



HAL
open science

Etudes cinétiques de la production d'anticorps monoclonaux anti-trichloroanisole par des cultures en masse d'hybridomes

Luc Marot

► **To cite this version:**

Luc Marot. Etudes cinétiques de la production d'anticorps monoclonaux anti-trichloroanisole par des cultures en masse d'hybridomes. Sciences pharmaceutiques. 2001. hal-01733762

HAL Id: hal-01733762

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733762v1>

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>

PN 2001/76
Double

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

2001

FACULTE DE PHARMACIE



**ETUDES CINÉTIQUES DE LA PRODUCTION D'ANTICORPS
MONOCLONAUX ANTI-TRICHLOROANISOLE PAR DES CULTURES
EN MASSE D'HYBRIDOMES**

DB 26274

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 21 décembre 2001

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Luc MAROT

Membres du Jury

Président : Mme Chantal Finance, Professeur

Juges : Mme Annie Marc, Directeur de Recherche au C.N.R.S
M. Jean-Louis Goergen, Chargé de Recherche au C.N.R.S
Mme Adèle Martial, Maître de Conférences L.R.G.I.A, Université C. Bernard de Lyon 1

BU PHARMA-ODONTOL



D

104 059867 5

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

2001



FACULTE DE PHARMACIE

**ETUDES CINETIQUES DE LA PRODUCTION D'ANTICORPS
MONOCLONAUX ANTI-TRICHLOROANISOLE PAR DES CULTURES
EN MASSE D'HYBRIDOMES**

DB 26279

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 21 décembre 2001

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Luc MAROT

Membres du Jury

Président : Mme Chantal Finance, Professeur

Juges : Mme Annie Marc, Directeur de Recherche au C.N.R.S
M. Jean-Louis Goergen, Chargé de Recherche au C.N.R.S
Mme Adèle Martial, Maître de Conférences L.R.G.I.A, Université C. Bernard de Lyon I

Membres du personnel enseignant 2001/2002

Doyen

Chantal FINANCE

Vice Doyen

Anne ROVEL

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Responsable de la filière officine

Gérald CATAU

Responsable de la filière industrie

Jeffrey ATKINSON

DOYENS HONORAIRES

M. BERNANOSE André

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mlle BESSON Suzanne

Mlle GIRARD Thérèse

M. LECTARD Pierre

M. MARTIN Jean-Armand

M. MIRJOLET Marcel

M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEURS EMERITES

M. HOFFMAN Maurice

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie cardiovasculaire
M	AULAGNER Gilles	Pharmacie clinique
M.	BAGREL Alain	Biochimie
Mle	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé publique
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Immunopathologie et organisation animale
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Mathématiques, physique et audioprothèse
Mle	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie clinique
M.	HENRY Max	Botanique, mycologie
M.	JACQUE Michel	Pharmacologie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie, orthopédie, Maintien à Domicile
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LEROY Pierre	Chimie
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique
M.	REGNOUF de VAINS Jean Bernard	Chimie Thérapeutique
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie, parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Biologie et pharmacologie moléculaire
M.	SIMON Jean Michel	Droit officinal, législation pharmaceutique
M.	VIGNERON Claude	Hématologie, physiologie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme GRISON Geneviève

Pratiques officinales

MAITRES DE CONFERENCES

Mme ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M. BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M. CATAU Gérald	Pharmacologie
M. CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. CHILLON Jean Marc	Pharmacologie
M. COLLIN Jean François	Santé publique
Mme COLLOMB Jocelyne	Parasitologie et Conseils vétérinaires
M. COULON Joël	Biochimie
M. DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M. DUCOURNEAU Joël	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Mme FAIVRE-FIORINA Béatrice	Hématologie
M. FERRARI Luc	Biochimie
Mle FONS Françoise	Biologie végétale et Mycologie
M. GANTZER Christophe	Virologie
M. GIBAUD Stéphane	Pharmacie Clinique
Mme HASENFRATZ-SAUDER Marie Paule	Mycologie - Botanique
Mle HINZELIN Françoise	Mycologie - Botanique
M. HUMBERT Thierry	Chimie organique
Mle IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
M. JORAND Frédéric	Santé et Environnement
Mme KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Communication scientifique – Communication et santé
Mme MARCHAND-ARVIER Monique	Hématologie
M. MENU Patrick	Physiologie
M. MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M. NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme PAULUS Francine	Informatique
Mme PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme PICHON Virginie	Biophysique
Mme POCHON Marie France	Chimie physique générale
Mme ROVEL Anne	Histologie - Physiologie
M. VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR AGREGE

M. COCHAUD Christophe

Anglais

ASSISTANTS

Mme BEAUD Mariette	Biologie Cellulaire
Mme BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M. DANGIEN Bernard	Mycologie
Mme MOREAU Blandine	Pharmacognosie - Phytothérapie
Mme PAVIS Annie	Parasitologie
M. TROCKLE Gabriel	Pharmacologie

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (L.S.G.C.) à Nancy, au sein du groupe Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires (G.P.B.A.), sous la direction de Madame Annie Marc, Directeur de Recherche au Centre National de Recherche Scientifique (C.N.R.S.). Je tiens à la remercier pour avoir assuré la direction scientifique de ce travail et pour l'intérêt qu'elle y a porté ainsi que pour ses suggestions et critiques tout au long de la rédaction de ce manuscrit.

J'exprime ma sincère reconnaissance à Madame le Professeur Chantal Finance, Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nancy, pour avoir accepté la présidence de ce jury. Qu'elle trouve ici l'assurance de ma gratitude.

Je remercie Madame Adèle Martial, Maître de Conférences au Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire (L.R.G.I.A.) de l'Université Claude Bernard de Lyon 1, pour sa précieuse collaboration et pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens également à remercier Monsieur Jean Louis Goergen, Chargé de Recherche au C.N.R.S., pour son aide technique et les conseils scientifiques qu'il m'a prodigués.

Un grand merci à toute l'équipe du G.P.B.A., en particulier à Bernard Pariset, Ingénieur d'étude, pour son aide constante tout au long de mes travaux, et à tous les membres de l'équipe « cellules animales » pour la qualité de leur accueil, leur dynamisme et leur aide efficace.

ABREVIATIONS

aa :	Acides aminés
aae :	Acides aminés essentiels
aae :	Acides aminés non essentiels
ACM :	Anticorps monoclonaux
BSA :	Albumine sérique bovine
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO :	Diméthyl sulfoxyde
ELISA :	Immuno-sorbent Enzyme Linked Assay
Glc :	Glucose
Gln :	Glutamine
HACCP :	Hazard Analysis Critical Control Point
HAM F12 :	Mélange nutritif de Ham
HAT :	Hypoxanthine - Aminoptérine - Thymidine
HGPRT :	Hypoxanthine - Guanine - Phosphoribosyl Transférase
IMDM :	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
Lac :	Lactate
MEM :	Milieu essentiel minimum
NH₄⁺ :	Ions ammonium
PEG :	Polyéthylène glycol
PBS :	Phosphate Buffered Saline solution
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PID :	Régulation Proportionnelle Intégrale Dérivée
RIA :	Radio Immuno Analyse
rpm :	Rotation par minute
RPMI :	Rosewell Park Memorial Institute (milieu)
SVF :	Sérum de Veau Foetal
TCA :	Trichloroanisole
TCBA :	Acide Trichloro-2,3,6-Benzoïque
Xv :	Cellules vivantes
Xm :	Cellules mortes
Xt :	Cellules totales (Xv+Xt)

Pour les acides aminés :

Ala :	Alanine
Arg :	Arginine
Asp :	Asparagine
Cys :	Cystéine
Glu :	Acide glutamique
Gly :	Glycine
His :	Histidine

Ile :	Isoleucine
Leu :	Leucine
Lys :	Lysine
Met :	Methionine
Phe :	Phénylalanine
Pro :	Proline
Ser :	Sérine
Thr :	Thréonine
Tyr :	Tyrosine
Val :	Valine

TABLE DES MATIERES



INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : BIBLIOGRAPHIE	4
I) Etude sur l'origine du « goût de bouchon » dans les vins	5
I.1) Origine du « goût de bouchon »	5
I.2) Origine des chloroanisoles	6
I.3) Prévention du « goût de bouchon »	7
II) Méthodes de détection rapide en microbiologie alimentaire	9
II.1) Microbiologie prévisionnelle	9
II.2) Méthodes immunologiques	11
II.3) Exemples de kits de détection rapide utilisant le test ELISA	14
III) Les anticorps monoclonaux	16
III.1) Définition des anticorps polyclonaux et monoclonaux	16
III.2) Caractéristiques des ACM	16
III.3) Difficultés d'obtention des ACM	16
III.4) Principe de production des ACM	17
III.5) Protocole expérimental de production des ACM	17
III.6) Production massive des hybridomes	19
IV) Système de culture en bioréacteur	20
IV.1) Mode discontinu (batch)	21
IV.2) Mode semi-continu (fed-batch)	22
IV.3) Mode continu avec ou sans système de rétention cellulaire	22
V) Conditions de culture	23
V.1) Conditions physico-chimiques	24
V.11) PH	24
V.12) Température	24
V.13) Oxygène dissous	25
V.2) Constituants des milieux de culture	25
V.21) Sources d'énergie	25
V.22) Facteurs trophiques de croissance	25
V.23) Constituants de base	26
V.3) Sérum	26

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES	27
I) Lignée cellulaire	28
I.1) Caractéristiques	28
I.2) Conservation des cellules	28
I.21) Congélation	28
I.22) Décongélation	28
I.3) Propagation des cellules	29
I.31) Préculture	29
I.32) Numération	29
I.33) Détection des contaminants	29
II) Milieux de culture	30
II.1) Composition du milieu de base RPMI 1640 et du milieu α MEM	30
II.2) Suppléments standards du milieu de base	31
II.21) Sérum de veau fœtal (SVF)	31
II.22) Glutamine	31
II.3) Autres suppléments	31
II.31) Acides aminés essentiels et non essentiels	32
II.32) Hydrolysate de protéines de colza	32
II.33) Carnosine	32
II.34) Butyrate de sodium	32
III) Systèmes de culture	33
III.1) Culture statique	33
III.2) Culture en flacons agités	33
III.21) Description	33
III.22) Systèmes d'aération	33
III.23) Régulation de pH	34
III.3) Culture en bioréacteur régulé et parfaitement agité	34
III.31) Descriptif du bioréacteur	34
III.32) Culture en mode discontinu	35
IV) Dosage des différents composants du milieu	35
IV.1) Dosages enzymatiques du glucose, de la glutamine et du lactate	37
IV.2) Dosage des ions ammonium	38
IV.3) Analyse des anticorps monoclonaux par test ELISA	38
IV.31) Réactifs	38
IV.32) Mode opératoire 1	40
IV.33) Mode opératoire 2	40
V) Exploitation des résultats	43
V.1) Vitesses spécifiques de croissance et de décès cellulaires	43

V.2) Vitesses spécifiques de consommation des substrats et de formation des produits	43
V.3) Rendement	43
VI) Mise en œuvre et validation d'un cytotoculteur	44
VI.1) Sonde de mesure et système de régulation du pH	44
VI.2) Sonde de mesure et système de régulation de l'oxygène dissous	46
VI.3) Sonde de mesure et système de régulation de la température	47
VI.4) Régulation de la vitesse d'agitation	47
VI.5) Stérilisation du milieu de culture	48
VI.6) Nettoyage et stérilisation du réacteur	48
VI.7) Ensemencement du réacteur	48
VI.8) Prélèvement des échantillons stériles	49
TROISIEME PARTIE : RESULTATS	50
I) Choix des conditions de culture de référence	51
I.1) Choix du milieu de base	51
I.11) Cinétique cellulaire avec le milieu RPMI 1640	51
I.12) Cinétique cellulaire avec le milieu α MEM	52
I.13) Conclusion	53
I.2) Influence du sérum sur les cinétiques de cultures des hybridomes en flacons agités	54
I.21) Conditions de culture	54
I.22) Cinétiques cellulaires	54
I.23) Production des ACM	56
I.24) Etude métabolique en flacon agité	56
I.25) Conclusion	59
II) Amélioration de la culture des hybridomes	59
II.1) Influences de diverses sources azotées	59
II.11) Conditions de culture	59
II.12) Cinétiques cellulaires	60
II.13) Production des ACM	63
II.2) Influence du butyrate de sodium	64
II.21) Conditions de culture	64
II.22) Cinétiques cellulaires	64
II.23) Production des ACM	66
III) Extrapolation du système de culture	67
III.1) Culture en réacteur agité	67
III.11) Conditions de culture	67
III.12) Cinétique cellulaire	67
III.13) Production des ACM	69

III.14) Etude métabolique en bioréacteur	69
III.2) Comparaison d'une culture en flacon agité et en bioréacteur	71
III.21) Conditions de culture	71
III.22) Cinétiques cellulaires	72
III.23) Production des ACM	73
III.24) Comparaison du métabolisme en flacon agité et en bioréacteur	73
III.25) Conclusion	75
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	77
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	80



INTRODUCTION

L'objectif général de ce projet est le développement d'un système de biodétection immunochimique du trichloroanisole (TCA) pour l'assurance qualité dans les domaines du liège (bouchons) et du vin.

En effet, le trichloroanisole, une des molécules responsable des « goûts de bouchon », serait dû à une transformation microbienne du trichlorophénol ou de ses dérivés, dont la source n'est pas clairement identifiée. Une prévention possible de ce « goût de bouchon » est de détecter les traces de trichloroanisole, à l'aide de techniques immunoenzymatiques (ELISA) sur bandelettes ou par le développement de capteurs électrochimiques.

Cette recherche d'une biodétection immunochimique du trichloroanisole s'inscrit dans le projet « TEC A COR » dans le cadre du programme européen de recherche FAIR-CT98-9586 (1999-2001) rassemblant des partenaires scientifiques :

- ✓ Laboratoire de Recherche en Génie Industriel (L.R.G.I.A.), Université Claude Bernard Lyon 1
- ✓ Universitat Rovira Virgili (U.R.V.) Tarragone, Espagne
- ✓ Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.) – Centro de Investigación y Desarrollo (C.I.D.), Barcelone, Espagne
- ✓ Technische Universität München, Freising, Allemagne
- ✓ Laboratori General d'Assaigs i Investigacions, Barcelone, Espagne
- ✓ Colaiste na hollscoile Corcaigh – University College Cork, Cork, Irlande
- ✓ Ampeloeniki, Ltd. Thessaloniki, Grèce

et des partenaires industriels :

- ✓ Juan Rich Xiberta, S.A. Girona, Espagne (bouchons de liège)
- ✓ Alvaro Coelho et Irmaos, L.D.A. Santa Maria da Feira, Portugal (bouchons de liège)
- ✓ Audit Diagnostics, Ltd. Cork, Irlande (capteurs)
- ✓ Union of Agricultural Cooperatives of Ioanmia – Litsa Ioanmia, Grèce
- ✓ Ktima Kir Yani, S.A. Nomos Imathias, Grèce (vins)
- ✓ Torres, S.A. Espagne
- ✓ Vins Georges Duboeuf, S.A. France
- ✓ Société Nouvelle J. Pellerin, France

Le but principal de notre étude consiste en l'optimisation de la mise en œuvre de la culture d'hybridomes murins pour produire des anticorps monoclonaux dirigés contre le trichloroanisole. Ces hybridomes nous ont été fournis par le Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire (L.R.G.I.A.), Université Claude Bernard Lyon 1.

La première partie de ce travail sera consacrée à une synthèse bibliographique passant en revue les connaissances actuelles sur le « goût de moisi », les kits immunologiques de l'industrie agroalimentaire, le développement des anticorps monoclonaux et la mise en œuvre des bioréacteurs.

Puis, le matériel et les méthodes décrivant les conditions expérimentales de cette étude seront abordés dans la seconde partie.

Enfin, la troisième et dernière partie sera consacrée à la présentation des résultats obtenus lors de nos expériences.

Plus précisément, en premier lieu, nous tenterons de choisir le milieu de culture le plus approprié puis nous essayerons de simplifier les conditions de culture en mettant en œuvre une diminution du sérum dans le milieu.

Dans un deuxième temps, nous nous attacherons à améliorer la production des anticorps monoclonaux par différentes supplémentations du milieu de culture.

Finalement, nous étudierons le suivi de cultures dans des systèmes de différentes tailles, afin de démontrer qu'une extrapolation à plus grande échelle est bel et bien envisageable.

PREMIERE PARTIE : BIBLIOGRAPHIE

I) Etude sur l'origine du « goût de bouchon » dans les vins

Lors des examens organoleptiques auxquels sont soumis les vins, le dégustateur est de plus en plus confronté avec des vins ayant des goûts particuliers rappelant quelquefois le moisi et dénommés couramment « goût de bouchon ». Sous ce nom, sont englobés des défauts organoleptiques qui sont plus de nature olfactive que gustative. Ces goûts désagréables posent aux producteurs de vin un problème grave dans la mesure où ils apparaissent assez fréquemment avec parfois une intensité telle que le vin n'est plus commercialisable.

Le coupable désigné est le plus souvent le bouchon de liège, mais il ne peut être mis seul en cause. En effet, dans de nombreux cas, ce défaut apparaît avant le conditionnement des vins en bouteille, c'est-à-dire pendant leur conservation en cuve ou en barrique. Le classique défaut de « logement » est alors invoqué pour expliquer l'altération. Mais, là encore, l'interprétation est peu convaincante lorsqu'il s'agit de chais neufs, à la cuverie parfaitement entretenue et à l'hygiène irréprochable. En fait, de nombreux composés, chimiquement très différents, peuvent être à l'origine d'odeurs qualifiées de « moisi » (Maujean, 1985).

I.1) Origine du « goût de bouchon »

A la suite d'un assez long travail analytique, ont été identifiés, dans les vins, les bouchons ainsi que les atmosphères de caves, trois composés chlorés :

- Le 2, 4, 6 trichloroanisole.
- Le 2, 3, 4, 6 tétrachloroanisole.
- Le pentachloroanisole en quantité nettement supérieure.

Des trois composés, ce sont le 2, 3, 4, 6 tétrachloroanisole et le 2, 4, 6 trichloroanisole qui possèdent l'odeur caractéristique de certaines caves dont les vins sont dits « bouchonnés », moisis... Ce sont les composés les plus caractéristiques de ce mauvais goût. (Schaeffer, 1978)

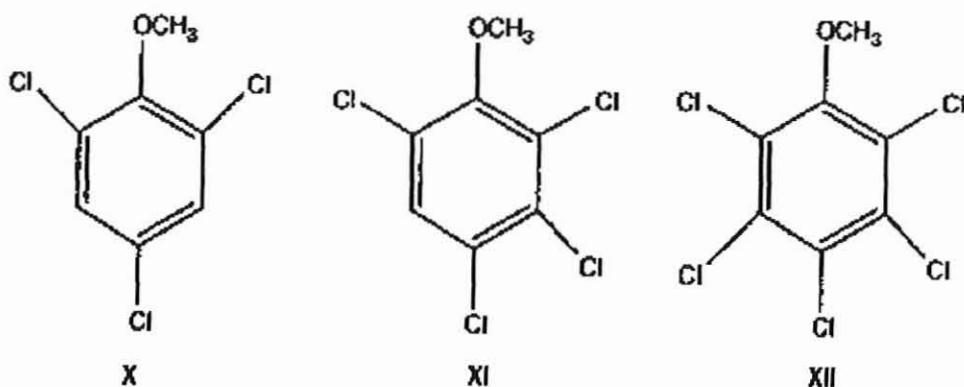


Figure 1 : Structure chimique des chloroanisoles (X : 2, 4, 6-trichloroanisole ; XI : 2, 3, 4, 6-tétrachloroanisole ; XII : pentachloroanisole).

I.2) Origine des chloroanisoles

Les chlorophénols sont largement utilisés comme insecticides pour le traitement des bois. Ces chlorophénols sont suffisamment volatils pour se répandre dans l'atmosphère des caves ou d'autres lieux, et se condenser à des endroits où se trouvent des moisissures. Ces dernières, sans doute par un mécanisme de détoxification, les transforment par méthylation en chloroanisoles correspondants (Dubois, 1998).

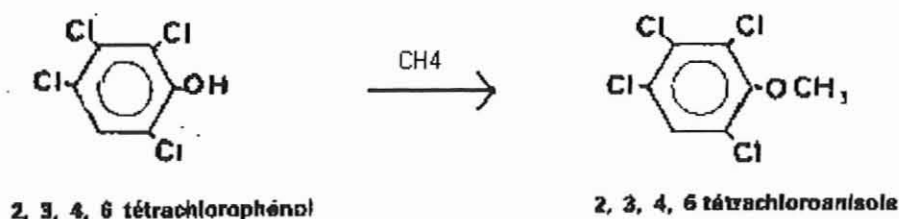


Figure 2 : Réaction de méthylation du 2,3,4,6 tétrachloroanisole.

Ces chloroanisoles se répandent à leur tour dans l'atmosphère des lieux, se condensent dans des cuves vides, ou sont simplement captés par le vin lors d'aérations, de transvasements ou d'autres manipulations le mettant au contact de l'air.

Il faut comprendre que ce n'est pas le produit de traitement des bois qui est directement responsable du mauvais goût, ni par son solvant, ni par les chlorophénols. Ces derniers doivent être méthylés par les moisissures pour que la mauvaise odeur apparaisse, du fait essentiellement de la formation des chloroanisoles.

Les chlorophénols peuvent avoir également d'autres origines. Le chlore entre dans la composition de nombreux agents de nettoyage préconisés en œnologie. Cet élément, sous la forme Cl_2 , HClO ou ClO^- selon le pH, peut réagir avec des phénols pour former des polychlorophénols par une réaction de substitution électrophile. Le chlore réduit sous forme d'ion chlorure Cl^- est en revanche inactif. Le chlore peut également être incorporé dans certaines molécules organiques comme les acides aminés soufrés.

Certaines moisissures du genre *Penicillium* sont capables de synthétiser elles-mêmes du 2, 4, 6 trichlorophénol par la voie de l'acide shikimique en présence de chlore libre ou incorporé dans la méthionine. La réaction est impossible en présence de simples chlorures. Ce chlorophénol peut à son tour être transformé en 2, 4, 6 trichloroanisole par le même micro-organisme.

La présence des chlorophénols a parfois été interprétée comme provenant d'une dégradation de pesticides organo-chlorés. Les problèmes d'accumulation rencontrés avec les insecticides de cette famille font que la plupart des molécules sont désormais interdites et remplacées par des organo-phosphorés. Les isomères de l'hexachlorocyclohexane (HCH) et en particulier le lindane (γHCH) sont encore utilisés pour certains traitements insecticides. Plusieurs polychlorophénols ont été identifiés comme produits du métabolisme de cette substance chez les mammifères, mais on ne connaît pas les produits de sa dégradation par la microflore des caves. Certains fongicides comme le CHLORANIL (tétrachloro-*para*-benzo-

quinone), retiré de la commercialisation en France, pourraient dans certaines conditions donner naissance à des chlorophénols. Le PROCHLORAZ ou 1-[N-propyl-N-2-(2, 4, 6 trichlorophénoxy)-éthyl carbamoyl] imidazole, matière active du fongicide SPORTAK utilisé en grande culture, peut être dégradé en 2, 4, 6 trichlorophénol puis en 2, 4, 6 trichloroanisole par méthylation microbienne et altérer irrémédiablement la qualité des productions. Cette molécule n'a jamais été autorisée sur vigne et il n'existe pas à notre connaissance de structure voisine répertoriée dans l'index phytosanitaire. Parmi les herbicides, des molécules non commercialisées en France, et notamment les dérivés de l'acide trichloro-2,3,6-benzoïque (TCBA), peuvent également se dégrader en substances susceptibles d'être métabolisées par la microflore en chloroanisoles, mais elles n'ont jamais été autorisées sur vigne.

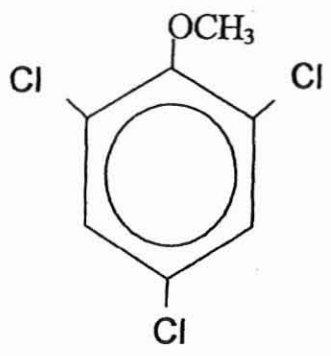
Enfin, plusieurs dérivés dithio et trithiophosphates des chlorophénols et notamment du 2, 4, 6 trichlorophénol auraient été autorisés au Japon comme des insecticides en grande culture. A notre connaissance, aucune des matières actives entrant dans la composition des produits phytosanitaires autorisés en viticulture n'est susceptible de libérer des chloroanisoles ou des chlorophénols.

I.3) Prévention du « goût de bouchon »

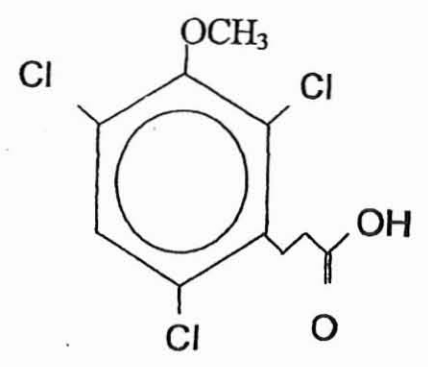
Le trichloroanisole semble être la principale molécule responsable des goûts de moisi. La prévention s'avère difficile. Le seul moyen actuel est la détection du trichloroanisole en vue d'éliminer les produits contaminés. Cependant, la complexité de la matrice alimentaire et le seuil de détection exigé nécessitent des techniques analytiques longues et coûteuses.

Ce projet s'inscrit dans le cadre du programme européen de recherche FAIR-CT98-9586 (1999-2001) rassemblant des partenaires industriels (producteurs de vin, producteurs de bouchons, producteurs de kits diagnostics) et des partenaires universitaires (immunologistes, biochimistes, microbiologistes) de divers pays (France, Allemagne, Espagne, Portugal, Grèce, Angleterre...).

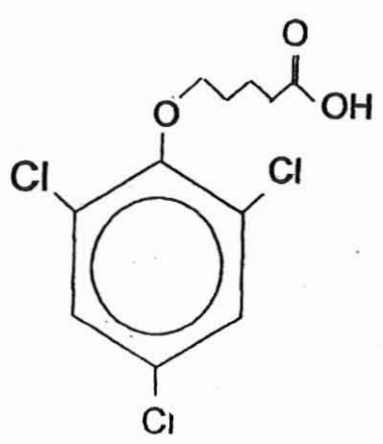
L'objectif général du programme de recherche engagé concerne le développement d'une nouvelle technique analytique spécifique du trichloroanisole. Il est envisagé de mettre au point une technique immunoenzymatique de type ELISA sous forme de bandelette et un immunocapteur électrochimique permettant de détecter des concentrations allant de 0.1 à 1 ppb de ce composé. Pour ce faire, nous avons travaillé sur l'optimisation de la production d'anticorps monoclonaux par des lignées cellulaires d'hybridomes obtenues par immunisation de souris avec des conjugués haptène-BSA proches du trichloroanisole (figure 3). Ces anticorps serviront ensuite à la mise au point de la méthode analytique de détection immunochimique du trichloroanisole.



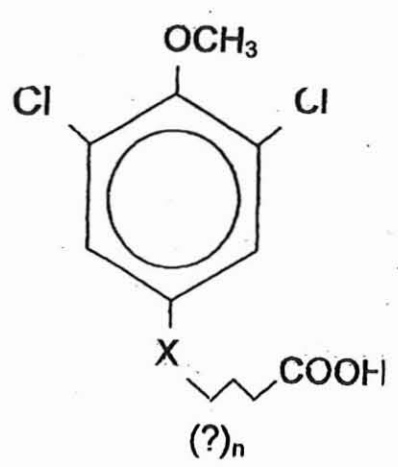
2,4,6-trichloroanisole



hapten A



hapten B



hapten C

Figure 3 : Présentation des différents haptènes utilisés pour le développement de conjugués permettant l'immunisation des souris lors de la phase de génération des hybridomes.

II) Méthodes de détection rapide en microbiologie alimentaire

Dans le cadre de notre étude de biodétection immunochimique du trichloroanisole (TCA) pour l'assurance qualité dans les domaines du liège (bouchons) et du vin, il nous a paru intéressant de présenter les méthodes de détection rapide en microbiologie alimentaire et plus principalement les méthodes immunologiques.

II.1) Microbiologie prévisionnelle

En dépit de la pression exercée par le consommateur qui souhaite des produits avec des durées de conservation plus longues, des traitements thermiques plus courts pour préserver leurs propriétés originelles et qui rejette l'utilisation de conservateurs, le professionnel de l'agroalimentaire est tenu de produire des aliments d'une qualité microbiologique la plus irréprochable possible. De leur côté, les pouvoirs publics souhaitent disposer d'un outil de référence pour accomplir leur mission de protection de la santé publique, et de positionnement des entreprises et des produits français dans le contexte international.

La conjonction de ces besoins est à l'origine de l'intérêt pour la microbiologie prévisionnelle discipline développée par les pays anglo-saxons depuis une dizaine d'années. Elle a pour objet d'étudier le comportement des micro-organismes dans les aliments et donc de prévoir leur croissance, survie ou destruction en fonction des conditions environnementales. On attend de cet outil une fiabilisation de l'évaluation de la qualité microbiologique dans les produits pendant leur phase de conception (aide à la formulation de nouveaux produits ou à l'amélioration des formules), mais aussi au cours de la transformation, du stockage, du transport et même chez le consommateur. Autrement dit, le rôle de la microbiologie prévisionnelle pourrait être de fournir des objectifs quantifiables pour la démarche HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point ou analyse des dangers-maîtrise des points critiques) en répondant aux questions « quel niveau de contamination, quel facteur de multiplication peut-on tolérer aux différents maillons de la chaîne ? ». (Coignard, 1996 - Anonyme, 1999).

L'industriel disposerait ainsi d'un outil lui permettant de déterminer les facteurs les plus importants, ceux qu'il peut favoriser par des combinaisons de facteurs, et de mettre en place des actions correctives pour assurer la maîtrise microbiologique du produit tout en conservant ses qualités organoleptiques et sensorielles. Mais le développement de cette discipline suppose la mise au point de méthodes d'analyse rapide.

Il existe de nombreuses méthodes de détection rapide en microbiologie alimentaire : tests biochimiques miniaturisés, tests physico-chimiques (impédance, bioluminescence et fluorescence), méthodes immunologiques et enfin méthodes génétiques (PCR) dont les principales sont présentées dans le tableau 1.

Au cours de ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement aux méthodes immunologiques. En effet, parmi les méthodes rapides qui se sont largement développées au cours des dix dernières années, on note les méthodes immunologiques avec notamment la méthode ELISA. Le concept des réactions immunoenzymatiques est beaucoup plus ancien, mais les années 90 ont vu l'explosion de son utilisation dans le domaine alimentaire. Le développement d'automates capables de délivrer une réponse fiable (car utilisant des

anticorps monoclonaux très spécifiques) au moindre coût, est pour beaucoup dans le succès très mérité de telles méthodes.

Société Marque	Principe	Type de méthode	Domaines d'application
Microbiologie			Tous pdts d'ali. humaine
3M Santé			
Petrifilm Flore totale	1	Numération flore totale	
Petrifilm Coliformes	1	Numération des coliformes totaux Et des coliformes fécaux	Tous pdts d'ali. humaine
Petrifilm C. coli	1	Numération des E. coli	Tous pdts d'ali. humaine
Kit Tecra	3	Détection des salmonelles	Tous pdts d'ali. humaine
AES			Tous pdts d'ali. humaine et animale
Salmonelle 1-2 Test	2	Détection des salmonelles	
Listerscreen	2	Détection des listeria	Tous pdts d'ali. humaine
Agrobiotests			Tous pdts d'ali. humaine
Gene-Trak Systems. Détection du genre Listeria DNA GT608	4	Détection des listeria	
Gene-Trak Systems. Détection du genre Listeria Monocytogenes DNA GT609	4	Détection des listeria Monocytogenes	Tous pdts d'ali. humaine
Biomérieux			Tous pdts d'ali. humaine
Vidas Salmonella	3	Détection des salmonelles	
Vidas Listeria	3	Détection des listeria sp	Tous pdts d'ali. humaine
Vidas Listeria Monocytogenes	3	Détection des listeria Monocytogenes	Tous pdts d'ali. humaine
Dynal France			Tous pdts d'ali. humaine et animale
Dynabeads Anti-Salmonella	2	Détection des salmonelles	
Dynabeads Anti-E. coli O157 : H7	2	Détection des E. coli O157 : H7	Tous pdts d'ali. humaine
Euralam			Lait, pdts laitiers et autres pdts d'ali. humaine
Accuprobe	4	Détection des listeria Monocytogenes	
Organon Teknica			Tous pdts d'ali. humaine et animale
Salmonella-Tek	3	Détection des salmonelles	
Rhône Poulenc Technologie			Tous pdts d'ali. humaine et animale
Kit Locate	3	Détection des salmonelles	
Sanofi Diagnostics Pasteur			Tous pdts d'ali. humaine et animale
Milieu « rapid » E. coli	1	Milieu de dénombrement des E. coli	
Probelia Salmonella sp	5	Détection des salmonelles	Tous pdts d'ali. humaine et animale

Transia-diffchamb Salmonella sp	3	Détection des salmonelles	Tous pdts d'ali. humaine et animale
Listeria sp Transia-Enrichissement Iso Fraer	3	Détection des listeria	Tous pdts d'ali. humaine
Unipath Salmonella Rapid Test	2	Détection des salmonelles	Tous pdts d'ali. humaine
Listeria Rapid Test	2	Détection des listeria	Tous pdts d'ali. humaine
Tests des contaminants chimiques Transia Diffchamb Kit transia Histamine	3	Test de tri par detection immuno-enzymatique de l'histamine dans le poisson	Poisson
UCB Pharma Test T101	7	Détection d'antibiotiques	Lait cru
Penzym 100	6	Recherche spécifique des beta-lactamines	Lait cru, stérilisé ou en poudre

1-Milieu de culture. 2-Test immunologique. 3-Test ELISA. 4-Test d'hybridation moléculaire
5-PCR 6-Réaction enzymatique. 7-Réaction bactérienne.

TABLEAU 1 : Méthodes d'analyses rapides de contaminants microbiologiques et chimiques validées Afnor (Tombj, 1997).

II.2) Méthodes immunologiques

La spécificité de la réaction antigène-anticorps est mise à profit pour compléter et affiner l'étude d'un micro-organisme. En effet, généralement, les études morphologiques, physiologiques et biochimiques permettent d'identifier l'espèce d'un micro-organisme. Mais, au sein d'une espèce, des différences très fines apparaissent et l'immunologie va permettre de différencier ces individus d'une même espèce.

Un micro-organisme peut être considéré comme une « mosaïque » d'antigènes, certains lui étant spécifiques.

La spécificité de la réaction antigène-anticorps est mise à profit pour la détection spécifique d'un micro-organisme dans un produit alimentaire. Les techniques employées sont :

- La précipitation
- l'agglutination sur lame
- l'immunofluorescence
- la technique immunoenzymatique ELISA
- l'immunoconcentration

Plus récemment, des techniques de cytométrie en flux permettent de coupler des études morphologiques et immunologiques.

Dans certains cas, on peut aussi extraire les antigènes des cellules microbiennes et procéder ensuite à la réaction immuno-chimique avec les antigènes purifiés : la réaction se traduit alors par une précipitation à l'interface antigène-anticorps. (Vernozy-Rozand, 1999).

Enfin, dans le cas de micro-organismes toxigènes, la recherche de toxine peut s'effectuer par des méthodes d'immunodiffusion.

Toutes les techniques immunologiques décrites sont basées sur la même réaction spécifique antigène-anticorps visant à détecter un antigène dans un mélange complexe. Mais selon la nature de l'antigène d'une part, la technique de marquage de l'antigène ou de l'anticorps d'autre part, on distingue les méthodes suivantes.

• **La précipitation**

Il y a précipitation lorsqu'un antigène soluble (donc invisible) forme avec les anticorps spécifiques un complexe antigène-anticorps insoluble qui apparaît sous forme d'un précipité (visible). C'est une réaction très simple à mettre en œuvre, mais assez peu sensible et qui peut donner lieu à des phénomènes de zone (en présence de certaines concentrations d'antigènes et d'anticorps, le précipité peut se resolubiliser et la réaction apparaître faussement négative).

• **L'agglutination**

Il y a agglutination lorsque les antigènes figurés ou particuliers forment entre eux, grâce aux anticorps qui leur sont spécifiques, des ponts qui de proche en proche constituent un réseau, l'ensemble se traduisant par l'apparition d'un agglutinat visible à l'œil nu.

Les antigènes doivent comporter plusieurs sites antigéniques (par exemple : bactéries, parasites, protéines, ...) ou bien doivent être fixés sur des hématies, des particules de latex ou de charbon afin de pouvoir se lier avec plusieurs anticorps. Les anticorps doivent eux-mêmes être de type « agglutinant », c'est-à-dire au moins bivalents pour parvenir à constituer ce réseau.

• **L'immunofluorescence**

Les anticorps sont couplés par des techniques appropriées à des composés fluorescents [l'isothiocyanate de fluorescéine (verte) ou de rhodamine (rouge)]; lorsque ces anticorps réagissent avec les antigènes qui leur sont spécifiques, le complexe antigène-anticorps fluorescent est visualisé à l'aide d'un microscope à fluorescence ou d'un cytomètre en flux. La technique peut être directe ou indirecte.

Immunofluorescence directe :

Dans cette technique, c'est l'anticorps spécifique qui est marqué, puis déposé sur la préparation de l'échantillon à examiner. Une émission de fluorescence après lavage signe la présence de l'antigène.

Immunofluorescence indirecte :

Cette technique comprend deux temps successifs où l'anticorps spécifique de l'antigène recherché joue le rôle d'anticorps dans le premier temps, et le rôle d'antigène dans le deuxième temps. Ce n'est pas cet anticorps qui porte le fluorochrome mais l'anti-anticorps que l'on dépose dans un second temps.

Les anticorps fluorescents peuvent être utilisés pour identifier directement les bactéries dans les échantillons cliniques mais aussi pour permettre une détection rapide des bactéries pathogènes, en particulier dans les aliments.

• **L'ELISA ou Enzyme Linked Immuno Sorbent-Assay**

Cette technique permet de visualiser une réaction immunologique grâce à une enzyme. Le substrat spécifique de cette enzyme libère, en sa présence, un composé coloré. L'apparition d'une couleur signe donc une réaction positive, et l'intensité de la réaction obtenue est fonction de la quantité d'antigène ou d'anticorps ayant réagi.

Sous cette dénomination sont regroupées un grand nombre de techniques, mais seules les réactions dites en phase hétérogène (où l'on fixe l'antigène ou l'anticorps sur une phase solide : plastique, cupules, billes de métal, tubes, etc.) ont des applications en hygiène alimentaire.

Parmi ce type de réactions, la technique « sandwich » (parce que l'antigène se trouve pris en sandwich entre deux anticorps) est la plus utilisée.

Les tests ELISA sont largement employés en diagnostic agroalimentaire. Mais à l'instar de la technique par immunofluorescence, le problème majeur est le manque de spécificité lié à l'utilisation des anticorps polyclonaux. Le développement récent de la technologie des hybridomes et la possibilité de préparer des anticorps monoclonaux de très grande spécificité a permis des améliorations spectaculaires de la méthode ELISA.

Plusieurs stratégies sont utilisées pour augmenter la sensibilité des tests ELISA. La production de composés fluorescents ou chimioluminescents au lieu de produits colorés a augmenté de 10 fois la sensibilité des tests.

• **L'immunoconcentration.** (Tombj, 1998b)

Il s'agit d'un procédé nouveau qui permet de détecter des micro-organismes spécifiques, présents en faible nombre dans l'aliment ou associés à une microflore abondante et variée. Cette technique utilise des supports solides d'une grande variété (polystyrène, Nylon, hydroxyde de titane, agarose, nitrocellulose, polyvinyle) recouverts d'anticorps mono ou polyclonaux dirigés contre des antigènes de surface de la bactérie cible. La capture spécifique de la bactérie cible est suivie d'une phase de lavage qui réduit considérablement les éléments indésirables. Cette capture immunologique n'affecte pas la vitalité des bactéries. Ces dernières peuvent donc se multiplier lorsqu'elles sont placées dans un milieu de culture adéquat, en présence de leurs supports (billes magnétiques, *dipstick*), ou après relargage sous l'action d'une enzyme spécifique.

La bactérie cible est ainsi séparée de la matrice alimentaire et se retrouve concentrée dans un volume très inférieur à celui d'origine. La réussite de l'immunoconcentration n'est possible que si l'organisme cible est présent en nombre suffisant.

Le seuil est déterminé par la sensibilité de la méthode qui peut varier en fonction de l'affinité et de l'avidité particulière de l'anticorps pour l'antigène de surface choisi.

II.3) Exemples de kits de détection rapide utilisant le test ELISA

Les toxi-infections alimentaires affectent plus de dix mille personnes en France chaque année sur lesquelles nous n'enregistrons heureusement que quelques décès à l'opposé des Etats-Unis où les décès annuels dus aux intoxications alimentaires se comptent par centaines.

Les bactéries pathogènes le plus souvent citées sont les salmonelles (plus de 50% des cas), *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*. Il faut également noter l'émergence de nouveaux pathogènes comme *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli O157*. Les changements de mode de vie (prise de nombreux repas à l'extérieur du domicile familial) expliquent la recrudescence des accidents alimentaires collectifs. Les industriels agroalimentaires ont besoin de méthodes rapides pour apprécier la qualité hygiénique des denrées produites et pouvoir maîtriser efficacement leurs procédés de fabrication. Ils disposent aujourd'hui de kits de détection rapide permettant de commercialiser leurs produits sans attendre 4 à 5 jours comme c'était le cas avec les méthodes microbiologiques traditionnelles d'isolement et d'identification. (Lemoine, 1996)

⇒ Détection des salmonelles

Le **Locate**, de Rhône-Poulenc Technologie, est basé sur le principe d'une réaction ELISA directe. Elle utilise un anticorps monoclonal spécifique, dirigé contre les antigènes somatiques des salmonelles. Le kit utilise comme support de réaction les puits d'une plaque de microtitration. Les résultats sont obtenus en 48 heures grâce à une lecture visuelle assurant une bonne discrimination des résultats (le développement de couleur indique la présence de salmonelles). Ce test peut être rapidement implanté au laboratoire sans investissement préalable. L'utilisation du kit Locate peut être couplée à celle du Spectate pour la confirmation et l'identification. Le kit Spectate est basé sur la réaction spécifique par agglutination d'antigènes de salmonelles avec des anticorps liés à des microbilles de latex. Il s'applique pour la détection de salmonelles à partir de colonies isolées sur milieu solide ou dans certains cas directement à partir des bouillons d'enrichissements sélectifs. La présence de salmonelles est confirmée en quelques minutes.

Le **Transia Salmonella**, commercialisé par Transia-Diffchamb est un test basé sur une réaction immuno-enzymatique de type sandwich mettant en œuvre un cocktail d'anticorps, permettant la détection de tous les sérotypes de Salmonella présents dans l'échantillon. Les principales caractéristiques de ce test sont une détection en 48 heures, sa facilité et souplesse d'emploi (barrettes sécables puits à puits, réactifs prêts à l'emploi) et un coût réduit. La microplaque « universelle » de 96 puits permet d'utiliser un large choix d'équipements qui correspondent à tous les degrés d'automatisation et de budget.

Le **Vidas Salmonella de Biomérieux** s'utilise avec l'automate compact Mini Vidas d'immunoanalyse, associant une méthode ELISA à une lecture finale en fluorescence. Il est assorti d'une gamme spécifique de réactifs unitaires prêts à l'emploi pour divers pathogènes (*listeria*, *salmonella*, entérotoxine de staphylocoques...). Les résultats sont obtenus en moins d'une heure après enrichissement. Pour les laboratoires effectuant plus de 50 analyses de pathogènes par jour, Biomérieux propose un appareil plus important le Vidas.

Le **kit Tecra Unique** distribué par les laboratoires 3M Santé permet la détection de salmonelles en moins de 22 heures. Chaque analyse est réalisée dans un module qui contient tous les réactifs pour l'analyse, les contrôles positifs et négatifs sont inclus dans chaque test.

Le cœur du test est un bâtonnet en forme d'ailette dont les faces sont recouvertes d'anticorps servant à capturer les salmonelles. Les salmonelles capturées se multiplient dans le bouillon M jusqu'à un niveau pouvant être détecté par immunoessai sur le bâtonnet. Un résultat présomptif positif se caractérise par une coloration pourpre des ailettes, la partie supérieure des ailettes, où se trouve le témoin contrôle négatif reste blanche. Ce test ne nécessite pas d'investissement en laveur ou lecteur, ni de milieu d'enrichissement sélectif. C'est un outil performant pour les petites séries, mais qui apporte également la flexibilité aux grandes séries.

Le **Path Stick**, de Perstorp Analytical, a été développé pour la détection spécifique des salmonelles. Ce test immunoenzymatique, très simple à utiliser, se présente sous la forme d'une bandelette que l'on plonge pendant quelques secondes dans l'échantillon préalablement enrichi. Le résultat s'affiche en 10 minutes, sous la forme d'une ligne violacée apparaissant sous la bande. La position de cette ligne, par rapport à deux repères, confirme ou infirme la présence de salmonelles. (Cohen-Maurel, 1999)

⇒ Détection des mycotoxines

De part sa fiabilité, la méthode ELISA a été largement appliquée à l'analyse des mycotoxines dans les aliments. En plus de l'anticorps monoclonal, cette technique met en œuvre un marqueur enzymatique qui déclenche au cours du protocole une réaction de coloration. Plusieurs types de tests à usage unique sont disponibles sur le marché. Deux catégories peuvent être distinguées : les kits de détection et les kits de dosage. Ils sont tous caractérisés par leur facilité d'usage.

Rhône-Poulenc Technologie propose des cartes de détection « **Easyscreen** » pour les aflatoxines B et G, l'ochratoxine, la toxine T2 et la zéaralénome. Vingt minutes suffisent à révéler la présence de toxines. Les seuils de détection sont compris entre 20 et 100 µg par kilogramme en fonction de l'analyse.

Idexx, pour sa part propose un seul test de détection de mycotoxine, le **cite aflatoxine M1**. Contrairement à beaucoup de kits ELISA, où la réaction a lieu dans un puits ou un tube, le milieu réactionnel de cite aflatoxine M1 est une membrane. Le seuil de sensibilité est de 0.5 µg par kilogramme.

Côté dosage, Transia-Diffchamb propose une large gamme de kits de dosage rapide des aflatoxines B, G et M1, de la zéaralénome, de l'ochratoxine, la vomitoxine et des fumosines. Chaque kit est conditionné en microplaque de 96 puits sécables. Les seuils de détection sont particulièrement bas : pour l'afltoxine M1, le seuil de sensibilité est de 10 nanogrammes par kilogramme. Les durées d'analyses sont comprises, en fonction des kits, entre 40 minutes et 2 heures et demie. Transia propose également des kits rapides de détection des aflatoxines B, G et M1. (Lemoine, 1996)

⇒ Détection d'antibiotique dans le lait.

Le test **Snap Beta-lactam**, de Idexx, détecte rapidement les laits non conformes avant leur dépotage en citerne. Ce test met en œuvre la technologie immuno-enzymatique avec une protéine réceptrice spécifique marquée par une enzyme. Il est utilisable à la laiterie ou par les conducteurs de citernes de collectes. Le Snap Beta-lactam est prêt à l'emploi et ne nécessite

aucun mélange, dosage ou rinçage. Il se réalise en trois étapes et le résultat est obtenu en dix minutes. (anonyme, 1996a)

III) Les anticorps monoclonaux

III.1) Définition des anticorps polyclonaux et monoclonaux.

Les anticorps polyclonaux doivent leur définition par le simple fait qu'ils constituent l'immunsérum polyclonal. L'immunsérum polyclonal contient plusieurs populations différentes d'anticorps qui reconnaissent chacune un épitope antigénique donné.

A l'inverse, les anticorps dits « monoclonaux » (ACM) doivent leur définition au fait qu'il n'existe qu'une seule population d'anticorps (issue du clonage d'un seul plasmocyte) dans le milieu reconnaissant donc un seul épitope antigénique.

III.2) Caractéristiques des ACM

L'une des caractéristiques les plus intéressantes du système immunitaire est la très grande spécificité de la réponse immune qui est liée au fait qu'un anticorps (Ac) donné peut reconnaître et se lier à un seul type d'antigène (Ag). C'est cette interaction spécifique Ag-Ac qui constitue la base de l'utilisation des anticorps comme outils puissants d'étude en biologie cellulaire et biochimie. Les applications peuvent donc se répartir en deux grands groupes : recherche d'anticorps et identification d'un antigène (Donzeau et al., 1998).

III.3) Difficultés d'obtention des ACM

La grande hétérogénéité des anticorps obtenus lors d'une réponse immunitaire rend difficile l'isolement d'un anticorps donné pour l'utiliser comme outil d'étude. La difficulté est d'obtenir un immunsérum monoclonal, c'est-à-dire ne comportant qu'un seul type d'anticorps spécifique.

Etant donné que l'hétérogénéité résulte de l'expression simultanée d'un très grand nombre de clones de lymphocytes B, la solution est de trouver les conditions dans lesquelles un clone tend à devenir prépondérant dans l'organisme (déversant ainsi dans le sang une seule catégorie d'immunoglobulines = anticorps monoclonal). Cette situation est réalisée lorsqu'un clone devient cancéreux. La cancérisation confère au clone cancéreux un pouvoir de multiplication important. Chez l'homme, une telle condition pathologique est rencontrée dans le « myélome multiple » (cancer de la moelle osseuse qui affecte les plasmocytes). Dans le sérum de ces malades, on trouve effectivement des quantités considérables d'une immunoglobuline monoclonale.

Chez la souris, il est possible d'induire expérimentalement le même type de maladie afin de multiplier les cellules indéfiniment à l'intérieur de la même souche, sans que la protéine synthétisée ne change.

III.4) Principe de production des ACM

C'est en 1975 que Kohler et Milstein (prix Nobel de médecine en 1984) ont été les premiers à obtenir *in vitro* des anticorps monoclonaux grâce au fait que les cellules de certains myélomes de souris (tumeurs malignes du système immunitaire) ont la propriété de sécréter, après fusion avec des lymphocytes, de grandes quantités d'immunoglobulines monoclonales et de se multiplier *in vivo* en donnant des clones immortels (contrairement aux lymphocytes B *in vivo*).

La technique consiste à fusionner des cellules normales productrices d'anticorps (les lymphocytes B, issus de la rate prélevée chez une souris préalablement immunisée contre un antigène donné) avec des cellules cancéreuses de souris (myélomes).

Les cellules issues de l'hybridation sont appelées hybridomes et possèdent deux caractéristiques :

- Une production d'anticorps spécifiques de l'antigène immunisant (spécificité prédéterminée lors de l'immunisation).
- Une division cellulaire indéfinie qui assure la pérennité de l'anticorps cloné.

L'hybridome constitue donc la cellule efficace pour produire indéfiniment des anticorps monoclonaux.

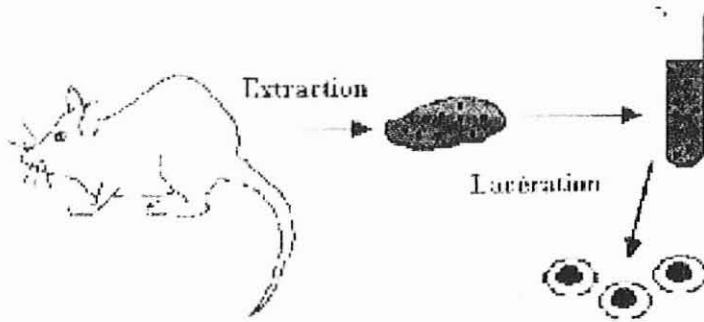
III.5) Protocole expérimental de production des ACM

A. Immunisation :



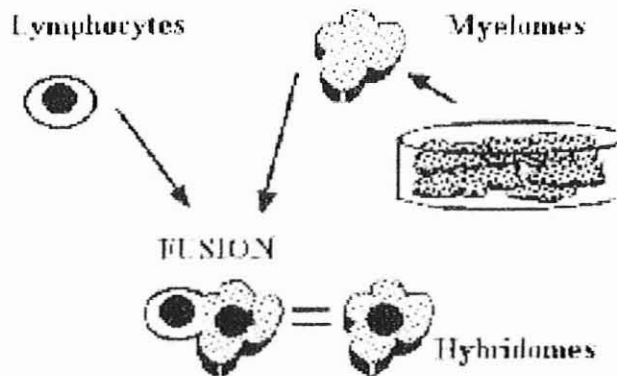
L'immunisation d'une souris est réalisée par injection intrapéritonéale d'une préparation d'antigène, avec un rappel trois jours avant la fusion afin d'augmenter considérablement la production d'anticorps dans la rate lors de la réponse secondaire.

B. Extraction des lymphocytes :



La rate est dilacérée pour récupérer les lymphocytes qui sont alors majoritaires.

C. Fusion :



Ainsi récupérés, les lymphocytes sont mis en culture avec des cellules myéломateuses, provenant d'une tumeur de souris Balb/c, en présence de polyéthylène glycol (PEG) qui facilite l'hybridation : on obtient des hybridomes.

D. Sélection des hybridomes :

Etant donné que toutes les cellules n'auront pas fusionné en hybridome, il faut séparer les hybridomes des myéloblastes et des lymphocytes restants.

Les cellules sont diluées, lavées, centrifugées et remises en suspension dans un milieu sélectif HAT (Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine). Les cellules qui ne possèdent pas l'activité HGPRT (HGPRT-), permettant de survivre dans ce milieu, seront détruites. Etant donné que cette activité est apportée par les lymphocytes qui sont donc HGPRT+, seuls les hybridomes posséderont cette activité HGPRT+ et se développeront.

E. Contrôle des hybridomes :

Le surnageant de culture est prélevé et testé par ELISA ou RIA (Radio Immuno-Analyse) pour déterminer si il y a production d'anticorps spécifiques.

F. Clonage :

Le clonage est fait grâce à la technique des dilutions limites qui consiste à réaliser des dilutions de manière à obtenir en théorie une seule cellule par puit de culture. On a ainsi une population homogène (clone) qui sécrète de façon permanente, quasi illimitée et continue des anticorps monoclonaux.

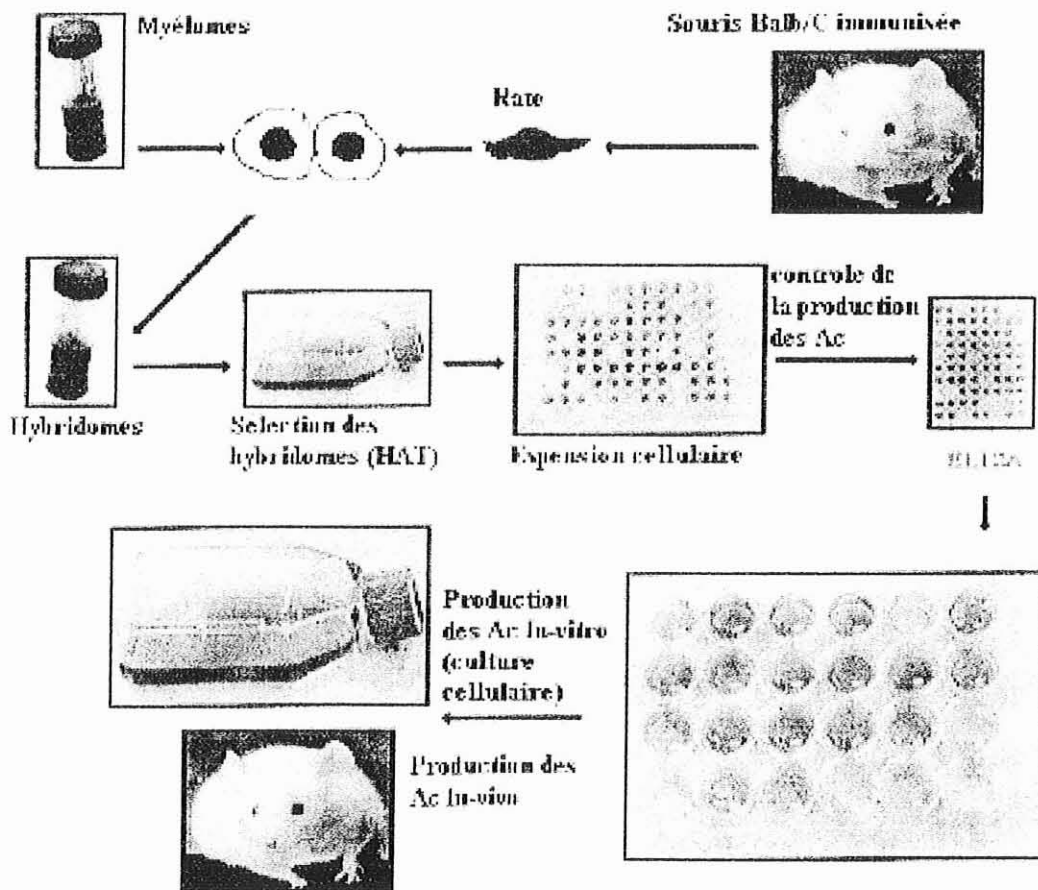


Figure 4 : Schéma de synthèse de production des ACM.

III.6) Production massive des hybridomes

Les souches d'hybridomes une fois établies après quatre à cinq clonages successifs, doivent être multipliés afin de produire les anticorps monoclonaux. Cette production peut être réalisée par différentes voies :

Ils peuvent être cultivés *in vivo* dans des souris compatibles. Les anticorps sont alors extraits du liquide d'ascite développé dans la cavité péritonéale de la souris. Cette méthode permet d'obtenir des concentrations élevées d'anticorps. En effet, chaque souris peut produire entre 10 et 100 mg d'anticorps pour une période de trois semaines. Ce procédé est utilisable lorsque de petites quantités (<1 kg) d'anticorps sont requises et lorsque la contamination par des protéines murines ne présente pas un problème. La production de 100 g d'anticorps nécessiterait environ 2000 souris.

Caractéristiques de la culture en ascite

- concentration élevée (0.9 à 9 mg.mL⁻¹)
- production d'un gramme d'ACM
 - Nombre de souris nécessaires : 20
 - Temps nécessaire : 2-3 semaines
- protéines contaminantes : anticorps de souris et protéines du sérum murin
- coût/mg d'ACM : faible
- pas de production multikilogrammes

La production d'ACM en ascite peut être suffisante pour de petites quantités destinées à un usage diagnostic, mais, dans l'état actuel des réglementations, la production en ascite est appelée à disparaître et à être remplacée par la production *in vitro*. Les avantages de la production *in vitro* peuvent être résumés ainsi :

- production d'ACM autre que murins
- procédé reproductible pouvant être automatisé
- procédé extrapolable en taille
- peu ou pas d'anticorps endogènes
- risque de contamination réduit

L'ensemble de ces avantages ne saurait faire oublier les désavantages que peut apporter la culture *in vitro*, en particulier la faible concentration des ACM recueillis en fin de culture.

IV) Systèmes de culture en bioréacteur

Dans les techniques de production *in vitro*, les hybridomes prolifèrent et secrètent directement dans le milieu de culture et même si la concentration en anticorps est seulement de l'ordre de 10 à 100 µg.mL⁻¹, il est possible maintenant de concevoir des systèmes ayant des volumes de plusieurs milliers de litres.

Ces systèmes sont appelés bioréacteurs ou cytoculteurs.

Au cours de cette partie, nous allons étudier les différents modes de culture des hybridomes et par conséquent les différents systèmes présents actuellement en vue d'une production d'ACM. Cette liste n'est pas exhaustive et doit permettre de dégager les grandes tendances de la production d'ACM *in vitro*.

Parmi les différents modes de propagation des cellules nous pouvons citer : la culture discontinue ou batch, la culture semi-continue ou fed batch, la culture continue ou chémostat et enfin la culture perfusée.

IV.1) Mode discontinu (batch)

Ce mode de culture met en œuvre un réacteur fermé dans lequel aucun milieu n'est ajouté, ni soutiré durant toute la durée de la culture (à l'exception de la prise d'échantillons et des régulations de l'oxygène dissous et du pH). Ainsi, au cours du temps, les nutriments sont consommés par les cellules tandis que les métabolites produits s'accumulent dans le milieu.

La croissance cellulaire est souvent limitée par l'épuisement de certains nutriments tels que le glucose, la glutamine ou d'autres acides aminés, et/ou par la forte concentration des déchets métaboliques, inhibiteurs de croissance ou toxiques, comme le lactate ou les ions ammonium (Hu et al., 1997). Cette phase de croissance dure entre 3 et 7 jours suivant les lignées et les milieux de culture mis en œuvre.

La culture recharge-récolte ou discontinue répétée constitue un mode de culture particulier qui consiste à vider le réacteur à 90% en fin de phase de croissance, puis à le compléter par du milieu frais afin de réaliser une nouvelle culture discontinue. L'intérêt principal est de ne pas nécessiter la propagation précédant un nouvel ensemencement.

Les deux principales configurations utilisées sont, d'une part, le réacteur parfaitement agité par une hélice d'agitation munie de pales inclinées, et d'autre part, le réacteur de type « airlift » dans lequel l'agitation est réalisée par un flux ascendant de bulles d'air (Birch et al., 1994). Ces deux types de réacteurs sont représentés dans la figure 5.

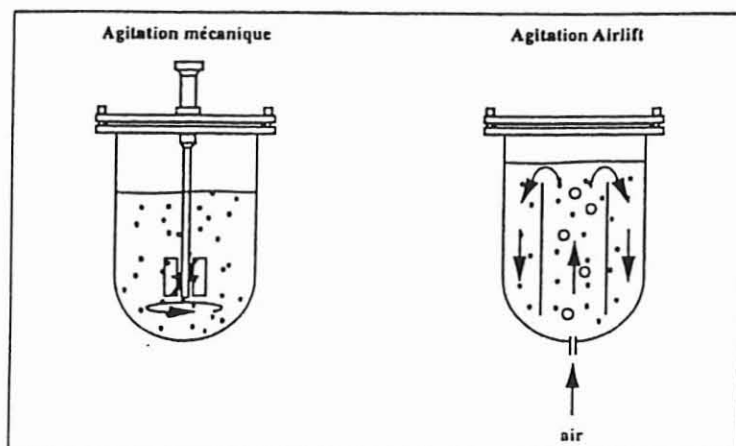


Figure 5 : Bioréacteurs discontinus.

IV.2) Mode semi-continu (fed-batch)

Dans ce système, le milieu est ajouté par paliers ou en continu, sans soutirage. Cela se traduit par une augmentation au cours du temps du volume de milieu de culture présent dans le réacteur.

L'intérêt de ce mode de culture en comparaison avec le mode discontinu est le prolongement de la phase de croissance et donc souvent l'augmentation de la production (Dardenne et al., 1994). Ce mode est utilisé industriellement pour la culture de cellules animales car il présente des atouts économiques intéressants. La capacité des cuves utilisées peut atteindre alors 15000 litres (Werner et al., 1993).

IV.3) Mode continu avec ou sans système de rétention cellulaire

Ce système utilise un réacteur ouvert dans lequel les débits d'apport de milieu frais et de soutirage de milieu dans le réacteur sont identiques. Le volume de milieu présent dans le réacteur reste donc constant au cours de la culture. Le réacteur peut être muni d'un dispositif permettant la rétention partielle ou totale des cellules. On parle alors de réacteurs de type perfusé. Le but de telles configurations est l'obtention de hautes densités cellulaires et l'utilisation de taux de dilution supérieurs à la vitesse maximale de croissance. De ce fait, les systèmes de culture perfusés permettent une productivité 10 à 50 fois plus élevée que les autres modes de culture (Griffiths et al., 1992).

Les réacteurs continus sans dispositif de rétention cellulaire sont surtout utilisés en laboratoire pour étudier le métabolisme cellulaire (Hayter et al., 1993). Dans l'industrie, leur capacité dépasse rarement 2000 litres (Werner et al., 1993).

Deux types de réacteurs perfusés (figure 6) sont principalement utilisés :

- réacteur à cellules immobilisées.
- réacteur à cellules circulantes.

Dans le cas des réacteurs à cellules immobilisées, le milieu est apporté aux cellules retenues, soit entre deux membranes planes (Seewöster et al., 1997 – Goergen et al., 1994), soit à l'intérieur d'un faisceau de fibres creuses (Choi et al., 1995) ou d'un module de céramique (Applegate et al., 1992) ou de plastique (Kadouri et al., 1997).

Les atouts majeurs de ces systèmes sont leur compacité et l'absence de contraintes de cisaillement. Cependant, les transferts d'oxygène et de nutriments peuvent y être limités. En outre, il est très difficile de contrôler les paramètres opératoires dans de tels montages. Par exemple, ils sont bien souvent dépourvus de systèmes permettant la prise d'échantillons cellulaires.

Les réacteurs à cellules circulantes, présentent un dispositif intérieur ou extérieur assurant le maintien des cellules dans le réacteur. Ainsi, les cellules peuvent être séparées du milieu grâce à une cartouche de micro ou ultra-filtration (Brotherton et al., 1996) ou d'un filtre cylindrique placé sur l'axe d'agitation appelé spin-filter (Yabannavar et al., 1994), par centrifugation continue (Tokashiki et al., 1993), par sédimentation gravitationnelle (Searles et al., 1994 – Tokashiki et al., 1993), ou acoustique (Sonderhoff, 1996)

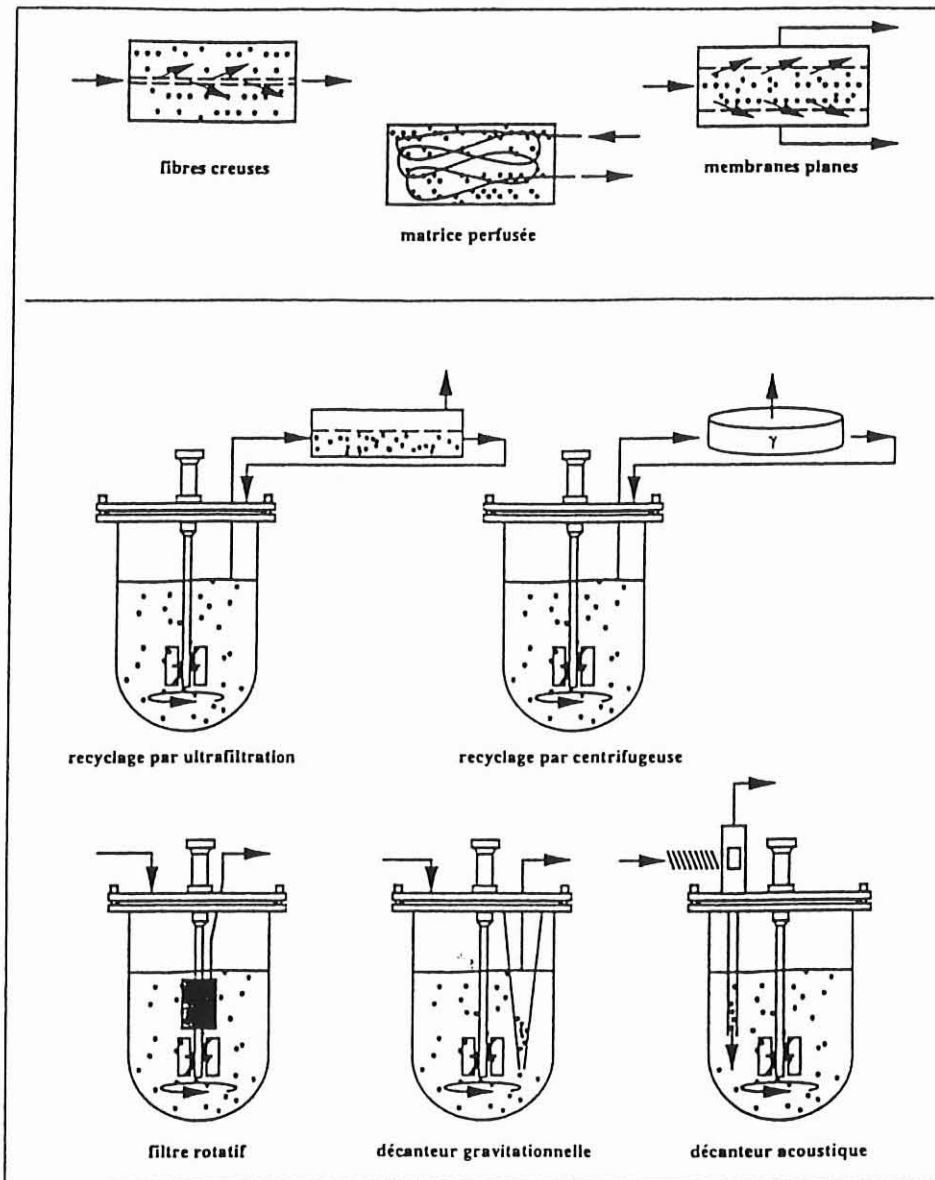


Figure 6 : Bioréacteurs perfusés.

Aucun système n'est idéal et ne convient à toutes les applications, chacun d'eux possède ses atouts et ses failles. Le choix d'un système sera fonction de plusieurs critères, en particulier les caractéristiques cellulaires dont la résistance aux contraintes de cisaillement, le volume de protéine à produire et les impératifs économiques (Birch et al., 1994).

V) Conditions de culture

Un milieu de culture doit permettre la croissance et le maintien des fonctions spécialisées des cellules *in vitro*. Il doit reconstituer autant que possible les conditions nutritionnelles et physicochimiques des cellules *in vivo*.

V.1) Conditions physico-chimiques

V.11) PH

Pour permettre la croissance des hybridomes, le pH du milieu de culture doit rester compris entre 6.8 et 7.8, la valeur optimale étant voisine du pH sanguin : 7.4 (Kurano et al., 1990). Le contrôle du pH durant la culture est important car un pH non régulé peut entraîner une diminution de la vitesse de croissance et de la production de la protéine (Cherlet, 1995). Afin d'éviter les variations trop brusques de pH et de réguler le système autour de la valeur de consigne, les milieux de culture contiennent généralement le système tampon $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ dont les réactions d'équilibre sont les suivantes :



Le pH du milieu est ainsi déterminé par la relation de Henderson-Hasselbalch :

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left(\frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} \right)$$

Grâce à ce système tampon, la régulation du pH dans les cultures en réacteur peut se faire par simple ajout de CO_2 ou de soude. Ainsi, la libération d'acide lactique par les cellules, faisant suite au catabolisme du glucose, n'entraîne pas d'acidification du milieu.

V.12) Température

La température optimale de croissance des cellules animales est de 37°C. Ce facteur joue un rôle très important dans l'optimisation des cultures et doit donc être régulé avec précision. En effet, les écarts en dehors de l'intervalle 36.5 - 38°C sont assez mal tolérés par les cellules. Ainsi en-dessous, le métabolisme et donc la croissance sont profondément ralentis (Kurano et al., 1990a). Au-dessus, les cellules génèrent des protéines intracellulaires afin de lutter contre l'élévation de température (Jenkins et al., 1993). La croissance est aussi ralentie et la synthèse des protéines est stoppée à partir de 43°C (Goochee et al., 1988).

V.13) Oxygène dissous

L'oxygène présent dans le milieu de culture est essentiel pour la croissance cellulaire car il représente un important système accepteur d'électron dans la chaîne de transport d'électron et permet la production d'énergie par phosphorylation oxydative (Chevalot, 1992). Sa consommation est généralement comprise entre 0.05 et 0.5 $\text{mmolO}_2/\text{h}/10^9$ cellules. En bioréacteur, la surface de contact entre le ciel et la surface du milieu est souvent trop faible pour que l'aération du milieu soit effectuée par simple diffusion à l'interface air-liquide. De ce fait, l'oxygène est apporté au milieu via un diffuseur fritté, aussi appelé « sparger » (Gardner et al., 1990). Ces dispositifs permettent de maintenir la teneur du milieu en oxygène dissous proche de la valeur de consigne souhaitée (la valeur de consigne étant celle pour laquelle le système de régulation est programmé). Cette dernière ne doit être ni trop faible pour permettre la respiration cellulaire, ni trop élevée afin d'éviter la production de peroxyde toxique pour la cellule.

V.2) Constituants des milieux de culture

Les milieux les plus utilisés pour la culture d'hybridomes sont les milieux DMEM, Ham F12, RPMI 1640 et IMDM. Ces milieux contiennent des acides aminés, des vitamines, une source de carbone, généralement du glucose et des sels minéraux dissous dans de l'eau chimiquement pure.

V.21) Sources d'énergie

A. Glucides :

Le glucose est la plus importante source d'énergie et de carbone des cellules en culture. Sa concentration varie entre 5 et 25 mM. Le glucose est parfois remplacé par du fructose (Low et al., 1985), du galactose (Wagner, 1990), du mannose ou du maltose (Imamura et al., 1982).

B. Glutamine :

La glutamine est employée entre 0.7 et 5 mM en culture. C'est le deuxième substrat énergétique majeur du milieu. Sa concentration est de 5 à 10 fois supérieure à celle des autres acides aminés, et sa consommation est aussi beaucoup plus rapide. Dans certains cas, la glutamine serait même la principale source d'énergie des cellules (Reitzer et al., 1979).

V.22) Facteurs trophiques de croissance

A. Acides aminés :

Les acides aminés sont la source d'azote de tous les milieux de culture, mais leur nombre et leur concentration varie d'un milieu à l'autre : le milieu MEM contient 13 acides aminés, le DMEM 15, le RPMI et l'IMDM en contiennent 20. Mis à part leur rôle dans la synthèse protéique, ils peuvent aussi servir de source d'énergie.

La classification en acides aminés essentiels et non-essentiels est liée aux besoins de l'organisme entier. Dans de nombreux systèmes de culture, cette classification n'est plus valable : si les 8 acides aminés essentiels (Ile, Leu, Val, Thr, Phe, Lys, Trp, Met) sont indispensables en culture, de nombreux autres acides aminés sont souvent nécessaires (Arg, Cys, Glu, His, Tyr en particulier). On notera que la glutamine (ou le glutamate lorsqu'il peut lui être substitué) est indispensable à la croissance, alors qu'elle n'est pas nécessaire à l'alimentation de l'animal entier (Eagle et al., 1965).

B. Vitamines :

Tous les milieux contiennent des vitamines. Leur rôle consiste à servir de cofacteurs à certaines réactions enzymatiques. Les vitamines contenues dans les milieux sont le plus souvent hydrosolubles (groupe B et C). Quelques vitamines liposolubles (A, D, E, K) ont été également utilisées (Birch, 1985).

C. Lipides :

Ils sont principalement utilisés par les cellules pour la synthèse de leurs membranes. Les acides gras et le cholestérol sont les composants lipidiques principaux des milieux de culture et sont apportés par le sérum de veau fœtal. Il est donc nécessaire de les ajouter aux milieux sans sérum afin de permettre la croissance cellulaire (Barnes et sato, 1980).

V.23) Constituants de base

A. Sels minéraux :

Les sels minéraux ont des fonctions variées. Ils interviennent dans la balance électrolytique, le transfert de signaux ou de molécules à travers les membranes et comme cofacteurs enzymatiques.

Le bicarbonate de sodium est également ajouté comme tampon pH.

B. Antibiotiques :

Ils sont souvent utilisés en culture à petite échelle (pénicilline, streptomycine, gentamycine, néomycine, kanamycine, amphotéricine B, nystatine). Ils sont généralement chers, peu stables et ne sont pas efficaces à 100%.

V.3) Sérum

Le milieu de base ne suffit pas à couvrir tous les besoins de la cellule et des concentrations de sérum variant entre 5 et 20% doivent être ajoutées aux milieux. Le sérum utilisé est en général du sérum de veau fœtal (SVF), mais d'autres sérums (veau nouveau-né, cheval) sont parfois utilisés. La composition biochimique du sérum n'est pas connue précisément, mais comporte en particulier : sels minéraux, facteurs de croissance, acides aminés, vitamines, sources de carbone, hormones, hémoglobine, albumine, transferrine, immunoglobuline et lactate déshydrogénase (Glassy et al., 1988). Les hormones et facteurs de croissance sont très nombreux et ne sont pas tous identifiés.

En dépit du rôle souvent décisif que joue le sérum dans la croissance cellulaire, son utilisation présente de nombreux inconvénients pour la culture de cellules animales, parmi lesquels (Schütt et al., 1997 – Zang et al., 1995) :

- composition partiellement connue et variable d'un lot à l'autre
- coût élevé
- risques de contamination par des agents infectieux identifiés ou non (virus, mycoplasmes)
- possibilité de présence d'inhibiteurs de croissance, de toxines et de facteurs d'adhérence
- possibilité de présence d'enzymes lytiques
- forte concentration en protéines pouvant rendre difficile les processus de séparation et de purification

DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES

I) Lignée cellulaire

I.1) Caractéristiques

Les cellules nous ont été fournies par le Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire (L.R.G.I.A.) de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

Différents haptènes de structure voisine du TCA ont été synthétisés par le CSIC de Barcelone, puis les lignées d'hybridomes ont été obtenues après immunisation de souris avec des conjugués haptènes-BSA puis fusion, clonage et sélection des clones producteurs d'anticorps anti 2,4,6 trichloroanisole. L'immunisation et la fusion de cellules en vue de l'obtention de lignées d'hybridomes ont été réalisées au Technische Universität München, Allemagne.

Nous avons travaillé avec deux lignées d'hybridomes différentes. La première lignée présentait une instabilité génétique sans doute due au caractère récent de la lignée ainsi qu'un faible pouvoir sécrétoire d'immunoglobulines qui diminuait avec le temps, seule la première expérience concernant le choix du milieu de base a été réalisée avec cette lignée. Par la suite nous avons reçu une deuxième lignée d'hybridomes appelée lignée RAMI I, présentant une meilleure stabilité, avec laquelle toutes les expériences suivantes ont été réalisées.

I.2) Conservation des cellules

I.21) Congélation

Les cellules sont conservées dans de l'azote liquide en cryules contenant environ 5.10^6 à 10.10^6 cellules. Elles sont congelées dans une solution cryoprotectrice dont la composition finale est la suivante :

- 10% (v/v) DMSO (diméthyle sulfoxyde)
- 20% (v/v) SVF
- 70% (v/v) RPMI (milieu de culture + cellules)

Les cellules sont congelées dans un appareil Nicoool LM 10 (produits oxygénés) qui permet une congélation progressive selon le programme suivant : 25 minutes en position 3 (-11.5°C), 10 minutes en position 10 (-61°C) puis immersion pendant une minute dans l'azote liquide. Les cryules sont ensuite stockées dans l'azote liquide à -196°C.

I.22) Décongélation

La décongélation doit être effectuée le plus rapidement possible. La cryule est portée à 37°C dans un bain marie pendant 1 à 2 mn. Son contenu, une fois dégelé, est resuspendu dans 10 mL de milieu frais puis centrifugé de façon à éliminer le surnageant contenant le DMSO, toxique pour les cellules.

Les cellules sont resuspendues ensuite dans 8 mL de milieu frais préchauffé à 37°C et mises en boîte de culture à forte densité (5.10^5 cellules.mL⁻¹) dans une étuve humide à atmosphère régulée à 5% de CO₂.

I.3) Propagation des cellules

La propagation se réalise à partir d'une cryule prélevée sur le stock de cellules congelées de la lignée des hybridomes, en augmentant progressivement le volume de culture jusqu'à ce que le nombre de cellules soit suffisant pour ensemercer un flacon agité ou un réacteur.

I.31) Préculture

Les cellules sont propagées dans des boîtes de culture statiques, appelées flacons de Roux, de différentes tailles suivant les besoins (25, 75 et 175 cm²). Elles peuvent aussi être cultivées en bouteilles roulantes de 750 cm². Les boîtes sont placées dans des incubateurs régulés à 37°C et à 5% de CO₂ (Jouan EG 110IR et Heraus Cytoperm). De manière à permettre les échanges gazeux, les bouchons sont légèrement dévissés à l'intérieur de l'étuve.

Les hybridomes sont ensemencés à 2.10⁵ cellules.mL⁻¹ dans 40 mL de milieu. Les boîtes sont repiquées toutes les 48 heures environ. La lignée d'hybridome étudiée, bien qu'elle soit non support dépendante, peut néanmoins se fixer sur un support lorsqu'elle est cultivée en absence d'agitation (culture en boîte) ou en présence d'une agitation faible (culture en bouteilles roulantes).

Les cellules fixées sont détachées par tapotement de la boîte (la trypsination qui permet une protéolyse n'est pas nécessaire). Le surnageant des boîtes de culture récolté subit une centrifugation à 800 tr/mn pendant 7 à 8 mn dans une centrifugeuse Jouan G4-11 pour éliminer le milieu usagé. Les cellules sont ensuite ensemencées dans du milieu neuf pour une autre culture.

I.32) Numération

Les cellules sont dénombrées par observation microscopique à l'aide d'un hémacytomètre (cellule de Thoma). Les échantillons sont dilués de façon à pouvoir compter de 30 à 150 cellules par grille. Six comptages sont effectués par échantillon de façon à limiter le risque d'erreur qui peut être de l'ordre de 10 à 20%.

La viabilité est déterminée par coloration de la suspension au Bleu Trypan. Cette molécule ne pénétrant à l'intérieur des cellules que si leur membrane est endommagée, on considère que toute cellule colorée est morte. Le comptage est réalisé sur cellule de Thoma dans une solution contenant 10% de Bleu Trypan (Intermed ref 92006323) en volume. Les cellules viables sont réfringentes et apparaissent de couleur jaune au microscope à contrainte de phase, les cellules mortes apparaissent en bleu.

I.33) Détection des contaminants

A petite échelle, la présence de bactéries est évitée par l'adjonction d'antibiotiques. Leur détection ainsi que celle des contaminants fongiques sont réalisées par observation microscopique.

II) Milieux de culture

II.1) Composition du milieu de base RPMI 1640 et du milieu α MEM

Le milieu de base utilisé pour cultiver la lignée d'hybridomes est le milieu RPMI-1640. Cependant le milieu α MEM est le plus couramment utilisé au sein de notre laboratoire. Il nous a paru intéressant de tester ce milieu afin d'observer si l'on pouvait remplacer le milieu RPMI 1640 par celui-ci. La composition de ces deux milieux est présentée dans le tableau I.

Ces deux milieux sont commercialisés sous forme de poudre et doivent être reconstitués dans de l'eau ultra-pure et tamponnés par du bicarbonate de sodium. Le pH est ajusté par de la soude 1N. Le milieu ainsi préparé est filtré stérilement sur une cartouche de filtration Sartorius de porosité 0.22 μ m et stocké dans des bouteilles stériles à +4°C.

	Composants	RPMI 1640 (mg.L⁻¹)	αMEM (mg.L⁻¹)	
Sels inorganiques	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	100	0	
	CaCl ₂ (anhyd.)	0	200	
	KCl	400	400	
	MgSO ₄ (anhyd.)	0	97.67	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	100	0	
	NaCl	6000	6800	
	NaHCO ₃	2000	0	
	Na ₂ HPO ₄ (anhyd.)	800	0	
	Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	0	140	
	Autres composants	D-Glucose	2000	1000
		Acide Thiocétique	0	0.20
		Glutathione (réduit)	1	0
Rouge de Phénol		5	10	
Pyruvate de Sodium		0	110	
Acides aminés		L-Alanine	0	25
		L-Arginine (base libre)	200	126.98
		L-Asparagine (base libre)	50	50
		Acide L-Aspartique	20	30
		L-Cystine	50	0
		L-Cystine.2HCl	0	31.28
		L-Cystéine HCl	0	100
	Acide L-Glutamique	20	75	
	L-Glutamine	0	292	
	Glycine	10	50	
	L-Histidine (base libre)	15	41.88	
	L-Hydroxyproline	20	0	
L-Isoleucine	50	52.40		
L-Leucine	50	52.40		
L-Lysine.HCL	40	72.47		
L-Méthionine	15	15		
L-Phénylalanine	15	32		

	L-Proline	20	40
	L-Sérine	30	25
	L-Thréonine	20	48
	L-Tryptophane	5	10
	L-Tyrosine	20	52.09
	L-Valine	20	46
Vitamines	D-Biotine	0.20	0.10
	Acide L-ascorbique	0	50
	Pantothénate de Calcium D	0.25	1
	Chlorure de choline	3	1
	Acide Folique	1	1
	i-Inositol	35	2
	Nicotinamide	1	1
	Acide Para- aminobenzoïque	1	0
	Pyridoxal HCl	1	1
	Riboflavine	0.20	0.10
	Thiamine HCl	1	1
	Vitamine B ₁₂	0.005	1.36

Tableau 1 : Composition du milieu RPMI-1640 (GibcoBRL – ref.31870) et du milieu α MEM (GibcoBRL – ref.11900).

II.2) Suppléments standards du milieu de base

II.21) Sérum de veau fœtal (SVF)

Le sérum est stocké à -20°C. Il est décongelé et décomplémenté par chauffage au bain-marie à 56°C pendant 30 mn en l'agitant périodiquement de manière à limiter l'apparition de précipités protéiques avant utilisation. Il est ajouté au milieu de base au taux de 10% (v/v) en conditions normales de culture.

II.22) Glutamine

La glutamine 200 mM (Intermed réf.92 000 282) est ajoutée au milieu, juste avant la culture, à une concentration de 2 mM.

II.3) Autres suppléments

Afin d'améliorer la production des ACM et la croissance cellulaire au cours des expérimentations, nous avons voulu observer l'impact de certaines sources azotées (acides aminés essentiels et non essentiels, l'hydrolysate de colza, la carnosine) et du butyrate de sodium sur les hybridomes.

II.31) Acides aminés essentiels et non essentiels

Deux solutions concentrées stériles (Gibco) ont été utilisées :

- des acides aminés essentiels (réf. 043-01130) : Arginine (Arg ou R), Cystéine (Cys ou C), Histidine (His ou H), Isoleucine (Ile ou I), Leucine (Leu ou L), Lysine (Lys ou K), Méthionine (Met ou M), Phénylalanine (Phe ou F), Thréonine (Thr ou T), Tryptophane (Trp ou W), Tyrosine (Tyr ou Y) et Valine (Val ou V).
- des acides aminés non essentiels (réf 043-01140) : Alanine (Ala ou A), Asparagine (Asp ou N), acide Aspartique (Asp ou D), acide Glutamique (Glu ou E), Glycine (Gly ou G), Proline (Pro ou P) et Sérine (Ser ou S).

L'enrichissement du milieu en acides aminés a été réalisé par addition d'une solution concentrée d'acides aminés essentiels (2% v/v) et d'une solution d'acides aminés non essentiels (1% v/v).

II.32) Hydrolysate de protéines de colza

Les hydrolysats de protéines peuvent être incorporés dans les milieux de culture pour remplacer partiellement le sérum. Ils sont une source peu onéreuse d'acides aminés pour les milieux de culture.

L'hydrolysate de protéines de colza est obtenu à partir de farine de tourteau de colza (extractions alcalines suivies d'une précipitation acide puis d'hydrolyses enzymatiques). Il est stérilisé par une filtration à 0.2 μm avant d'être introduit dans le milieu de culture à la concentration de 8 g.L^{-1} .

II.33) Carnosine

Il s'agit du dipeptide β -alanyl-L-histidine, molécule naturelle trouvée dans le muscle squelettique et dans le cerveau. Des taux élevés de carnosine sont présents dans les cellules à longue durée de vie comme les neurones.

Il nous a semblé intéressant de tester ce dipeptide dans le but d'observer son action sur la durée de vie des hybridomes. L'enrichissement du milieu a été réalisé à une concentration de 50 mM de carnosine.

II.34) Butyrate de sodium

Afin d'optimiser la production d'une protéine, il est possible d'ajouter au milieu de culture des inducteurs protéiques ou des stimulateurs chimiques de la synthèse de la protéine recherchée. Parmi ces agents, se trouve notamment, le butyrate de sodium qui a été identifié comme stimulant la production d'ACM pour diverses lignées d'hybridomes (Field et Brown, 1990), en facilitant l'accès de l'ADN cellulaire à l'ARN polymérase (Oh et al., 1993).

Le butyrate de sodium est ajouté dans le milieu de culture à la concentration de 1 mM à partir d'une solution concentrée et stérile de 150 mM (Fluka, Réf. 19364). Il a été démontré que l'addition de 1 mM au cours de la phase de prolifération des cellules viables permettrait d'augmenter considérablement la production d'ACM sans affecter de façon notable la croissance cellulaire (Dardenne, 1995) et (Cherlet et al., 1995).

III) Systèmes de culture

III.1) Culture statique

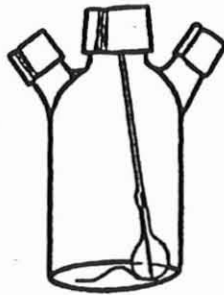
Comme nous l'avons décrit précédemment, les cellules peuvent être multipliées en boîtes ou en bouteilles roulantes avant d'être utilisées pour ensemercer les flacons agités ou les réacteurs.

III.2) Culture en flacons agités

Ce sont en fait des mini-réacteurs de 200 à 250 mL de volume utile. Leur mise en œuvre est rapide et aisée car elle nécessite de faibles quantités de milieu et de cellules ce qui permet de réaliser en parallèle des études comparatives, comme par exemple, l'étude de l'influence de différentes concentrations initiales d'un substrat sur la prolifération cellulaire.

III. 21) Description

Les flacons agités sont des flacons cylindriques en verre borosilicaté pourvus d'une tige aimantée centrale de marque Techne.



Les flacons sont placés sur un agitateur magnétique (Techne MCS 1045) à l'intérieur d'une étuve régulée à 37°C et 5% de CO₂ (Jouan EG 110 IR). L'agitation est maintenue à 35 rpm.

III.22) Système d'aération

Les flacons sont pourvus de deux bouchons latéraux qui restent légèrement dévissés à l'intérieur de l'étuve et permettent les échanges gazeux. L'oxygénation des cultures se fait par transfert à l'interface liquide-gaz.

III.23) Régulation de pH

Le pH du milieu est contrôlé par le CO₂ régulé à l'intérieur de l'étuve. Le bicarbonate contenu dans le milieu joue le rôle de tampon pH. Toutefois, il est souvent nécessaire de réajuster le pH qui a tendance à baisser en cours de culture.

L'acidification est surveillée hors ligne par l'ajout manuel quotidien de 0.5 à 1 mL de NaOH 0.1 N lors des prélèvements. La variation de pH dans les flacons n'excède pas de cette façon 0.2 unités pH.

III.3) Culture en bioréacteur régulé et parfaitement agité

III.31) Descriptif du bioréacteur

Le réacteur utilisé de marque Sétric Génie Industriel a un volume de 4 litres (volume utile : 2 litres), la configuration générale étant présentée figure 1. La vitesse d'agitation a été fixée à 50 tr/mn afin d'éviter la formation d'agrégats d'une part et des contraintes de cisaillement trop fortes d'autre part. Le réacteur contenant du PBS est stérilisé par autoclavage (30 minutes, 121°C, 1 bar). Le PBS est soutiré stérilement avant ensemencement.

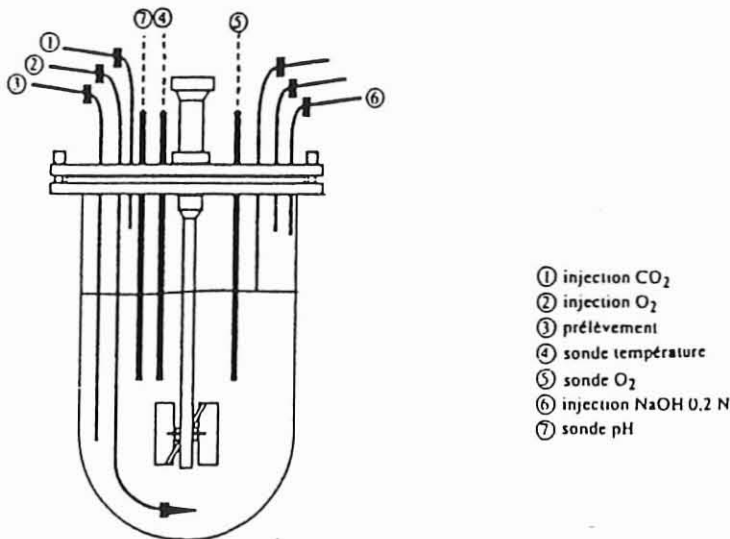


Figure 1 : Représentation schématique du type de bioréacteur utilisé.

A. Régulation du pH :

Le pH est contrôlé en ligne par un système de régulation de type PID (Proportionnelle-Intégrale-Dérivée) couplé à une sonde de mesure de pH stérilisable (Ingold). L'étalonnage de

la sonde est réalisée avant la stérilisation grâce à des solutions standards de pH 4 et 7. Le système de régulation PID commande l'arrivée d'acide, en l'occurrence le CO_2 pour la dissociation de H_2CO_3 en H^+ et HCO_3^- si le pH mesuré est supérieur à la valeur de consigne (7.2). Dans le cas contraire la régulation actionne l'injection de soude 0.2 N dans le réacteur à l'aide d'une pompe péristaltique.

B. Régulation de l'oxygène dissous :

L'oxygène dissous (pO_2) est aussi contrôlé en ligne par un système PID couplé à une sonde stérilisable (Ingold). La sonde mesurant la pression d'oxygène dissous est étalonnée avant stérilisation. Les valeurs 0% et 100% sont obtenues en plaçant la sonde dans un flux d'azote puis d'air. Pendant les cultures, l'aération est assurée en fond de cuve par un diffuseur d'air (sparger). L'injection d'air est soumise à l'ouverture d'une électrovanne pilotée par le système PID. La valeur de la consigne de pO_2 était fixée à 50% pour la culture de cette étude.

C. Régulation de la température :

La température est maintenue à 37°C dans le réacteur par un système de circulation d'eau dans une épingle plongeant dans la cuve et reliée à un bain-marie régulé à 40°C .

III.32) Culture en mode discontinu

Les cultures de cette étude ont été réalisées selon un mode discontinu, c'est-à-dire dans un réacteur fermé. Ainsi, après ensemencement, aucun ajout ni soutirage de milieu n'est réalisé, à l'exception de la prise d'échantillons. La température, le pH et la pO_2 sont régulés. Le PBS présent dans le réacteur pour l'autoclavage est évacué par surpression à l'aide d'air stérile. L'ensemencement est réalisé en injectant stérilement dans le réacteur le milieu frais contenant les cellules par surpression à l'aide d'air contenant 5% de CO_2 . Durant les quinze premières heures de culture, l'ajout de CO_2 est privilégié. Ensuite, seul intervient l'ajout de soude en raison de la tendance du métabolisme cellulaire à acidifier le milieu par libération d'acide lactique en particulier. Des prélèvements sont effectués deux fois par jour, afin de permettre les comptages cellulaires et les dosages des différents composés du milieu.

IV) Dosage des différents composants du milieu

Les différentes analyses qui sont effectuées à partir des échantillons prélevés sont représentées dans la figure 2.

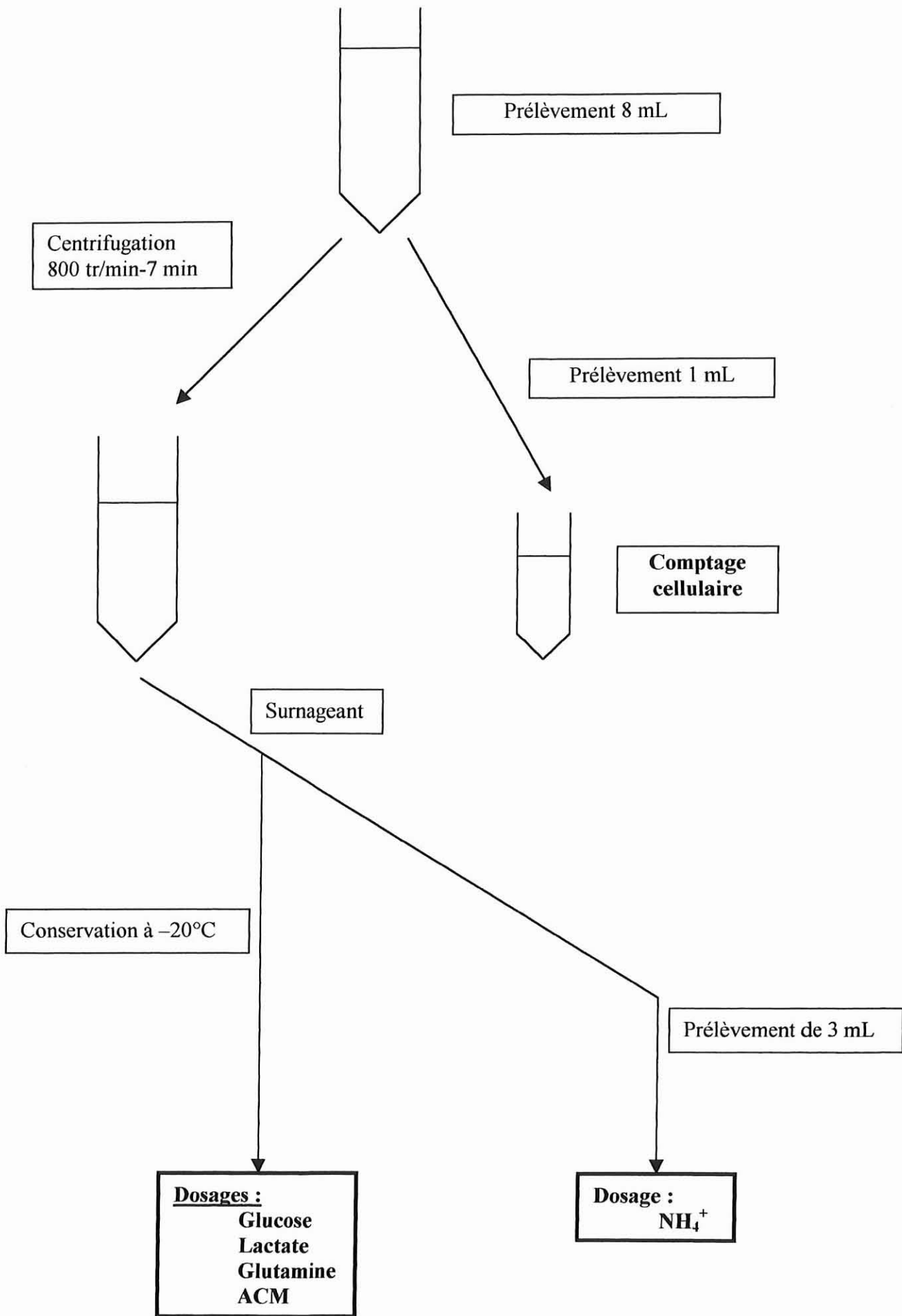


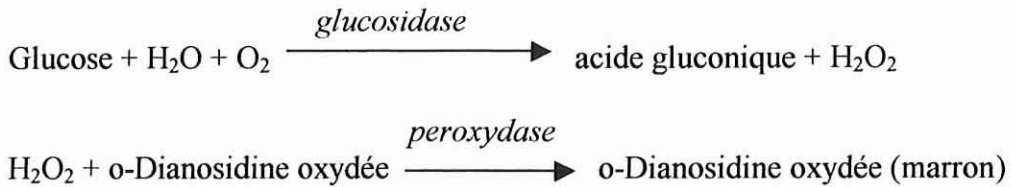
Figure 2 : Prélèvement et analyse des échantillons lors des cultures.

IV.1) Dosages enzymatiques du glucose, de la glutamine et du lactate.

Le glucose, le lactate et la glutamine sont dosés enzymatiquement. Pour chaque essai, une gamme d'étalonnage est réalisée avec des solutions de concentrations connues.

A. Dosage du glucose :

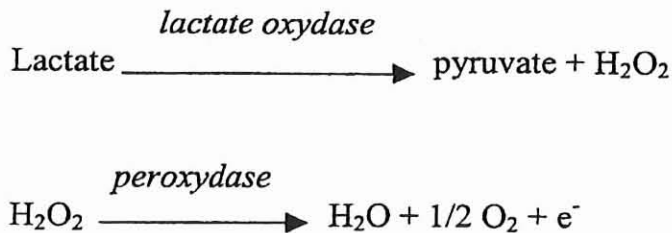
Le dosage du glucose est réalisé par méthode enzymatique à l'aide du kit commercial SIGMA Diagnostics (réf 510-A) sur plaques de microtitration de 96 puits. Le principe du dosage est le suivant :



L'intensité de la couleur marron mesurée à 540 nm est proportionnelle à la concentration de glucose. Les enzymes agissent pendant 30 minutes à 37°C.

B. Dosage du lactate :

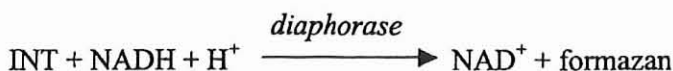
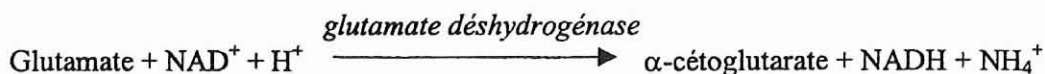
Le lactate est dosé par méthode enzymatique à l'aide du kit commercial Sigma (réf. 735-10). Son principe est le suivant :



L'électron libéré oxyde un substrat chromogène pour produire une coloration mesurée à 540 nm. L'erreur de dosage est de 10 à 20% (Cherlet, 1995).

C. Dosage de la glutamine :

La glutamine est d'abord transformée en glutamate à l'aide d'une asparaginase. Le glutamate formé est dosé par méthode enzymatique à l'aide du kit commercial Boehringer Mannheim (réf 139092). Les réactions du dosage du glutamate sont les suivantes :



(INT : chlorure d'iodonitrotétrazolium)

L'apparition de formazan est détectée à 492 nm sur spectrophotomètre Multiskan MCC/340 Titertek. La concentration en glutamine est déterminée par différence, en dosant d'une part le glutamate seul, et d'autre part l'ensemble glutamate et glutamine après transformation par l'asparaginase (Boehringer Mannheim – réf. 102 903). L'erreur de dosage est de l'ordre de 20% (Cherlet, 1995).

IV.2) Dosage des ions ammonium

Le dosage des ions ammonium est réalisé grâce à une électrode à diffusion gazeuse (Orion). En milieu très alcalin, les ions ammonium du milieu sont transformés en ammoniac gazeux selon la réaction suivante :



L'équilibre est déplacé vers la droite par addition de 3 mL de soude 0.2 N à 3 mL de l'échantillon à analyser. Le pH final du mélange est de 12. L'ammoniac formé diffuse à travers la membrane perméable de l'électrode et entraîne une variation de potentiel selon la loi de Nernst : $E = E_0 - S \cdot \log[\text{NH}_3]$, où E_0 est le potentiel de référence (ordonnée à l'origine) et S est la pente de la courbe d'étalonnage. Celle-ci est réalisée avec des solutions NH_4Cl de molarité connue en traçant $\log[\text{NH}_4\text{Cl}]$ en fonction du potentiel de l'électrode (mV). L'erreur de dosage est de 10% (Cherlet, 1995).

IV.3) Analyse des anticorps monoclonaux par test ELISA

IV.31) Réactifs

✓ PBS 1X	1)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ H_2O	10.027 g QSP 700 mL
	2)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ H_2O	2.1856 g QSP 350 mL

NaCl 8.5 g

Ajouter 2 à la solution 1 jusqu'à pH=7.2, puis ajouter le NaCl en poudre.

✓ PBS 5X.	1)	Na ₂ HPO ₄ ,12H ₂ O	50.135 g
		H ₂ O	QSP 700 mL
	2)	NaH ₂ PO ₄ ,2H ₂ O	10.928 g
		H ₂ O	QSP 350 mL
		NaCl	42.5 g

Ajouter 2 à la solution 1 jusqu'à pH=7.2, puis ajouter le NaCl en poudre.

✓ Tampon carbonate pH=9.6.

1)	NaHCO ₃	2.9403 g
	H ₂ O	QSP 700 mL
2)	Na ₂ CO ₃	1.8548 g
	H ₂ O	QSP 350 mL

Ajouter la solution 2 à 1 jusqu'à pH=9.6

✓ Chromogène.

Solution du substrat chromogène 1.

TMB (3,3',5,5'-Tetraméthylbenzidine Sigma T-2885)	28.8 mg
DMSO (Diméthylsulfoxyde Sigma D-8779)	10 mL
H ₃ PO ₄ 85%	50 µL
Pénicilline G (Sigma P-3032)	1.2 mg
H ₂ O distillée	QSP 100 mL

Tampon pour le chromogène 2.

Na ₂ HPO ₄ ,12H ₂ O	125 mg
NaH ₂ PO ₄ ,2H ₂ O	2.059 g
Urea hydrogen peroxide (Sigma U-1753)	28.2 mg
H ₂ O distillée	QSP 100 mL

Pour le test préparer extemporanément 1 volume de la solution de substrat (1) + 2 volumes de tampon (2).

✓ Immunsérum de chèvre anti IgG de souris marqué à la peroxydase (SIGMA réf. A-0168).

✓ Haptènes A,B ou C couplés à l'albumine de sérum bovin (fournis par le L.R.G.I.A. de l'Université Claude bernard Lyon 1).

✓ Albumine de sérum bovin (SIGMA) en solution à 2% dans du PBS .

✓ Tween 20 (SIGMA réf. P-1379).

✓ IgG anti-souris non marqués SIGMA M_3014

✓ IgG souris purifiés SIGMA I-5381

IV.32) Mode opératoire 1

Il s'agit du premier mode opératoire utilisé pour lequel nous ne possédions pas de gamme étalon. Un seul dosage d'anticorps a été réalisé avec ce mode opératoire puis ensuite nous avons travaillé sur le deuxième mode opératoire. Son principe est représenté sur la figure 3.

- Fixation des haptènes sur les microplaques (coating) :

- ✓ dilution de l'haptène couplé à la BSA dans du tampon carbonate pH=9.6 pour obtenir une concentration de 5 µg/mL et répartition dans les plaques à raison de 200 µL par puits.

- ✓ incubation une nuit à 4°C.

- ✓ rinçage des plaques par du tampon PBS-Tween (200 ml tampon PBS 5X qsp 1 litre + 0.5 mL Tween 20) avec 3 lavages.

- Saturation des sites non spécifiques :

- ✓ répartition de 200 µL par puits de BSA à 2% dans du PBS.

- ✓ incubation une nuit à 4°C.

- ✓ rinçage des plaques par du tampon PBS-Tween avec 3 lavages.

A ce niveau, les plaques ont été congelées.

- Réaction Antigène-Anticorps :

- ✓ ajout par puits de 100 µL PBS 1X + 100 µL de surnageant de culture.

- ✓ incubation 1 heure à 4°C.

- ✓ rinçage des plaques par du tampon PBS-Tween avec 3 lavages.

- ✓ ajout de 200 µL par puits de l'immunsérum marqué à la peroxydase (dilué au 1/20000 dans du PBS 1X).

- ✓ rinçage des plaques par du tampon PBS-Tween avec 3 lavages.

- Révélation du complexe Antigène-Anticorps :

- ✓ ajout de 200 µL par puits de la solution de chromogène (2 vol de tampon chromogène + 1 vol de solution de substrat).

- ✓ attendre 30 mn à température ambiante.

- ✓ arrêt de la réaction avec 100 µL de H₂SO₄ 1M.

- ✓ lecture des densités optiques sur un lecteur de microplaques (à 450 nm).

IV.33) Mode opératoire 2

Le principe de ce mode opératoire est représenté sur la figure 3. Il s'agit du mode opératoire avec lequel la majorité des dosages ont été effectués.

- Fixation des IgG anti-souris non marqués sur les microplaques (coating) :
 - ✓ dilution au 1/10000 des IgG anti-souris non marqués dans du tampon carbonate pH=9.6 et répartition dans les plaques à raison de 200 μ L par puits.
 - ✓ incubation une nuit à 4°C.
 - ✓ rinçage des plaques par du tampon PBS-Tween (200 mL tampon PBS 5X qsp 1 litre + 0.5 mL Tween 20) avec 3 lavages.

- Saturation des sites non spécifiques :
 - ✓ répartition de 300 μ L par puits de BSA à 2% dans du PBS1X.
 - ✓ incubation 2 h 30 à température ambiante.
 - ✓ rinçage des plaques par du tampon PBS-Tween avec 3 lavages.

- Réaction immune primaire :
 - ✓ préparation de la gamme étalon en réalisant une dilution dans du PBS 1X (1/10000 à 1/3200000) des IgG purifiés de souris.
 - ✓ ajout de 200 μ L par puits de l'étalon et du surnageant cellulaire.
 - ✓ incubation 1 heure à température ambiante.
 - ✓ rinçage des plaques par du tampon PBS-Tween avec 3 lavages.
 - ✓ ajout de 200 μ L par puits de l'immunsérum marqué à la peroxydase (dilué au 1/20000 dans du PBS 1X).
 - ✓ incubation 1 heure à température ambiante.
 - ✓ rinçage des plaques par du tampon PBS-Tween avec 3 lavages.

- Révélation du complexe Antigène-Anticorps :
 - ✓ ajout de 200 μ L par puits de la solution de chromogène (2 vol de tampon chromogène + 1 vol de solution de substrat).
 - ✓ attendre 30 mn à température ambiante.
 - ✓ arrêt de la réaction avec 100 μ L de H₂SO₄ 1M.
 - ✓ lecture des densités optiques sur un lecteur de microplaques (à 450 nm).

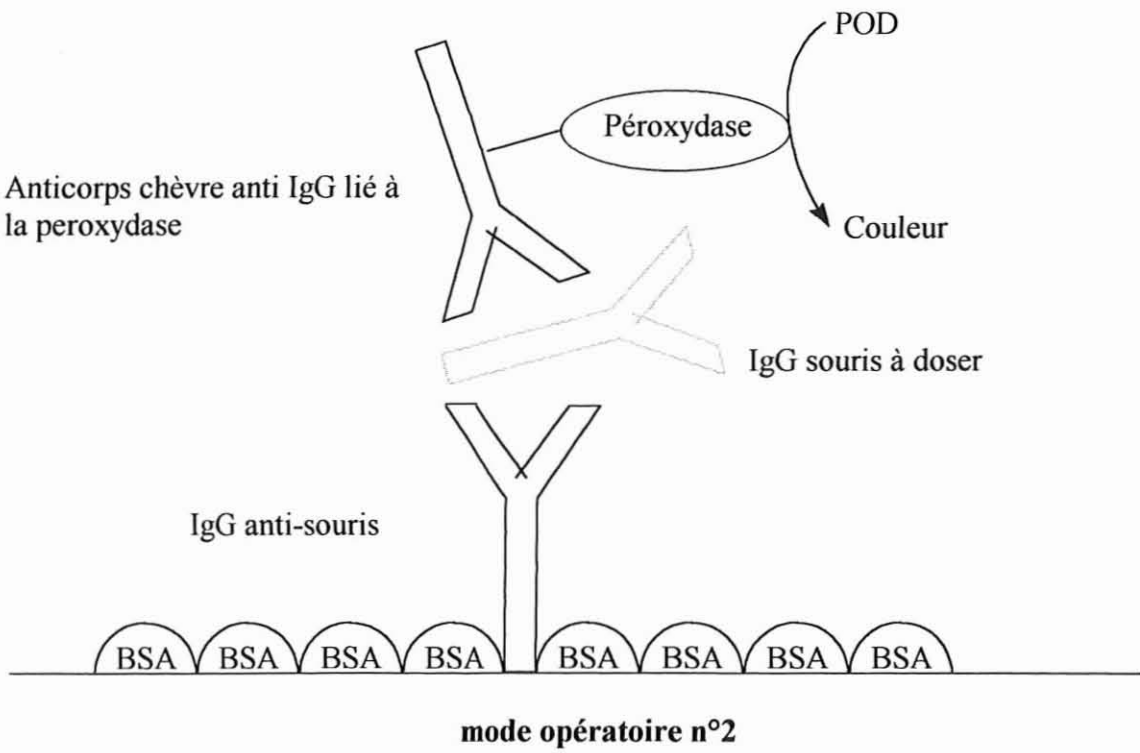
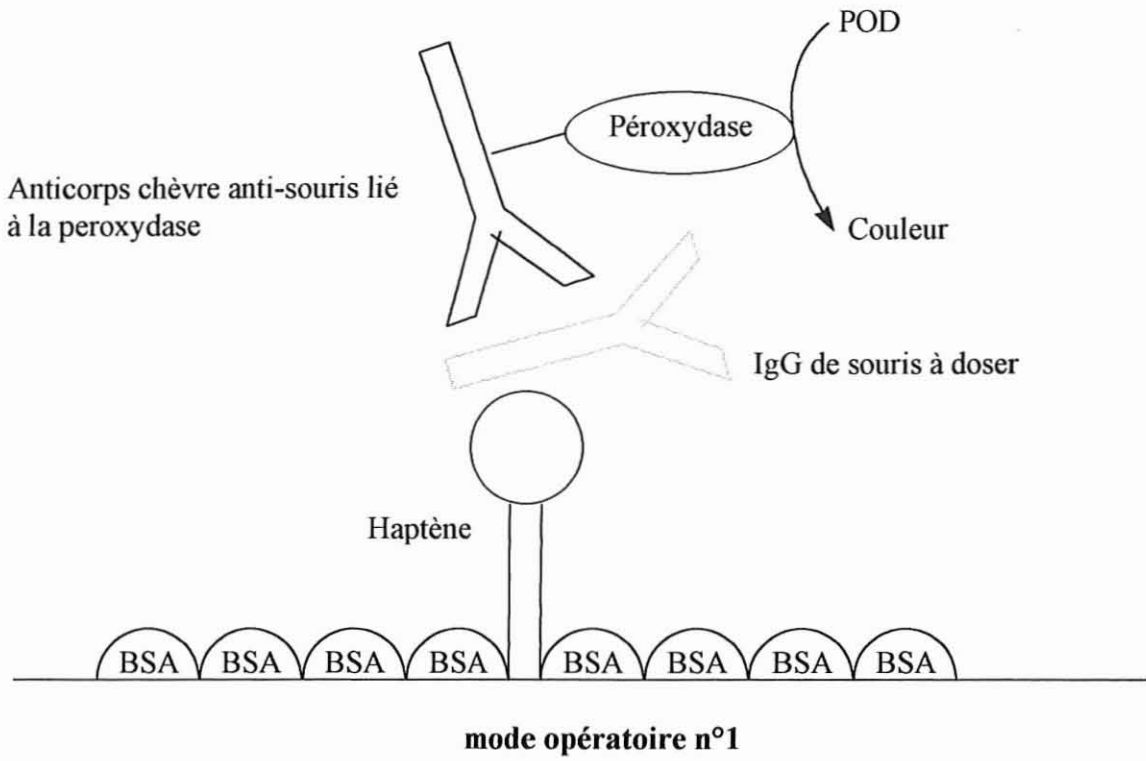


Figure 3 : Principe de la méthode ELISA pour le dosage des anticorps

V) Exploitation des résultats

V.1) Vitesses spécifiques de croissance et de décès cellulaires.

En faisant l'hypothèse de l'absence de lyse cellulaire, les bilans de matière sur les cellules vivantes et mortes sont réduits à leur plus simple expression en réacteur fermé et conduisent directement aux vitesses de croissance et de décès cellulaire : r_x et r_d , X_m étant la concentration de cellules mortes (colorées par le bleu de trypan) :

$$r_x - r_d = dX_v/dt \quad \text{et} \quad r_d = dX_m/dt$$

$\mu_{\text{réel}}$, μ_{app} et k_d sont respectivement les vitesses spécifiques de croissance réelle, apparente et de décès cellulaire. Elles sont définies par :

$$\begin{aligned} \mu_{\text{réel}} &= r_x / X_v & \text{et} & & k_d &= r_d / X_v \\ \text{avec } \mu_{\text{app}} &= \mu_{\text{réel}} - k_d = (1/X_v) \cdot (dX_v/dt) \end{aligned}$$

La vitesse spécifique maximale peut aussi être calculée en traçant les logarithmes des valeurs des comptages cellulaires sur la période de croissance exponentielle en fonction du temps. Cette valeur globale correspond à la pente de la droite obtenue en représentant la concentration cellulaire en fonction du temps sur une échelle semi-logarithmique.

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{\text{max}}(t - t_0)$$

V.2) Vitesses spécifiques de consommation des substrats et de formation des produits

r_s et r_p sont respectivement les vitesses de consommation d'un substrat S et de formation d'un produit P par unité de volume et à un temps t. En réacteur fermé, elles sont égales à :

$$r_s = dS/dt \quad \text{et} \quad r_p = dP/dt$$

Les vitesses spécifiques correspondantes sont données par :

$$q_s = r_s / X_v \quad \text{et} \quad q_p = r_p / X_v$$

V.3) Rendement

Le rendement $Y_{P/S}$ définit la quantité de produit P formé par quantité de substrat S consommé. En mode discontinu, les calculs sont basés sur les courbes d'évolution du substrat S et du produit P. Le rendement instantané renseigne sur la stœchiométrie de la réaction. Il est calculé entre un instant donné t et le temps initial t_i de la manière suivante :

$$Y_{P/S}^t = (P^t - P^{t_i}) / (S^{t_i} - S^t)$$

VI) Mise en œuvre et validation d'un cytotoculteur

Le cytotoculteur utilisé dans cette étude, représenté dans la figure 4, de marque Sétic Génie Industriel, est couplé à un ensemble de mesures et de régulations, composé de plusieurs modules assurant les fonctions suivantes :

- ✓ régulation de la vitesse d'agitation.
- ✓ mesure et régulation de température.
- ✓ mesure et régulation du pH.
- ✓ mesure et régulation de l'oxygène dissous.

Afin de pouvoir conduire des cultures de façon satisfaisante, il est nécessaire de s'assurer auparavant du bon fonctionnement des différentes sondes et des systèmes de régulation du bioréacteur. Pour cela, des procédures d'étalonnage, propres à chaque type de sonde, et des comparaisons régulières au cours du temps avec des valeurs de référence permettent de vérifier la qualité des différents éléments du système de mesures et de régulations.

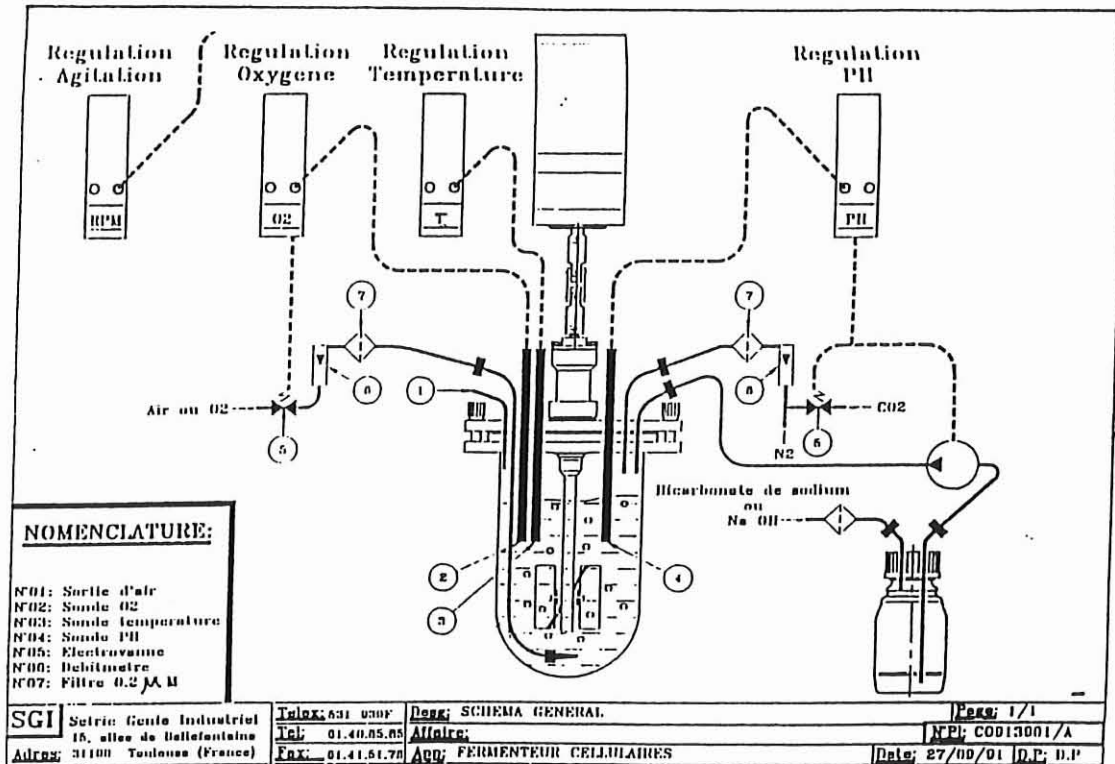


Figure 4 : Représentation schématique du type de réacteur utilisé et de ses différentes régulations.

VI.1) Sonde de mesure et système de régulation du pH

La sonde de pH, stérilisable (Ingold), est une électrode combinée, représentée dans la figure 5, constituée d'une chaîne de mesure de pH comprenant une électrode de verre et une électrode de référence. Elle est utilisée avec un électrolyte argent/chlorure d'argent.

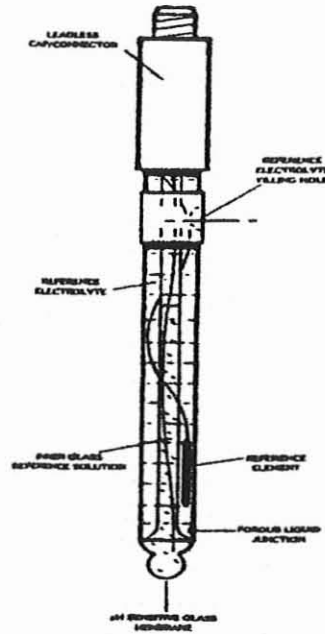


Figure 5 : Exemple d'électrode combinée de mesure de pH.

Le point zéro (valeur du pH, ici pH 7, pour laquelle la tension de la chaîne de mesure est nulle) et la pente sont des caractéristiques d'étalonnage sujettes à de légères variations pour des raisons de fabrication. L'électrode de pH doit donc être étalonnée périodiquement (la fréquence étant fonction des conditions d'utilisation) au moyen de solutions tampons définies exactement.

Un étalonnage exact suppose que l'on dispose de deux solutions tampons choisies en fonction de la plage de pH et de la précision souhaitée. La valeur de la première solution tampon doit se trouver près du point zéro, qui correspond ici à pH 7.0. La seconde solution tampon devrait avoir une valeur différant d'au moins 2 unités de pH et se trouvant près ou à l'intérieur de la plage de mesure prévue. Ici, la pente est fixée par une solution tampon de pH 4.0.

Procédure d'étalonnage :

L'étalonnage du point zéro s'effectue en plongeant l'électrode dans la solution tampon de pH 7.0 (Schott-Geräte – ref. 000508/A). Dès que l'indication est stable, le pH-mètre est réglé sur pH 7.0. Après avoir rincé la sonde avec de l'eau distillée, l'avoir séchée en la tamponnant avec du papier absorbant, la pente est étalonnée avec la deuxième solution tampon, de pH 4.0 (Schott-Geräte – ref 000509/A) par l'intermédiaire du potentiomètre de pente. Enfin, l'étalonnage du point zéro est répété pour vérifier l'exactitude des mesures. Pour réaliser un étalonnage correct, il est important de ne pas intervertir la séquence ci-dessus.

Stabilité de la sonde pH :

Le système de régulation de pH, de type PID, a aussi été vérifié en s'assurant que tout écart à la valeur de consigne déclenchait systématiquement la mise en route d'une compensation adéquate. La régulation acide est assurée par l'ajout de CO₂ dans la phase liquide par l'intermédiaire d'une électrovanne, de type EVG7F, fonctionnant en tout ou rien (au niveau du débit, fixé à 5 L.h⁻¹ sur un débit-mètre couplé). L'action du régulateur sur l'électrovanne étant proportionnelle, les temps d'ouverture et de fermeture varient en fonction de l'écart entre la mesure et la consigne. La régulation basique se fait par ajout de soude 0.2N par une pompe péristaltique de type PAP 7F, composée d'un moteur et d'une tête de pompe Watson Marlow.

Il est intéressant de noter également que le milieu de culture contient un indicateur de pH, le rouge de phénol, dont la couleur permet de visualiser facilement un éventuel écart de pH lié à une dérive de la sonde.

VI.2) Sonde de mesure et système de régulation de l'oxygène dissous

La sonde O₂, stérilisable, de marque Ingold (diamètre : 19 mm – ref 32 275 6702), est une électrode polarographique représentée sur la figure 6. Son étalonnage doit être réalisé régulièrement (fréquence fonction du type d'utilisation) afin de limiter toute dérive trop importante. Pour cela, la sonde est placée directement dans un flux d'air afin de déterminer le point correspondant à une saturation en O₂ dans l'air de 100%. Ensuite, la valeur 0% de saturation est obtenue grâce à un flux d'azote pur. L'étalonnage du point 100% doit être enfin répété pour vérifier l'exactitude des mesures effectuées par l'électrode. Ces valeurs de 0% et 100% sont retrouvées en milieu liquide lorsque l'on fait barboter de l'azote et de l'air dans le réacteur contenant du PBS ou du milieu de culture.

Il est important de savoir qu'en cas de déconnexion, l'électrode à O₂ nécessite un temps de polarisation de 6 heures minimum après connexion, et que par conséquent, un étalonnage correct ne peut être obtenu avant ce délai.

Des tests au cours du temps ont été aussi effectués pour garantir la fiabilité des mesures pendant toute la durée d'une culture discontinue. Ils n'ont pas révélé d'écarts supérieurs à 5% par rapport aux deux valeurs d'étalonnage, ce qui est très acceptable compte tenu du large intervalle d'aération (50-80%) toléré par les cellules animales en culture.

Le système de régulation, également de type PID, a aussi été vérifié : toute mesure inférieure à la consigne (50%) déclenchait bien l'injection d'oxygène par l'intermédiaire d'une électrovanne de type EVG7F et d'un débit-mètre réglé sur 5 L.h⁻¹.

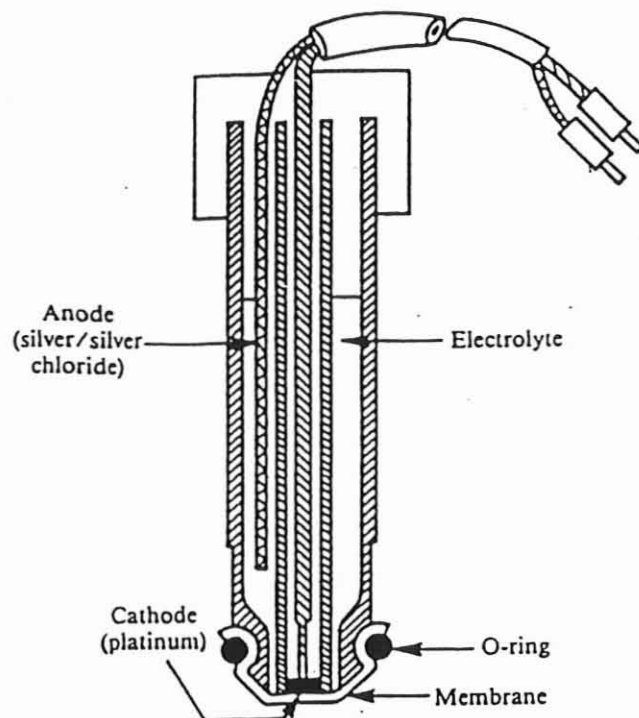


Figure 6 : Electrode polarigraphique pour la mesure d'oxygène dissous.

VI.3) Sonde de mesure et système de régulation de la température

La sonde de température est un capteur absolu semi-conducteur AD 590 (thermistance). Son étalonnage est effectué par comparaison avec un thermomètre introduit dans le réacteur contenant de l'eau.

En ce qui concerne la régulation de la température, l'épingle plongeant dans la cuve a été reliée à un bain-marie maintenu à une température de 40°C, afin de compenser les pertes de chaleur du réacteur.

VI.4) Régulation de la vitesse d'agitation

La vitesse de rotation de la turbine à pales inclinées est fixée sur le variateur de vitesse, à 50 tr/mn afin d'éviter à la fois la formation d'agrégats (en cas d'agitation trop faible) et l'altération des cellules par cisaillement (si les contraintes sont trop importantes).

Le moteur est équipé d'un système de mesure de la vitesse qui permet de transformer le variateur en régulateur par connexion à l'ensemble de régulation du réacteur. Il est alors possible de moduler la vitesse d'agitation en fonction du taux d'O₂ dissous dans le milieu de culture.

VI.5) Stérilisation du milieu de culture

Une fois reconstitué, le milieu de base est filtré stérilement à l'aide d'une cartouche de filtration Sartorius autoclavable de porosité 0.22 μm (Sartobran – ref 5231307H9P-00-A).

Le sérum de veau fœtal et la glutamine, ajoutés ultérieurement au milieu de base, sont maintenus stériles pendant toute la durée de leur utilisation (manipulations sous hotte à flux laminaire).

VI.6) Nettoyage et stérilisation du réacteur

A la fin de chaque culture, l'ensemble du réacteur doit être nettoyé afin d'éliminer toute trace organique d'agrégats cellulaires ou de milieu biologique, les protéines ayant tendance à précipiter. Pour cela, la cuve et les différents éléments associés, tels que la turbine d'agitation, le diffuseur d'air, les joints d'étanchéité, les tuyaux servant pour les prises d'échantillon ou l'apport de soude, sont traités avec un détergent-désinfectant, Indulfan (Paragerm), à base de formaldéhyde, de glyoxal et de dérivés cationiques. L'eau de javel (HOCL) peut aussi être utilisée dans un but de désinfection.

Afin d'éviter toute contamination de bactéries ou de levures, le réacteur doit être stérilisé avant chaque nouvelle culture.

Procédure de stérilisation :

Il est nécessaire d'étalonner les sondes (pH, O₂ et température) avant de les déconnecter et de repositionner leur capuchon protecteur. Il faut aussi protéger les filtres (Millipore – 0.22 μm), servant à stériliser les arrivées de gaz (O₂ et CO₂), de l'humidité régnant dans l'autoclave de stérilisation au moyen de feuilles d'aluminium et en clampant le tuyau les reliant au réacteur. Au moins une communication entre l'intérieur et l'extérieur du réacteur doit être maintenue ouverte afin de ne pas créer de surpression liée à l'augmentation de température durant la stérilisation.

Le réacteur, contenant du PBS, est ensuite introduit dans l'autoclave. Le programme de stérilisation permet de maintenir une température de 121°C pendant 20 minutes minimum, la pression restant égale à 1 bar. Le PBS joue ici le rôle de solution tampon, car son pH de 7.4 reste stable au cours de l'autoclavage et permet donc de vérifier la stabilité de la sonde pH juste avant l'ensemencement (le maintien de la stérilité dans le réacteur ne permettant plus l'étalonnage de la sonde).

VI.7) Ensemencement du réacteur

L'introduction dans le réacteur des cellules en suspension dans le milieu de culture doit être réalisée en maintenant des conditions de stérilité parfaites à l'intérieur du réacteur.

Dans un premier temps, le PBS est éliminé en fond de cuve par un tuyau de soutirage, en appliquant une surpression d'air filtré, par le ciel du réacteur. Le récipient contenant la

suspension cellulaire est ensuite relié à une entrée du réacteur. Un autre système de surpression permet le passage des cellules de leur récipient d'origine vers l'intérieur du réacteur.

VI.8) Prélèvement des échantillons stériles

La prise d'échantillon communique avec le réacteur par un tube plongeant au milieu de la suspension cellulaire. En dehors des prélèvements d'échantillon, cette sortie est clampée à deux niveaux, et son extrémité extérieure plonge dans un tube d'éthanol afin d'éviter toute contamination venant du milieu extérieur.

Le prélèvement s'effectue à l'aide de deux seringues (10 et 20 mL) pouvant se fixer sur la prise d'échantillon. La première sert à éliminer le volume mort du tube (correspondant aux 10 premiers millilitres prélevés). L'échantillon (15 mL) qui sera conservé, est prélevé avec la deuxième seringue en veillant à ne pas faire revenir de milieu du tube vers le réacteur, l'ouverture et la fermeture des clamps s'effectuant en maintenant une pression d'aspiration au moyen de la seringue.

Ces échantillons sont ensuite conservés au froid (-20°C), en vue de l'analyse ultérieure du milieu, excepté 1 mL utilisé immédiatement afin de réaliser un comptage cellulaire.

TROISIEME PARTIE : RESULTATS

La lignée d'hybridomes a été développée au Technische Universität München dans le but de produire des ACM dirigés contre le trichloroanisole. Il est envisagé ensuite, dans le cadre du projet européen de mettre au point une technique immunoenzymatique de type ELISA sous forme de bandelette et un immunocapteur électrochimique permettant de détecter des concentrations allant de 0,1 à 1 ppb de trichloroanisole.

Notre contribution au projet général a consisté à définir et mettre au point les conditions de production de ces ACM par la culture en masse des hybridomes. Notre objectif est d'approfondir les connaissances du schéma général du métabolisme cellulaire et des interactions entre les cellules et leur environnement, afin d'envisager l'amélioration des conditions de culture et de ses performances. Dans un premier temps, nous allons étudier le milieu de culture le plus approprié à la croissance des hybridomes ainsi que la concentration en SVF nécessaire. Dans un deuxième temps, nous allons observer l'influence de diverses sources azotées et du butyrate de sodium sur les cinétiques cellulaires et sur la production des ACM. Pour finir, nous observerons le comportement des hybridomes en bioréacteur dans le but d'étudier si une extrapolation à l'échelle industrielle est envisageable.

I) Choix des conditions de culture de référence

I.1) Choix du milieu de base

Cette première expérience a été réalisée avec une première lignée d'hybridomes. D'après les renseignements fournis par la suite par le Laboratoire de Recherche en Génie Industriel (L.R.G.I.A.) de l'Université Claude Bernard Lyon 1, il semblerait que ces hybridomes présentent une instabilité génétique sans doute due au caractère récent de la lignée et un faible pouvoir sécrétoire d'immunoglobulines qui diminuerait avec le temps.

Le milieu RPMI 1640 contenant 2 g.L^{-1} de glucose, 2 mM de glutamine et supplémenté à 10% en SVF est le milieu de culture qui nous a été fourni par le L.R.G.I.A. pour réaliser les cultures d'hybridomes.

Le milieu α MEM est le plus couramment utilisé au sein de notre laboratoire. Il nous a donc paru aussi intéressant de tester ce milieu.

Deux cultures ont été réalisées parallèlement en flacons agités avec 150 mL de milieu. Les cellules ont étéensemencées à $2 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ dans le milieu RPMI 1640 contenant initialement 2 g.L^{-1} de glucose, 2 mM de glutamine et supplémenté à 10% en SVF, ainsi que dans le milieu α MEM supplémenté à 10% en SVF avec 4 mM de glutamine et 1 g.L^{-1} de glucose.

I.11) Cinétique cellulaire avec le milieu RPMI 1640

⇒ Croissance cellulaire

La durée totale de la culture est de 144 heures. Le profil d'évolution de la concentration en cellules viables, représenté dans la figure 1, présente trois phases distinctes.

La première phase correspond à une courte période de latence de 12 heures pendant laquelle la population de cellules stagne à $2 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$. Cette étape est liée soit à l'adaptation des cellules aux conditions de culture en flacon agité, soit à un équilibre insuffisant du milieu au moment de l'ensemencement des cellules (température, pH, pO_2).

Cette phase de latence est suivie par une phase d'augmentation de la concentration cellulaire observée jusqu'à 70 heures. La densité maximale en cellules viables obtenue est de $12 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$, ce qui correspond à une augmentation d'un facteur 6 de cette densité par rapport à l'ensemencement initial ($2 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$).

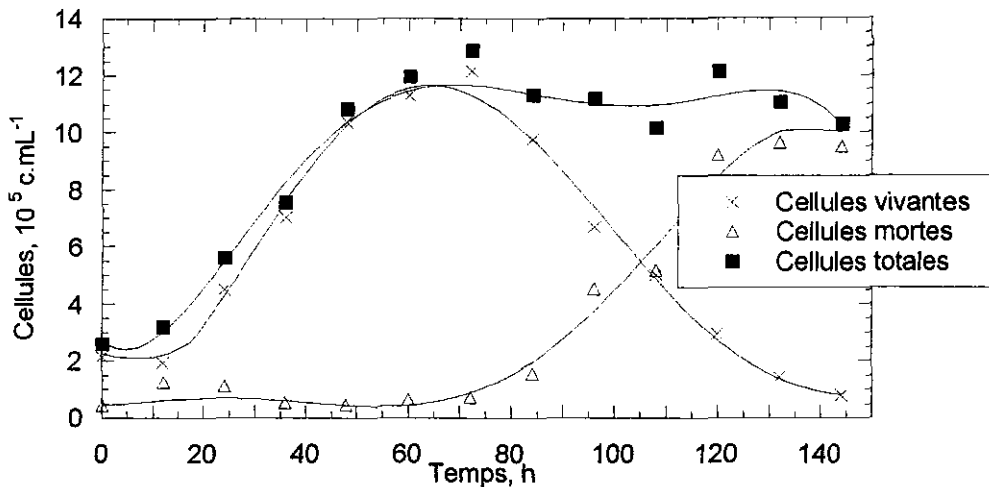


Figure 1 : Cinétiques de cultures en flacons agités. Milieu de culture : RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 10% de SVF.

Enfin, la phase de croissance est suivie par une phase de déclin de la concentration en cellules viables en raison du décès cellulaire. Après 144 heures de culture, la concentration en cellules vivantes est proche de 0.

⇒ Décès cellulaire

Le profil d'évolution de la concentration des cellules mortes, représenté dans la figure 1, présente également trois phases distinctes.

La première phase jusqu'à 70 heures correspond à une période où il n'y a pratiquement pas de décès.

La seconde période est marquée par une augmentation exponentielle du nombre de cellules mortes qui passe de $0,5 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ à $10 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ en 50 heures.

La dernière phase correspond aux dernières 24 heures de culture où l'on observe une stagnation à $10 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ de la concentration en cellules mortes.

I.12) Cinétique cellulaire avec le milieu α MEM

⇒ Croissance cellulaire

Le profil d'évolution de la croissance cellulaire présente deux phases distinctes représentées dans la figure 2. Le niveau en cellules viables oscille entre $2 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ (niveau de l'ensemencement initial) et $2,5 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ pendant les 80 premières heures de culture, puis on observe une diminution progressive du nombre de cellules vivantes.

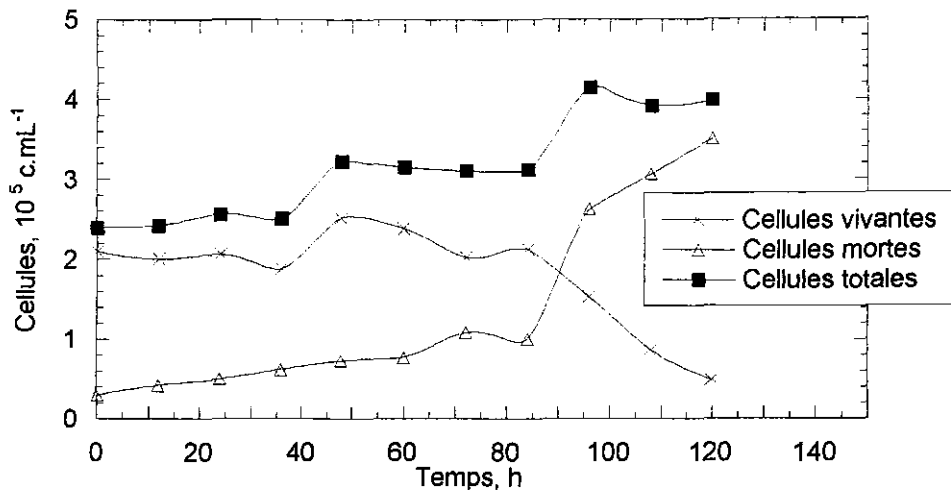


Figure 2 : Cinétiques de cultures en flacons agités. Milieu de culture utilisé : milieu α MED supplémenté avec 4 mM de glutamine et 5% de SVF.

⇒ Décès cellulaire

Le profil d'évolution du décès cellulaire présente également deux phases distinctes représentées dans la figure 2. Une première phase de 80 heures où l'on observe une légère progression du décès cellulaire qui passe de $0,3 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ à $1 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$. La seconde phase est constituée d'un décès plus rapide des cellules pour atteindre la valeur de $3,5 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$.

Les résultats observés ne sont pas ceux attendus. Le développement des hybridomes ne s'est pas réalisé dans ce milieu α MED.

I.13) Conclusion

En comparant la composition des deux milieux, le milieu α MED est plus riche en acides aminés, en vitamines et il possède une concentration deux fois plus forte en glutamine (4 mM) que le milieu RPMI 1640 (2 mM). Seule la supplémentation en SVF du milieu α MED (5%) et la concentration en glucose (1 g.L^{-1}) est plus faible que dans le milieu RPMI 1640 (10% et 2 g.L^{-1}).

Il est important de préciser que les hybridomes ont été mis en contact pour la première fois avec le milieu α MED lors du démarrage de la culture en flacons agités, sans adaptation préalable. Il serait intéressant de recommencer la culture en adaptant préalablement les cellules au milieu, par plusieurs passages en flacons de Roux, avant d'ensemencer le flacon agité.

La suite des expériences sera donc réalisée avec le milieu RPMI 1640 avec lequel on a pu observer une cinétique cellulaire convenable.

I.2) Influence du sérum de veau fœtal sur les cinétiques de cultures des hybridomes en flacons agités

Cette deuxième expérience a été réalisée avec la deuxième lignée des hybridomes, appelée RAMI I, fournis par le L.R.G.I.A. avec une meilleure stabilité génétique. Il s'agit de la lignée d'hybridomes RAMI I avec laquelle toutes les autres expériences ont été réalisées.

Les milieux contenant du sérum sont relativement chers et ce supplément étant un liquide biologique, la réduction de sa concentration dans les milieux de culture est une étape importante permettant non seulement de réduire le coût économique, mais également de faciliter la purification des ACM, de mieux maîtriser le procédé de production et de limiter tout risque de contamination.

Une comparaison de deux concentrations en sérum (5 et 10%) a été réalisée dans le but de déterminer la croissance des hybridomes et la production des ACM, en vue de réduire substantiellement le niveau de SVF dans le milieu de culture.

I.21) Conditions de cultures

Deux cultures ont été réalisées en parallèle en flacons agités de 250 mL. Les cellules ont étéensemencées à $2 \cdot 10^5$ c.mL⁻¹ dans le milieu RPMI 1640 contenant initialement 2 g.L⁻¹ de glucose supplémenté avec 2 mM de glutamine et 10% en SVF pour la première culture et à 5% en SVF pour la deuxième culture. Les cellules n'ont pas été préalablement adaptées à la concentration de 5% de SVF.

I.22) Cinétiques cellulaires

⇒ Croissance cellulaire

Deux phases distinctes de prolifération peuvent être distinguées dans la figure 3. En effet, il n'y a pas de phase de latence, même pour le milieu supplémenté à 5% de SVF pour lequel il n'y a pas eu d'adaptation préalable, ce qui semble indiquer que le passage de 10% à 5% de SVF ne semble pas perturber les hybridomes.

La première phase est une phase de croissance cellulaire qui se déroule au cours des 50 premières heures de culture. La concentration en cellules viables (X_v) passe de $2 \cdot 10^5$ c.mL⁻¹ (concentration de l'ensemencement) à $12 \cdot 10^5$ c.mL⁻¹ pour les deux milieux testés, ce qui correspond à une augmentation d'un facteur 6 de la population en cellules vivantes dans les flacons agités.

Enfin, la phase de croissance est suivie par une phase de déclin ou décès cellulaire jusqu'à la fin de la culture (140 heures).

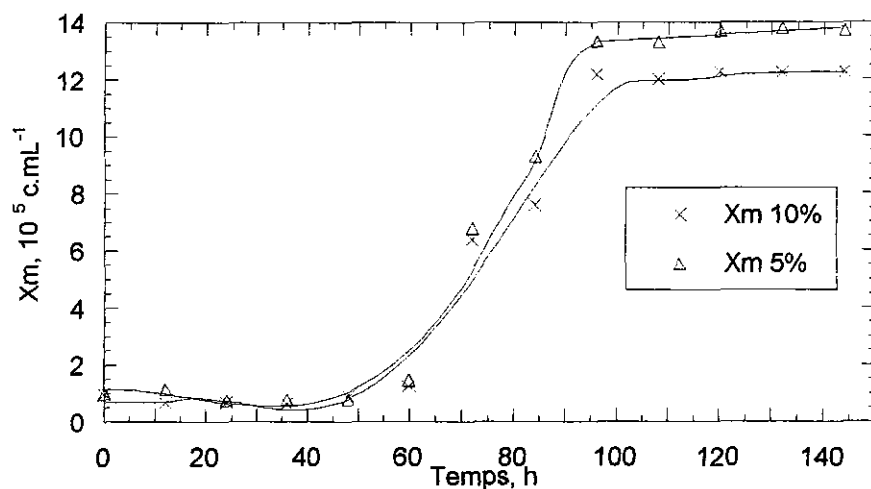
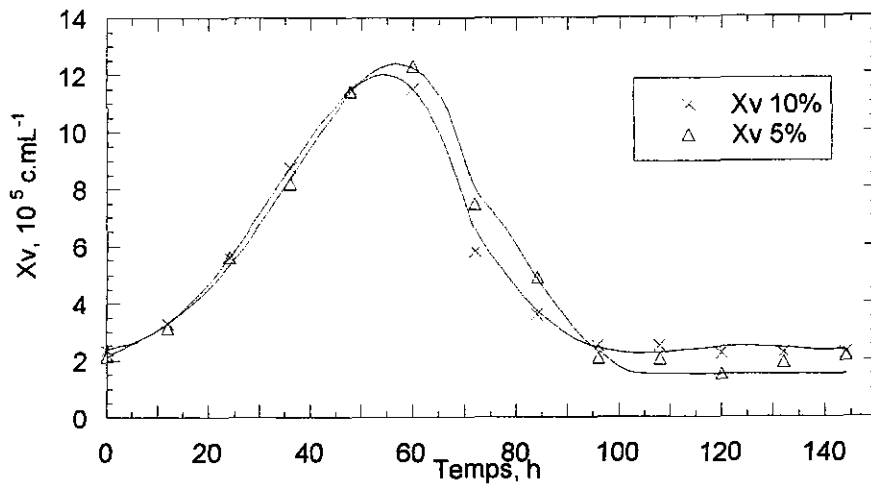


Figure 3 : Cinétiques de cultures en flacons agités. Milieu de culture : milieu RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5 ou 10% de SVF.

⇒ Décès cellulaire

Le profil d'évolution de la concentration en cellules mortes (X_m) présente trois phases distinctes représentées dans le deuxième schéma de la figure 3.

La première phase jusqu'à 55 heures correspond à une période où il n'y a pas de décès cellulaire. Puis la deuxième phase correspond à une augmentation exponentielle du nombre de cellules mortes qui passe de $0,5 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ à environ 12 à $13 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ pour les deux cultures, après 100 heures de culture. La dernière phase correspond à la fin de la culture où il y a stagnation de la concentration en cellules mortes.

Le fait de diminuer la supplémentation en SVF de moitié ne perturbe donc pas la cinétique cellulaire des hybridomes.

I.23) Production des ACM

Les résultats présentés dans la figure 4 sont les valeurs obtenues par densité optique, l'étalonnage du test ELISA n'ayant pas encore été effectué (utilisation du mode opératoire n°1). Ils permettent malgré tout de comparer de manière relative les résultats obtenus pour les deux milieux. Il apparaît clairement que la production en ACM est identique pour les deux milieux.

Cette production se déroule en deux phases. Une phase d'augmentation de la concentration en ACM présents dans le milieu au cours des 60 premières heures de culture c'est-à-dire pendant la phase de prolifération des cellules viables. La deuxième phase correspond à une stagnation de la concentration en ACM dans le milieu jusqu'à la fin de la culture.

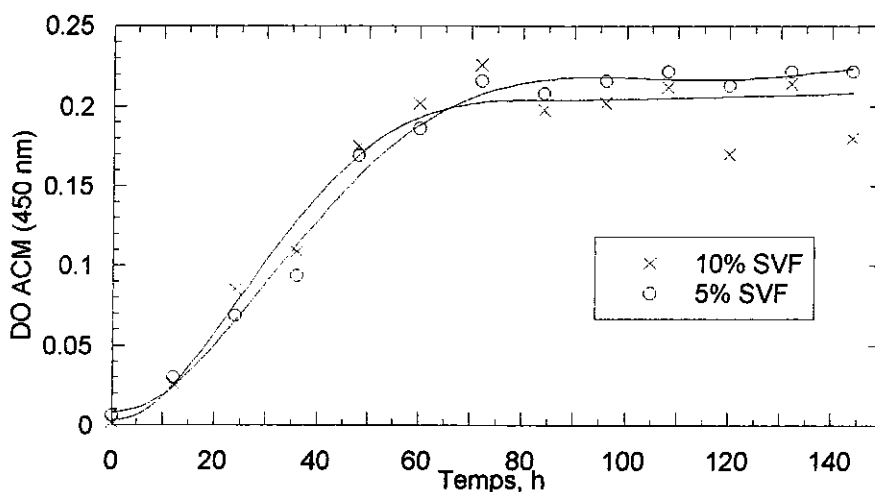


Figure 4 : Production d'ACM (DO) en flacons agités. Milieu de culture : milieu RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5 ou 10% de SVF.

I.24) Etude métabolique en flacon agité

Afin de caractériser le comportement de la lignée RAMI I, l'analyse du métabolisme de deux nutriments essentiels pour la cellule, le glucose et la glutamine, a été réalisée à travers le suivi de leur concentration dans le surnageant du milieu de culture, ainsi que celles de deux produits de leur catabolisme, le lactate et les ions ammonium.

A. Consommation de glucose et production de lactate :

⇒ Consommation de glucose

Le glucose est le glucide le plus rapidement métabolisé par les cellules. Sa dégradation par la voie glycolytique conduit au lactate.

La concentration initiale en glucose est la même dans les deux cultures réalisées en flacons agités (11 mM ou 2 g.L⁻¹).

L'évolution de la cinétique de consommation de glucose, représentée dans la figure 5, est similaire dans les deux cultures réalisées. En effet, il est consommé pendant la phase de croissance cellulaire et sa concentration s'annule (après 45 heures) avant que la densité cellulaire n'atteigne sa valeur maximum (après 55 heures). Ainsi la croissance cellulaire n'apparaît pas stoppée par l'absence de glucose.

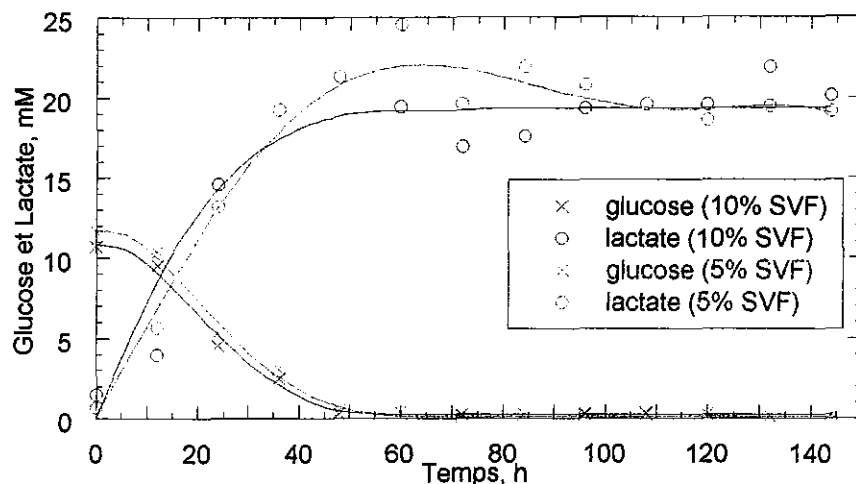


Figure 5 : Consommation de glucose et production de lactate en flacons agités. Le milieu de culture est le milieu RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5 ou 10% de SVF.

⇒ Production de lactate

Le lactate est obtenu essentiellement par dégradation du glucose selon la voie glycolytique.

On peut suivre une évolution identique de la production de lactate dans la figure 5.

La concentration initiale en lactate est nulle au début de la culture et elle augmente pendant la phase de croissance cellulaire au cours des 50 premières heures de culture pour atteindre une concentration de 20 mM de lactate. Sa production est directement corrélée à la consommation de glucose.

Durant la phase de déclin de la culture où il n'y a plus de glucose, la concentration de lactate stagne à une valeur de 20 mM (la transformation du glucose par la voie glycolytique n'est plus possible).

Le rendement glycolytique du glucose en lactate ($Y_{lac/glc}$) est de 1.7 mole/mole pour les deux cultures réalisées (10% et 5% de SVF).

B. Consommation de glutamine et production d'ions ammonium :

⇒ Consommation de glutamine

La glutamine est l'acide aminé majoritaire dans les milieux de culture car c'est une source d'énergie essentielle pour les cellules.

La concentration initiale en glutamine dans le milieu RPMI 1640 est de 2 mM pour les deux cultures réalisées.

L'évolution de la concentration en glutamine est présentée dans la figure 6. L'évolution de cette concentration est similaire pour les deux cultures. Cet acide aminé est consommé complètement après 60 heures de culture. La fin de la phase de croissance cellulaire semble liée à l'épuisement de la glutamine. Il semble donc que la glutamine soit un facteur limitant de la croissance cellulaire.

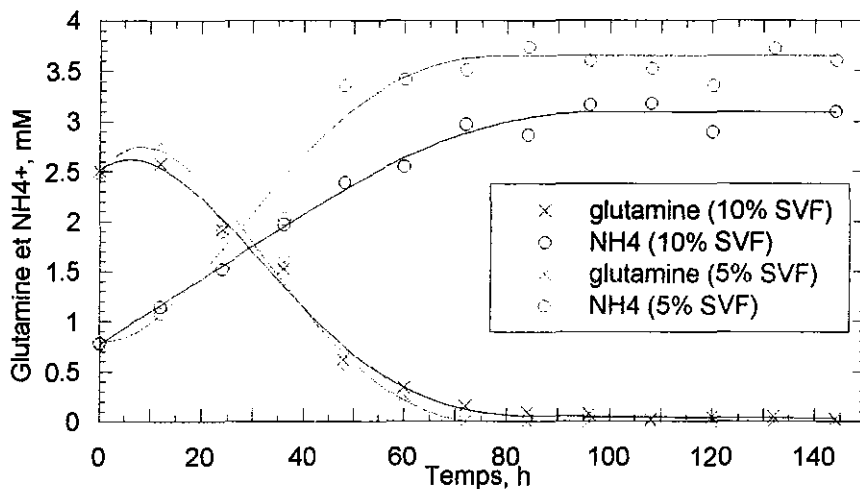


Figure 6 : Consommation de glutamine et production d'ammoniaque en flacons agités. Milieu de culture : milieu RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5 ou 10% de SVF.

⇒ Production d'ions ammonium

Les ions ammonium sont le principal déchet du métabolisme des acides aminés. Ils proviennent essentiellement de la désamination de la glutamine en glutamate et de sa dégradation spontanée.

On peut suivre l'évolution de la production d'ions ammonium pour les deux cultures dans la figure 6.

La concentration initiale en ammoniaque est faible avec une valeur de 0,8 mM pour les deux cultures. Cette concentration augmente pendant la phase de croissance cellulaire où il y a consommation de glutamine pour atteindre la valeur maximum de 3,5 mM pour la culture à 5% de SVF et de 3 mM pour la culture à 10% de SVF après 60 heures de culture.

Durant la phase de déclin en cellules viables de la culture où il n'y a plus de glutamine, la concentration maximum stagne à ces concentrations.

Le rendement de conversion global de la glutamine en ion ammonium $Y_{\text{NH}_4^+/\text{Gln}}$ est pratiquement identique pour les deux cultures : 0.9 et 1.1 mole d'ions ammonium par mole de glutamine consommée pour respectivement la culture enrichie à 10 et 5% en SVF.

I.25) Conclusion

Les cinétiques de croissance et de décès cellulaires, la production des ACM et le métabolisme du glucose et de la glutamine évoluent de la même façon entre le milieu supplémenté à 10% en SVF et le milieu à 5%. La suite des expériences sera réalisée à la concentration réduite de 5% en SVF.

L'adaptation des cellules à un milieu plus pauvre ou sans sérum est souvent une opération assez longue à mener à terme. Elle pourrait être poursuivie si les priorités du projet le nécessitaient.

II) Amélioration de la culture des hybridomes

Dans le but d'améliorer la production des ACM, deux approches seront étudiées dans ce chapitre. La première consiste à enrichir le milieu de culture en sources azotées comme l'hydrolysate de protéines de colza, la carnosine et les acides aminés essentiels et non essentiels. La deuxième approche consiste à ajouter dans le milieu de culture un inducteur de la synthèse protéique tel que le butyrate de sodium. Le butyrate de sodium a été identifié comme stimulant de la production d'ACM pour diverses lignées d'hybridomes (Field et Brown, 1990) en facilitant l'accès de l'ADN cellulaire à l'ARN polymérase (Oh et al., 1993).

II.1) Influences de diverses sources azotées

Le marché des anticorps monoclonaux produits par la culture des hybridomes prend un essor de plus en plus important. Il devient nécessaire d'optimiser les milieux afin d'obtenir des cultures en réacteur à haute densité cellulaire et à productivité en ACM élevée. Les différentes lignées cellulaires ont des exigences nutritionnelles différentes, mais toutes ont des besoins élevés en acides aminés. En effet, les acides aminés sont des constituants essentiels des milieux de culture. Ils participent directement à la synthèse des protéines de structure, des enzymes et sont donc liés à tous les aspects du métabolisme cellulaire.

Le but de ce chapitre est d'étudier si une augmentation de la concentration en diverses sources azotées peut améliorer la croissance cellulaire et la production des ACM.

II.11) Conditions de culture

Quatre cultures discontinues ont été réalisées. Ces quatre cultures ont été mises en œuvre en flacons agités de 500 mL. Chaque flacon contenait 250 mL de milieu RPMI 1640ensemencé avec $2 \cdot 10^5$ c.mL⁻¹ de la lignée RAMI I. Les hybridomes servant à l'ensemencement des 4 flacons agités ont été propagés dans le milieu RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5% SVF mais non enrichi avec les différentes sources azotées testées, c'est-à-dire sans adaptation préalable.

- 1^{er} flacon : flacon de référence (milieu RPMI 1640 + 2 mM de glutamine + 5% de SVF).
- 2^{ème} flacon : flacon hdc (milieu référence + 8 g.L⁻¹ d'hydrolysate de colza)
- 3^{ème} flacon : flacon carnosine (milieu référence + 50 mM de carnosine)
- 4^{ème} flacon : flacon aa (milieu référence + 2% d'acides aminés essentiels + 1% d'acides aminés non essentiels)

II.12) Cinétiques cellulaires

⇒ Croissance cellulaire

La durée totale de la culture a été supérieure à 200 heures. Comme le plus souvent, le profil d'évolution de la concentration en cellules viables présente 3 phases distinctes visibles dans la figure 7 (phase de latence, phase d'augmentation exponentielle en cellules vivantes, phase de déclin des cellules vivantes).

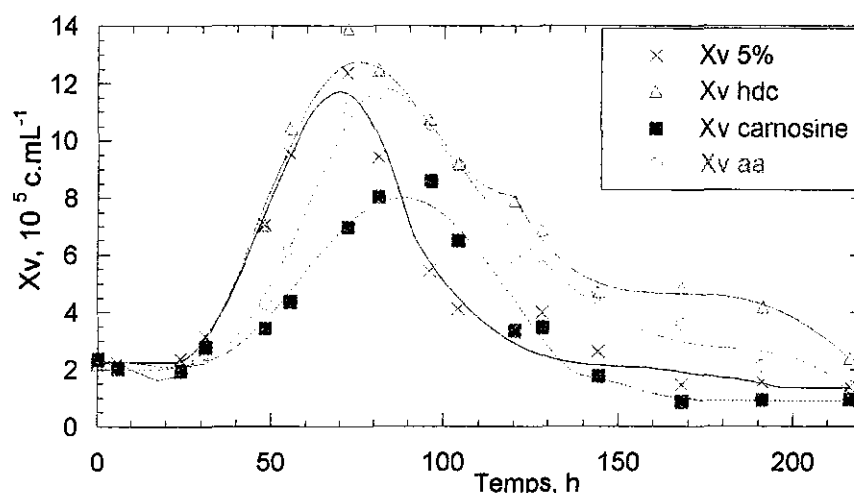


Figure 7 : Cinétiques des cellules viables au cours des 4 cultures en flacons agités. Milieu de culture : RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine, 5% de SVF et les sources azotées décrites dans les conditions de culture.

La phase de latence est identique pour les 4 cultures réalisées en flacons agités. Elle est d'une durée de 20 heures pendant laquelle les cellules vivantes stagnent à la concentration de l'ensemencement ($2 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$).

La phase d'augmentation exponentielle débute à la 20^{ème} heure de culture pour se terminer entre la 70^{ème} et la 90^{ème} en fonction des cultures testées.

La densité maximale en cellules viables obtenue ($11 \text{ à } 12 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$) est la même concernant la culture de référence ainsi que les cultures réalisées avec une supplémentation en hydrolysate de colza et en acides aminés.

La phase de croissance de la culture de référence et celle de la culture supplémentation avec de l'hydrolysate de colza sont identiques et la densité maximale est atteinte après 70 heures de culture. La phase de croissance de la culture supplémentation en aa est plus lente avec une densité maximale atteinte après 80 heures de culture.

En ce qui concerne la culture supplémentée en carnosine, la densité maximale est obtenue après un temps plus long de culture (90 heures) et elle n'est que d'une concentration de $8 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$.

La phase de déclin de la concentration en cellules viables débute avec les pics correspondants à la densité maximale en cellules viables et elle se termine à la fin des cultures après plus de 200 heures.

Le déclin le plus rapide est observé avec la culture de référence. On note un passage de la densité maximale en cellules vivantes ($12 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$) à la 70^{ème} heure de culture à une valeur résiduelle de $2 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ observée après 120 heures de culture.

La phase de déclin de la culture supplémentée en hydrolysat de protéines de colza est beaucoup moins rapide malgré une densité maximale en cellules vivantes égale et atteinte au même moment que celle de la culture de référence. Entre la 150^{ème} et la 200^{ème} heure de culture, le déclin atteint un plateau à une concentration de $5 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$, puis la concentration en cellules viables tend à disparaître.

La phase de déclin de la culture supplémentée en aa suit une évolution proche de la culture de référence et elle permet de faire passer la concentration en cellules viables de sa concentration maximale ($12 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$) observée après 90 heures à une valeur résiduelle de $2 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ après 170 heures de culture.

La dernière culture qui est celle supplémentée en carnosine possède une phase de déclin où l'on voit la densité maximale de $8 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ atteinte après 90 heures de culture diminuer à une valeur résiduelle de $2 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ après 140 heures de culture.

⇒ Décès cellulaire

Le profil d'évolution de la concentration en cellules mortes présente 3 phases distinctes visibles dans la figure 8 (phase de latence, phase d'augmentation exponentielle en cellules mortes, phase de stagnation de la concentration en cellules mortes).

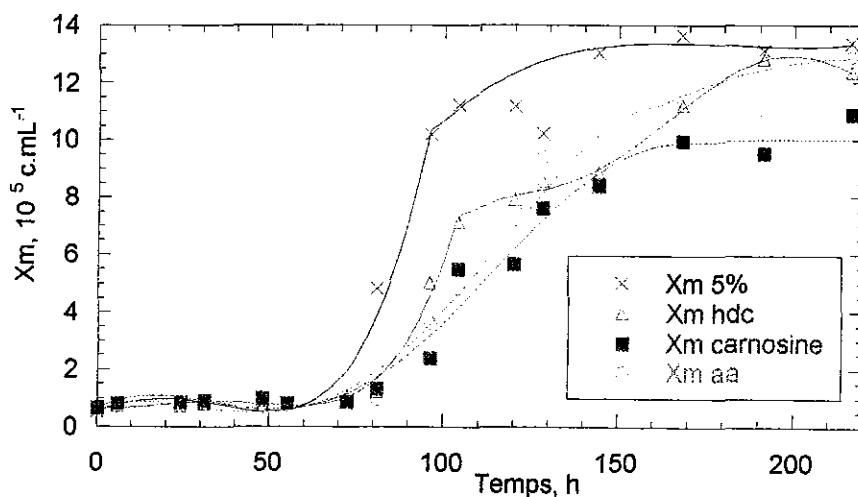


Figure 8 : Cinétiques des cellules mortes au cours des 4 cultures en flacons agités. Milieu de culture : RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5% de SVF ainsi que les sources azotées décrites dans les conditions de culture.

La phase de latence est identique pour les 4 cultures réalisées en flacons agités. Elle est d'une durée de 60 heures pendant laquelle les cellules mortes stagnent à la concentration de 1.10^5 c.mL⁻¹.

La phase d'augmentation exponentielle en cellules mortes est d'une durée plus ou moins longue en fonction des cultures réalisées. Cette phase correspond à la phase de déclin de la concentration en cellules viables.

La culture de référence possède une phase d'augmentation rapide en cellules mortes avec une concentration qui passe de 1.10^5 c.mL⁻¹ à 13.10^5 c.mL⁻¹ après 130 heures de culture. Cette phase correspond bien à la phase de déclin de la concentration en cellules viables décrite précédemment.

La culture supplémentée en aa possède une phase d'augmentation en cellules mortes beaucoup plus longue que la culture de référence qui voit la concentration en cellules mortes passer de 1.10^5 c.mL⁻¹ à 12.10^5 c.mL⁻¹ après 190 heures de culture. Le décès cellulaire évolue moins rapidement qu'avec la culture de référence.

La culture supplémentée en hdc possède une phase d'augmentation en cellules mortes de la même durée que la culture supplémentée en aa, ainsi la concentration en cellules mortes passe de 1.10^5 c.mL⁻¹ à 12.10^5 c.mL⁻¹ après 130 heures de culture. Pour cette culture, on peut observer un palier entre la 110^{ème} et la 140^{ème} heure de culture avec une concentration de cellules mortes de 8.10^5 c.mL⁻¹. Comme pour la culture supplémentée avec aa, le décès cellulaire évolue moins rapidement que pour la culture de référence.

La culture supplémentée en carnosine possède une phase d'augmentation de la concentration en cellules mortes entre la 60^{ème} et la 110^{ème} heure de culture qui permet à la concentration en cellules mortes d'évoluer de la concentration de 1.10^5 c.mL⁻¹ à la concentration de 9.10^5 c.mL⁻¹.

⇒ Conclusion

Pour toutes ces cultures, la concentration maximale de cellules mortes est proche de la concentration maximale de cellules vivantes formées. On peut donc supposer que le phénomène de lyse cellulaire est quasi inexistant.

L'effet de la supplémentation en diverses sources azotées du milieu de culture sur la cinétique cellulaire est le suivant :

La carnosine semble freiner la prolifération des hybridomes, il y a donc un effet inhibiteur de la carnosine sur le développement cellulaire.

L'utilisation des aa permet d'atteindre la même densité maximale en cellules vivantes que sur la culture de référence mais cette densité est un peu plus longue à atteindre ce qui peut s'expliquer par la non adaptation préalable des hybridomes aux aa. Par contre, il semble que les aa diminuent la rapidité du décès cellulaire c'est à dire permettent de garder les hybridomes plus longtemps en vie.

L'hydrolysate de protéines de colza lui aussi permet d'atteindre la même densité maximale en cellules vivantes et au même moment que sur la culture de référence, mais le décès cellulaire est nettement ralenti en présence d'hdc comme pour la culture supplémentée en aa.

Pour la suite de notre travail, il semble intéressant d'observer si le fait que les cellules restent en vie plus longtemps permet de produire une quantité supérieure en ACM.

II.13) Production en ACM

On peut observer dans la figure 9 l'évolution de la concentration en ACM en fonction du temps pour les quatre cultures réalisées. Cette évolution se fait en deux phases, la première qui correspond à la phase de production des ACM par les cellules jusqu'à 70 heures de culture puis la deuxième phase qui correspond à un plateau où il n'y a plus de production d'ACM.

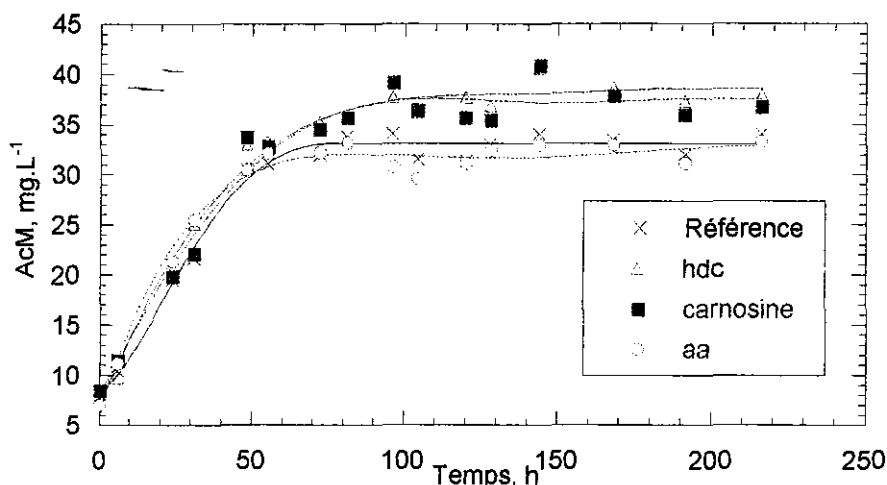


Figure 9 : Production d'ACM en mg.L^{-1} en flacons agités. Milieu de culture : milieu RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine, 5% de SVF et la source azotée testée.

L'évolution de la phase de production cellulaire en ACM est identique pour les quatre cultures réalisées au cours des 50 premières heures de cultures où l'on atteint une concentration en ACM de 30 mg.L^{-1} . Ensuite, on distingue deux tendances : une stagnation de cette production cellulaire en ACM pour la culture de référence et pour la culture supplémentée en aa avec une concentration maximale de 33 mg.L^{-1} et une poursuite de la production cellulaire en ACM jusqu'à la 100^{ème} heure de culture pour les cultures supplémentées en carnosine et en hdc avec une concentration maximale de 38 mg.L^{-1} .

La différence de plateaux observée entre une concentration maximale de 38 mg.L^{-1} et une concentration de 32 mg.L^{-1} ne semble cependant pas très significative car elle peut s'expliquer par le manque de sensibilité du test ELISA.

Les résultats observés permettent de constater deux choses :

Pour les cultures supplémentées en aa et en hdc, le fait d'augmenter la durée de vie des hybridomes de la lignée RAMI I ne semble pas permettre d'accroître les performances de production des ACM.

Pour la culture supplémentée en carnosine, il apparaît que la concentration en cellules viables est moins importante que pour la culture de référence mais que les hybridomes produisent spécifiquement plus d'ACM.

II.2) Influence du butyrate de sodium

Dans le cadre de nos expérimentations, nous avons choisi d'étudier de façon plus approfondie l'utilisation du butyrate de sodium comme agent susceptible de stimuler la production des ACM en flacons agités. Cependant, ce composé présente également un effet inhibiteur de la croissance cellulaire. Cette dualité impose donc la définition d'un protocole précis de son ajout dans le milieu de culture, quantité et moment d'ajout, afin de ne pas hypothéquer une possible amélioration de la productivité du procédé.

II.21) Conditions de culture

Quatre cultures ont été réalisées en parallèle en flacons agités de 250 mL. Les cellules ont étéensemencées à une concentration de $2 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ dans le milieu RPMI 1640 contenant initialement 2 g.L^{-1} de glucose auxquels ont été ajoutés 2 mM de glutamine et 5% de SVF. La concentration de butyrate testée est de 1 mM.

Une des quatre cultures est réalisée sans ajout de butyrate afin de servir de culture de référence.

L'ajout de 1 mM de butyrate a été effectué dès la mise en route de la culture pour le deuxième flacon agité (culture « t=0 »).

Pour les deux dernières cultures, l'ajout de 1 mM de butyrate a été réalisé à la 31^{ème} et 47^{ème} heure de culture (« t=31 » et « t=47 ») c'est-à-dire à des instants correspondants respectivement à la phase de croissance exponentielle des cellules viables et à la fin de cette phase de croissance.

II.22) Cinétiques cellulaires

⇒ Croissance cellulaire

On peut suivre l'évolution des différentes croissances cellulaires dans la figure 10.

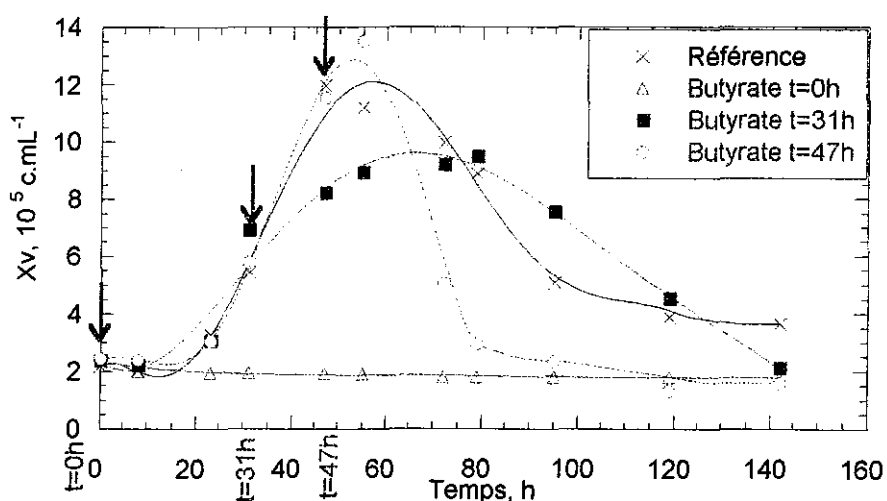


Figure 10 : Cinétiques des cellules viables au cours des 4 cultures en flacons agités. Milieu de culture : RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5% de SVF avec ajout de butyrate de sodium en cours de culture.

La culture avec ajout initial de 1 mM de butyrate de sodium ne s'est pas développée. La concentration en cellules viables a stagné à la concentration d'ensemencement ($2 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$) sans toutefois décliner. On observe donc bien dans ce cas un effet inhibiteur de la croissance cellulaire provoqué par le butyrate de sodium.

La culture « t=31h » suit une évolution normale par rapport à la culture de référence jusqu'au moment où est introduit le butyrate. Puis on observe une diminution dans l'évolution de la concentration en cellules viables pour atteindre une densité maximale de $9 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ après 65 heures de culture. La phase de décroissance liée au décès cellulaire est moins rapide que ce que l'on observe habituellement.

La culture de référence et la culture « t=47h » suivent une évolution identique jusqu'à la fin de la période de croissance en cellules viables avec une densité maximale habituelle de $12 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$.

En ce qui concerne la phase de déclin cellulaire, il apparaît que l'introduction de butyrate a entraîné une accélération du décès cellulaire puisque l'on retrouve une concentration résiduelle en cellules viables de $2 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ après 80 heures de culture là où la culture de référence conserve encore une concentration résiduelle en cellules viables.

⇒ Décès cellulaire

L'évolution du décès cellulaire est représentée dans la figure 11 où l'on observe les trois phases distinctes : la phase de latence, la phase d'augmentation exponentielle en cellules mortes et la phase de stagnation de la concentration en cellules mortes.

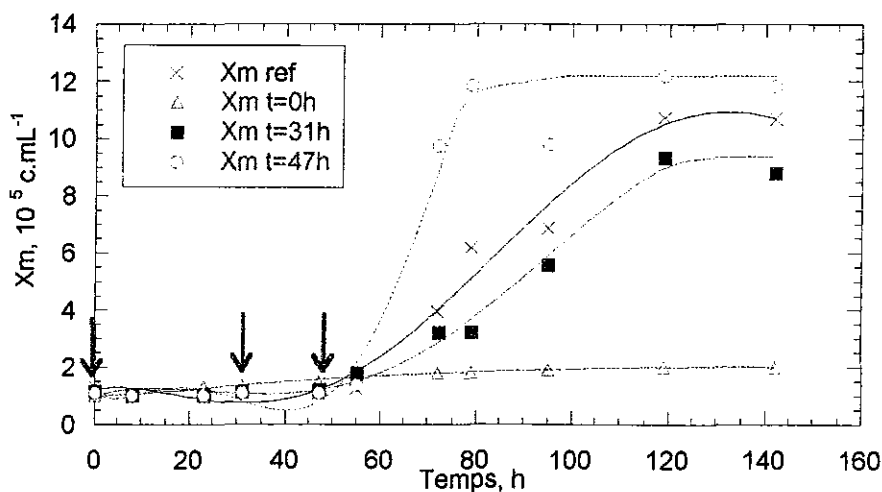


Figure 11 : Cinétiques des cellules mortes au cours des 4 cultures en flacons agités. Milieu de culture : RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5% de SVF avec ajout de butyrate de sodium en cours de culture.

La phase de latence où il existe une faible concentration de cellules mortes d'environ $1 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ est identique pour les trois cultures et elle dure durant les 50 premières heures de culture, quel que soit le protocole utilisé.

La phase d'augmentation exponentielle en cellules mortes n'existe pas pour la culture à « t=0h » ce qui est normal puisqu'il n'y a pas eu de croissance cellulaire.

Pour la culture de référence et la culture à « t=31h », cette phase évolue de façon similaire et permet d'atteindre respectivement la concentration de 11.10^5 et 10.10^5 c.mL⁻¹ en cellules mortes.

Pour la culture « t=47h », on observe une phase d'augmentation exponentielle en cellules mortes très rapide qui permet d'atteindre la concentration maximale en cellules mortes de 12.10^5 c.mL⁻¹ en 20 heures de culture.

La phase de stagnation de la concentration en cellules mortes s'observe en fin de culture et elle permet à chaque culture de rester à la concentration maximale en cellules mortes atteinte à la fin de la phase précédente.

⇒ Conclusion

Pour toutes ces cultures, la concentration maximale de cellules mortes correspond pratiquement à la concentration maximale de cellules vivantes formées. On peut donc supposer que le phénomène de lyse cellulaire est quasi inexistant.

L'effet inhibiteur du butyrate de sodium sur la croissance cellulaire a été observé grâce à la culture « t=0h » et « t=31h ». Mais on a également pu observer un effet accélérateur du décès cellulaire sur la culture « t=47h » où la vitesse spécifique maximale de décès cellulaire est de 0.05 h⁻¹. Pour la culture de référence et la culture « t=31h » cette valeur maximale est de 0.03 h⁻¹, ce qui montre que l'on observe pas cet effet accélérateur du décès cellulaire pour la culture « t=31h » où la densité maximale en cellules viables était plus faible.

II.23) Production des ACM

On peut suivre la production des ACM en mg.L⁻¹ dans la figure 12. Cette production se fait en deux phases, la première qui correspond à la phase de production cellulaire en ACM jusqu'à 50 heures de culture puis la deuxième phase qui correspond à un plateau où il n'y a plus de production d'ACM.

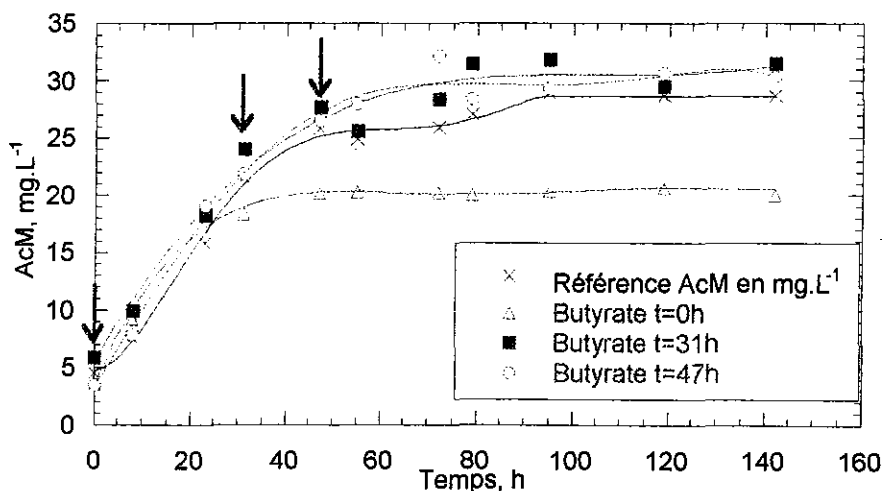


Figure 12 : Production des ACM en mg.L⁻¹ au cours des 4 cultures en flacons agités. Milieu de culture : RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5% de SVF avec ajout de butyrate de sodium en cours de culture.

La concentration maximale atteinte avec la culture où le butyrate a été introduit à « t=0h », dans laquelle aucun développement cellulaire n'a été observé, est surprenante. Elle signifie que la concentration initiale en cellules viables de l'ensemencement a permis de produire 20 mg.L^{-1} d'ACM ce qui semble élevé.

Pour les trois autres cultures la production des ACM est similaire et l'on observe une concentration maximum de 30 mg.L^{-1} d'ACM atteinte après 60 heures de culture. Pour ces trois cultures, la densité maximum en cellules viables était de $12.10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ pour la culture « t=47h » et celle de référence et de 9.10^5 c.mL^{-1} pour la culture « t=31h », il apparaît donc que la culture « t=31h » produise autant d'ACM que les deux autres cultures avec moins d'hybridomes. Il faut cependant relativiser ce résultat car la concentration maximum obtenue en ACM est identique à celle de la culture de référence c'est à dire que l'effet d'amélioration de la production des ACM par les hybridomes permet juste de compenser la perte due à l'inhibition de croissance cellulaire observé.

⇒ Conclusion

L'effet inhibiteur du butyrate de sodium sur la croissance cellulaire a bien été observé mais en ce qui concerne l'amélioration de la production des ACM, aucun résultat déterminant n'est ressorti de ces expériences.

III) Extrapolation du système de culture

III.1) Culture en réacteur agité

En vue de futures cultures de la lignée RAMI I à grande échelle, il est important de s'assurer que les cellules conservent un comportement similaire dans des systèmes de culture de tailles différentes (car toutes les cultures précédentes ont été réalisées dans des flacons agités avec des volumes utiles de 200 à 300 mL). Ainsi une culture en bioréacteur contrôlé et régulé a été réalisée.

III.11) Conditions de culture

Dans cette dernière partie, un bioréacteur contrôlé et régulé d'un volume de 4 litres a été mis en œuvre. Le milieu utilisé est comme précédemment, le RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5% en SVF. L'ensemencement du réacteur est réalisé à une concentration de $2,5.10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ pour un volume de milieu de 2 litres.

III.12) Cinétique cellulaire

⇒ Croissance cellulaire

La durée totale de la culture est de 120 heures. Le profil d'évolution de la concentration des cellules viables présente trois phases distinctes représentées dans la figure 13.

La première phase correspond à une courte période de latence d'environ 10 heures pendant laquelle la population de cellules stagne à $2,5 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$. Cette étape est liée à l'adaptation des cellules aux conditions de culture en bioréacteur.

Cette phase de latence est suivie par une phase d'augmentation de la concentration cellulaire observée jusqu'à 50 heures de culture. La densité maximale en cellules viables obtenue est de $11 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$, ce qui est légèrement inférieur à la densité maximale en cellules viables obtenue en flacons agités ($12 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$).

Enfin la phase de croissance est suivie par une phase de déclin de la concentration en cellules viables en raison du décès cellulaire.

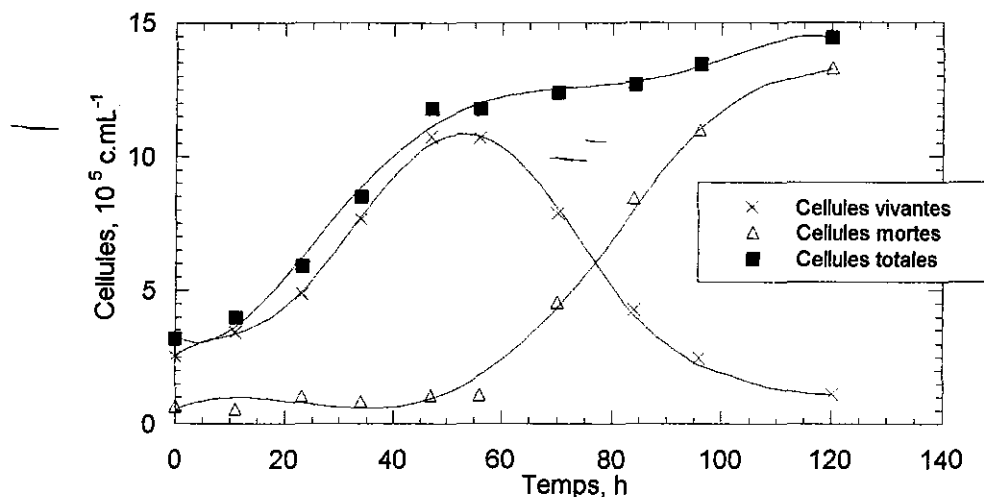


Figure 13 : Cinétiques de cultures en bioréacteur. Milieu utilisé : RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5% de SVF.

⇒ Décès cellulaire

Le profil d'évolution de la concentration en cellules mortes présente trois phases distinctes visibles dans la figure 13.

La première phase jusqu'à 50 heures de culture correspond à une période où il n'y a pas de décès cellulaire. La seconde phase est marquée par une augmentation exponentielle du nombre de cellules mortes qui passe de $0,5 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ à $12 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ entre la 50^{ème} et la 100^{ème} heure de culture. La dernière phase observée en fin de culture correspond à une stagnation entre $12 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ et $13 \cdot 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ de la concentration en cellules mortes.

Les vitesses observées sont similaires à celles observées dans les cultures en flacons agités. Il apparaît donc que les cellules de la lignée étudiée supportent de manière satisfaisante l'extrapolation du flacon agité (500 mL) au réacteur agité (4 litres).

III.13) Production des ACM

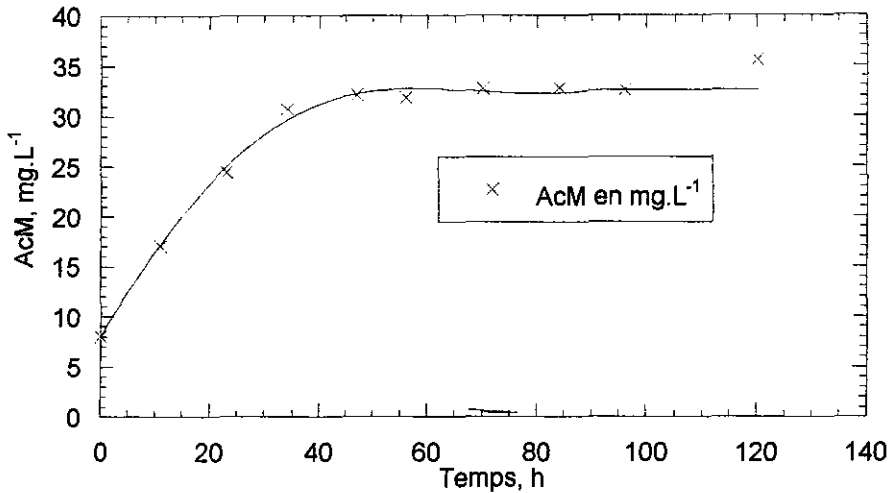


Figure 14 : Production d'ACM en réacteur agité. Milieu de culture : milieu RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5% de SVF.

Dans la figure 14, on peut décomposer l'évolution de la production des ACM en deux phases distinctes.

La première phase correspond à une augmentation de la concentration en ACM dans le milieu de culture au cours des 50 premières heures de culture pour atteindre une concentration en ACM de 32 mg.L⁻¹. Cette phase de production d'ACM est liée à la phase d'augmentation de la concentration en cellules viables qui a lieu simultanément.

La seconde phase correspond à une stagnation de la concentration en ACM présente dans le milieu de culture à une valeur de 32 mg.L⁻¹. Il n'y a plus de croissance cellulaire et les hybridomes ne sécrètent plus d'ACM ce qui explique la stagnation de la concentration en ACM.

III.14) Etude métabolique en bioréacteur

A. Consommation de glucose et production de lactate :

⇒ Consommation de glucose

La concentration en glucose est la même dans toutes les cultures réalisées (11 mM ou 2 g.L⁻¹).

L'évolution de la cinétique de consommation de glucose peut être observée dans la figure 15. Il est consommé pendant la phase de croissance cellulaire qui se déroule au cours des 50 à 60 premières heures de cultures. La concentration résiduelle de ce substrat est nulle pendant le décès cellulaire. La fin de la phase de croissance cellulaire semble liée à l'épuisement du glucose. Il semble donc que le glucose soit un facteur limitant de la croissance cellulaire.

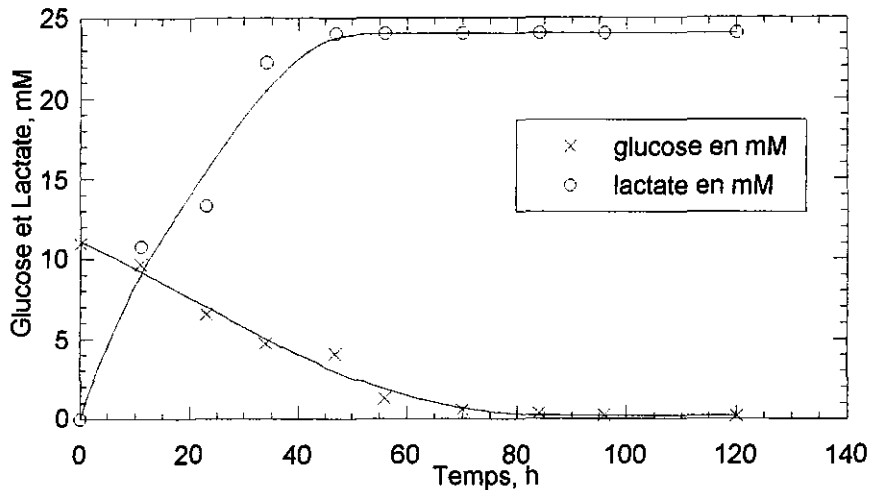


Figure 15 : Consommation de glucose et production de lactate en réacteur agité. Milieu de culture : milieu RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5% de SVF.

⇒ Production de lactate

On peut suivre l'évolution de la production de lactate dans la figure 15.

La concentration initiale en lactate est nulle au début de la culture et elle augmente pendant la phase de croissance cellulaire au cours des 50 premières heures de culture pour atteindre une concentration de 24 mM de lactate.

Durant la phase de déclin de la culture, où il n'y a plus de glucose, la concentration de lactate stagne à une valeur de 24 mM (la transformation du glucose par la voie glycolytique n'est plus possible).

Le rendement glycolytique du glucose en lactate ($Y_{lac/glc}$) est de 2 mole/mole.

B. Consommation de glutamine et production d'ions ammonium :

⇒ Consommation de glutamine

La concentration initiale en glutamine dans le milieu RPMI est de 2,5 mM.

On peut suivre l'évolution de la concentration en glutamine dans la figure 16. Cet acide aminé est consommé complètement après 60 heures de culture. La fin de la phase de croissance cellulaire semble liée à l'épuisement de la glutamine. Il semble donc que la glutamine soit un facteur limitant de la croissance cellulaire.

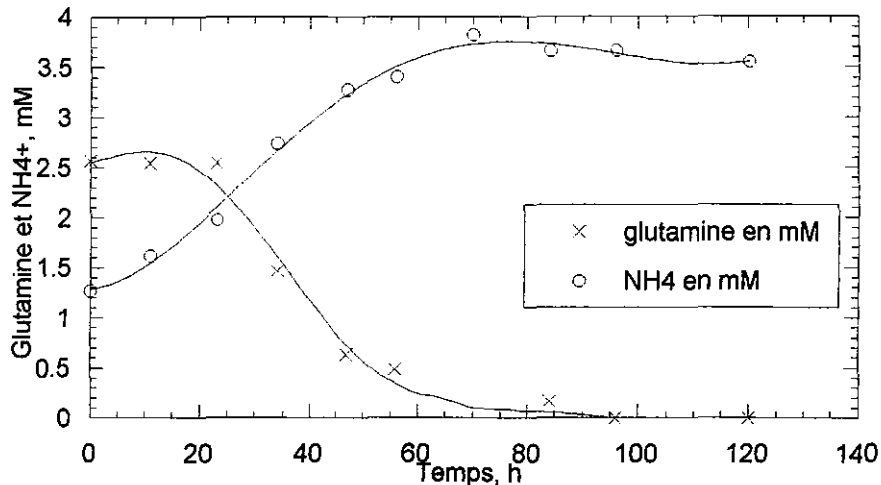


Figure 16 : Consommation de glutamine et production d'ammoniaque en réacteur agité. Milieu de culture : milieu RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5% de SVF.

⇒ Production d'ions ammonium

On peut suivre l'évolution de la production des ions ammonium dans la figure 16. La concentration initiale est de 1,2 mM (ce qui est très élevé pour une concentration initiale). Cette concentration augmente pendant la phase de croissance cellulaire où il y a consommation de glutamine pour atteindre la valeur maximum de 3,5 mM après 60 h de culture. Durant la phase de déclin en cellules viables où il n'y a plus de glutamine, la concentration en ions ammonium stagne à 3,5 mM.

Le rendement de conversion global de la glutamine en ion ammonium $Y_{\text{NH}_4^+/\text{Gln}}$ est de 0.9 mole d'ions ammonium par mole de glutamine consommée.

III.2) Comparaison d'une culture en flacon agité et en bioréacteur

En vue de futures cultures de la lignée RAMI I à grande échelle, il est important de s'assurer que les hybridomes conservent un comportement similaire dans des systèmes de culture de tailles différentes. Ainsi dans cette dernière partie nous allons comparer une culture en flacon agité de 200 mL réalisée simultanément avec la culture en bioréacteur contrôlé et régulé de 2 litres.

III.21) Conditions de culture

Le milieu utilisé pour ces deux cultures est le RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5% de SVF. Le bioréacteur représenté est celui étudié précédemment et la culture en flacon agité a été réalisée simultanément avec les mêmes cellules d'ensemencement.

III.22) Cinétiques cellulaires

L'évolution de la concentration en cellules viables, en cellules mortes et en cellules totales en fonction du temps pour la culture en flacon agité et en bioréacteur est représentée dans la figure 17.

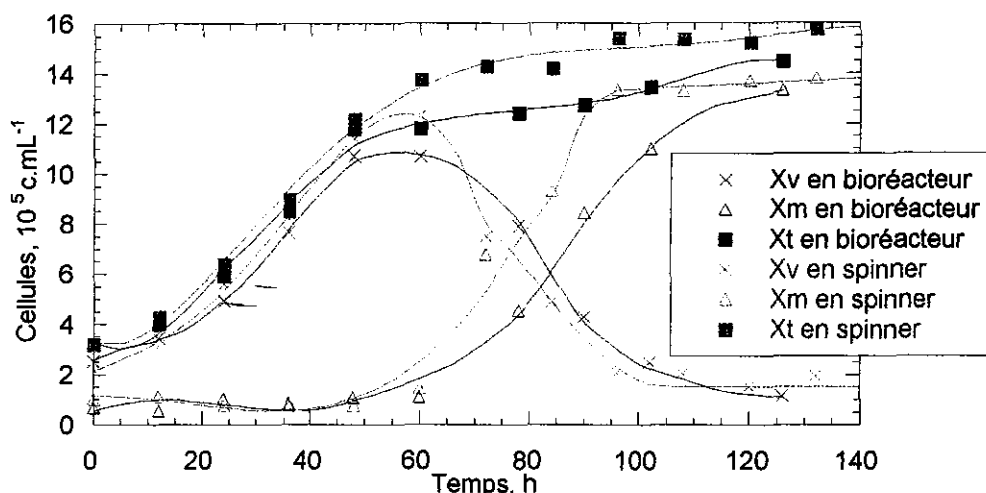


Figure 17 : Comparaison des cinétiques de cultures en flacon agité et en bioréacteur. Milieu de culture : RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5% SVF.

⇒ Croissance cellulaire

L'évolution des concentrations en cellules viables pour les deux types de cultures est comparable. Une période de latence d'une dizaine d'heures est suivie par la phase de croissance exponentielle d'une durée de 40 heures. Les densités en cellules viables atteignent une valeur maximale de $11.10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ pour la culture en bioréacteur et une valeur légèrement supérieure de $12.10^5 \text{ c.mL}^{-1}$ pour la culture en flacon agité. La phase de croissance est suivie par la phase de déclin de la concentration en cellules viables liée au décès cellulaire.

Cette phase de déclin est identique pour les deux cultures avec une concentration résiduelle en cellules viables de 2.10^5 c.mL^{-1} après 100 heures de culture.

⇒ Décès cellulaire

L'évolution du décès cellulaire est proche entre les deux types de culture. Il existe un écart au niveau de la phase d'augmentation exponentielle du nombre de cellules mortes. En effet, cette phase est plus rapide pour l'expérience réalisée en flacon agité. Cette différence est cependant minime et ne semble pas très significative.

⇒ Conclusion

Du point de vue de la cinétique cellulaire, les hybridomes de la lignée RAMI I évoluent de la même façon en flacon agité et en bioréacteur. On a observé une bonne extrapolation entre un volume de culture de 200 mL et un volume de 2 litres.

III.23) Production des ACM

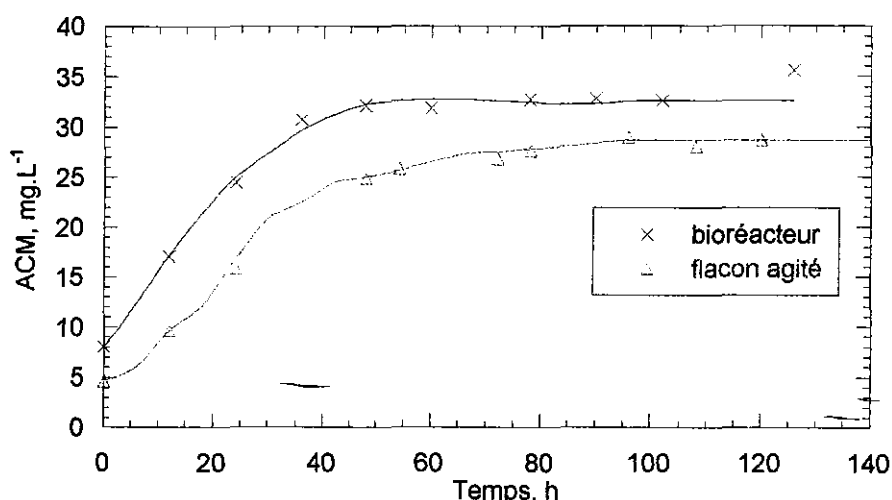


Figure 18 : Comparaison de la production d'ACM (mg.L^{-1}) en flacon agité et en bioréacteur. Milieu de culture : milieu RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5% de SVF.

L'évolution de la production des ACM pour les deux cultures est représentée dans la figure 18.

La production des ACM est parallèle pour les deux cultures, elle est liée au développement de la concentration en cellules viables puis est arrêtée au cours de la phase de décès cellulaire. Il semble cependant que la production en bioréacteur soit plus élevée que celle en flacon agité (concentration maximum de 32 mg.L^{-1} contre 27 mg.L^{-1}). Cependant, cette différence ne semble pas très significative quand on compare cette concentration maximum (27 mg.L^{-1}) en ACM en flacon agité avec les expériences précédentes (partie 2) où dans les mêmes conditions on a obtenu des concentrations maximums de 28 et 32 mg.L^{-1} en ACM. Cette différence peut s'expliquer par le manque de sensibilité du test ELISA.

III.24) Comparaison du métabolisme en flacon agité et en bioréacteur

A. Consommation de glucose et production de lactate :

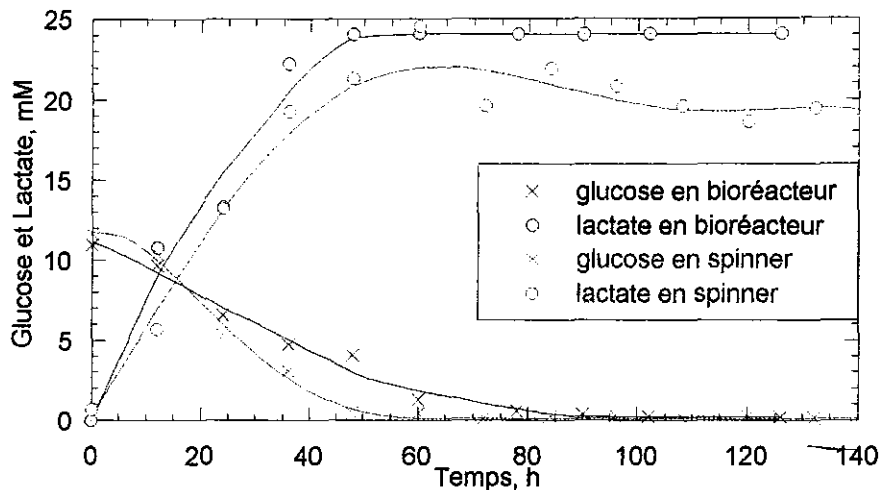


Figure 19 : Comparaison de la consommation de glucose et de la production de lactate en bioréacteur et en flacon agité. Milieu de culture : milieu RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5% de SVF.

⇒ Consommation de glucose

L'évolution de la consommation de glucose est représentée dans la figure 19. La concentration initiale en glucose est la même dans les deux cultures réalisées avec une concentration de 11 mM correspondant à 2 g.L⁻¹. L'évolution de ce substrat est voisine pour les deux cultures avec une consommation qui se déroule au cours des 50 premières heures de cultures pour le flacon agité et au cours des 70 premières heures de cultures pour le bioréacteur. La concentration de ce substrat est nulle pendant la phase de décès cellulaire.

⇒ Production de lactate

Cette production est également représentée dans la figure 19. L'évolution de la production de lactate est semblable pour les deux cultures réalisées. La production augmente au cours des 50 premières heures de cultures pour atteindre un maximum de 24 mM pour la culture en bioréacteur et environ 20 mM pour la culture en flacon agité. Durant la phase de déclin cellulaire où il n'y a plus de glucose la concentration en lactate se stabilise à cette concentration maximum car la voie glycolytique n'est alors plus possible.

Le rendement glycolytique du glucose en lactate ($Y_{lac/glc}$) est de 1.7 mole/mole pour la culture en flacon agité et 2 mole/mole pour le bioréacteur.

B. Consommation de glutamine et production d'ions ammonium :

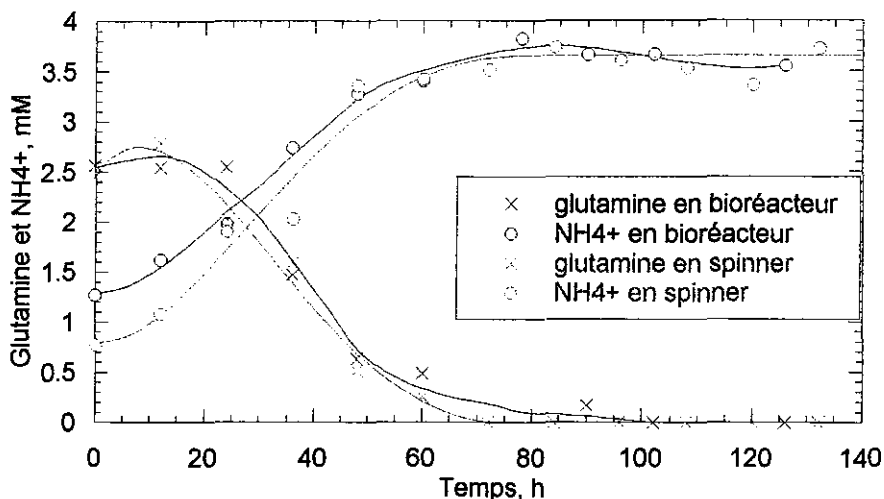


Figure 20 : Comparaison de la consommation de glutamine et de la production d'ions ammonium en bioréacteur et en flacon agité. Milieu de culture : milieu RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de glutamine et 5% de SVF.

⇒ Consommation de glutamine

L'évolution de la concentration en glutamine est représentée dans la figure 20. La concentration initiale de ce substrat est de 2,5 mM pour les deux types de cultures. La consommation de cet acide aminé est identique dans les deux cas et après 60 heures de culture il ne reste plus de glutamine dans les milieux de culture. Cette période correspond à la densité maximale en cellules viables.

Il est intéressant de noter que la glutamine apparaît être limitante dans les deux cultures, sa disparition coïncidant avec l'arrêt de la croissance cellulaire.

⇒ Production d'ions ammonium

La concentration initiale en NH_4^+ est voisine pour les deux cultures avec une concentration de 1,3 mM pour le bioréacteur et de 0,8 mM pour le flacon agité. L'évolution en NH_4^+ est similaire dans les deux cultures et elle est liée à la consommation de la glutamine.

Après épuisement, sa concentration se stabilise autour de 3,5 mM dans les deux cultures réalisées.

Le rendement de conversion global de la glutamine en ion ammonium $Y_{\text{NH}_4^+/\text{Gln}}$ est proche pour les deux cultures : 1,1 et 0,9 mole d'ions ammonium par mole de glutamine consommée pour respectivement la culture en flacon agité et celle en bioréacteur.

III.25) Conclusion

Afin d'obtenir des comparaisons valables, les deux cultures ont été conduites en parallèle avec les mêmes cellules et le même lot de milieu (milieu de base, glutamine et flacon de SVF). De ce fait, la comparaison a été réalisée dans les meilleures conditions possibles et

la reproductibilité des expériences nous apporte des résultats similaires entre le bioréacteur et la culture en flacon agité. L'extrapolation de la culture de la lignée RAMI I au bioréacteur est bien réalisable.

En complément des analyses effectuées pour cette étude, il serait intéressant de suivre également la consommation des autres acides aminés afin de détecter d'éventuelles limitations susceptibles d'engendrer l'arrêt de la croissance cellulaire.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La lignée RAMI I a été développée en vue de produire des ACM dirigés contre le trichloroanisole. L'objectif de ce travail était d'étudier l'adaptation de cette lignée à des conditions de culture se rapprochant de celles qu'une utilisation industrielle pourrait nécessiter en étudiant le comportement de cette lignée dans différents milieux de culture et en essayant d'optimiser la production des ACM.

Dans un premier temps, le choix ainsi que la simplification du milieu de culture ont donc été envisagés afin de faciliter la production des ACM, de diminuer le coût des cultures et de limiter les risques de contamination. La procédure d'adaptation à un milieu sans sérum de veau fœtal a déjà autorisé l'abaissement de la concentration du sérum de 10% à 5% (v/v). L'adaptation des cellules à un milieu plus pauvre ou sans sérum est souvent une opération assez longue à mener à terme et doit donc être poursuivie.

Dans un deuxième temps, des cultures avec un milieu supplémenté en diverses sources azotées et en butyrate de sodium ont été réalisées dans le but d'observer l'impact sur les cinétiques cellulaires et sur la production des ACM par la lignée RAMI I. Les résultats observés ne permettent pas de conclure à une augmentation conséquente de production des ACM. Il semble que l'hydrolysate de colza et la carnosine ralentissent le phénomène de décès cellulaire et le butyrate de sodium possède un effet inhibiteur sur la cinétique cellulaire.

Dans la dernière partie, des cultures à différentes échelles (flacons agités et bioréacteur) ont ensuite permis d'étudier le comportement cellulaire dans des volumes variant de 250 ml à 2 l. La cinétique de croissance de la lignée RAMI I n'apparaît pas être modifiée significativement par la taille du système de culture. Ainsi, la densité maximale atteinte est d'environ $12 \cdot 10^5$ c/ml.

Enfin, l'analyse du métabolisme des hybridomes qui a été effectuée à partir des échantillons prélevés durant la culture en réacteur et les cultures en flacons agités a fourni des informations intéressantes sur la lignée étudiée. Ainsi l'arrêt de la phase de prolifération des cellules viables semble être causée par l'épuisement du glucose et de la glutamine dans le milieu.

Des données caractérisant la cinétique de croissance et le métabolisme de la lignée RAMI I sont donc maintenant disponibles et pourront être utilisées comme éléments de comparaison pour évaluer son comportement dans des conditions de cultures différentes ou après d'éventuelles modifications génétiques de la lignée.

Pour cette étude, seul le mode discontinu (ou batch) a été testé. Il demeure le procédé le plus communément employé pour la production d'ACM par cultures d'hybridomes. Cependant, ce mode de culture, bien que relativement simple de mise en œuvre, ne permet d'obtenir que des productivités cellulaires et d'ACM limitées. En effet, l'expérimentation ne peut, à aucun moment de la culture, contrôler l'état de prolifération des cellules, ni leur production d'ACM. Or pour la plupart des procédés de culture en cellules animales, leur optimisation d'un point de vue production d'une protéine d'intérêt est basée essentiellement sur les potentialités d'un milieu à maintenir une prolifération cellulaire sur des périodes prolongées.

D'autre part, les données cinétiques recueillies au cours de cultures discontinues ne sont pas toujours suffisantes pour comprendre l'effet de différents paramètres de l'environnement des cellules sur leur croissance, leur métabolisme et leur production d'ACM. Il existe un mode de culture considéré comme le plus approprié pour la compréhension du comportement des cellules en culture : le mode continu. En effet, il permet de maintenir des conditions d'environnement cellulaire constantes et homogènes. Toutefois, ce mode de culture présente l'inconvénient majeur d'être lourd de mise en œuvre. La durée importante des expérimentations augmente les risques de contamination et peut induire des modifications de la stabilité génétique des cellules.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALTABA S., (1991)

Production d'acide lactique en culture continue à haute densité cellulaire dans un bioréacteur à membrane : cinétique, modélisation et analyse économique.

Thèse de doctorat INPL, Nancy.

APPLEGATE M.-A., STEPHANOPOULOS G., (1992)

Development of a single-pass ceramic matrix bioreactor for large-scale mammalian cell culture.

Biotechnol. Bioeng., **40**, 1056-1068.

BARTOLOME B., (1999)

Low molecular-weight phenolic compounds in natural and agglomerated cork stoppers.

Science des aliments, **19**, 119-124.

BASSET V., (1998)

Les méthodes de microbiologie classique.

Process, **1137**, 60-66.

BASEET V., (2000)

Choisir une méthode de contrôle.

Process, hors-série, 14-15.

BIRCH J.-R., FROUD S.-J., (1994)

Mammalian cell culture systems for recombinant protein production.

Biologicals, **22**, 127-133.

BROTHERTON J.-D., CHAU P.-C., (1996)

Modeling of axial-flow hollow fiber cell culture bioreactors.

Biotechnol. Prog., **12**, 575-590.

BUTLER M., et al., (1989)

Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture.

J. biotechnol., **12**, 97-110.

CHATONNET P., (1994)

Nature et origine des odeurs de « moisi » dans les caves. Incidences sur la contamination des vins.

Journal international des sciences de la vigne et du vin, **28**, **2**, 131-151.

CHERLET M., (1995)

De l'intérêt de la cytométrie en flux pour l'étude de cultures d'hybridomes en bioréacteur : cinétiques de croissance et décès cellulaires, de production d'anticorps et d'évolution du pH intracellulaire.

Thèse de doctorat INPL, Nancy.

CHEVALOT I., (1992)

Production d'une protéine membranaire humaine par culture en réacteurs de cellules animales recombinantes. Obtention de la lignée CHO recombinante et études cinétiques en réacteurs discontinus et semi-continus.

Thèse de doctorat INPL, Nancy.

CHOI S.-K., CHANG H.-N., LEE G.-M., KIM I.-H. et OH D.-J., (1995)

High cell density perfusion cultures of anchorage-dependent Vero cells in a depth filter perfusion system.

Cytotechnology., 17, 147-158.

COHEN-MAUREL E., (1999)

Qualité et sécurité des poissons fumés à froid : Listeria dans le saumon.

Process, 1145, 46-49.

COIGNARD M., (1996)

Microbiologie prévisionnelle : l'état de la science.

Process, 1112, 45.

COLIN P., (1996)

Hygiène et sécurité alimentaire : Salmonella, comment les traquer ?

Process, 1114, 32-33.

DARDENNE M., (1995)

Stratégies d'optimisation de la production d'anticorps monoclonaux en réacteurs semi-fermés : enrichissement du milieu de culture, substitution de substrats et ajouts d'un effecteur.

Thèse de doctorat INPL, Nancy.

DARDENNE M., CHERLET M., ENGASSER J.-M. et MARC A., (1994)

Kinetic studies of fed-batch hybridoma cultures : effect of various feeding compositions and flow rates.

In : animal Cell Technology. Products for today, prospects for tomorrow. (Spier R.E., Griffiths J.B. et Berthold W., Eds), Butterworth-Heinemann, 542-544.

DONZEAU I., LEFORT I., (1998)

Les anticorps monoclonaux non conjugués : actualités et perspectives d'utilisation en thérapeutique médicamenteuse.

Thèse de doctorat pharmacie, université Lille II.

DUBOIS P., (1998)

A propos du goût de bouchon.
Vignes et vins, 48-49.

EAGLE H., LEWINTOV L., (1965)

Amino acid and protein metabolism.

In : Cell and Tissues in culture : Methods in biology and physiology, Vol 1 (Willmer E.-N., Eds), Academic Press, New York, 277-296.

GARDNER A.-R., et al., (1990)

Effects of stirring and sparging on cultured hybridoma cells.
Biotechnol. Bioeng., **35**, 940-947.

GIORDANO G., (1971)

Technologica del ligno, vol I, Utet Ed.

GLASSY M.-C., et al., (1988)

Serum free media in hybridomas culture and Mab production.
Biotechnol. Bioeng., **32**, 1015-1028.

**GOERGEN J.- L., MARC A., ENGASSER J.-M., RABAUD J.-N., PIERRY G.,
GEAUGEY V., GEACHEL I. et HACHE J., (1994)**

Developpement of a new membrane reactor for large scale mammalian cell culture.

In : Animal Cell Technology : products of today, prospects for tomorrow (Spier R.E., Griffiths J.B., Berthold W., Eds.), Butterworth-Heinemann, 287-289.

GOOCHEE C.-F., PASSINI C.-A., (1988)

Intracellular proteins produced by mammalian cells in response to environmental stress.
Biotechnol. Prog., **4**, 189-201.

GRIFFITHS N.-S., (1974)

Sensory properties of chloroanisoles.
Chem. Sense and flavor, **1**, 187-195.

GRIFFITHS J.-B., LOOBY D. et RACHER A.-J., (1992)

Maximisation of perfusion systems and process comparison with batch-type cultures.
Cytotechnology, **9**, 3-9.

GUERIN V., (1999)

Maîtrise de la contamination biologique en industrie agroalimentaire: Contaminexpert donne des solutions.
Process, **1148**, 74.

HAYTER P.-M., CURLING E.-M.-A., GOULD M.-L., BAINES A.-J., JENKINS N., SALMON I., STRANGE P.-G. et BULL A.T., (1993)

The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon-gamma production in glucose-limited chemostat culture.
Biotechnology, **42**, 1077-1085.

HU W.-S., AUNINS J.-G., (1997)

Large-scale mammalian cell culture.
Curr. Opin. Biotechnol., **8**, 148-153.

IMAMURA T., CRESPI C.-L., THILLY G. et BRUNENGRABER H., (1982)

Fructose as a carbohydrate source yields stable pH and redox parameters in microcarrier cell culture.
Analytical Biochem., **124**, 353-358.

JENKIS N., HOVEY A., (1993)

Temperature control of growth and productivity in mutant Chinese hamster ovary cells synthesising a recombinant protein.
Biotechnol. Bioeng. **42**, 1029-1036.

KADOURI A., WANG G., ZHANG W., JACKLIN C. et FREEDMAN D., (1997)

Design and performance of a perfusion based packed bed bioreactor for the production of secreted protein.
In : Animal Cell Technology : From Vaccines to Genetic Medicine. (Carrondo M.J.T., Griffiths B. et Moreira J.L.P., Eds.), Kluwer Academic Publishers, 307-312.

KURANO S., KURANO N., LEIST C. et FIECHTER A., (1990)

Utilization and stability of vitamins in serum-containing and serum-free media in CHO cell culture.
Cytotechnology, **4**, 243-250.

LAMOTTE D., (1997)

Production et glycosylation de l'interféron-gamma humain par des cellules CHO cultivées en bioréacteurs discontinus et perfusés. Influence des conditions opératoires et du potentiel de glycosylation des cellules.
Thèse de doctorat INPL, Nancy.

LEFEVRE A., (1983)

Incidences des microorganismes du liège sur les altérations olfactives du vin.
Sciences des aliments, **3**, 265-278.

LE FLOCH F., (1998)

Maîtrise de la culture en masse de la cellule animale CHO-UH1 : études cinétiques, simplification du milieu et extrapolation.
Thèse de doctorat INPL, Nancy.

LEMOINE D., (1996a)

L'immunologie incontournable pour les mycotoxines.
RIA, **555**, 38.

LEMOINE D., (1996b)

Les kits d'analyse restent encore rares.
RIA, **555**, 43.

LOW K.-S., HARBOUR C., (1985)

Growth kinetics of hybridoma cells :
2- the effect of varying energy source concentrations.
Develop. Biol. Standard, **60**, 73-79.

MARTIAL A., (1991)

Étude du comportement d'hybridomes en réacteurs dans un milieu défini : effet des suppléments (acides aminés, insuline, lipides) en cultures discontinues et continues.
Thèse de doctorat INPL, Nancy.

MAUJEAN A., (1985)

Explications biochimiques et métaboliques de ma confusion entre goût de bouchon et goût de moisi.
R.F.OE., **99**, 55-62 (cahier scientifique).

MIZRAHI A., et al., (1988)

Media for cultivation of animal cells. An overview.
Cytotechnol., **1**, 199-214.

MOREAU M., (1977)

Altérations des bouchons par quelques moisissures.
Rev. Fr. Ceno, **66**, 63-67.

PINTON H., (1991)

Cultures perfusées d'hybridomes dans un réacteur agité avec recyclage externe des cellules : mise au point, cinétiques et performances.
Thèse de doctorat INPL, Nancy.

REITZER L.-J., WICE B.-M. et KATINGER H.-W.-D., (1979)

Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells.
J. boil. Chem., **254**, 2669-2676.

ROUSSELIN-ROSVOAL F., (1998)

Microbiologie des viandes : le porc salue les plans de contrôle.
Process, **1138**, 44-45.

SCHAEFFER A., (1978)

Etude sur l'origine du « goût de bouchon » dans les vins.
Rev. Fr. Œno, **70**, 25-29.

SEEWOSTER T., et al., (1997)

The BIOCHIP – A new cell factory for the cell cultivation in defined three-dimensional layers.

In : Animal Cell Technology : From Vaccines to Genetic Medicine; (Carroondo M.J.T., Griffiths B. et Moreira J.L.P., Eds), Kluwer Academic Publishers, 595-600.

SOBDERHOFF S., (1996)

Perfusion culture utilizing acoustic resonance to separate and recycle cells.*
Gen. Eng. News, **16**, 41.

TANNER H., (1998)

La journée vinicole, 8 avril 1998 p8.

TINTO A., et al., (1997)

Selection of an immobilization method for a perfusion bioreactor with hybridoma cells.

In : Animal Cell Technology : From Vaccines to Genetic Medicine. (Carrondo M.J.T., Griffiths B. et Moreira J.L.P., Eds.), Kluwer Academic Publishers, 423-428.

TOKASHAKI M., TAKAMATSU H., (1993)

Perfusion culture apparatus for suspended mammalian cells.
Cytotechnology, **13**, 149-159.

TOMBJ P., (1997)

La microbiologie rapide doublera ses ventes en 2000.
RIA, **566**, 68.

TOMBJ P., (1998a)

Les risques microbiologiques décryptés par le CNEVA.
RIA, 579, 34-35.

TOMBJ P., (1998b)

L'immunoconcentration : pour une analyse en 24 heures.
RIA, 579, 28-29.

TOMBJ P., (1996)

Hygiène et qualité, les techniques qu'il faudra maîtriser.
RIA, 555, 28-30.

VERNOZY-ROZAND Ch., (1999)

Méthode de détection rapide en microbiologie alimentaire.
Technique de l'ingénieur, traité Agroalimentaire, F1130, 1-6.

WAGNER A., (1990)

Production de PUK par des cellules humaines tumorales cultivées en réacteurs discontinus et perfusés : cinétiques, physiologie, et modélisation.
Thèse de doctorat INPL, Nancy.

WERNER R.-G., NOE W., (1993)

Mammalian cell cultures – Part II : genetic engineering, protein glycosylation, fermentation and process control.
Arzein.-Forsch./Drug Res. 43, 1242-1249.

YABANNAVAR V.-M., SINGH V. et CONNELLY N.-V., (1994)

Scale-up of spin-filter perfusion bioreactor for mammalian cell retention.
Biotechnol; Bioeng., 43, 159-164.

ANONYME, (1996a)

Microbiologie rapide : plus de micro-organismes à analyser
RIA, 555, 45-48.

ANONYME, (1996b)

10 ans de sécurité alimentaire : satisfaction, service, santé et sécurité.
Process, 1148, 64-65.

ANONYME, (1999)

1 ans de microbiologie prévisionnelle : des modèles encore trop pessimistes.
Process, **1148**, 68-69.



DEMANDE D'IMPRIMATUR



**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE**

Présenté par Luc MAROT

Sujet : Etudes cinétiques de la production
d'anticorps monoclonaux anti-trichloroanisole
par des cultures en masse d'hybridomes.

Jury :

Président : Mme C. Finance, Professeur

Juges : Mme A. Marc, Directeur de Recherche CNRS
M. J.-L. Goergen, Chargé de Recherche CNRS
Mme A. Martial, Maître de Conférences LRGA

Vu,

Nancy, le 27 / 11 / 01

Le Président de thèse,

C. FINANCE


Vu et approuvé,

Nancy, le 27 / 11 / 01

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'université
Henri Poincaré – Nancy I,


C. FINANCE

Vu,

Nancy, le 3 décembre 2001
n° 1221

Le président de l'Université Henri Poincaré – Nancy I



N° d'identification : PH Nancy 01 n° 76

**ETUDES CINÉTIQUES DE LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX
ANTI-TRICHLOROANISOLE PAR DES CULTURES EN MASSE D'HYBRIDOMES.**

Thèse soutenue le 21/12/2001

Par Luc MAROT

RESUME :

Nous avons étudié le comportement d'hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux dirigés contre le trichloroanisole, molécule responsable du « goût de bouchon » dans le vin. Après avoir défini les connaissances actuelles sur ce « goût de bouchon », les kits immunologiques de l'industrie agroalimentaire, les anticorps monoclonaux et les hybridomes, nous avons présenté les résultats des expérimentations réalisées en flacons agités et en bioréacteur, dans différents milieux de culture.

Des données caractérisant la cinétique de croissance et le métabolisme de la lignée d'hybridomes, ainsi que ses capacités de production des anticorps, sont maintenant disponibles et pourront être utilisées comme éléments de comparaison pour évaluer le comportement des hybridomes dans des conditions de cultures différentes ou après d'éventuelles modifications génétiques de la lignée.

MOTS CLES : 2,4,6-trichloroanisole, anticorps monoclonaux, hybridomes, bioréacteurs, cinétiques

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
A. MARC	LSGC	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographie <input type="checkbox"/>
		Thème 5

Thèmes

1-Sciences fondamentales
3-Médicament
5-Biologie

2-Hygiène/Environnement
4-Alimentation-Nutrition
6-Pratique professionnelle