

Le tréhalose : un cryoprotecteur très efficace ?

La préservation à long terme des cellules et des tissus représente un enjeu biologique et biotechnologique important, en particulier dans le domaine des transplantations de cellules et d'organes. La technique la plus couramment utilisée est la cryopréservation, qui implique l'addition de cryoprotecteurs comme le diméthyl sulfoxyde (DMSO), le glycérol ou l'éthylène glycol. Des études récentes montrent que le tréhalose pourrait non seulement être un cryoprotecteur très puissant mais aussi préserver la survie de cellules déshydratées [1-3].

Le tréhalose est un disaccharide présent à forte concentration dans les organismes vivants, comme la levure de boulanger, certaines plantes et de nombreuses bactéries, qui résistent à la déshydratation, un phénomène appelé anhydrobiose. Cette capacité de survie des levures après déshydratation est corrélée à leur capacité de synthèse du tréhalose. L'action protectrice de ce sucre relève probablement de deux mécanismes conjoints : d'une part « le remplacement de l'eau » par la capacité des groupements hydroxyle du tréhalose à interagir physiquement avec les résidus polaires des membranes et protéines; d'autre part la possibilité de former un liquide extrêmement visqueux (mécanisme de vitrification) ralentissant les réactions chimiques ce qui permet la stabilité et la quiescence des systèmes vivants [4]. Cependant, une des limites de l'utilisation du tréhalose est son impossibilité, en l'absence de transporteur spécifique, à franchir les membranes cellulaires.

Beattie *et al.* ont, les premiers, montré que le tréhalose permettait de préserver des cellules pancréatiques fœtales humaines pendant leur congélation [1]. Les auteurs ont exploité le fait que, pendant la

congélation de ces cellules, la température de la phase de transition vers l'état solide des lipides membranaires est supérieure à la température de congélation. Pendant cette phase, les membranes deviennent plus perméables et permettent l'entrée de ce disaccharide dans les cellules. Après leur décongélation, les cellules, transplantées dans des souris *nude*, sont restées viables trois mois et contenaient la même quantité d'insuline que des cellules transplantées mais non congelées.

Eroglu *et al.* ont choisi de perméabiliser les membranes des cellules par l'hémolysine du staphylocoque doré qui forme des pores transmembranaires heptamériques. Il s'agit d'un pore modifié, appelé H5, qui a la caractéristique de se fermer si des concentrations micromolaires de Zn^{2+} sont ajoutées, ce qui permet d'éviter l'action cytolytique de cette toxine [5]. Les auteurs ont tout d'abord montré que l'incubation de fibroblastes en présence de H5 et de tréhalose n'avait qu'un effet minime sur la survie des cellules, puisque 18 heures après le traitement, seules 15 % des cellules ne survivaient pas et ne se multipliaient plus [2]. Dans un deuxième temps, ils ont montré l'efficacité de ce traitement sur la survie des cellules congelées une heure dans l'azote liquide, puis décongelées : plus des deux tiers sont en effet encore vivantes et capables de se multiplier, si bien qu'après 18 heures de culture, la population de ces fibroblastes représente 70 % de celle de cellules témoins non congelées. En revanche, si le traitement comprend non plus le pore H5, mais le pore non modifié de l'hémolysine, qui reste constamment dans un état ouvert, moins de 20 % des cellules sont encore vivantes immédiatement après leur décongélation. Elles sont surtout incapables de se multiplier et

leur survie à plus long terme est gravement compromise. Des résultats semblables ont été observés avec des kératinocytes humains en culture primaire.

Il apparaît donc que le tréhalose, utilisé à des concentrations plus faibles que celles des autres cryoprotecteurs puisque de l'ordre de 0,2 M, et associé à une méthode simple pour le faire pénétrer dans les cellules, pourrait représenter une alternative intéressante pour la cryopréservation. Le chemin est encore long avant son éventuelle utilisation pour un usage thérapeutique, en particulier en ce qui concerne le degré et la qualité de survie des cellules après leur congélation pendant de longues périodes, et l'absence d'effets nocifs de ce disaccharide.

1. Beattie GM, Crowe JH, Lopez AD, Cirulli V, Ricordi C, Hayek A. Trehalose : a cryoprotectant that enhances recovery and preserves function of human pancreatic islets after long-term storage. *Diabetes* 1997; 46: 519-23.
2. Eroglu A, Russo MJ, Bieganski R, *et al.* Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 163-7.
3. Guo N, Puhlev I, Brown DR, Mansbridge J, Levine F. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 168-71.
4. Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 73-103.
5. Walker B, Kasianowicz J, Krishnasastri M, Bayley H. A pore-forming protein with a metal-actuated switch. *Protein Eng* 1994; 7(5) : 655-62.

Pascale Borensztein

Inserm U. 474, Maternité Port-Royal, 123, boulevard de Port-Royal, 75014 Paris, France.