

# Culture *in vitro* de cellules hépatiques fœtales de ruminants

par M. RIOCHE (\*)

(avec la collaboration de M. S. DIALLO)

## RESUME

L'auteur décrit les méthodes utilisées pour la culture *in vitro* des cellules hépatiques fœtales de ruminants (bovin, mouton, chèvre) et les résultats obtenus. Les commentaires portent principalement sur la caractérisation des hépatocytes en culture. L'étude de la sensibilité de ces cellules à divers virus est en cours.

L'intérêt que peut présenter la culture de cellules hépatiques n'est plus à souligner en raison des nombreux travaux qui s'y rapportent, en particulier dans les domaines de la biologie cellulaire de la virologie et de la cancérologie expérimentale.

Cependant, la plupart des études publiées jusqu'à présent concernent les cultures de foie de poulet ou de rongeurs et peu de recherches sont consacrées aux grands mammifères. Chez les ruminants en particulier, les seuls travaux que nous connaissons sont ceux de PIEK et KUYPER (12) relatifs à l'établissement d'une lignée épithéliale de foie de veau et de KUYPER et collab. (8) traitant de la biologie de cette lignée.

Ayant la possibilité de disposer facilement d'embryons, nous nous sommes proposé de mettre au point une technique de culture de cellules hépatiques fœtales de ruminants et d'en étudier divers aspects.

## I. MATERIEL ET METHODE

Il s'agit de cultures statiques effectuées à la

température de 37° C en flacons ou tubes Leighton hermétiquement bouchés.

Les foies utilisés sont récoltés stérilement sur des fœtus de ruminants provenant de l'abattoir. Lorsque la mise en culture ne peut être immédiate, le foie est conservé en boîte de Pétri jusqu'à 24 heures à + 4° C soit entier, soit broyé.

### A. Milieux de culture

Deux milieux ont été testés :

- Milieu de Earle (1) supplémenté par 10 p. 100 de sérum de veau.
- Milieu de Hanks selon FRANKLIN et collab. (2) supplémenté par 10 p. 100 de sérum de veau.

### B. Cultures primaires

Les primocultures sont faites soit à partir d'explants soit à partir de cellules dispersées par la trypsine. Selon que l'on désire ou non obtenir des cultures en masse, on utilise le foie total amputé de la région du hile ou seulement un petit fragment prélevé sur le bord d'un lobe.

#### 1. Cultures d'explants

Le fragment de foie est broyé stérilement

(\*) Laboratoire national de l'Elevage, B.P. n° 2057, Dakar-Hann, Sénégal.

au bistouri puis passé à travers un tamis métallique à mailles de 1 mm. Les explants obtenus sont ensuite lavés 2 fois en Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) puis 1 fois dans le milieu de culture. Le milieu est alors décanté et les explants sont placés dans le flacon de culture à raison d'une cinquantaine par flacon de 60 ml et d'une dizaine par tube à lamelle. On ajoute ensuite le milieu de culture en quantité juste suffisante pour recouvrir les explants. Les flacons sont alors mis à l'étuve et examinés chaque jour. Le milieu n'est changé que lorsque les cellules commencent à se multiplier. Il est ensuite changé une ou deux fois par semaine.

## 2. Culture de cellules dispersées

Le prélèvement est traité comme ci-dessus, mais les explants sont lavés 3 fois en HBSS puis placés dans une solution de trypsine à 3 p. 1000 en HBSS. La dispersion se fait sous agitateur magnétique pendant un quart d'heure à la température ambiante puis, après renouvellement de la solution de trypsine, à + 4° C jusqu'à dispersion totale des cellules. La suspension est alors passée à travers une gaze stérile puis centrifugée pendant 5 mn à 1.500 t/mn. Le surnageant est rejeté. Le culot cellulaire est mis en suspension dans le milieu de culture à raison d'environ 100 ml de milieu par cm<sup>3</sup> de cellules. Après répartition de cette suspension les flacons sont mis à l'étuve à 37° C.

## C. Subcultures

Lorsque les cellules se sont développées en une couche monocellulaire continue, le milieu de culture est rejeté et le tapis cellulaire est lavé trois fois avec une solution de trypsine-versène (trypsine à 2,5 p. 1000 : 1 partie;

tampon versène : 4 parties). Le flacon est placé à 37° C jusqu'au décolllement du tapis. Les cellules sont dispersées dans un peu de milieu par pipetages successifs, elles sont ensuite mises en suspension dans une quantité de milieu double de celle du flacon dont elles proviennent, réparties dans deux nouveaux flacons puis mises à l'étuve. Lors des subcultures suivantes, si le taux de multiplication cellulaire est suffisant, les suspensions sont faites à raison de 50.000 à 100.000 cellules par ml de milieu.

## D. Recherche du glycogène

Il est mis en évidence dans le cytoplasme par la coloration au PAS (une lame témoin négatif est colorée de la même façon après traitement durant 1 heure à 37° C par une solution à 1 p. 1000 d'amylase).

## E. Etude du caryotype

Des cultures de 3 à 4 jours sur lamelle sont traitées pendant 6 à 12 heures par la colchicine (1 microgramme par ml de milieu). Le milieu est ensuite rejeté et les métaphases sont dispersées par l'eau distillée à 37° C pendant 7 mn. Puis l'eau est aspirée au papier filtre. Les lames sont séchées à l'étuve et fixées 3 mn à l'alcool méthylique. Après rinçage, le cytoplasme est hydrolysé par l'acide chlorhydrique normal pendant 7 mn à 60° C. Après rinçage dans une solution tamponnée, les lamelles sont colorées au Giemsa lent ou au bleu de Unna et montées à l'Entellan (Merck). L'analyse chromosomique se fait sur clichés photographiques.

# II. RESULTATS

## A. Résultats généraux

TABLEAU N° I

	Bovins		Moutons		Chèvres
	Explants	Cellules dispersées	Explants	Cellules dispersées	Cellules dispersées
Nombre de prélèvements traités	14		9		1
Méthode ++ de Primoculture	3	14	4	7	1
Cultures réussies	2	13	2	6	1
Echecs	1	1	2	1	0

++ = 3 foies de bovins et 2 foies de moutons ont été cultivés selon chacune des deux méthodes.

## B. Aspect et évolution des cultures

### 1. Cultures primaires

Quelle que soit l'espèce dont proviennent les cellules, les aspects morphologiques et cinétiques des cultures sont les mêmes.

#### a) Cultures d'explants

Toutes les cultures sont faites en milieu de Earle. L'adhérence des explants au support est assez longue à s'établir. Le démarrage de la culture n'intervient qu'entre le 7<sup>e</sup> et le 20<sup>e</sup> jour. Il est signalé par l'apparition de quelques fibroblastes et macrophages provenant de cellules isolées ou migrant à partir des explants. Environ 48 heures plus tard commence la migration de cellules épithéliales à partir des explants. Celle-ci peut revêtir deux aspects :

- formation d'une membrane monocellulaire constituée de cellules étroitement juxtaposées, légèrement fusiformes devenant nettement polygonales au fur et à mesure que la membrane s'agrandit;
- migration de cellules isolées, adhérant fortement au support mais ne s'étalant pas. Ces cellules qui peuvent migrer assez loin de l'explant finissent par s'étaler et forment en se multipliant une membrane monocellulaire semblable à celle déjà décrite. Cet aspect s'observe le plus souvent dans les cultures de foie de mouton.

Quel que soit le type de migration observée, les membranes de cellules épithéliales deviennent confluentes vers la 5<sup>e</sup> semaine et il est alors possible d'effectuer la première subculture.

#### b) Cultures de cellules dispersées

Le démarrage de la culture, plus précoce que lorsqu'il s'agit d'explants, intervient entre le 5<sup>e</sup> et le 10<sup>e</sup> jour. Il se signale aussi par l'apparition de fibroblastes et de macrophages qui se multiplient plus ou moins, alors que les cellules hépatiques adhèrent fortement au support sans se multiplier. Puis ces dernières s'étalent progressivement et se multiplient pour former des îlots de cellules étroitement juxtaposées. Ces îlots deviennent rapidement confluent et sont formés de cellules dont la morphologie varie en fonction du milieu utilisé.

En milieu de Hanks LA-YE on observe, soit une population homogène de cellules

d'aspect fibroblastique, se développant comme les fibroblastes parallèlement à certains axes directionnels mais en différant par leur forme moins effilée et leur noyau peu allongé, soit une population mixte formée de travées de cellules d'aspect fibroblastique enserrant des îlots plus ou moins vastes de cellules épithéliales à contour polygonal, à cytoplasme plus ou moins granuleux et dont le noyau rond ou ovale contient 1 à 3 nucléoles.

Ces îlots épithéliaux peuvent contenir deux types de cellules :

*Cellules du premier type* : cellules à contour polygonal, à cytoplasme assez granuleux, surtout autour du noyau qui est rond ou ovalaire et contient un, deux, parfois trois nucléoles arrondis et de taille régulière. Les cellules binucléées ne sont pas rares.

*Cellules du deuxième type* : l'aspect est identique mais le cytoplasme est nettement moins granuleux et de ce fait la cellule paraît plus claire lorsqu'on l'examine à l'état vivant. Ce type cellulaire est plus fréquemment observé que le précédent et on trouve aussi un certain nombre de cellules binucléées.

En milieu de Earle à 10 p. 100 de sérum de veau, se développent des cellules épithéliales de type I ou II, en nombre moindre, des cellules fibroblastiques qui disparaissent progressivement après 3 à 4 subcultures.

Quel que soit le milieu utilisé, la couche monocellulaire est complète entre le 10<sup>e</sup> et le 20<sup>e</sup> jour et le 1<sup>er</sup> transfert peut être alors effectué.

Qu'il s'agisse de cultures d'explants ou de cellules dispersées, on observe toujours quelques cellules « géantes » de type épithélial atteignant 3 à 4 fois la taille d'une cellule normale, à gros noyau dont le ou les nucléoles ont souvent une forme irrégulière. Il s'agit sans doute de cellules « dégénérées ».

### 2. Subcultures et évolution des lignées

Après le premier transfert, les cellules adhèrent en quelques heures puis se multiplient et forment en 7 à 15 jours un tapis complet de cellules présentant, selon le milieu employé, les caractères morphologiques déjà décrits, tandis que fibroblastes et macrophages semblent

disparaître des cultures. Les repiquages suivants sont faits tous les 7 à 15 jours.

Après cette phase de culture exponentielle qui peut durer 2 à 3 mois (4 à 6 passages) les cultures entrent en phase de dégénérescence. Le cytoplasme devient granuleux, de nombreux débris cytoplasmiques apparaissent, les cellules « gonflent » et les mitoses se raréfient avant de disparaître; puis la culture meurt.

Cependant, à partir d'une de ces cultures, s'est développée une lignée comptant actuellement 71 passages et 2 ans de vie (lignée HFB-RIOCHE) (13).

### 3. Caractérisation des cellules

Bien que la morphologie des cellules épithéliales n'évoque pas toujours l'hépatocyte, la présence de glycogène dans le cytoplasme permet d'affirmer qu'il s'agit de cellules du parenchyme. Nous avons aussi noté la présence de glycogène dans les cellules fibroblastoïdes.

### 4. Chromosomes

L'étude des caryotypes n'a pas été faite systématiquement mais plusieurs analyses ont montré que les cellules restaient diploïdes. Seule la lignée HFB possède un caryotype anormal.

## COMMENTAIRES

La culture de cellules hépatiques de mouton est plus difficile que celle du foie de bovin. Trois lots différents de sérum de mouton, testés sur certaines cultures se sont révélés toxiques; c'est le sérum de veau qui donne le meilleur résultat.

Il est préférable d'instaurer les cultures primaires à partir de suspensions de cellules dispersées plutôt que d'explants. Avec ceux-ci, en effet, la réussite de la culture est plus aléatoire et son démarrage est toujours retardé par rapport à celui des cellules dispersées. Ceci est en accord avec les observations de ZUCKERMAN et collab. (16) relatives aux cultures d'hépatocytes fœtaux humains.

L'action de la trypsine doit cependant être ménagée car les hépatocytes semblent assez sensibles à cette enzyme. Ceci nous a été confirmé par KAIGHN (7) qui utilise dans les cultures d'hépatocytes humains ou de primates,

une solution tamponnée contenant 1 p. 1.000 de trypsine, 1 p. 1.000 de collagénase et 1 p. 100 de sérum de poulet qui protège les hépatocytes contre l'action de ces enzymes.

Qu'il s'agisse d'explants ou de cellules dispersées, la culture ne présente plus de difficultés lorsque la multiplication cellulaire a débuté et le cycle biologique des lignées obtenues comprend les trois phases décrites par HAY-FLICK et MOORHEAD (4):

- Phase I : culture primaire.
- Phase II : croissance exponentielle.
- Phase III : dégénérescence et mort.

Comme le montre la plupart des travaux qui concernent la culture des cellules hépatiques fœtales, celles-ci ne nécessitent pas pour se développer *in vitro* les conditions strictes d'aérobiose indispensables à l'hépatocyte adulte. Nos cultures se développent parfaitement à l'état immergé et en flacons hermétiquement clos dans lesquels le rapport volume de l'air des flacons sur volume de milieu est égal à 9/1 environ.

La disparition rapide des fibroblastes et macrophages dans les cultures paraît due à la présence d'hydrolysats de lactalbumine dans le milieu. Cette substance semble favoriser en effet le développement des hépatocytes en particulier (HILLIS et BANG, 5) et des cellules épithéliales en général (MICHL, 11).

Du fait de la disparition de ces cellules, nous ne nous sommes pas préoccupés de leur origine « histologique » qui est classiquement rapportée respectivement aux cellules du conjonctif et aux cellules histiocytaires, encore que FREDERIC (3) ait démontré chez l'embryon de poulet la transformation d'hépatocytes en macrophages. Le problème de la caractérisation des hépatocytes se pose surtout au sujet des cellules épithéliales. En effet, divers auteurs, notamment SANDSTRÖM (14) pensent que du fait de sa variabilité, la morphologie de ces cellules ne peut constituer un critère sûr d'identification car celles-ci peuvent provenir du parenchyme ou de l'endothélium sinusoidal.

Lorsqu'il est conservé l'aspect général de l'hépatocyte correspond aux cellules du premier type décrit. Cet aspect souvent observé chez d'autres espèces animales est classiquement

considéré comme caractéristique de l'hépatocyte en culture. La présence de glycogène dans le cytoplasme de nos cellules de type I confirme d'ailleurs leur nature hépatocytaire. Nous avons aussi noté la présence de glycogène dans les cellules de type II et les cellules fibroblastoïdes. Nous pensons qu'il s'agit aussi d'hépatocytes dont les caractéristiques morphologiques ont été plus ou moins modifiées au cours de l'adaptation à la vie *in vitro*.

A la lumière de travaux récents, la caractérisation de l'hépatocyte peut aussi être assurée par la mise en évidence de certaines activités de synthèse, spécifiques de ces cellules, telles que la synthèse des  $\alpha$ -foetoprotéines spécifiques par l'hépatocyte fœtal (VAN FURTH et collab., 15); (LURIA et collab., 10) ou de l'albumine par la cellule fœtale et adulte (LE GUILLY et collab., 9); (LURIA et collab., 10); (HULL et collab., 6). Nous avons tenté de mettre en évidence la synthèse d'albumine uniquement pour l'identification des cellules de la lignée HFB.

L'étude *in vitro* de la sensibilité des hépatocytes de ruminants à certains virus est en

cours et les premiers essais nous ont permis de constater la sensibilité des hépatocytes bovins au virus de la peste bovine (PB) et leur insensibilité au virus de la peste des petits ruminants (PPR). Si cette dernière se confirme au cours de nouveaux essais, ces cultures pourront constituer un système utile pour l'étude de ces virus dont les parentés antigéniques sont très étroites.

## CONCLUSION

Malgré quelques échecs, la culture des hépatocytes fœtaux de ruminants ne présente pas de difficultés majeures et permet si on le désire, d'obtenir des cultures en masse.

L'évolution de ces cultures et l'aspect morphologique des divers types cellulaires observés sont comparables à ceux qui ont été décrits chez d'autres espèces animales.

L'étude de la sensibilité de ces cellules à divers virus nous renseignera sur leur utilisation éventuelle en virologie.

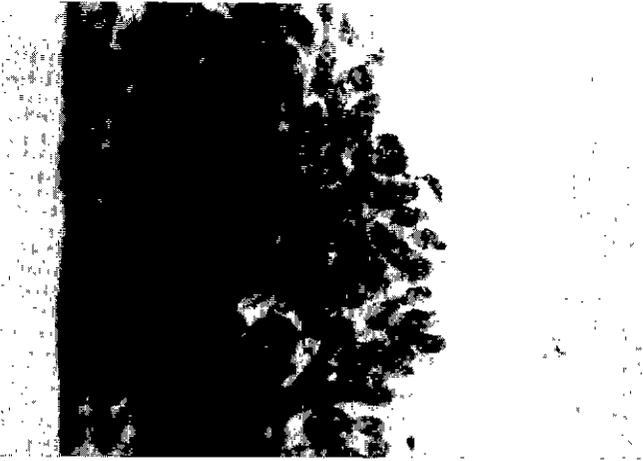


Photo 1. — Culture primaire d'explants (bovin), 8<sup>e</sup> jour. Migration des cellules sous forme de membrane (May-Grünwald-Giemsa).  
Objectif : 10 ×; Oculaire : 5 ×.

Photo 2. — Culture primaire d'explants (mouton), 21<sup>e</sup> jour. Migration de cellules isolées dont certaines commencent à s'étaler. Matériel vivant.  
Objectif : 10 ×; Oculaire : 5 ×.

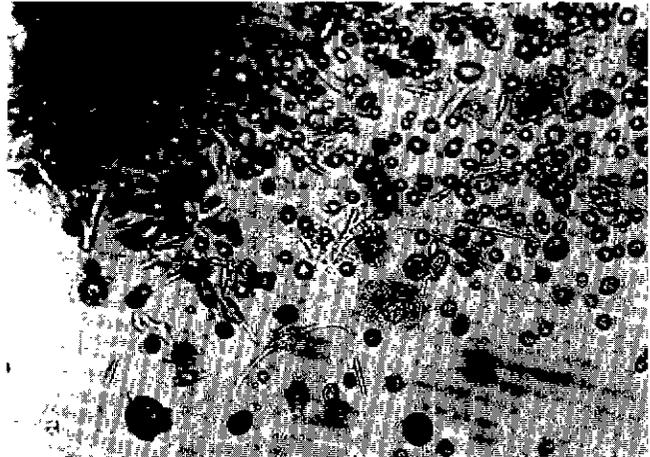
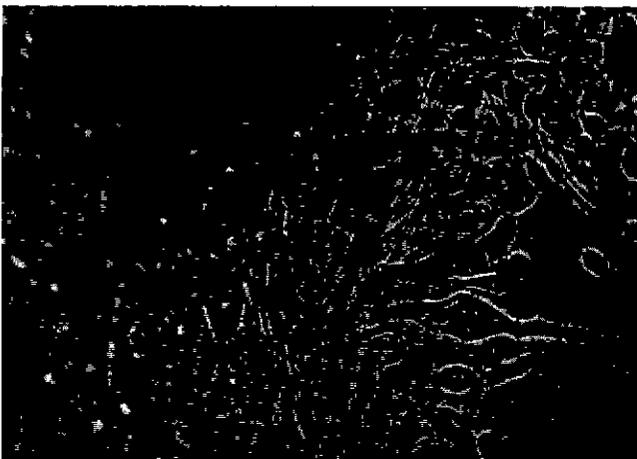
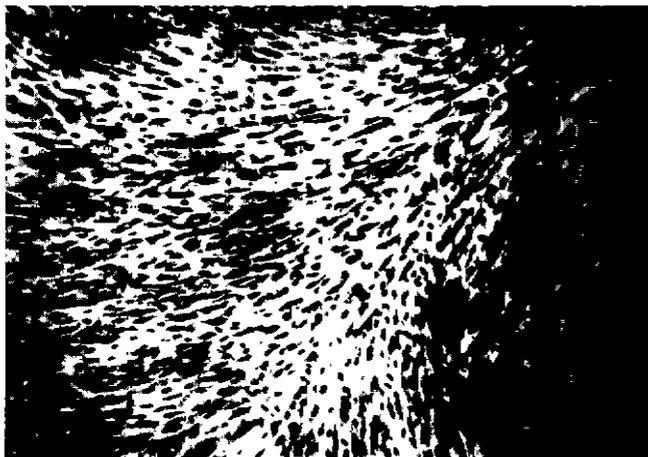


Photo 3. — Même culture que le n<sup>o</sup> 2. 23<sup>e</sup> jour. Certaines cellules commencent à former une « membrane ». Matériel vivant.  
Objectif : 10 ×; Oculaire : 8 ×.





Phot 4. — Culture de cellules hépatiques fœtales de mouton. 1<sup>er</sup> passage. 9<sup>e</sup> jour.  
Cellules fibroblastoïdes.  
(May-Grünwald-Giemsa).  
Objectif : 10 ×; Oculaire : 8 ×.

Photo 5. — Culture de cellules hépatiques fœtales de bovin. 2<sup>e</sup> passage. 10<sup>e</sup> jour.  
Ilot de cellules épithéliales de type II entouré de cellules fibroblastoïdes.  
(May-Grünwald-Giemsa).  
Objectif : 25 ×; Oculaire : 5 ×.



Photo 6. — Culture de cellules hépatiques fœtales de bovin. 1<sup>er</sup> passage. 4<sup>e</sup> jour.  
Ilot de cellules épithéliales de type I.  
(May-Grünwald-Giemsa).  
Objectif : 25 ×; Oculaire : 8 ×.

## SUMMARY

*In vitro* culture of foetal liver cells of ruminants

The author reports the methods used for the *in vitro* culture of ruminants foetal liver cells (cattle, sheep and goat) and the results obtained. Comments are made mainly on characterization of liver cells *in vitro* culture. Study of sensibility of these cells to various virus is in progress.

## RESUMEN

Cultivo *in vitro* de células hepáticas fetales de rumiantes

El autor describe los métodos utilizados para el cultivo *in vitro* de células hepáticas fetales de rumiantes (bovino, oveja, cabra) y los resultados obtenidos. Comenta principalmente la caracterización de los hepatocitos en cultivo. El estudio de la sensibilidad de dichas células para con varios virus está realizándose.

## BIBLIOGRAPHIE

1. EARLE (W. R.). *J. nat. Cancer Inst.*, 1943, **4**: 165.
2. FRANKLIN (R. M.), RUBIN (H.) et DAVIS (C. A.). The production, purification and properties of Newcastle disease virus labelled with radiophosphorus. *Virology*, 1957, **3**: 96-114.
3. FREDERIC (J.). La transformation histiocytaire des cellules hépatiques cultivées *in vitro* et son déterminisme. *Rev. Hematol.*, 1951, **6**: 423-447.
4. HAYFLICK (L.) et MOORHEAD (P. S.). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 1961, **25**: 585-621.
5. HILLIS (W. D.) et BANG (F. B.). The cultivation of human embryonic liver cells. *Exp. Cell Res.*, 1962, **26**: 9-36.
6. HULL (E. W.), CARBONE (P. P.), O'CARA (R. W.), MOERTEL (Ch. G.), O'CONNOR (G. T.) et SMITH (C. F.). (National Cancer Institute, Bethesda; Maryland and Mayo Clinic, Rochester, Minnesota) Studies of  $\alpha$ -fetoprotein ( $\alpha$ -FP) in primates. Communication au Centre international de Recherches sur le cancer, juillet 1969. (Non publiée.)
7. KAIGHN (E.). (The New-York Blood Center) Communication personnelle.
8. KUYPER (Ch. M. A.), SMET (L. A.) et PIEK (A. C. M.). The life cycle of a strain of liver cells cultivated *in vitro*. *Exp. Cell Res.*, 1962, **26** (1): 217-219.
9. LE GUILLY (Y.), LENOIR (P.) et BOUREL (M.). Synthèse de protéines exportables par les primocultures de foie humain adulte. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 1971, série D, **272**: 973-976.
10. LURIA (E. A.), BAKIROV (R. D.), YELISEYEVA (T. A.), ABELEV (G. I.) et FRIEDENSTEIN (A. Y.). Differentiation of hepatic and hematopoietic cells, and synthesis of blood serum proteins in organ culture of the liver. *Exp. Cell Res.*, 1969, **54**: 111-117.
11. MICHL (J.). Metabolism of cells in tissue culture *in vitro*: II. long term cultivation of cell strains and cells isolated directly from animals in a stationary culture. *Exp. Cell Res.*, 1962, **26**: 129-135.
12. PIEK (A. C. M.) et KUYPER (Ch. M. A.). Establishment of an epithelial cell strain from calf liver in continuous culture. *Experientia*, 1961, **17**: 115-116.
13. RIOCHE (M.). Etablissement et caractéristiques d'une lignée cellulaire d'hépatocytes fœtaux de bovin (lignée H.F.B.). (En préparation.)
14. SANDSTRÖM (B.). Studies of cells from liver tissue cultivated *in vitro*. *Exp. Cell Res.*, 1965, **37**: 552-568.
15. VAN FURTH (R.) et ADIMOLFI (M.). *In vitro* synthesis of the foetal -globulin in man. *Nature*, 1969, **222**: 1296-1299.
16. ZUCKERMANN (A. J.), TSQUAYE (K. N.) et FULTON (F.). Tissue culture of human embryo liver cells and the cytotoxicity of aflatoxin. *Brit. J. exp. Path.*, 1967, **48**: 20.