



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2000/05/18
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2000/11/23
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2010/10/05
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2001/10/22
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2000/001336
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2000/069259
(30) Priorité/Priority: 1999/05/18 (FR99/06434)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *A01N 1/02* (2006.01)
(72) Inventeurs/Inventors:
LOPEZ, GEORGES ANTOINE, FR;
RAMELLA VIRIEUX, SILVINA, FR
(73) Propriétaire/Owner:
INSTITUT GEORGES LOPEZ, FR
(74) Agent: BROUILLETTE & ASSOCIES/PARTNERS

(54) Titre : SOLUTION AQUEUSE DE CONSERVATION DE TISSUS ET D'ORGANES
(54) Title: AQUEOUS SOLUTION FOR PRESERVING TISSUES AND ORGANS

(57) Abrégé/Abstract:

Solution aqueuse de conservation de tissus et d'organes, caractérisée en ce qu'elle est du type extracellulaire et en ce qu'elle comprend des ions calcium (Ca^{2+}) et du polyéthylène glycol purifié de poids moléculaire égal à 35 000.





DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A01N 1/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 00/69259 (43) Date de publication internationale: 23 novembre 2000 (23.11.00)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/01336 (22) Date de dépôt international: 18 mai 2000 (18.05.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/06434 18 mai 1999 (18.05.99) FR (71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): CAIR L.G.L [FR/FR]; ZI Le Pontet, F-69380 Civrieux D'Azergues (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): LOPEZ, Georges, Antoine [FR/FR]; Rue des Phily, F-69290 Craponne (FR). RAMELLA VIRIEUX, Silvina [FR/FR]; 31, rue du Bât D'Argent, F-69001 Lyon (FR). (74) Mandataires: VUILLERMOZ, Bruno etc.; Cabinet Laurent & Charras, 20, rue Louis Chirpaz, Boîte postale 32, F-69131 Ecully (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>
<p>(54) Title: AQUEOUS SOLUTION FOR PRESERVING TISSUES AND ORGANS (54) Titre: SOLUTION AQUEUSE DE CONSERVATION DE TISSUS ET D'ORGANES (57) Abstract The invention relates to an aqueous solution for preserving tissues and organs, characterized in that it is an extracellular-type solution and in that it contains calcium ions (Ca²⁺) and purified polyethylene glycol with a molecular weight of 35 000. (57) Abrégé Solution aqueuse de conservation de tissus et d'organes, caractérisée en ce qu'elle est du type extracellulaire et en ce qu'elle comprend des ions calcium (Ca²⁺) et du polyéthylène glycol purifié de poids moléculaire égal à 35 000.</p>		

SOLUTION AQUEUSE DE CONSERVATION DE TISSUS ET D'ORGANES.

L'invention se rapporte à une solution aqueuse de conservation de tissus et
5 d'organes. Par « tissus », on désigne notamment mais de façon non limitative les
veines, artères, valves, vaisseaux... . Par "solution de conservation d'organes", on
désigne une solution aqueuse de conservation unique apte à conserver une
multitude d'organes, et notamment, mais de façon non limitative, le foie, le coeur et
le rein.

10

Après avoir été prélevés chez le donneur, le ou les organes ou les tissus, sont
soumis avant d'être greffés chez un receveur, à une période inévitable d'ischémie.
Par conséquent, les liquides mis en oeuvre pour la conservation d'organes doivent
remplir simultanément trois objectifs, à savoir :

- 15
- laver le greffon du sang résiduel,
 - refroidir l'organe,
 - assurer une prévention et une protection efficace contre les lésions
provoquées par l'ischémie.

20 La méthode de conservation d'organes la plus répandue est la conservation
hypothermique statique. Cette méthode consiste à rincer l'organe prélevé avec une
solution de conservation refroidie, puis à maintenir l'organe dans cette solution
jusqu'au moment de la greffe ultérieure. Cependant, cette méthode assure la
conservation des organes pour seulement une période limitée, cette période ne
25 dépassant guère 24 heures pour le rein, 12 à 18 heures pour le foie et 4 à 6 heures
pour le coeur.

Les liquides de conservation d'organes proposés jusqu'alors présentent des
compositions différentes en fonction des organes à conserver.

30

Ainsi, sont préconisés pour la conservation du rein, le liquide EURO COLLINS commercialisé par FRESENIUS, résultant d'un mélange du type intracellulaire (concentration en potassium supérieure à la concentration en sodium) exclusivement ionique c'est-à-dire exempt de toute macromolécule et le
5 liquide BELZER-VIASPAN connu également sous le nom de UW (Université du Wisconsin) commercialisé par DUPONT.

Concernant la conservation hépatique, celle-ci peut être assurée au moyen de la solution BELZER-VIASPAN précitée.

10

Enfin, on a proposé pour la conservation de greffons cardiaques, le liquide SAINT THOMAS résultant d'un mélange purement ionique du type extracellulaire (concentration en sodium supérieure à la concentration en potassium) exempt de macromolécule, commercialisé par les Laboratoires AGUETTANT.

15

Les compositions de chacun de ces liquides figurent dans le tableau 1 ci-après.

Tableau 1

	SAINT-THOMAS	EURO COLLINS	BELZER
Sodium (mM)	120		30
Potassium (mM)	16		125
Raffinose (mM)			30
Lactobionate (mM)			100
Glutathion (mM)			3
Adénosine (mM)			5
Allopurinol (mg/l)			1
HEA (g/l) Hydroxyéthyl amidon PM : 250 000			50
MgSO ₄ (mM)			5
H ₂ PO ₄ (mM)			25

KH ₂ PO ₄ (g/l)		2,0	
Glucose (g/l)		25	
HCO ₃ (mM)	10		
Cl (mM)	160		
Mg (mM)	16		
CaCl ₂ (mM)	1,2		
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O (g/l)		9,70	
KCl (g/l)		1,12	
MgSO ₄ 7H ₂ O (g/l)		7,38	
NaHCO ₃ (g/l)		0,86	
Osmolalité (mOsm/Kg)	290	320	300

Comme déjà dit et comme le montre le tableau récapitulatif ci-dessus, la solution retenue pour la conservation cardiaque est du type extracellulaire (riche en sodium), alors que la solution de conservation pour la conservation du rein et du foie est du type intracellulaire (riche en potassium).

Comme déjà dit, le principal inconvénient de ces solutions est de ne pouvoir être aptes à assurer la conservation de tous les organes.

10 En d'autres termes, le problème que se propose de résoudre l'invention est de fournir une solution unique susceptible d'assurer la conservation de tout organe, et notamment du foie, rein et coeur.

15 Un autre objectif de l'invention est de préparer une solution qui soit apte non seulement à conserver les organes, mais également à conserver les tissus.

Un autre objectif de l'invention est d'augmenter la durée et la qualité de la conservation.

Pour résoudre ces problèmes, l'invention propose une solution aqueuse de conservation de tissus et d'organes.

Cette solution se caractérise en ce qu'elle est du type extracellulaire et en ce
5 qu'elle comprend des ions calcium (Ca^{2+}) et du polyéthylène glycol purifié de poids moléculaire égal à 35 000.

Dans la suite de la description et dans les revendications, par solution du type extracellulaire, on désigne une solution comprenant une concentration en
10 sodium (Na^+) d'au moins 30 millimolaires, avantageusement 125 millimolaires.

Pour une concentration inférieure à 30 millimolaires, on obtient une solution cardioplégique.

15 Le Demandeur a constaté que de façon surprenante, la solution de type extracellulaire de l'invention permettait d'assurer non seulement la conservation du cœur et des tissus, mais également la conservation d'organes tels que le rein et le foie, pour lesquels étaient proposées jusqu'alors des solutions du type intracellulaires.

20

En outre et de façon tout aussi surprenante, le Demandeur a constaté que la présence de calcium au sein de la composition extracellulaire permettait de conserver non seulement le cœur, mais également les autres organes du type foie et rein, pour lesquels le calcium était jusque là absent.

25

Enfin, alors que toutes les solutions comprenant des macromolécules, dont le poids moléculaire est de 20 000, le Demandeur a découvert que l'utilisation de macromolécule du type polyéthylène glycol de poids moléculaire égal à 35 000 permettait d'améliorer la conservation des organes.

30

5

Dans une forme de réalisation avantageuse, le PEG est un PEG purifié non linaire, c'est-à-dire un PEG synthétisé à partir de molécules de PEG de poids moléculaire inférieur.

5 En pratique, la purification est effectuée par dialyse en ayant pour objectif de supprimer toutes les molécules issues de l'oxydation du PEG ou nécessaires à sa fabrication en particulier les molécules de poids moléculaire inférieur à 15 000.

Pour assurer le redémarrage cardiaque dans le cas de la conservation du
10 coeur, la concentration en ions Ca^{2+} est comprise entre 0,1 et 2 millimolaires, avantageusement 0,5 millimolaires.

Pour une concentration inférieure à 0,1 millimolaires, on n'observe pas de redémarrage cardiaque.

15

Pour une concentration supérieure à 2 millimolaires, on perturbe le fonctionnement cardiaque.

Comme déjà dit, pour éviter la formation d'oedèmes tissulaires et cellulaires,
20 la macromolécule présente un poids moléculaire égal à 35 000 permettant de garantir la pression oncotique, améliorant ainsi l'efficacité de la conservation.

Dans le cas de la conservation rénale, il apparaît en outre que ladite macromolécule améliore les fonctions glomérulaire et tubulaire et produit un effet
25 diurétique.

En pratique, la concentration en polyéthylène glycol de la solution de l'invention est comprise entre 0,01 et 5 millimolaires, de préférence inférieure à 1 millimolaires, avantageusement égale à 0,03 millimolaires.

30

6

Pour une concentration inférieure à 0,01 millimolaires, on observe la formation d'oedèmes tissulaires et cellulaires.

Pour une concentration supérieure à 5 millimolaires, la viscosité de la solution n'est pas satisfaisante.

Selon une autre caractéristique de l'invention, la solution aqueuse de conservation de l'invention comprend en outre un anion imperméant, un sucre, un agent stabilisant de membrane, une solution tampon, un agent antiradicalaire et une source d'énergie.

Par ailleurs, pour obtenir une solution du type extracellulaire, le pH de la solution de l'invention est compris entre 6,5 et 8, avantageusement 7,4.

Dans une forme de réalisation avantageuse, la solution aqueuse de conservation comprend en outre :

- de 20 à 40 millimolaires de raffinose,
- de 70 à 140 millimolaires d'acide lactobionique,
- de 1 à 10 millimolaires de $MgSO_4$,
- de 10 à 40 millimolaires de H_2PO_4 (apportée par KH_2PO_4),
- de 1 à 6 millimolaires de Glutathion,
- de 1 à 10 millimolaires d'Adénosine,
- de 1,5 à 5 millimolaires d'Allopurinol,
- de 10 à 40 millimolaires de K^+ apportées par KH_2PO_4 ,
- de 30 à 150 millimolaires de Na^+ apportées par NaOH,
- avec pH = 6,5 à 8
- et osmolalité de 290 à 320 milliosmoles/kg

Dans une forme avantageuse, la solution aqueuse de conservation de l'invention comprend :

- Raffinose 30 millimolaires

		7
	• PEG 35000 purifié	0,03 millimolaires
	• MgSO ₄	5 millimolaires
	• KH ₂ PO ₄	25 millimolaires
	• CaCl ₂	0,5 millimolaires
5	• Gluthation	3 millimolaires
	• Adénosine	5 millimolaires
	• Allopurinol	1 millimolaires
	• Na ⁺ (apporté par NaOH)	125 millimolaires
	• K ⁺ (apporté par KH ₂ PO ₄)	25 millimolaires
10	• pH = 7,4	
	• osmolalité	300 milliosmoles/kg

La solution de conservation de l'invention s'applique à la conservation hypothermique statique et est utilisée à une température comprise entre 2 et 10° C, avantageusement 4° C.

L'invention et les avantages qui en découlent ressortiront mieux des exemples de réalisation ci-après.

20 **Exemple 1**

Préparation de la solution aqueuse de conservation multi-organes de l'invention

25 On prépare une solution aqueuse de conservation dont la composition est reproduite dans le tableau 2 suivant :

Tableau 2

	Concentration (mM)
Raffinose	30

8

Lactobionate	100
Glutathion réduit	3
Adénosine	5
Allopurinol	1
PEG (35000) fabriqué par MERCK	0,029
MgSO ₄ .7H ₂ O	5
H ₂ PO ₄ (apporté par KH ₂ PO ₄)	25
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,5
Na ⁺ (apporté par NaOH)	125
K ⁺ (apporté par KH ₂ PO ₄)	25

La préparation de la solution consiste à dissoudre l'ensemble des constituants dans une solution aqueuse, le pH de la solution obtenue étant ramené à 7,4 par addition du NaOH.

5

Exemple 2

On a comparé dans cet exemple les performances de la solution aqueuse de conservation de l'invention sur le rein et le foie au regard de la solution BELZER-
10 VIASPAN commercialisée par DUPONT.

Pour ce faire, les essais sont réalisés sur des organes isolés et perfusés selon des techniques connues. Pour l'essentiel, ces techniques consistent en l'isolement total ex-vivo de l'organe et en sa perfusion avec une solution artificielle du type
15 KREPS Henseleit-bicarbonate enrichie en substrat énergétique et contenant de l'albumine.

On distingue dans cet exemple trois groupes différents :

- **Groupe A** : groupe contrôle directement perfusé avec la solution artificielle sans conservation préalable ;

20

- **Groupe B** : organe conservé pendant une période d'ischémie de 24 heures à une température de 4° C dans une solution de conservation BELZER-VIASPAN avant re-perfusion avec la solution artificielle ;
- **Groupe C** : organe conservé pendant une période de 24 heures d'ischémie à une température de 4° C dans la solution de conservation de l'invention.

I/ Conservation hépatique

10 Pour apprécier l'efficacité de la solution de conservation de l'invention sur la conservation hépatique, on a étudié les paramètres suivants :

a) Paramètres fonctionnels

15 1 - Variation du débit biliaire

Le débit biliaire après greffe est un indice de bon fonctionnement du foie. Les débits biliaires ont été calculés après une période de conservation hypothermique de 24 heures.

20

Les résultats figurent dans le tableau suivant (tableau 3).

Tableau 3

Débit Biliaire ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$)			
	A	B	C
Moyenne 30 min	0,51	0,17	0,35
Moyenne 60 min	0,48	0,35	0,47
Moyenne 90 min	0,45	0,30	0,44
Moyenne 1200 min	0,51	0,26	0,56

Pour le groupe A, le débit biliaire est stable pendant les deux heures de perfusion. Comme le montre le tableau, le débit biliaire est minimal pendant les 30 premières minutes de perfusion, puis augmente jusqu'à atteindre un maximum au bout de 60 minutes pour rester stable durant la deuxième heure de perfusion.

5

On constate que le foie conservé dans la solution de l'invention (C) présente le débit biliaire le plus élevé (0,56).

2 - Excrétion du vert d'indocyanine dans la bile

10

Le vert d'indocyanine en se fixant rapidement sur les protéines plasmatiques se distribue dans le volume vasculaire. Il est spécifiquement épuré par le foie et concentré dans la bile. La présence du vert d'indocyanine dans le foie dépend du débit de perfusion et son excrétion dépend du statut énergétique des hépatocytes. Il s'ensuit que ce paramètre donne non seulement des informations sur l'intégrité des cellules endothéliales, mais également des informations sur l'intégrité des hépatocytes

Le pourcentage d'excrétion du vert d'indocyanine dans la bile a été représenté dans le tableau suivant (tableau 4).

Tableau 4

Excrétion du vert d'indocyanine dans la bile (%)			
	A	B	C
Moyenne	41	11	29

On constate que la clairance du vert d'indocyanine est plus faible pour la conservation du foie dans la solution B que dans la solution C de l'invention, qui apporte donc une amélioration significative.

b) Paramètres biochimiques

15

1 - Variation d'activité des transaminases

Les transaminases (ALAT et ASAT) sont des enzymes intracellulaires. Leur présence dans le perfusat témoigne d'une lyse cellulaire.

5

Les résultats sont représentés dans le tableau ci-après (tableau 5).

Tableau 5

ALAT (UI/L)			
	A	B	C
Moyenne 30 min	4	13	9
Moyenne 60 min	5	18	14
Moyenne 90 min	9	25	16
Moyenne 1200 min	13	31	18
ASAT (UI/L)			
Moyenne 30 min	34	61	44
Moyenne 60 min	43	71	59
Moyenne 90 min	50	86	67
Moyenne 1200 min	70	107	73

10 On constate que le foies perfusés avec la solution B de type intracellulaire libèrent plus d'ASAT et d'ALAT que les foies conservés dans la solution de l'invention de type extracellulaire (C). De plus, le remplacement de l'hydroxyéthylamidon de la solution B par le polyéthylène glycol entraîne une importante diminution de la lyse cellulaire.

15

Enfin, on constate qu'il n'y a aucune différence de lyse cellulaire entre le foie perfusé par le liquide de conservation A par rapport au foie perfusé par le liquide de conservation C.

20

2 - Variation d'activité des créatine kinases

La créatine kinase (CK-BB) est une isoenzyme qui se trouve spécifiquement dans les cellules endothéliales. Sa libération dans le liquide de perfusion montre donc une lyse de ces cellules. Au cours de la conservation en ischémie froide, les 5 cellules endothéliales subissent des lésions sévères. La perte de viabilité des cellules endothéliales n'a lieu qu'après perfusion et le taux de mort cellulaire dépend de la qualité de la conservation et donc, de la solution de conservation.

Le temps 0 référencé dans le tableau ci-après (tableau 6) correspond à la 10 remise en perfusion des greffons. Dans ces conditions, le liquide récupéré est le liquide de conservation gardé 24 heures dans le foie. L'activité CK-BB dosée est donc un marqueur de la lésion des cellules endothéliales subie pendant la période de conservation.

15 On remarque que la solution C protège bien les cellules endothéliales.

Tableau 6

CK (UI/L)			
	A	B	C
Moyenne T0-CK BB	32	81	33
Moyenne T30-CK BB	7	40	34
Moyenne (CK UI/L/g) CK BB	0,004	0,022	0,022

20 **II - Conservation du rein**

On a comparé l'efficacité du liquide de conservation de l'invention (solution C) par rapport au liquide BELZER-VIASPAN (solution B) et EURO COLLINS (solution D).

25 Pour ce faire, on a étudié les paramètres suivants.

a) Variation du débit urinaire

Le débit urinaire après greffe témoigne du mauvais ou bon fonctionnement rénal. Les résultats sont représentés dans le tableau ci-après (tableau 7).

Tableau 7

Débit Urinaire ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{g})\text{N}$				
	A	B	C	D
Moyenne \pm et	55.43 \pm 24.04	36.03 \pm 15.09	118.25 \pm 60.99	24.61 \pm 21.04

Comme le montre le tableau, le débit urinaire des reins perfusés par le liquide A reste inférieur au débit urinaire des reins sans conservation préalable.

En revanche, les reins conservés dans la solution de l'invention présentent le débit le plus important.

b) Clairance de l'inuline

Ce paramètre permet de mesurer la fonction glomérulaire du rein et donne des informations sur le débit de filtration glomérulaire.

Les résultats sont représentés dans le tableau 8.

Tableau 8

Clairance de l'inuline ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$)				
	A	B	C	D
Moyenne \pm et	512.43 \pm 109.8	49.42 \pm 29.21	306.90 \pm 131.33	25.06 \pm 24.71

Comme le montre ce tableau, la clairance de l'inuline est plus faible avec la conservation du greffon dans la solution B. En revanche, la solution C de l'invention présente une amélioration significative.

5 c) Réabsorption de sodium

Le taux de réabsorption de sodium permet de mesurer la fonction tubulaire rénale. Les résultats sont représentés dans le tableau 9 ci-après.

10

Tableau 9

Taux de réabsorption de sodium (%)				
	A	B	C	D
Moyenne ± et	92.2 ± 3.51	26.68 ± 12.98	61.17 ± 15.18	3.3 ± 4.47

Comme le montre ce tableau, la réabsorption de sodium est plus faible pour les reins conservés avec la solution B que pour les reins conservés avec la solution C.

15

Les avantages de l'invention ressortent bien de la description.

On notera notamment la capacité du liquide de conservation de l'invention à conserver tout organe, que ce soit foie, cœur, rein ou autre.

20

On note en outre l'amélioration des performances du liquide de l'invention sur les paramètres biochimiques et fonctionnels des organes perfusés par rapport aux liquides de conservation actuellement commercialisés.

REVENDICATIONS

1/ Solution aqueuse de conservation de tissus et d'organes, caractérisée en ce qu'elle est du type extracellulaire et en ce qu'elle comprend des ions calcium (Ca^{2+}) et du polyéthylène glycol purifié de poids moléculaire égal à 35 000.

2/ Solution aqueuse selon la revendication 1, caractérisée en ce que le PEG est synthétisé à partir de molécules de PEG de poids moléculaire inférieur.

3/ Solution aqueuse selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend des ions Na^+ à une concentration d'au moins 30 millimolaires.

4/ Solution aqueuse selon la revendication 1, caractérisée en ce que la concentration en ion Ca^{2+} est comprise entre 0,01 et 2 millimolaires.

5/ Solution aqueuse de conservation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la concentration de PEG dans la solution est comprise entre 0,01 et 5 millimolaires.

6/ Solution aqueuse de conservation selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un anion imperméant, un sucre, un agent stabilisant de membrane, une solution tampon, un agent antiradicalaire et une source d'énergie.

7/ Solution aqueuse de conservation selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre :

- de 20 à 40 millimolairesde raffinose,
- de 70 à 140 millimolairesd'acide lactobionique,
- de 1 à 10 millimolairesde MgSO_4 ,
- de 10 à 40 millimolairesde H_2PO_4 apporté par KH_2PO_4 ,
- de 1 à 6 millimolairesde Glutathion,
- de 1 à 10 millimolairesd'Adénosine,

- de 1,5 à 5 millimolaires d'Allopurinol,
 - de 10 à 40 millimolaires de K^+ apportées par KH_2PO_4 ,
 - de 30 à 150 millimolaires de Na^+ apportées par NaOH,
 - avec pH = 6,5 à 8,
- 5 - et osmolalité de 290 à 320 milliosmoles/kg.

8/ Solution aqueuse de conservation selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend :

	- Raffinose	30 millimolaires
10	- PEG 35000 purifié	0,03 millimolaires
	- $MgSO_4$	5 millimolaires
	- H_2PO_4	25 millimolaires
	- $CaCl_2$	0,5 millimolaires
	- Gluthation	3 millimolaires
15	- Adénosine	5 millimolaires
	- Allopurinol	1 millimolaires
	- Na^+ (apporté par NaOH)	125 millimolaires
	- K^+ (apporté par KH_2PO_4)	25 millimolaires
	- pH = 7,4	
20	- osmolalité	300 milliosmoles/kg.