

BBA 79477

ETUDE DE LA TENEUR INTRA ET EXTRACELLULAIRE DES ELECTROLYTES DANS LES CULTURES DE *PARAMECIES* REALISEES PENDANT UN VOL SPATIAL

RENÉ TIXADOR ^a, GÉRARD RICHOILLEY ^a, JACQUES TEMPLIER ^a, ELISABETH MONROZIES ^a, JEAN-PIERRE MOATTI ^b et HUBERT PLANEL ^a

^a Laboratoire de Biologie Médicale, Faculté de Médecine, 37, allées Jules Guesde, 31 000 Toulouse et ^b Laboratoire de Biochimie, C.H.R. La Grave, Place Lange, 31000 Toulouse (France)

(Received April 29th, 1981)

Key words. Space flight, Salt metabolism, (*Paramecium*)

Study of the intra- and extracellular electrolyte content in *Paramecia* cultures carried out during a space flight

In the results of previous investigations we have already reported that cultures of *Paramecium tetraurelia* submitted to a space flight present a stimulation of their proliferative ability, an increase in cell volume and a decrease in dry weight and in total protein content. These results suggest changes of cell metabolism induced by the space environment. In order to confirm this hypothesis we have studied the concentration of extracellular electrolytes in the control and the in-flight culture media with respect to the intracellular content of the same electrolytes. These measures concern Na, Cl, K, P, Mg, Ca. In this paper we report the results of these analyses and note that if no differences are noted for Na and Cl between control and in-flight cultures, modifications in P, K, Ca and Mg levels are observed. Generally there is a higher concentration of these elements in the in-flight medium but, in contrast, a lower intracellular content is noted for in-flight *Paramecia*. We have established a double comparison: on the one hand between control and in-flight media and between control and in flight cells, on the other hand between media and cells. All these data suggest possible changes in the membrane permeability, or of the binding proteins in *Paramecia* cultivated in hypogravity.

Introduction

Nous avons rapporté [1,2] que des *paramécies* cultivées à bord de la station orbitale soviétique Saliout 6 faisaient l'objet d'un certain nombre de modifications morphologiques et physiologiques se traduisant par:
une stimulation de l'activité prolifératrice;
une augmentation des volumes cellulaires.

Cette augmentation paradoxale du volume des *paramécies* vol nous a conduit à envisager deux hypothèses pour tenter d'expliquer ce phénomène, cet accroissement de volume pouvant être dû soit à une stimulation du métabolisme de synthèse, soit à une surcharge hydrique. Les mesures de poids sec et de teneur en protéines cellulaires devaient nous permet-

tre d'envisager que l'augmentation de volume était plutôt le résultat d'une hyperhydratation cellulaire. En effet, les mesures effectuées font état d'une diminution du poids sec et de la teneur en protéines [3] chez les *paramécies* vol.

Partant de ces données, nous avons pensé qu'il serait intéressant, dans le but de confirmer ou d'inflimer cette hypothèse, d'étudier la répartition respective de certains éléments minéraux intra et extra-cellulaires.

Protocole expérimental

(1) Préparation des cultures et chronologie de l'expérience

Nous avons utilisé *Paramecium tetraurelia*, variété

4, mating type VII. Dans le but de limiter l'expérience à la seule phase orbitale de vol, nous avons été conduits à placer les cultures d'abord à une température de 8°C, puis à 25°C. Une température de 8°C permet en effet la survie de la *Paramécie* mais bloque son activité mitotique. La préparation des cultures avant le vol a été effectuée à l'Institut des Problèmes Médico-Biologiques de Moscou. Des cellules d'un même clone, postautogames de 5 jours et en début de division, ont été isolées; les cellules soeurs ainsi obtenues ont permis de constituer deux lots, témoin et expérimental, formés d'éléments de même âge et de même équipement génique. Les cellules ont été ensuite introduites, par clonage, dans de petits sachets de polyéthylène contenant 1.3 ml de milieu de culture (infusion végétale préalablement ensemencée par *Enterobacter aerogenes*) et deux ampoules de verre renfermant un liquide fixateur sous pression (formol 85%/acide acétique 5%/éther sulfurique 10%).

128 cultures ont été ainsi réalisées pour chaque lot. Les cultures ont été introduites dans deux enceintes, maintenues à une température de $8 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les cultures expérimentales ont été transportées par avion jusqu'à l'aire de lancement; le boîtier à cultures a été ensuite transféré dans une deuxième enceinte maintenue à la même température et déjà placée à bord du vaisseau spatial Soyouz 27. Après le lancement et après arrimage à la station Saliout 6, les cultures ont été introduites à bord de la station orbitale, dans un incubateur maintenu à une température de $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ permettant aux cultures de retrouver une capacité de prolifération normale. Cette température a été maintenue constante pendant toute la durée de l'expérience.

Huit ordres de fixation ont été donnés toutes les 12 h fixant simultanément 16 cultures.

L'expérience en vol a été arrêtée au bout de 4 jours et les cultures ont été ramenées à terre le jour suivant, à l'aide du vaisseau Soyouz 26 préalablement arrimé à la station orbitale.

L'expérience témoin, synchrone, a été effectuée selon le même programme, à l'Institut des Problèmes Médico-Biologiques de Moscou. Le dépouillement de l'expérience a été réalisé dans notre laboratoire.

(2) Analyse des milieux de culture

Le taux des électrolytes contenus dans les milieux

de culture a été mesuré après concentration par lyophilisation.

Les méthodes d'analyse utilisées ont été: la photométrie de flamme pour le dosage du sodium et du potassium; la photométrie d'absorption atomique pour le magnésium et le calcium; la colorimétrie pour le phosphore; la coulométrie pour le chlore. Ces mesures réalisées sur deux pools de milieux correspondant à l'ensemble des milieux de culture témoin et vol, il n'a pas été possible d'effectuer d'analyse statistique des résultats.

(3) Analyse des éléments intracellulaires

Ces microanalyses ont été réalisées avec un spectromètre à diode 'EDAX' associé à un microscope électronique à balayage 'Jeol type J.S.M. U.3'.

Le principe de fonctionnement de l'appareil en microanalyse est très voisin de celui de la microsonde de Castaing. Les paraméries, en provenance de différents relevés, ont été lavées dans trois bains successifs d'eau distillée et étalées sur des lames d'aluminium haute pureté polies. Les paraméries ont été métallisées à l'argent, l'épaisseur du dépôt d'argent étant de l'ordre de 200 Å.

Nous avons mesuré la teneur en sodium, chlore, phosphore, magnésium, potassium et calcium présents dans un volume de $140 \mu\text{m}^3$ pour chaque paramécie. Ce volume a été déterminé par les conditions expérimentales suivantes. grossissement, 6000; diaphragme, 3; tension, 10 kV.

Cette tension d'accélération des électrons incidents a été choisie en fonction du fait qu'elle correspond à 2- à 3-fois l'énergie de la raie K_α du calcium (3.69 keV) élément le plus lourd intéressé par notre analyse, et également afin que le faisceau d'électrons traverse la totalité du corps cellulaire de la *Paramécie*.

Nous avons analysé 100 paraméries au total réparties de la façon suivante. dix paraméries pour chaque lot témoin et vol provenant des relevés de la 36, 60, 72, 84 et 96ème h. La durée du balayage d'un champ a été identique pour toutes les mesures et fixée à 40 s. L'analyse statistique des résultats a été effectuée par le test de l'écart réduit.

Resultats

(1) Mesures de la concentration des électrolytes dans les milieux de culture

Les résultats des mesures sont rapportés dans le

TABLEAU I

	Témoin		Vol	
	mequiv/l	mg/l	mequiv/l	mg/l
Sodium	144	143		
Chlore	131	118		
Potassium	2.2	3.4		
Phosphore		34		55
Calcium		96		133
Magnésium		36		44

Tableau I. Ils montrent une nette augmentation du potassium, magnésium, phosphore et calcium dans le milieu provenant des cultures vol. Par contre, la teneur en chlore et sodium est à peu près équivalente dans le milieu témoin et le milieu vol.

(2) Mesures de la teneur intracellulaire des mêmes éléments minéraux

Les résultats sont exprimés en unités arbitraires dans le Tableau II.

Les différences observées entre les paramétries du lot témoin et les paramétries du lot vol ne sont pas significatives en ce qui concerne la teneur intracellulaire de sodium, de chlore et de potassium; par contre, les paramétries du lot vol sont moins riches que les paramétries du lot témoin, en phosphore (-31.86%) en calcium (-55.80%) et en magnésium (-14.53%), les différences observées étant dans ce cas significatives au seuil de 99%.

(3) La comparaison entre la composition en élec-

TEMPOIN VOL

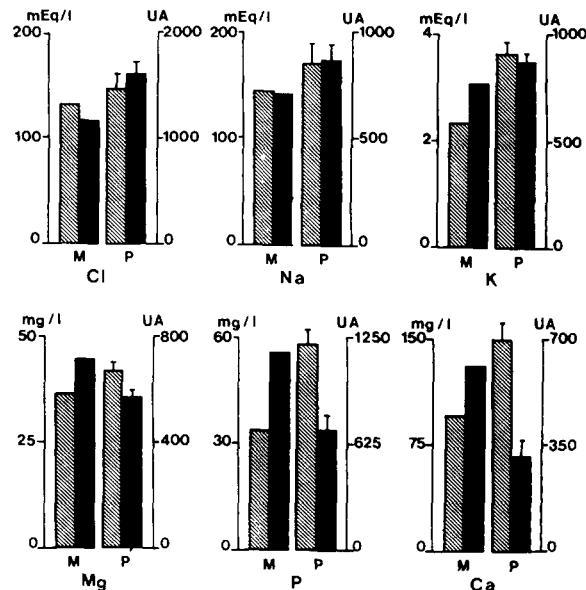


Fig. 1. Histogrammes représentant les concentrations de Cl, Na, K, Mg, P, Ca dans les milieux de culture témoin et vol (histogrammes de gauche M) et la teneur intracellulaire de ces mêmes éléments (histogrammes de droite P) U.A., unités arbitraires

trolytes des milieux de culture (M) du lot témoin et du lot vol et la teneur intracellulaire (P) de ces mêmes éléments est exprimée dans la Fig. 1.

Discussion et conclusion

Les résultats que nous avons déjà rapportés [1,2]

TABLEAU II

TENEUR INTRACELLULAIRE DES ELEMENTS MINERAUX

Tableau relatant les teneurs moyennes en unités arbitraires, les erreurs standards et la valeur de l'écart réduit ϵ (s. significatif; n.s., non significatif.)

	Témoin	Vol	ϵ	
Sodium	867.90 \pm 71.21	890.88 \pm 79.29	0.22	n.s.
Chlore	1 462.74 \pm 132.33	1 635.10 \pm 112.69	0.99	n.s.
Potassium	904.36 \pm 50.21	878.58 \pm 38.61	0.41	n.s.
Phosphore	1 190.92 \pm 100.92	811.40 \pm 91.63	2.78	s.
Calcium	696.62 \pm 59.31	307.88 \pm 27.93	5.93	s.
Magnésium	699.32 \pm 29.48	572.08 \pm 23.38	2.58	s.

ont montré que les facteurs de l'environnement spatial entraînaient une stimulation de la prolifération cellulaire et paradoxalement une augmentation du volume des *paramécies*. Des études complémentaires (mesures du poids sec et de la teneur en protéines cellulaires) devaient nous autoriser à penser que l'hypothèse de l'hyperhydratation cellulaire pouvait vraisemblablement expliquer cette augmentation de volume. Effectivement, la paramécie vol, bien que de volume supérieur à la paramécie témoin, a une masse sèche et une teneur moyenne en protéines inférieure à celle du témoin. On peut, dans une première hypothèse, penser que cette hyperhydratation est liée à une modification de la perméabilité membranaire. C'est dans le but de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse que nous avons été amenés à mesurer les teneurs extra et intracellulaires de certains éléments minéraux.

Les résultats de ces mesures montrent qu'il existe une concordance entre les teneurs intracellulaires et la concentration dans les milieux de culture d'un certain nombre d'électrolytes. Les dosages de sodium et de chlore font apparaître une répartition comparable de ces deux éléments tant dans les milieux de culture que dans les cellules des lots témoin et vol. L'accord est cependant moins démonstratif dans le cas du potassium. Pour cet électrolyte une concentration plus forte est observée dans le milieu de culture vol. Or dans ce cas, les différences de teneur intracellulaire entre les deux lots de paramécies témoin et vol ne sont pas significatives. Par ailleurs, une bonne concordance s'observe pour le calcium, le phosphore et le magnésium: aux augmentations de concentration dans le milieu de culture vol correspondent une teneur intracellulaire plus faible chez les paramécies cultivées en hypogravité.

Ces résultats plaident en faveur de plusieurs hypothèses. En effet, cette diminution du calcium intracellulaire peut être rapprochée de l'hyperexcrétion calcique urinaire déjà décrite chez les animaux et les hommes vivant en apesanteur [4]. Si dans ce cas, la perte minérale provient essentiellement d'une mise au repos partiel de l'appareil locomoteur, on peut penser, à la lumière de ces résultats, qu'une fuite du calcium intracellulaire peut contribuer également à cette hypercalciurie, cette fuite étant en rapport avec un changement éventuel de la perméabilité membranaire liée à l'absence de pesanteur. On peut aussi logiquement penser qu'une faible teneur en protéines des paramécies vol puisse être responsable du taux plus faible d'électrolytes intracellulaires par

insuffisance de protéines porteuses.

Par ailleurs, l'hypothèse d'une modification des sites de fixation de ces électrolytes dans les conditions de vol doit être envisagée, notamment en ce qui concerne le calcium. Effectivement, on sait que la paramécie utilise cet élément, fixé à la partie basale des cils où il est nécessaire à l'activité des protéines contractiles associées à ces formations [5,6]. On peut penser que l'hypogravité, en diminuant l'activité cinétique destinée à lutter contre la sédimentation diminue ainsi les besoins en calcium de la paramécie. On sait également que le calcium joue un rôle très important dans les processus de décondensation des trichocystes chez la paramécie [7] responsable des phénomènes d'exocytose considérés comme ATP dépendants. Un ralentissement de ces phénomènes de rejet de matériel intracytoplasmique constitué par des substances de déchet peut être envisagé. La paramécie vivant en état d'apesanteur consommant moins d'énergie excrète moins de substances de déchets et de ce fait a besoin de moins de calcium.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats plaide en faveur de modifications du métabolisme et plus particulièrement du métabolisme hydrominéral à l'échelon cellulaire, induites par l'environnement spatial. De nouvelles recherches seront nécessaires pour mieux préciser le mécanisme de ces troubles observés tant au niveau cellulaire qu'au niveau des organismes.

Remerciements

Les auteurs remercient Mme Cécile Asselineau pour la critique du texte et MM. Farre, Victor et Daste (Ecole Nationale Supérieure de l'Aéronautique et de l'Espace) pour leur assistance technique.

Bibliographie

- 1 Tixador, R., Richolley, G., Grechko, G., Nefedov, Y et Planel, H. (1978) C.R. Acad. Sci. Paris 287, 829-832
- 2 Tixador, R., Richolley, G., Monrozies, E. et Planel, H (1979) C.R. Acad. Sci. Paris 289, 1085-1088
- 3 Tixador, R., Richolley, G., Planel, H., Bassleer, R., Lepoint, A., De Parmentier, R., Moatti, J.P. et Monrozies, E. (1980) C.R. Acad. Sci. Paris 290, 183-185
- 4 Rambaut, P.C., Smith, M.C., Mack, P.B. and Vogel, J.M (1979) Biological Space Experiments, N.A.S.A. T.M. 58217, 1, 70-74
- 5 Eckert, R. (1972) Science 176, 473-4
- 6 Berl, S., Puskin, S. and Nicklas, J. (1973) Science 179, 441
- 7 Bilinski, M., Plattner, H and Matt, H. (1981) J. Cell Biol 88, 179-188