

**Modifications des conditions de culture cellulaire en haute altitude.**

par L. MALASPINA, J. C. QUILICI et J. ERGUETA COLLAO.

Dans les derniers mois de 1968, nous avons pratiqué des cultures de leucocytes humains en altitude, à l'occasion d'une enquête portant sur le caryotype des Amérindiens Aymara et Quechua vivant sur l'Altiplano péruano-bolivien. Ces travaux furent effectués aux laboratoires de cytogénétique de l'Instituto Boliviano de Biología de Altura (La Paz) et de l'Hôpital Nunez Butron de Puno. Au début nous utilisons la microtechnique classique que nous appliquons de manière satisfaisante au laboratoire du Centre d'Hématologie du C.N.R.S. (Toulouse) (1\*).

Celle-ci ne donna pas de bons résultats et il nous est apparu nécessaire de reprendre les différents paramètres pour adapter cette microtechnique aux conditions écologiques particulières dans lesquelles se déroulait cette enquête.

*Matériel et Méthode.* — La technique classique de culture des leucocytes du sang s'effectue en mettant une dizaine de gouttes de sang humain total dans un milieu nutritif additionné de phytohémagglutinine. Les tubes de cultures sont incubés pendant 72 h, à 37°C. A ce moment, on effectue un blocage des mitoses par la colchicine, puis un choc hypotonique pour obtenir une bonne dispersion des chromosomes ; on fixe enfin par le Carnoy acétique.

Les préparations ainsi obtenues permettent généralement d'observer de 50 à 100 mitoses en pseudométaphase pour chaque lame.

Nous avons effectué tant à l'Institut de La Paz qu'au Laboratoire de Cytogénétique de l'Hôpital de Puno, une soixantaine d'examen. L'utilisation de cette méthode n'a donné que des préparations très pauvres en divisions cellulaires (une à deux mitoses par lame).

Nous avons alors essayé de prolonger le temps d'incubation des cultures de 24 h : les mitoses sont apparues beaucoup plus nombreuses.

Par la suite, nous avons cherché à améliorer encore la technique en faisant varier quelques points de détails. Ceci nous a amenés à utiliser la méthode suivante :

*Technique.* — 15 gouttes de sang veineux ou capillaire sont mises dans un milieu de culture contenant : 15 ml de TC 199 (Institut Pasteur) + antibiotiques et 5 ml de sérum humain O Rh (+) ou sérum bovin préparé sur place ; 4 gouttes de phytohémagglutinine M ; 3 gouttes de phytohémagglutinine P ; 4 gouttes de Liquémine Roche, ce qui est conforme à la technique habituelle. Par contre, le sérum AB a été remplacé par 5 ml de sérum humain O Rh (+) ou par du sérum

(1\*) J. Ducos et P. Colombies, *C. R. Soc. Biol.*, 1967, t. 161, p. 1452.

bovin préparé sur place. En effet, les fréquences relatives du groupe ABO chez les Indiens de l'Altiplano (2\*) ne permettent pratiquement pas de disposer de sérum AB. En fait, les cultures donnent de très bons résultats avec le sérum O, les anticorps anti-A et anti-B n'apparaissant freiner en rien la pousse cellulaire (mais notons toutefois que la quasi-totalité des sujets étudiés appartenaient au groupe O).

Les tubes de cultures sont placés pendant 96 h (au lieu de 72 h) dans une étuve à 37°C et agités deux fois par jour. Après ce délai, on ajoute dans chaque tube de culture 2,5 ml d'une solution de colchicine à 0,04 % et l'on replace les tubes 1 h 30 en étuve.

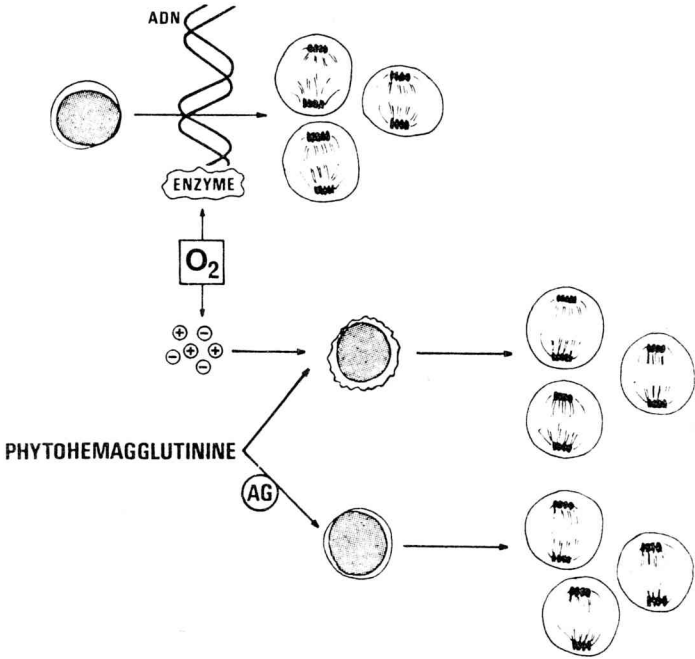


Fig. 1. — Action de certains facteurs sur le rythme des mitoses lors des cultures cellulaires.

A ce moment, on effectue le choc hypotonique. Pour cela après centrifugation, on ajoute au culot cellulaire 15 à 20 ml d'une solution hypotonique, soit de citrate à 0,95 %, soit de sérum bovin dilué au 1/7 dans l'eau distillée. Les cellules sont remises en suspension et placées à 37°C pendant 10 mn.

La suite de la préparation se poursuit selon la technique classique : fixation au Carnoy, étalement à la flamme, hydrolyse par acide chlorhydrique dilué et porté à 60°C, enfin coloration au Giemsa.

(2\*) J. Ruffie, G. Larrouy et H. Vergnes, *Nouv. Rev. Fr. Hémat.*, 1966, t. 6, p. 544.

**Résultats.** — Chaque culture bloquée par la colchicine après 96 h d'incubation à 37°C a donné un nombre élevé de mitoses, toujours suffisant pour faire une étude précise du caryotype d'un sujet donné.

Nous avons effectué ainsi, avec succès, 160 cultures et préparations pour faire l'étude du caryotype des populations andines. Nos résultats sont reportés sur la fig. 2 (qui indique les fréquences et l'intensité des pousses positives à 4 000 mètres d'altitude, après 72 h et après 96 h).

**Discussion.** — Ces résultats démontrent que le rythme des mitoses est ralenti en haute altitude (4 000 m). Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce phénomène.

1. On peut penser qu'il s'agit d'un ralentissement de la division cellulaire, elle-même liée à une diminution de la pression d'oxygène. Cette hypothèse est assez vraisemblable et demanderait à être vérifiée

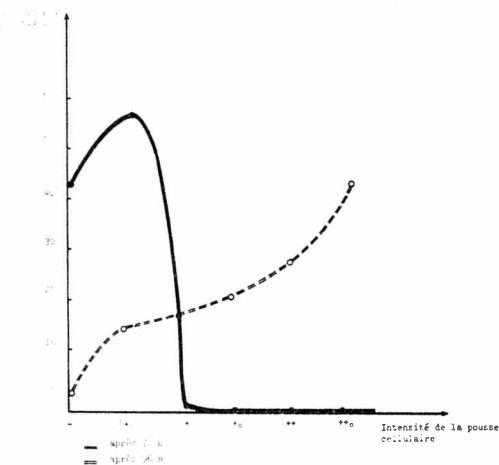


Fig. 2. — Répartition de l'intensité de la pousse cellulaire en fonction du temps de culture.

Nombre de mitoses par lame : -- négatif ; (+) 1 à 5 ; + 5 à 15 ; +. 15 à 50 ; ++ 50 à 100 ; +\*. 100 à 200.

en laboratoire. On a déjà noté que, sur l'Altiplano, les processus de cicatrisation sont plus longs à intervenir. Il est probable que la diminution de la pression d'oxygène se traduit par un ralentissement global du métabolisme cellulaire et donc de la vitesse de duplication de l'ADN.

2. Mais il convient de discuter aussi l'action de la phytohémagglutinine. Deux modes ont été envisagés.

a. Pour les uns, la phytohémagglutinine agirait par mécanisme immunologique. L'apport de la phytohémagglutinine dans le milieu de culture contenant un antigène chez un sujet sensibilisé créerait un conflit antigène-anticorps qui déclencherait une réponse lymphocytaire et donc une multiplication des cellules.

Or, nous avons déjà signalé des taux de  $\gamma$ -globuline abaissés chez les Amérindiens de l'Altiplano (2\*). Une diminution de l'intensité et de la rapidité de la réaction antigène-anticorps permettrait d'expliquer ce retard de la division.

b. D'autres auteurs, devant la réponse constante des lymphocytes au contact de la phytohémagglutinine, pensent que cette réaction n'est pas immunologique, mais physico-chimique : la phytohémagglutinine entraînerait des modifications de la membrane cellulaire qui induirait la division.

Il est possible alors que la diminution de la pression partielle d'oxygène entraîne une modification de l'équilibre ionique provoquant ce ralentissement des mitoses.

(*Laboratoire de cytogénétique de l'Instituto Boliviano de Biología de Allura, La Paz, Bolivie ; Laboratoire de cytogénétique de l'Hôpital Régional Nunez Butron, Puno, Pérou ; Centre d'Hématologie et R.C.P. n° 87 du C.N.R.S., C.H.U. de Purpan, 31 - Toulouse*).

---

(3\*) A. M. Salles-Mourlan, Contribution à l'étude de l'influence de quelques modifications des conditions de prélèvement, de conservation et de culture sur la multiplication « in vitro » D.E.S. Faculté des Sciences de Toulouse, 1967.