



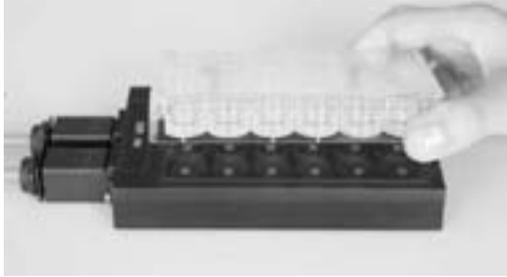
## Le suivi en ligne d'oxygène en culture cellulaire

Effets des modulateurs mitochondriaux sur la dynamique  $O_2$  des cellules mammifères

S.G. Lynn et J.J. LaPres, Département de biochimie, Michigan State University, East Lansing, MI, USA

**Contact :** PreSens Precision Sensing GmbH – **Tél :** +49 941 942 72 100 – **Email :** info@presens.de – **Web :** www.PreSens.de

Les mesures en temps réel de l'oxygène et du pH dans les cultures de cellules mammifères sont importantes pour comprendre la dynamique métabolique dans les cultures cellulaires. Le SDR SensorDish® Reader permet de suivre l'évolution dans le temps de la consommation d'oxygène des cellules en réponse aux conditions environnementales ou agressions toxicologiques. Ce type de surveillance pourrait également être utile pour d'autres applications telles que l'ingénierie tissulaire et la recherche sur les cellules souches.



**Fig. 1 - SDR SensorDish® Reader pour le suivi en ligne de l'oxygène dissous et du pH dans des plaques à 24 puits.**

### La détection d'oxygène non-invasive

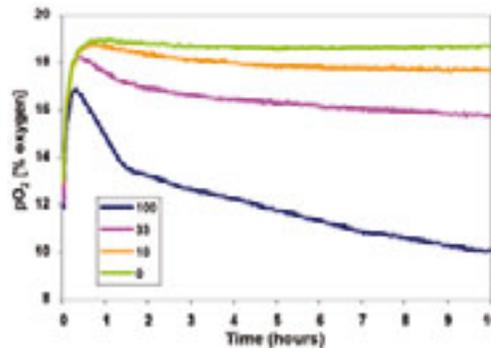
Le SDR SensorDish® Reader (Fig. 1) permet une surveillance en ligne non-invasive de l'oxygène et du pH dans des plaques de microtitration 24 puits. Dans le présent travail, le SDR a été utilisé pour surveiller les niveaux d'oxygène dans les milieux de cellules étalées à 4 densités de cellules et à des tensions variables d'oxygène (19%  $O_2$  (Fig. 2) et 7%  $O_2$  (Fig. 3)). En outre, les taux de consommation en  $O_2$  en réponse aux modulateurs mitochondriaux (Fig. 4) ont également été évalués. Les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) ont été utilisés comme types de cellules mammifères représentatifs. Le cyanure de carbonyle m-chlorophénylhydrazone (CCCP) a été utilisé comme découpleur métabolique et l'antimycine a été utilisée comme un inhibiteur de la chaîne de transport des électrons.

### Matériels et méthodes

Les cellules de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) ont été cultivées en plaques 24 puits avec capteurs d'oxygène intégrés (OxoDishes®). Les cellules ont été maintenues dans un milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), inactivé par la chaleur, 1% de pénicilline (10.000 UI / ml) / streptomycine (10.000 µg / ml), 1% de L-glutamine (200 mM), 1% acides aminés non essentiels (10mM) et 1% 1M HEPES (pH 7,8) dans des conditions normales de culture cellulaire (5% de  $CO_2$ , humidité de 35% et 37 °C). Dans tous les cas, les cellules ont été cultivées dans 1 ml de milieux par puits. La concentration d'oxygène dans le milieu de culture a été suivie pendant toute la période de culture, à intervalles prédéfinis en utilisant le logiciel SensorDish® Reader.

### Effets de la densité cellulaire

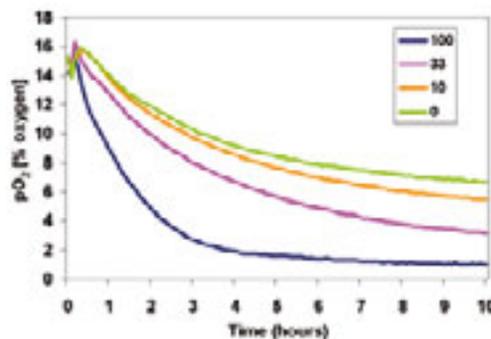
La première expérience a été conçue pour étudier les effets de la densité cellulaire sur le taux de consommation d'oxygène cellulaire et les taux d' $O_2$  ultérieurs dans les médias. Les cellules MEF ont été étalées à trois concentrations distinctes (100 000, 33 000 et 10 000 cellules /  $cm^2$ ) avec un contrôle «milieu seul». Les mesures ont été faites toutes les 2 minutes pendant 10 heures à des taux d'oxygène proches de l'atmosphère (environ 19% de  $O_2$ ). Le profil d'oxygène (Fig. 2) montre clairement un effet de la densité des cellules sur le niveau de consommation  $O_2$  de chaque traitement.



**Fig. 2 - Les taux moyens  $pO_2$  dans les milieux de culture de cellules MEF étalées à des densités différentes (100 000, 33 000; 10 000 et 0 cellules /  $cm^2$ ) et exposés à env. 19% de  $O_2$ ; n = 3 pour chaque traitement**

Une période de latence de moins d'1 heure est observée, sans doute lorsque le système s'équilibre à la température et aux niveaux d'oxygène. Après cette période, toutes les concentrations de cellules montrent une diminution du taux de  $pO_2$  dans les puits de contrôle « milieu seul ». Enfin, au cours de l'incubation, l'écart avec les puits de contrôle « milieu seul » est proportionnel au nombre de cellules initialement étalées, ce qui implique que la respiration cellulaire individuelle est équivalente à toutes les densités cellulaires testées.

La deuxième expérience a été conçue pour étudier les effets de faibles concentrations d'oxygène ambiant sur les observations de densité cellulaire dans la première expérience. Les cellules MEF ont été étalées à trois concentrations distinctes (100 000, 33 000 et 10 000 cellules /  $cm^2$ ) avec un contrôle « milieu seul », puis placées dans une atmosphère  $O_2$  à 7% et suivies toutes les 5 minutes pendant 10 heures. Le profil d'oxygène a confirmé l'effet de la densité cellulaire sur le taux de consommation d' $O_2$  de chaque traitement (Fig. 3)



**Fig. 3 Les taux moyens de  $pO_2$  dans les milieux de culture de cellules MEF étalées à des densités différentes (100 000, 33 000, 10 000 et 0 cellules /  $cm^2$ ) et exposées à l' $O_2$  à 7%, n = 3 pour chaque traitement**

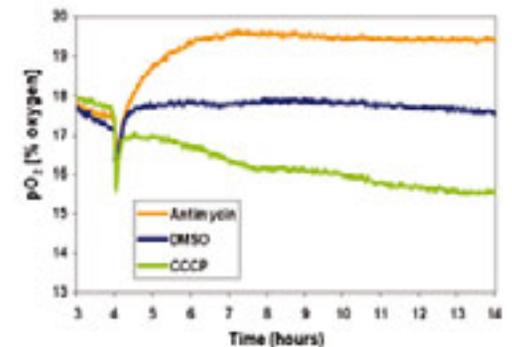
Une courte période d'équilibration de la température (<1 heure) est observée, après quoi l'oxygène résiduel dans les milieux est consommé par les cellules selon la densité. Fait intéressant, même le « milieu seul » n'est pas totalement équilibré au nouveau taux d'oxygène à 7% d' $O_2$  après 10 heures. Toutefois, l'écart avec les puits de contrôle « milieu seul » est par traitement proportionnel au nombre de cellules étalées.

### Effets des modulateurs mitochondriaux

La troisième expérience a été conçue pour étudier les effets de modulateurs spécifiques des mitochondries sur la consommation d'oxygène des cellules et les taux

de  $pO_2$  ultérieurs dans les milieux. Des cellules MEF ont été étalées à 33 000 cellules /  $cm^2$  et autorisées à adhérer à la boîte de culture pendant 4 heures. Les milieux de culture ont ensuite été remplacés par les milieux spécifiques au traitement, contenant soit 1 µl/ml de diméthylsulfoxyde (DMSO, véhicule contrôle); 10 µM de cyanure de carbonyle m-chlorophénylhydrazone (CCCP); ou 10 µM d'antimycine.

Chaque puits a ensuite été recouvert avec 1 ml d'huile minérale et la plaque a été incubée dans des conditions standard de culture (5% de  $CO_2$ , 35% d'humidité, 37 °C, et 19% d'atmosphère  $O_2$ ) et suivie toutes les 2 minutes pendant 10 heures. Le profil d'oxygène montre un effet prononcé du traitement sur le niveau de consommation en  $O_2$  des cellules (Fig. 4).



**Fig. 4 - Taux moyens de  $pO_2$  dans les milieux de culture de cellules MEF exposés à l'antimycine, DMSO et CCCP à 4 heures; n = 4 pour chaque traitement**

Les mesures à partir de 3 à 4 heures indiquent qu'il y a eu peu de variation dans les traitements avant la réception des milieux dosés. Dans les 30 minutes suivant le dosage, des différences observables sont apparues dans les courbes de consommation d'oxygène entre les traitements. Le DMSO, le véhicule contrôle, a causé peu de variations dans le taux moyen d' $O_2$  dans les cellules MEF. Un état d'équilibre entre la consommation d'oxygène et d'infiltration d'oxygène a été obtenu à environ 17,5% d' $O_2$ . L'antimycine, un inhibiteur du complexe III de la chaîne de transport d'électrons, a montré une diminution observable dans le taux de consommation d'oxygène des cellules, ce qui a entraîné un état d'équilibre plus élevé que celui obtenu avec le DMSO. Enfin, le traitement CCCP, un découpleur mitochondrial, a entraîné une augmentation observable dans la consommation d'oxygène des cellules.

### Conclusion

En utilisant le SDR SensorDish® Reader, nous avons surveillé les taux d'oxygène dans les milieux de cultures de cellules mammifères et nous avons observé une consommation d'oxygène selon la densité cellulaire. Les différences selon la densité, observées à 19% d' $O_2$ , ont également été observées à 7% d' $O_2$ , un taux d'oxygène physiologiquement plus révélateur. En outre, les milieux de culture cellulaire sans cellules ont mis plus de 10 heures pour atteindre l'équilibre en cas d'exposition à 7% d' $O_2$ .

Par conséquent, la préincubation du milieu au taux d'oxygène souhaité est recommandée. Enfin, on a observé que le CCCP provoquait une augmentation de la demande en oxygène des cellules tandis que l'antimycine provoquait une baisse de la demande en oxygène des cellules par rapport au véhicule contrôle. Le SDR SensorDish® Reader permet une quantification rapide et constante des taux d'oxygène dans les milieux qui peut être utilisée comme mesure de la demande en oxygène des cellules et de la fonction métabolique.