



HAL
open science

Caractérisation de la mort des cellules animales cultivées en bioréacteur

Sandra Carmaux

► **To cite this version:**

Sandra Carmaux. Caractérisation de la mort des cellules animales cultivées en bioréacteur. Sciences pharmaceutiques. 2008. hal-01732878

HAL Id: hal-01732878

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732878>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

2008

FACULTE DE PHARMACIE

**CARACTERISATION DE LA MORT DES CELLULES
ANIMALES CULTIVEES EN BIOREACTEUR**

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 06 juin 2008

pour obtenir

le **Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par Sandra CARMAUX

Née le 20 Mai 1982

Membres du Jury

Président :

Mme FINANCE Chantal, Professeur, Faculté de Pharmacie de Nancy

Juges :

Mme MARC Annie, Directrice de Recherche CNRS, LSGC-UPR6811 Nancy

M. GUEDON Emmanuel, Chargé de recherche CNRS, LSGC-UPR6811 Nancy

SOMMAIRE

TABLE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	7
ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION	10
1. LES PRINCIPAUX PROCESSUS DE MORT CELLULAIRE	11
1.1. La nécrose	13
1.2. L'apoptose	15
1.2.1. Les modifications morphologiques, biochimiques et moléculaires de l'apoptose	16
1.2.2. Le déclenchement de l'apoptose	18
1.2.3. Les caspases	20
1.2.4. La voie extrinsèque ou "voie des récepteurs de mort cellulaire"	23
1.2.5. La voie intrinsèque ou "voie mitochondriale"	24
1.2.6. Le stress du réticulum endoplasmique	26
1.2.7. La régulation de l'activité des caspases	27
2. LA CULTURE CELLULAIRE EN BIOREACTEUR	30
2.1. Les modes d'alimentation du milieu nutritif.....	31
2.2. Systèmes d'agitation et d'aération	32
3. LES METHODES DE CARACTERISATION DE LA MORT CELLULAIRE IN VITRO	35
3.1. Analyse morphologique par microscopies optique, électronique et fluorescence	35
3.1.1. Microscopie optique et colorants d'exclusion.....	36
3.1.2. Analyse des brins d'ADN (fragmentation) par microscopie à fluorescence	37
3.1.3. Visualisation de la chromatine et des corps apoptotiques par microscopie à fluorescence (AO/PI) .	39
3.2. Analyse de l'ADN et des protéines par électrophorèse	40
3.2.1. Analyse des brins d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose.....	40
3.2.2. Identification des endonucléases mises en jeu dans la fragmentation de l'ADN	41
3.2.3. Analyse de l'activation de l'apoptose par Western-blot	42
3.3. Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase par méthode enzymatique colorimétrique.....	43
3.4. Viabilité cellulaire par méthode colorimétrique au Méthyl-Thiazolyl-Tetrazolium (MTT)	44

3.5. Analyse de la mort cellulaire par cytométrie en flux	44
3.5.1. Principes de fonctionnement	46
3.5.2. Analyse morphologique : Laser Scanning Cytometer (LSC)	48
3.5.3. Analyse des fonctions cellulaires par fluorescence	49
3.6. Synthèse des méthodes utilisées en bioréacteurs	65
3.7. Méthodes automatisées utilisables à l'échelle industrielle	68
3.7.1. Evaluation de la viabilité : méthode au bleu trypan.....	68
3.7.2. Evaluation de la viabilité : Méthode au iodure de propidium.....	68
3.7.3. Cytométrie "sans" flux, capillaire.....	71
3.7.4. Détermination électronique du volume cellulaire.....	71
4. LA MORT CELLULAIRE EN BIOREACTEUR	73
4.1. Impact de l'environnement biochimique sur la mort cellulaire en bioréacteurs	73
4.1.1. Limitation en nutriments	73
4.1.2. Oxygène dissous.....	74
4.1.3. Accumulation de métabolites toxiques.....	75
4.2. Impact de l'environnement physique et mécanique sur la mort cellulaire en bioréacteur	75
4.2.1. Effet de l'agitation	76
4.2.2. Influence de l'aération	80
4.2.3. Conclusion.....	81
4.3. Prévention de la mort cellulaire en bioréacteur	82
4.3.1. Supplémentation du milieu	82
4.3.2. Stratégies génétiques	85
4.3.3. Technologie du bioréacteur	88
CONCLUSION	90
BIBLIOGRAPHIE	91

TABLE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Les modifications morphologiques de la nécrose</i>	11
<i>Figure 2 : Les modifications morphologiques de l'apoptose</i>	11
<i>Figure 3 : Cellules CHO saine et apoptotique transfectées par la GFP ("Green Fluorescent Protein").....</i>	12
<i>Figure 4 : Caractéristiques morphologiques de la nécrose et de l'apoptose.....</i>	13
<i>Figure 5 : Cellules Hela induite en apoptose par TNFα</i>	16
<i>Figure 6 : Schéma simplifié représentant les protéines essentielles au programme de mort cellulaire chez C.elegans et chez les mammifères.....</i>	19
<i>Figure 7 : Structure et activation des caspases</i>	20
<i>Figure 8 : Les différentes voies d'induction de l'apoptose</i>	22
<i>Figure 9 : Les différentes voies d'activation des caspases.....</i>	22
<i>Figure 10 : Activation des caspases par les récepteurs de mort Fas et TNF-R1</i>	23
<i>Figure 11 : Représentation simplifiée de la voie intrinsèque ou voie mitochondriale</i>	25
<i>Figure 12 : Structure des protéines Bcl-2 et Bax.....</i>	28
<i>Figure 13 : Bioréacteur.....</i>	30
<i>Figure 14 : Bioréacteur en verre 5L, BIOSTAT[®] B-DCU Single version.....</i>	30
<i>Figure 15 : Bioréacteur de culture cellulaire 300L, BioFlo Pro[®]</i>	31
<i>Figure 16 : Les différents modes de culture.....</i>	31
<i>Figure 17 : Evolution dans le temps de la concentration cellulaire (X), des substrats (S) et des produits (P) en fonction du mode d'alimentation du bioréacteur</i>	31
<i>Figure 18 : Agitation radiale : agitateur de type "turbine"</i>	32
<i>Figure 19 : Agitation axiale : agitateur de type "hélice"</i>	33
<i>Figure 20 : Bioréacteur de type "Air lift"</i>	33
<i>Figure 21 : Poches de culture de type "vague" (10L, 5L utiles).....</i>	34
<i>Figure 22 : Exemples de dispositifs d'aération ("ring sparger" et fritté)</i>	34
<i>Figure 23 : Cellule de comptage.....</i>	36
<i>Figure 24 : Principe du test TUNEL-fluoresceine-dUTP</i>	38
<i>Figure 25 : Observation de la fragmentation de l'ADN à l'aide de la méthode enzymatique TUNEL</i>	38
<i>Figure 26 : Marquage DAPI.....</i>	39
<i>Figure 27: Fragmentation internucléosomale</i>	40
<i>Figure 28 : Fragmentation internucléosomale de l'ADN lors de l'apoptose</i>	41
<i>Figure 29 : Electrophorèse Caspase-3</i>	42
<i>Figure 30 : Electrophorèse Cytochrome-c.....</i>	43
<i>Figure 31 : Principe du dosage de la LDH.....</i>	44
<i>Figure 32 : Principe de la méthode colorimétrique au MTT.....</i>	44
<i>Figure 33 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux</i>	47
<i>Figure 34 : Incidence de la lumière sur la cellule</i>	48
<i>Figure 35 : Visualisation SSC et FSC</i>	49
<i>Figure 36 : Apoptose induite chez des cellules Jurkat (10μM de camptothécine)</i>	52
<i>Figure 37 : Association cyanine, non perméante aux membrane de cellules viables (SYTOX[®])</i>	52
<i>Figure 38 : Marquage cyanine SYTO[®], perméante aux membranes des cellules viables</i>	52
<i>Figure 39 : Représentation schématique de la perte d'asymétrie de la membrane plasmique durant l'apoptose et du test à l'annexine V.....</i>	53
<i>Figure 40 : Principe du test à l'Annexine V.....</i>	53
<i>Figure 41 : Analyse PI/Annexine V-FITC de cellules de thymocytes de rat.....</i>	54

<i>Figure 42 : Marquage de cellules MR65 cultivées en présence de 200µM d'olomoucine, inducteur de l'apoptose</i>	54
<i>Figure 43 : Double marquage Rhodamine 123 /PI</i>	55
<i>Figure 44 : Principe du marquage JC-1</i>	55
<i>Figure 45 : Marquage au DiOC₂(3) de cellules Jurkat</i>	56
<i>Figure 46 : Variation du potentiel mitochondrial</i>	56
<i>Figure 47 : Marquage Hoechst /PI ; V : viables, A : Apoptotiques, N : Nécrotiques</i>	57
<i>Figure 48 : Marquage au iodure de propidium (PI) pour la mise en évidence des cellules apoptotiques, hypodiploïdes</i>	58
<i>Figure 49 : Principe des méthodes fluorimétrique et colorimétrique</i>	60
<i>Figure 50 : Action des caspases sur les substrats bisamides de type Z-DEVD-R110</i>	61
<i>Figure 51 : Activation de la caspase-3 par la daunorubicine suivie par cytométrie en flux</i>	62
<i>Figure 52 : Activation de la caspase-3 liée à la modification d'exposition de la phosphatidylsérine</i>	62
<i>Figure 53 : Vi-CellTM et Cedex[®]</i>	68
<i>Figure 54 : Nucleocounter[®] - Chemometec</i>	69
<i>Figure 55 : Principe de la méthode de numération des cellules mortes et totales du Nucleocounter</i>	70
<i>Figure 56 : Dispositifs C-Reader et ADAM (Digital Bio)</i>	71
<i>Figure 57 : Système Guava EasycyteTM Plus</i>	71
<i>Figure 58 : Evaluation électronique du volume, et ainsi du diamètre cellulaire</i>	72
<i>Figure 59 : Influence de l'échelle de Kolmogorov sur les cellules</i>	77
<i>Figure 60 : Effet de l'augmentation de l'agitation en culture batch</i>	78
<i>Figure 61 : Effet de l'agitation intensive (1500 rpm) sur la densité cellulaire</i>	79
<i>Figure 62 : Effet de l'agitation de la turbine sur le taux de croissance spécifique</i>	80
<i>Figure 63 : Effet du taux d'aération sur le taux de croissance spécifique</i>	81
<i>Figure 64 : Les différentes étape de la rupture d'une bulle à la surface</i>	81
<i>Figure 65 : Schématisation du procédé dialyse semi-continue</i>	88
<i>Figure 66 : Bioréacteur à lit de bulles</i>	89

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Principales différences entre apoptose et nécrose</i>	12
<i>Tableau 2 : Modifications aux niveaux morphologique et biochimique durant l'apoptose.....</i>	18
<i>Tableau 3 : Conservation des différentes grandes familles de protéines impliquées dans l'apoptose, du nématode aux vertébrés</i>	19
<i>Tableau 4 : Caractéristiques des différents groupes de protéines de la famille Bcl-2</i>	27
<i>Tableau 5 : Critères morphologiques pour l'identification des cellules apoptotiques et nécrotiques</i>	35
<i>Tableau 6 : Caractéristiques des sous-populations de cellules en microscopie à fluorescence AO/PI.....</i>	39
<i>Tableau 7 : Informations données par la cytométrie en flux</i>	47
<i>Tableau 8 : Exemple de substrats fluorescents des caspases.....</i>	61
<i>Tableau 9 : Tableau récapitulatif des différents marqueurs utilisés pour détecter et quantifier la mort cellulaire (non exhaustif).....</i>	64
<i>Tableau 10 : Comparaison des principales méthodes de détection de la mort cellulaire</i>	65
<i>Tableau 11 : Différentes méthodes utilisées pour caractériser et quantifier la mort cellulaire dans la littérature (non exhaustif).....</i>	66

ABREVIATIONS

A

ADN : Acide desoxyribonucléique
AIF : Apoptose Inducing Factor
AO : Acridine Orange
Apaf-1 : Apoptosis Protease-Activating Factor-1
ATP : Adénosine Tri-Phosphate

B

BH : Bcl-2 Homology
BHK : Baby Hamster Kidney

C

CARD : Caspase Activation and Recruitment Domain
CCD : Charge Coupled Device

D

DD : Death Domain
DED : Death Effector Domain
DISC : Death Inducing Signaling Complex

E

Endo-G : Endonucléase G

F

FADD : Fas-associated death domain
FDA : Fluorescéine diacétate
FITC : isothiocyanate de fluorescéine
FSC : Forward SCatter

H

HEK : Human embryonic kidney
HIV-1 : Human immunodeficiency virus-1
HN : Humanine

I

IAP : Inhibitor of Apoptosis Proteins
Il-x : Interleukine x

K

kDa : kiloDaltons

L

LDH : Lactate Deshydrogenase

N

NaBu : Butyrate de sodium
NAC : N-acétylcystéine (antioxydant)

NSO : Noyau SupraOptique

P

PARP : Poly-ADP-Ribose polymérase

PE : Phycoérythrine R

PI : iodure de propidium

PMT : Photomultiplicateur

R

RE : Réticulum endoplasmique

ROI : Reactive Oxydative Intermediate

ROS : Reactive oxygen species

S

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SMAC : Second Mitochondrial Activator of Caspases

SSC : Side SCatter

SREBPs : Sterol-Regulatory Element Binding Proteins

T

TDT : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase

TRAIL-R : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNF-R : Tumor Necrosis Factor Receptor

TUNEL : Terminal deoxynucleodityl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling

INTRODUCTION

La culture en bioréacteur de cellules animales est un outil majeur dans de nombreux domaines pharmaceutiques ou médicaux, tels que celui de la production de protéines thérapeutiques recombinantes, de vaccins, d'anticorps, ou plus récemment, en ingénierie tissulaire.

Des procédés mettant en jeu des bioréacteurs à grande échelle permettent la culture en masse de ces cellules animales. Cependant, leur mise en œuvre nécessite la prise en compte et l'évaluation de paramètres tels que les contraintes hydrodynamiques et l'environnement biochimique, auxquels les cellules sont soumises. Ces paramètres vont influencer la croissance, la viabilité, les vitesses métaboliques et donc leur production. C'est pourquoi, il apparaît essentiel de mieux connaître, décrire, quantifier et prévenir la mort des cellules cultivées *in vitro* en bioréacteur.

Ce travail consiste en une revue bibliographique, évoquant les principales démarches disponibles pour la mise en évidence de la mort cellulaire. La première partie de cette revue décrit les différents processus de mort cellulaire rencontrés soit, la nécrose et l'apoptose. Ce travail décrit ensuite les principales méthodes utilisées pour caractériser et quantifier la mort cellulaire, utilisant la microscopie, l'électrophorèse ou encore la cytométrie en flux. Enfin, les différentes causes de la mort des cellules en culture sont abordées, ainsi que certaines stratégies pour en limiter l'incidence sur les performances des procédés mis en œuvre.

1. LES PRINCIPAUX PROCESSUS DE MORT CELLULAIRE

Il existe deux types majeurs de mort cellulaire : la **nécrose** et l'**apoptose** (*Figure 1, Figure 2, Figure 3, Figure 4 et Tableau 1*).

La **nécrose** est une mort cellulaire dite "accidentelle" qui survient lors d'un dommage. La cellule enfle, puis la membrane cellulaire éclate, déversant le contenu cellulaire dans le tissu environnant et provoquant l'inflammation. Les mitochondries gonflent et subissent des lésions irréversibles (*cf. Figure 1*).

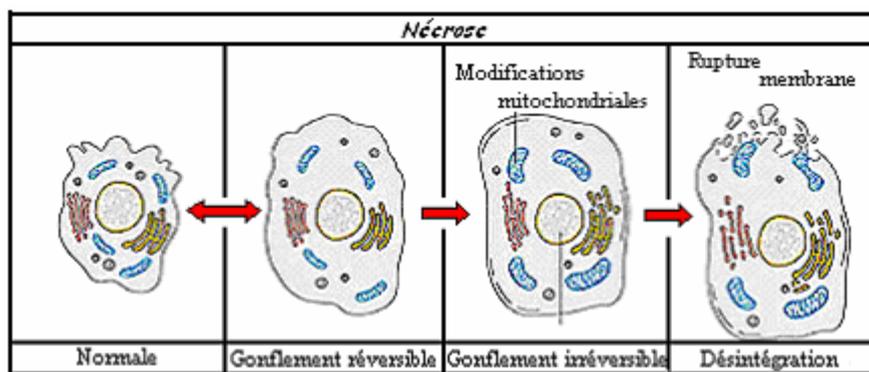


Figure 1 : Les modifications morphologiques de la nécrose [Source : Roche Diagnostics]

L'**apoptose**, ou mort cellulaire programmée, est une forme physiologique de mort cellulaire hautement régulée. Elle est nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. Les cellules d'organismes multicellulaires s'autodétruisent lorsque celles-ci ne sont plus utiles, lorsqu'elles sont endommagées ou dysfonctionnelles. L'apoptose implique habituellement des cellules individuelles dans un tissu et ne provoque pas l'inflammation (*Figure 2 et Figure 3*).

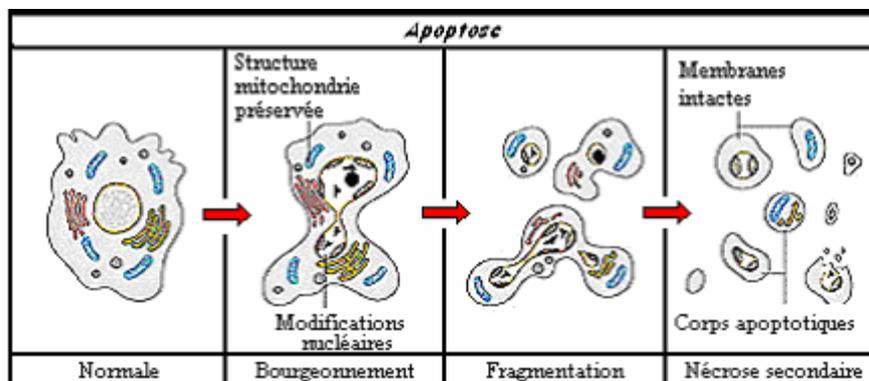
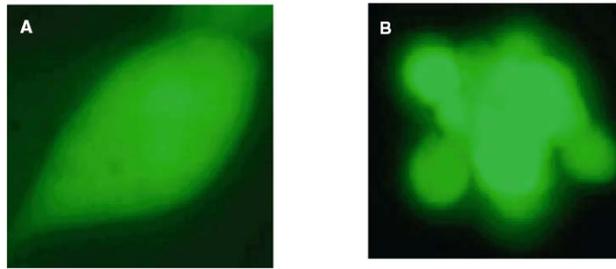


Figure 2 : Les modifications morphologiques de l'apoptose [Source : Roche Diagnostics]



Cellule saine

Cellule apoptotique

Figure 3 : Cellules CHO saine et apoptotique transfectées par la GFP ("Green Fluorescent Protein")
[Arden et al. 2006]

Ces deux formes de mort cellulaire sont rencontrées *in vivo*, mais également, dans le cas de culture en bioréacteur à des fins d'applications biotechnologiques.

Les principales différences entre ces deux types de mort cellulaire sont reprises dans le Tableau 1 et la Figure 4 ci-dessous.

Tableau 1 : Principales différences entre apoptose et nécrose

<i>Nécrose</i>	<i>Apoptose</i>
Mort anormale des cellules	Mort cellulaire programmée
Spontanée, ne nécessite pas d'énergie	Controlée, requiert de l'énergie (ATP)
Bourgeonnement cellulaire	Rétrécissement des cellules, sans inflammation
Fragments ADN de taille aléatoire	Fragmentation de l'ADN : taille multiple de 185 bp
Perte de l'intégrité membranaire du fait de la lyse	Membrane plasmique bourgeonne mais reste intacte
Contenu cellulaire libéré dans l'environnement cellulaire : inflammation	Bourgeonnement des corps apoptotiques (contenu cellulaire encapsulé) (cf. <u>Figure 3</u>)
Phagocytose des débris cellulaires par les macrophages chez les organismes multicellulaires	Phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages chez les organismes multicellulaires <u>[Arden et al. 2006]</u>

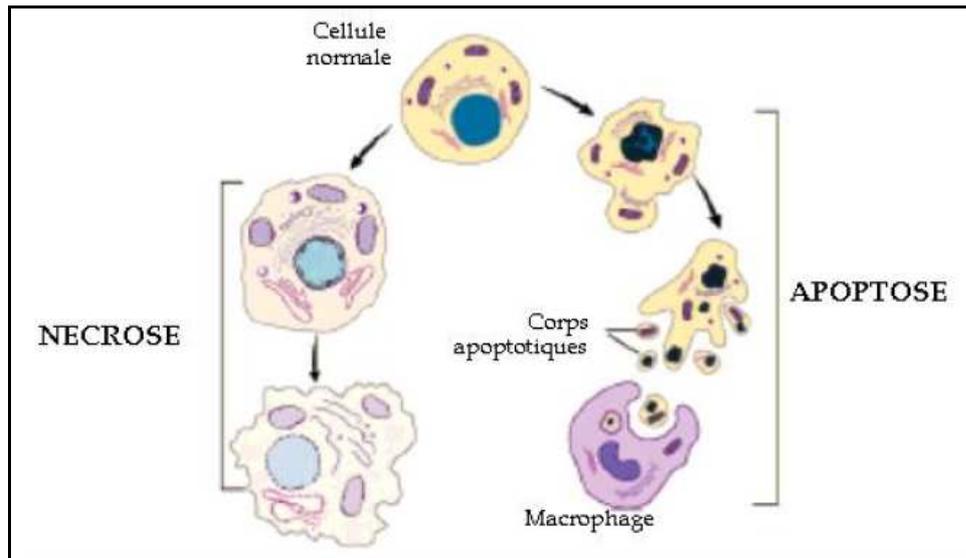


Figure 4 : Caractéristiques morphologiques de la nécrose et de l'apoptose [Saikumar et al. 1999]

Les caractéristiques des deux types de mort cellulaire sont évoquées plus précisément dans les chapitres suivants.

1.1. La nécrose

Le terme de "nécrose" est issu du grec nekros (νεκρός) qui signifie "mort". Une définition pourrait être : "un arrêt pathologique, autrement dit anormal, du fonctionnement d'une cellule". La nécrose a été la première forme de mort cellulaire mise en évidence. Elle intervient après une agression sévère de la cellule. Elle n'est pas déterminée par des facteurs intrinsèques, mais uniquement par des perturbations de l'environnement. Elle est l'aboutissement de conditions non physiologiques extrêmes et n'est pas déclenchée de façon "volontaire". C'est un mécanisme passif, rapide et non spécifique.

Elle peut être induite par différents éléments tels que l'insuffisance d'apport en oxygène (hypoxie, ischémie), des agents physiques (traumatismes mécaniques, thermiques, radiations), chimiques et infectieux (virus, bactéries, champignons, parasites), des réactions immunologiques, des déséquilibres nutritionnels...

Contrairement à l'apoptose, la nécrose est considérée comme une mort cellulaire "désordonnée". Une perte précoce du contrôle des flux ioniques au niveau membranaire entraîne la pénétration

massive et excessive de l'eau et plus tard, la lyse de la membrane plasmique. Ceci conduit au relargage du contenu cytoplasmique dans le milieu environnant. Les organelles ont tendance à gonfler. La perméabilité des membranes interne et externe des mitochondries est modifiée par l'augmentation de la concentration en calcium dans ces organelles. Les lysosomes vont se rompre, libérant dans le cytoplasme des enzymes hydrolytiques qui contribuent à la destruction de la cellule. L'ADN nucléaire est dégradé de manière "aléatoire" par des endonucléases activées notamment par des sérines protéases.

Le cytoplasme de la cellule nécrosée est habituellement éosinophile (parfois vacuolaire) par diminution de l'ARN cytoplasmique (responsable de la basophilie cytoplasmique) et par augmentation de la liaison de l'éosine aux protéines cytoplasmiques dénaturées. Il peut être homogène ou vacuolaire (par digestion enzymatique des organites). Le gonflement de la cellule entraîne la rupture de la membrane et ainsi la libération du contenu intracellulaire, qui se caractérise *in vivo* par une inflammation, due à la présence de ces débris, phagocytés par les cellules voisines du système immunitaire. Les modifications nucléaires prennent plusieurs formes avant la disparition du noyau. Trois types de modifications sont rencontrés. La pycnose consiste en la condensation avec rétraction du noyau et l'agglutination des amas chromatiniens contre la membrane nucléaire. Un autre phénomène est la caryolyse, correspondant à une dissolution nucléaire. La masse nucléaire peut également se fragmenter de manière aléatoire par des endonucléases ; il s'agit de la caryorrhexis [Bicknell *et al.* 1995, Dong *et al.* 1997, Maillet *et al.* 2000, Ricci *et al.* 2000].

Les modifications observables en microscopie optique traduisent la dénaturation protéique et la digestion des organites par les enzymes protéolytiques des lysosomes. La nécrose n'est manifeste que plusieurs heures après la mort cellulaire. La nécrose se définit néanmoins plus facilement par comparaison avec l'apoptose. Lorsque l'on constate une mort cellulaire sans pouvoir mettre en évidence des facteurs apoptotiques, on parlera de nécrose. A ce titre, les éléments comparatifs majeurs entre ces deux types de mort cellulaire sont résumés précédemment dans le Tableau 1.

Ce phénomène de nécrose intervient chez les cellules cultivées en bioréacteur et est influencé par les conditions de cultures.

1.2. L'apoptose

La mort cellulaire programmée fait partie intégrante de la physiologie normale d'un organisme. Elle est indispensable au maintien de l'homéostasie. Ainsi, au cours des nombreuses mitoses et différenciations cellulaires qui permettront de créer un organisme à partir d'un œuf, il est en permanence nécessaire d'éliminer les cellules superflues ou potentiellement dangereuses. L'apoptose est une réponse à une accumulation de "stress" non létaux tels que le manque de nutriments, de facteurs de croissance, une infection virale ou l'accumulation de métabolites.

La notion d'apoptose a été introduite en 1972 par Kerr *et al.* pour désigner une forme de mort cellulaire différente de la nécrose, tant d'un point de vue morphologique que biochimique [Kerr *et al.* 1972]. Elle est considérée comme étant une mort cellulaire "ordonnée" qui procède en différentes phases qui durent quelques heures. Les cellules tout d'abord s'isolent. Le noyau et le cytoplasme se condensent, induisant une diminution notable du volume cellulaire. La mitochondrie va également subir des modifications importantes (relargage du cytochrome-c dans le cytoplasme...). La chromatine est clivée en fragments réguliers.

La membrane plasmique bourgeonne et conduit à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. En effet, toute trace doit être éliminée dans le tissu afin de prévenir la nécrose secondaire ayant pour conséquence une libération aléatoire du contenu cellulaire et donc le déclenchement d'une réaction inflammatoire. Afin de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes d'organismes vivants, la cellule va signaler son état apoptotique à son environnement notamment grâce au changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines qui passent d'une orientation cytoplasmique vers une orientation extracellulaire. L'intégrité de la membrane plasmique n'est pas altérée au cours du processus, ce qui permet d'éviter toute libération du contenu cellulaire.

Ce phénomène d'apoptose intervient chez les cellules cultivées en bioréacteur et est influencé par les conditions de cultures [Al-Rubeai *et al.* 1998, Laken *et al.* 2001, Maillet *et al.* 2000, Poulin *et al.* 2005, Ricci *et al.* 2000].

1.2.1. Les modifications morphologiques, biochimiques et moléculaires de l'apoptose

Morphologie

L'une des premières altérations subies par la cellule est la déshydratation. La perte de l'eau intracellulaire conduit à la condensation du cytoplasme. Les cellules, originellement rondes, peuvent s'allonger ou prendre une forme irrégulière, et diminuent de taille.

Un changement caractéristique de l'apoptose est la condensation de la chromatine nucléaire. La membrane nucléaire se désintègre ensuite, les protéines lamines (protéines de la membrane nucléaire) sont dégradées et le noyau se fragmente (caryorrhexis). Les fragments nucléaires sont dispersés dans tout le cytoplasme puis "empaquetés" avec du cytoplasme dans des fragments de membrane cytoplasmique en formant ainsi des corps apoptotiques. Ceux-ci vont se détacher peu à peu : la cellule "bourgeonne" (*Figure 5*).

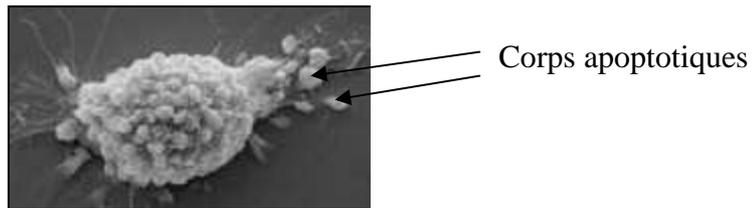


Figure 5 : Cellules HeLa induite en apoptose par TNF α . [Cellule apoptotique 2006]

La perte des structures de surface telles que les pseudopodes et les microvillosités (microtubules) est aussi caractéristique de l'apoptose. [Al-Rubeai et al. 1998(a)]

Modifications biochimiques et moléculaires

Une importante modification est le changement de ratio entre les protéines inhibitrices (Bcl-2, Bcl-x_L...) et promotrices (Bax, Bik, Bad...) de l'apoptose, de la famille Bcl-2 [Golstein *et al.* 1997, Kumar *et al.* 1997, Nagata *et al.* 1997, Yang *et al.* 1996]. De plus, la perte de potentiel mitochondrial transmembranaire observée tôt lors de l'apoptose, l'apparition d'intermédiaires réactifs oxydants (ROI : Reactive Oxydative Intermediates) et la libération du cytochrome-c par la mitochondrie et de calcium Ca²⁺ (augmentation de la concentration intracellulaire de cet ion) semblent être des conséquences de l'ouverture de pores dans la membrane mitochondriale.

L'intégrité structurale et la plupart des fonctions de transport de la membrane plasmique sont conservées au moins durant la phase initiale de l'apoptose. Cependant, la perméabilité de la membrane plasmique à certains fluorochromes tels que la 7-aminoactinomycine-D ou Hoechst

33342, est augmentée [Frey *et al.* 1995, Ormerod *et al.* 1993, Schmid *et al.* 1992]. L'un des changements caractéristiques de la membrane plasmique est la perte de l'asymétrie phospholipidique conduisant à l'exposition de phosphatidylsérine sur la face externe (*cf.* § 3.5.3.1.b) *Perte de l'asymétrie de la membrane phospholipidique*). Cette modification survient tôt lors de l'apoptose, qu'elle soit médiée par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire (voie des récepteurs de mort cellulaire), ou des agents génotoxiques déclenchant la mort cellulaire via des dommages de l'ADN (voie mitochondriale).

L'activation en cascade de sérine protéases et de caspases (= cystéine protéases) conduit à la dégradation de certaines protéines appelées "substrats de mort" (Poly-ADP-ribose-polymérase (PARP), lamines, actine...). La cellule peut ainsi perdre ses microvillosités du fait de la dégradation de la F-actine [Endersen *et al.* 1995].

L'activation d'endonucléases est également une caractéristique de l'apoptose. Initialement, l'ADN est clivé au niveau des sites d'attachement des boucles de chromatine à la matrice nucléaire (fragments de 50 à 300 kpb). Puis, l'ADN est préférentiellement clivé au niveau des nucléosomes [Al-Rubeai *et al.* 1998(a)].

Les principales modifications morphologiques et biochimiques sont reprises dans le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Modifications aux niveaux morphologique et biochimique durant l'apoptose [Al-Rubeai et al. 1998(a)]

<i>Changements morphologiques</i>	<i>Modifications biochimiques et moléculaires</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Rétrécissement de la cellule - Changement de forme - Condensation de la chromatine nucléaire (perte de structure nucléaire, visuellement reconnaissable et hyperchromicité de l'ADN) - Dissolution de l'enveloppe nucléaire - Fragmentation nucléaire - Condensation du cytoplasme - Perte des structures de surface (pseudopodes, microvillosités) - Formation de corps apoptotiques - Détachement des cellules - Phagocytose des cellules apoptotiques restantes (<i>in vivo</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la proportion de protéines de la famille bcl-2 promotrices (vs inhibitrices) de l'apoptose - Modifications mitochondriales : baisse du potentiel transmembranaire, fuite de cytochrome-c, stress oxydatif (ROI) - Augmentation du Ca²⁺ intracellulaire - Déshydratation de la cellule - Perte de l'asymétrie des phospholipides de la membrane plasmique - Activation des sérines protéases - Activation des caspases en cascade : "protéolyse des substrats de mort" - Dégradation de la F-actine et des protéines autres que les substrats de mort cellulaire - Perte de la stabilité de l'ADN jusqu'à dénaturation - Coupure d'ADN simple brin - Dégradation endonucléolytique de l'ADN (fragments de 50-300 pb, clivage dans l'ADN internucléosomal) - Activation de la transglutaminase

L'apoptose se distingue principalement de la nécrose par la fragmentation génomique régulière, la condensation de la chromatine et la formation de corps apoptotiques [Duval *et al.* 1986, Wyllie *et al.* 1980(b), Wyllie 1997].

1.2.2. Le déclenchement de l'apoptose

L'existence d'un programme moléculaire responsable du déclenchement de la mort cellulaire programmée a tout d'abord été identifié chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, puis chez les mammifères, dont des homologues ont été identifiés.

Chez *C. elegans*, on retrouve 4 protéines-clés :

- Ced-3 est une cystéine protéase à substrat aspartate (caspase) synthétisée par la cellule sous forme de précurseur inactif ;

- Ced-4 est un activateur qui se lie à Ced-3, permettant la production de la caspase active ;
- Ced-9 en interagissant avec Ced-4 l'empêche d'activer Ced-3 ;
- Egl-1 en se liant à Ced-9 permet la libération de Ced-4 qui peut se lier à Ced-3 pour l'activer.

Chez les mammifères, Ced-3 a pour homologue la caspase-1 ; Ced-4, l'Apaf, protéine pro-apoptotique ; Ced-9, les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et Egl-1, les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 à domaine BH3 (*Figure 6, Tableau 3 et § 1.2.3. Les caspases*).

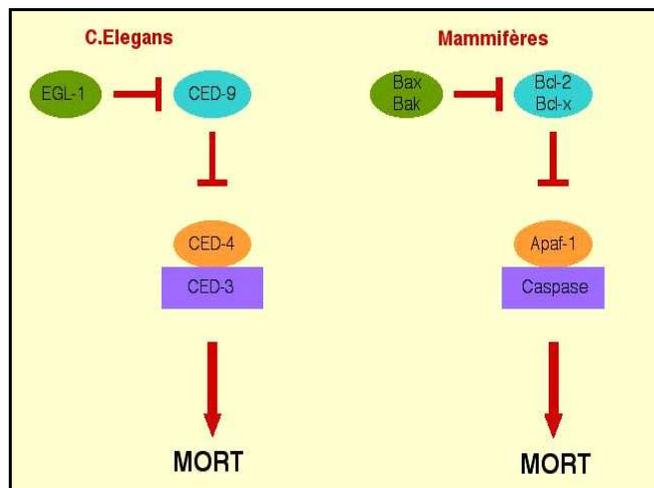


Figure 6 : Schéma simplifié représentant les protéines essentielles au programme de mort cellulaire chez C.elegans et chez les mammifères [Protéines de mort 2006]

Tableau 3 : Conservation des différentes grandes familles de protéines impliquées dans l'apoptose, du nématode aux vertébrés [Ricci et al. 2000]

Inhibiteur des régulateurs (protéines à domaine BH3)	Régulateurs	Adapteurs	Protéases
NEMATODES EGL-1	CED-9	CED-4	CED-3
VERTEBRES Bad, Bid...	Bcl-2	Apaf-1	Caspases

Il existe principalement 2 voies d'induction de l'apoptose dans la cellule :

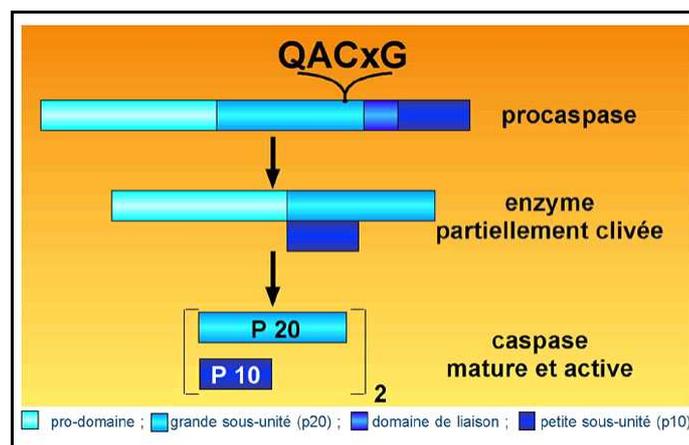
- la voie des **récepteurs à domaine de mort**, situés dans la membrane plasmique, voie aussi appelée "**extrinsèque**" ;

- la voie **mitochondriale**, dite "**intrinsèque**", induite par la libération de protéines mitochondriales.

Ces deux voies permettent l'initiation de l'activation des caspases, les protéases apoptogènes [Chinnaiyan *et al.* 1996, Takahashi *et al.* 1996, Thornberry *et al.* 1995, Wang *et al.* 1994].

1.2.3. Les caspases

La mort par apoptose est essentiellement due à l'activation d'une famille de protéases spécifiques, les caspases (Cystéine aspartate protéase), qui possèdent une cystéine sur leur site catalytique (QACxG = Glutamine-Alanine-Cystéine-x-Glycine, avec x = Q, G ou R (Arginine) selon les caspases) [Orrenius *et al.* 2004] et clivent leurs substrats protéiques après un résidu acide aspartique. Chez les mammifères, cette famille comprend 14 membres numérotés selon leur ordre de découverte. Elles sont localisées sous la forme de zymogènes dans le cytosol et dans l'espace intermembranaire des mitochondries. Les caspases sont présentes sous la forme de proenzymes (30-50 kDa) inactives dans toutes les cellules animales. Chaque pro-caspase est constituée d'un pro-domaine en N-terminal, d'une grande sous-unité (17-22 kDa), dont le centre actif (QACxG), et d'une petite (10-12kDa). Le clivage et l'hétéro-dimérisation de deux grandes et deux petites sous-unités provoquent l'activation de la caspase (*Figure 7*) [Adolphe *et al.* 2003, Al-Rubeai *et al.* 1998, Laken *et al.* 2001, Poulin *et al.* 2005, Ricci *et al.* 2000].



*Figure 7 : Structure et activation des caspases [Rathmell *et al.* 1999]*

Les caspases se divisent en deux groupes, distinguant les caspases initiatrices et les caspases effectrices. Les caspases initiatrices (caspases-2, -8, -9, -10 et -12) sont caractérisées par un long pro-domaine en N-terminal peu conservé possédant des motifs d'interaction protéine-protéine leur permettant de lier des protéines adaptatrices (FADD ou Apaf-1). Ce site d'interaction

protéine-protéine est nommé DED (Death Effector Domain) pour les caspases-8 et -10 et CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) pour les caspases-2 -9 et -12 [Degterev *et al.* 2003]. Ce site d'action, spécifique aux caspases initiatrices, leur permet d'être activées par d'autres molécules et d'activer à leur tour les caspases effectrices. Les caspases initiatrices s'activent par elles-mêmes lors de la réception d'un signal apoptotique ou à l'aide d'une liaison avec une autre molécule telle que le complexe protéique appelé apoptosome (*Figure 8* et *Figure 9*). Les caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7) sont activées par les caspases initiatrices et responsables de nombreux clivages protéiques. Par exemple, la caspase-3 est responsable du clivage de deux protéines (PARP : Poly-ADP-Ribose Polymerase et SREBPs : Sterol-Regulatory Element Binding Proteins), impliquées dans la réparation de l'ADN et l'homéostasie du cholestérol cellulaire [Goswami *et al.* 1999].

Près de cent substrats des caspases ont été identifiés. Ces cibles se séparent en six catégories de protéines qui peuvent :

- être impliquées dans la régulation de l'apoptose, telles que Bcl-2 ou Bid,
- réguler la traduction du signal apoptotique, telles que les kinases,
- structurer le cytosol et le noyau, telles que les actines,
- être requises pour les réparations cellulaires,
- réguler le cycle cellulaire.

Les caspases sont activées par le biais de deux voies principales, dites "des récepteurs de mort" et "mitochondriale". Une troisième voie annexe fait intervenir le réticulum endoplasmique (*Figure 8* et *Figure 9*).

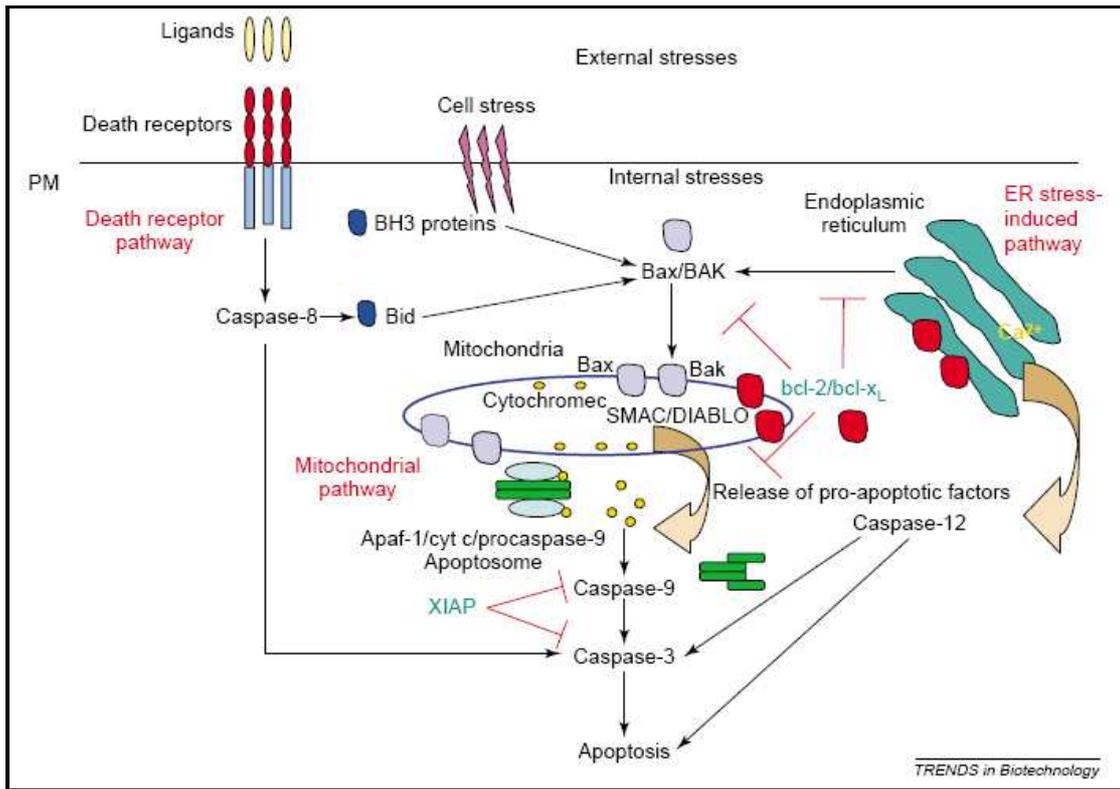


Figure 8 : Les différentes voies d'induction de l'apoptose [Arden 2004]

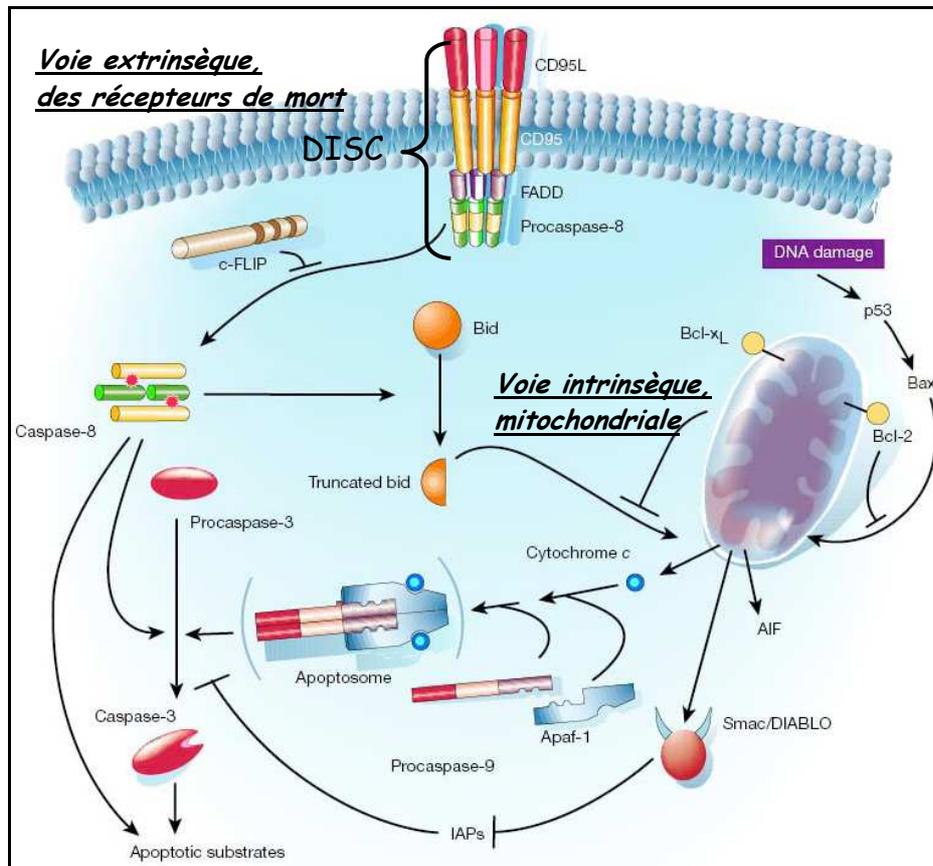


Figure 9 : Les différentes voies d'activation des caspases [Voies apoptotiques 2007]

Ces différentes voies sont décrites dans les paragraphes suivants.

1.2.4. La voie extrinsèque ou "voie des récepteurs de mort cellulaire"

La voie des récepteurs de mort cellulaire est déclenchée par la liaison de ligands à des récepteurs spécifiques appartenant à la super famille des récepteurs du "Tumor Necrosis Factor" (TNF) situés au niveau de la membrane plasmique [Orrenius *et al.* 2004]. Ces récepteurs, de type TNF-R1 ou Fas, via la présence dans leur portion intracellulaire d'un domaine appelé "domaine de mort" (DD, death domain), assurent la transmission du signal de mort programmée.

L'interaction des récepteurs TNF-R1 (ou p55) ou Fas (appelé aussi CD95 ou APO-1) avec leur ligand naturel (ou un anticorps monoclonal agoniste) permet l'assemblage d'un complexe multiprotéique cytoplasmique (contenant la protéine FADD, Fas-Associated Death Domain) appelé DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Ce complexe initie l'enclenchement de la cascade apoptotique par l'activation principalement de la procaspase-8 (*Figure 10*).

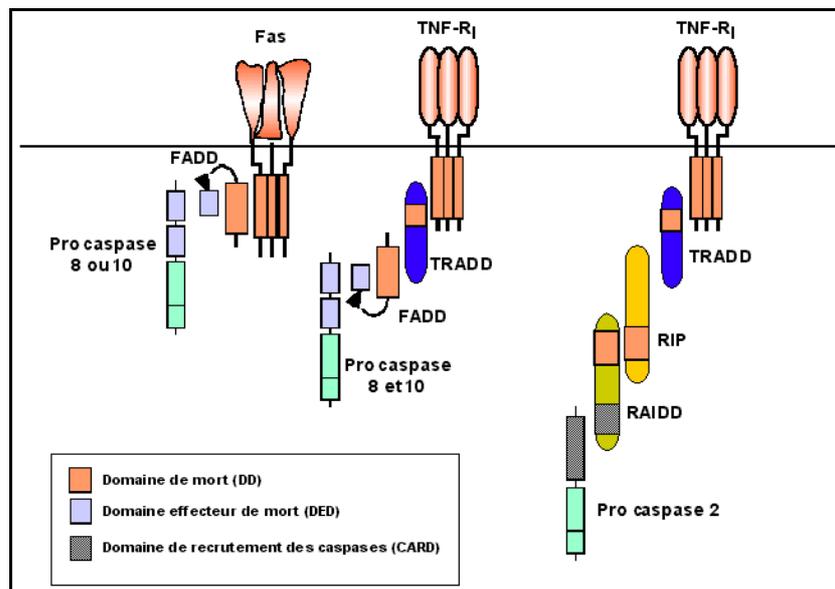


Figure 10 : Activation des caspases par les récepteurs de mort Fas et TNF-R1

Recrutement des caspases de trois manières distinctes : interaction avec les domaines de mort (DD), les domaines effecteurs de mort (DED) ou les domaines de recrutement des caspases (CARD)[Rathmell et al. 1999]

L'activation consécutive des caspases-3, -6 et -7 par un clivage protéolytique de la caspase-8 induit l'autodestruction cellulaire en clivant des substrats essentiels au maintien de la vie cellulaire [Borner *et al.* 2003, Ouellet *et al.* 2004, Reed *et al.* 2000]. Cette voie implique également la mitochondrie par l'intermédiaire d'une protéine pro-apoptotique, homologue de la

famille bcl-2, la protéine Bid, activée par le clivage de la caspase-8 pour générer une protéine Bid tronquée (tBid) [Zha *et al.* 2000]. Cette protéine une fois activée crée des pores au sein de la membrane mitochondriale et entraîne la libération de cytochrome-c dans le cytosol (*Figure 8* et *Figure 9*). Il est à remarquer que cette voie peut être inhibée au niveau des récepteurs par une protéine appelée FLIP-S, homologue inactif de la caspase-8, qui entre en compétition avec cette dernière (*Figure 9*) [Adolphe *et al.* 2003, Ricci *et al.* 2000].

1.2.5. La voie intrinsèque ou "voie mitochondriale"

La voie intrinsèque se déclenche, par exemple, en cas d'absence de facteur de croissance, d'hypoxie, d'endommagement de l'ADN, d'irradiation (laser, rayons gamma...) ou encore en présence de certaines molécules chimiothérapeutiques. Les altérations de l'ADN entraînent l'activation du facteur de transcription, la protéine p53.

Le gène suppresseur de tumeur p53 code pour une protéine dont la fonction principale est de protéger l'organisme contre la prolifération de cellules potentiellement tumorigènes. Dans des conditions normales (cellule non stressée), la protéine p53 est inactive. En présence de stress, son activité enzymatique de type exonucléase lui permet, en collaboration avec d'autres enzymes, de participer directement à la réparation de l'ADN. Lorsque le taux cellulaire de p53 augmente, ceci conduit à l'expression de protéines inhibitrices (p21 et p45) du cycle cellulaire. L'interruption du cycle cellulaire permet la réparation des dommages génomiques avant l'entrée en phase S ou bien avant l'entrée en mitose.

Dans le cas où l'altération de l'ADN n'est pas réparable, la protéine p53 induit l'expression de protéines pro-apoptotiques (protéine Bax, Bak...) qui déclenche le processus de mort cellulaire programmée. Suite à un stress apoptotique, l'extrémité C-terminale de la protéine Bax change de conformation afin de se fixer à la membrane externe des mitochondries [Borner *et al.* 2003]. La membrane mitochondriale se perfore et entraîne la libération du cytochrome-c, du facteur induisant l'apoptose (AIF) et de l'endonucléase G (EndoG) (*Figure 8*, *Figure 9*) [Borner *et al.* 2003, Polster *et al.* 2004].

La libération du cytochrome-c de la mitochondrie dans le cytosol est l'étape irréversible du processus [Adolphe *et al.* 2003, Al-Rubeai *et al.* 1998, Laken *et al.* 2001, Poulin *et al.* 2005, Ricci *et al.* 2000]. Le cytochrome-c peut intervenir sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) (oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$),

peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et radical hydroxyle (OH^{*}). Elles peuvent endommager les composantes cellulaires telles que les protéines, les lipides et l'ADN [Brookes *et al.* 2004]. Le cytochrome-c peut également se lier au récepteur IP₃R du réticulum endoplasmique (RE) pour conduire à l'augmentation du calcium libéré par le RE et ainsi à l'activation de la voie apoptotique du RE (*Figure 8 et § 1.2.6. Le stress du réticulum endoplasmique*) [Brookes *et al.* 2004]. Enfin, le cytochrome-c peut également intervenir sur la cascade des caspases en se liant avec la protéine Apaf-1 (*Apoptosis Protease-Activating Factor-1*) pour former l'apoptosome en présence d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate). L'apoptosome se lie à la procaspase-9 par son domaine CARD afin d'activer la caspase-9. L'activation de cette caspase initiateur mène à l'activation des caspases effectrices telles que les caspases-3, -6 et -7. L'activité de toutes ces caspases, des endonucléases et des ROS conduit à l'autodestruction cellulaire (*Figure 8, Figure 9 et Figure 11*) [Borner *et al.* 2003].

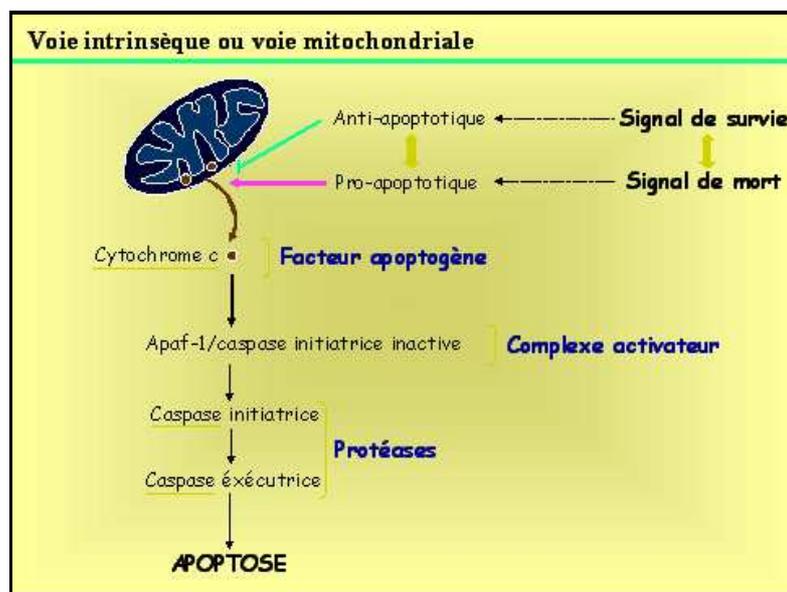


Figure 11 : Représentation simplifiée de la voie intrinsèque ou voie mitochondriale [Voie mitochondriale 2006]

Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 agiraient, quant à eux, en prévenant la perforation de la membrane mitochondriale en bloquant la formation de pores ou en stabilisant la couche lipidique de la membrane externe (*cf. § 1.2.7.1 Protéines de la famille Bcl-2*) [Borner *et al.* 2003].

Remarque : il semble que la protéine p53 soit impliquée également dans la voie des récepteurs "à domaine de mort" en stimulant l'expression des récepteurs de mort cellulaire [Drane *et al.* 2002].

Une voie mitochondriale caspase-indépendante semble également entrer en jeu. Le facteur AIF (Apoptosis Inducing Factor) est une des molécules apoptogènes libérées par la mitochondrie. Ce facteur a été identifié il y a plusieurs années [Lorenzo *et al.* 1999]. Il est localisé dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Il s'agit d'une molécule possédant une double fonction : oxydoréductase et facteur apoptogène. Afin que cette dernière activité s'exerce, une redistribution subcellulaire est nécessaire : de la mitochondrie vers le cytosol puis vers le noyau. La voie AIF est indépendante des caspases et ne nécessite aucun intermédiaire pour provoquer l'apoptose nucléaire.

1.2.6. Le stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un capteur intracellulaire clé dans la détection de signaux de stress pouvant aboutir à l'arrêt du cycle cellulaire ou à l'apoptose [Arden *et al.* 2004, Arden *et al.* 2006]. Il est responsable de la synthèse des protéines (sécrétées ou de membrane) et est souvent soumis à des stress résultants de mauvaises glycosylations et conformations protéiques, d'agrégations, de manque de glucose ou des fluctuations dans l'homéostasie calcique [Cudna *et al.* 2003, Kaufman 2002]. Ces événements stressants sont d'autant plus amplifiés chez les lignées cellulaires mammaliennes sélectionnées pour leur niveau élevé de production de protéines. Le réticulum endoplasmique représente une source importante de stress intracellulaires. En effet, les contraintes qu'il subit, entraînent ce que l'on appelle "la réponse de la protéine non repliée" ("Unfolded protein response, UPR") consistant en une cascade de signaux intracellulaires [Cudna *et al.* 2003, Kaufman 2002, Patil *et al.* 2001, Ron *et al.* 2002].

Les stress du RE peuvent entraîner l'arrêt du cycle cellulaire, en inhibant la traduction protéique, ou l'apoptose à travers un mécanisme dépendant ou non de la mitochondrie. Des protéines localisées dans la membrane du RE agissent comme des capteurs de stress et activent la caspase-12, ou d'autres, chez des cellules mammaliennes, conduisant à une apoptose mitochondrie-indépendante par activation en cascade d'autres caspases. La voie mitochondrie-dépendante résulte des fluctuations de la concentration cytoplasmique en calcium Ca^{2+} entraînant l'activation de protéines de la famille BH3 et leur translocation au niveau de la membrane mitochondriale induisant la mort cellulaire programmée, via la caspase-12 (*Figure 8*) [Brookes *et al.* 2004, White *et al.* 2005, Zong *et al.* 2003].

1.2.7. La régulation de l'activité des caspases

Le phénomène d'activation des caspases est soumis à une régulation faisant intervenir différentes protéines, notamment celles de la famille Bcl-2, des inhibiteurs des protéines de l'apoptose (IAP, ("Inhibitor of Apoptosis Proteins")) ou des protéines de choc thermique (hsp, "Heat Shock Proteins").

1.2.7.1. Les protéines de la famille Bcl-2

Chez les mammifères, le processus de la mort cellulaire programmée a été attribué, entre autres, à un ensemble de protéines impliquées dans la réception et dans la transmission du message de mort cellulaire. L'activité principale des membres de la famille Bcl-2 est de contrôler l'activation ou l'inhibition de la cascade des caspases [Adolphe *et al.* 2003, Al-Rubeai *et al.* 1998, Ricci *et al.* 2000]. Ces protéines sont les éléments principaux du contrôle de la signalisation apoptotique au niveau mitochondrial. Au moins trente protéines de cette famille ont été caractérisées chez les animaux grâce à leur homologie structurelle. En effet, tous les membres de cette famille possèdent un à quatre domaines conservés BH (Bcl-2 Homology).

Elles sont divisées en trois groupes, selon des critères fonctionnels et structurels : (*Tableau 4*)

- les anti-apoptotiques multidomains, comme Bcl-2 et Bcl-x_L ;
- les pro-apoptotiques multidomains, comme Bax et Bak ;
- les proapoptotiques qui ne possèdent que le domaine BH3, telles que Bad et Bid (*Figure 12*).

Tableau 4 : Caractéristiques des différents groupes de protéines de la famille Bcl-2 [Adolphe et al. 2003]

	Groupe I	Groupe II	Groupe III
Protéines	Bcl-2, Bcl-x _L	Bax, Bak	Bid, Bad, Bim, Bmf, Noxa
Motifs	BH1 à BH4	BH1 à BH3	BH3
Localisation	Membrane externe de la mitochondrie	Cytoplasme puis membrane mitochondriale (→ sortie cytochrome-c)	
Rôles	Anti-apoptotique Prévient la libération du cytochrome-c	Pro-apoptotique Formation pores dans membrane mitochondrie	Pro-apoptotique Favorise activation de Bax Inhibe fonction de Bcl-2

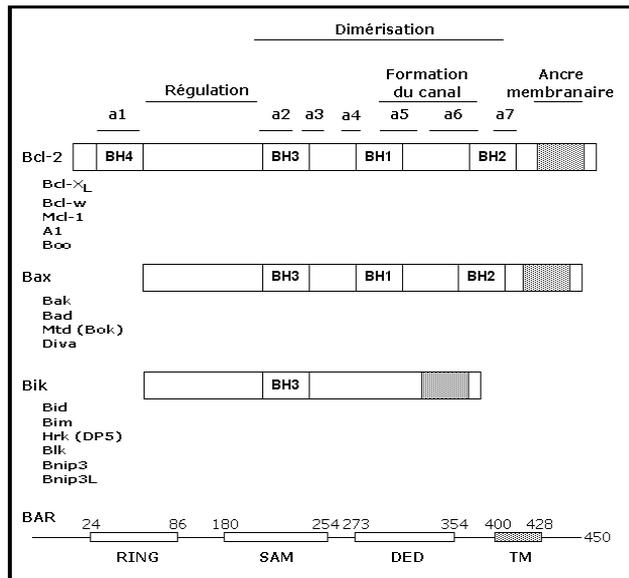


Figure 12 : Structure des protéines Bcl-2 et Bax

*La protéine Bcl-2 possède les quatre domaines BH et un domaine transmembranaire (TM).
La protéine Bax possède uniquement les domaines BH1-BH3 et le TM.*

Le gène Bcl-2 (B-cell lymphoma) a été le premier régulateur de l'apoptose à être identifié chez l'humain. Il a été découvert à la jonction de la translocation chromosomique t(14;18) retrouvée chez des lymphocytes B cancéreux [Cleary *et al.* 1986]. La surexpression de Bcl-2, résultant de cette translocation, empêche les cellules de mourir normalement, ce qui explique la prolifération excessive des cellules et la formation d'une tumeur [Vaux *et al.* 1999]. Quelques années plus tard, la protéine Bax ("Bcl-2-associated protein X") a été isolée grâce à sa capacité à former un hétérodimère avec la protéine Bcl-2 [Oltvai *et al.* 1993]. Lorsqu'elle est surexprimée, la protéine Bax accélère l'apoptose et inhibe l'effet protecteur conféré par la surexpression de Bcl-2.

De nombreux membres de cette famille peuvent former des homo- ou hétérodimères entre eux par le domaine BH-3. L'équilibre entre les protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques, via leurs interactions mutuelles, permet donc de déterminer le sort de la cellule [Bortner *et al.* 2002].

1.2.7.2. Les inhibiteurs de protéines apoptotiques, IAP ("Inhibitors of Apoptosis Proteins")

Les inhibiteurs de protéines apoptotiques constituent une famille de protéines capables de se lier aux caspases qui agissent en aval de la mitochondrie et d'inhiber directement leur activité. Au moins cinq homologues ont été identifiés chez les mammifères. Leur effet protecteur est dû à leur capacité à inhiber l'activation de certaines caspases.

La protéine Diablo/Smac (Second Mitochondrial Activator of Caspases) (*Figure 8* et *Figure 9*), une fois synthétisée, est importée dans la mitochondrie. Au cours de l'apoptose, elle est libérée dans le cytosol en même temps que le cytochrome-c et peut interagir avec toutes les IAPs et neutraliser leur activité en bloquant leur liaison aux caspases, empêchant leur action protectrice et permettant ainsi aux caspases contenues dans l'apoptosome de s'activer [Adolphe *et al.* 2003, Du *et al.* 2000, Verhagen *et al.* 2000, Wolf *et al.* 2002].

1.2.7.3. Les protéines de choc thermique : "Heat shock proteins"

Ces protéines de stress, ou "hsp" ("*heat shock protein*"), forment une famille de protéines remarquablement conservées au cours de l'évolution. Elles exercent des fonctions essentielles à la vie cellulaire et plus encore à la survie lors de stress d'origine chimique, physique ou métabolique. Ces protéines ont été classifiées en fonction de leur poids moléculaire respectif. Certaines, comme hsp90, 70, 60 et 27 agissent comme des protéines chaperonnes. Elles vont lier les peptides, les protéines, en cours de synthèse ou à fort risque d'agrégation et vont ainsi permettre leur repliement correct et leur translocation dans les compartiments subcellulaires appropriés [Gething *et al.* 1992]. Elles sont aussi capables de lier des protéines dénaturées afin de rétablir leurs fonctions [Parsell *et al.* 1993].

L'élévation modérée de la température permet l'induction de toute la famille des "hsp" et l'obtention d'un état dit de "thermotolérance". Cette thermotolérance correspond à l'adaptation de la cellule et à sa résistance à un choc thermique [Li *et al.* 1982]. Cet état ne permet pas seulement à la cellule de se protéger d'un choc thermique mais il lui permet aussi d'être moins susceptible à d'autres facteurs de stress, notamment à des facteurs pro-apoptotiques. Selon Stankiewicz *et al.* [Stankiewicz *et al.* 2005], la protéine hsp70 inhiberait l'apoptose en empêchant la migration de la protéine Bax du cytosol à la mitochondrie et son oligomérisation au niveau de la membrane externe mitochondriale, conduisant à la formation de pores autorisant la libération du cytochrome-c.

Après avoir décrit les différents processus de mort cellulaire, nous nous attacherons brièvement, dans le chapitre suivant, à la présentation des principales caractéristiques de la culture de cellules animales en bioréacteur, concernant notamment les aspects technologiques et les modes d'alimentation.

2. LA CULTURE CELLULAIRE EN BIOREACTEUR

Les bioréacteurs consistent, le plus souvent, en une cuve en verre, à petite échelle, ou en inox, à grande échelle. Ces cuves sont munies, le plus généralement, d'un dispositif d'agitation, d'un système d'aération et de balayage en différents gaz (O_2 , N_2 , CO_2 , Air...) (*Figure 13*, *Figure 14*, *Figure 15*). Différentes voies d'alimentation en solutions telles que acides/bases sont aussi présentes.

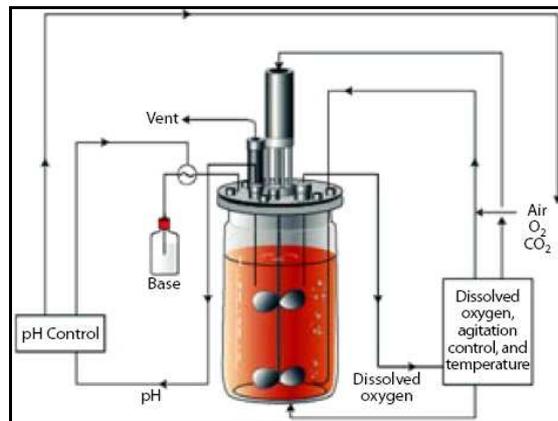


Figure 13 : Bioréacteur [Fries 2005]



Figure 14 : Bioréacteur en verre 5L, BIOSTAT[®] B-DCU Single version [Sartorius-Stedim 2007]



Figure 15 : Bioréacteur de culture cellulaire 300L, BioFlo Pro® [New Brunswick Scientific 2008]

Les bioréacteurs sont munis d'un système de contrôle régulant les paramètres physiques (agitation, température...) et chimiques (pH, oxygène dissous...), à partir des mesures réalisées en ligne par des sondes stérilisables de mesure du pH et des gaz dissous. Les systèmes à grande échelle sont également munis de dispositifs de nettoyage et stérilisation en place (*Figure 15*).

2.1. Les modes d'alimentation du milieu nutritif

Les cellules peuvent être cultivées en suspension ou à la surface de microporteurs. Différents modes d'alimentation des cultures en milieu nutritif peuvent être utilisés (*Figure 16*) :

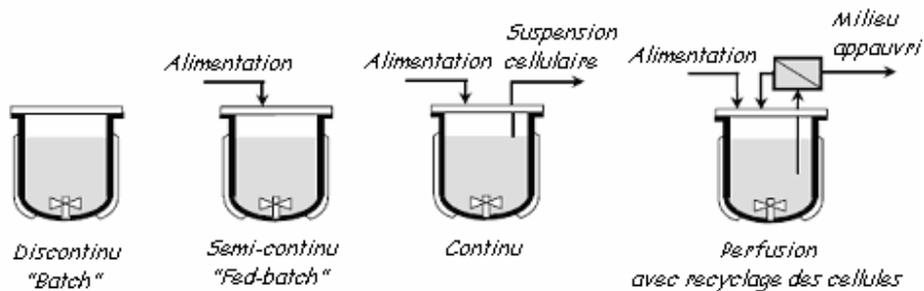


Figure 16 : Les différents modes de culture

Des exemples de cinétiques selon le mode d'alimentation sont donnés ci-dessous (*Figure 17*)

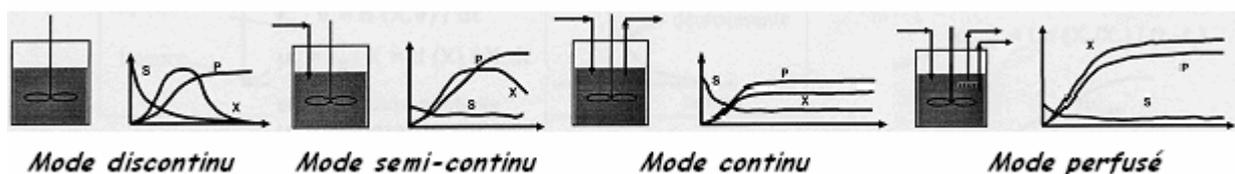


Figure 17 : Evolution dans le temps de la concentration cellulaire (X), des substrats (S) et des produits (P) en fonction du mode d'alimentation du bioréacteur

Dans le cas du mode discontinu ("batch"), le système est fermé, le milieu n'est pas renouvelé. La concentration en substrat diminue tandis que celle du produit augmente avec la croissance cellulaire. Le milieu, une fois épuisé et enrichi en sous-produits (métabolites), n'assure plus son rôle nutritif. La croissance cellulaire est stoppée. En mode semi-continu ("fed-batch"), l'ajout de milieu frais, sans aucun soutirage, permet de maintenir la concentration en substrat et de prolonger la phase de production des cellules. Le mode continu consiste en l'alimentation en milieu frais et soutirage du même volume de milieu usagé avec les cellules. Ce mode permet de maintenir les concentrations en substrats, produits et cellules. Quant à la perfusion, elle permet le renouvellement du milieu en parallèle d'un soutirage sans cellule (système de rétention : centrifugation, ultrafiltration, filtres, décantation...). Le choix du mode d'alimentation du bioréacteur dépend du comportement de la lignée cellulaire, de la stabilité du produit, de la productivité envisagée, des contraintes techniques et économiques.

2.2. Systèmes d'agitation et d'aération

Différents modes d'agitation sont possibles. Le procédé le plus courant consiste en un agitateur, fixé à l'extrémité d'un axe, positionné au centre du bioréacteur. Selon leur conception, ils permettent une agitation radiale (turbine) ou axiale (hélice) du milieu de culture.

Le choix de l'agitateur dépend de la viscosité du milieu et de la sensibilité des cellules aux contraintes mécaniques. La turbine Rushton fournit une agitation radiale, à laquelle les cellules animales sont sensibles (*Figure 18*). Elle est donc plutôt utilisée dans le cadre de fermentation (bactéries plus résistantes). Dans le cadre de cultures cellulaires, l'agitation axiale est préférée (*Figure 19*).

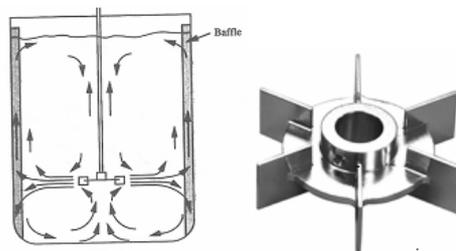


Figure 18 : Agitation radiale : agitateur de type "turbine"



Figure 19 : Agitation axiale : agitateur de type "hélice"

L'agitation possède différentes fonctions. Elle est nécessaire au transfert d'oxygène et des nutriments et au maintien des cellules ou des microporteurs en suspension. En effet, l'objectif est d'éliminer les gradients de concentrations et de température, de disperser le gaz aérant le milieu afin de faciliter l'accès des cellules aux éléments nutritifs. L'agitation facilite également le transfert de chaleur entre le milieu et la surface d'échange (double-enveloppe).

Il existe également des systèmes appelés "air lift" dans lesquels l'agitation et l'aération sont produits par un courant gazeux ascendant (*Figure 20*).

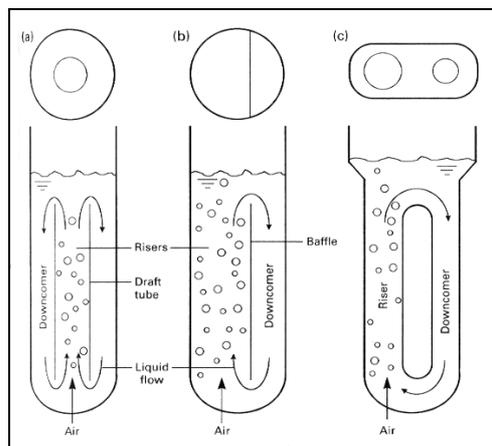


Figure 20 : Bioréacteur de type "Air lift"

Des bioréacteurs à usage unique, proposés depuis peu sur le marché, permettent des modes d'agitation moins contraignants pour les cellules et d'utilisation plus flexible, tels que les systèmes dits "vague" (*Figure 21*).



Figure 21 : Poches de culture de type "vague" (10L, 5L utiles)

Cependant, ces réacteurs à usage unique n'ont pas encore été testés avec toutes les lignées cellulaires (en particulier lorsque les cellules sont fixées sur microporteurs) et présentent des échelles de volumes encore faibles par rapport aux réacteurs inox.

L'aération peut être réalisée à l'aide de différentes technologies. Des dispositifs émettant des bulles, consistant en une canne plongeante munie d'un dispositif d'aspersion ("ring sparger", fritté...), sont les plus répandus (Figure 22). Les bulles fournies par les dispositifs poreux (frittés) sont plus petites.



Figure 22 : Exemples de dispositifs d'aération ("ring sparger" et fritté)

Il est à noter cependant que, plus les bulles sont petites, plus l'aération est efficace mais délétère pour les cellules (*cf. 4.2.2. Influence de l'aération*). Le dispositif d'agitation est donc à choisir en fonction du type de culture envisagé. De nouveaux systèmes dits "bubble free" consistent en des membranes poreuses hydrophobes (*cf. 4.3.3. Technologie du bioréacteur*).

Dans le chapitre suivant, nous présenterons les principales méthodes potentiellement utilisables pour la mise en évidence et la quantification des phénomènes de mort des cellules animales cultivées in vitro.

3. LES METHODES DE CARACTERISATION DE LA MORT CELLULAIRE IN VITRO

Les différents modes de mort cellulaire peuvent être mis en évidence à l'aide de différentes techniques telles que la microscopie, l'électrophorèse ou la cytométrie en flux, évoquées dans ce chapitre. Les *Tableau 9* à *Tableau 11* du § 3.6. reprennent les principales méthodes disponibles.

3.1. Analyse morphologique par microscopies optique, électronique et fluorescence

Les modifications morphologiques, telles que la diminution de taille ou la condensation du noyau et de la chromatine, permettent de détecter les cellules apoptotiques par microscopie optique [Bryson *et al.* 1994, Martin *et al.* 1990] et électronique [Bryson *et al.* 1994, Gorman *et al.* 1996, Kerr *et al.* 1972, Mower *et al.* 1994, Sun *et al.* 1992, Wyllie *et al.* 1991]. On peut également observer les organelles tels que les mitochondries, gonflant durant la nécrose (*Tableau 5*) [Darzynkiewicz *et al.* 1992].

Tableau 5 : Critères morphologiques pour l'identification des cellules apoptotiques et nécrotiques [Al-Rubeai 1998]

<i>Apoptose</i>	<i>Nécrose</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Taille réduite, forme complexe 	<ul style="list-style-type: none"> • Gonflement de la cellule et du noyau
<ul style="list-style-type: none"> • Bourgeonnement de la membrane plasmique 	<ul style="list-style-type: none"> • Condensation de la chromatine
<ul style="list-style-type: none"> • Condensation de la chromatine 	<ul style="list-style-type: none"> • Gonflement de la mitochondrie
<ul style="list-style-type: none"> • Perte de structure du noyau (apparence lisse) 	<ul style="list-style-type: none"> • Vacuolisation du cytoplasme
<ul style="list-style-type: none"> • Fragmentation du noyau 	<ul style="list-style-type: none"> • Rupture de la membrane plasmique
<ul style="list-style-type: none"> • Présence de corps apoptotiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Dissolution de l'ADN ("Caryolyse")
<ul style="list-style-type: none"> • Dilatation du réticulum endoplasmique 	
<ul style="list-style-type: none"> • Organelles pas trop modifiées 	

L'apoptose implique le rétrécissement de la cellule, une augmentation de la densité du cytoplasme, la condensation de la chromatine et la ségrégation en masses qui peuvent former des protusions. Ces dernières se séparent pour donner des corps apoptotiques liés à la membrane.

Initialement, la mitochondrie et l'appareil de Golgi ne présentent pas de signes d'éclatement et la membrane nucléaire reste intacte durant une longue période. En revanche, durant la nécrose, la chromatine se condense en masses mal définies, les organelles gonflent, et à un stade plus avancé, la membrane s'altère et la cellule se désintègre.

En microscopie électronique, l'application des techniques d'imagerie quantitatives pour visualiser les différents niveaux de gris permet de détecter les modifications de densité nucléaire [Payne *et al.* 1992]. Un autre outil est la microscopie confocale à balayage laser, puissante pour l'analyse morphologique et la localisation macromoléculaire, en réalisant des sections optiques des cellules [Smith *et al.* 1991]. La condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire sont faciles à visualiser par examen de cellules dont l'ADN est coloré à l'aide, par exemple, de iodure de propidium et de Hoechst 33342. En l'absence de systèmes d'analyse d'images complexes, la limitation manifeste des méthodes basées sur la microscopie dans les études quantitatives de l'apoptose est le nombre limité de cellules qui peuvent être effectivement analysées [Al-Rubeai *et al.* 1996, Sgonc *et al.* 1998]. Ces techniques sont utilisées principalement comme méthode de détermination qualitative de l'apoptose. Pour la quantification, la cytométrie en flux est plus puissante.

3.1.1. Microscopie optique et colorants d'exclusion

Le bleu trypan est un colorant qui entre dans les cellules. Une cellule vivante expulsera la molécule et restera blanche au microscope, au contraire d'une cellule morte qui n'aura pas l'énergie de la rejeter et restera bleue. Cette technique permet donc de détecter les cellules nécrotiques et apoptotiques tardives (membrane plasmique altérée). Le comptage des cellules peut être réalisé sur une cellule de Thoma ou de Bürker par exemple (*Figure 23*).

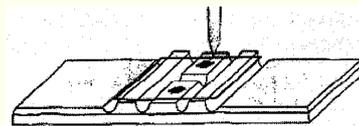


Figure 23 : Cellule de comptage

Des appareils permettent l'automatisation de cette méthode (*cf. § 3.7.1. Evaluation de la viabilité : méthode au bleu trypan*). Cependant, ce marqueur présente l'inconvénient d'être toxique pour les cellules, ainsi l'analyse doit être réalisée rapidement sous peine d'obtenir des

résultats faussés. L'érythosine est un colorant d'exclusion fluorescent, entrant dans les cellules dont la membrane est endommagée [Krause *et al.* 1984, Elias *et al.* 1995]. Les cellules mortes seront visualisées en rouge.

3.1.2. Analyse des brins d'ADN (fragmentation) par microscopie à fluorescence

3.1.2.1. Méthode "TUNEL"

L'une des caractéristiques de l'apoptose est la dégradation de l'ADN qui, aux premiers stades de l'apoptose, concerne des zones internucléosomales. Le clivage de l'ADN peut produire des coupures simples ou doubles. Les deux types de fractures peuvent être détectés en marquant les extrémités 3'-OH libres à l'aide de nucléotides modifiés (biotine-UTP, fluorescéine-dUTP) intervenant dans une réaction enzymatique [Moore *et al.* 1995, Tinto *et al.* 2002].

L'enzyme terminal desoxynucléotidyl transférase (TdT) catalyse la polymérisation sans matrice nucléique des desoxyribonucléotides des extrémités 3' de l'ADN double et simple brin. Cette méthode est appelée "TUNEL" (Terminal deoxynucleodityl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling). Elle consiste à ajouter aux extrémités 3'-OH, un nucléotide marqué.

Après perméabilisation, les cellules sont incubées avec le réactif TUNEL contenant l'enzyme TdT et le marqueur (ex : fluorescéine-dUTP). Pendant cette période d'incubation, l'enzyme permet l'addition du marqueur sur les groupes 3'-OH libres des simples et doubles brins d'ADN. Après lavage, le marqueur incorporé au niveau des sites ADN endommagés peut être visualisé par microscopie fluorescence dans le cas de marquage par nucléotides fluorescents, soit après une réaction particulière, fonction du marqueur employé [Roche 2006]. La quantification est réalisable par cytométrie en flux (*Figure 24* et *Figure 25*).

Cette technique a l'avantage de marquer les cellules dont les altérations morphologiques sont encore difficiles à visualiser en microscopie optique.

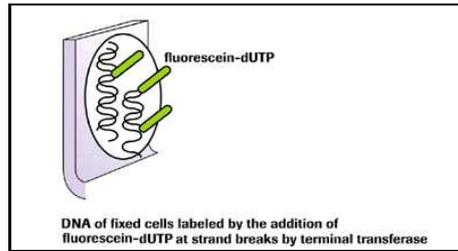
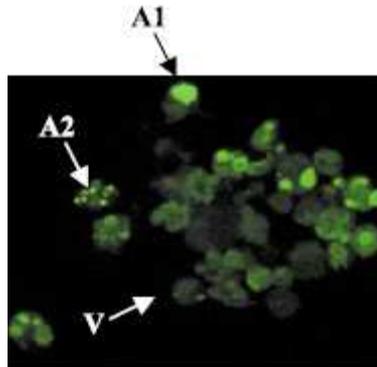


Figure 24: Principe du test TUNEL-fluoresceine-dUTP [Roche 2006]

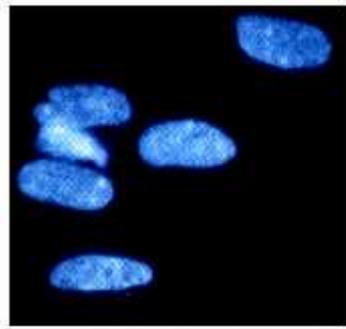


*Figure 25 : Observation de la fragmentation de l'ADN à l'aide de la méthode enzymatique TUNEL
 A1 : Cellule apoptotique avec chromatine condensée mais sans fragmentation nucléaire
 A2 : Cellule apoptotique avec fragmentation nucléaire, V : Cellule viable [Tinto et al. 2002]*

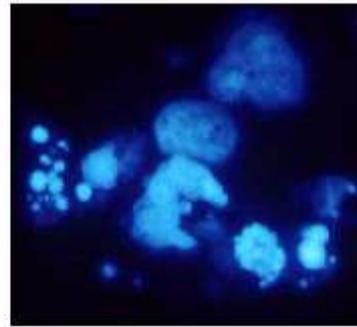
Il existe différentes variantes de ce test. Une autre alternative est de marquer les groupes 3'-OH libres par "nick translation" : la DNase (endonucléase) crée des cassures aléatoires ("nick") dans l'ADN double et simple brin, l'ADN-polymérase 1 se fixe sur ces extrémités 3' libérées et synthétise une nouvelle chaîne d'ADN à partir des nucléotides marqués ou non du milieu d'incubation. Cependant, la technique TUNEL est considérée comme étant plus sensible et plus rapide.

3.1.2.2. Méthode "DAPI"

Le DAPI (ou 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochlorate) est un marqueur bleu fluorescent des acides nucléiques qui se lie aux régions AT de l'ADN. Il permet la mise en évidence de la fragmentation de l'ADN (*Figure 26*).



Cellules témoins, viables



Cellules apoptotiques, traitées par paclitaxel, anticancéreux antimitotique

Figure 26 : Marquage DAPI

3.1.3. Visualisation de la chromatine et des corps apoptotiques par microscopie à fluorescence (AO/PI)

La combinaison des deux marqueurs, acridine orange/iodure de propidium, permet de distinguer les différentes sous-populations de cellules. Les cellules viables (V) et apoptotiques précoces ("Early apoptotic – EA") produisent une fluorescence verte du fait de la coloration des acides nucléiques par l'acridine orange (AO) mais elles excluent le iodure de propidium (PI). Les cellules apoptotiques précoces se distinguent par leur chromatine très condensée. Les cellules nécrotiques (N) et nécrotiques secondaires ("Secondary Necrotic – SN") émettent une fluorescence rouge par inclusion du PI (*Tableau 6*).

Tableau 6 : Caractéristiques des sous-populations de cellules en microscopie à fluorescence AO/PI

Population	Fluorescence	Noyau / Chromatine
Viable	Verte	Noyau normal
Apoptotique précoce	Verte	Noyau condensé, fragmenté
Apoptotique tardive	Rouge	Chromatine condensée, fragmentée
Nécrotique	Rouge	Noyau normal
Fluorescence verte = Coloration AO et exclusion PI		
Fluorescence rouge = Inclusion PI		

Les cellules nécrotiques ont une chromatine diffuse alors que les nécrotiques secondaires et les corps apoptotiques ont une chromatine condensée (*cf. § 3.5.3.4. Fragmentation de l'ADN*) [Al-

Rubeai *et al.* 1995, Ishaque *et al.* 1998, Moore *et al.* 1995, Tey *et al.* 2000(a), Tey *et al.* 2000(b), Tey *et al.* 2005].

3.2. Analyse de l'ADN et des protéines par électrophorèse

Les modifications au niveau de l'ADN et des protéines peuvent être mises en évidence par électrophorèse.

3.2.1. Analyse des brins d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

L'évènement le plus caractéristique dans l'apoptose est le clivage de l'ADN. Il est une conséquence de l'activation des endonucléases. Ce clivage a lieu entre les nucléosomes et produit des fragments comprenant un nombre de paires de bases multiple de 160 à 200 paires de bases (pb) [Al-Rubeai *et al.* 1996, Al-Rubeai *et al.* 1997, Wyllie *et al.* 1980(a)]. L'analyse des fragments par électrophorèse sur gel d'agarose, après révélation au bromure d'éthidium, présente une configuration caractéristique dite en "échelle" appelée "DNA ladder" (*Figure 27* et *Figure 28*) [Compton *et al.* 1986]. Par contre, dans le cas de la nécrose, l'ADN est fragmenté de manière irrégulière : on obtient des bandes irrégulières ("smear") sur gel d'agarose [Al-Rubeai *et al.* 1998(a), Sgonc *et al.* 1998].

La détermination du rapport d'ADN fragmenté sur l'ADN total, dans les lysats de cellules entières (centrifugation haute vitesse) a été mise au point dans de nombreuses études pour la quantification de l'apoptose dans les populations de cellules *in vitro*. Les inconvénients des méthodes utilisant la fragmentation de l'ADN dans l'estimation de l'apoptose sont la nécessité d'un nombre important de cellules, des motifs de fragmentation de l'ADN non-quantitatifs ou au mieux semi-quantitatifs, des méthodes limitées à fournir des informations sur la population entière plutôt que sur les cellules individuelles.

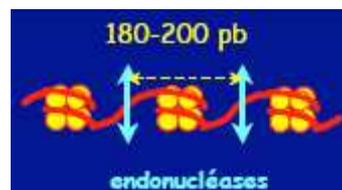


Figure 27: Fragmentation internucléosomale

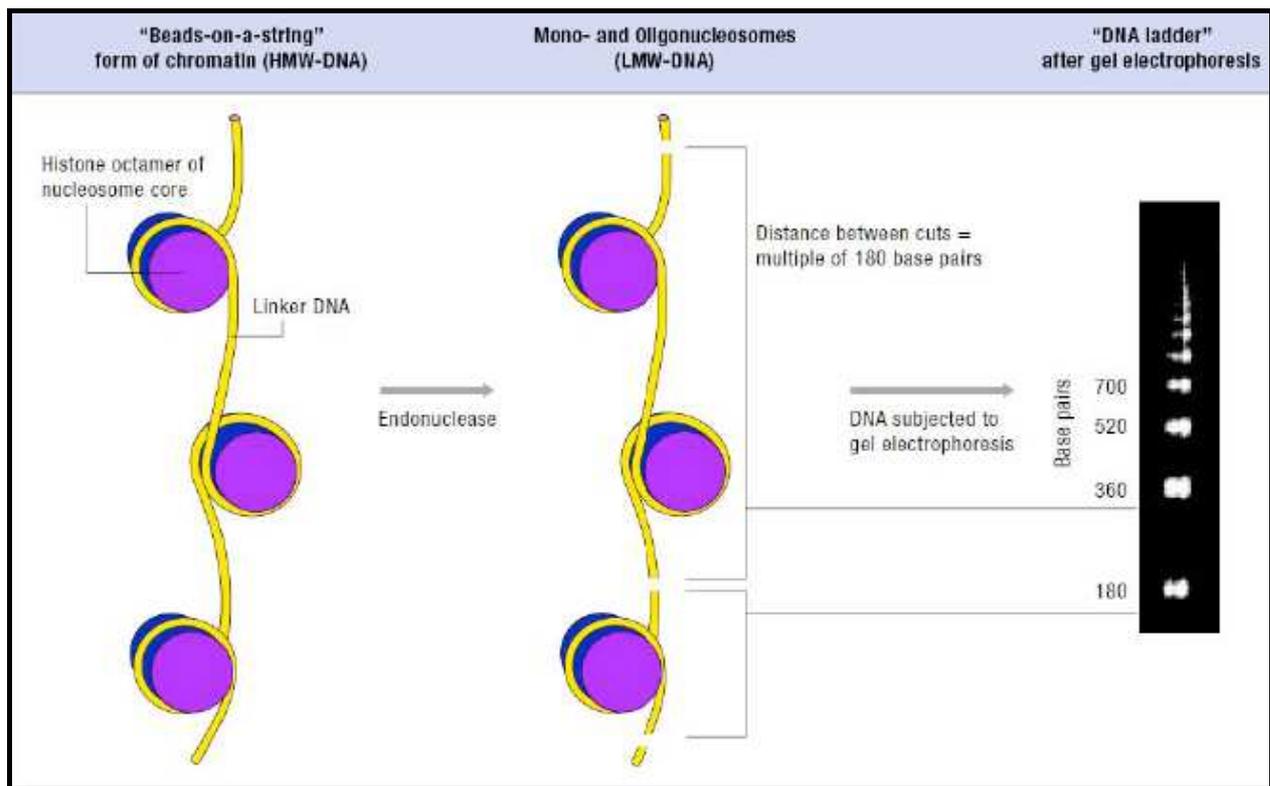


Figure 28 : Fragmentation internucléosomale de l'ADN lors de l'apoptose
 Une endonucléase clive l'ADN entre les nucléosomes et génère des fragments réguliers qui forment une échelle d'ADN sur le gel d'agarose après électrophorèse (à droite) [Fragmentation internucléosomal 2007]

Une méthode améliorée, pour détecter la fragmentation de l'ADN, visualise l'ADN après "Southern blotting" à l'aide d'une sonde radioactive de l'ADN total cellulaire, au lieu du bromure d'éthidium, qui augmente la sensibilité [Faccinetti *et al.* 1991, Moore *et al.* 1995]. Ces techniques plus sensibles ont cependant différents inconvénients (temps, nécessité d'un grand nombre de cellules, radioactivité pour la méthode la plus sensible). Elles ne permettent pas de déterminer le pourcentage de noyaux apoptotiques ou de reconnaître les cellules apoptotiques parmi une population hétérogène de cellules.

3.2.2. Identification des endonucléases mises en jeu dans la fragmentation de l'ADN

La fragmentation de l'ADN est la conséquence de l'activation des endonucléases. Si l'on souhaite les identifier, il est possible de réaliser une électrophorèse "SDS-PAGE" ("sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis") contenant un acide nucléique substrat, marqué au

^{32}P ou non-radioactif. L'activité de l'endonucléase est révélée par la diminution du substrat dans le gel [Caron *et al.* 1991, Rosenthal *et al.* 1977, Sgonc *et al.* 1998].

3.2.3. Analyse de l'activation de l'apoptose par Western-blot

Cette technique utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer les protéines, préalablement dénaturées, selon leur masse. Les protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane (typiquement en Polyvinidyl difluoride PVDF), où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Cette technique permet de détecter des protéines caractéristiques de l'apoptose telles que les caspases activées, PARP clivé (substrat de la caspase-3) ou le cytochrome c libéré [Arden *et al.* 2004, Fusseneger *et al.* 2000, Goswami *et al.* 1999, Han Kyu Oh *et al.* 2005, Tinto *et al.* 2002]. Deux exemples, concernant la caspase-3 et le cytochrome-c, sont décrits ci-après.

Caspase-3 :

Cette protéase est présente dans la cellule sous forme d'une procaspase inactive. L'activation lors de l'apoptose nécessite le clivage de l'enzyme, au niveau de sites aspartate spécifiques, en deux sous-unités de poids moléculaire de 12 000 (p12) et 17 000 (p17). La proenzyme a une masse moléculaire $M_r = 32\ 000$ (Figure 29).

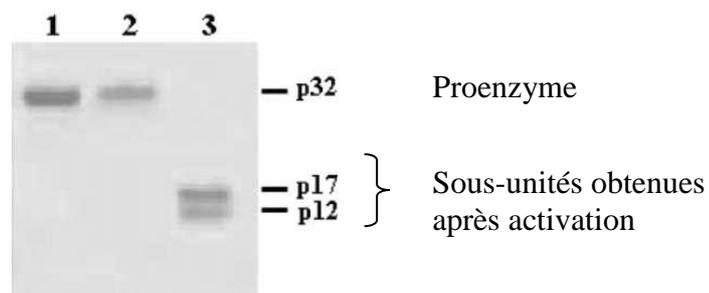


Figure 29 : Electrophorèse Caspase-3

Ligne 1 : Cellules CHO non traitées, Ligne 2 : Cellules traitées par NaBu et NAC, Ligne 3 : Cellules traitées par NaBu seul, NaBu : Butyrate de sodium (cytotoxique), NAC : N-acétylcystéine (antioxydant) [Oh et al. 2005]

Cytochrome- c :

Lors de l'apoptose, la mitochondrie relargue le cytochrome-c qui active les procaspases, dans le cytoplasme. La quantité de cytochrome-c retrouvée dans la suspension de culture est le reflet de l'incidence de l'apoptose (Figure 30).

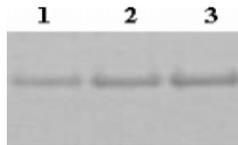


Figure 30 : Electrophorèse Cytochrome-c
Ligne 1 : Cellules CHO non traitées
Ligne 2 : Cellules traitées par NaBu et NAC
Ligne 3 : Cellules traitées par NaBu seul [Oh et al. 2005]

Remarque : Ces deux expériences mettent en évidence le rôle anti-apoptotique de la N-acétylcystéine (cf. § 4.3.1. *Supplémentation du milieu*). En effet, on remarque que pour les cellules non traitées par N-Acétylcystéine (NAC), la caspase-3 est clivée donc activée (*Figure 29, ligne 3*) et la quantité (intensité) de cytochrome-c plus importante comparée à celle rencontrée chez les cellules traitées à la NAC (*Figure 30, ligne 3*).

3.3. Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase par méthode enzymatique colorimétrique

Cette technique permet d'évaluer l'intégrité membranaire. Les cellules dont la membrane a été perméabilisée ou lysée, libèrent leur contenu cytosolique, et notamment l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH), dans le milieu extracellulaire. La quantité de LDH relarguée dans le milieu de culture est proportionnelle au nombre de cellules mortes (après évaluation du contenu en LDH d'une cellule viable).

La mesure de l'activité LDH permet d'évaluer non seulement la mort cellulaire nécrotique (caractérisée par une rupture précoce de la membrane plasmique) mais aussi une partie de la mort cellulaire apoptotique : les cellules apoptotiques ne sont pas phagocytées (*in vitro*) et finissent par perdre leur intégrité membranaire au stade ultime du processus apoptotique ("nécrose secondaire").

La mesure de l'activité LDH dans le milieu de culture peut être réalisée par dosage enzymatique colorimétrique [Goergen *et al.* 1993, Moore *et al.* 1995, Racher *et al.* 1990, Wagner *et al.* 1992]. Le surnageant des cellules est incubé avec le substrat de l'enzyme LDH, l'acide lactique. L'activité de l'enzyme est déterminée à l'aide d'une seconde réaction, couplée à la première, pendant laquelle un colorant (sel de tétrazolium) est réduit. Le dosage est effectué par spectrophotométrie à environ 500 nm (*Figure 31*).

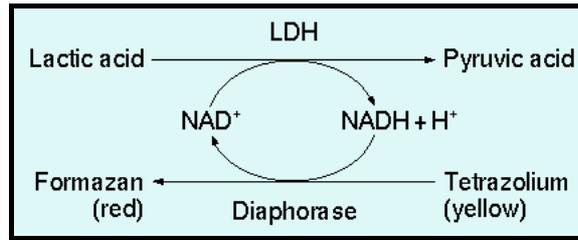


Figure 31 : Principe du dosage de la LDH

Remarque : Cette méthode, contrairement à celle du bleu trypan, permet de prendre en compte les cellules lysées.

3.4. Viabilité cellulaire par méthode colorimétrique au Méthyl-Thiazolyl-Tetrazolium (MTT)

Les mitochondries des cellules viables contiennent une enzyme réductase, la succinate deshydrogénase, permettant de réduire un sel de tetrazolium, le 3-[4,5-(dimethylthiazol-2-yl)]-2,5-diphenyltetrazolium bromide ou MTT (jaune) en formazan (bleu violet) (*Figure 32*).

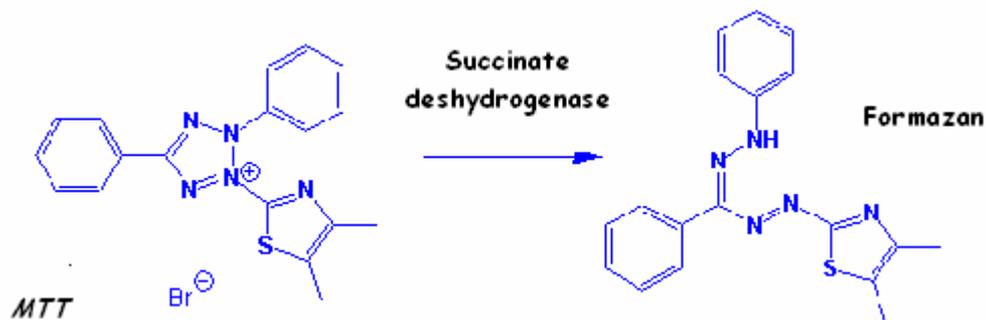


Figure 32 : Principe de la méthode colorimétrique au MTT

L'intensité de la coloration violette est alors proportionnelle au nombre de cellules vivantes et à leur activité métabolique [Mosmann 1983].

3.5. Analyse de la mort cellulaire par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui permet la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques et biologiques d'une cellule. Elle a été initialement développée pour le dénombrement des cellules en suspension et l'évaluation de leur taille mais elle est devenue une

technique d'analyse et de quantification dans des domaines divers tels que la prolifération cellulaire, l'immunologie, la microbiologie ou le diagnostic de certaines maladies. Elle est la seule technique qui permet de faire une analyse cellule par cellule, quantitative, multiparamétrique, à grande vitesse, avec une bonne sensibilité de détection. Un tri des cellules peut également être associé.

Cette méthode présente différents avantages :

- l'analyse individuelle des cellules,
- la facilité de préparation des échantillons,
- la rapidité de l'analyse,
- le faible nombre de cellules nécessaires,
- l'identification de sous-populations,
- la mesure simultanée de différents paramètres cellulaires.

Pour l'analyse par cytométrie, une dissociation cellulaire est nécessaire. Les cultures de cellules en suspension cellulaires en suspension représentent le matériel de choix pour l'obtention de cellules isolées ; seule une bonne dispersion est nécessaire pour éliminer les éventuels agrégats cellulaires. Dans le cas de cultures de cellules adhérentes, il est nécessaire de détacher les cellules de leur support et de les dissocier. Le détachement et la dissociation mécanique peuvent être obtenus par l'emploi d'enzymes protéolytiques, d'agents chélateurs ou par leur association. La trypsine, enzyme protéolytique, est couramment employée. La pronase, mélange de protéases, (aminopeptidase et carboxypeptidase) et la collagénase peuvent également être utilisées. L'utilisation d'enzymes pour la dispersion peut conduire à des altérations de la surface cellulaire. Il est donc nécessaire d'inactiver ces enzymes par du sérum ou un inhibiteur (inhibiteur de soja dans le cas de la trypsine). La dissociation des cellules peut également être obtenue par des agents chélateurs (EDTA...), mais qui peuvent aussi être à l'origine d'altérations chromosomiques et des mitochondries. L'association d'une enzyme et d'un agent chélateur assure une excellente dispersion cellulaire.

La fixation des cellules permet de les conserver dans un état aussi proche que possible de l'état vivant en provoquant une coagulation très fine de la matière vivante sans détruire les structures. Elle a pour but :

- d'éviter l'autolyse des constituants fondamentaux sous l'effet des enzymes cellulaires, autolyse qui aboutirait à la transformation des protéines en acides aminés ;

- de précipiter les constituants cellulaires destinés à être analysés ;
- d'éviter les phénomènes de distorsion et de rétraction.

Dans l'analyse quantitative des acides nucléiques par cytométrie en flux, le but essentiel de la fixation est de consolider le substrat morphologique et d'assurer la préparation des structures cellulaires à la coloration. Le fixateur universel n'existe pas, tous ont des avantages et des inconvénients. Les composés le plus souvent utilisés sont l'éthanol ou le formaldéhyde [Adolphe *et al.* 2003]

3.5.1. Principes de fonctionnement

La cytométrie en flux permet l'analyse multiparamétrique de plusieurs milliers de cellules isolées. Des mesures simultanées de caractéristiques physiques et biologiques peuvent être réalisées pour chacune d'elles. Chaque cellule est entraînée par un fluide au centre d'une veine liquide. Elle traverse ensuite la source d'excitation lumineuse.

La cytométrie en flux se caractérise par deux principes :

- le guidage des cellules isolées en suspension à l'aide d'un flux laminaire liquide, assurant le défilement des cellules une à une devant une source lumineuse d'excitation, à une vitesse uniforme ($1 \text{ à } 10 \text{ m.s}^{-1}$) après un centrage hydrodynamique ;
- l'utilisation d'un système d'excitation et de détection permettant l'analyse d'une cellule en quelques microsecondes.

La source d'excitation lumineuse doit permettre une excitation des colorants utilisés à une longueur d'onde proche de leur maximum d'absorption. Elle doit être puissante, stable et nécessite une bonne focalisation (*Figure 33*).

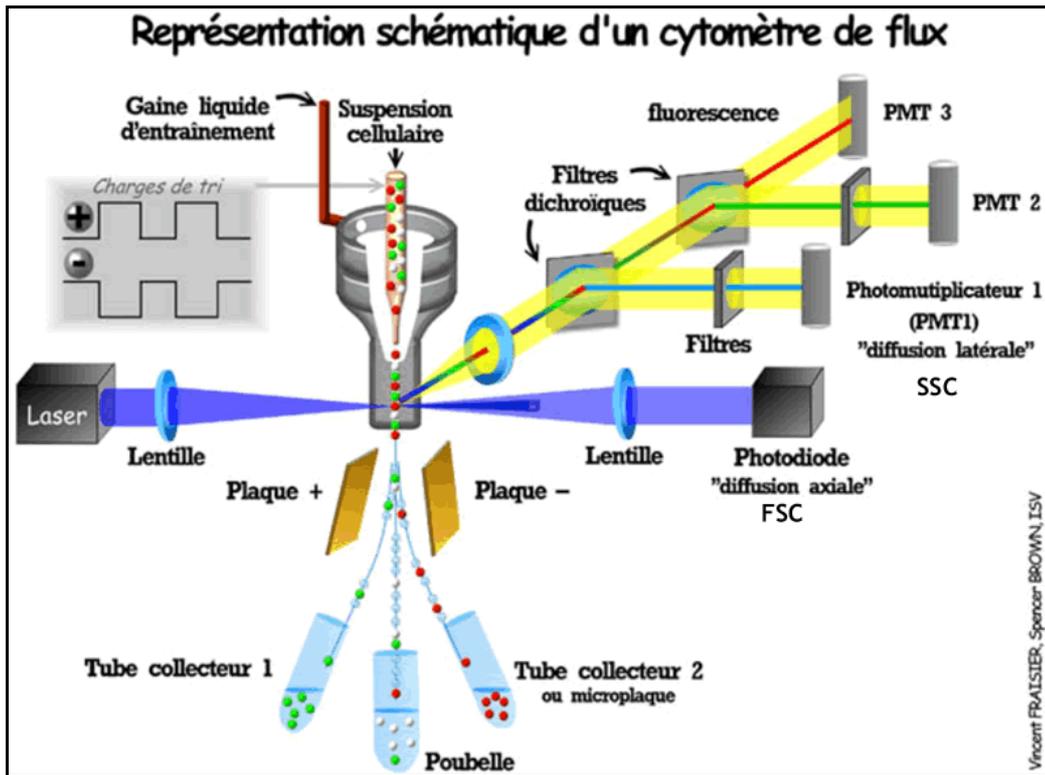


Figure 33 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux [Cytomètre en flux 2007]

Les signaux optiques ou physiques émis par la cellule en suspension, coupant le faisceau de la source lumineuse, sont ensuite analysés. Ils sont reliés aux propriétés optiques intrinsèques (diffusion lumineuse liée aux dimensions de la particule, structure interne, autofluorescence de certaines cellules) ou induites par fluorescence (marquage de structures ou de fonctions cellulaires). Ces différents paramètres optiques permettent d'obtenir des informations cellulaires (Tableau 7).

Tableau 7 : Informations données par la cytométrie en flux [Bouix et al. 2001, Adolphe et al. 2003]

Paramètres optiques	Signaux	Informations
Diffusion de la lumière aux petits angles	Proportionnelle au diamètre, volume cellulaire	Taille des cellules
Diffusion de la lumière à angle droit	Fonction du contenu cellulaire	Hétérogénéité cellulaire
Fluorescences	Couleur et intensité, proportionnelles à l'intensité du marquage	Marqueur cellulaire, ADN, ARN, fonctions cellulaires

3.5.2. Analyse morphologique : Laser Scanning Cytometer (LSC)

Les propriétés de diffusion de la lumière des cellules peuvent être utilisées pour analyser les modifications de taille et de granulosité. Après intersection du rayon incident, la cellule diffracte la lumière. L'intensité de la lumière diffusée dans l'axe (angle $< 12^\circ$), est proportionnelle à la taille de la cellule (FSC : Forward SCatter) ; celle diffusée à 90° est représentative de son contenu cytoplasmique, sa granulosité (SSC : Side SCatter) [Sgonc *et al.* 1998].

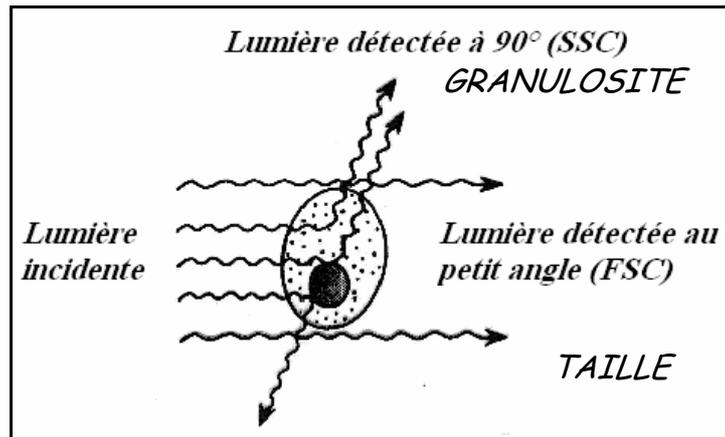


Figure 34 : Incidence de la lumière sur la cellule [Incidence lumière 2006]

Les signaux détectés par le système optique sont amplifiés, convertis en signaux électroniques puis en valeurs numériques. Elles sont analysées grâce à l'unité informatique du cytofluorimètre. L'affichage simultané des paramètres, FSC, SSC traités par le logiciel, visualise chaque cellule sur écran sous forme de point. On obtient un cytogramme, nuage de signaux punctiformes (*Figure 35*).

L'apoptose est accompagnée d'une perte d'eau, une contraction de la cellule et d'une fragmentation de l'ADN, non présentes lors de la nécrose. Ainsi, les cellules apoptotiques et nécrotiques diffèrent par leur motifs de diffusion de la lumière [Carbonari *et al.* 1994] ; les cellules apoptotiques diffractent moins la lumière vers l'avant, du fait de leur petite taille, mais plus à 90° (contenu condensé) que les cellules viables, reflétant une plus petite taille et une variation de la densité du noyau et du cytoplasme (*Figure 34* et *Figure 35*) [Al-Rubeai 1997].

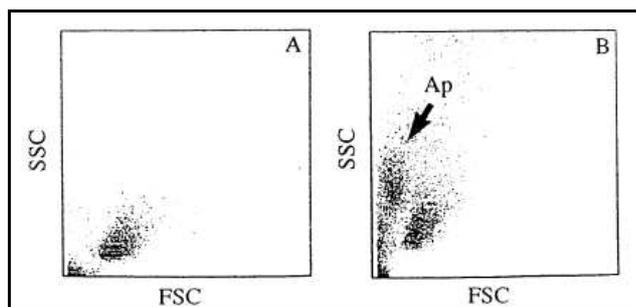


Figure 35 : Visualisation SSC et FSC

A : cellules non traitées, B : cellules traitées par dexaméthasone

Ap = cellules apoptotiques : Faible FSC, Haute SSC [Sgonc et al. 1998]

En principe, l'analyse des paramètres morphologiques par cytométrie en flux est une méthode rapide et objective pour dénombrer les cellules apoptotiques. Selon les deux paramètres FSC et SSC, il est possible de distinguer différentes populations cellulaires et de tracer le contour de la population à étudier en excluant, d'une part, les débris sur les critères de petite taille (FSC) et petite granularité (SSC) et d'autre part, les agrégats situés très haut dans la partie supérieure de l'écran. La zone d'intérêt ainsi délimitée (appelée fenêtre ou région) est la population cellulaire homogène. Seules les valeurs concernant cette région sont analysées par un logiciel.

3.5.3. Analyse des fonctions cellulaires par fluorescence

Le laser produit une lumière monochromatique qui excite spécifiquement un fluorochrome à une longueur d'onde donnée. Les fluorochromes sont des substances capables, lorsqu'elles reçoivent un rayonnement incident d'une certaine longueur d'onde, de réémettre une radiation de longueur d'onde supérieure. Ils peuvent se fixer directement sur un élément cellulaire comme ADN, ARN, protéines ou être conjugués à un anticorps spécifique d'un constituant cellulaire. On détermine alors les pourcentages de cellules marquées et la quantité de l'élément étudié présent dans les cellules, grâce à l'intensité du marquage. L'intensité de la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de cet élément.

Les analyses morphologiques (LSC) et de fluorescence peuvent être couplées. Des points apparaissent représentant chacun une cellule en fonction de sa taille et de la fluorescence qui lui est associée.

Différents fluorochromes sont à disposition. Certains sont spécifiques d'éléments cellulaires permettant de les quantifier via l'intensité de fluorescence émise. D'autres sont liés à un marqueur spécifique d'éléments cellulaires servant d'étiquette pour un marqueur cellulaire non

fluorescent dont le site de fixation est connu. La détection de plusieurs paramètres n'est limitée que par les sources d'excitation disponibles. Ainsi, sont souvent utilisés l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et la phycoérythrine-R (PE), qui sont excitables à la même longueur d'onde, mais qui émettent à 2 longueurs d'onde bien séparées permettant ainsi de récupérer 2 signaux différents. Les signaux émis sont focalisés, séparés puis acheminés vers des systèmes de détection, photomultiplicateurs. Pour les signaux de fluorescence, on utilise un photomultiplicateur (PMT) qui a pour rôle de convertir une énergie lumineuse en énergie électrique puis d'amplifier celle-ci pour permettre sa mesure précise par les composants électroniques du cytomètre. La réponse du PMT est fonction de la longueur d'onde qu'il reçoit.

Les endonucléases conduisant à la fragmentation de l'ADN puis à la perte importante d'ADN, l'apoptose peut être mise en évidence par simple mesure du contenu d'ADN en utilisant un colorant intercalant de l'ADN comme le iodure de propidium (PI) [Nicoletti *et al.* 1991], le bromure d'éthidium (EB), l'acridine orange (AO) ou des colorants se liant à l'extérieur de l'ADN comme Hoechst 33342, DAPI (4'-6-diaminido-2-phenylindole) [Telford *et al.* 1992]. Le iodure de propidium (PI) et le bromure d'éthidium (EB) sont des agents intercalants de l'ADN (sans spécificité de base), de structures chimiques similaires, qui ne peuvent pas traverser une membrane cytoplasmique intacte. Ils pénètrent, par contre, dans les cellules dont la membrane est endommagée : il sont donc utilisés comme marqueurs de cellules mortes (nécrotiques), marqueurs de l'intégrité membranaire. La combinaison de coloration, à l'aide de Hoechst 33342 et d'une solution de iodure de propidium, qui ne diffuse pas à travers les membranes intactes, permet de différencier et quantifier les cellules apoptotiques, nécrotiques et viables [Dive *et al.* 1992]. La translocation de la phosphatidylsérine (PS) du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique pendant l'apoptose, peut être détectée par l'annexine V (*cf.* 3.5.3.1. b) *Perte de l'asymétrie de la membrane phospholipidique*) [Koopman *et al.* 1994].

Les paragraphes suivants abordent différentes méthodes utilisant la fluorescence en cytométrie en flux.

3.5.3.1. Modifications au niveau de la membrane plasmique

a) Modification de la perméabilité de la membrane

Les colorants cationiques, tels que l'iodure de propidium, le bromure d'éthidium ou la 7-actinomycine (7-AMD), ne pénètrent pas les cellules à la membrane intacte. Ils permettent donc de mettre en évidence les cellules mortes et ainsi de faire un sondage sur la viabilité des cellules.

- ***Iodure de propidium et bromure d'éthidium***

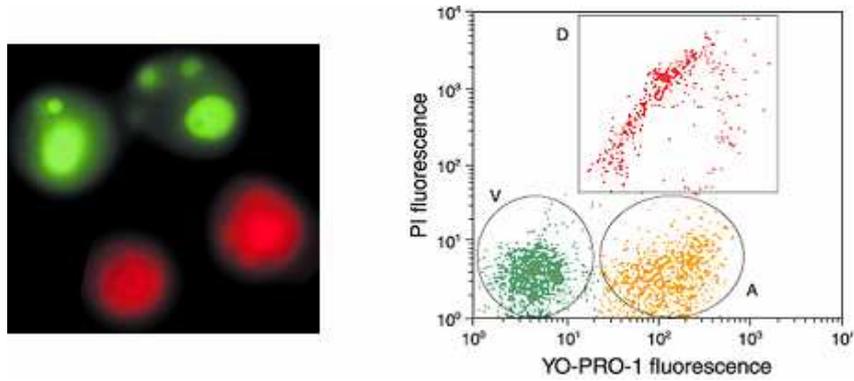
Le iodure de propidium (PI) et le bromure d'éthidium (EB) sont des agents intercalants de l'ADN (sans spécificité de base), de structures chimiques similaires, ne traversant que les membranes cytoplasmiques endommagées. Ils permettent ainsi de mettre en évidence, des cellules apoptotique perméabilisées, hypodiploïdes [Sgonc *et al.* 1998, Vermes *et al.* 1995] (*cf.* 3.5.3.4. *Fragmentation de l'ADN*), et les phases du cycle cellulaire [Tey *et al.* 2005, Al-Rubeai *et al.* 1993] (*cf.* 3.1. *Analyse morphologique par microscopies*).

- ***Diacétate de fluorescéine***

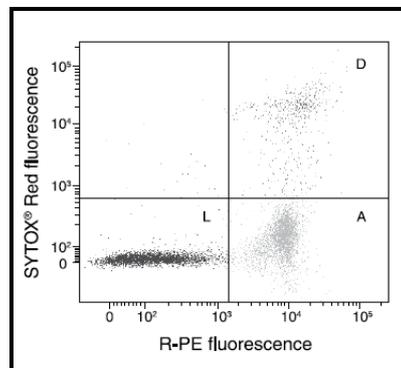
Le diacétate de fluorescéine (FDA) permet d'évaluer la perméabilité membranaire. Non chargé, il passe facilement la membrane plasmique (transport passif) et est clivé en fluorescéine par les estérases des cellules vivantes. Cette fluorescéine libre chargée positivement sort plus lentement que ne rentre son ester. Elle est donc retenue dans les cellules vivantes [Al-Rubeai *et al.* 1993]. Ce composé peut être, par exemple, utilisé en combinaison avec le iodure de propidium.

- ***Cyanines, colorants des acides nucléiques***

Ces marqueurs permettent de mettre en évidence l'ADN et l'ARN. Les cellules viables sont perméables (SYTO...) ou non (SYTOX, TOTO, YOPRO...) à ces composés [Frey 1995, Harding *et al.* 2000, Poot *et al.* 1997]. Une double coloration peut être réalisée, notamment à l'aide de iodure de propidium, auquel les cellules apoptotiques restent imperméables. La fluorescence des marqueurs perméants aux membranes des cellules viables est diminuée durant l'apoptose du fait de l'altération de l'ARN et ADN (*Figure 36*, *Figure 37* et *Figure 38*).



*Figure 36 : Apoptose induite chez des cellules Jurkat (10 μ M de camptothécine)
 A gauche : Noyau des cellules apoptotiques marquées par YO-PRO-1 (green) et cellules apoptotiques tardives et nécrotiques sont détectées par PI (rouge)
 A droite : Cellules apoptotiques (jaune), perméables au colorant cyanine et imperméable au PI [Molecular Probes]*



*Figure 37 : Association cyanine, non perméante aux membrane de cellules viables (SYTOX[®]) et R-Phycoérythrine-Annexine V
 L : cellules viables (Live), A : Apoptotiques, D : mortes, nécrotiques (Death) [Molecular Probes]*

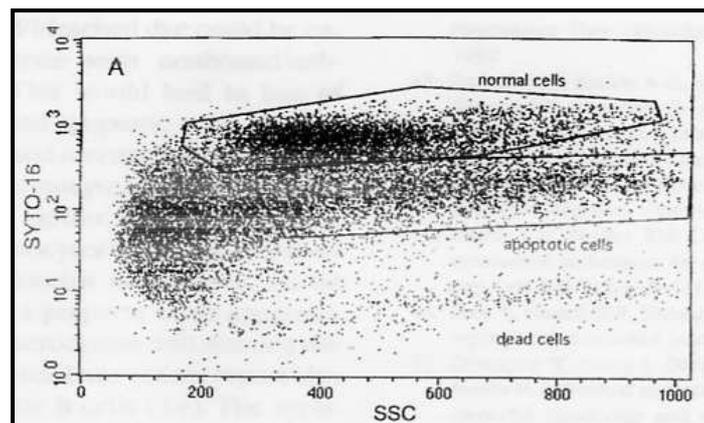


Figure 38 : Marquage cyanine SYTO[®], perméante aux membranes des cellules viables [Frey 1995]

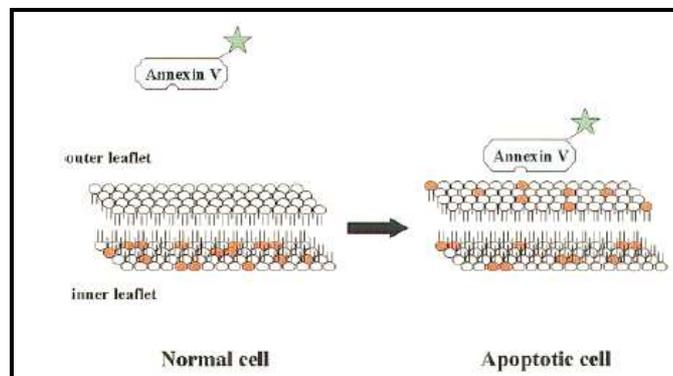
- **7-aminoactinomycine-D**

La 7-aminoactinomycine-D (7-AAD) est un analogue rouge fluorescent de l'actinomycine-D, spécifique de l'ADN, qui s'intercale dans les régions GC de l'ADN. Durant le procédé de mort cellulaire, la membrane plasmique s'altère progressivement et devient perméable à ce colorant

[Lecoeur 2002(b)]. Ce test a été initialement décrit pour la détection et la quantification de l'apoptose [Lecoeur *et al.* 1996, Schmid *et al.* 1992, Schmid *et al.* 1994, Telford *et al.* 2002].

b) Perte de l'asymétrie de la membrane phospholipidique

Les cellules viables présentent une membrane plasmique asymétrique (*Figure 39*). La phosphatidylsérine n'est présente qu'au niveau interne de la bicouche lipidique. Pendant l'apoptose précoce, la phosphatidylsérine est transloquée de la face interne de la membrane plasmique à la face externe et est identifiée en utilisant un conjugué fluorescent de l'annexine V (*Figure 40*) [Arden *et al.* 2004, Bretscher 1972, Van Engeland *et al.* 1998].



*Figure 39 : Représentation schématique de la perte d'asymétrie de la membrane plasmique durant l'apoptose et du test à l'annexine V [Van Engeland *et al.* 1998]*

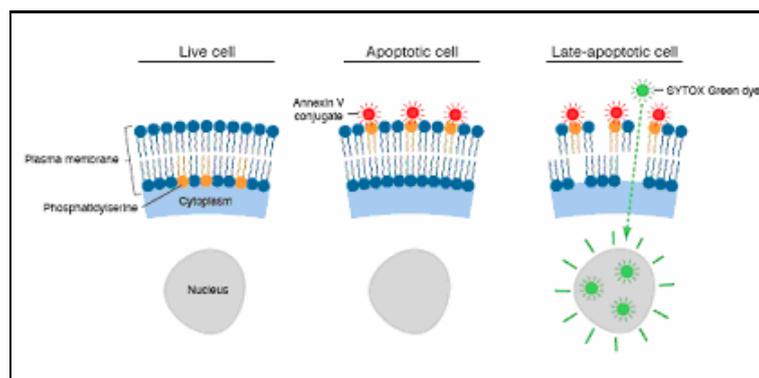


Figure 40 : Principe du test à l'Annexine V [Molecular probes]

L'annexine V est une protéine, isolée pour la première fois à partir d'un placenta humain par Bohn *et al.* [Inaba *et al.* 1984], capable de se lier à la phosphatidylsérine. Pour les analyses, elle est conjuguée à un marqueur tel que la biotine ou la fluoresceine (FITC) [Harding *et al.* 2000, Ishaque *et al.* 1998, Tinto *et al.* 2002]. Elle ne peut donc pas se lier aux cellules viables, ne

présentant pas de phosphatidylsérine à la surface. Chez les cellules nécrotiques, au contraire, ceci est possible du fait de la perte d'intégrité de la membrane. Pour différencier les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques, on utilise en complément un colorant tel que le iodure de propidium (PI) [van Engeland *et al.* 1998, Vermes *et al.* 1995] ou la 7-actinomycine-D [Telford *et al.* 2002]. Cette analyse peut être effectuée par cytométrie en flux (*Figure 41*) ou microscopie (*Figure 42*).

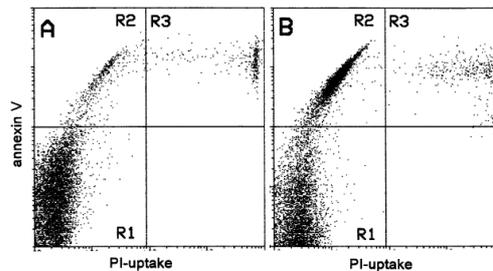


Figure 41 : Analyse PI/Annexine V-FITC de cellules de thymocytes de rat
A : non traitées, B : traitées par dexaméthasone ; R1 : viables (-/-), R2 : apoptotiques (Annexine+/PI-), R3 : R3 : mortes, nécrotiques (+/+) [Van Engeland *et al.* 1998]

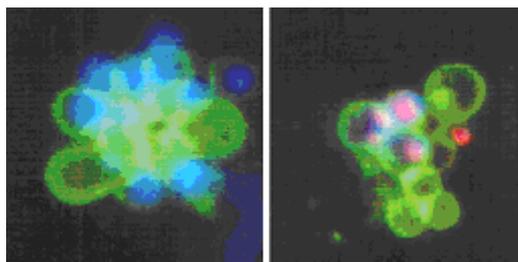
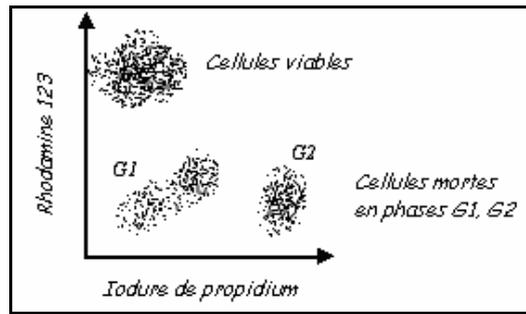


Figure 42 : Marquage de cellules MR65 cultivées en présence de 200µM d'olomoucine, inducteur de l'apoptose
Après 4,5 h, les cultures sont incubées avec Annexine V-FITC, PI et Hoechst 33342 [Van Engeland *et al.* 1998]
A gauche : cellule apoptotique, à droite : cellule nécrotique (Annexine V (vert), PI (rouge), Hoechst (bleu))

3.5.3.2. Perte du potentiel mitochondrial

La perte de potentiel mitochondrial au début de l'apoptose peut être mesurée à l'aide de fluorochromes qui lui sont sensibles.

La rhodamine 123 est un colorant spécifique de la mitochondrie. Il s'agit d'une cyanine cationique qui s'accumule dans les compartiments électriquement négatifs tels que les mitochondries, sans induire d'effets cytotoxiques. En cas de perte de potentiel mitochondrial, comme au début de l'apoptose, la rhodamine s'y accumule dans une moindre mesure. Un double marquage Rhodamine / PI peut être réalisé (*Figure 43*) [Al-Rubeai *et al.* 1993].



*Figure 43 : Double marquage Rhodamine 123 /PI
G1, G2 : phase du cycle cellulaire des cellules mortes(G1(2n), G2(4n)) [Al-Rubeai et al. 1993]*

La chlorométhyl-X-rosamine (CMX-Ros) est un marqueur, séquestré dans les mitochondries des cellules vivantes. Lors de la chute du potentiel mitochondrial pendant l'apoptose, cette molécule est libérée de la cellule [Poot et al. 1997, Poot et al. 1999].

Le marqueur JC-1 (5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimidazolcarbocyanine iodure) est une molécule lipophile (carbocyanine cationique) qui fluoresce en vert sous sa forme monomérique, en rouge lorsqu'il constitue des multimères. La charge négative établie par le potentiel membranaire mitochondrial permet à ce fluorochrome chargé positivement de s'accumuler dans la matrice mitochondriale. Lorsque sa concentration augmente, des agrégats se forment et fluorescent en rouge. Dans les cellules apoptotiques, le potentiel mitochondrial diminue et le JC-1 ne peut s'accumuler dans la mitochondrie à une concentration suffisante. Il reste donc dans le cytoplasme ou dans la mitochondrie, sous sa forme monomérique verte (*Figure 44*) [Cossarizza et al. 1993].

Le colorant JC-9 (3,3'-diméthyl- α -naphthoxcarbocyanine iodure) présente un spectre similaire à JC-1, dépendant du potentiel, allant d'un produit fluorescent en vert à des agrégats rouges.

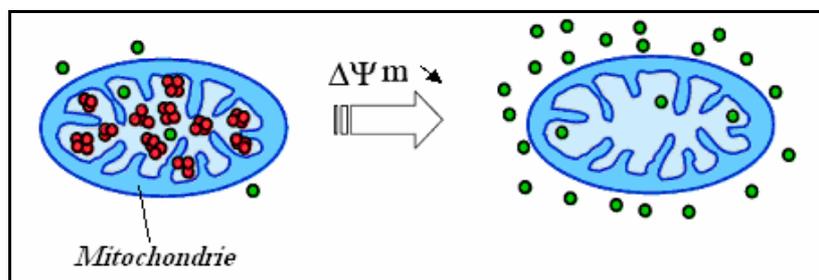


Figure 44 : Principe du marquage JC-1 [Fischer 2004]

Les marqueurs carbocyaniques de type DiOC₂(3), s'accumulent, à faible concentration, au niveau des mitochondries (*Figure 45*). Les cellules viables, aux membranes mitochondriales polarisées, émettent de fortes fluorescences contrairement aux cellules apoptotiques ou nécrotiques (*Figure 46*).

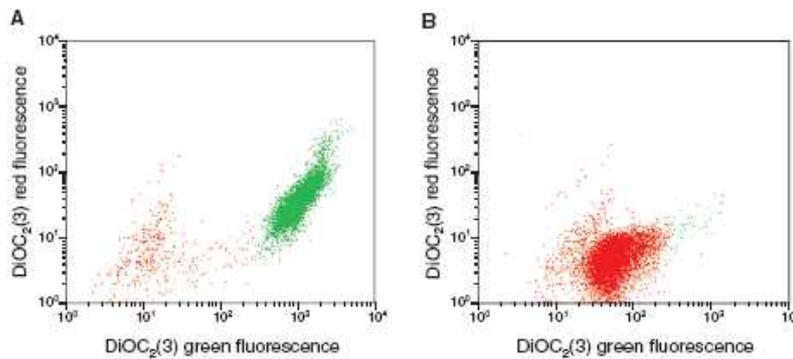


Figure 45 : Marquage au DiOC₂(3) de cellules Jurkat Non-traitées (A) or traitées au carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) qui rompt la membrane mitochondriale (B) [Site Molecular probes]

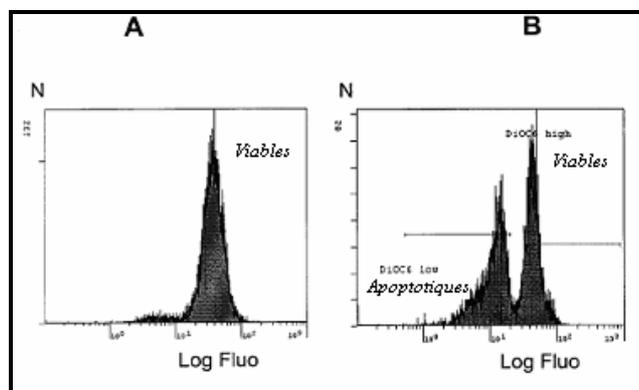


Figure 46 : Variation du potentiel mitochondrial A : Sans induction par camptothécine, B : avec induction [Belloc et al. 2000] Les cellules avec une forte fluorescence DiOC₆(3) sont viables, alors que autres sont apoptotiques

L'acétoxyméthyl-calceïne (Calceïne-AM) marque les cellules vivantes en vert fluorescent, après son hydrolyse par les estérases présentes dans les cellules viables. Son association avec, par exemple, l'iodure de propidium ou le bromure d'éthidium, permet la mise en évidence des cellules nécrotiques. Ce marqueur peut entrer dans la matrice de la mitochondrie grâce à l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (MTP). Ces pores permettent à des molécules de taille relativement importante (- de 620 daltons) de passer du cytosol à la matrice mitochondriale. Le transport de la calceïne à travers les pores a été utilisé pour étudier leur rôle dans l'apoptose.

La nonyl acridine orange est connue pour ses propriétés de liaison à la cardiolipine au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Sa fluorescence diminue lorsque la cardiolipine est oxydée ou altérée pendant l'apoptose [Ferlini *et al.* 1996].

3.5.3.3. Condensation de la chromatine

La condensation de la chromatine peut être mise en évidence à l'aide du marqueur Hoechst 33342 (bisbenzimidazole H 33342). Il s'agit d'un colorant (fluorescence bleue) d'acides nucléiques spécifique des régions de l'ADN bicaténaire riches en AT. Il est facilement capté par toutes les cellules au début de l'apoptose alors que les colorants non perméants de la membrane tels que l'iodure de propidium et le bromure d'éthidium sont exclus. L'apoptose se poursuivant, la perméabilité de la membrane augmente, ce qui permet au iodure de propidium ou au bromure d'éthidium de pénétrer dans la cellule (*Figure 47*).

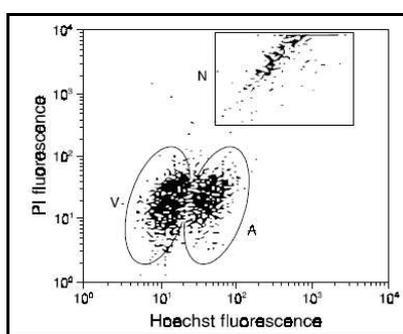


Figure 47 : Marquage Hoechst /PI ; V : viables, A : Apoptotiques, N : Nécrotiques [Molecular Probes]

Sa fluorescence bleue est particulièrement lumineuse chez les noyaux condensés des cellules apoptotiques (*Figure 42*). Des associations de marqueurs sont également possibles avec la 7-aminoactinomycine-D, des colorants des acides nucléiques (YOPRO...), la calcéine-AM ou Carboxy SNARF-1 (marqueur du pH intracellulaire (*cf. 3.5.3.5. pH intracellulaire*)) [Reynolds *et al.* 1996(a)].

3.5.3.4. Fragmentation de l'ADN

- ***Iodure de propidium***

Le iodure de propidium (PI), marqueur de l'intégrité membranaire, se fixe sur les acides nucléiques et permet de mettre en évidence les cellules apoptotiques hypodiploïdes, suite à une perte d'ADN consécutive à la fragmentation (*Figure 48*). Fixées, les cellules apoptotiques perméabilisées ou leurs noyaux isolés montrent une faible coloration de l'ADN formant une région quantifiable sous le pic G0/G1 [Al-Rubeai *et al.* 1993, Al-Rubeai *et al.* 1995, Sgonc *et al.* 1998, Vermes *et al.* 1995].

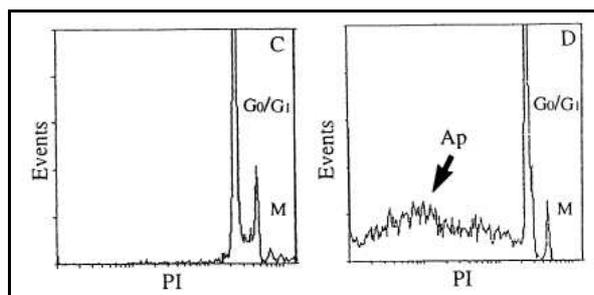


Figure 48 : Marquage au iodure de propidium (PI) pour la mise en évidence des cellules apoptotiques, hypodiploïdes [Sgonc et al. 1998]

Cette hypodiploïdie est également visible avec d'autres marqueurs de l'ADN tels que DAPI, Hoechst, Acridine orange.

- **TUNEL**

La fluorescence de la méthode TUNEL décrite précédemment, permettant la mise en évidence de la fragmentation de l'ADN, peut être détectée et surtout quantifiée par cytométrie en flux (*cf.* § 3.1.2.1. *Méthode TUNEL*).

- **DAPI et sulforhodamine 101**

Le marquage DAPI permet la mise en évidence des cellules apoptotiques hypodiploïdes (*cf.* § 3.1.2.2. *Méthode DAPI*). Les composés DAPI et sulforhodamine 101 peuvent être utilisés ensemble sur des cellules apoptotiques fixées pour révéler les coupures de protéines et de l'ADN.

- **Pyronine Y associée à DAPI ou Hoechst 33342 : distinction ADN/ARN**

La combinaison de la pyronine Y, colorant général des acides nucléiques (ADN et ARN), avec DAPI ou Hoechst 3342 permet de mettre en évidence l'ADN et l'ARN. Dans un premier temps, l'ADN est coloré à l'aide de DAPI ou Hoechst 33342. Ensuite, la pyronine Y est ajoutée aux cellules. Puisque l'ADN est déjà marqué, la pyronine ne marque que l'ARN.

- **Carbocyanines, colorants des acides nucléiques : YO-PRO-1, TO-PRO-3...**

Ces carbocyanines marquent les acides nucléiques et permettent la mise en évidence de la fragmentation de l'ADN, en plus de la perméabilité membranaire (*cf.* § 3.5.3.1. *a) Modification de la perméabilité membranaire*).

- ***LDS 751***

LDS 751, colorant perméant aux cellules viables, est utilisé pour discriminer les cellules à noyau intact des cellules à noyau endommagé aussi bien que pour distinguer les cellules apoptotiques des autres [Frey 1995].

- ***Acridine orange***

L'acridine orange est une sonde métachromatique, utilisée dans la détection des cellules apoptotiques. Sa fluorescence varie selon la nature monocaténaire (rouge) ou bicaténaire (verte) des acides nucléiques marqués. Les cellules apoptotiques ont une fluorescence verte réduite et une fluorescence rouge augmentée, comparées à celles des cellules normales (*cf.* § 3.1.3. *Visualisation de la chromatine et des corps apoptotiques par microscopie à fluorescence (AO/PI)*).

3.5.3.5. pH intracellulaire

Lors de l'apoptose a lieu une acidification intracellulaire [Barry *et al.* 1993, Li *et al.* 1995, Morana *et al.* 1994, Reynolds *et al.* 1996(b)]. Elle peut être détectée en cytométrie en flux en utilisant des marqueurs particuliers tels que Carboxy-SNARF-1 [Ishaque *et al.* 1998, Reynolds *et al.* 1996(a)] ou BCECF (2^l,7^l-bis-(2-carboxyethyl)-5(and-6)-carboxyfluorescein). Des dérivés esters (Acétoxyméthyl) de ces composés sont aussi disponibles. Ils sont convertis en composés fluorescents via l'action des estérases des cellules viables. Les profils d'absorption sont fonction du pH. D'autres marqueurs du pH intracellulaire existent (4-méthyl-sucétine, 4-MU, DADC...).

3.5.3.6. Microfilaments d'actine

Une perte rapide des structures de la surface cellulaire, tels que les pseudopodes et les microvillosités, intervient en parallèle des modifications nucléaires et cytoplasmiques chez un grand nombre de cellules entrant en apoptose [Arends *et al.* 1991, Boc *et al.* 1991, Wyllie *et al.* 1980(b)]. La F-actine est un constituant majeur de ces structures. Ces modifications donnent une surface lisse typique aux cellules apoptotiques en microscopie électronique [Al-Rubeai *et al.* 1993, Al-Rubeai *et al.* 1995, Endresen *et al.* 1995]. Les phallotoxines, une famille de peptides cycliques toxiques, se lient spécifiquement à l'actine et évite la dépolymérisation [Wulf *et al.* 1979]. Ainsi, la FITC-phalloïdine, phallotoxine marquée, est utilisée afin de mettre en évidence

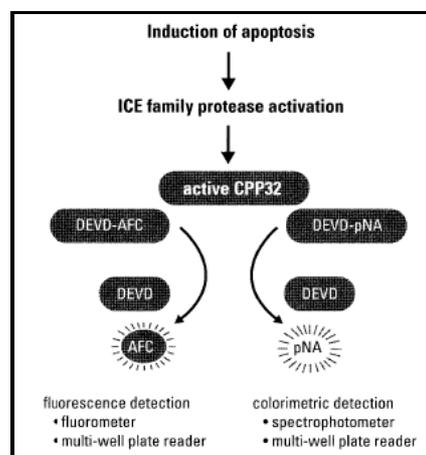
la F-actine. Des anticorps fluorescents anti-actine peuvent également être utilisés [Elias *et al.* 1995].

3.5.3.7. Calcium intracellulaire

Le calcium joue différents rôles au niveau structural, électrique, en tant que co-facteur d'enzymes et protéines et régulateur intracellulaire. La concentration en ions calcium libres intracellulaires est maintenue à un faible niveau (de l'ordre de 0,1 nM) par rapport à la concentration externe du milieu. Le bas niveau en calcium est maintenu grâce aux pompes ATPase-Ca²⁺ de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique et par séquestration par les organelles. Une cellule saine maintient une concentration dix mille fois inférieure à celle extérieure. Au moment de l'apoptose par contre, un influx de calcium survient. Les esters du colorant Quin-2 entrent dans la cellule et sont clivés par des estérases produisant des molécules qui augmentent la fluorescence, fonction de la concentration en ions calcium Ca²⁺. Cependant, les colorants Fura-2 et Indo-1 (2^{ème} génération) sont 30 fois plus fluorescents. [Al-Rubeai *et al.* 1998(b)].

3.5.3.8. Activité caspasique

Un évènement caractéristique des premiers stades de l'apoptose est l'activation des enzymes caspases jouant un rôle déterminant en tant que médiateurs dans les évènements complexes biochimiques (*cf.* § 1.2. *L'apoptose*). Deux types de méthodes existent pour quantifier ces protéases : les techniques fluorimétriques et colorimétriques (*Figure 49*).



*Figure 49 : Principe des méthodes fluorimétrique et colorimétrique [Gurtu *et al.* 1997]*

- **Méthode des substrats fluorimétriques**

La méthode fluorimétrique met en jeu des substrats, bisamides non fluorescents (*Tableau 8*).

Tableau 8 : Exemple de substrats fluorescents des caspases

<i>Séquence peptidique</i>	<i>Caspases cibles</i>	<i>Substrats</i>
DEVD = Asp-Glu-Val-Asp	3, 6, 7, 8, 1	Z-DEVD-AFC Z-DEVD-R110 Z-DEVD-AMC
IETD = Ile-Glu-Thr-Asp	8	Z-IEDT-AFC Z-IEDT-R110 Z-IEDT-AMC
LETD = Leu-Glu-Thr-Asp	8	Z-LETD-R110
YVAD = Tyr-Val-Ala-Asp	1, 4	Z-YVAD-AFC Z-YVAD-R110
VEID = Val-Glu-Ile-Asp	6	Z-VEID-R110
LEHD = Leu-Glu-His-Asp	9, 4, 5	Z-LEHD-AFC Z-LEHD-R110
LEED = Leu-Glu-Glu-Asp	13	Z-LEED-R110
YDVAD = Tyr-Asp-Val-Ala-Asp	2	Z-YDVAD-R110

Le bisamide non fluorescent est d'abord converti par la caspase activée en un monoamide fluorescent et ensuite en fluorophore encore plus fluorescent (*Figure 50*) [Chiang *et al.* 2005, Goswami 1999, Gurtu *et al.* 1997].

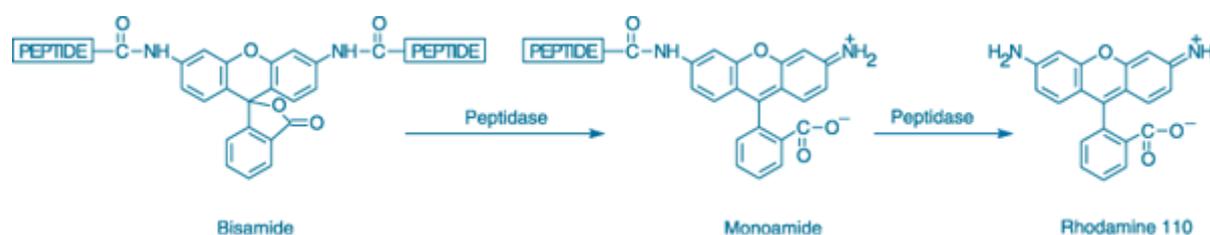


Figure 50 : Action des caspases sur les substrats bisamides de type Z-DEVD-R110

- **Méthodes des anticorps fluorescents**

Belloc *et al.* [Belloc *et al.* 2000] utilisent un anticorps polyclonal anti-caspase-3 active, conjugué à phycoérythrine, pour suivre l'activation de la caspase-3 durant l'apoptose de cellules

leucémique, induite par la daunorubicine (*Figure 51*). D'autres marqueurs fluorescents tel que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) peuvent être couplés à l'anticorps anti-caspase-3 active.

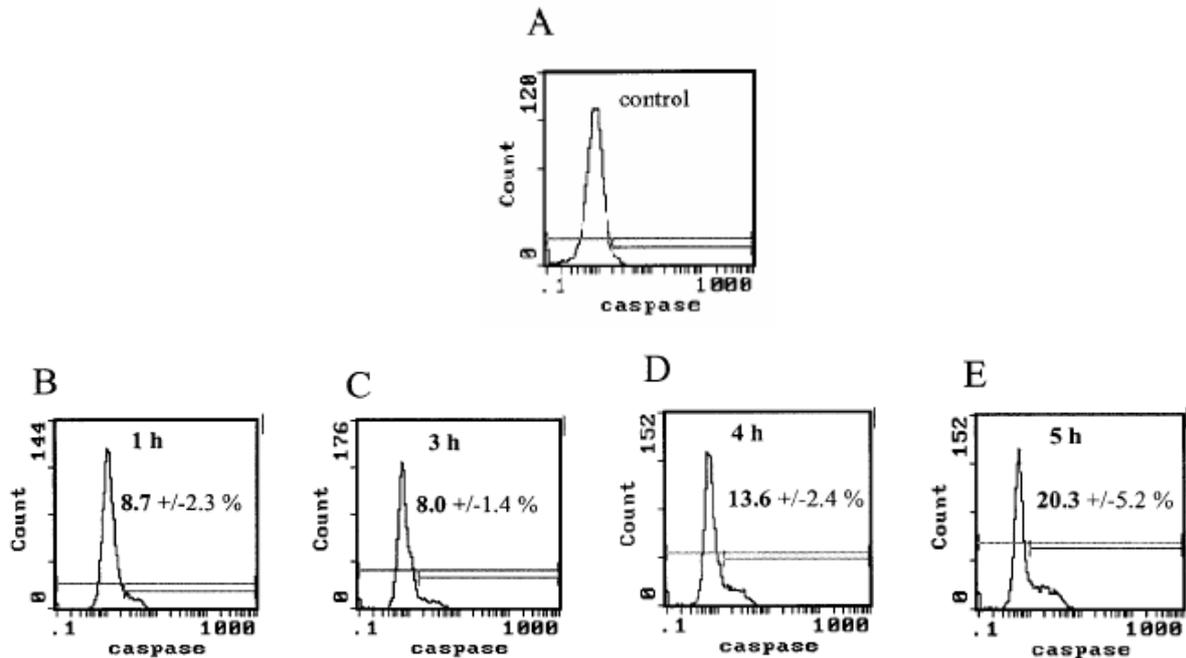


Figure 51 : Activation de la caspase-3 par la daunorubicine suivie par cytométrie en flux
Cellules U937 (lignée de cellules leucémiques humaines issues d'un lymphome histiocytaire) fixées et marquées à l'aide d'anticorps anti-caspase-3 active (clivée), après 1h (B), 3h (C), 4h (D) et 5h (E) après le début de l'expérience. A : contrôle négatif avec un anticorps non pertinent [Belloc et al. 2000]

Des expériences sur des cellules apoptotiques leucémiques de patients, atteints de leucémies myéloïdes aiguës et lymphoïdes aiguës, traitées par daunorubicine et idarubicine, et des lymphocytes normaux, ont montré la relation entre l'activation caspasique et la perte de l'asymétrie membranaire (*Figure 52*).

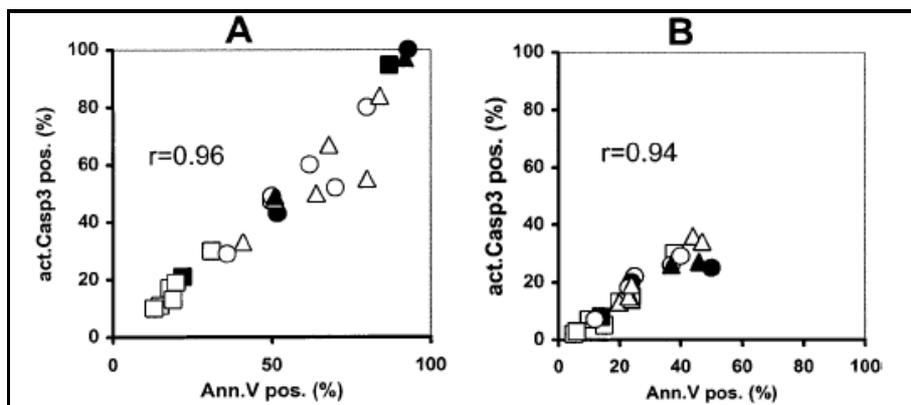


Figure 52 : Activation de la caspase-3 liée à la modification d'exposition de la phosphatidylsérine
Leucémie myéloïde aiguë : symboles blancs, Leucémie lymphoïde aiguë : symboles noirs
Daunorubicine : cercles, idarubicine : triangles, non traités : carrés
A : leukemic blast cells, B : lymphocytes [Belloc et al. 2000]

Remarque : La baisse du potentiel membranaire mitochondrial peut-être détecté par l'incorporation de D₂OC₆(3) (cf. § 3.5.3.2 *Perte du potentiel mitochondrial*). Au même moment, l'activité DEVDase augmente [Belloc *et al.* 2000].

- **Méthode colorimétrique : spectrophotométrie**

Il existe également des substrats colorimétriques utilisables en spectrophotométrie. La libération de la p-nitroaniline est suivie à 405 nm [Vasilakos *et al.* 1997, Gurtu *et al.* 1997, Chae *et al.* 2004, Mouratidis *et al.* 2006].

- Caspase 1 : Ac-WEHD-pNA (Ac-Trp-Glu-His-Asp-pNA), YVAD-pNA...
- Caspase 3 : DEVD pNA, Ac-DEVD-pNA...
- Caspase 8 : Ac-IETD-pNA
- Caspase 9 : Ac-LEHD-pNA
- Caspase 10 : Ac-AEVD-pNA

Des inhibiteurs des caspases peuvent également être utilisés pour s'assurer que la fluorescence ou la densité optique est uniquement liée au clivage du substrat introduit (ex : DEVD-CHO (aldéhyde), DEVD-fmk (fluorométhylketone), z-VAD-fmk... [Chae *et al.* 2004, Goswami *et al.* 1999, Gurtu *et al.* 1997, Mouratidis *et al.* 2006]. Ces inhibiteurs peuvent être couplés à des marqueurs fluorescents (FITC) [Jayaraman 2003]. Ces composés peuvent être employés dans la prévention de l'apoptose (cf. 4.3.1.3. *Additifs interrompant la cascade apoptotique*).

Tableau récapitulatif de différents marqueurs utilisés dans l'analyse de la mort cellulaire

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des différents marqueurs utilisés pour détecter et quantifier la mort cellulaire (non exhaustif)

Paramètre	Marqueurs
Taille	Pas de marquage (FSC)
Granulosité	Pas de marquage (SSC)
Viabilité	- Bleu trypan - Erythrosine B
Membranes	- Iodure de propidium / Bromure d'Ethidium - Fluorescéine diacétate - AnnexineV-FITC - LDH - Carbocyanines (YOPRO...)
ADN	- Hoechst 33342 - DAPI - Iodure de propidium / Bromure d'Ethidium - Dérivés d'UTP (TUNEL) - 7-AminoActinomycine-D - ³² P - Carbocyanines (YOPRO...)
ADN et ARN	- Acridine orange / PI - Pyronine Y - LDS 751 - Carbocyanines (SYTO, YOPRO...)
Mitochondrie, potentiel membranaire	- Rhodamine 123 - Chlorométhyl-X-rosamine (CMX-Ros) - DiOC ₆ (3) et dérivés de la même famille - JC-1, JC-9 et dérivés de la même famille - Calceine AM - Nonyl acridine orange
pH intracellulaire	- Carboxy-SNARF-1 et dérivés (AM) - BCECF et dérivés (AM)
Calcium intracellulaire	- Quin-2 - Indo-1, Fura-2, Fluo-3...
Filaments d'actine	- FITC-Phalloïdine - Anticorps fluorescents anti-actine
Activité caspasique	- Substrats fluorescents de caspases - Substrats colorés des caspases - Inhibiteurs des caspases - Anticorps fluorescents anti-caspases activées - Anticorps anti-cytochrome-c - Anticorps anti-PARP

3.6. Synthèse des méthodes utilisées en bioréacteurs

Tableau 10 : Comparaison des principales méthodes de détection de la mort cellulaire [adapté de Drugmand 2007]

DIFFERENTES METHODES UTILISEES POUR DETECTER LA MORT CELLULAIRE CHEZ LES CELLULES ANIMALES						
Méthode	Principe	Caractéristiques détectées	Avantages	Inconvénients	Détection	Quantitative ?
<u>Colorants</u>						
Bleu Trypan	Colorant d'exclusion Microscopie optique ou hémocytomètre	Intégrité membrane plasmique	Facile, simple Bon marché	Subjectivité Cytotoxique Peu précis	Nécrose Apoptose tardive	Oui
AO/PI	Colorant fluorescent Microscopie fluorescence Cytométrie en flux	Intégrité membrane plasmique Condensation chromatinienne	Facile, simple Différenciation early, late apoptose et nécrose	Subjectivité Cytotoxique Peu précis	Apoptose Nécrose	Oui
Calceïne – AM / PI	Colorant fluorescent Microscopie fluorescence Cytométrie en flux	Intégrité membrane plasmique	Facile, simple Bon marché	Subjectivité Cytotoxique Peu précis	Nécrose	Oui
Rhodamine 123 / PI	Colorant fluorescent Microscopie fluorescence Cytométrie en flux	Intégrité membrane plasmique Modification du potentiel mitochondrial	Détection apoptose activée par la voie mitochondriale	Subjectivité Cytotoxique Peu précis Faux positifs	Apoptose Nécrose	Oui
AnnexineV-FITC / pl	Colorant fluorescent Microscopie fluorescence Cytométrie en flux	Intégrité de la membrane plasmique Inversion Phosphatidylsérine	Haute sensibilité	Surestimation apoptose Colorant cher	Apoptose précoce Nécrose	Oui
<u>Fragmentation ADN</u>						
Motif en échelle ADN	Electrophorèse gel agarose	Fragments ADN (180 pb)	Critère indiscutable qd positif	Long Faux négatifs	Apoptose	Peu
TUNEL	Anticorps couplés fluorochromes Cytométrie n flux	Fragments ADN, à l'aide d'anticorps	Conservation des échantillons	Long, cher Faux négatifs	Apoptose	Oui
<u>Détection protéines</u>						
LDH	Test enzymatique Spectroscopie	Détection LDH cytosolique dans le surnageant	Rapide, efficace, sensible	Conservation délicate des échantillons	Nécrose	Oui
Détection caspases	Test enzymatique (spectroscopique ou fluorimétrique)	Activité enzymatique	Sensible	Coûteux Faux négatifs	Apoptose	Oui
Activité caspasiqque : clivage protéines	Western blot (clivage caspase, PARP) Cytométrie en flux	Détection de l'activité caspasiqque : clivage caspase, PARP	Sensible	Coûteux Anticorps spécifique	Apoptose	Non
Libération Cytoch.-c	Western blot	Détection cytochrome-c libéré	Sensible	Coûteux Anticorps spécifique	Apoptose	Semi Quantitative
<u>Analyse cellulaire</u>						
Microscopie electron.	Morphologie	Noyau, Intégrité membranaire Présence de corps apoptotiques	Sensible	Coûteux Pas en routine	Apoptose Nécrose	Non
Cytométrie en flux	FSC / SSC Colorants fluorescents (PI, Hoechst...)	Taille / Granulosité Divers marquages (pH...)	Reproductible Efficace	Coûteux	Apoptose Nécrose	Oui

Le tableau suivant présente une liste non exhaustive de différentes méthodes utilisées pour caractériser et quantifier la mort cellulaire.

Tableau 11 : Différentes méthodes utilisées pour caractériser et quantifier la mort cellulaire dans la littérature (non exhaustif)

Caractéristique	Méthode	Type cellulaire	Référence
Viabilité / Densité	Bleu trypan	CHO CHO IFN- γ (bcl-2) CHO et 293 HEK CHO (Bcl-X _L , Aven, XIAP) CHO-K1, 293 HEK (XIAP et mutants) CHO-K1 (Bcl-X _L , Aven) CHO 100AB-37 / CHO 3-43 CHO TF 70R CHOK1/ CHO111-10	Moore 1995 Goswami 1999 Sauerwald 2003 Sauerwald 2006 Sauerwald 2002 Figuroa 2004 Chiang 2005 Altamirano 2000 Zhang 2000
		Mouse-mouse TB/C3 hybridoma cells / CHO320	Shah 2006
		Hybridoma TB/C3 : NS1-derived murine hybridoma TB./C3 : mouse hybridoma cell line TB/C3 : NS1-derived mouse hybridoma NS-1 derived hybridoma (TB/C3) TB/C3 murine hybridoma	Schürch 1988 Al-Rubeai 1995 Harding 2000 Al-Rubeai 1993 Ishaque 1998 Born 1992
		Myeloma NSO 6A1 (GS \pm bcl-2) NSO 6A1 NSO 6A1 (bcl-2/GS)	Tey 2004 Tey 2005 Frahm 2003
	Erythrosine B	KG-1	Elias 1995
	MTT	Lymphocytes	Mosmann 1983
Morphologie	FSC / SSC (taille / granulosité)	Juskatt cells E6-1 / MCF-7 TB./C3 : mouse hybridoma cell line	Jayaraman 2003 Harding 2000
	Microscopie électronique à transmission	CHO / sf9 / plasmacytome murin (J558L) et hybridome murin (TB/C3)	Singh 1994
Fragmentation ADN "ADN ladder"	Electrophorèse	CHO IFN- γ (bcl-2) CHO / sf9 / plasmacytome murin (J558L) et hybridome murin (TB/C3) CHO et 293 HEK CHO-K1, 293 HEK (XIAP et mutants) CHO-K1 (Bcl-X _L , Aven) CHO CHO CHO-D003 CHOK1/ CHO111-10	Goswami 1999 Singh 1994 Sauerwald 2003 Sauerwald 2002 Figuroa 2004 Fusseneger 2000 Moore 1995 Han Kyu Oh 2005 Zhang 2000
		NSO Jurkatt cells E6-1 / MCF-7 KB26.5 Hybridoma cells CCRF-HSB-2 human leukemia Human lymphocyte TB/C3 : NS1-derived murine hybridoma	Tey 2000 Jayaraman 2003 Tinto 2002 Vermes 1995 Rubeai 1995

	TUNEL (3'DNA end labelling)	CHO KB26.5 Hybridoma cells	Moore 1995 Tinto 2002
	TOTO-1	CHO	Moore 1995
	TOPRO-3	TB/C3 : NS1-derived mouse hybridoma	Harding 2000
Intégrité membranaire	Iodure de propidium	NSO 6A1 TB/C3 : NS1-derived mouse hybridoma Juskatt cells E6-1 / MCF-7	Tey 2005 Al-Rubeai 1993 Jayaraman 2003
	Bromure d'éthidium	KB26.5 Hybridoma cells Jurkatt cells E6-1 / MCF-7	Tinto 2002 Jayaraman 2003
	LDH	Mouse-mouse hybridoma cell C1E3 Human tumor kidney cells Hybridoma cells line VO208 CHO	Racher 1990 Wagner 1992 Georgen 1993 Moore 1995
Morphologie nucléaire	AO	TB/C3 : NS1-derived murine hybridoma CHO IFN- γ (bcl-2) CHO / sf9 / plasmatocytome murin (J558L) et hybridome murin (TB/C3) CHO NS-1 derived hybridoma (TB/C3) Myeloma NSO 6A1 (GS \pm bcl-2) NSO NSO 6A1 KB26.5 Hybridoma cells	Al-Rubeai 1995 Goswami 1999 Singh 1994 Moore 1995 Ishaque 1998 Tey 2004 Tey 2000 Tey 2005 Tinto 2002
Translocation Phosphatidylsérine	Annexine V	CCRF-HSB-2 human leukemia Human lymphocyte NS-1 derived hybridoma (TB/C3) TB./C3 : mouse hybridoma cell line EL-4 murine thymoma cells / UMR-106 rat osteosarcoma (adh.) KB26.5 Hybridoma cells	Vermes 1995 Ishaque 1998 Harding 2000 Telford 2002 Tinto 2002
pH intracellulaire	Carboxy-SNARF-1-AM	NS-1 derived hybridoma (TB/C3)	Ishaque 1998
Activité mitoch	Rhodamine 123	TB/C3 : NS1-derived mouse hybridoma	Al-Rubeai 1993
Cycle cellulaire	PI	TB/C3 : NS1-derived mouse hybridoma	Al-Rubeai 1995
Microfilament actine	Phalloidine + PI Immunofluorescence	TB/C3 : NS1-derived mouse hybridoma TB/C3 : NS1-derived murine hybridoma KG-1	Al-Rubeai 1993 Al-Rubeai 1995 Elias 1995
Perméabilité membranaire	Fluoresceine diacetate	TB/C3 : NS1-derived mouse hybridoma	Al-Rubeai 1993
Activité caspasique : Clivage caspase Clivage PARP Libération Cytochrome c	Substrats ou inhibiteurs capsases	EL-4 murine thymoma cells / UMR-106 rat osteosarcoma (adh.) Jurkatt cells E6-1 / MCF-7 CHO IFN- γ (bcl-2) CHO 100AB-37 / CHO 3-43 KB26.5 Hybridoma cells	Telford 2002 Jayaraman 2003 Goswami 1999 Chiang 2005 Tinto 2002
	Western-blot	CHO MG12 CHO-D003 CHO IFN- γ (bcl-2) KB26.5 Hybridoma cells	Fusseneger 2000 Han Kyu Oh 2005 Goswami 1999 Tinto 2002
Expression protéines	Western-blot : anti-XIAP	CHO CHO et 293 HEK	Sauerwald 2006 Sauerwald 2003

3.7. Méthodes automatisées utilisables à l'échelle industrielle

Certains dispositifs automatisés ont été développés afin de faciliter certaines analyses de routine dans l'industrie (bleu trypan, cytométrie sans flux...) et permettre d'éviter les déviations inter- et intra-individuelles des opérateurs. Les échantillons ne doivent pas présenter de cellules agrégées.

3.7.1. Evaluation de la viabilité : méthode au bleu trypan

Différents appareils, tels que Vi-Cell™ (Beckman Coulter®), Cedex® (Innovatis), permettent d'automatiser la méthode au colorant d'exclusion bleu trypan (*Figure 53*). Ils rendent ainsi possible le suivi des paramètres de culture tels que la densité, la viabilité et la taille cellulaires.



Figure 53 : Vi-Cell™ et Cedex®

Certaines études ont mis en évidence une équivalence entre les numérations et viabilités manuelles au bleu trypan et celles obtenues à l'aide du Cedex® [Hawerkamp 2001, Kwok *et al.* 2002] ou du Vi-Cell™ [Szabo 2003, Szabo *et al.* 2004]. Cependant, la présence de cellules agrégées peut entraîner une déviation de la numération.

3.7.2. Evaluation de la viabilité : Méthode au iodure de propidium

Nucleocounter®

Nucleocounter® est un outil de comptage de cellules, portable, basé sur le principe de la microscopie à fluorescence, utilisant la marquage au iodure de propidium (*Figure 54*).



Figure 54 : Nucleocounter® - Chemometec

Shah *et al.* ont comparé la numération et la viabilité cellulaire obtenues à l'aide du Nucleocounter®, à celles obtenues par coloration bleu trypan sur hémocytomètre (*cf. § 3.1.1. Microscopie optique et coloration bleu trypan*) et cytométrie en flux. Ils concluent que ce dispositif est un outil rapide, précis et objectif pour le suivi des densités et viabilités cellulaires pour les cultures de cellules animales. Il fournit des résultats comparables à ceux obtenus avec les méthodes standards de façon reproductible entre expériences et opérateurs [Shah *et al.* 2006]. Cependant, la présence de cellules agrégées peut entraîner une déviation de la numération.

Le principe du dosage des cellules mortes et totales est décrit dans la figure suivante. Pour déterminer la viabilité cellulaire, les noyaux des cellules non-viables sont marqués par le iodure de propidium, perméants à leur membrane altérée. Le comptage des cellules totales consiste à lyser la membrane de toutes les cellules à l'aide d'un tampon et ainsi à marquer tous les noyaux à l'aide du iodure de propidium (*Figure 55*) .

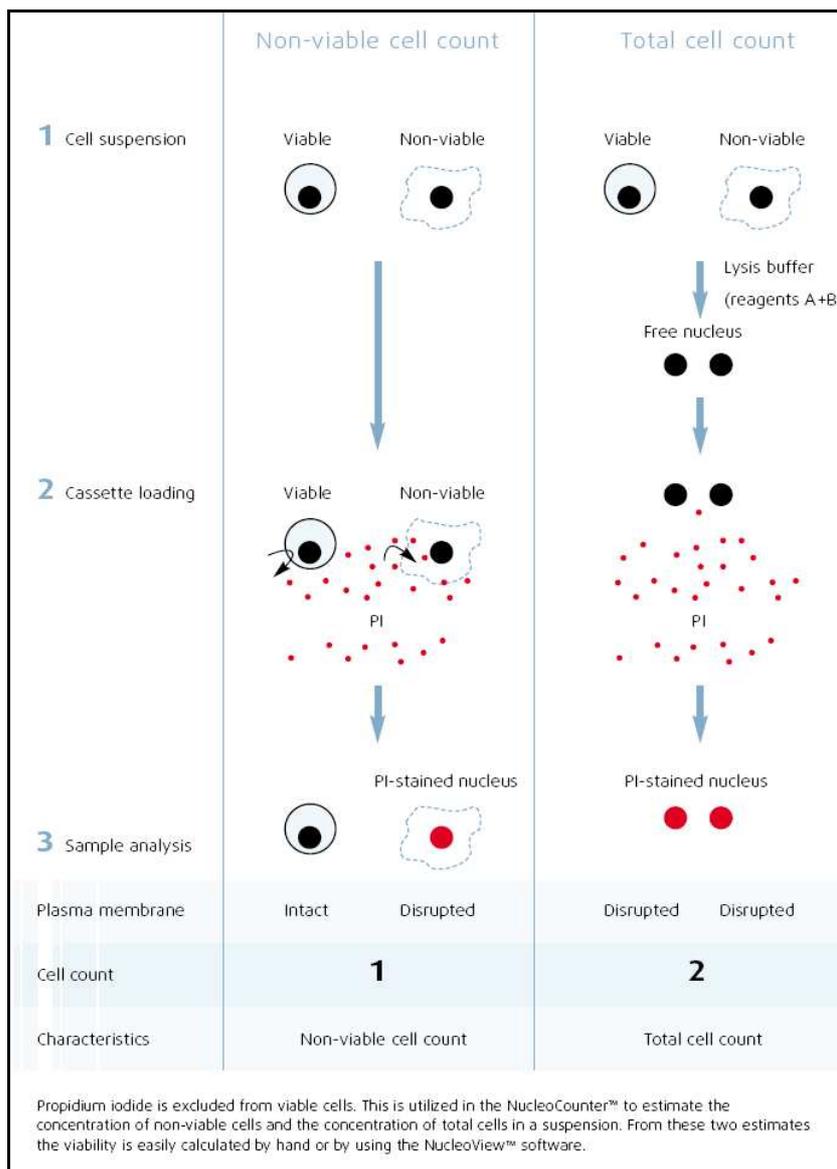


Figure 55 : Principe de la méthode de numération des cellules mortes et totales du Nucleocounter [Site Chemometec]

C-Reader et ADAM (Digital Bio)

Le fonctionnement des dispositifs C-Reader et ADAM (Automated Detection Accurate Measurement, Digital Bio) est basé sur le principe de la microscopie à fluorescence et permet la numération et la détermination de la viabilité cellulaire (*Figure 56*).

Le principe de marquage des cellules pour la numération des cellules mortes ou totales est identique à celui du Nucleocounter[®], à l'aide de iodure de propidium.

Il nécessite l'utilisation d'hémocytomètres jetables dans lesquels on dispose les échantillons traités par des solutions spécifiques, sans agrégats cellulaires. Des hémocytomètres à double canal,

permettent le comptage des cellules totales et des cellules non-viables, afin d'aboutir à la viabilité après détection à l'aide d'une caméra CCD.



Figure 56 : Dispositifs C-Reader et ADAM (Digital Bio)

3.7.3. Cytométrie "sans" flux, capillaire

Cytomètre Guava[®]

Guava propose des cytomètres, utilisant des tubes capillaires pour le prélèvement des échantillons de cellules en suspension (*Figure 57*). Cette caractéristique permet de réduire la taille des appareils de cytométrie et le volume nécessaire des échantillons. Il permet de réaliser différentes analyses, telles que la viabilité/numération (2 colorants), le test à l'annexine V, la détection de l'activité caspasiq (inhibiteurs), la méthode TUNEL ou la détection de la variation du potentiel mitochondrial (JC-1).



Figure 57 : Système Guava EasyCyte[™] Plus

3.7.4. Détermination électronique du volume cellulaire

Cette méthode consiste à évaluer le volume des cellules, et ainsi leur état physiologique, en les faisant passer à travers un orifice parcouru d'un faible courant électrique. Chaque cellule passant

dans l'orifice, modifie la résistance du courant qui la traverse. La variation de résistance, proportionnelle au volume cellulaire, génère un signal, qui est ensuite amplifié et analysé (CASY™, Schärfe systems). Les cellules sont ainsi différenciées, selon leur diamètre cellulaire, en cellules mortes, vivantes, agrégats ou débris (*Figure 58*) [Freshney 2005].

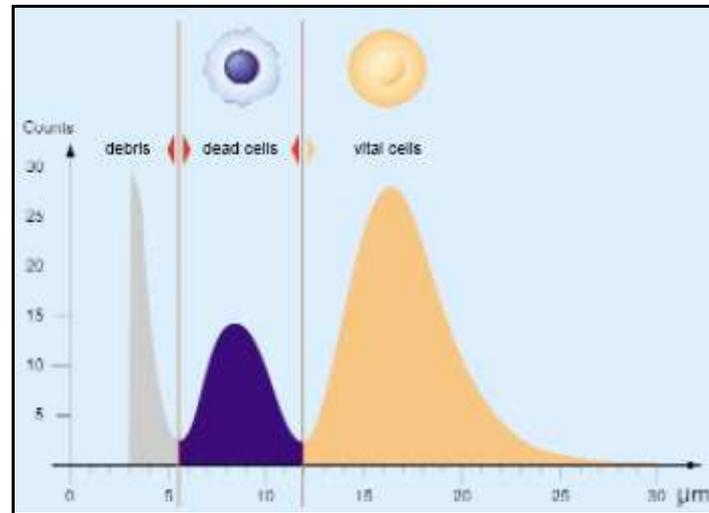


Figure 58 : Evaluation électronique du volume, et ainsi du diamètre cellulaire [Casy Technology 2007]

Après avoir décrit les différentes méthodes disponibles pour la détection et la quantification de mort cellulaire, la prochaine partie de ce travail aborde les origines de la mort des cellules cultivées en bioréacteur ainsi que certaines stratégies disponibles pour en limiter l'ampleur.

4. LA MORT CELLULAIRE EN BIOREACTEUR

Cultivées en bioréacteur, les cellules sont soumises à différentes contraintes telles que l'agitation et l'aération. L'agitation augmente le transfert d'oxygène et permet d'obtenir un milieu homogène pour la croissance cellulaire. Bien que l'on parvienne à obtenir des cultures cellulaires de forte densité, des progrès sont à faire au niveau de la productivité en bioréacteur. L'agitation et l'aération sont deux paramètres majeurs à prendre en compte dans la conception de technologies de culture cellulaire [Papoutsakis 1991].

Pendant longtemps, les facteurs impliqués dans la mort cellulaire n'étaient pas pris en compte dans l'optimisation des procédés de culture cellulaire. En fait, on pensait que seule intervenait la nécrose et qu'il suffisait de réduire les contraintes de cisaillement pour diminuer la mort cellulaire. Or, dans de nombreux cas, cela s'est avéré difficile à réaliser. Désormais, il est clairement avéré que les cellules soumises à un environnement contraignant, peuvent subir également l'apoptose [Al-Rubeai *et al.* 1998(b)]. Différents facteurs, pouvant induire la mort cellulaire en bioréacteur, sont abordés dans ce chapitre.

4.1. Impact de l'environnement biochimique sur la mort cellulaire en bioréacteurs

L'environnement biochimique joue un rôle prépondérant sur la cellule notamment au niveau nutritif.

4.1.1. Limitation en nutriments

La limitation en nutriments est l'une des causes primaires de la mort cellulaire durant la phase de déclin en culture discontinue ("batch"). Les nutriments limitants les plus connus sont le glucose, les acides aminés essentiels et les non-essentiels dans une moindre mesure pour des cellules hybridomes [Mercille *et al.* 1994, Singh *et al.* 1994, Perreault *et al.* 1994, Simpson *et al.* 1998].

En plus de ces nutriments, la culture cellulaire *in vitro* dépend également de la présence dans le milieu de facteurs de croissance et de cytokines présents dans le sérum [Al-Rubeai *et al.* 1998(b)]. Il a été rapporté que l'ajout de sérum, à des cellules adaptées à un milieu qui n'en contient pas, peut les protéger de l'apoptose due à un manque de nutriments [Zanghi *et al.* 1999]. Elias *et al.* ont observé que la présence de sérum a une influence positive sur le taux de croissance en diminuant les contraintes de cisaillement [Elias *et al.* 1995]. L'absence de sérum peut induire l'apoptose chez la plupart des types cellulaires. Cependant, les industriels ont développé des milieux sans sérum et sans protéines. Outre le coût et les interférences dans les processus de purification, la nature relativement non définie du sérum est source de variabilité et peut potentiellement être source de contamination (virus, prions). Il est possible de cultiver les cellules sans sérum en maintenant de bonnes croissances et productivités [Laken *et al.* 2001, Sinacore *et al.* 1996, Renner *et al.* 1995].

Une solution pour limiter le manque de nutriments, est le mode semi-continu ("fed-batch") ou perfusé mais les cellules restent sensibles à l'apoptose même si celle-ci survient plus tard (*cf.* § 4.3.3. *Technologie du bioréacteur*). En effet, soit un nutriment critique non identifié manque encore, soit d'autres inducteurs conduisent à l'apoptose dans ces modes de mise de œuvre [DeZengotita *et al.* 2000, Laken *et al.* 2001].

4.1.2. Oxygène dissous

La formation d'espèces réactives de l'oxygène, suite à l'aération ou au métabolisme, peut entraîner des dommages au niveau de l'ADN et de la membrane [Emery *et al.* 1995]. Sous ces conditions, le cycle est prolongé et la viabilité de la culture diminue. Ainsi, il a été suggéré que les espèces réactives de l'oxygène jouent un rôle important dans la réponse apoptotique et que des antioxydants tels que le glutathion et la N-acétylcystéine permettent de protéger les cellules de l'apoptose en condition de stress oxydatif (*cf. Remarque du § 3.2.3.*) [Al-Rubeai *et al.* 1998(b), Chang *et al.* 1999, Mastrangelo *et al.* 1999]. L'anoxie est également inductrice d'apoptose, mais peut être supprimée par surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 [Al-Rubeai *et al.* 1998 (b), Laken *et al.* 2001, Simpson *et al.* 1997].

Plus le volume de culture est important, plus il est difficile de satisfaire les demandes en oxygène des cellules. L'oxygénation par "sparging" (bullage) est la méthode la plus efficace mais conduit à l'apoptose des cellules du fait des interactions bulles-cellules durant le dégagement des bulles

de gaz dans le milieu [Handa-Corrigan *et al.* 1989]. Des solutions partielles à ce problème sont proposées, telles que l'utilisation de systèmes d'aération sans bulle (membrane poreuse hydrophobe), efficaces pour les cultures intensives mais souvent limités pour l'extrapolation aux grandes échelles [Schneider *et al.* 1995, Wagner *et al.* 1988] (cf. § 4.3.3. *Technologie du bioréacteur*).

4.1.3. Accumulation de métabolites toxiques

Il a été montré que l'ammonium et le lactate peuvent avoir un impact négatif sur le taux de croissance cellulaire [Lao *et al.* 1997] et une augmentation de la concentration d'ammoniaque, induire l'apoptose [Singh *et al.* 1994]. La capacité des hépatocytes à éliminer l'ammonium a été utilisée dans une stratégie de co-culture pour améliorer un procédé de culture de CHO [Choi 2000].

4.2. Impact de l'environnement physique et mécanique sur la mort cellulaire en bioréacteur

Les contraintes de cisaillement (agitation, aération, pompage...) sont une cause potentielle d'induction de la mort cellulaire (absence de paroi cellulaire contrairement aux mycètes et aux bactéries) [Chisti 2000, Meier *et al.* 1999]. Il est sûr qu'elles peuvent induire une mort par nécrose. Cependant, à des niveaux plus faibles de contraintes, les conséquences pour les cellules ne sont pas claires [Laken *et al.* 2001].

Selon Kunas et Papoutsakis, deux mécanismes de mécanique des fluides peuvent causer des dommages cellulaires et un retard de croissance. Le premier est présent uniquement en présence de phase gazeuse et est associé à la formation de vortex, accompagné de l'entraînement et éclatement de bulles. Ils ont observé qu'en l'absence de vortex et d'entraînement de bulles, les cellules ne sont endommagées que sous de très fortes contraintes (>700 rpm), par stress dans le liquide turbulent. En l'absence de vortex, l'entraînement et le mouvement de bulles très fines ne causent pas de retard dans la croissance même à de fortes vitesses d'agitation (600 rpm).

4.2.1. Effet de l'agitation

L'exposition à des niveaux élevés d'agitation mécanique induit des niveaux importants d'apoptose [Al-Rubeai 1998(b)]. L'état physiologique et mécanique de la cellule est également un facteur qui intervient dans les altérations cellulaires.

4.2.1.1. Echelle de Kolmogorov

La culture de cellules nécessite l'agitation du milieu afin d'assurer le transfert de l'oxygène et des nutriments et de maintenir les cellules dans une suspension homogène. L'action de l'agitateur et du "sparger" permet l'agitation et le mélange. Le mélange du liquide résulte de l'existence d'un gradient de vitesse dans le milieu agité, auquel sont sensibles des cellules. Celles-ci se déforment sous l'effet des contraintes de cisaillement (fonction du gradient de vitesse). Ainsi leur membrane plasmique peut se rompre et la cellule mourir [Born et al. 1992, Joshi et al. 1996].

En bioréacteur agité, le fluide turbulent peut être considéré comme étant composé de larges tourbillons primaires instables, qui s'affaiblissent et transfèrent l'énergie à une chaîne de tourbillons plus petits jusqu'au plus petit où la dissipation de l'énergie en chaleur a lieu. L'échelle à partir de laquelle l'énergie est dissipée en chaleur a été caractérisée par Kolmogorov, comme fonction de la viscosité du milieu et de la puissance massique dissipée [Joshi *et al.* 1995, Kunas 1990, Papoutsakis 1991]. Croughan *et al.* ont montré que la destruction cellulaire était corrélée à la taille des plus petits tourbillons formés [Croughan *et al.* 1987].

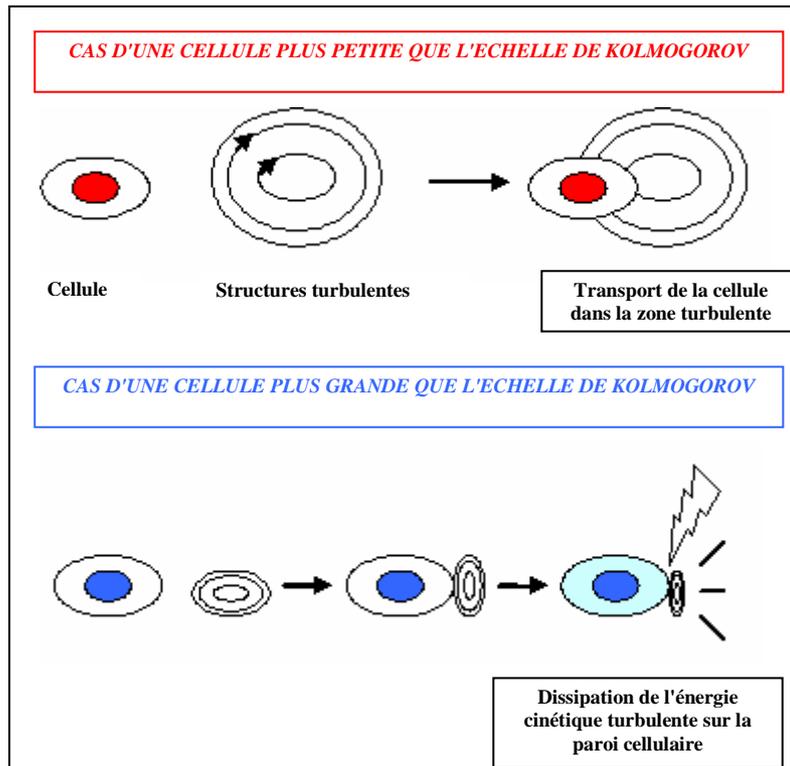


Figure 59 : Influence de l'échelle de Kolmogorov sur les cellules

Les interactions fluide-particule en régime turbulent dépendent des tailles relatives des micro-échelles de Kolmogorov et des particules. Lorsque que les cellules sont plus petites que l'échelle de Kolmogorov, elles sont entraînées sans subir de contraintes. Au contraire, les cellules, subissant une dissipation d'énergie au niveau de leur membrane, sont endommagées (l'échelle de Kolmogorov similaire ou inférieure à la taille de la cellule) (Figure 59).

4.2.1.2. Influence de la vitesse d'agitation

L'augmentation de la vitesse d'agitation a un impact négatif sur la croissance cellulaire. On peut notamment noter que plus la vitesse d'agitation est élevée, plus l'échelle de Kolmogorov diminue et risque d'atteindre une dimension inférieure à celle de la cellule (Figure 59).

Les dommages cellulaires dans un bioréacteur agité apparaissent à des vitesses d'agitation de 150-350 rpm, selon les paramètres cellulaires mis en jeu (lignée, type de bioréacteur...). Ils sont principalement dus à la formation d'un vortex entraînant des bulles. Son impact peut être minimisé en augmentant le volume de culture (diminution profondeur vortex), permettant ainsi le travail à de plus fortes vitesses d'agitation. [Kunas *et al.* 1990, Al-Rubeai *et al.* 1995].

Le comportement de cellules sous forte agitation a été étudié par Al-Rubeai *et al.* [Al-Rubeai *et al.* 1995] afin de distinguer les dommages dus aux contraintes hydrodynamiques de ceux induits par le milieu ou les variations physiologiques. En culture discontinue de cellules murines hybridomes (sans "gas sparging"), ils ont montré que l'augmentation de la vitesse d'agitation de 100 à 600 rpm entraîne une baisse de la densité cellulaire et de la viabilité (*Figure 54a*), la proportion de cellules apoptotiques augmentant avec la vitesse d'agitation (*Figure 54b*). L'origine de l'apoptose a été attribuée aux contraintes hydrodynamiques, les nutriments n'étant pas limitants durant la culture et les métabolites toxiques en quantité insuffisante pour contribuer à la mort cellulaire. Des cellules nécrotiques aussi apparaissent, indiquant une mort passive due à la perte de l'intégrité membranaire.

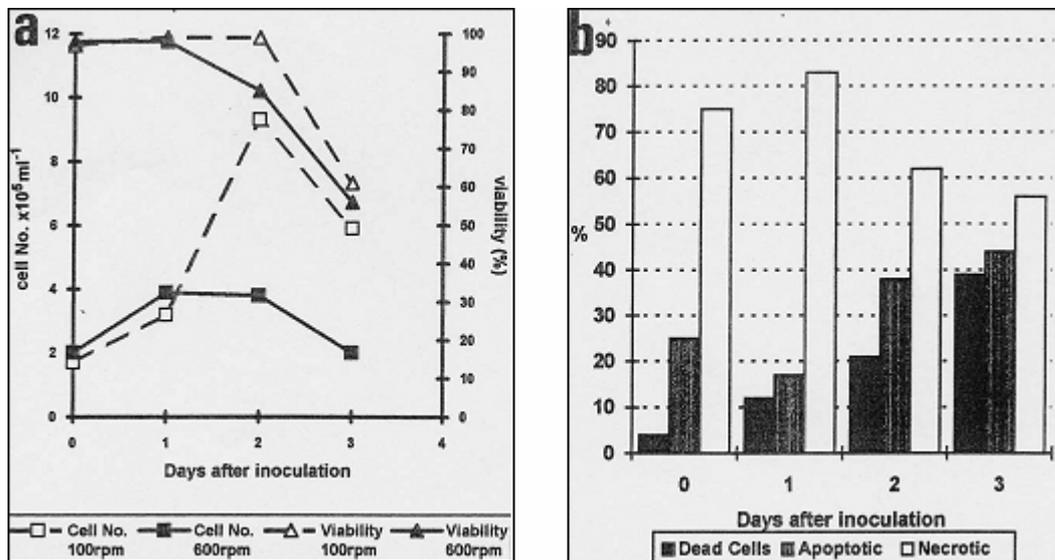


Figure 60 : Effet de l'augmentation de l'agitation en culture batch [Al-Rubeai *et al.* 1995]

A très forte agitation (1500 rpm), la densité cellulaire diminue tandis que la viabilité reste constante (*Figure 61*). Il est supposé que cela est le résultat de la destruction rapide des cellules dans un environnement dissipant une énorme énergie, c'est-à-dire que le taux de destruction est égal au taux auquel les cellules viables deviennent non viables.

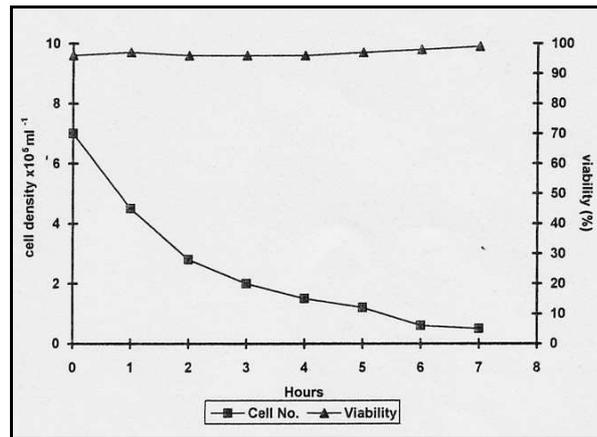


Figure 61 : Effet de l'agitation intensive (1500 rpm) sur la densité cellulaire et la viabilité (bleu trypan= pas de prise en compte de la lyse) [Al-Rubeai et al. 1995]

Remarque : Il semblerait qu'il existe une relation apparente entre le cycle cellulaire et la susceptibilité de la cellule à mourir par stress hydrodynamique : les cellules en phase S ou G2(4n) seraient plus sensibles aux contraintes que celles en G1(2n) [Al-Rubeai et al. 1995].

4.2.1.3. Mesure des niveaux de cisaillements

Les cellules animales sont cultivées dans des systèmes agités tels que les spinners ou des bioréacteurs agités. Etant données les différentes configurations de réacteurs (agitateurs...), il est difficile de tirer des conclusions sur les niveaux de cisaillement auxquels sont soumises les cellules. Des expériences de culture cellulaire peuvent alors être réalisées en bioréacteurs de type Couette-Taylor, permettant le contrôle des contraintes de cisaillement, afin d'étudier l'effet du cisaillement sur les cellules [Begley et al. 2000, Cowger et al. 1999, O'Connor et al. 2002, Sun et al. 1999, Haut et al. 2003, Curran et al. 2004].

Il existe différentes méthodes de mesure des flux et ainsi des gradients de vitesse. Les vitesses doivent être mesurées à différents points du réacteur afin d'obtenir le profil de vitesse complet. Différentes méthodes anémométriques sont utilisées dans ce but :

- Méthodes photographiques ;
- Anémomètre à pellicule chauffante ;
- Méthodes électrochimiques ;
- Anémomètre Doppler à laser (LDA).

Il existe certaines difficultés à corréler la taille des tourbillons à leur rôle dans les altérations cellulaires. Des corrélations obtenues à base de données expérimentales ont été établies [Joshi 1996].

4.2.2. Influence de l'aération

Choisir et dimensionner un bioréacteur approprié, dépendant des caractéristiques de la cellule, demande de comprendre les environnements complexes hydrodynamique, nutritionnel et physico-chimique, qui affectent les cellules. Dans les réacteurs agités, les cellules ne sont pas simplement soumises à des contraintes de cisaillement mais plutôt à un environnement hydrodynamique complexe généré par la turbulence. L'utilisation de "gas sparging" ou de l'entraînement de bulles peut générer un environnement encore plus contraignant pour les cellules. [Chisti 2000, Meier *et al.* 1999, Wu 1995(a), Wu *et al.* 1995(b)]. Cependant, malgré cela, les bioréacteurs aérés restent le moyen préféré de culture cellulaire car l'aération est une méthode robuste de fournir l'oxygène, particulièrement à grande échelle [Chisti 2000].

Les différentes lignées cellulaires sont plus ou moins sensibles à la présence de bulles dans le milieu de culture. Il s'avère que les petites bulles (diamètre < 2mm) sont plus endommageantes que les plus grosses (≈ 10 mm). Cependant, l'étendue des dommages cellulaires est aussi directement liée au taux d'aération. Bien que l'agitation mécanique sous conditions typiques de culture n'endommage pas les cellules en suspension en l'absence de bullage, les dommages liés à un bullage peuvent être augmentés par l'agitation, particulièrement si celle-ci rompt les bulles de gaz. Le cas d'une turbine Rushton a été étudié en culture de cellules d'insectes Sf9 en culture sans sérum (*Figure 62* et *Figure 63*) [Chisti 2000, Cruz *et al.* 1998].

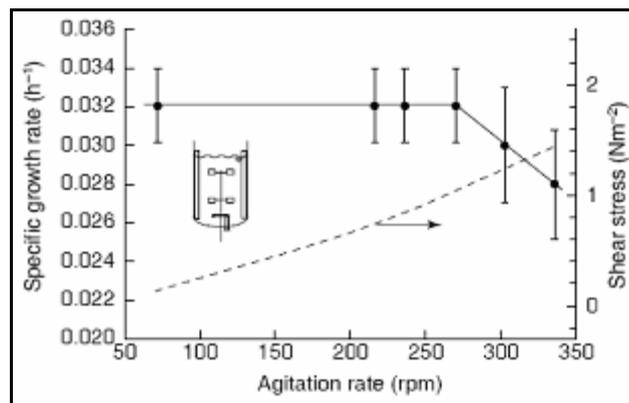


Figure 62 : Effet de l'agitation de la turbine sur le taux de croissance spécifique
Le taux spécifique de croissance est indépendant du taux d'agitation jusqu'à 270 rpm.
Pour des vitesses plus élevées, le taux de croissance diminue.

A la vitesse la plus élevée, plus de 97 % des cellules restent viables pendant 24h [Cruz *et al.* 1998]

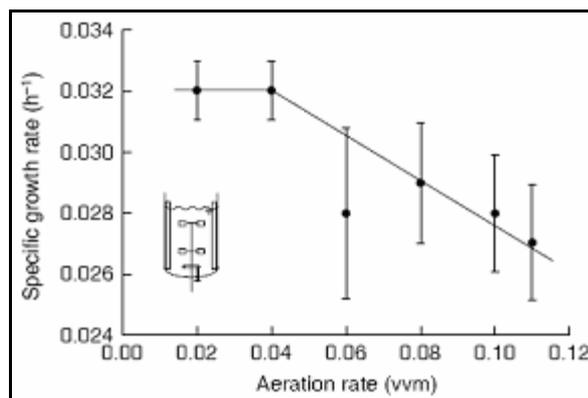


Figure 63 : Effet du taux d'aération sur le taux de croissance spécifique
 Pour une vitesse d'agitation constante (200 rpm), le taux de croissance spécifique diminue à partir d'un taux d'aération de 0,04 vvm [Cruz et al. 1998]

Les évènements spécifiques responsables des dommages des cellules liés aux bulles sont la formation des bulles au niveau du "sparger", le détachement des bulles, l'ascension dans le fluide, la rupture dans le milieu et à la surface. Les cellules semblent s'attacher plus facilement aux bulles dont le diamètre leur est proche voire similaire [Boulton-Stone *et al.* 1993, Garcia-Briones *et al.* 1994]. L'éclatement des bulles à la surface semble être cependant, la cause majeure de mortalité cellulaire. La rupture des petites bulles endommage plus sérieusement les cellules que la rupture des grosses bulles. Selon la loi de Laplace, la différence de pression de part et d'autre de l'interface est inversement proportionnelle au rayon de courbure, ainsi supérieure pour des bulles de faible diamètre et responsable de la formation subséquente d'un jet de liquide (*Figure 64*) [Chisti 2000, Handa-Corrigan *et al.* 1989, Wu 1995(a), Wu *et al.* 1995(b)].

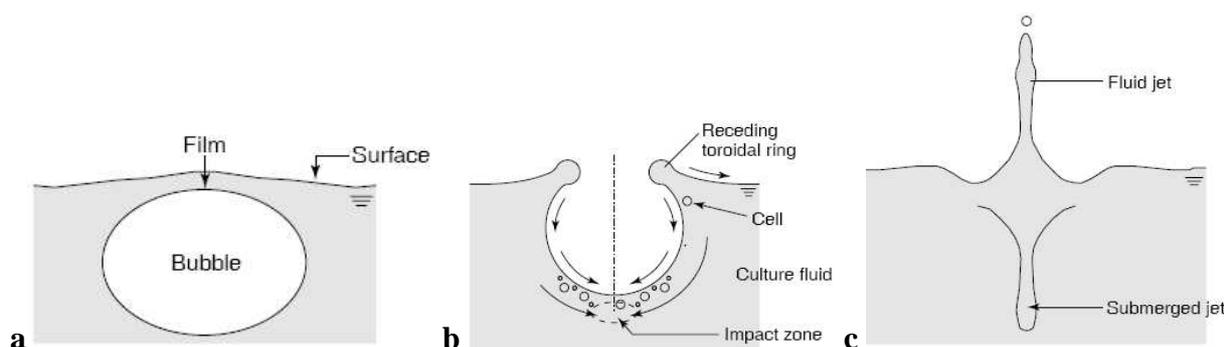


Figure 64 : Les différentes étapes de la rupture d'une bulle à la surface [Chisti 2000]

4.2.3. Conclusion

Selon Papoutsakis [Papoutsakis 1991], les dommages cellulaires dans les bioréacteurs agités sont dus à deux mécanismes de mécanique des fluides dépendant de l'intensité de l'agitation. Le

premier est présent à des vitesses d'agitation assez faibles seulement en présence de phase gazeuse et est associé à la formation de vortex, accompagné de l'entraînement et de la rupture de bulles. Le second prévaut en l'absence de vortex et d'entraînement de bulles et à des vitesses élevées ; dans ce cas, les dommages sont dus au stress dans le liquide turbulent et corrélés à la taille de l'échelle de Kolmogorov similaire ou plus faible que la taille cellulaire (*Figure 59*) [Oh *et al.* 1989, Murhammer *et al.* 1990].

L'entraînement de bulles pouvant être diminué ou supprimé en jouant sur le design ou la position de l'agitateur et/ou l'utilisation de chicanes, les altérations des cellules peuvent être réduites même à de très fortes agitations. Différents additifs peuvent être ajoutés au milieu pour la protection cellulaire (*cf.* § 4.3.1. *Supplémentation du milieu*) [Papoutsakis 1991].

Sous des niveaux de contraintes de cisaillement sublétaux, le métabolisme et la croissance sont modulés par les réponses biologiques de la cellule. Sous des conditions d'agitation plus fortes, la consommation de glucose et l'activité mitochondriale augmentent [Al-Rubeai *et al.* 1990, Abu-Reesh *et al.* 1989, Abu-Reesh *et al.* 1991]. Le taux d'agitation affecte aussi la synthèse de l'ADN chez les cellules CHO. Le cisaillement a aussi un effet sur la structure de la cellule. En effet, on observe la rupture de filaments d'actine du cytosquelette qui augmente la sensibilité de la cellule aux contraintes.

4.3. Prévention de la mort cellulaire en bioréacteur

L'optimisation de la culture de cellules animales est essentielle pour améliorer le rendement de la production des biopharmaceutiques. Différentes approches sont possibles permettant de minimiser et prévenir la mort cellulaire, telles que la supplémentation du milieu, le choix d'une stratégie génétique ou du type de bioréacteur employé [Arden *et al.* 2004, Arden *et al.* 2006].

4.3.1. Supplémentation du milieu

Le déclenchement de l'apoptose étant souvent lié aux conditions extracellulaires, l'une des stratégies peut être de modifier le milieu pour augmenter la viabilité à travers l'ajout de

nutriments ou de peptides, de produits anti-apoptotiques ou protecteurs des cellules [Arden *et al.* 2004].

4.3.1.1. Additifs de milieu sans sérum

Le sérum est souvent un bon agent anti-apoptotique à chaque étape du cycle cellulaire, à la suite d'un épuisement en nutriments. Cependant, la croissance cellulaire en milieu sans sérum est souvent requise lors de cultures à grande échelle de cellules de mammifères, afin d'éviter toute contamination (prion...). D'autres additifs peuvent être utilisés.

La suramine est une naphtylurée polysulfatée qui protège les cellules CHO durant la phase exponentielle de croissance. Contrairement au sérum, la suramine ne protège pas les cellules durant la phase de mort apoptotique, indiquant que des composés anti-apoptotiques inconnus sont présents dans le sérum [Zhanghi *et al.* 2000]. La transferrine joue un rôle important dans le transport du fer, élément essentiel dans la croissance cellulaire. L'insulin growth-like factor-I (IGF-I) peut remplacer l'insuline en tant que mitogène et inhibe l'apoptose de cultures cellulaires exposées à des stimuli inducteurs de mort cellulaire via les récepteurs IGF-I. Les lignées cellulaires surexprimant ce récepteur IGF-I et cultivées dans un milieu avec transferrine et insuline présentent une meilleure viabilité et un maintien de la croissance des cellules dans un milieu sans sérum [Sunstrom *et al.* 2000]. Choi *et al.* évoque l'effet inhibiteur de l'hémolymphe de ver à soie sur l'apoptose et le détachement de cellules adhérentes Hela [Choi *et al.* 2002]. Les antioxydants ont aussi un rôle protecteur efficace (N-acétylcystéine, Oh *et al.* 2005 ; Acide 2-phosphate L-ascorbique (VCP) et glutathion GSH, Yun *et al.* 2001].

4.3.1.2. Nutriments

L'alimentation en nutriments du milieu de culture est une autre méthode efficace pour prévenir l'apoptose. L'apoptose est induite en l'absence de glutamine et de galactose pour les cellules VERO et CHO. Des études ont montré que la présence de ces éléments dans le milieu protégeait les cellules de l'apoptose [Mendonça *et al.* 2002, Sanfeliu *et al.* 1999].

Une concentration élevée en acides aminés peut permettre de protéger les cellules de différents stress environnementaux, tels que l'augmentation de la pression partielle en CO₂, l'hyperosmolarité ou le manque de nutriments. Ainsi, l'ajout de glycine, bétaïne, asparagine ou thréonine à des cellules hybridomes ou CHO, restaure la croissance de ces cellules exposées à ces stress [deZengotita *et al.* 2002].

4.3.1.3. Additifs interrompant la cascade apoptotique

Une autre approche dans la prévention de l'apoptose est l'ajout d'additifs interrompant la cascade apoptotique. Les caspases, activées par protéolyse, participant au déclenchement de l'apoptose, peuvent être inhibées à l'aide de substances telles que Ac-DEVD-cho (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde) et z-VAD-fmk (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone), qui suppriment le programme apoptotique chez des cellules hybridomes privées de glutamine [Tinto *et al.* 2002]. L'utilisation de combinaisons de ces inhibiteurs de caspases prolonge la viabilité des cellules cultivées sous des conditions d'épuisement en nutriments [Vives *et al.* 2003]. Etant donnée la diversité des stimuli pouvant induire l'apoptose, l'inhibiteur de caspase à utiliser peut différer selon l'inducteur. La mort par appauvrissement du milieu est retardée plus facilement à l'aide d'un inhibiteur de la caspase 8, z-IEDT-fmk (benzyloxycarbonyl-Ile-Glu-Thr-Asp-fluoromethyleketone). Dans le cas de la mort induite par l'étoposide, l'inhibiteur de la caspase 9, Z-LEHD-fmk (benzyloxycarbonyl-Leu-Glu-His-Asp-fluoromethyleketone) est le plus efficace [Sauerwald *et al.* 2003].

L'utilisation de ces inhibiteurs ne procure cependant pas une cytoprotection totale car l'on observe tout de même des dysfonctionnements au niveau de la mitochondrie, de l'exposition de la phosphatidylsérine, de la perméabilisation de la membrane plasmique et de la perte du potentiel clonogénique (= Pouvoir que possède une cellule à se différencier et à proliférer, en présence de facteurs solubles adéquats, pour donner naissance à un clone de cellules matures identiques) [Perfettini *et al.* 2003]. Ainsi, Goswami *et al.* observent que l'ajout de z-VAD.fmk prévient le clivage des substrats caspasiques mais ne protège pas de la mort cellulaire [Goswami *et al.* 1999]. L'ajout de rapamycine présente une alternative. Elle est efficace dans la limitation de l'apoptose en induisant l'arrêt de la cellule en phase G1 ; la mort cellulaire est retardée de 48h et la production d'anticorps monoclonal est plus que doublée [Balcarcel *et al.* 2001].

4.3.1.4. Protecteurs des contraintes hydrodynamiques

Différents additifs protecteurs sont utilisés dans le cadre de la protection des cellules vis-à-vis des contraintes hydrodynamiques. Ils appartiennent à deux groupes, soit des matériels bioactifs tels que le sérum, les protéines, les lipides, soit des polymères neutres (dérivés de cellulose, surfactant Pluronic). Les matériaux bioactifs jouent un rôle nutritif tandis que les polymères interviennent sur les propriétés physiques du milieu de culture (tension de surface, viscosité...).

Le sérum de foetus bovin (FBS) [Elias *et al.* 1995], le polyéthylène glycol, la méthylcellulose, le surfactant Pluronic F68 [Al-Rubeai *et al.* 1993] et le dextran [Zhang *et al.* 1995] ont, en général, un effet positif sur les cellules en augmentant le taux de croissance et la viabilité. Leur bénéfice dépend tout de même des conditions de culture. Wu décrit les processus (interactions air-liquide) de protection de polymères tels que les polyols pluronic, la méthylcellulose et le polyéthylène glycol [Wu *et al.* 1995(a)] et Chisti réalise une revue concernant ces additifs [Chisti 2000].

Remarque importante : Les protecteurs d'origine animale (type sérum...) ne sont plus utilisables pour des raisons de présence éventuelle de prion.

4.3.2. Stratégies génétiques

De récentes stratégies génétiques se sont avérées efficaces pour retarder l'apparition de l'apoptose dans les cultures de cellules mammaliennes. Certaines protéines virales et cellulaires inhibent l'apoptose à des points distincts des différentes voies apoptotiques. L'expression des gènes codant pour ces protéines peut souvent modifier la réponse par mort cellulaire des cellules en culture [Arden *et al.* 2004].

4.3.2.1. Bcl-2, Bcl-x_L et XIAP et variants

Les facteurs Bcl-2 et Bcl-x_L sont des protéines anti-apoptotiques, qui inhibent la libération par la mitochondrie de molécules pro-apoptotiques. Les cellules CHO, NSO, BHK et hybridomes transfectées avec le gène codant pour la facteur Bcl-2 voient leur viabilité augmentée et leur robustesse améliorée, en comparaison avec les cellules non modifiées, en cas de manque de sérum, glucose, glutamate, asparagine, et autres nutriments et après une exposition à une toxine, à une infection virale ou à une autre condition défavorable [Arden *et al.* 2006, Charbonneau *et al.* 2003, Chung *et al.* 1998, Ishaque *et al.* 1998, Goswami *et al.* 1999, Fusseneger *et al.* 2000, Jung *et al.* 2002, Mastrangelo *et al.* 2000(a), Mastrangelo *et al.* 2000(b), Meents *et al.* 2002, Perani *et al.* 1998, Simpson *et al.* 1998, Tey *et al.* 2000(a), Tey *et al.* 2000(b), Tey *et al.* 2004, Vives *et al.* 2003].

L'expression du gène codant pour le facteur Bcl-x_L semble aussi efficace pour inhiber l'apoptose chez les cellules CHO et BHK [Chiang *et al.* 2005, Figueroa *et al.* 2004, Kim *et al.* 2002, Mastrangelo *et al.* 2000(a), Mastrangelo *et al.* 2000(b), Sauerwald *et al.* 2006].

Les caspases peuvent également être inhibées en utilisant une stratégie génétique qui interfère avec leur activation. L'inhibiteur de l'apoptose lié à l'X (X-linked inhibitor of apoptosis = XIAP) est un inhibiteur des caspases -3, -9 et -7 qui agit en aval de Bcl-2 et Bcl-x_L sur la voie de l'apoptose. Il a été montré que l'expression de XIAP recombinant augmente la viabilité de cellules CHO et de rein d'embryon humain (HEK 293) en culture [Arden *et al.* 2006, Komiyama *et al.* 1994, Sauerwald *et al.* 2002, Sauerwald *et al.* 2003, Sauerwald *et al.* 2006, Vives *et al.* 2003].

Des gènes variants de ces trois protéines, Bcl-2, Bcl-xL et XIAP, ont été comparés aux gènes sauvages chez les lignées cellulaires BHK, CHO et HEK-293. Ils peuvent également être utilisés pour limiter la réponse apoptotique [Arden *et al.* 2004, Arden *et al.* 2006, Figueroa *et al.* 2001, Figueroa *et al.* 2003, Sauerwald *et al.* 2002].

4.3.2.2. Protéines virales

Plusieurs protéines virales (Adenovirus, HIV-1, Herpes virus associé au sarcome de Kaposi, virus de l'hépatite B, Epstein-Barr...) stabilisent la membrane mitochondriale et ciblent certains membres de la famille Bcl-2, p53. Les protéines virales peuvent ainsi réguler l'apoptose au niveau de la transition mitochondriale [Boya *et al.* 2003]. Avec l'objectif de produire des lignées de cellules hybridomes de plus en plus robustes, les homologues viraux de la protéine Bcl-2, ksbc1-2 (herpes virus associé au sarcome de Kaposi) ou bhfr-1 (Epstein-Barr), ont été utilisés en combinaison avec des stimuli apoptotiques pour évaluer leur efficacité. Les cellules exprimant bhfr-1 permettent une meilleure protection contre l'apoptose induite par un déficit en glutamine [Jung *et al.* 2002]. Auparavant, il a également été montré que le gène adénoviral E1B19K fournissait une protection contre l'apoptose de cellules NSO exposées à des stimuli apoptotiques [Arden *et al.* 2006, Mercille *et al.* 1999(a)].

4.3.2.3. Hsp70

Les protéines de la famille hsp70 fonctionnent en tant que chaperones moléculaires impliquées dans le repliement, le transport et la dégradation de protéines. De plus, la protéine hsp70 protège les cellules d'agents cytotoxiques variés et de stimuli apoptotiques. La surexpression de ces protéines dans les cellules de myélome NSO, retarde l'apoptose de 24 heures [Arden *et al.* 2006, Lasunskaja *et al.* 2003].

4.3.2.4. Humanine et Bax

La protéine Bax, protéine pro-apoptotique, subit un changement conformationnel qui conduit à sa translocation du cytosol à la mitochondrie, et à la libération du cytochrome-c. L'expression hétérologue d'humanine (HN), peptide interférant dans l'activation de la protéine Bax, bloque des stimuli particuliers de la mort cellulaire [Arden *et al.* 2006, Guo *et al.* 2003].

4.3.2.5. Potentiel mitochondrial

Le potentiel mitochondrial de certaines lignées semble également avoir une influence sur la viabilité et la productivité cellulaire. Follstad a montré que des cultures de cellules hybridomes, à haut potentiel mitochondrial, présentent une meilleure viabilité mais une production d'anticorps monoclonal plus faible [Follstad *et al.* 2002]. Un subclone de cellules CHO à faible potentiel mitochondrial présente une plus faible consommation des substrats énergétiques (glucose et glutamine) et une production de lactate, ainsi qu'un taux de croissance plus fort par rapport aux cellules à haut potentiel mitochondrial. Par ailleurs, la production spécifique en anticorps monoclonal est améliorée [Hinterkörner *et al.* 2007].

4.3.2.6. Conclusion

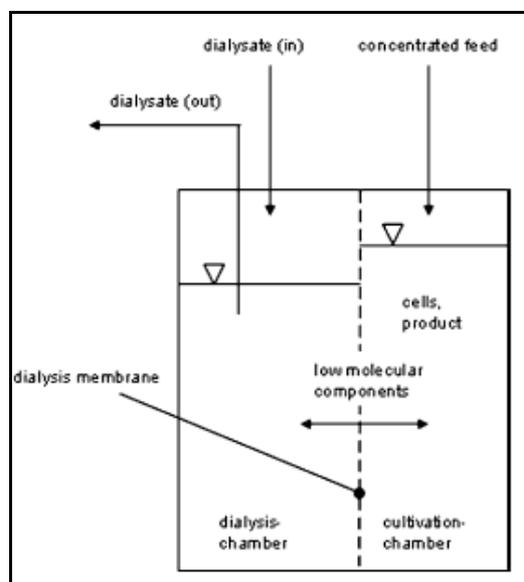
L'expression de gènes anti-apoptotiques a un effet significatif sur la survie des cellules de mammifères en culture. Une question importante à se poser concerne des conséquences éventuelles de ces modifications sur le produit final.

Plusieurs études nous indiquent que l'expression des gènes anti-apoptotiques est plus efficace lorsque l'élément limitant la productivité est la viabilité [Lasunskaja *et al.* 2003, Meents *et al.* 2002, Mercille *et al.* 1999(b), Tey *et al.* 2000(a), Tey *et al.* 2000(b)]. Dans des cultures semi-continues ("fed-batch") à court terme, cette méthode ne semble pas être très avantageuse puisque les viabilités restent importantes. Cependant, dans les expériences en culture fed-batch ou perfusion plus longues, l'amélioration de la viabilité peut s'avérer significative chez des cellules animales modifiées pour exprimer des gènes anti-apoptotiques [Mercille *et al.* 1999(b), Tey *et al.* 2000(a), Tey *et al.* 2000(b)]. L'intérêt de l'expression de ces gènes anti-apoptotiques augmente avec l'importance des stress internes et externes capables d'activer la cascade apoptotique [Al-Rubeai 1997, Al-Rubeai *et al.* 1998(b), Laken *et al.* 2001].

4.3.3. Technologie du bioréacteur

Les premiers paramètres sur lesquels il est possible d'intervenir pour améliorer la viabilité cellulaire, sont ceux caractérisant le mélange du milieu, tels que la géométrie de l'agitateur et la vitesse d'agitation. Il convient de déterminer les conditions permettant un mélange adéquat du milieu tout en limitant les cisaillements et ainsi l'endommagement cellulaire. La qualité des surfaces (rugosité...) en contact avec les cellules est également un critère non négligeable.

Le mode d'alimentation du réacteur peut être étudié afin d'optimiser la croissance cellulaire. Les métabolites produits par les cellules durant la culture, peuvent inhiber la croissance cellulaire. Ils peuvent s'accumuler jusqu'à atteindre des niveaux toxiques. L'utilisation d'une membrane de dialyse afin d'éliminer les substances de bas poids moléculaire peut améliorer significativement les performances du procédé. Les métabolites diffusent à travers la membrane (dialysat) suivant le gradient de concentration (*Figure 65*). Les molécules de fort poids moléculaire, telles que les anticorps monoclonaux, sont retenues avec les cellules, ce qui permet également d'enrichir le produit. Le milieu est souvent utilisé comme dialysat pour éliminer les métabolites et fournir les nutriments aux cellules [Frahm *et al.* 2003].



*Figure 65 : Schématisation du procédé dialyse semi-continue [Frahm *et al.* 2003]*

Par ailleurs, des solutions au manque de nutriments sont les procédés semi-continus ("fed-batch") ou perfusé mais les cellules restent sensibles à l'apoptose même si celle-ci est retardée [DeZengotita *et al.* 2000, Arden *et al.* 2006]. En effet, soit un nutriment critique non identifié

manque encore, soit d'autres inducteurs conduisent à l'apoptose dans ce mode de culture [Laken *et al.* 2001]. Ainsi, l'adoption de ces modes d'alimentation seule ne peut suffire à éliminer complètement les contraintes auxquelles sont soumises les cellules. Des dispositions telles que celles citées précédemment doivent être également mise en place (stratégies génétiques...).

Le mode d'aération de la culture est aussi un paramètre sur lequel on peut intervenir en vue de limiter les dommages dus aux bulles. Le "design" du réacteur et le système d'aération peuvent être adaptés. Par exemple, un bioréacteur, limitant l'ascension des bulles vers la surface et ainsi leur rupture, a été étudié pour diminuer les dommages et la mort des cellules (*Figure 66*). Le gaz est diffusé au pied du tube interne. Les bulles n'atteignent pas la surface, ne pouvant s'élever à contre courant dans le tube interne. Selon Sucker *et al.*, la croissance cellulaire de cellules hybridomes et leur production d'anticorps monoclonal dans ce dispositif se sont avérées similaires à celles obtenues dans des cultures à aération en surface [Chisti 2000, Sucker *et al.* 1994].

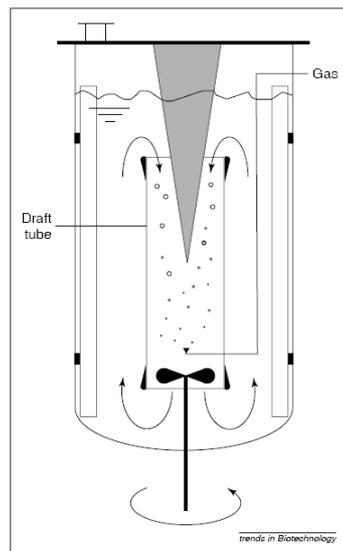


Figure 66 : Bioréacteur à lit de bulles
[Chisti 2000]

Les systèmes d'aération proprement dits ont également fait l'objet d'études dans le but de réaliser l'oxygénation du milieu sans émission de bulles, à l'aide de membranes poreuses hydrophobes polymériques (polytétrafluoroéthylène (PTFE = Téflon), polypropylène, silicone) [Wagner *et al.* 1988, Schneider *et al.* 1995].

CONCLUSION

La culture en masse de cellules animales en bioréacteur présente de très nombreuses applications. Cette technique est de plus en plus explorée et employée notamment pour la production de molécules d'intérêts thérapeutiques.

Cependant, l'emploi de ces procédés biotechnologiques est soumis aux aléas liés à l'utilisation de matériel biologique. Les cellules sont fragiles et leurs métabolisme, morphologie, intégrité peuvent être modifiés par leur environnement biochimique et hydrodynamique. La mort cellulaire peut affecter ainsi le rendement protéique. Les deux types de mort cellulaire rencontrées sont l'apoptose et la nécrose dont la survenue est influencée par les conditions de culture. Les principales causes sont le manque de nutriments, la présence de métabolites toxiques et les contraintes hydrodynamiques induites par l'agitation et l'aération.

Dans cette revue bibliographique, nous avons passé en revue la plupart des techniques permettant de caractériser et quantifier la mort cellulaire telles que la microscopie, l'électrophorèse et la cytométrie en flux. Nous avons également présentés certains dispositifs mis au point afin d'automatiser la numération et l'évaluation de la viabilité cellulaire.

Différentes stratégies de protection des cellules sont disponibles. Tout d'abord, le choix du bioréacteur et du mode de culture est important. Il est également possible d'agir au niveau de la cellule en modifiant génétiquement les lignées cellulaires pour surexprimer des protéines anti-apoptiques (Bcl-2, Bcl-x_L). Des additifs, possédant des propriétés nutritives ou protectrices du point de vue hydrodynamique, ou encore inhibitrices de la cascade apoptotique, peuvent être utilisés pour compléter le milieu de culture. Des modifications technologiques peuvent également être mises en œuvre. En effet, le mode de culture (renouvellement milieu de culture...), les systèmes d'agitation (maîtrise des contraintes hydrodynamiques...) et d'aération peuvent être adaptés à la nature et aux besoins des cellules employées.

Le développement intensif de la culture cellulaire à l'échelle industrielle, a ainsi donné lieu à la recherche et à l'élaboration de nouveaux outils permettant de mieux appréhender les phénomènes de mort cellulaire et d'améliorer leur prévention.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abu-Reesh I., Kargi F. : **Biological responses of hybridoma cells to defined hydrodynamic shear stress**, J. Biotechnol 1989, 9 : 167-178

Abu-Reesh I., Kargi F. : **Biological responses of hybridoma cells to hydrodynamic shear in an agitated bioreactor**, Enz. Microb. Technol. 1991, 13 : 913-919

Adolphe M., Barlovatz-Meimon G., Guillouzo C., Ronot X. : **Culture de cellules animales**, Paris : INSERM, 2003, 898 p

Al-Rubeai M, Mills D., Emery A.N. : **Electron microscopy of hybridoma cells with special regard to monoclonal antibody production**, Cytotechnology 1990, 4 (1) : 13-28

Al-Rubeai M., Oh S.K.W., Musaheb R., Emery A.N. : **Modified cellular metabolism in hybridomas subjected to hydrodynamic and other stresses**, Biotechnol. Lett. 1990(b), 12 : 323-328

Al-Rubeai M., Emery A.N., Chalder S., Goldman M.H. : **A flow cytometric study of hydrodynamic damage to mammalian cells**, J. Biotech. 1993, 31 : 161-177

Al-Rubeai M., Singh R.P., Goldman M.H., Emery A.N., **Death Mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation**, Biotechnol. Bioeng. 1995, 45 : 463-472

Al-Rubeai M., Emery A.N. : **Flow Cytometry Applications in Cell Culture**
New-York : Marcel Dekker Inc., 1996, 331 p

Al-Rubeai M. : **Apoptosis and cell culture technology**, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 1997, 59 : 225-249

Al-Rubeai M. : **Apoptosis**, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 1998(a), 62, 193 p

Al-Rubeai M. , Singh R.P. : **Apoptosis in cell culture**, Curr. Opin. Biotech. 1998(b), 9 : 152-156

Altamirano C. : **Improvement of CHO cell culture medium formulation : Simultaneous substitution of glucose and glutamine**, Biotechnol. Prog. 2000, 16 : 69-75

Arden N., Betenbaugh M.J. : **Life and death in mammalian cell culture : strategies for apoptosis inhibition**, Trends Biotechnol. 2004, 22 : 174-180

Arden N., Betenbaugh M.J. : **Regulating apoptosis in mammalian cell cultures**, Cytotechnology 2006, 50 : 77-92

Arends M.J., Wyllie A.H. : **Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology**, Int. Rev. Exp. Pathol. 1991, 32 : 223-254

B

Balcarcel R.R. et al. : **Rapamycin reduces hybridoma cells death and enhances monoclonal antibody production**, Biotechnol. Bioeng. 2001, 76 : 1-10

Barry M.A., Reynolds J.E., Easunan A. : **Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification**, Cancer Res. 1993, 53 : 2349-2357

Begley C.M., Kleis S.J. : **The fluid dynamic and shear environment in the NASA/JSC rotating-wall perfused-vessel bioreactor**, Biotech. Bioeng. 2000, 70(1) : 32-40

Belloc F., Belaud-Rotureau M.A., Lavignolle V., Bascans E., Braz-Pereira E., Durrieu F., Lacombe F. : **Flow cytometry detection of caspase 3 activation in preapoptotic leukemic cells**, Cytometry 2000, 40 : 151-160

Bicknell G.R., Cohen G.M. : **Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis**, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995, 207 : 40-47

Boc R., Gjertsen B.T., Vintermyr O.K., Houge G., Lanotte M., Deskeland S.O. : **The protein phosphatase inhibitor okadric acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells**, *Exp. Cell. Res.* 1991, 195 : 237-246

Born C. Et al. : **Estimation of disruption of animal cells by laminar shear stress**, *Biotechnol. Bioeng.* 1992, 40 : 1004-1010

Borner, C. : **The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions**, *Mol. Immunol.* 2003, 39 : 615-47.

Bortner C.D., Cidlowski, J.A. : **Cellular mechanisms for the repression of apoptosis**, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002, 42 : 259-81.

Bouix M., Leveau J.Y. : **Les applications de la cytométrie en flux en microbiologie**, *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 2001, 16 (3) : 210-18.

Boulton-Stone J.M., Blake J.R. : **Gas bubbles bursting at a free surface**, *J. Fluid Mech.* 1993, 254 : 466-473

Boya P. et al. : **Mitochondrion-targeted apoptosis regulators of viral origin**, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2003, 304 : 575-581

Bretscher M.S. : **Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes**, *Nature New Biol.* 1972, 236 : 11-12

Brookes P.S., Yoon Y., Robotham J.L., Anders M.W., Sheu S.S. : **Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle**, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004, 287, C817-833

Bryson G.J., Harmon B.V., Collins R.J. : **A flow cytometric study of cell death ; failure in some models to correlate with morphological assessment**, *Immunol. Cell. Biol.* 1994, 72 : 35-41

C

Carbonari M., Cibati M., Cherchi M., Sbarigia D., Pesce A.M., Dell'Anna L., Modica A., Fiorilli M. : **Detection and characterization of apoptotic peripheral blood lymphocytes in human immunodeficiency virus infection and cancer chemotherapy by a novel flow immunocytometric method**, *Blood* 1994, 83 : 1268-1277

Caron, Leslie L.A., Cidlowski J.A. : **Similar actions of glucocorticoids and calcium on the regulation of apoptosis in S49 cells**, *Mol. Endocrinol.* 1991, 5 : 1169-1179

Casy Technology : http://www.casy-technology.com/downloads/download_index_en.html, page visitée en décembre 2007

Cellule apoptotique: <http://fmc.med.univ-tours.fr/Pages/INSERM/Cours/herault.pdf>, page visitée en Avril 2006

Chae I., Park K., Kim H., Oh B. : **Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells**, *Clin. Chim. Acta* 2004, 341 : 83-91

Chang K.H., Kim K.S., Kim J.H. : **N-acetylcysteine increases the biosynthesis of recombinant EPO in apoptotic CHO cells**, *Free Rad. Res.* 1999, 30 : 85-91

Chao D.T. et al. : **Bcl-x_L and Bcl-2 repress a common pathway of cell death**, *J. Exp. Med.* 1995, 182 : 821-828

Charbonneau J.R. et al. : **Bcl-x_L expression interferes with the effect of L-glutamine supplementation on hybridoma cultures**, *Biotechnol. Bioeng.* 2003, 81 : 279-290

Chemometec : **Principe de la méthode de numération des cellules mortes et totales du Nucleocounter**, <http://www.chemometec.com/sw2521.asp>, site visité en novembre 2007

Cherry R.S., Papoutsakis E.T. : **Hydrodynamic effects on cells in agitated tissue culture reactors**, *Bioproc. Eng.* 1986, 1 : 29-41

Cherry R.S., Papoutsakis E.T. : **Understanding and controlling fluid mechanical injury of animal cells in bioreactors**, *Anim. Cell Biotechnol.* 1990, 4 : 71-121

Chiang G.G., Sisk W.P. : **Bcl-X_L mediates increased production of humanized monoclonal antibodies in Chinese Hamster Ovary cells**, *Biotechnol. Bioeng.* 2005, 91 (7) : 779-792

Chinnaiyan A.M., Dixit V.M. : **The cell-death machine**, *Curr. Biol.* 1996, 6 : 555-562

Chisti Y. : **Animal-cell damage in sparged bioreactors**, *Trends Biotechnol.* 2000, 18 : 420-432

Choi Y.S., Lee D.Y., Kim I.C., Kang S., Ahn K., Kim H.J., Jeong Y.H., Chun G.T., Park J.K., Kim I.H. : **Ammonia removal using hepatoma cells in mammalian cell cultures**, *Biotechnol. Prog.* 2000, 16 : 760-768

Choi S.S., Rhee W.J., Park T.H. : **Inhibition of human cell apoptosis by silkworm hemolymph**, *Biotechnol. Prog.* 2002, 18 : 874-878

Chung J.D. et al. : **Growth factor and Bcl-2 mediated survival during abortive proliferation oh hybridoma cell line**, *Biotechnol. Bioeng.* 1998, 57 : 164-171

Cleary M.L., Smith S.D., Sklar, J. : **Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2 immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation**. *Cell* 1986, 47 : 19-28

Cohn G.M., Sun X.M., Snowden R.T., Dinsdale D., Skilleter D.N. : **Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation**, *Biochem. J.* 1992, 286 : 331-334

Compton M.M., Cidlowski J.A. : **Rapid in vivo effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid**, *Endocrinology* 1986, 118 : 38-45

Compton M.M. : **Development of an apoptosis endonuclease assay**, *DNA Cell Biol.* 1991, 10 : 133-141

Cossarizza A., Baccarani Contri M., Kalashnikova G., Franceschi C. : **A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1)**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, 197 : 40-45

Cowger N.L., O'Connor K.C., Hammond T.G., Lacks D.J., Navar G.L. : **Characterization of bimodal cell death of insect cells in a rotating-wall vessel and shaker flask**, *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 64(1) : 14-26

Croughan M.S., Hamel J.F., Wang D.I.C. : **Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures**, *Biotechnol. Bioeng.* 1987, 29 : 130-141

Cruz, P.E. *et al.* : **Optimization of the production of virus-like particles in insect cells**, *Biotechnol. Bioeng.* 1998, 60 : 408-418

Cudna R.E., Dickson A.J. : **Endoplasmic reticulum signaling as a determinant of recombinant protein expression**, *Biotechnol. Bioeng.* 2003, 81 : 56-65

Curran S.J., Black R.A. : **Quantitative experimental study of shear stresses and mixing in progressive flow regimes within annular-flow bioreactor**, *Chem. Eng. Science* 2004, 59(24) : 5859-5868

Cytomètre en flux : <http://acces.inrp.fr/acces/equipes/dyna/travaux/bioscience/dynacell/dynacell%20plone/outils/winmdi/images/cytometre.gif>, page visitée en octobre 2007

D

Darzynkiewicz Z., Bruno S., Del Bino G., Gorczyca W., Hotz M.A., Lassota P., Traganos F. : **Features of apoptotic cells measured by flow cytometry**, *Cytometry* 1992, 13 : 795-808

Degterev, A., Boyce, M. & Yuan, J. : **A decade of caspases**, *Oncogene* 2003, 22 : 8543-8567

DeZengotita V.M., Miller W.M., Aunins J.G., Zhou W. : **Phosphate feeding improves high cell concentration in NSO myeloma culture performance for monoclonal antibody production**, *Biotechnol. Bioeng* 2000, 69 : 566-576

DeZengotita V.M et al. : **Selected amino acids protect hybridoma and CHO cells from elevated carbon dioxide and osmolality**, *Biotechnol. Bioeng.* 2002, 78 : 741-752

DiPietrantonio A.M., Hsieh T., Wu J.M. : **Activation of Caspase 3 in HL-60 Cells Exposed to Hydrogen Peroxide**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 255 : 477-482

Dive C., Gregory C.D., Philipp D.J., Evans D.L., Milner A.E., Willye A.H. : **Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry**, *Biochim. Biophys. Acta* 1992, 1133 : 275-285

Dong Z., Saikumar P., Weinberg J. M., Venkatachalam M. A. : **Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases**, *Am. J. Pathol.* 1997, 151 : 1205-1213

Drane P., Alvarez S., Meiller A., May A. : **L'activation de la protéine p53, un événement déterminant de la réponse cellulaire aux radiations ionisantes**, *Médecine nucléaire – Imagerie fonctionnelle et métabolique* 2002, 26 (3) : 139-147

Drugmand J.C. : **Characterization of insect cell lines is required for appropriate industrial processes : case study of high-five cells for recombinant protein production**, 228 p
Th. : Sciences agronomiques et ingénierie biologique : Université Catholique de Louvain : 2007

Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X. : **Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition**, *Cell* 2000, 102 : 33-42

Duval E., Wyllie A.H. : **Death and the cell**, *Immunology Today* 1986, 7 : 115-19.

E

Endresen P.C., Prytz P.S., Aarbakke J. : **A New Flow Cytometric Method for Discrimination of Apoptotic Cells and Detection of Their Cell Cycle Specificity Through Staining of F-Actin and DNA**, *Cytometry* 1995, 20:162-171

Elias C.B. et al. : **Turbulent shear stress – Effect on mammalian cell culture and measurement using laser doppler anemometer**, *Chem. Eng. Sci.* 1995, 50 (15) : 2431-2440

Emery A.N., Jan D.C., Al-Rubeai M. : **Oxygenation of intensive cell-culture systems**, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995, 43 : 1028-1033

Endersen P.C., Prytz P.S., Aarbakke J. : **New flow cytometric method for discrimination of apoptotic cells and detection of their cell cycle specificity through staining of F-actin and DNA**, *Cytometry* 1995, 20(2) : 162-171

F

Faccinetti A., Tessarollo L., Mazzochi M., Kingston R., Collavo D., Biasi G. : **An improved method for the detection of DNA fragmentation**, *J. Immunol. Methods* 1991, 136 : 125-131

Ferlini C., Di Cesare S., Rainaldi G., Malorni W., Samoggia P., Biselli R., Fattorossi A. : **Flow cytometric analysis of the early phases of apoptosis by cellular and nuclear techniques**, *Cytometry* 1996, 24 : 106-115

Figueroa B. Jr et al. : **Comparison of Bcl-2 to a Bcl-2 deletion mutant for mammalian cells exposed to culture insults**, *Biotechnol. Bioeng.* 2001, 73 : 211-222

Figueroa B. Jr et al. : **A comparison of the properties of bcl-x_L variant to the wild-type anti-apoptosis inhibitor in mammalian cell cultures**, *Metab. Eng.* 2003, 5 : 230-245

Figueroa B. Jr et al. : **Aven, and Bcl-X_L enhance protection against apoptosis for mammalian cells exposed to various culture conditions**, *Biotechnol. Bioeng.* 2004, 85 (6) : 589-600

Fischer B. : **Etude de la signalisation cellulaire de l'apoptose induite par différents types de rayonnements ionisants dans des cellules lymphoblastoïdes humaines différant par leur statut p53**
Th. : Sciences du vivant : Université Louis Pasteur Strasbourg : 2004 ; 201

Follstad B.D. et al. : **Mitochondrial membrane potential selects hybridomas yielding high viability in fed-batch cultures**, Biotechnol. Bioeng. 2002, 18 : 1-5

Fragmentation internucléosomale : http://idg.u-strasbg.fr/PDFcours/cours_JCA_2006.pdf, page consultée en octobre 2007

Frahm B., Lane P., Märkl H., Pörtner R., **Improvement of a mammalian cell culture process by adaptative, model-based dialysis fed batch cultivation and suppression of apoptosis**, Bioprocess. Biosyst. Eng. 2003, 26 : 1-10

Freshney R.I. : **Culture of animal cells, a manual of basic technique**
Hoboken, New Jersey : John Wiley & Sons, 2005, 642 p

Frey T. : **Nucleic acid dyes dor detection of apoptosis in live cells**, Cytometry 1995, 21 : 265-274

Fries S., Glazomitsky K., Woods A., Forrest G., Hsu A., Olewinski R., Robinson D., Chartrain M. : **Evaluation of disposable bioreactors**, BioProcess International Supplement Octobre 2005 : 36-44

Fusseneger M. Et al. : **Regulated overexpression of the survival factor bcl-2 in CHO cells increases viable cell density in batch culture and decreases DNA release in extended fixed bed cultivation**, Cytotechnology 2000, 32 : 45-61

G

Garcia-Briones, M.A. et al. : **Computer simulations of the rupture of a gas bubble at a gas-liquid interface and its implications in animal cell damage**, Chem. Eng. Sci. 1994, 49 : 2301-2320

Gardner A.R., Gainer J.L., Kirwan D.J. : **Effects of stirring and sparging on cultured hybridoma cells**, Biotechnol. Bioeng., 1990, 35(7) : 940-947

Gething M. J., Sambrook J. : **Protein folding in the cell**, Nature 1992, 355 : 33-45

Gregory C.D., Dive C., Henderson S., Smith C.A., Williams G.T., Gordon J., Rickinson A.B. : **Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis**, Nature 1991, 349(6310) : 612-614.

Goergen J.L., Marc A., Engasser J.M. : **Determination of cell lysis and death kinetics in continuous hybridoma cultures from the measurement of lactae deshydrogenase release**, Cytotechnology 1993, 11 : 189-195

Golstein P. : **Controlling cell death**, Science 1997, 275(5303) : 1081

Goswami J., Sinskey A.J., Steller H., Stephanopoulos G.N., Wang D.I.C. : **Apoptosis in batch cultures of chinese hamster ovary cells**, Biotechnol. Bioeng. 1999, 62 (6) : 632-640

Guo B. et al. : **Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation**, Nature 2003, 423 : 456-460

Gurtu V., Kain S.R., Zhangl G : **Fluorometric and Colorimetric Detection of Caspase Activity Associated with Apoptosis**, Anal. Biochem. 1997, 251: 98-102

H

Handa-Corrigan A., Emery A.N., Spier R.E. : **Effect of the gas liquid interfaces on the growth of suspended mammalian cells ; mechanisms of cell damage by bubbles**. Enz. Microbiol. Technol. 1989, 11 : 230-235

Han Kyu Oh et al. : **Effect of N-acetylcystein on butyrate-treated chinese hamster ovary cells to improve the production of recombinant human interferon- β 1a**, Biotechnol. Prog. 2005, 21 : 1154-1164

Harding C.L., Lloyd D.R., McFarlane C.M., Al-Rubeai M. : **Using the Microcyte flow cytometer to monitor cell number, viability, and apoptosis in mammalian cell culture**, Biotechnol. Prog. 2000, 16 : 800-802

Haut B., BenAmor H., Coulon L., Jacquet A., Halloin V. : **Hydrodynamics and mass transfer in a Couette-Taylor bioreactor for the culture of animal cells**, Chem. Eng. Sci. 2003, 58 : 777-784

Hawerkamp A. : **Automated trypan blue method for optimal cell viability determination**, Am. Biotechnol. Lab. 2001, 19(2) : 50-52

Hinterkörner G., Brugger G., Müller D., Hesse F., Kunert R., Katinger H., Borth N. : **Improvement of the energy metabolism of recombinant CHO cells by cell sorting for reduced mitochondrial membrane potential**, J. Biotechnol. 2007, 129 : 651-657

I

Inaba N., Sato N., Ijichi M., Fukazawa I., Nito A., Takamizawa H., Luben G., Bohn H. : **The immunocytochemical location of two membrane-associated placental tissue proteins in human and cynomolgus monkey placenta**, Tumor Biol. 1984, 5 : 75-85

Incidence lumière : <http://lbbc1.cep.u-psud.fr/cours%20M1/BAO/cours%20CMF.ppt>, page visitée en mai 2006

Ishaque A., Al-Rubeai M. : **Use of intracellular pH and annexinV flow cytometric assays to monitor apoptosis and its suppression by bcl-2 over-expression in hybridoma cell culture**, J. Immunol. Methods 1998, 221 : 43-57

J

Jayaraman S. : **Intracellular determination of activated caspases (IDAC) by flow cytometry using a pancaspase inhibitor labeled with FITC**, Cytometry PartA 2003, 56A : 104-122

Jendrossek I. et al. : **Intracellular mediators of erulcylphosphocholine-induced apoptosis**, Oncogene 2003, 22 : 2621-2631

Joshi J.B., Elias C.B., Patole M.S. : **Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells**, Chem. Eng. J. 1996, 62 : 121-141

Jung D. et al. : **Inducible expression of bcl-x_L restricts apoptosis resistance to the antibody secretion phase in hybridoma cultures**, Biotechnol. Bioeng. 2002, 79 : 180-187

K

Kaufman R.J. : **Orchestrating the unfolded protein response in health and disease**, J. Clin. Invest. 2002, 110 : 1389-1398

Keane J.T., Ryan D., Gray P.P. : **Effect of shear stress on expression of a recombinant protein by Chinese Hamster Ovary cells**, Biotechnol. Bioeng. 2003, 81 (2) : 211-220

Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. : **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics**, Br. J. Cancer 1972, 26(4):239-57

Kim N.S. et al. : **Response of recombinant Chinese Hamster Ovary cells to hyperosmotic pressure : effect of Bcl-2 overexpression**, J. Biotechnol. 2002, 95 : 237-248

Komiyama T. et al. : **Inhibition of interleukin-1 β converting enzyme in the cowpox virus serpin Crma**, J. Biol. Chem. 1994, 269 : 19331-19337

Koopman G., Reutlingsperger C.P.M., Kuijten G. A. M., Keehnen R. M. J., Pals S. T., van Oers M. H. J. : **Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserin expression on B cells undergoing apoptosis**, Blood 1994, 84 : 1415-1420

Krause A. W., Carley W.W., Webb W.W. : **Fluorescent erythrosin B is preferable to trypan blue as a vital exclusion dye for mammalian cells in monolayer culture**, J. Histochem. Cytochem. 1984, 32(10) : 1084-1090

Kumar S. : **The Bcl-2 family of proteins and activation of the ICE-CED-3 family of proteases: a balancing act in apoptosis ?** , Cell Death Diff. 1997, 4(1): 2-3

Kunas K.T., Papoutsakis E.T. : **Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment**, Biotechnol. Bioeng. 1990, 36 : 476-483

Kwok S.M., Ham W., McGowan M.A., Ohashi R., Otero J.M., Hamel J-F. P. : **Evaluation of the Automated Cell Density Examination System (Cedex®)**, Boston : 224th ACS National meeting, August 22nd 2002 : http://www.innovatis.com/pdf/download/publications/Poster_MIT_ACS-2002_1.pdf

L

Laken H.A., Leonard M.W. : **Understanding and modulating apoptosis in industrial cell culture**, Curr. Opin. Biotechnol. 2001, 12 : 175-179

Lakhotia S., Bauer K.D., Papoutsakis E.T. : **Damaging agitation intensities increase DNA synthesis rate and alter cell-cycle phase distributions of CHO cells**, Biotechnol. Bioeng. 1992, 40 : 978-990

Lao M.S., Toth D. : **Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant CHO cell culture**, Biotechnol. Prog. 1997, 13 : 688-691

Lasunskaja E.B. et al : **Transfection of NSO myeloma fusion partner cells with hsp70 gene results in higher hybridoma yield by improving cellular response to apoptosis**, Biotechnol. Bioeng. 2003, 81 : 496-504

Lecoeur, H., Gougeon, M.L. : **Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons. Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes**, J. Immunol. Methods 1996, 198 (1) : 87.

Lecoeur H., de Oliveira-Pinto L.M., Gougeon M.L. : **Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical events associated with apoptosis and using the 7-aminoactinomycin D assay**, J. Immunol. Methods 2002(a), 265 : 81-96

Lecoeur H. : **Nuclear apoptosis detection by flow cytometry : Influence of endogenous endonucleases**, Exp. Cell Res. 2002(b), 277 : 1-14

Lee G.M., Huard T.K., Kaminski M.S., Palsson B.O. : **Effect of mechanical agitation on hybridoma cell growth**, Biotechnol. Lett. 1988, 10 : 625-628

Lengwehasatis I. Et al. : **Analysis of the role of GADD153 in the control of apoptosis in NSO myeloma cells**, Biotechnol. Bioeng. 2002, 80 : 719-730

Li J., Eastman A. : **Apoptosis in an IL-2-dependent cytotoxic T lymphocyte cell line is associated with intracellular acidification: Role of the Na⁺/H⁺-antiport**, J. Biol. Chem. 1995, 270:3203-3211

Li G.C., Werb Z. : **Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982, 79 : 3218-3222.

Liston P., Roy N., Tamai K., Lefebvre, C. Baird S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean M., Ikeda, J. E., MacKenzie A., Korneluk, R. G. : **Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes**, Nature 1996, 379 : 349-353

Lorenzo H.K., Susin S.A., Penninger J., Kroemer G. : **Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death**, Cell Death Diff. 1999, 6(6) : 516-524

Los, M., Wesselborg, S., and Schulze-Osthoff, K. : **The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice**. Immunity 1999, 10 : 629-39.

M

Maillet M., **Biologie cellulaire**

Paris : Masson, 2000, 500 p, collection Abrégés

Martin S.J., Bradley J.G., Cotter T.G. : **HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis**, Clin. Exp. Immunol. 1990, 448-453

Mastrangelo A.J., Zou S., Hardwick J.M., Betenbaugh M.J. : **Antiapoptosis chemicals prolong productive lifetimes of mammalian cells upon Sindbis virus vector infection**, Biotechnol. Bioeng. 1999, 65 : 298-305

Mastrangelo (a) A.J. et al. : **Bcl-2 and Bcl-x_L limit apoptosis upon infection with alphavirus**, Biotechnol. Bioeng. 2000, 67 : 544-554

Mastrangelo (b) A.J. et al. : **Overexpression of bcl-2 family members enhances survival of mammalian cells in response to various culture insults**, Biotechnol. Bioeng. 2000, 67 : 555-564

Meents H. et al. : **Impact of coexpression and coamplification of sICAM and anti-apoptosis determinants, bcl-2 and bcl-x_L, on productivity, cell survival, and mitochondria number in CHO-DG44 grown in suspension and serum free media**, Biotechnol. Bioeng. 2002, 80 : 706-716

Meier S.J., Hatton T.A., Wang D.I.C. : **Cell death from bursting bubbles : role of cell attachment to rising bubbles in sparged bioreactors**, Biotechnol. Bioeng. 1999, 62 : 468-478

Mendonça R.Z., et al. : **Metabolic active-high density VERO cell cultures on microcarriers following apoptosis prevention by galactose/glutamine feeding**, J. Biotechnol. 2002, 97 : 13-22

Mercille S., Massie B. : **Induction of apoptosis in hybridoma and myeloma cells**, Biotechnol. Bioeng. 1994, 44 : 1140-1154

Mercille (a) S. et al. : **Dose dependent reduction of apoptosis in nutrient limited cultures of NSO myeloma cells transfected with the E1B-19K adenoviral gene**, Biotechnol. Bioeng. 1999, 63 : 516-528

Mercille (b) S. et al. : **Apoptosis resistant E1B-19K-expressing NSO myeloma cells exhibit increased viability and chimeric antibody productivity under perfusion culture conditions**, Biotechnol. Bioeng. 1999, 63 : 529-543

Mosmann T. : **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays**, J. Immunol. Methods 1983, 65(1-2) : 55-63

Moore A. et al. : **Apoptosis in CHO cell batch cultures : examination by flow cytometry**, Cytotechnology 1995, 17 : 1-11

Morana S., Li J., Springer E.W., Eastman A. : **The inhibition of etoposide induced apoptosis by zinc is associated with modulation of intracellular pH**, Int. J. Oncol. 1994, 5153-158

Mouratidis P.X.E., Colston K.W., Dalglish A.G. : **Doxycycline induces caspase-dependent apoptosis in human pancreatic cancer cells**, Int. J. Cancer 2006, 120, 743-752

Mower D.A., Peckham D.W., Illera V.A., Fishbaugh J.K., Stunz L.L., Ashman R.F. : **Decreased membrane phospholipid packing and decreased cell size precede DNA cleavage in mature mouse B cell apoptosis**, J. Immunol. 1994, 152, 4832-4842

Murhammer D.W., Goochee C.F. : **Sparged animal cell bioreactor: Mechanism of cell damage and Pluronic F-68 protection**, Biotechnol. Prog., 1990, 6 : 391-397

N

Nagata S. : **Apoptosis by death factor**, Cell 1997, 88 : 355-365

New Brunswick Scientific : http://www.nbsc.com/bioflopro_cc.aspx, page consultée en mars 2008

Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C., Grignani F., Riccardi C. : **A simple and rapid method for measuring thymocytes apoptosis by propidium iodide and flow cytometry**, J. Immunol. Methods 1991, 139 : 271-279

Nollert et al. : **Hydrodynamic shear stress and mass transport modulation of endothelial cell metabolism**, Biotechnol. Bioeng. 1991, 38 : 588-602

O

Oberhammer F., Fritsch, G, Pavelka M., Froschl G., Tiefenbacher R., Purchio T., Schultehermann R. : **Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in the regressing liver by transforming growth factor-beta 1 occurs without activation of an endonuclease**, *Toxicol. Lett.* 1992, 64-65 : 701-704

O'Connor K.C., Papoutsakis E.T. : **Agitation effects on microcarrier and suspension CHO cells**, *Biotechnol. Tech.* 1992, 6 : 323-328

O'Connor K.C., Cowger N.L., DeKee D.C.R., Schwarz R.P. : **Prolonged shearing of insect cells in a couette bioreactor**, *Enz. Microb. Technol.* 2002, 31 : 600-608

Oh S.K.W., Nienow A.W., Al-Rubeai M., Emery A.N : **The effects of agitation intensity with and without continuous sparging on the growth and antibody production of hybridoma cells**, *J. Biotechnol.* 1989, 12(1) : 45-62

Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer, S.J. : **Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death**, *Cell* 1993, 74 : 609-619

Ormerod M.G., Sun X.M., Snowden R.T., Davies R., Fearhead H., Cohen G. : **Increased membrane permeability of apoptotic thymocytes: A flow cytometric study**, *Cytometry* 1993, 14 : 595-602

Orrenius S. : **Mitochondrial regulation of apoptotic cell death**, *Toxicol. Lett* 2004, 149 : 19-23.

Ouellet, M. : **Analyse fonctionnelle d'homologues végétaux de Bax Inhibitor-1 et développement d'un modèle de mort cellulaire programmée induite par Bax chez des cultures cellulaires de *Nicotiana tabacum***, 130 p
Maîtrise Biochimie : Université Laval Québec : 2004 ; 6

P

Papoutsakis E.T., Kunas K.T. : **Hydrodynamic effects on cultured hybridoma cells CRL 8018 in an agitated bioreactor**, *Advances in Animal Cell Biology and Technology for Bioprocesses* 1989 : 203-208

Papoutsakis E.T. : **Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors**, *Tibtech* 1991, 9 : 427-437

Parsell D. A., Lindquist S. : **The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins**, *Annu. Rev. Genet.* 1993, 27 : 437-96.

Patil C., Walter P. : **Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: unfolded protein response in yeast and mammals**, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2001, 13 : 349-355

Payne C.M., Cromey D.W. : **An image analysis workstation designed for multiple users: Application of quantitative digital imaging techniques to electron microscopy**, *Ultrastruct. Pathol.* 1992, 12 : 147-154

Perani A. et al. : **Variable functions of bcl-2 in mediating stress-induced apoptosis in hybridoma cells**, *Cytotechnology* 1998, 28 : 177-188

Perfettini J.L. et al. : **Caspase activation is not death**, *Nat. Immunol.* 2003, 4 : 308-310

Perreault J., Lemieux R. : **Essential role of optimal protein-synthesis in preventing the apoptotic death of cultured B-cells hybridomas**, *Cytotechnology* 1994, 13 : 99-105

Polster B.M., Fiskum G. : **Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis**, *J. Neurochem.* 2004, 90 : 1281-1289.

Poot M., Gibson L.L., Singer V.L. : **Detection of apoptosis in live cells by MitoTracker TM Red CMXRos and SYTO dye flow cytometry**, *Cytometry* 1997, 27 : 358-364

Poot M., Pierce R. H. : **Detection of Changes in Mitochondrial Function During Apoptosis by Simultaneous Staining With Multiple Fluorescent Dyes and Correlated Multiparameter Flow Cytometry**, *Cytometry* 1999, 35 : 311-317

Poulin L. : **Etude de la relation structure-fonction de la protéine BI-1 chez les *Saccharomyces cerevisia***, Maîtrise en biochimie : Université Laval Québec : 2005 ; 11

Protéines de mort : <http://pages.infinet.net/apoptose/generalite.html#necrose>, page consultée en avril 2006

R

Racher A.J., Looby D., Griffiths J.B. : **Use of lactate deshydrogenase to assess changes in culture viability**, Cytotechnology 1990, 3 : 301-307

Rathmell J. C., Thompson C. B. : **The central effectors of cell death in the immune system**. Annu. Rev. Immunol. 1999, 17 : 781-828

Reed J.C. : **Mechanisms of apoptosis**, Am. J. Pathol. 2000, 157 : 1415-1430

Renner W.A., Lee K.H., Hatzimanikatis V., Bailey J.E. : **Recombinant cyclin E expression activates proliferation and obviates surface attachment of Chinese Hamster Ovary (CHO) cells in protein-free medium**, Biotechnol. Bioeng. 1995, 47 : 476-482

Reynolds J.E., Li J, Eastman A. : **Detection of apoptosis by flow cytometry of cells simultaneously stained for intracellular pH (CarboxySNARF-1) and membrane permeability**, Cytometry 1996(a) 25 : 349-357

Reynolds J.E., Li J., Craig R.W., Eastman A. : **BCL-2 and MCL-1 expression in Chinese hamster ovary cells inhibits intracellular acidification and apoptosis induced by staurosporine**, Exp. Cell Res. 1996(b), 225 : 430-436

Ricci J.E., INSERM U526, Faculté de médecine de Nice

Les mécanismes moléculaires de l'apoptose, 2000 : <http://www.123bio.net/revues/jericci/iapoptose.html>

Roche : **Apoptosis and Cell Proliferation** : <https://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/index.jsp>, consultation juillet 2006

Ron D. : **Translational control in the endoplasmic reticulum stress response**, J. Clin. Invest. 2002, 110 : 1383-1388

Rosenthal A.L., Lacks S.A. : **Nuclease detection in SDS-polyacrilamide gel electrophoresis** , Anal. Biochem. 1977, 80 : 76-90

Rosl F. : **A simple and rapid method for detection of apoptosis in human cells**, Nucleic Acid Res. 1992, 20 : 5243

S

Saikumar P., Dong Z., Mikhailov V., Denton M., Weinberg J.M., Venkatachalam M.A. : **Apoptosis : definition, mechanisms, and relevance to disease**, Am. J. Med. 1999, 107 : 489-506

Sanfeliu A. et al. : **Effect of glutamine limitation on the death of attached Chinese Hamster Ovary cells**, Biotechnol. Bioeng. 1999, 64 : 46-53

Sartorius – Stedim, <http://www.sartorius-stedim.com/index.php?id=2016&L>, page visitée en décembre 2007

Sauerwald T.M. et al. : **Inhibiting apoptosis in mammalian cell culture using the caspase inhibitor XIAP and deletion mutant**, Biotechnol. Bioeng. 2002, 77 : 704-716

Sauerwald T.M., Oyler G.A., Betenbaugh M.J. : **Study of the caspase inhibitors for limiting death in mammalian cell culture**, Biotechnol. Bioeng. 2003, 81 : 329-340

Sauerwald T.M., Figueroa Jr. B., Hardwick J.P., Oyler G.A., Betenbaugh M.J. : **Combining caspase and mitochondrial dysfunction inhibitors of apoptosis to limit cell death in mammalian cell cultures**, Biotechnol. Bioeng. 2006, 94 : 362-372

- Schmid, I., Krall, W.J., Uittenbogaart, C.H., Braun, J., Giorgi, J.V. : **Dead cell discrimination with 7-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry**, *Cytometry* 1992, 13 (2), 204.
- Schmid I., Uttenbogaart C.H., Keld K., Giorgi J.V. : **A rapid method for measuring apoptosis and dual color immunofluorescence by single laser flow cytometry**, *J. Immunol. Methods* 1994, 170 : 145-157
- Schneider M., Reymond F., Marison I. W., von Stockar U. : **Bubble-free oxygenation by means of hydrophobic porous membranes**, *Enz. Microb. Technol.* 1995, 17(9) : 839-847
- Schürch U. et al. : **Experimental evaluation of laminar shear stress on the behaviour of hybridoma mass cell cultures, producing monoclonal antibodies against mitochondrial creatine kinase**, *J. Biotechnol.* 1988, 7 : 179-184
- Schwartzman R.A., Cidlowski J.A. : **Internucleosomal deoxyribonucleic acid cleavage activity in apoptotic thymocytes : Detection and endocrine regulation**, *Endocrinology* 1991, 128 : 1190-1197
- Sgonc R., Gruber J. : **Apoptosis detection : an overview**, *Exp. Gerontology* 1998, 33 (6) : 525-533
- Shah D., Naciri M., Clee P., Al-Rubeai M. : **NucleoCounter – an efficient technique for the determination of cell number and viability in animal cell culture process**, *Cytotechnology* 2006, 51 : 39-44
- Sharpe J.C., Arnoult D., Youle, R.J. **Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members**, *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1644 : 107-113
- Senger R.S., Karim M.N. : **Effect of shear stress on intrinsic CHO culture state and glycosylation of recombinant tissue-type plasminogen activator protein**, *Biotechnol. Prog.* 2003, 19 : 1199-1209
- Silins S.L., Sculley T.B. : **Burkitt's lymphoma cells are resistant to programmed cell death in the presence of the Epstein-Barr virus latent antigen**, *Int. J. Cancer.* 1995, 60(1) : 65-72
- Simpson N.H., Milner A.N., Al-Rubeai M : **Prevention of hybridoma cell death by bcl-2 during sub-optimal culture conditions**, *Biotechnol. Bioeng.* 1997, 54 : 1-16
- Simpson N.H., Singh R.P., Perani A., Goldenzon C., Al-Rubeai M. : **Deprivation of any single amino acid leads to the induction of apoptosis in hybridoma cultures, which is suppressed by the bcl-2 gene**, *Biotechnol. Bioeng.* 1998
- Simpson N.H. et al. : **In hybridoma culture, deprivation of any single amino acid leads to apoptotic death, which is suppressed by the bcl-2 gene**, *Biotechnol. Bioeng.* 1998, 59 : 90-98
- Sinacore M.S., Charlebois T.S., Harrison S., Brennan S., Richards T., Hamilton M., Scott S., Brodeur S. Oakes P., Leonard M. et al. : **CHO DUKX cell lineages preadapted to growth serum-free suspension culture enable rapid development of cell culture processes for the manufacture of recombinant proteins**, *Biotechnol. Bioeng.* 1996, 52, 518-528
- Singh R.P., Al-Rubai M., Gregory C.D., Emery A.N. : **Cell death in bioreactor : a role for apoptosis**, *Biotechnol. Bioeng.* 1994, 44 : 720-726
- Sitailo L.A. et al. : **Activation of caspase-9 is required for UV-induced apoptosis of human keratinocytes**, *J. Biol. Chem.* 2002, 277 : 19346-19352
- Smith G.J., Bagnell C.R., Bakewell W.E., Black K.A., Bouldin T.W., Earnhardt T.S., Hook G.E., Pryzwansky K.B. : **Application of confocal scanning laser microscopy in experimental pathology**, *J. Electron. Microsc. Technol.* 1991, 18 : 38-49
- Stankiewicz A.R., Lachapelle G., Foo C.P.Z., Radicioni S.M., Mosser D.D. : **Hsp70 Inhibits Heat-induced apoptosis Upstream of Mitochondria by Preventing Bax Translocation**, *J. Biol. Chem.* 2005, 280(46) : 38729-38739

Sucker H.G., Jordan M., Eppenberger H.M., Widmer F. : **Bubble bed reactor: a reactor design to minimize the damage of bubble aeration on animal cells**, *Biotechnol. Bioeng.* 1994, 44 : 1246-1254

Sun X.M., Snowden R.T., Skilleter D.N., Dinsdale D., Ormerod M.G., Cohen G.M. : **A flow cytometric method for the separation and quantification of normal and apoptotic thymocytes**, *Anal. Biochem.* 1992, 204 : 351-356

Sun X., Linden J.C. : **Shear stress effects on plant cell suspension cultures in a rotating wall vessel bioreactor**, *J. Indus. Microb. Biotech.* 1999, 22 : 44-47

Sunstrom N.A.S., et al. : **Insulin-like growth factor-I and transferrin mediate growth and survival of Chinese Hamster Ovary Cells**, *Biotechnol. Prog.* 2000, 16 : 698-702

Szabo S.E. : **Automating the Assessment of Cell Viability**, *Gen. Eng. News* 2003, 23(10)

Szabo S. E., Monroe S. L., Fiorino S., Bitzan J., Loper K. : **Evaluation of an Automated Instrument for Viability and Concentration Measurements of Cryopreserved Hematopoietic Cells**, *Laboratory Hematology* 2004, 10 : 109-111

T

Takahashi A., Earnshaw W.C. : **ICE-related proteases in apoptosis**, *Curr. Op. Gen. Dev.* 1996, 6 : 50-55

Telford W.G., King L.E., Fraker P.J. : **Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry**, *Cytometry* 1992, 13 : 137-143

Telford W.G., Komoriya A., Packard B.Z. : **Detection of localized caspase activity in early apoptotic cells by laser scanning cytometry**, *Cytometry* 2002, 47 : 81-88

Tey B.T. (a) et al. : **Influence of Bcl-2 on cell death during the cultivation of a Chinese Hamster Ovary cell line expressing a chimeric antibody**, *Biotechnol. Bioeng.* 2000, 68 : 31-43

Tey B.T. (b) et al. : **Bcl-2 mediated suppression of apoptosis in myeloma NSO cultures**, *J. Biotechnol.* 2000, 79 : 147-159

Tey B.T., Al-Rubeai M. : **Suppression of apoptosis in perfusion culture of myeloma NSO cells enhances cell growth but reduces antibody productivity**, *Apoptosis* 2004, 9 : 843-852

Tey B.T., Al-Rubeai M. : **Effect of Bcl-2 overexpression on cell cycle and antibody productivity in chemostat cultures of myeloma NSO cells**, *J. Biosci. Bioeng.* 2005, 100 (3) : 303-310

Thornberry N.A., Molineaux S.M. : **Interleukin-1- β converting enzyme: a novel cysteine protease required for IL-1- β production and implicated in programmed cell death**, *Protein Sci.* 1995, 4 : 3-12

Tinto A., Gabernet C., Vives J., Prats E., Cairo J.J., Cornudella L., Godia F. : **The protection of hybridoma cells from apoptosis by caspase inhibition allows culture recovery when exposed to non-inducing conditions**, *J. Biotechnol.* 2002, 95 : 205-214

Tramper J., Williams J.B., Joustra D. : **Shear sensitivity of insect cells in suspension**, *Enz. Microb. Technol.*, 1986, 8 : 33-36

Tsujimoto Y., Shimizu S. : **Bcl-2 family: life-or-death switch**, *FEBS Lett* 2000, 466 : 6-10

V

Van der Pol M.A., Broxterman H.J., Westra G., Ossenkoppele G.J., Schuurhuis G.J. : **Novel multiparameter flow cytometry assay using Syto16 for the simultaneous detection of early apoptosis and apoptosis-corrected P-Glycoprotein function in clinical samples**, *Cytometry Part B (Clinical cytometry)* 2003, 55B : 14-21

Van Engeland M., Nieland L.J.W., Ramaeckers F.C.S., Schutte B., Reutelingsperger C.P.M. : **Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure**, *Cytometry* 1998, 31 : 1-9

Vasilakos J.P., Lynch T., Ghayur T., Giegel D. A., Santoro M., Shivers B.D. : **Caspase-3/ CPP32-like activity is not sufficient to mediate apoptosis in an IL-2 dependent T cell line**, Apoptosis 1997, 2(3) : 289–303

Vaux D.L., Korsmeyer S.J. : **Cell death in development**, Cell 1999, 96, 245-254

Verhagen A. M., Ekert P. G., Pakusch M., Silke J., Connolly L. M., Reid G. E., Moritz R. L., Simpson R. J., Vaux D. L. : **Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins**, Cell 2000, 102 : 43-53

Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. : **A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V**, J. Immunol. Methods 1995, 184 : 39-51

Vives J. et al. : **Metabolic engineering of apoptosis in cultured animal cells : implications for the biotechnology industry**, Metab. Eng. 2003, 5 : 124-132

Voie mitochondriale : <http://corpo.acm.netasso.net/files/P1/Cours%20Apoptose%20Maudelonde.ppt>, page visitée en mai 2006

Voies apoptotiques : http://idg.u-strasbg.fr/PDFcours/cours_JCA_2006.pdf, page visitée en octobre 2007

W

Wagner R., Lehmann J. : **The growth and productivity of recombinant animal cells in a bubble-free aeration system**, Trends Biotechnol. 1988, 6(5) : 101-104

Wagner A., Marc A., Engasser J.M. : **The use of lactate dehydrogenase (LDH) release kinetics for the evaluation of death and growth of mammalian cells in perfusion reactors**, Biotechnol. Bioeng. 1992, 39: 320-326.

Wang L., Miura M., Bergeron L., Zhu H., Yuan J. : **Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death**, Cell 1994, 78 : 739-750

White C., Li C., Yang J., Petrenko N.B., Madesh M., Thompson C.B., Foskett J.K. : **The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-xL modulation in the InsP3R**, Nat. Cell. Biol. 2005, 7 : 1021-1028

Welsh J.P., Al-Rubeai M. : **The relationship between intracellular pH and cell cycle in cultured animal cells using SNARE-1 indicator**, dans Flow cytometry applications in culture, New-York : Marcel Dekker 1996, p 163-175

Wolf B.B., Green D.R. : **Apoptosis : letting slip the dogs of war**, Curr. Biol. 2002, 12 : R177-R179

Wu J. : **Mechanisms of animal cell damage associated with gas bubbles and cell protection by medium additives**, J. Biotechnol. 1995(a), 43 : 81-94

Wu J., Goosen M.F.A. : **Evaluation of the killing volume of gas bubbles in sparged animal cell culture bioreactors**, Enz. Microb. Technol. 1995(b), 17 : 241-247

Wulf E., Deboben A., Bautz F.A., Faulstich, Wieland T.H. : **Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1979, 76 : 4498-4502

Wyllie A.H. : **Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation**, Nature 1980(a), 284 : 555-556

Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R. : **Cell death : The significance of apoptosis**, Int. Rev. Cytol. 1980(b), 68:251-306

Wyllie A.H. : **Apoptosis: an overview**, Br. Med. Bull. 1997, 53 : 451-65

Y

Yang E., Korsmeyer S.J. : **Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death**, Blood 1996, 88 : 386-401

Z

Zha J., Weiler S., Oh K.J., Wei M.C., Korsmeyer S.J. : **Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis**, Science 2000, 290 : 1761-1765

Zhang Z. Et al. : **Effects of the hydrodynamic environment and shear stress peotectants on survival of erythrocytes in suspension**, J. Biotechnol. 1995, 43 : 33-40

Zanghi J.A., Fusseneger M., Bailey J.E. : **Serum protects protein-free competent CHO cells against apoptosis induced by nutrient depivation in batch culture**, Biotechnol. Bioeng. 1999, 64 : 108-119

Zanghi J.A., Renner W.A., , Bailey J.E., Fusseneger M. : **The growth factor inhibitor suramin reduces apoptosis and cell aggregation in protein-free CHO cell batch cultures**, Biotechnol. Prog. 2000, 16 : 319-325

Zong W.X., Li C., Hatzivassiliou G., Lindsten T., Yu Q.C., Yuan J., Thompson C.B. : **Bax and Bak can localize to the the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis**, J. Cell. Biol. 2003, 162 : 59-69

