

Établissement de lignées cellulaires d'origine rénale à partir de souris transgéniques

N. Cartier, J. Hagège, R. Lacave,
P. Briand, A. Kahn, A. Vandewalle

L'hétérogénéité morphologique et fonctionnelle du tubule rénal rend difficile l'étude des fonctions spécifiques de ses différents types cellulaires constitutifs. Dans ce but, de nombreuses équipes ont développé des techniques d'isolement de segments tubulaires [1] ou de populations cellulaires rénales [2]. Plus récemment, l'amélioration des conditions de culture a permis la mise en culture de tels segments tubulaires isolés ou de populations cellulaires ayant gardé certaines des caractéristiques fonctionnelles des cellules parentales. Cependant, l'utilisation de cultures primaires reste en partie limitée du fait de leur faible potentiel de prolifération *in vitro*. Une alternative à ces limites est l'utilisation de lignées cellulaires établies ayant un potentiel de prolifération élevé [3]. La majorité des études concernant les cellules rénales a été faite sur les lignées LLC-PK₁, MDCK, OK ou A₆ dérivant respectivement de reins de porc, de chien, d'opossum ou de grenouille. Cependant, leur origine précise (cellules proximales ou distales du néphron) ainsi que la nature des effets des agents immortalisants et/ou transformants restent toujours indéterminées, rendant difficile l'association des fonctions cellulaires observées à celles d'un type cellulaire particulier *in vivo*.

Récemment, l'infection par le virus simien 40 (SV40) de cultures primaires de cellules isolées de cortex rénal a cependant permis l'établissement et le maintien de plusieurs lignées ayant conservé les principales caractéristiques fonctionnelles des cellules des segments proximal, distal et collecteur cortical du tubule rénal [4].

Dans le travail dont nous présentons

ici les résultats préliminaires, nous avons utilisé une autre approche, celle de l'oncogène ciblé dont le principe est la création d'animaux transgéniques chez lesquels l'expression d'un oncogène est dirigée dans un organe particulier. Le transgène est un gène hybride dans lequel les séquences codantes d'un oncogène sont placées sous le contrôle de séquences promo-

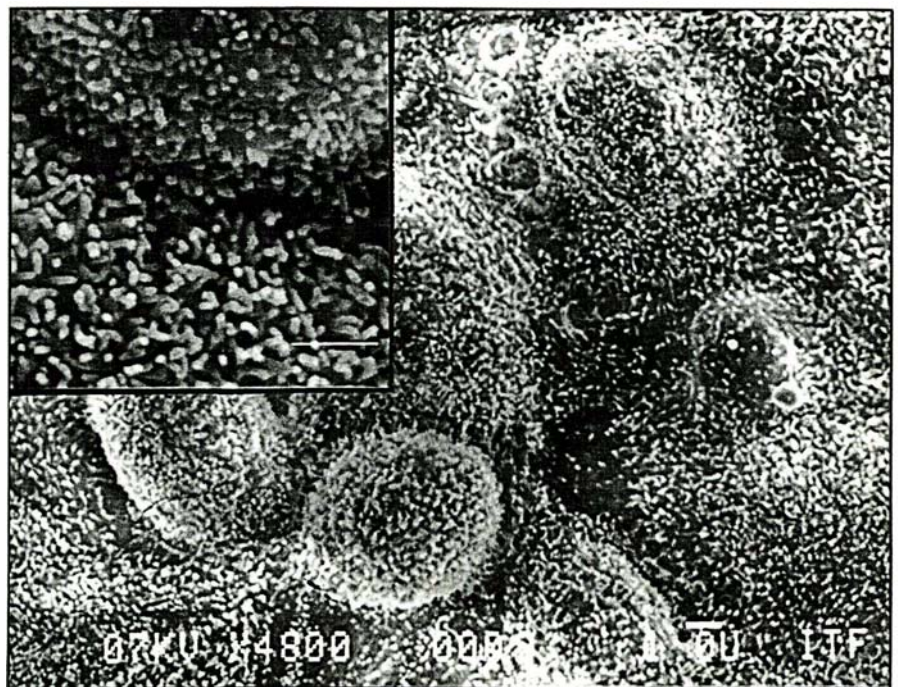


Figure 1. Microscopie à balayage. Illustration de l'abondance des microvillosités apicales des cellules PCT-PKSV cultivées à la confluence sur support semi-perméable en présence du milieu défini contenant 25 mM de glucose et 5 µg/ml d'insuline. Barre = 1 µm.

N. Cartier : Inserm U. 129. J. Hagège : Inserm U. 64. R. Lacave : Inserm U. 64. P. Briand : CJF 9003 de l'Inserm. A. Kahn : Inserm U. 129. Correspondance A. Vandewalle : Inserm U. 246, UER Xavier-Bichat, 16, rue Henri-Huchard, 75018, Paris, France.

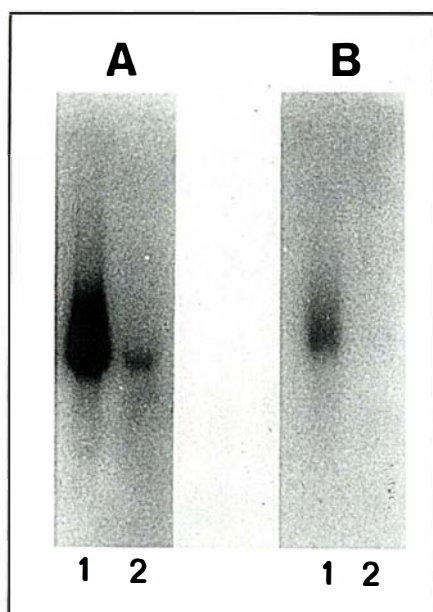


Figure 2. Analyse par hybridation moléculaire sur filtre de l'ARN messager grand T de SV40. Les cellules PCT-PKSV (A) et PR-PKSV (B) ont été soit cultivées dans le milieu défini contenant 25 mM de glucose et 5 µg/ml d'insuline [1], soit sevrées pendant 72 heures en glucose et insuline [2].

trices et régulatrices d'un autre gène. Ce choix des séquences régulatrices peut permettre de faire exprimer l'oncogène dans un type cellulaire particulier, à un stade précis, au cours du développement, en réponse aux conditions physiologiques, nutritionnelles, métaboliques ou hormonales qui autorisent la transcription du gène à partir duquel ont été isolées les séquences régulatrices du transgène.

Cette stratégie présente deux intérêts potentiels. D'une part, elle peut permettre la mise en culture plus aisée de cellules appartenant à des populations cellulaires faiblement représentées *in vivo* [5-7]; d'autre part, selon les séquences régulatrices utilisées, il est possible de moduler l'expression du transgène et donc le taux de prolifération cellulaire, en fonction des conditions de culture, tout en gardant un état de différenciation cellulaire avancé,

notamment lorsqu'il est inactivé.

Dans notre modèle, nous avons cherché à obtenir des lignées de cellules tubulaires proximales à partir d'une lignée de souris transgéniques pour l'antigène grand T de SV40 placé sous le contrôle du promoteur et des régions régulatrices du gène de la pyruvate kinase L de rat (PK-L), enzyme clé de la glycolyse hépatique. Le promoteur du gène de la PK-L est actif dans les hépatocytes, les entérocytes et les cellules tubulaires proximales de rein [8]. Son utilisation dans le foie est contrôlée positivement par le glucose et l'insuline, négativement par le glucagon [9]. Les caractéristiques de l'expression du transgène PK-T SV40 dans cette lignée de souris sont bien conservées comme l'attestent l'expression du messenger grand T de SV40 dans le foie, l'intestin et le rein ainsi que la régulation de son abondance en fonction du régime alimentaire [10]. Par les techniques de microdissection [1], des segments tubulaires (de 0,2 à 0,5 mm) de la partie contournée (PCT₂) et terminale (*pars recta*, PR) du tubule proximal ont été isolés après incubation de fragments de rein dans un milieu de culture stérile contenant 0,1 % (vol/vol) de collagénase. De manière stérile, ces segments tubulaires ont étéensemencés (2 à 4 tubules par puits) dans des boîtes de culture de 24 puits tapissées de collagène.

Les segments tubulaires microdisséqués ont été cultivés dans un milieu défini [4] contenant 10 ng/ml de facteur de croissance épidermique, 2 % de sérum de veau fœtal et 25 mM de D-glucose. Les cultures ont été entretenues à 37 °C sous atmosphère contenant 5 % de CO₂.

Dans ces conditions, il a été possible d'établir et d'entretenir deux lignées cellulaires à partir du segment contourné (PCT-PKSV) et de la *pars recta* (PR-PKSV) du tubule rénal actuellement au-delà du 25^e passage. La présence de l'antigène grand T a été confirmée par immunofluorescence dans 100 % des noyaux pour les deux lignées cellulaires. Les caractéristiques fonctionnelles et morphologiques « proximales » de ces deux lignées ont été établies sur plusieurs critères.

(1) Mise en évidence d'hydrolases

membranaires normalement exprimées au niveau des microvillosités des cellules tubulaires proximales [11].

(2) Présence du cotransporteur sodium-glucose spécifiquement inhibé par la phlorizine [12].

(3) Stimulation de la production intracellulaire d'AMP cyclique par la parathormone [13].

(4) Présence de nombreuses microvillosités au pôle apical des cellules cultivées sur boîte de Pétri ou sur support semi-perméable (filtres Costar) tapissés de collagène. La *figure 1* illustre l'abondance des microvillosités des cellules PCT-PKSV en microscopie à balayage.

Dans ce modèle, la croissance cellulaire peut être contrôlée par les conditions de culture. En présence de fortes concentrations de glucose (de 5 à 20 mM), le temps de doublement cellulaire (20-30 heures) est identique à celui d'autres lignées cellulaires d'origine rénale transformées par SV40 [3, 4]. Le sevrage des cellules en glucose et en insuline est suivi d'un ralentissement progressif de la croissance cellulaire associé à une disparition quasi complète de leur contenu en ARN messenger grand T de SV40 (*figure 2*). Les derniers résultats indiquent que l'on peut contrôler *in vitro*, dans un modèle de cellules tubulaires proximales en culture, l'expression du transgène PK T SV40 par le glucose comme elle est contrôlée *in vivo* par le glucose et l'insuline [10].

En conclusion, ces résultats montrent qu'il est possible d'obtenir des lignées de cellules épithéliales issues de segments tubulaires microdisséqués à partir de reins de souris transgéniques exprimant l'oncogène T de SV40 dans ces cellules. Les deux lignées cellulaires (PCT-PKSV et PR-PKSV) ont gardé les principales fonctions spécifiques du tubule proximal. De tels modèles possèdent de multiples applications potentielles, que ce soit pour des études de transports ioniques membranaires, des études pharmacologiques, l'étude du rôle de l'activation du virus SV40 dans les phénomènes de transformation et de différenciation cellulaires, ou des études concernant la régulation de l'expression du gène de la pyruvate kinase L ■

Summary

Establishment of kidney cell lines derived from transgenic mice

The present study describes preliminary results obtained on two renal cell lines derived from microdissected proximal tubules from kidneys of transgenic mice for the SV40 large T gene under the control of promoting and regulatory sequences of the rat pyruvate kinase-L gene. Both cell lines exhibited main features of parental proximal tubule cells. Furthermore glucose was able to regulate *in vitro* the expression of the transgene as well as cell proliferation. Such models of cultured renal cells offer useful tool for studies related to cell transformation and differentiation.

Références

1. Burg M, Grantham J, Abramow M, Orloff J. Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons. *Am J Physiol* 1966 ; 210 : 1293-8.
2. Poujeol P, Vandewalle A. Phosphate uptake by proximal cells isolated from rabbit kidney : role of dexamethasone. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol 18)* 1985 ; 249 : F74-83.
3. Handler JS. Use of cultured epithelia to study transport and its regulation. *J Exp Biol* 1985 ; 106 : 55-9.
4. Vandewalle A, Lelongt B, Géniteau-Legendre M, *et al.* Maintenance of proximal and distal cell functions in SV40-transformed tubular cell lines derived from rabbit kidney cortex. *J Cell Physiol* 1989 ; 141 : 203-21.
5. Spector D, Delannoy M, Grant S, Hanahan D, Baekkeskov S. B cell lines derived from transgenic mice expressing a hybrid insulin gene-oncogene *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 9037-41.
6. Kruse F, Komro CT, Michnoff CH, MacDonald RJ. The cell-specific elastase I enhancer comprises two domains. *Mol Cell Biol* 1988 ; 8 : 893-902.
7. Paul D, Höhne M, Pinkert C, Piasecki A, Hummelmann E, Brinster RL. Immortalized differentiated hepatocytes lines derived from transgenic mice harboring SV40 T-antigen gene. *Exp Cell Res* 1988 ; 175 : 354-62.
8. Weber A, Marie J, Cottreau D, *et al.* Dietary control of aldolase B and L-type pyruvate kinase mRNAs in rat. Study of the translational activity and hybridization with cloned cDNA probes. *J Biol Chem* 1984 ; 259 : 1798-1802.
9. Decaux JF, Kahn A. Post transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver. *J Biol Chem* 1986 ; 261 : 7621-5.
10. Cartier N, Tulliez M, Bennoun M, Briand P, Kahn A. Diet dependent carcinogenesis in transgenic mice. Mouse molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, 1990.
11. Tauc M, Chatelet F, Verroust P, Vandewalle A, Poujeol P, Ronco P. Characterization of monoclonal antibodies specific for rabbit renal brush border hydrolases : application to immuno-histological localization. *J Histochem Cytochem* 1988 ; 36 : 523-32.
12. Jacobson HR. Functional segmentation of the mammalian nephron. *Am J Physiol* 241 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol 10*) 1981 ; 241 : F203-18.
13. Morel F. Sites of hormone action in the mammalian nephron. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol 9)* 1981 ; 240 : F159-64.

L'immortalisation cellulaire : du concept aux applications

Jean Feunteun

L'immortalisation est définie opérationnellement par la capacité des cellules à proliférer indéfiniment *in vitro*. Trois types de cellules répondent à cette définition : les cellules post-crise, qui ont échappé naturellement à la sénescence, certaines cellules tumorales et les cellules immortalisées *in vitro* par introduction d'un oncogène viral ou cellulaire. Les deux premiers types cellulaires résultent d'une sélection longue et complexe, *in vitro* ou *in vivo* respectivement, tandis que le troisième est obtenu en un temps relativement bref par l'introduc-

tion d'informations génétiquement définies. On fera ici une brève revue de l'activité du laboratoire dans ce domaine qui s'applique à définir le concept d'immortalisation et à développer des applications exploitant le pouvoir immortalisant de gènes viraux.

Le phénotype immortel

Petit *et al.* [1] ont étudié la capacité du virus SV40 à immortaliser des cellules embryonnaires de rongeurs. Grâce à l'allèle thermosensible du gène A, il est montré que l'antigène grand T (LT) est seul impliqué dans l'immortalisation. Ce rôle s'exerce à la fois sur l'établissement et le maintien du phénotype immortel qui est exprimé de manière conditionnelle chez les cellu-

les établies par le virus exprimant l'allèle tsA58. Tous les paramètres de la croissance cellulaire démontrent une très forte thermosensibilité à 39 °C, température à laquelle l'antigène LT/A58 est inactivé. Les cellules perdent leur viabilité et acquièrent une morphologie qui rappelle celle des cellules sénescents. L'existence de lignées cellulaires immortalisées de façon conditionnelle permet d'aborder la définition de la nature des événements responsables de l'immortalisation [2]. Des expériences d'incorporation de thymidine, d'uridine et de leucine tritiées montrent que l'arrêt de la réplication suit précocement le transfert à 39 °C, alors que la transcription et la traduction sont peu affectées. L'analyse par cytofluorimétrie de flux révèle que les cellules sont arrêtées à n'importe quelle

J. Feunteun : Laboratoire d'oncologie moléculaire, Cnrs U.A.1158, Institut Gustave-Roussy, 94805 Villejuif Cedex, France.