



IMMORTALISATION DES CELLULES ANIMALES ET HUMAINES

Deuxième colloque de la
Société de Pharmaco-Toxicologie
Cellulaire (SPTC)
Paris — 8 mars 1991

Conseil Scientifique

Monique Adolphe
Directeur à l'École Pratique des Hautes Études

Pierre-Étienne Bost
Directeur des recherches, Pharmacie humaine,
Rhône-Poulenc Santé

Jean-Paul Cano
Directeur des recherches Sanofi

Roger Deraedt
Directeur du développement pré-clinique, Roussel-Uclaf

André Guillouzo
Directeur de Recherche, INSERM U49

Pierre Rouget
Professeur, Université Paris VI

DES CELLULES ISOLÉES DIFFÉRENCIÉES ET IMMORTELLES : MYTHE OU RÉALITÉ PROCHAINE

**André Guillouzo,
Christiane
Guguen-Guillouzo**

La prévention et le traitement des maladies reposent sur nos connaissances de la biochimie et de la physiologie de l'organisme. Celles-ci incluent des études sur le métabolisme et les effets des molécules à usage thérapeutique ou potentiellement toxiques ; le but ultime étant, bien entendu, d'acquiescer ces informations chez l'homme. De telles recherches sont limitées pour des raisons éthiques. Le développement de nouvelles molécules et l'analyse des mécanismes de toxicité font d'abord appel à l'expérimentation animale. Toutefois, ces études rencontrent de plus en plus de critiques. Les résultats obtenus ne peuvent être directement extrapolés à l'homme et, surtout, une véritable éthique animale est en train de voir le jour.

Ces limitations auxquelles sont soumises les études *in vivo* ont conduit à rechercher des modèles plus simples, plus accessibles et plus reproductibles. Aussi, au cours des vingt dernières années, la place des modèles *in vitro* n'a cessé de croître dans divers domaines et notamment en pharmacologie et en toxicologie. Les différents modèles proposés ont tous leurs avantages et leurs limites. L'organe isolé, les tranches d'organe, les cellules isolées en suspension ou en culture et les fractions subcellulaires sont les modèles les plus utilisés. Ceux-ci, à l'exception des cellules en culture, ne permettent pas d'envisager des études dépassant quelques heures et conservent l'hétérogénéité cellulaire de l'organe (foie, rein...).

Il est bien établi qu'une cellule normale provenant d'un organe solide ne peut survivre en suspension au-delà de quelques heures. Sa survie peut être temporairement prolongée par stockage au froid, immobilisation dans un milieu gélifié ou encapsulation. Elle peut, dans certains cas, être conservée, congelée dans l'azote liquide, mais les cellules différenciées supportent mal la congélation et la décongélation ; habituellement, des pertes cellulaires et des lésions plus ou moins réversibles ne peuvent être évitées.

Pour garder ses potentialités sans être organisée en tissu, la cellule spécialisée doit adhérer à un support. Des progrès considérables ont été réalisés ces dernières années, permettant d'obtenir des cultures primaires à partir de cellules spécialisées de la plupart des tissus, mais il apparaît néanmoins qu'il existe plusieurs limites à ces modèles. Souvent ces cellules ont une durée de vie limitée, se divisent peu ou pas et perdent rapidement leurs fonctions différenciées. C'est le cas des hépatocytes et des cellules tubulaires rénales. D'autres, par exemple les kératinocytes et les chondrocytes, peuvent être maintenues pendant un certain temps en subculture, mais elles perdent leurs marqueurs spécifiques. En outre, certaines cultures, cellules nerveuses, myocytes, ne sont parfois obtenues qu'à partir de tissus fœtaux ou de nouveau-nés. Certes, la survie et le maintien des fonctions spécifiques peuvent être améliorés en permettant à la cellule de retrouver une certaine organisation qui

A. Guillouzo, C. Guguen-Guillouzo :
Inserm U. 49, unité de recherches hépatologiques, hôpital Pontchaillou, 35033 Rennes Cedex, France.

rappelle celle existant *in vivo*. L'importance de l'environnement *in vitro* a été largement démontrée au cours des dernières années. De nombreux travaux ont montré l'importance de certains facteurs solubles, de protéines matricielles et des contacts intercellulaires. Ainsi, la cellule mammaire sur un extrait matriciel gélifié appelé matrigel et la cellule thyroïdienne sur collagène retrouvent leur polarité ; l'hépatocyte conserve également, sur matrigel, une forme globulaire et une meilleure activité fonctionnelle pendant quelques jours. Toutefois, la contamination de cette préparation matricielle par des facteurs de croissance et des hormones est aujourd'hui reconnue et son importance dans les effets observés reste à préciser. La coculture de la cellule spécialisée avec un autre type cellulaire a également souvent un effet favorable. La survie et le fonctionnement des hépatocytes sont largement améliorés lorsque ceux-ci sont associés à un autre type de cellule hépatique. D'autres modèles de coculture sont également largement utilisés : cellules de Sertoli, spermatogonies...

Des conditions de culture aussi sophistiquées ne sont pas sans rappeler la culture organotypique. Elles permettent de disposer de modèles d'un grand intérêt pour l'étude de la régulation des fonctions spécifiques tissulaires ; en revanche, elles ne permettent pas d'obtenir des cultures prolongées de cellules répliquatives ; il s'agit là d'une limite importante, notamment pour des cellules difficiles à isoler et à obtenir en grand nombre et surtout pour des cellules humaines dont les activités fonctionnelles peuvent grandement varier d'un individu à l'autre.

Un premier recours consiste à tenter d'obtenir des cultures à partir de cellules provenant de tumeurs primitives. L'expérience révèle qu'il n'est généralement pas aisé d'établir des

lignées à partir de tumeurs. Les cellules n'expriment au mieux qu'un certain nombre des fonctions de la cellule normale correspondante, le plus souvent à un niveau plus faible et celles-ci ne sont pas toujours stables au cours des passages successifs. Ainsi, aucune lignée d'hépatomes d'origine animale ou humaine ne possède tout l'équipement enzymatique de biotransformation des xénobiotiques normalement présent dans l'hépatocyte.

Un deuxième recours consiste à rendre immortelle une cellule normale. Différents moyens ont été proposés : radiations, cancérogènes chimiques, virus... Aujourd'hui est privilégiée la transfection qui consiste à introduire artificiellement une séquence d'ADN virale (SV40, adénovirus) ou cellulaire. Selon les buts recherchés, des modèles *in vitro* ou *in vivo* peuvent être envisagés. Grâce à des progrès techniques considérables, la transfection des cellules normales peut intéresser des cellules fœtales comme des cellules adultes et matures. L'injection d'ADN dans l'ovocyte fertilisé de souris permet de suivre l'expression du gène micro-injecté dans différents tissus organisés et, surtout, d'envisager le prélèvement et la sélection des cellules à tous les stades du développement, de la maturation tissulaire ou encore de la progression tumorale. Le choix de la séquence transfectée est très important. Il conditionne l'expression de celle-ci et détermine l'évolution à court ou long terme des cellules transfectées. En effet, il est possible d'orienter une expression et de limiter ses effets à un type cellulaire choisi comme cible. Par ailleurs, il est établi que des séquences codant pour certains oncogènes ont un pouvoir transformant, alors que d'autres sont uniquement immortalisants. Ce point est particulièrement important car la stabilité des populations cellulaires en dépend. En effet, la trans-

formation d'une cellule s'accompagne obligatoirement d'un certain nombre de changements morphologiques et fonctionnels dont la répercussion sur les fonctions spécialisées peut être plus ou moins importante. En conséquence, il est difficile d'imaginer que tous les mécanismes de régulation de la cellule soient normalement préservés. Certaines conditions de culture (milieux sélectifs, supports matriciels) peuvent aussi jouer un rôle essentiel sur l'activité proliférative et sur le maintien, voire la réexpression, de fonctions différenciées dans les cellules transfectées. En outre, il n'est pas exclu que le mode d'obtention des cellules immortalisées puisse avoir une grande importance. Des travaux récents ont montré une plus grande stabilité des lignées de cellules immortalisées obtenues à partir de souris transgéniques.

L'immortalisation cellulaire est aujourd'hui une voie de recherche en pleine explosion. Peut-on espérer un jour prochain disposer de lignées de cellules immortalisées stables à partir de différents tissus, le but ultime étant de les obtenir à partir de cellules humaines ? Des progrès indiscutables ont été accomplis (hépatocytes, cellules intestinales...), comme en témoignent les articles qui suivent. On aurait certes toujours des systèmes réductionnistes, mais n'est-il pas possible d'imaginer des systèmes de cultures en batterie qui mettraient en œuvre dans un ordre approprié les cellules cibles des différents tissus ? Nos connaissances actuelles ne peuvent que nous conduire à émettre des réserves sur l'espoir de disposer prochainement de tels systèmes intégrés et stables. En revanche, il est très vraisemblable que, dans un avenir proche, il sera possible d'obtenir des lignées cellulaires immortalisées stables possédant la majorité sinon la totalité des caractéristiques de la cellule originelle ■