

Effet de l'oxygène et de *O*-(β -hydroxyethyl)-Rutosidea sur (HR)¹ l'artère mésentérique de l'embryon de poulet expantée in vitro²

La méthode de culture organotypique selon Wolff et Haffen (les explants sont déposés sur la surface d'un milieu semi-solide, contenu dans une salière; dans chaque salière, il y a 7 gouttes de gélose, 3 gouttes de tyrode et 3 gouttes d'extrait d'embryon de poulet dilué à 50% dans du tyrode) est l'une des plus indiquées pour cultiver in vitro différents organes embryonnaires du poulet. Cependant, les vaisseaux sanguins de l'embryon de poulet (dans notre cas, l'artère mésentérique prélevée après 15 jours d'incubation) ne présentent pas une bonne survie in vitro avec cette méthode: au bout de 6 jours de culture, la musculature de l'artère est complètement dédifférenciée et la paroi du vaisseau se réduit à un petit nodule fibreux³⁻⁵. Toutefois, nous avons démontré^{5,6} que l'adjonction au milieu de culture de différentes doses d'un flavonoïde semi-synthétique *O*-(β -hydroxyethyl)-rutosidea (HR)¹ permet une meilleure survie de l'artère en dehors de l'organisme: pas de signe de souffrance, la dédifférenciation de la paroi vasculaire est retardée ou empêchée, la musculature persiste et continue à se développer en culture.

En apportant ensuite une petite modification technique⁷ à la méthode originale de Wolff, nous avons obtenu des résultats sensiblement meilleurs en cultivant les artères sur le milieu standard. Au lieu de sceller à la paraffine les salières, nous les avons déposées ouvertes dans un dessiccateur en verre qui fonctionne donc comme une grande chambre de culture, dans laquelle l'humidité est maintenue par de l'ouate imbibée d'eau distillée déposée sur le fond: par le biais de ce simple artifice, on a constaté que les artères survivent mieux in vitro. Nous avons pensé que l'amélioration de la morphologie artérielle était liée à la plus grande quantité d'air, et par conséquent d'oxygène, avec laquelle les explants viennent en contact lorsqu'ils sont placés dans le dessiccateur.

Dans un travail publié récemment dans cette revue⁸, nous avons étudié les effets de différentes concentrations d'oxygène sur l'artère mésentérique de l'embryon de poulet de 15 jours d'incubation. On a constaté, que les artères, cultivées en hypoxie, montrent des signes impor-

tants de souffrance tissulaire et de dégénérescence, malgré que les salières soient déposées ouvertes dans le dessiccateur. Nous avons alors pensé que les mauvais résultats, obtenus précédemment avec la méthode originale de Wolff, étaient liés au fait que dans les salières fermées il existe un état d'hypoxie, plus ou moins marqué; cet effet délétère d'ailleurs pouvait être neutralisé, du moins en partie, par l'adjonction de HR au milieu de culture.

En nous basant sur ces considérations et ces résultats, on a eu l'idée d'étudier l'effet combiné (salières ouvertes dans le dessiccateur) de HR et de concentrations différentes d'oxygène. Nous pensions en effet que l'action de HR sur la paroi artérielle, si elle se traduisait réellement par un effet protecteur, aurait dû se manifester même en réalisant des conditions de culture particulièrement défavorables, représentées par l'hypoxie. Nous référons dans cette note les résultats ainsi obtenus.

On a prélevé et explanté l'artère mésentérique de l'embryon de poulet de 15 jours d'incubation. Les explants sont déposés sur le milieu de culture semisolide de Wolff et Haffen dans des salières, qui sont placées ouvertes dans un dessiccateur en verre où l'atmosphère est maintenue saturée d'humidité. Un certain nombre d'explants sont déposés sur le milieu standard, d'autres sur un milieu contenant 20 γ de HR par salière (donc 25-28 γ de HR/ml de milieu). A travers un bouchon en caoutchouc avec 2 canules en verre, on introduit dans le dessiccateur

¹ Zyma S.A., Nyon.

² Ces recherches ont été faites grâce à un subside du Fonds National suisse de la Recherche scientifique et de la Fondation E. Barell.

³ G. CONTI et B. CAPPELLI, *Experientia* 24, 1050 (1968).

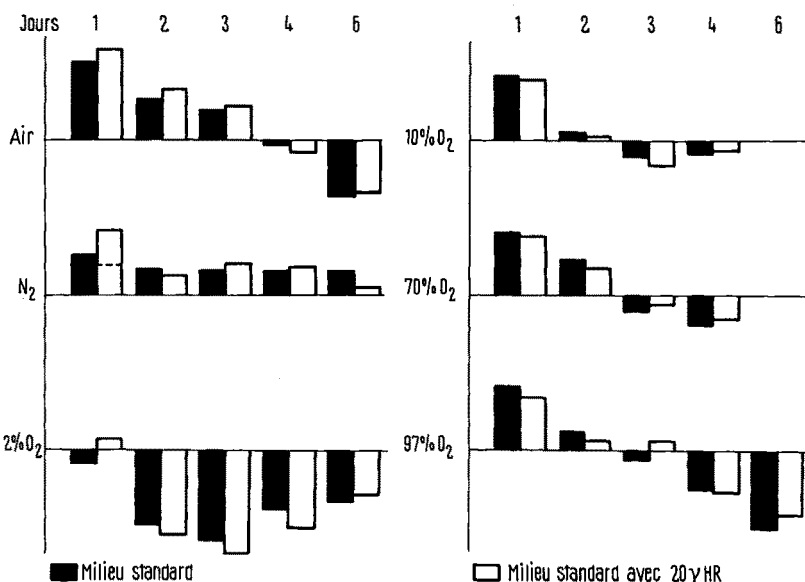
⁴ G. CONTI et B. CAPPELLI, *Bull. Ass. Anat.* 141, 728 (1968).

⁵ B. CAPPELLI, G. CONTI, L. LASZT et B. MANDI, *Angiologica* 5, 28 (1968).

⁶ B. CAPPELLI, G. CONTI, L. LASZT et B. MANDI, *Angiologica* 5, 41 (1968).

⁷ B. CAPPELLI-GOTZOS, V. GOTZOS et G. CONTI, *Experientia* 26, 158 (1970).

⁸ B. CAPPELLI-GOTZOS, G. CONTI et V. GOTZOS, *Experientia* 26, 1217 (1970).



Résumé des 6 groupes d'expériences (l'explication se trouve dans le texte).

le mélange gazeux voulu. Dans une première série d'expériences, on a introduit des mélanges gazeux contenant 2, 10, 70 et 97% d'oxygène, le CO₂ restant toujours constant au 3%, et le volume au 100% a été complété avec de l'N₂. On a fait également une série de cultures dans de l'air atmosphérique (~20% d'O₂) et une troisième série dans de l'azote pur, qui, après analyse, ne montrait pas la présence d'O₂ (dans les limites de précision de l'appareil, Mikro-Gasanalyseapparat d'après Scholander: 0,01%); cela pour réaliser une atmosphère d'anoxie totale. Les explants sont prélevés après 1, 2, 3, 4 et 6 jours de culture; lors de l'ouverture du dessiccateur pour prélever les explants (le dessiccateur contient 14 saalières), le mélange gazeux est renouvelé. Les explants sont fixés au Carnoy, inclus à la paraffine et les coupes sont colorées avec les méthodes de coloration histologique habituelle.

La Figure résume les résultats de nos observations. Le critère d'évaluation sur l'état de conservation de l'artère se base sur le système des plus et des moins, que nous avons décrit en détail dans notre précédent travail⁸. Les colonnes en noir représentent la moyenne des valeurs données aux explants cultivés sur milieu standard et les colonnes en blanc celle des cultures sur milieu standard contenant 20 γ de HR par saalière. Le graphique en haut à gauche représente des cultures dans un milieu gazeux constitué par l'air atmosphérique après 1, 2, 3, 4 et 6 jours de culture, sans et avec HR. Même si l'on peut observer une certaine différence entre standard et HR pendant les premiers jours de culture, différence pouvant indiquer une faible action favorable de cette substance sur les explants, nous ne pouvons pas considérer ces résultats comme significatifs.

Si l'on cultive les artères dans de l'azote pur, c'est-à-dire en anoxie totale, on constate, même après 6 jours de culture, que la morphologie générale du vaisseau est assez bien conservée: les 2 couches de musculature persistent, les phénomènes de dégénérescence sont très peu nombreux, la paroi de l'artère ne devient pas hypotrophique. Mais, en observant de plus près l'aspect cytologique des cellules musculaires, on voit que leur noyau est souvent pycnotique, on observe une coarctation du cytoplasme autour du noyau et parfois un décollement de l'intima de la media. L'aspect de tous les explants se maintient plus ou moins identique pendant toute la période de culture: on a comme l'impression que le métabolisme cellulaire est bloqué, empêchant ainsi soit les processus de croissance, soit tout processus dégénératif et de différenciation. Un fait nous paraît intéressant à souligner: après 1 jour de culture, les artères cultivées en présence de HR montrent un aspect tout à fait différent dans la moitié de la circonférence qui est en contact avec le milieu de culture et dans la moitié libre se trouvant directement exposée à l'azote: la première présente un aspect toujours nettement meilleur par rapport à la seconde; ce phénomène ne se présente jamais dans les artères cultivées sur milieu standard. Dans le graphique, nous avons rapporté séparément, sur la même colonne, la moyenne des valeurs données aux 2 moitiés de la paroi artérielle. La ligne continue est celle de la moitié en contact avec le milieu de culture, la ligne pointillée représente la moyenne des valeurs données à la moitié en contact direct avec l'azote. Il apparaît évident que, dans les premières 24 h de culture, HR manifeste une action protectrice sur le métabolisme cellulaire, en le maintenant actif, même en condition d'anoxie complète. Cet effet ne dure cependant pas longtemps, et après 2 jours de culture, on n'observe pas de différence entre les 2 moitiés de la paroi artérielle explantée sur le milieu contenant HR.

Avec une concentration d'oxygène de 2%, ce qui représente une hypoxie très poussée, après 1 jour de culture, on n'observe plus la différence entre les 2 moitiés des explants; toutefois, les cultures avec HR ressentent moins les effets de l'hypoxie. Après 2, 3, 4 et 6 jours de culture, HR ne manifeste plus aucun effet.

Pour les trois groupes d'expériences représentés dans les graphiques de droite, c'est-à-dire avec les concentrations de 10, 70 et 97% d'oxygène, on observe, dans l'ensemble, les mêmes phénomènes: les explants manifestent des signes de dégénérescence et de différenciation plus rapidement que lorsqu'ils sont cultivés dans l'air. L'adjonction au milieu de culture de 20 γ de HR par saalière, ne modifie pas, en général, ces phénomènes. Seulement au 3^e jour de culture, en forte hyperoxie (97% d'oxygène), nous avons observé une nette action favorable du HR sur les artères. Cela serait en accord avec l'action antioxydante attribuée aux flavonoïdes par de nombreux auteurs^{9,10}. On pourrait se demander pourquoi cette action se manifeste uniquement au 3^e jour de culture. L'expérience acquise lors de nos recherches sur les cultures organotypiques d'artères, nous a montré que le 3^e jour de culture représente un moment particulièrement critique pour la vie in vitro, où les signes de souffrance des explants deviennent particulièrement évidents. Il ne nous paraît pas hasardeux de penser que HR manifeste en particulier son action à ce moment critique.

Quant au comportement des explants cultivés sur milieu standard, les résultats obtenus confirment les effets toxiques soit de l'hypoxie, soit de l'hyperoxie sur les cultures, ce que l'on avait déjà observé précédemment⁸.

Conclusions. Les résultats illustrés dans la Figure nous montrent que l'adjonction au milieu de culture de 20 γ de HR par saalière (25-28 γ de HR/ml de milieu) n'a pas manifesté d'effet protecteur dans des atmosphères gazeuses contenant 10, ~20 (air) et 70% d'oxygène. En condition d'anoxie complète (N₂), et de forte hypoxie, il y a un effet favorable pendant les premières 24 h de culture.

L'effet de HR sur les explants en atmosphère d'azote se manifeste en maintenant actif le métabolisme cellulaire lorsqu'il est complètement bloqué par le manque absolu d'oxygène. Cette action est évidente dans la moitié de l'explant se trouvant en contact avec le milieu de culture, mais seulement après un jour de culture.

En ce qui concerne la forte hyperoxie (97% d'oxygène), on peut noter un certain effet favorable seulement au troisième jour de culture, correspondant au moment le plus critique pour la vie des artères explantées in vitro.

Summary. The effect of oxygen and of the semi-synthetic flavonoid *O*-(β -hydroxyethyl)-rutosidea (HR) on the mesenteric artery of chicken embryo explanted in vitro has been studied. The protective effect of HR on the explants appears in anoxic (N₂) and hypoxic (2% O₂) atmosphere, but only during the first 24 h of culture. In hyperoxic atmosphere (97% O₂) only after 3 days of culture HR has a protective action on the explants against the toxic effects of oxygen.

B. CAPPELLI-GOTZOS et G. CONTI

Institut d'Histologie et d'Embryologie générale de l'Université, CH-1700 Fribourg (Suisse), 20 janvier 1971.

⁹ E. W. CRAMPTON et L. E. LLOYD, *J. Nutr.* 41, 487 (1950).

¹⁰ K. HANO et M. OKA, *Folia Pharmacol. Japonica* 55, 18 (1959).