

Utilisation des protéines du lait comme milieu nutritif dans les cultures cellulaires

par

J. L. NANO, L. VERMEULEN et P. RAMPAL*

Les cultures de cellules nécessitent l'utilisation d'un milieu nutritif composé d'acides aminés, de sucres et de vitamines. A ce milieu doit être apporté un supplément de liquide biologique ou d'extraits mal définis. On a ainsi, depuis le début du siècle, successivement proposé de cultiver les cellules en présence d'extraits embryonnaires, de liquide céphalo-rachidien ou de liquide amniotique. C'est cependant le sérum de source diverse qui est actuellement le plus utilisé des compléments pour la culture (Barnes et Sato, 1980).

Cependant, compte tenu de l'utilisation croissante des cultures cellulaires en biologie et en médecine et du coût important du sérum, une alternative moins onéreuse a été recherchée. Or le lait est un milieu qui peut *in vivo* maintenir des cellules viables. Le lait, humain ou bovin, contient jusqu'à 4×10^6 cellules/ml essentiellement macrophages, T lymphocytes et B lymphocytes qui synthétisent des IgA ; d'autre part, le lait, nutriment unique du nouveau-né, permet à l'enfant de compenser l'immaturité de ses tissus. Partant de ces idées, plusieurs auteurs (Fassolitis *et al.*, 1981. Klagsburn, 1978 et 1980. Sereni *et al.*, 1981) ont tenté de cultiver les cellules en présence de lait, puis ont cherché à identifier les facteurs actifs qui, dans le lait, permettent la croissance cellulaire *in vitro*, ces facteurs étant vraisemblablement d'une importance capitale pour le fonctionnement des cellules *in vivo*.

Klagsburn en 1978 a cultivé des fibroblastes humains et de souris (3T3) en présence de sérum de veau et quand ces cellules sont arrivées à confluence et ne se sont pas multipliées, cet auteur a incorporé du lait humain à différentes concentrations. Les cellules 3T3

Laboratoire d'Hépatogastro-entérologie, Centre d'Hépatogastro-entérologie (Pr J. Delmont), Hôpital de Cimiez, 4, avenue Reine-Victoria - 06000 Nice.

* A qui la correspondance doit être adressée.

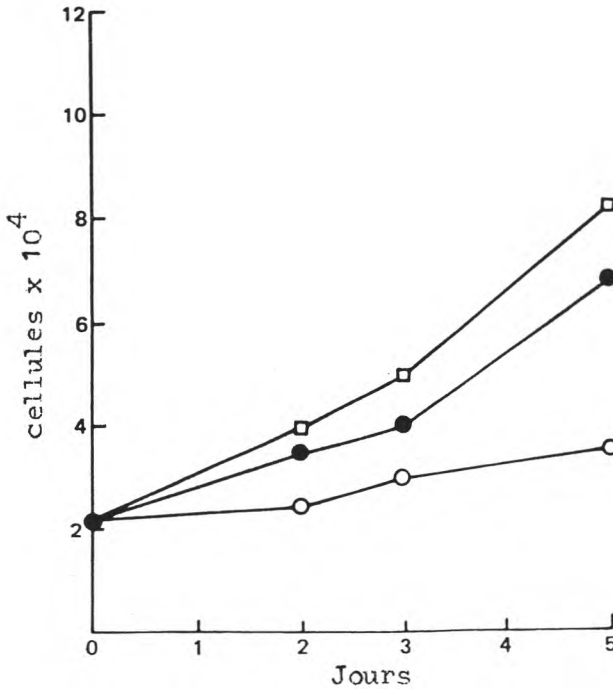


fig. 1

Stimulation de la division cellulaire par le lait
Des cellules 3T3 en monocouche confluite sont incubées avec 0 % (○), 1 % (●) ou 2,5 % (□) de lait. Après 2,3 et 5 j, les cellules sont détachées avec de la trypsine et comptées. (Klagsburn M., 1978).

Stimulation of cell division by milk

Cells 3T3 in confluent monolayer were incubated with 0 % (○), 1 % (●) or 2.5 % (□) milk. After 2, 3 and 5 days, cells were harvested with trypsin and numbered. (Klagsburn M. 1978).

voient alors leur division augmenter en fonction de la concentration en lait du milieu (fig. 1) et l'incorporation de la thimidine ^3H dans le DNA est augmentée parallèlement à la multiplication cellulaire (fig. 2). Le lait humain s'est avéré être, à une concentration de 1 %, aussi actif sur la synthèse du DNA que le sérum humain de même donneur à une concentration de 5 %. A une concentration de 0,5 %, le lait humain s'est avéré aussi actif que le sérum de veau à une concentration de 6 %. Si ces résultats sont exprimés en activité spécifique (A.S.), on s'aperçoit que l'A.S. du lait humain sur les cellules 3T3 est 50 à 100 fois plus grande que celle du sérum de veau. Un début de caractérisation de ce facteur montre qu'il s'agit d'un fac-

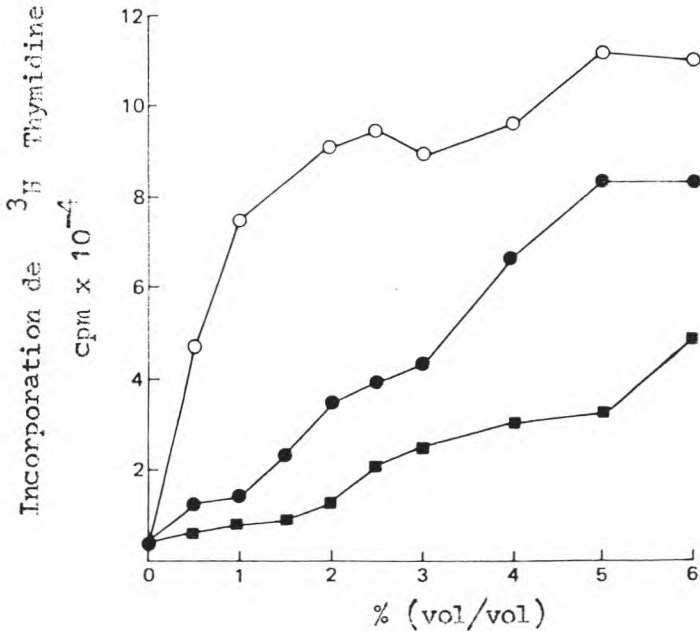


fig. 2

Stimulation de la synthèse du DNA par le lait et le sérum
Des cellules 3T3 en monocouche confluyente sont incubées avec des concentrations variables de lait humain (○), de sérum humain du même donneur (●) et du sérum de veau (■) en présence de thymidine tritié. (Klagsburn M., 1978).

Stimulation of DNA synthesis by milk and blood serum
3T3 cells in confluent monolayer were incubated with various concentrations of human milk (○), blood serum of the same donor (●) and calf serum (■) in mixture with tritiated thymidine. (Klagsburn M., 1978).

teur protéique sensible à la trypsine, stable avec un poids moléculaire situé en 14 000 et 18 000 et un point isoélectrique situé entre 4,42 et 4,68.

Carpenter en 1980 a tenté d'identifier, par une méthode immunologique, le facteur de croissance présent dans le lait humain. Cet auteur a observé, qu'en incorporant de l'Epidermal Growth Factor (E.G.F.) 10 mg/ml ou du lait humain à 5 % dans un milieu de cultures de fibroblastes humains, l'incorporation de ³H-thymidine est augmentée d'un facteur 10 par rapport à une culture témoin. Quand ces cultures étaient conduites en présence d'un anticorps anti E.G.F., l'effet stimulant était déprimé de 90 %. Parallèlement à l'incorporation de thymidine, la croissance cellulaire est augmentée de 50 % en

présence de milieu supplémenté en 10 % de lait humain et est inhibée par la présence dans le milieu, d'anticorps anti E.G.F. Cependant, l'E.G.F. ne paraît pas être le seul facteur de croissance présent dans le lait car, l'E.G.F. a été identifié par Carpenter dans le lait obtenu chez des femmes 5 semaines après l'accouchement ; alors que, pour Klagsburn, l'action sur la prolifération cellulaire est d'autant plus importante que l'on est proche de la naissance. Parallèlement, le poids moléculaire de l'E.G.F. de 8 000 est très différent de celui du facteur de croissance isolé dans le lait par Klagsburn. Et surtout les cellules N.R.G. qui sont des cellules 3T3 dépourvues de récepteurs de l'E.G.F. augmentent leur prolifération en présence de lait.

Du fait des propriétés trophiques démontrées sur le lait humain, les auteurs se sont intéressés aux effets du lait de vache comme substitution du sérum de veau dans les cultures monocouches.

Klagsburn en 1980 a démontré que les cellules épithéliales MDCK, provenant de reins de chien, poussaient électivement en présence de 2,5 % de colostrum de vache recueilli dans les 8 h suivant la mise à bas de la vache (fig. 3).

Cependant, ces cultures épithéliales ne pouvaient être maintenues quand le colostrum était remplacé par du lait obtenu 8 jours après la naissance.

Parallèlement, les cultures fibroblastiques de peau humaine ne poussaient ni en présence de colostrum ni en présence de lait. Cette

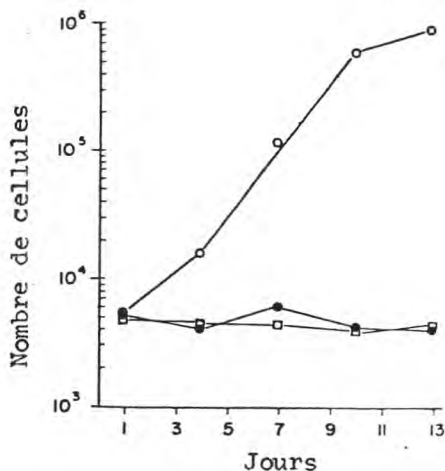


fig. 3

Courbe de croissance des cellules MDCK en présence de colostrum. Les cellules MDCK sont inoculées dans du DMEM à la densité de 5×10^3 cellules/cm². Le DMEM est changé 6 h après l'inoculation et remplacé par du DMEM 2,5% (v/v) de colostrum de 1 j (○), ou du DMEM supplémenté avec 2,5% (v/v) de lait de 8 j (●). Chaque 3 j, les cellules sont comptées en double exemplaire et le reste des cellules sont changées avec du milieu frais (Klagsburn M., 1980).

Growing curve of MDCK cells added in mixture with colostrum

MDCK cells were inoculated in DMEM at a density of 5×10^3 cells/cm². DMEM was changed 6 hours after inoculation and replaced by fresh DMEM (□), 2.5% of one day colostrum supplemented DMEM (○), or 2.5% of 8 days milk DMEM (●). Every 3 days, cells were numbered in duplicate and fresh medium changed for remaining cells (Klagsburn M., 1980).

propriété du colostrum de sélection des cellules épithéliales a été utilisée par de nombreux laboratoires dont le nôtre pour sélectionner les cellules épithéliales au sein d'une population de cellules clonées (Negrel, 1982). Le recueil de colostrum et sa stérilisation, offrant de grosses difficultés, l'application technique de cette pratique est apparue très délicate et l'intérêt s'est alors focalisé sur l'utilisation de lait de vache adulte dans les cultures cellulaires.

Fassolitis a pris du lait en poudre commercial, écrémé qu'il a stérilisé par filtration sous pression sur un filtre de $0,22 \mu$. Il a ainsi pu cultiver, en présence de 5 % de lait, des cellules de rein de singe (B.G.M.) (fig. 4). Cultivée dans les mêmes conditions, une lignée de fibroblastes ne s'est pas multipliée. La susceptibilité au virus de ces cellules est analogue à celle de cultures conduites en 10 % de sérum de veau et les possibilités de conservation et de congélation de cette lignée cellulaire paraissent très satisfaisantes puisque la viabilité après congélation s'établit à 90 %.

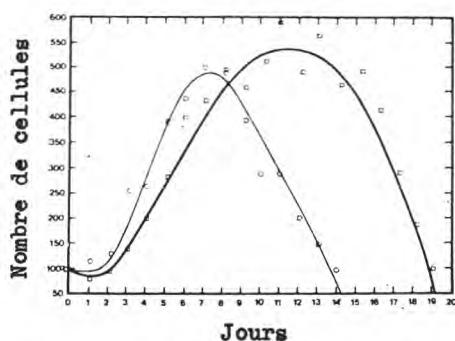


fig. 4

Comparaison des courbes de croissance des cultures BGM cultivées dans du milieu supplémenté avec 5% de lait (□) ou du milieu supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (○). Ces cellules au jour indiqué sont comptées en double exemplaire, la valeur portée représente la moyenne. (Fassolitis A.C. *et al.*, 1981).

Comparison of growing curves of BGM cultures inoculated in 5% milk supplemented medium (□) or 10% fetal calf serum supplemented medium (○). Cells were numbered in duplicate, indicated value is the average. (Fassolitis *et al.*, 1981).

Certes, ces résultats sont discordants avec ceux de Klagsburn qui n'observait aucune action positive du lait de vache sur la prolifération des cellules épithéliales, quand il était recueilli 8 jours après la naissance.

Cependant, il faut noter que Klagsburn n'utilisait pas une technique de filtration sous pression mais une méthode de filtration qui impose une centrifugation et une dilution importante du lait. Cette méthode pouvait avoir contribué à lui faire perdre certains facteurs de croissance contenus en moins grande quantité dans le lait que dans le colostrum.

Ces résultats semblent confirmés par ceux de Sereni (Sereni, Baserga, 1981) qui a cultivé de nombreuses lignées cellulaires épithéliales en présence de lait de vache, écrémé ou cru. Ce lait a été centri-

fugé, le surnageant lipidique et le culot cellulaire éliminés, la partie intermédiaire filtrée à $0,22 \mu$. Cependant, pour cet auteur, l'adjonction au milieu de 0,5 % de sérum de veau en plus des 10 % de lait est une nécessité afin de permettre une adhésion des cellules à la surface de la culture. Il est possible, qu'au cours de la séparation, certains facteurs d'attachement cellulaire aient été éliminés. Dans ces conditions de culture, les courbes de croissance des différentes lignées cellulaires ont été tout à fait satisfaisantes (fig. 5).

Tout récemment, sept lignées cellulaires établies, épithéliales et fibroblastiques et quatre primocultures ont été cultivées (Steimer

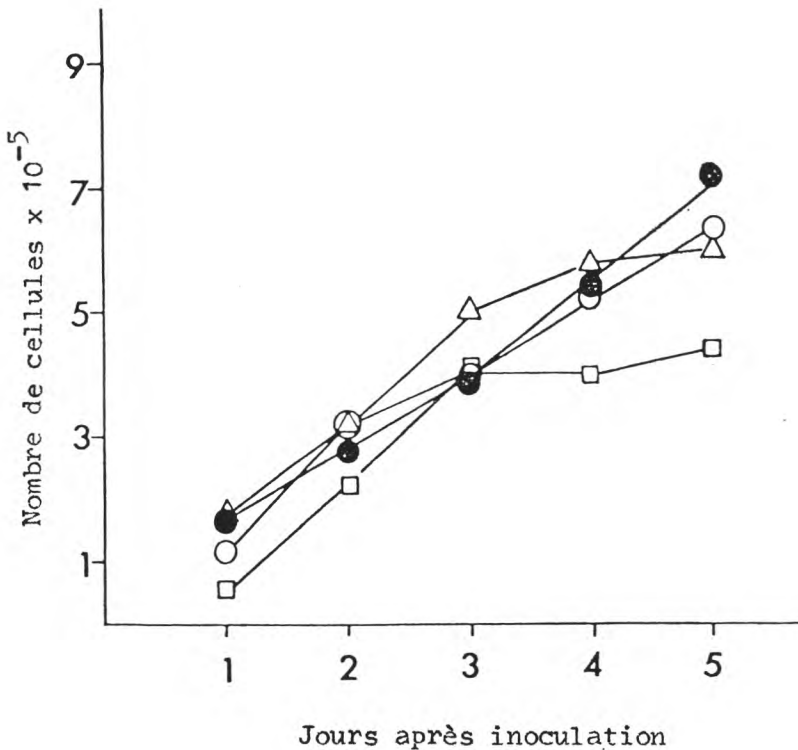


fig. 5

Courbes de croissance des cellules NIH 3T3 inoculées à la densité de 10^5 cellules par boîte de Pétri de 35 mm dans du milieu de Dulbecco supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal \triangle — \triangle , 5% de lait \bullet — \bullet , 3% de lait \circ — \circ et 1% de lait \square — \square . (Sereni A. et Baserga R. (1981).

Growing curves of NIH 3T3 cells inoculated at a density of 10^5 cells per 35 mm diameter Petri dish in Bulbecco medium added with 5% fetal calf serum (\triangle — \triangle), 5% milk (\bullet — \bullet), 3% milk (\circ — \circ) and 1% milk (\square — \square). (Sereni A. et Baserga R., 1981).

et al.) dans un milieu sans sérum auquel a été ajouté du colostrum ou du lait recueilli 80 jours après la naissance. Les cellules épithéliales ont poussé en présence de colostrum et on atteint des densités de saturation entre 22 et 63 % de celles qu'elles atteignent en présence de sérum. A l'opposé, les fibroblastes et les primocultures n'ont pas poussé en présence de colostrum. Aucune des onze lignées testées n'a poussé en présence de lait recueilli 80 jours après la naissance. Par contre, les cellules incapables de pousser en présence de colostrum ou de lait âgé, ont une croissance satisfaisante quand les boîtes de culture sont, avant inoculation, recouvertes de fibronectine. De plus, certaines lignées nécessitent l'adjonction, en plus de la fibronectine, d'insuline ou de transferrine de manière à terminer leur croissance. La densité de saturation atteinte dans ces conditions est alors tout à fait satisfaisante.

En conclusion, les facteurs de croissance contenus dans le lait paraissent nombreux et présents à une concentration d'autant plus importante que l'on se rapproche plus de naissance. Cela confère plusieurs avantages au lait comme milieu nutritif cellulaire : d'une part, les cultures en présence de colostrum permettent de sélectionner les cellules épithéliales, d'autre part, le lait seul, ou en cas de culture exigeante, supplémenté par des apports nutritifs complémentaires, permet d'assurer des cultures cellulaires d'une excellente viabilité. Enfin, dans certains cas, le lait ou le colostrum peuvent constituer une source de facteur de croissance (E.G.F.) ou de fibronectine peu onéreuse.

Bibliographie

- BARNES (D.), SATO (G.) (1980). — Serum free cell culture a unifying approach. *Cell*, 22, 649-655.
- CARPENTIER (G.) (1980). — Epidermal growth-factor is a major growth-promoting agent in human milk. *Science*, 210, 198-199.
- FASSOLITIS (A. C.), NOVELLI (R. M.), LARKIN (E. P.) (1981). — Serum substitute in epithelial cell culture media: nonfat dry milk filtrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 42, 200-203.
- KLAGSBURN (M.) (1978). — Human milk stimulates DNA synthesis and cellular proliferation in cultured fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75, 5057-5061.
- KLAGSBURN (M.) (1980). — Bovine colostrum supports the serum-free proliferation of epithelial cells but not of fibroblasts in long term culture. *Journal Cell Biology*, 84, 808-814.
- NEGREL (R.), RAMPAL (P.), NANO (J. L.), CAVENEL (C.) AILHAUD (G.) (1982). — Establishment and properties of an epithelial intestinal cell line from rat embryo. (Accepté pour publication dans *Experimental Cell Research*).
- SERENI (A.), BASERGA (R.) (1981). — Routine growth of cell lines in medium supplemented with milk instead of serum. *Cell Biology International Reports*, 5, 339-345.
- STEIMER (K. S.), PACKARD (R.), HOLDEN (D.), KLAGSBURN (M.) (1981). — The serum free growth of cultured cells in bovine colostrum and in milk obtained later in the lactation period. *Journal of Cellular Physiology*, 109, 223-234.