ZV 000 1148

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 271, p. 1148-1151 (28 septembre 1970) Série D

CANCÉROLOGIE. — *Culture* in vitro *de cellules de cancer primitif de foie humain.* Note **(*)** de M. **Michel Rioche,** Mme **Simone Quelin,** MM. **Ibrahima Seck, Marcel Jacquesson, Bernard Basteris** et **René Masseyeff,** présentée par M. Bernard Halpern.

Des cultures de cancer primitif de foie humain ont été réalisées et entretenues *in vitro* durant des périodes de trois semaines à deux mois ; aucune subculture n'a été obtenue.

De nombreux travaux ont déjà été consacrés à la culture *in vitro* de cellules d'hépatomes induits chez le rat, permettant non seulement d'établir des lignées cellulaires permanentes, mais aussi de comparer le métabolisme de ces cellules et celui des hépatocytes normaux. En outre, les recherches sur les cultures d'hépatomes induits chez le rat [Abelev et coll. ([1]), Abelev ([2])], la souris [Irlin et coll. ([3])] et le singe [Dawe et coll. ([4]), Hull et coll. ([5])] ont permis de démontrer que ces cultures synthétisaient, au moins pendant un certain temps, l'α-fœtoprotéine spécifique (a-FP) produite normalement par le foie fœtal et, chez l'adulte, par les hépatocarcinomes primitifs ou, plus rarement, par certains tératoblastomes. Chez l'homme, Baylet et Camain ([6]) ont cultivé des cellules de cancer primaire du foie sur membrane chorioallantoïde d'œuf embryonné et Chen ([7]) a établi et entretenu pendant plus de deux ans une souche d'hépatocarcinome humain en culture de tissu. Cependant le métabolisme des cellules cultivées n'a pas été étudié.

C'est pourquoi nous nous sommes proposé d'essayer de cultiver des cellules de cancer primitif du foie (CPF) humain et de mettre en évidence, dans un premier temps, une production éventuelle d'a-FP par ces cellules.

Nous n'exposons ici que les méthodes et l'aspect des cultures obtenues, les observations relatives à la production d'a-FP étant décrites par ailleurs ([8]).

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les fragments utilisés sont obtenus à partir de ponctions-biopsies du foie (PBF), d'hépatectomies partielles (HP) ou de prélèvements nécropsiques (PN) effectués à l'hôpital et immédiatement mis dans un récipient stérile (contenant une solution saline tamponnée pour les PBF). Ils sont transportés sous glace au laboratoire et conservés à + 4 °C lorsque la mise en culture ne peut être immédiate.

Les prélèvements sont d'abord finement hachés au bistouri ou dilacérés à la pipette Pasteur, puis lavés trois fois dans une solution saline sans calcium ni magnésium (les PBF de faible volume ne sont pas lavées). Dans certains cas, quelques-uns des menus fragments obtenus sont utilisés comme explants et placés alors sur coagulum plasmatique ou directement sur le support de culture. La dispersion des fragments restants est réalisée soit par digestion dans une solution de trypsine selon les méthodes classiques (trypsine Difco 1 : 250 à 2,5 ‰ en Hanks Balanced Salt Solution, le temps d'action variant selon le volume des prélèvements), soit par dispersion mécanique à la pipette. La suspension cellulaire est alors centrifugée pendant 5 mn à 1 500 tr/mn et, après élimination du surnageant, le culot cellulaire

est mis en suspension dans le milieu de culture (10^5 à 5 x 10^5 cellules/ml selon les essais).

Lorsque les fragments sont difficiles à dissocier (cancer sur cirrhose), ils sont mis en culture sans numération préalable des cellules. Les cultures sont faites en flacons de verre ou de polystyrène revêtus ou non d'un gel d'agar ou d'agar-gélatine.

Nous avons employé les milieux de base suivants :

1. Minimum essentiel de Eagle ([9]).
2. 199 de Parker.
3. Earle ([11]).
4. HBSS à 0,5 % d'hydrolysat de lactalbumine.
5. Même milieu sans rouge de phénol ni autre indicateur de pH.
6. Milieu nº 5 + 0,1 % d'extrait de levure (Yeastolate Difco) + 0,6 % de L-glutamine (solution à 0,5 %).
7. Milieu nº 6 + 1 000 µg p. 100 de vitamine B 12 + 5 mg p. 100 de vitamine C.

Au moment de leur utilisation, tous les milieux reçoivent des antibiotiques aux concentrations usuelles et 10 à 30 % de sérum humain normal (SH). Les milieux 5, 6 et 7 reçoivent, en outre, 1 mg p. 100 de dipyramidol dont Lenoir et coll. ([12]) ont montré l'action favorable sur les cultures d'hépatocytes. Le pH est ajusté à 6,7 ou 7,0. Les cultures sont incubées à 37 ºC. Sauf quelques essais en tubes roulants, il s'agit toujours de cultures statiques en tubes ou flacons hermétiquement bouchés.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — Les onze prélèvements actuellement étudiés (8 PBF, 2 HP, 1 PN) proviennent de carcinomes hépatocellulaires. Parmi ceux-ci, quatre nous ont permis d'obtenir la survie et la multiplication des cellules.

Les périodes pendant lesquelles nous avons pu entretenir ces cultures ont duré respectivement 54 (T), 55 (II), 27 (III) et 35 (IV) jours. Les essais de transfert ont toujours échoué ; au premier passage, il y a parfois un début de multiplication, mais ensuite les cellules meurent rapidement.

C'est le milieu nº 7 à 30 % de SH qui a donné les meilleurs résultats. Viennent ensuite les milieux 4, 5 et 6 ; les milieux 1 et 2 ne donnent que des cultures fugaces durant au plus 7 à 8 jours. Le milieu nº 3 n'a permis aucune prolifération.

Des supports éprouvés, le verre est le meilleur, bien que l'adhérence des cellules cancéreuses n'y soit pas très bonne. Les tubes roulants sont préférables à cet égard, mais la prolifération n'y est pas améliorée.

La trypsination dans les conditions décrites donne de meilleurs résultats que la dilacération mécanique.

Les cellules cancéreuses en culture se différencient nettement des hépatocytes normaux par leur forme arrondie ou polygonale à angles mousses et leurs dimensions irrégulières alors que l'hépatocyte normal a une forme polygonale à angles nets et une taille assez régulière. Les cellules cancéreuses ont souvent tendance à l'auto-agrégation et forment alors des amas plus ou moins importants comparables à ceux décrits par Kuroda ([13]) dans les cultures de foie embryonnaire de poulet. Ces agrégats peuvent adhérer au support et se comporter alors comme des explants.

Au cours de la culture les cellules peuvent conserver leur morphologie originelle ; elles se multiplient alors sur le support ou en suspension en formant des amas irréguliers ou des couches monocellulaires. Dans d'autres cas la culture a un aspect classique : les cellules adhèrent au support, s'étalent plus ou moins et se divisent en formant des îlots de cellules épithéliales ou fibroblastiques.

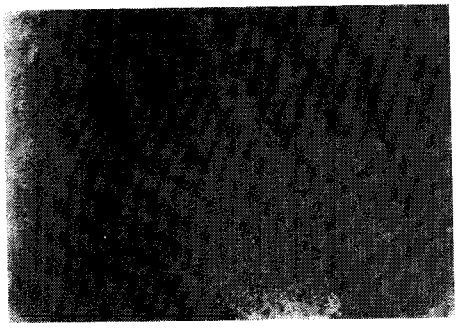

Fig. 1

Fig. 2

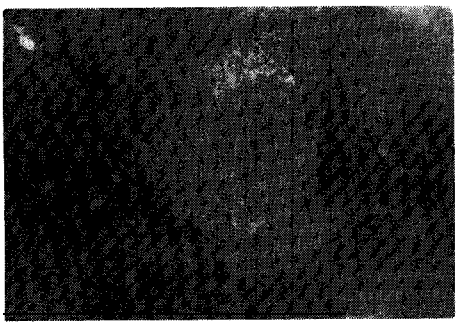

Fig. 3

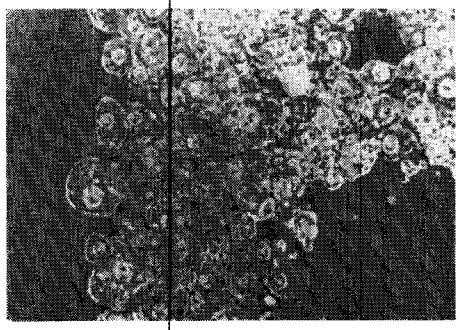

Fig. 4

Fig. 1. — Tapis épithélial développé à partir d'un petit amas de cellules. Matériel vivant (culture correspondant au 2e type décrit) (Obj. : 10 Y, Oc. : 5 X).

Fig. 2. — Culture 3. Au centre, une cellule à 8 noyaux. Coloration de May-Grunwald-Giemsa (Obj. : 25 ×, oc. : 12 ×).

Fig. 3. — Migration cellulaire et début de formation d'une membrane épithéliale à partir d'un agrégat cellulaire ayant adhéré au verre. Matériel vivant (culture correspondant au 2e type décrit) (Obj. : 10 ×, oc. : 5 ×).

Fig. 4. — Ilot de multiplication. Matériel vivant (culture correspondant au 1er type décrit) (Obj. : 10 ×, Oc. : 5 ×).

Non seulement nous avons observé la multiplication cellulaire en constatant, par les examens microscopiques journaliers, l'augmentation du nombre des cellules, mais nous l'avons aussi vérifiée par numération cellulaire : ayant ensemencé 1 x 10^6 cellules, nous en avons compté 5 jours après 3 x 10^6 en suspension. Leur nombre avait donc augmenté plus de trois fois puisque les cellules adhérant au flacon n'ont pas été dénombrées. Cette multiplication, relativement rapide dans les cultures I, III, IV a été très lente dans la culture II.

Après un temps variable et quel que soit le type de culture, la multiplication cesse, les cellules dégénèrent puis meurent.

La production d'a-FP par deux de ces cultures peut être considérée comme la preuve que ce sont bien les hépatocytes tumoraux qui ont proliféré (8).

CONCLUSION. — La culture des cellules d'hépatocarcinome humain est possible, bien que difficile, avec une proportion élevée d'échecs et l'impossibilité jusqu'ici de réussir des subcultures. Outre l'intérêt de l'étude métabolique de l'hépatocyte tumoral, les progrès réalisés dans ce domaine pourront éventuellement être utiles à une autre culture très délicate, celle de l'hépatocyte humain normal.

(*) Séance du 14 septembre 1970.

(1) G. I. ABELEV, S. D. PEROVA, N. I. KHRAMKOVA, Z. A. POSTNIKOVA et I. S. IRLIN, *Transplantation*, 1, 1963, p. 174.

(2) G. I. ABELEV, ***Progr. Exp. Tumor. Res., 7, 1965,*** p. 104.

(3) I. S. IRLIN, S. D. PEROVA et G. I. ABELEV, *Int. J. Cancer, 1,* 1966, p. 337.

(4) C. J. DAWE, J. WHANG-PENG, W. D. MORGAN, R. W. O'GARA et M. G. KELLY, *J. Nat. Cancer Inst.*, **40, 1968,** p. 1167.

(5) N. W. HULL, R. P. CARBONE, W. R. O'GARA et M. G. KELLY, *Proc. Assoc. Cancer Res.*, **9, 1968,** p. 33.

(6) R. BAYLET et R. CAMAIN, C. ***R. Soc. Biol., 156*** (2), 1962, p. 324.

(7) J. M. CHEN, *Unio* ***Inter. Contra Cancrum, 20, 1964,*** p. 1314.

(8) S. QUELIN, M. RIOCHE, R. MASSEYEFF, I. SECK, M. JACQUESSON et B. BASTERIS, ***Synthèse in vitro, d'α-FP par les cellules de foie humain cancéreux en culture.***

(9) H. EAGLE, *Science,* **130, 1959,** p. 432.

(10) J. F. MORGAN, H. J. MORTON et R. C. PARKER, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1950,* p. 1.

(11) W. R. EARLE, ***J. Nat. Cancer Inst., 4,*** 1943, p. 165.

(12) P. LENOIR, Y. LE GUILLY et M. BOUREL, ***Comptes rendus, 267,*** Série D, 1969, p. 1522.

(13) Y. KURODA, *Exptl. Cell. Res.*, ***49,*** 1968, p. 626.

(Service des cultures de Tissus, I. E. M. V. T.,
Laboratoire National de Recherches Vétérinaires, Dakar, *Sénégal* ;
Service de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine et Pharmacie, Dakar, Sénégal ;
Hôpital ***Le Dantec, Dakar,*** *Sénégal* ;
Ecole Nationale de Médecine, 06-*Nice*, *Alpes-Maritimes.*)

13. Tmp. JOUVE, 12, rue de Tournon, Paris (6")
Imprimé en France