. Des bandes noires marquent l'emplacement des protéides radioactifs.

c - Préparation des historadiogrammes

La technique de préparation des historadiogrammes est identique à celle que nous avons décrite à propos des acides nucléiques marqués par le ^{14}C -orotate (voir p. 166).

2 - RESULTATS

a - Autoradiographie des électrophorégrammes

La figure 50 (p. 172) montre que des zones de radioactivité sont visibles sur les électrophorégrammes. Elles correspondent à des protéides puisque les extraits cellulaires ont été dialysés pour éliminer les ^{14}C -amino-acides résiduels. Les hépatocytes sont donc bien capables de synthétiser des protéines. Celles-ci s'étendent sur toute la longueur des électrophorégrammes avec des comportements électrophorétiques allant des γ -globulines aux préalbumines.

b - Historadiographies

La figure 51 (p. 173) montre que les hépatocytes ont incorporé les ^{14}C -amino-acides et que la radioactivité est uniformément répartie sur toute la surface de la cellule.

3 - CONCLUSIONS

Les hépatocytes libres ont bien conservé leur propriété de synthétiser des protéines.

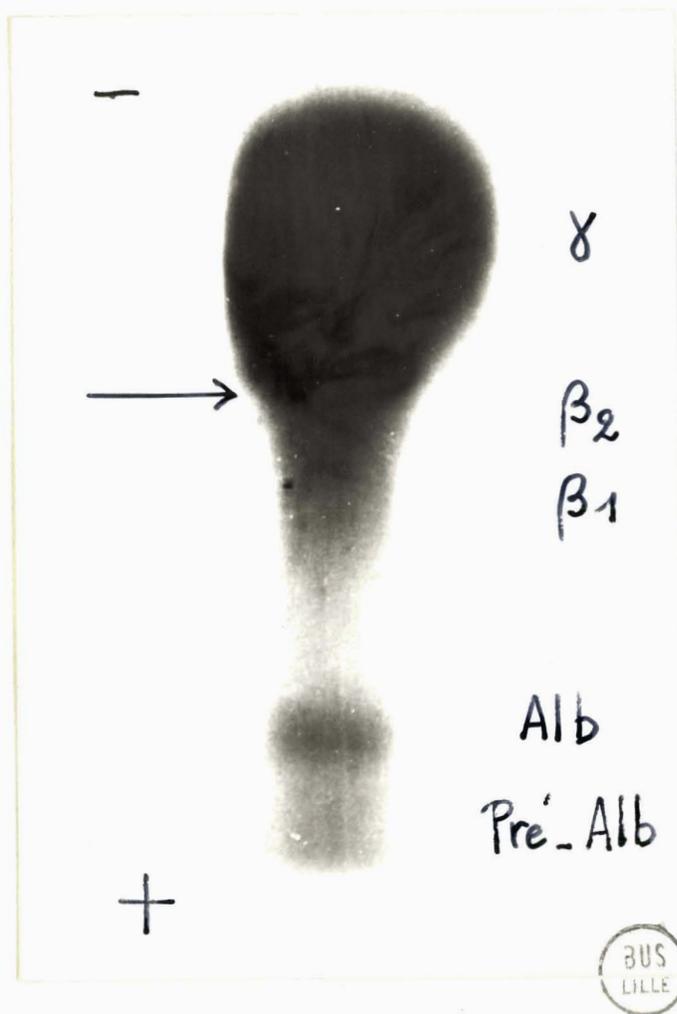


Figure 50

Autoradiographies d'électrophorégrammes réalisés en gélose de ^{14}C -protéines obtenues par incubation d'hépatocytes libres dans une solution de ^{14}C -amino-acides. Tampon véronal pH 8,2. La flèche indique le point de dépôt de la solution. Les lettres indiquent le comportement électrophorétique des protéides : γ -, β_2 -, β_1 -globulines, Alb : albumines, Pré-Alb : préalbumines.

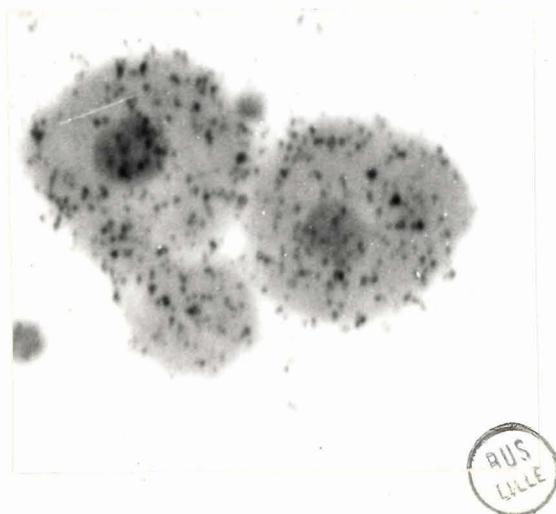


Figure 51

Historadiographie d'hépatocytes incubés
en présence de ^{14}C -amino-acides .

C O N C L U S I O N S

1°) - Nous avons étudié d'une manière systématique les différentes méthodes de dissociation des tissus qui avaient été proposées jusqu'à présent pour préparer des cellules "libres".

Nous avons appliqué à l'isolement de cellules du foie de Rat les procédés suivants :

- a - Méthodes de digestion trypsique de DULBECCO et VOGT et d'ESSNER et coll.
- b - Méthodes de dissociation par agents chimiques d'ANDERSON, de BRANSTER et MORTON et de LONGMUIR et REES.
- c - Méthode "mécanique" de KALTENBACH.

L'application de critères "techniques", - destinés à vérifier que les procédés de dissociation des tissus fournissent rapidement, avec un grand rendement des cellules exemptes de débris et de constituants cytoplasmiques -, nous a amené à ne retenir, parmi tous ces procédés, que la méthode de LONGMUIR et REES (dissociation des tissus dans des solutions de phosphates minéraux à pH 5).

2°) - L'application de critères d'intégrité morphologique, biochimique et biologique nous a conduit à rejeter la méthode de LONGMUIR et REES pour les recherches biochimiques, biologiques et cancérologiques que nous nous proposons d'effectuer sur les cellules "libres" du foie de Rat.

En effet, la morphologie des hépatocytes est profondément altérée. Les mitochondries, en particulier, sont gonflées et optiquement vides. En outre, l'activité respiratoire est relativement faible et la biosynthèse des acides ribonucléiques est totalement abolie. Enfin, les cellules mises en culture ne survivent pas.

L'action létale est due aux ions phosphates et à la valeur très basse du pH du milieu de dissociation.

3°) - L'emploi de solutions de dissociation plus "physiologiques" améliore à la fois la morphologie et l'activité biochimique et biologique de la cellule.

La mise au point d'un milieu "RINGER citraté-hyaluronidase" nous a permis d'obtenir des cellules dans lesquelles la morphologie des inclusions cytoplasmiques est considérablement améliorée. Cependant, les mitochondries montrent encore des lésions graves, - comme la vacuolisation -, qui expliquent que les activités biochimiques, - l'activité respiratoire, en particulier -, et biologiques ne soient pas entièrement restaurées.

4°) - L'utilisation de milieux de dissociation "biologiques" à base de sérum devait nous permettre de préparer des cellules dont l'intégrité morphologique, biochimique et biologique est parfaite. L'emploi de sérum citraté rend aux mitochondries leur morphologie, sans éviter, toutefois, un léger gonflement de ces organites. En outre, le noyau est fortement altéré, mais cette lésion est réversible et la morphologie du noyau est restaurée à la fin de l'incubation des cellules en présence d'oxygène. Il n'est donc pas surprenant que les cellules préparées dans ce milieu possèdent un métabolisme bien supérieur à celui des cellules isolées par la "méthode au RINGER-citraté-hyaluronidase" et qu'elles soient capables de survivre pendant plusieurs jours dans des milieux nutritifs.

L'addition d'ATP et de sels manganéux au sérum citraté devait enfin nous permettre de résoudre le problème de la préparation à partir de tissus de cellules vivantes, biologiquement et biochimiquement actives. L'emploi de ce milieu de dissociation des tissus fournit des cellules dont la morphologie est respectée et dont l'activité métabolique est maximale.

5°) - La méthode que nous décrivons n'est pas, jusqu'à présent, d'application générale. Il est probable que la dissociation de chaque type de tissu posera un problème particulier et que la mise au point de méthodes spécifiques sera nécessaire.

6°) - Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'il existe, dans le cas particulier des cellules libres, une corrélation étroite entre la morphologie cellulaire et l'activité métabolique. Nous avons vu, en effet, que l'architecture des cellules obtenues par la méthode de LONGMUIR et REES est totalement détruite et que l'activité métabolique s'en trouve abolie. Au fur et à mesure que nous

avons vu se restaurer les structures cellulaires, nous avons assisté à une reprise progressive des métabolismes et les cellules les plus parfaites du point de vue morphologique sont aussi les plus actives du point de vue métabolique.

L'analyse des courbes de la figure 20 (p. 107) et du tableau III (p.109) est, à cet égard, très démonstrative.

7°) - L'étude comparative des qualités biologiques et métaboliques des hépatocytes isolés par la méthode de LONGMUIR et REES et par les trois procédés personnels au "RINGER-citraté-hyaluronidase", au "sérum citraté" et au "sérum citraté-ATP-Mn⁺⁺" nous a conduit à choisir ce dernier procédé pour la suite de nos recherches.

Il fournit, en effet, des hépatocytes dont l'activité respiratoire et la synthèse des acides nucléiques sont maximales et qui sont, en outre, encore capables de synthétiser des protéines.

8°) Les applications de la méthode de préparation des hépatocytes sont très nombreuses et les premiers résultats que nous avons obtenus sont très prometteurs. Dans le présent mémoire, nous nous sommes limité à l'exposé de nos recherches sur l'activité respiratoire et sur le métabolisme des acides nucléiques.

RECHERCHES SUR LA RESPIRATION

A la suite de notre observation que le glucose n'était pas utilisé par l'hépatocyte libre comme substrat d'oxydation, nous avons été amené à étudier l'activité respiratoire en présence des produits du métabolisme intermédiaire du glucose : ceux de la chaîne de EMBDEN-MEYERHOF et ceux du cycle de KREBS. Nos conclusions sont les suivantes : les différents substrats étudiés sont utilisés par l'hépatocyte libre à des degrés divers : certains, comme les acides pyruvique, α -cétoglutarique, fumarique, malique, ne le sont nullement, d'autres, comme les hexoses phosphates le sont plus activement, d'autres, comme les acides glutamique, aspartique et phospho-énol-pyruvique, le sont après un certain temps de latence correspondant au temps de diffusion des composés au travers de la membrane cellulaire. Seul, l'acide succinique est oxydé très rapidement et possède le coefficient respiratoire le plus élevé. Il représente donc le substrat énergétique de choix pour la cellule libre.

L'étude de l'activité respiratoire de la cellule en présence d'ATP nous conduit à la conclusion que les systèmes enzymatiques des mitochondries sont respectés. En effet, l'action inhibitrice de l'ATP sur l'utilisation de l'acide succinique démontre l'intégrité du système couplé des oxydations phosphorylantes qui serait préservé par la présence d'ATP et d'ions Mn^{++} dans le milieu de dissociation.

RECHERCHES SUR LE METABOLISME DES ACIDES NUCLEIQUES

L'étude de l'incorporation, dans les acides nucléiques des hépatocytes, de l'acide ^{14}C -orotique par la méthode d'historadiographie et de l'acide ^{32}P -phosphorique par la méthode électrophorétique démontre que les systèmes de synthèse des acides nucléiques sont intacts.

La standardisation de la méthode d'incubation des hépatocytes en présence de radiophosphates nous conduit à des résultats reproductibles qui permettent d'envisager des études métaboliques comparatives et la recherche de facteurs d'activation ou d'inhibition de la synthèse des acides nucléiques.

Les premiers essais que nous avons effectués montrent que les synthèses sont plus actives en aérobose et dans des milieux minéraux, comme la solution de KREBS-RINGER. L'addition de sérum dans les milieux d'incubation ralentit, en effet, l'incorporation de l'acide radiophosphorique dans les acides nucléiques. Cette action peut s'expliquer par une diminution de l'activité respiratoire des cellules que nous avons observée sous l'influence des protéides plasmatiques. Mais elle peut encore être provoquée par la présence, dans le sang, de facteurs de régulation de la synthèse des acides nucléiques et qui pourraient bien être de nature hormonale. Des recherches sont actuellement en cours au laboratoire. Peut-être apporteront-elles la confirmation de cette hypothèse ?

S'il nous fallait résumer en quelques phrases lapidaires, l'ensemble des résultats qui ont été le fruit de nos recherches, nous écririons : "La dissociation du foie dans du sérum citraté additionné d'ATP et d'ions manganéux conduit à l'isolement rapide de quantités élevées d'hépatocytes libres qui ont gardé leur morphologie et les principales activités métaboliques indispensables au maintien de la vie : la respiration et les synthèses des acides nucléiques et des protéines".

Pouvons-nous pour autant tirer la conclusion que les hépatocytes libres ainsi décrits sont restés vivants ? Il serait dangereux de l'affirmer en tirant argument de la maintenance d'activités métaboliques essentielles car chacune d'elle peut être réalisée par des systèmes extraits de la cellule : les mitochondries isolées "respirent" et des extraits acellulaires sont capables de synthétiser des acides nucléiques et des protéines. Cependant, pouvons-nous refuser le qualificatif de "vivantes" à des cellules qui ont conservé leur morphologie, qui sont capables de réaliser simultanément les trois processus métaboliques fondamentaux précédents et qui, en outre, survivent dans des milieux nutritifs.

Les résultats que nous avons obtenus sont le fruit d'un travail d'équipe et de la collaboration de la Biochimie et de la Cytologie. Il est hors de doute que nos recherches n'auraient pu être menées à leur terme sans cette symbiose scientifique.

"Mener à son terme un travail" est une expression bien illusoire et bien présomptueuse car le chercheur scientifique ne peut jamais considérer qu'une oeuvre de recherche soit terminée. Personnellement, le champ des recherches que nous avons entreprises est loin d'être exploré en totalité et nous avons conscience d'avoir soulevé plus de problèmes que nous n'en avons résolus.

B I B L I O G R A P H I E

- ALBERTSON P.A., Biochim. Biophys. Acta , 1958, 27, 378 (15)
- ALIEN R.J.L., Biochem. J., 1940, 34, 858 (252)
- ALLFREY V.G., in BRACHET J., The cell., 1, 193, Academic Press, New York, 1959(12)
- ALLFREY V.G. et MIRSKY A.E., Science, 1955, 121, 879, (163)
- AMBROSE E.J., Unio Internationalis Contra Cancerum Acta, 1960, 16, 36 (180)
- AMBROSE E.J., JAMES J. et LOWICK A., Nature, 1956, 177, 576 (175)
- ANDERSON N.G., Science, 1953, 117, 627 (139, 233, 240, 246, 263)
- ANDERSON N.G., Exptl. Cell. Res., 1955, 8, 91 (139, 240, 246, 263)
- ANDERSON N.G., in Physical Techniques in Biological Research, 3, 299, Academic Press, New York, 1956 (9)
- AZZONE G.F. et ERNSTER L., J. Biol. Chem., 1961, 236, 1518 (269)
- BALO J. et BANGA I., Nature, 1949, 164, 491 (121)
- BALO J. et BANGA I., Biochem. J., 1950, 46, 384 (121)
- BANGA I. et BALO J., Nature, 1956, 178, 310 (122)
- BANGHAM A.D. et GLOVER J.C., Biochem. J., 1962, 84, 513 (183)
- BANGHAM A.D. et PETHICA B.A., Proc. R. Phys. Soc. Edimb., 1960, 28, 43 (182)
- BARNABEI O. et FERRARI R., Arch. Biochem. Biophys., 1961, 94, 79 (35, 41)
- BEAUFAY H., BENDALL D.S., BAUDHUIN P., WATTIAUX R. et DE DUVE C., Biochem. J., 1959, 73, 628 (21)
- BEEBE S., Am. J. Physiol., 1904, 12, 167 (169)
- BELL L.G.E., J. Theor. Biol., 1961, 1, 104. (63)
- BELL L.G.E., J. Theor. Biol., 1962, 3, 132 (63)
- BENECKE W., Jahrb. Wiss. Botan., 1898, 32, 452 (82)

- BENOR S., EISENBERG S. et DOLJANSKI F., Nature, 1960, 188, 1200 (181)
- BERNARD C., Leçons de Physiologie Expérimentale, Paris, 1856 (95)
- BESSIS M. et BRICKA M., Arch. Anat. Microsc. et Morph. Exp., 1949, 38, 190 (48)
- BESSIS M., BRICKA M. et DEPUY A., Ch. Soc. Biol., 1951, 145, 1509 (49)
- BOULANGER P. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chin. Biol., 1951, 33, 784, 791 (253)
- BOULANGER P. et MONTREUIL J., Biochim. Biophys. Acta, 1952, 9, 619 (255)
- BOULANGER P., MONTREUIL J. et MASSE L., C.R. Acad. Sc., 1952, 234, 565 (254)
- BOWES J.H., ELLIOTT R.G. et MOSS J.A., Biochem. J., 1955, 61, 143 (77)
- BOWES J.H. et MOSS J.A., Nature, 1951, 168, 514 (73)
- BRANSTER M.V. et MORTON R.K., Austr. J. Sci., 1956, 19, 72 (145, 234, 241)
- BRANSTER M.V. et MORTON R.K., Nature, 1957, 180, 1283 (146, 234, 241)
- BUCCIOLINI M.G. et MARSILII G., Sperimentale, 1960, 110, 177 (230)
- BUCCIOLINI M.G. et MARSILII G., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1960, 36, 1135(230)
- BUCCIOLINI M.G. et MARSILII G., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1961, 37, 124 (230)
- BUCCIOLINI M.G. et MARSILII G., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1961, 37, 126 (230)
- BUCHER N.L.R., SCOTT J.P. et SIMPSON E., Cancer Res., 1951, 11, 240 (159)
- BURDON R.H., SMELLIE R.M.S., Biochim. Biophys. Acta, 1961, 51, 153 (205)
- CAMPBELL P.N. et KERNOT B.A., Biochem. J., 1962, 82, 262 (225)
- CHAMBERS, Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1940, 8, 144 (80, 88)
- CHANCE G. et HAGIHARA B., Biochem. Biophys. Res. Com., 1960, 3, 6 (271)
- CHAPPELL J.B. et GREVILLE G.D., Nature, 1958, 182, 813 (258, 262)
- CHAPPELL J.B. et GREVILLE G.D., Nature, 1959, 183, 1525 (258, 262)
- CHAPPELL J.B. et GREVILLE G.D., Nature, 1959, 183, 1737 (258, 262)
- CHAPPELL J.B. et GREVILLE G.D., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 38, 483 (258, 262)
- CHAPPELL J.B. et GREVILLE G.D., Nature, 1961, 190, 502 (258, 262)
- CHAPPELL J.B., GREVILLE G.D. et BICKNELL K.E., Biochem. J., 1962, 84, 61.P (266)

- CHAUVEAU J., Ann. Nutr. Alim., 1960, 14, 37 (13)
- CHEVALIER F., C.R. Soc. Biol., 1957, 151, 892 (143)
- CLAUDE A., Harvey Lectures, 43, 121, Academic Press Ed., New York, 1948 (5, 18)
- CLAUDE A., Harvey Lectures, 43, Academic Press Ed., New York, 1950 (14)
- COMAN D.R., Cancer Res., 1944, 4, 625 (165)
- COMAN D.R., Cancer Res., 1960, 20, 1202 (165, 178)
- COMAN D.R. et ANDERSON T.F., Cancer Res., 1955, 15, 541 (166, 177)
- DANIELLI J.F. et HARVEY E.N., Biol. Rev., 1938, 13, 319 (55, 59)
- DAVIDSON J.N. et SMELLIE R.M.S., Biochem. J., 1952, 52, 594 (250)
- DAY T., J. Pathol. Bacteriol., 1947, 59, 567 (120)
- DAY T., J. Physiol., 1949, 109, 380 (120)
- DE DUVE C., Exposés Annuels de Biochimie Médicale, 14, 17, Masson, Paris, 1952 (8)
- DE DUVE C., Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 11 (20)
- VON DER DECKEN A. et CAMPBELL P.N., Biochem. J., 1961, 80, 38 P., (43, 223)
- VON DER DECKEN A. et CAMPBELL P.N., Biochem. J., 1961, 80, 39 P. (43, 223)
- VON DER DECKEN A. et CAMPBELL P.N., Biochem. J., 1962, 82, 448 (43, 223)
- VON DER DECKEN A. et CAMPBELL P.N., Biochem. J., 1962, 84, 449 (42, 43, 223, 227)
- DELONG R.P., COMAN D.R. et ZEIDMAN I., Cancer, 1950, 3, 718 (170)
- DERVICHIAN D.G., Trans. Faraday Soc. Disc., 1949, 6, 7 (53)
- DERVICHIAN D.G., in THOMAS, Problèmes de Structure d'ultrastructure et de fonctions cellulaires, Masson, 1955, p.103 (46, 53, 54, 60)
- DERVICHIAN D.G. et MAGNANT C., Bull. Soc. Chim. Biol., 1947, 29, 655 ;
Ann. Inst. Pasteur, 1947, 73, 841 (53)
- DEVILLERS C., Ann. St. Centr. Hydrobiol. Appli., 1948, 2, 229 (107)
- DEVILLERS C.H., in THOMAS, Problèmes de Structure, d'ultrastructure et de fonctions cellulaires, 1955, p.139 (104)
- DOUNCE A.L., J. Cell. Comp. Physiol., 1952, 39, suppl. 2, 43 (6)
- DOUNCE A.L., in CHARGAFF E. et DAVIDSON J.N., The Nucleic Acids, 2, 93, Academic Press, New York, 1955 (6)

- DULBECCO R. et VOGT M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1952, 38, 747 (124)
- DULBECCO R. et VOGT M., J. Exp. Med., 1954, 99, 167 (129, 231, 238)
- DURCHON M., C.R. Soc. Biol., 1960, 154, 2082 (174)
- EARLE W.R., J. Nat. Cancer Inst., 1943, 4, 165 (191)
- EARLE W.R., in WISSCHER M.P., Methods in Medical Research, 4, 217, The Year Book Ed., Chicago, 1951 (191)
- EARLE W.R., EVANS V.J., EDWARD M.F. et DUCHESNE E., U.S. Nat. Cancer Inst. J., 1949-1950, 10, 291 (191)
- EARLE W.R., SCHILLING E.L. et SHELTON E., U.S. Nat. Cancer Inst. J., 1949, 10, 1067 (191)
- EARLE W.R., SCHILLING E.L. et SHELTON E., U.S. Nat. Cancer Inst., 1949-1950, 10, 865 (191)
- EARLE W.R., SCHILLING E.L., STARK T.H., STRAUSS N.P., BROWN M.F. et SHELTON E., U.S. Nat. Cancer Inst. J., 1943-1944, 4, 165 (191)
- EARLE W.R. et THOMPSON J.W., Pub. Health Rep., 1931, 45, 2672 (188, 189)
- EASTOE J.E., Biochem. J., 1955, 61, 589 ; 1957, 65, 363 (78)
- ERRERA M., HELL A. et PERRY R.P., Biochim. Biophys. Acta , 1961, 49, 58 (209)
- ESSNER E., SATO H. et BELKIN M., Exp. Cell. Res., 1954, 7, 430 (92, 106, 131, 153, 232, 239)
- EVANS V.J. et EARLE W.R., J. Natl. Cancer Inst., 1947, 8, 103 (191)
- EVANS V., EARLE W., SANFORD K., SHANNON J. et WALTZ K., J. Natl. Cancer Inst., 1951, 11, 907 (193)
- FALCONER J.S., JENDEN D.J. et TAYLOR D.B., Discuss. Faraday Soc., 1953, 13, 40 (17)
- FERMI C., Centr. Bakteriolog. Parasitenh., 1910, 56, 55 (98)
- FISHER A., Tissue Culture, Levin and Munksgaard Ed., Copenhagen, 1925 (186)
- FOX C.F. et WEISS S.B., J. Biol. Chem., 1964, 239, 175 (274)
- FOX C.F., RODINSON W.S., HASELKORN R. et WEISS S.B., J. Biol. Chem., 1964, 239, 186 (274)
- GABY W.L. et SILBERMAN R., Arch. Biochem. Biophys., 1960, 87, 188 (34)
- GARVEY J.S., Nature, 1961, 191, 972 (137, 195)
- GAZZANIGA P.P. et SONNINO F.R., Experientia, 1962, 18, 26 (226)

- GOLDSTEIN L., MICOU J. et CROCKER T.T., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, 82 (210)
- GORDON A.H. et HUMPHREY J.H., Biochem. J., 1961, 78, 551 (222)
- GRAY J., Proc. Cambridge Phil. Soc., 1924, 1, 164 (85, 90, 108, 117)
- GRAY J., Brit. J. Exp. Biol., 1926, 3, 167 (90, 108, 117)
- GUZMAN-BARRON E.S. et KIT S., Trans. Assoc. Am. Physicians, 1952, 65, 293 (154)
- HAAG J. et SANTUCCI J., C.R. Acad. Sc., 1962, 255, 1845 (197)
- HADJIULOV A.A. et IRKOV A.T., Biochem. Biophys. Acta, 1961, 47, 217 (206)
- HALL D.A., Int. Rev. Cyt., 1959, 8, 211 (75)
- HALWORSON H.O. et COHEN G.N., Ann. Inst. Pasteur, 1958, 95, 73 (30)
- HARKNESS R., Biochem. J., 1954, 56, 558 (91)
- HARLEY, Brit. J. Med. Chem. Rev., 1860, 25, (96)
- HARRIS S., HARRIS T.N. et FARBER M.B., Antigen J. Immunol., 1954, 72, 148 (158, 162)
- HARRIS M. et MORRISON G.A., Nature, 1961, 191, 1276 (220)
- HARVEY E.N. et SHAPIRO H., J. Cell. Comp. Physiol., 1934, 5, 255 (58)
- HAYDON D.A., Biochim. Biophys. Acta, 1961, 50, 450 (185)
- HAYDON D.A., Biochim. Biophys. Acta, 1961, 50, 457 (185)
- HEILBRUNN L.V., Arch. exp. Zellforschung, 1927, 4, 246 (56)
- HEILBRUNN L.V., Protoplasma Monogr., 1928, 1 (87)
- HELMREICH E., J. Biol. Chem., 1962, 237, 1925 (219)
- HENDLER R.W., Science, 1958, 128, 143 (24, 217)
- HENDLER R.W., J. Biol. Chem., 1959, 234, 1466 (24, 217)
- HENDLER R.W., Biochim. Biophys. Acta, 1961, 49, 297 (24, 217)
- HENDLER R.W., Nature, 1962, 193, 821 (24, 38, 217)
- HENDLER R.W., Biochim. Biophys. Acta (ss presse) (24, 217)
- HERBST C., Wilhelm Roux'Arch. Entwicklunsmech. Organ, 190, 9, 424 (84)
- HOAGLAND M.B., STEPHENSON M.L., SCOTT J.F., HECHT L.I. et ZAMECNIK P.C., J. Biol. Chem., 1958, 231, 241 (39)

- HOAGLAND M.B., ZAMECNIK P.C. et STEPHENSON M.L., Biochim. Biophys. Acta, 1957, 24, 215 (39)
- HOBER R., Physical Chemistry of cells and tissues, The Blahiston Company, Philadelphia, 1945 -(69)
- HOGEBOOM G.H., KUFF E.L. et SCHNEIDER W.E., Intern. Rev. Cytol., 1957, 6, 425 (11)
- HOGEBOOM G.H. et SCHNEIDER W.C., Cancer Res., 1951, 11, 1 (7)
- HOKIN L.E. et HUKIN M.R., J. Biol. Chem., 1959, 234, 1387 (37)
- HOLLINGSHEAD S. et THOMASON D., Nature, 1962, 195, 1217 (184)
- HOLTFRETER J., J. Exp. Zool., 1943, 93, 251 (105, 151)
- HOLTFRETER J., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1948, 49, 709 (151)
- HUMPHREY E.W., Cancer Res., 1961, 21, 1573 (260)
- HUNTER G.D., Phil. Trans. Roy. Soc., 18 juin 1872 (94)
- HUNTER G.D. et GODSON G.N., Nature, 1961, 189, 140 (33)
- HUNTER G.D. et GOODSALL R.A., Biochem J., 1961, 78, 564 (33)
- JACQUET J. et STEEG L., C.R. Acad. Sc., 1962, 255, 2860 (198)
- JEZEQUEL A.M., Path. et Biol., 1962, 10, 501 (2)
- KALTENBACH J.P., Fed. Proc., 1952, 11, 237 (155, 215)
- KALTENBACH J.P., Exp. Coll. Research, 1954, 7, 568 (155, 202, 215, 237, 244)
- KEMPNER E.S. et BOWIE D.B., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 42, 401 (32)
- KIMURA A., NAGAI Y., TURUMI K., KAWASHIMA Y. et SATO H., Nature, 1961, 191, 596 (164)
- KIPNIS D.M. et REISS E., J. Clin. Investig., 1960, 39, 1002 (31)
- KIPNIS D.M., REISS E. et HELMREICH E., Biochim. Biophys. Acta, 1961, 51, 519 (31)
- KNISELY W.H. et MAHALEY M.S., Cancer Res., 1958, 18, 900 (160)
- KOLIN A. et KADO R.T., Nature, 1958, 182, 510 (16)
- KREBS H.A., Biochim. Biophys. Acta, 1950, 4, 249 (149)
- KUYPER C.M.A., The Organization of Cellular Activity, ELSEVIER Ed., Amsterdam, 1962, p.126 (61, 62, 71)

- LAWS J.O. et STICKLAND L.H., Nature, 1956, 178, 309 (140, 157, 203, 247, 259)
- LEHNINGER A.L., J. Biol. Chem., 1959, 234, 2465 (257, 261)
- LEHNINGER A.L., Ann. N.Y. Acad. Sc., 1960, 86, 484 (257, 261)
- LEHNINGER A.L., Biochim. Biophys. Acta , 1961, 48, 324 (257, 261, 265)
- LEHNINGER A.L., J. Biochem., 1961, 49, 553 (257, 261)
- LEHNINGER A.L., RAY B.L. et SCHNEIDER M., J. Biophys. Biochem. Cytol., 1960, 7, 589 (257, 261)
- LEHNINGER A.L. et REMMERT L.F., J. Biol. Chem., 1959, 234, 2459 (257, 261)
- LEHNINGER A.L. et coll. , J. Biophys. Biochem. Cytol., 1959, 5, 97 (257, 261)
- LEPAGE G.A., Cancer Res., 1953, 13, 178 (214)
- LINDBERG O., et ERNSTER L., Nature, 1954, 173, 1038 (273)
- LITTLEFIELD J.W., KELLER E.B., GROSS J. et ZAMECNIK P.C., J. Biol. Chem., 1955, 217, 121 (25)
- LONGMUIR I.S., Biochem. J., 1957, 65, 378 (135, 201, 204)
- LONGMUIR I.S., PISTEL J. et MAGNUS I.A., Biochim. Biophys. Acta , 1958, 29, 203 (135, 201, 204)
- LONGMUIR I.S. et REES W., Nature, 1956, 177, 997 (148, 201, 236, 243)
- MCCUTCHEON M., COMAN D.R. et MOORE F.B., Cancer, 1948, 1, 460 (176)
- MANDL I. et coll., Biochim. Biophys. Acta, 1952, 8, 654 ; 1952, 10, 540 (83)
- MASHERPA P., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1947, 23, 242 (19)
- MEDAWAR P., Nature, 1941, 148, 783 (100)
- MELNICK J.L. et coll., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1955, 88, 676 (133)
- MEYER K., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1938, 6, 91 -(79)
- MEYER K., Mucoïds and Glycoproteins, Adv. Prot. Chem., 1945, 2, 249 (79)

- MEYER K., Some Conjugated Proteins ; A Symposium, Rutgers Univ. Press Ed., 1953, p.64 (79)
- MEYER K. et RAPPORT M.M., Science, 1951, 113, 596 (*01)
- MIESCHER F., Hoppe Seyler medizinische chemische Untersuchungen, 1871, 4, 441 (1, 3)
- MITCHISON J.M., Nature, 1950, 166, 347 (52)
- MOEN J.K., J. Exp. Med., 1935, 61, 247 (137)
- MONTREUIL J., Le Fractionnement Cellulaire, Cancérologie, 1954, 2, 17 (10)
- MONTREUIL J., Acquisitions récentes concernant la structure et la biochimie de la cellule - Le Fractionnement Cellulaire, Revue des questions scientifiques, 1957, 214 (10)
- MONTREUIL J., DEFERT-KOBUS W. et MANGEZ C., (communication personnelle)
- MONTREUIL J., DERUMEZ P. et BOULANGER P., C.R. Acad. Sc., 1960, 251, 3100 (249, 251)
- MONTREUIL J., DERUMEZ P. et BOULANGER P., Biochim. Biophys. Acta (sous presse) (249, 251)
- MONTREUIL J., DUPONT A., DEMAILLE A., ADENIS L. et DRIESSENS J., C.R. Soc. Biol., 1960, 154, 2079 (22)
- MONTREUIL J., SEGARD E., COLBEAU A. et DUQUESNE N., Quelques applications biochimiques de la méthode de préparation des cellules libérées à partir du foie de Rat, Réunion de la Société de Biologie de Lille du 5 juillet 1963 (269)
- MONTREUIL J., SEGARD E. et DEFERT-KOBUS W., (résultats non publiés) (22)
- MOORE A.F., Protoplasma, 1928, 3, 524 (86)
- MORGAN J.F., MORTON H.J. et PARKER R.C., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1950, 73, 1 (256)
- MOSCONA A., Exp. Cell. Research., 1952, 3, 535 (125, 172)
- MOSCONA A., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1956, 92, 410 (152, 172)

- MOSCONA A., Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 1957, 43, 184 (152, 172)
- MOSCONA A., Scientific American, 1959, 200, 132, (152, 172)
- MOSCONA A., Dev. Cell. System. N.Y., 1960 (152, 172)
- MOSCONA A., Exp. Cell. Res., 1960, 22, 455, 465 (152, 172)
- MOSCONA A., Nature, 1961, 190, 408 (168)
- NEUBERGER J., PERRONE J. et SLACK H., Biochem. J., 1951, 49, 199 (72)
- NEVILLE D.H.J., J. Biophys. Biochem. Cytol., 1960, 8, 413 (44, 65)
- NORTHCRAFT, Science, 1951, 113, 407 (116)
- NORTHROP J.H., J. Gen. Physiol., 1926, 9, 497; 1947, 30, 375 (99, 128)
- NOVIKOFF A.B., J. Biochem. Biophys. Cytol., 1956, 2, 65 (147, 235, 242)
- OAKLEY et coll., J. Pathol. Bactériol., 1946, 58, 229 (111)
- OGATA K., OMORI S. et HIROKAWA R., J. Biochem. (Japon), 1961, 49, 660 (221)
- OLIVO O.M., Arch. Ital. di Anat. e di Embriol., 1932, 30, 241 (190)
- OTAKA E., OSAWA S., OOTA Y., ISHIHAMA A. et MITSUI H., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 55, 310 (213)
- PAUL J., Path et Biol., 1961, 9, 529 (200)
- PAULING L., Molecular Structure and Intermolecular Forces, in LANDSTEINER, Specificity of Serological Reactions, HARVARD University Press, 1946, p.310 (68)
- PERRY R.P., HELL A. et ERRERA M., Biochim. Biophys. Acta, 1961, 49, 47 (208)
- PING YAO-CHENG, Biochim. Biophys. Acta, 1961, 53, 235 (207)
- POLONOVSKI J., Ann. Histochimie, 1962, 6, 379
- PRINSGHEIM E., Planta, 1926, 2, 555 (115)
- PURDOM L., AMBROSE E.J. et KLEIN G., Nature, 1958, 181, 1586 (179)

- RACHEVSKY H. et LANDAHL H.D., Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1940, 8, 9 (45)
- RINALDINI L.M., J. Physiol., 1953, 123, 20 P (110, 126)
- RINALDINI L.M., J. Physiol., 1953, 123, Proc. 6 (110)
- RINALDINI L.M., Nature, 1954, 173, 1134 (103, 127)
- RINALDINI L.M.J., Isolation of Living Cells from Tissues, Intern. Rev. Cytol., 1958, 7, 618 (109, 110, 118, 119, 123)
- RINGER S., J. Physiol., 1890, 11, 79 (83)
- ROBERTSON J.D., The Molecular Structure and Contact Relationships of Cell Membranes, Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry, 1960, 10, 343(47)
- ROOF B.S. et AUB J.C., Cancer Res., 1960, 20, 1426 (161, 216, 245)
- ROOF B.S., RYSER H. et AUB J.C., Cancer Res., 1960, 20, 1436 (161, 216, 245)
- ROUILLER C., Physiological and Pathological Changes in Mitochondrial Morphology Intern Rev. Cytol., 1960, 9, 277 (264)
- ROUS P. et JONES F., J. Exp. Med., 1916, 23, 549 (112)
- ROUS P. et JONES F.S., J. Exp. Med., 1916, 23, 564 (112)
- RUNNSTROM J. et HOLTFRETER J.,
- RUNNSTROM J., MONNÉ L. et BROMAN L., Arkiv Zool., 1944, 35 A, n° 3 (102)
- RUTTER W.J. et BROSEMER R.W., J. Biol. Chem., 1961, 236, 1247 (144, 228)
- SACHS H., J. Biol. Chem., 1957, 228, 23 (26)
- ST AMAND G. et TIPTON S., Science, 1954, 119, 93 (130)
- ST GEORGE S.S., FRIEDMAN M. et BYERS S.O., Science, 1954, 120, 463 (142)
- SANFORD K.K., EARLE W.R. et LIKELY G.D., J. Nat. Cancer Inst., 1949, 9, 229 (192)
- SANTUCCI J., DHENNIN L. et HAAG J., C.R. Acad. Sc., 1962, 255, 2858 (196)
- SANTUCCI J., HAAG J., CHOAY J. et THELY M., C.R. Acad. Sc., 1962, 254, 955 (196)
- SCHERER W., SYVERTON J. et GEY G., J. Exp. Med., 1953, 97, 695 (134)
- SCHIFF, Leçons sur la physiologie de la digestion, 1868, 2, (97)
- SCHMITT F.O., Growth Symp., 1941, 3, 1 (66)

- SCHMITT F.O., BEAR R.S. et PONDER E., J. Cell. Comp. Physiol., 1936, 9, 89 (51,66)
- SCHNEIDER W.C., J. Biol. Chem., 1945, 161, 293 (248)
- SCHULTZE B., OEHLERT W. et MAURER W., Biochim. Biophys. Acta, 1961, 49, 35 (211)
- SEGARD E., MONTREUIL J., COLBEAU A., DUPONT A., DEMAILLE A., ADENIS L. et DRIESSENS J., C.R. Acad. Sci., 1962, 255, 1479 (268)
- SEGARD E., MONTREUIL J., COLBEAU A., DUPONT A., DEMAILLE A., MANGEZ C., ADENIS L. et DRIESSENS J., C.R. Soc. Biol., 1962, 156, 1102 (268)
- SEGARD E., MONTREUIL J., COLBEAU A., DUPONT A., DEMAILLE A., MANGEZ C., ADENIS L. et DRIESSENS J., C.R. Soc. Biol., 1963, 157, 130 (268)
- SEVERIN S.E., SKULACHEV V.P. et KISELEV L.L., Doklady Acad. Nauk.SSSR, 1959, 128 628 (270)
- SHAH V.C., Experientia, 1962, 18, 239 (138)
- SIEKEVITZ P., J. Biol. Chem., 1952, 195, 549 (27)
- SKULACHEV V.P., Nature, 1963, 198, 444 (272)
- SRINIVASAN P.R., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 55, 553 (212)
- SRINIVASAN P.R., MILLER FAURÉS A. et ERRERA M., Arch. Inter. Phys. Bioch., 1962, 70, 14 (212)
- STERZL J., Folia Biologica, 1957, 3, 1 (150, 218)
- TAUC L., J. Physiol., 1953, 45, 232 (57)
- TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem. Z., 1929, 215, 36
- TONG W., KERKOF P. et CHAIKOFF I.L., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 60, 1 (229)
- TOWNES P.L. et HOLTFRETER J., J. Exptl. Zool., 1955, 128, 53 (171)
- TRIA E. et BARNABEI O., Biochem. J., 1960, 76, 36 P. (36)
- TRIA E. et BARNABEI O., Ric. Sci., 1962, 32, 145 (36)
- TRIA E. et BARNABEI O., Nature, 1963, 197, 598 (36, 40, 64)
- UMBREIT W.W., BURRIS R.H. et STAUFFER J.F., Manometric Techniques, BURGESS Ed., Minneapolis, 1945 (156)
- VERZAR F., Scientific American, 1963, 208, 104 (74, 76)
- WARBURG O., The Metabolism of Tumours, Constable and Co.Ltd.Ed., London, 1930 (199)
- WARBURG O., GAWEHN K. et GEISSLER A.W., Z.Naturforschg, 1958, 13 b, 61 (136)

- WARBURG O., GAWEH K. et GEISSLER A.W., Z. Naturforschg, 1958, 13 b, 588 (136)
- WARBURG O., GAWEHN K. et GEISSIER A.W., Z. Naturforschg, 1960, 15 b, 378 (136)
- WATTIAUX R. et coll., Biochem. J., 1956, 63, 608 (141)
- WEISS P., Yale J. Biol. Medic., 1947, 19, 235 (67)
- WEISS P., Quart. Rev. Biol., 1950, 25, 177 (67)
- WEISS P., Intern. Rev. Cytol., 1958, 7, 416 (67)
- WEISS L., The Adhesion of Cells, Intern. Rev. Cytol., 1960, 9, 187 (167)
- WILLE N., Beitrage zur physiologischen Anatomie der Laminariaceen, Christiana 1897 (81)
- WILLMER E.N., Assays on Growth and Form, the University Press Ed., Oxford, 1945, p.264 (114)
- WOLF K., QUIMBY M.C., PYLE E.A. et DEXTER R.P., Science, 1960, 132, 1890 (194)
- WOLFF E., Bull. Soc. Zool., 1954, 79, 357 (173)
- WOLFF E., Les facteurs de la croissance et de la différenciation des organes embryonnaires en culture in vitro, Les Facteurs de la Croissance Cellulaire, Masson Ed., Paris, 1956, p.157 (173)
- WOLFF E., Experientia, 1956, 12, 321 (173)
- WOLFF E., Acta Anat. Suisse, 1957, 30, 952 (173)
- WOLFF E., Les parabioses d'organes embryonnaires, La Biologie des Homogreffes, Coll. Intern.C.N.R.S. n° 78, Paris (173)
- WOLFF E., Association d'organes et de tumeurs en culture in vitro, in les Conférences du Palais de la Découverte, Série A., n° 245, Impr. Alençonnaise Ed., 1958 (173)
- WOLFF E. et LUTZ H., Arch. Anat. Histol. Embryol., 1955, 37, 185 (173)
- WOLFF E. et SCHNEIDER N., C.R. Soc. Biol., 1956, 150, 845 -(173)
- WOLFF E. et SIMON D., C.R. Acad. Sc., 1955, 241, 1994 (173)
- WOLFF E. et WENIGER J.P., C.R. Acad. Sci., 1953, 237, 936 (173)
- WOLFF E. et WENIGER J.P., J. Embryol. Exper. Morphol., 1954, 2, 161 (173)
- WOLFF E. et WOLFF E., Rev. Fr. Er. Clin. Biol., 1958, 3, 945 (173)

- WOLPERS C., Naturwissenschaften, 1941, 29, 416 (50)
- YOUNGER J., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1954, 85, 202 (132)
- ZAMECNIK P.C., Feder. Proc., 1953, 12, 295 (28)
- ZAMECNIK P.C. et KELLER E.B., Biochem. J., 1954, 209, 337 (29)
- ZWEIFACH B., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1940, 8, 216 (89)

