

> La culture cellulaire est une approche expérimentale largement utilisée depuis les débuts de la recherche en cancérologie. Cette technique a apporté une masse considérable d'informations sur la biologie des cellules cancéreuses et demeure encore dans bien des cas une étape incontournable. Or, si dès le début de la mise au point des cultures cellulaires une attention toute particulière a été apportée afin d'assurer une température d'incubation physiologique, le problème posé par la pression partielle en oxygène (pO_2) des milieux de culture est encore largement sous-estimé voire négligé. <

Pression partielle en oxygène et culture de cellules cancéreuses

Un demi-siècle d'artéfacts ?

Didier Wion, Maurice Dematteis, Marie-France Nissou, Céline Cretallaz, François Berger, Jean-Paul Issartel

Normoxie expérimentale en culture = hyperoxie physiologique

Actuellement, les cultures cellulaires effectuées dans des incubateurs « classiques » sous 5 % de CO_2 se font sous la pression atmosphérique d' O_2 , qui est d'environ 160 mm Hg ($\approx 21\% O_2$). Cette pO_2 dite « atmosphérique » est toutefois légèrement inférieure dans les incubateurs de culture cellulaire dont l'atmosphère présente une hygrométrie élevée et contient 5 % de CO_2 . Or *in vivo*, la pression partielle en oxygène dans les tissus n'atteint jamais une telle valeur. Ainsi, la pO_2 du sang artériel est de 95 ± 5 mmHg, celle du sang veineux est d'environ 40 mmHg, et cette pression varie entre 6 et 34 mmHg (1-5 % O_2) au niveau de la plupart des tissus [1, 2]. Le mode de culture *in vitro* des cellules issues de tissus humains impose donc de ce fait une « hyperoxie » artificielle aux conséquences très imparfaitement contrôlées. Ce problème posé par la pO_2 des cultures cellulaires est probablement encore plus crucial dans le cas spécifique des cellules tumorales dont on sait qu'elles sont confrontées *in vivo* à des conditions hypoxiques, du fait d'une masse tumorale exagérée et d'une vascularisation souvent insuffisante en dépit du phénomène d'angiogenèse. Ainsi, la « normoxie » expérimentale des cultures de cellules tumorales, qui correspond aux conditions de culture cellulaire classiques définies il y a près d'un siècle à une époque où les pressions partielles



D. Wion, M.F. Nissou, J.P. Issartel : Inserm U836, Équipe 7, Institut des Neurosciences, Bâtiment Edmond J. Safra des Neurosciences, chemin Fortuné Ferrini,

Site Santé, 38706 La Tronche Cedex, France.

didier.wion@ujf-grenoble.fr

C. Cretallaz : Université Joseph Fourier, Grenoble 1, 38042 Grenoble, France.

M. Dematteis : Inserm ERI17, 38042 Grenoble, France.

Université Joseph Fourier, Grenoble 1, Faculté de Médecine, 38402 Grenoble, France.

CHU A. Michallon, Laboratoires du Sommeil et EFCR, 38043 Grenoble, France.

F. Berger : Inserm U836, Équipe 7, Institut des Neurosciences, 38042 Grenoble, France.

Université Joseph Fourier, Grenoble 1, Faculté de Médecine, 38402 Grenoble, France.

en O_2 des tissus commençait juste à être étudiées, est en fait une condition d'hyperoxie. En d'autres termes, la « normoxie » expérimentale ou « culturelle » de nos milieux de culture correspond à une « hyperoxie » physiologique. Le manque de vigilance fréquent vis-à-vis de ce phénomène vient probablement du fait que les cellules normales ou tumorales survivent et sont capables de croître même sous la pression atmosphérique de 21 % de O_2 ($pO_2 \approx 160$ mmHg). Néanmoins, ces conditions « hyperoxiques » ne sont pas dépourvues de conséquences et altèrent très probablement de manière négative la physiologie cellulaire. Pour preuve l'observation faite dès 1972 mentionnant que la diminution de



la pression en oxygène des milieux de culture en deçà de la pO_2 atmosphérique a un effet bénéfique sur les cellules en augmentant l'efficacité d'ensemencement [3]. Cette constatation a été confirmée à plusieurs reprises [4-7]. De plus, il a été montré que le fait de cultiver des fibroblastes humains dans une atmosphère où les pourcentages d' O_2 sont inférieurs aux 20 % « conventionnels » retarde leur entrée en sénescence et augmente le nombre de doublements de population [5, 7-9]. Ces différences de croissance selon la richesse en O_2 du milieu pourraient être liées, entre autres, au stress oxydatif qu'entraîne l'hyperoxie « culturelle » [8, 10]. Enfin, plus récemment, l'influence de la pO_2 des conditions de culture a été étudiée dans le cas de cellules souches. C'est ainsi que les conditions de culture « classiques » (20 % O_2) apparaissent aujourd'hui préjudiciables au maintien des cellules souches qui requiert un pourcentage proche de 1-3 % [2, 11-13]. Par ailleurs, dans le cas des tumeurs gliales du cerveau (glioblastomes), la diminution de la pO_2 favorise le maintien de la population exprimant la protéine CD133 en culture [14] - population à laquelle on attribue selon certaines publications un rôle critique en terme de tumorigénicité [15].

Variations de la pression d'oxygène au cours de la culture

Toutefois, l'opinion selon laquelle la pO_2 des cultures cellulaires est hyperoxique par rapport aux conditions physiologiques n'est que partiellement correcte. En effet, si la pO_2 d'un milieu de culture fraîchement préparé se situe bien aux alentours de 160 mmHg, cette pO_2 diminue au cours de la culture cellulaire du fait de la respiration cellulaire. Cet effet est d'autant plus marqué que le milieu de culture est, sauf dans le cas de cultures « roller »¹, un milieu stagnant qui limite les échanges gazeux. C'est ainsi que les cellules cultivées dans les conditions « standard » actuelles sont bien soumises à chaque changement de milieu à un apport de milieu de culture hyperoxique, mais cette hyperoxie pourra n'être que transitoire compte tenu de la consommation d'oxygène par les cellules. De ce fait, le milieu atteindra progressivement et transitoirement une normoxie péricellulaire en fonction du métabolisme et de la densité cellulaires, et pourra même devenir hypoxique lorsque le tapis cellulaire sera très confluent [16].

Le cas des cultures sphéroïdes

La complexité de cette situation expérimentale prend par ailleurs une dimension supplémentaire lors de la culture de cellules cancéreuses sous forme de sphéroïdes. Dans ce cas, les cellules (qui ne forment pas un tapis cellulaire au fond de la boîte de culture, mais poussent sous la forme d'agglomérats sphériques multicellulaires) sont soumises à des valeurs de pO_2 très hétérogènes du fait de l'établissement d'un gradient de pO_2 au sein de chacun des sphéroïdes [17-19]. En effet, du fait de la limitation de la diffusion de l'oxygène au sein du sphéroïde et de la consommation de l'oxygène par les cellules qui le composent, les cel-

lules de la périphérie sont exposées à une pO_2 supérieure à celle qui existe au plus profond du sphéroïde. Les cellules se développent ainsi dans un milieu dont la tendance hypoxique sera plus ou moins marquée en fonction de paramètres biophysiques peu contrôlables (densité de cellules, taille du sphéroïde, vitesse de consommation d'oxygène...). Par ailleurs, dans les sphéroïdes, d'autres gradients liés au métabolisme cellulaire (pH, lactate, glucose, facteurs de croissance...) vont s'ajouter au gradient d' O_2 . Dans le cas de l'oxygène, l'existence de ce type de gradient n'est pas retrouvée dans les cultures monocouches [16]. Ces conditions hétérogènes et imparfaitement définies au sein d'une même culture pourraient néanmoins avoir l'avantage pour l'expérimentateur, à la condition d'en maîtriser les paramètres, de « mimer » *in vitro* certains aspects retrouvés *in vivo* dans les masses tumorales mal perfusées.

Péché de facilité ?

La définition des conditions de pO_2 pour la culture de cellules tumorales, et notamment pour celles cultivées sous forme de monocouche, devrait donc à terme devenir aussi incontournable que le contrôle de la température ou du pH. Dans ces conditions, pourquoi continue-t-on à cultiver les cellules cancéreuses sous 20-21 % O_2 ? Une réponse avancée dans la revue « *Cancer Cell* » : « parce que c'est plus facile, qu'on a toujours fait comme ça et que les cellules se divisent bien dans une atmosphère contenant 21 % d' O_2 » [20] alimente l'insatisfaction. En effet, si ces arguments devaient être retenus, ils suggéreraient que nous sélectionnons certaines conditions expérimentales sur la base de la facilité, du conformisme et de la productivité. Le problème de la pO_2 des conditions de culture pourrait alors être le reflet d'une autre crise culturelle plus profonde. La lutte contre le cancer doit pouvoir remettre en cause les protocoles expérimentaux les mieux établis, et parmi eux ceux utilisés en culture cellulaire. On pourra bien sûr objecter que les conditions de culture cellulaire sont forcément très éloignées des conditions physiologiques et que le problème soulevé ici avec la pO_2 peut être généralisé à une multitude d'autres constantes physiologiques. Répondre au problème des meilleures modalités d'oxymétrie nécessaires *in vitro* à la culture des cellules cancéreuses n'est cependant pas qu'un problème académique ; c'est une question cruciale pour assurer la pertinence des expériences menées *in vitro* dans la plupart des laboratoires, avec des conséquences importantes sur les conclusions physiopathologiques et thérapeutiques. ♦

Oxygen tension and cancer cells cultures: half a century artefacts?

¹ On désigne ainsi des cultures de cellules effectuées dans des flacons de culture qui sont agités en permanence.

