



HAL
open science

Les peptides de colza : une alternative aux protéines animales dans les procédés de culture de cellules de mammifères ?

Bérangère Farges

► To cite this version:

Bérangère Farges. Les peptides de colza : une alternative aux protéines animales dans les procédés de culture de cellules de mammifères ?. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2005. Français. NNT : 2005INPL054N . tel-01749982

HAL Id: tel-01749982

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749982v1>

Submitted on 29 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>

2360001014

OS INPL OSUN

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
Laboratoire des Sciences du Génie Chimique

THESE

[M] 2005 FARGES-HADDANI B

présentée à l'INPL par

Bérangère FARGES-HADDANI

Ingénieur du CUST de Clermont-Ferrand

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

**Les peptides de colza : une alternative aux protéines animales
dans les procédés de culture de cellules de mammifères ?**

Soutenue publiquement le 5 juillet 2005 devant la commission d'examen

Membres du jury

- Président : M. Michel FICK - Professeur à l'ENSAIA-INPL, Nancy
- Rapporteurs : M. Gérard DEVAUCHELLE - Professeur à l'Université de Montpellier II
M. Yves-Jacques SCHNEIDER - Professeur à l'Université Catholique de Louvain
- Examineurs : M. Stéphane CHENU - Centre d'Immunologie Pierre Fabre, St Julien en Genevois
M. Jean-Louis GOERGEN - Professeur à l'ENSAIA-INPL, Nancy
Mme Annie MARC - Directrice de Recherche CNRS, Nancy
- Invité : M. Claude-Gilles DUSSAP - Professeur au CUST, Clermont-Ferrand

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, dans le groupe "Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires". Je remercie M. Michel Sardin, directeur du LSGC, et M. Michel Fick, responsable du GPBA, pour leur accueil.

Je remercie vivement mes directeurs de thèses, Mme Annie Marc et M. Jean-Louis Goergen, pour leur encadrement et leur soutien durant ces trois années.

J'exprime mes remerciements à M. Yves-Jacques Schneider et M. Gérard Devauchelle pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Mes remerciements vont également à M. Stéphane Chenu et M. Michel Fick, président du jury de thèse, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens également à remercier le Centre d'Immunologie Pierre Fabre de St Julien en Genevois, partenaire du projet EUREKA "peptide media" et qui a participé au financement de ce travail de thèse.

J'exprime ma sincère reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à ce travail, et en particulier, à Isabelle pour les nombreux, très nombreux essais "Cellscreen", à Christelle pour m'avoir "initiée" à l'utilisation de la fameuse unité de filtration PROSCALE, à Evelyne, Frantz et Olivier pour les très divers (et fréquents) "dépannages" informatiques, sans oublier Françoise et Valérie pour tout le travail administratif de dépôt et l'organisation de ma soutenance.

Je remercie également tout particulièrement Bertrand pour avoir toujours su répondre, avec à chaque fois, une rapidité déconcertante à mes nombreuses (très nombreuses) questions, et bien entendu, Nad', ma collègue du premier jour qui a eu la bienveillance de me supporter 3 années durant aussi bien à la paillasse qu'au bureau et même à l'extérieur au cours de discussions interminables voire théâtrales...

Merci à Seb' et Nadia qui ont fortement contribué à me permettre de découvrir Nancy et ses appareils les plus intéressants.

IFN- γ	Interféron gamma
IGF	Insuline-like growth factor
Ig	Immunoglobuline
Il	Interleukine
ITES	Insuline, transferrine, éthanolamine, sélénium
k_d	Vitesse spécifique de décès
Lac	Lactate
LDH	Lactate déshydrogénase
MA	Matière azotée
MM	Masse molaire
MP	Matière peptidique
μ	Vitesse spécifique de croissance
μ_{app}	Vitesse spécifique de croissance apparente
μm	Micro-mètre
$\mu_{réel}$	Vitesse spécifique de croissance réelle
mn	Minute
mM	Millimolaire
mOsm	Milliosmoles
NAD ⁺	Nicotinamide-adénine-dinucléotide (oxydée)
NADH	Nicotinamide-adénine-dinucléotide (réduite)
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (oxydée)
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (réduite)
ND	Non déterminé
NH ₄ ⁺	Ions ammonium
OPA	O-phthaldéhyde
PC	Pyruvate carboxylase
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PEP	Phosphoénolpyruvate
PEPck	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
q_{glc}	Vitesse spécifique de consommation du glucose
q_{gln}	Vitesse spécifique de consommation de la glutamine
q_{IFN}	Vitesse spécifique de production de l'interféron
q_{lac}	Vitesse spécifique de production de lactate
q_{NH_4}	Vitesse spécifique de production d'ions ammonium
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV	Respiratory syncytial virus
RTS	Rapid translation system

Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SFM	Serum free media
SVF	Sérum de veau foetal
3-MPA	Acide 3-mercapto-propionique
T°	Température
TA	Transaminase
TCA	Acid tricarboxylique
TFA	Acide trifluoracétique
TIB	Transferrine, Insuline, Albumine
TNF	Tumor necrosis factor
tPA	Tissue plasminogen activator
UV	Ultra-violet
Vu	Volume utile

ABREVIATIONS DES ACIDES AMINES

	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Acide aspartique	Asp	D
Acide glutamique	Glu	E
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V
Acide aspartique + Asparagine	Asx	-
Acide glutamique + Glutamine	Glx	-

SOMMAIRE GENERAL

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	69
CHAPITRE III - PREAMBULE : OBTENTION ET CARACTERISATION DES FRACTIONS PEPTIDIQUES DE COLZA	95
CHAPITRE IV : INTERET DE L'UTILISATION DE FRACTIONS PEPTIDIQUES DE COLZA DANS LE MILIEU DE CULTURE DE CELLULES CHO	106
CHAPITRE V : CROISSANCE ET METABOLISME DE CELLULES CHO, EN MILIEU SANS SERUM, EN PRESENCE DE PEPTIDES DE COLZA.....	134
CHAPITRE VI : ATOUTS DE LA FRACTION PEPTIDIQUE DE COLZA AU COURS DES DIFFERENTES ETAPES D'UN PROCEDE DE CULTURE	169
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	208
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	215

INTRODUCTION



INTRODUCTION

Le marché biopharmaceutique mondial connaît, depuis ces dernières années, des croissances annuelles de plus en plus importantes. Il a atteint en 2003, un chiffre d'affaires de 38 milliards de dollars, représentant ainsi 8% du marché pharmaceutique : plus de 40% des nouvelles molécules commercialisées étant d'origine biologique. Entre 2004 et 2009, de 82 à 137 nouveaux médicaments biologiques, principalement sous la forme d'anticorps monoclonaux et des protéines thérapeutiques vaccinales, devraient être distribués. Ce marché pourrait alors atteindre près de 100 milliards de dollars en 2010 et représenter 12% du marché pharmaceutique mondial.

Actuellement, ce sont les cellules de mammifères qui sont le plus largement utilisées pour fabriquer ces produits à haute valeur ajoutée que sont les protéines recombinantes ou les anticorps monoclonaux. Industriellement, les types cellulaires les plus représentés sont, entre autres, les hybridomes, les cellules Vero, les cellules BHK et les cellules CHO. Les hybridomes sécrètent des anticorps monoclonaux tandis que les cellules Vero, BHK et CHO sont généralement utilisées pour la production de virus et de protéines recombinantes.

Traditionnellement, les milieux de culture cellulaire de base contiennent des acides aminés libres, des vitamines, des minéraux et des sucres. La plupart des cellules animales et humaines requièrent également du sérum pour vivre en culture. Son prix, et surtout sa qualité, sont les principales préoccupations des industries biotechnologiques. C'est pourquoi, dans l'optique de réduire au maximum le risque de contamination des produits pharmaceutiques par différents agents pathogènes, et plus particulièrement le risque d'encéphalopathie spongiforme bovine, la législation tant nationale qu'internationale est en train d'évoluer vers l'interdiction de l'utilisation de produits dérivés d'animaux. Cependant, les productivités des cultures de cellules animales dont le milieu est déplété en sérum sont généralement moindres, en raison, d'une part, de la faible densité cellulaire atteinte et, d'autre part, des courtes phases de production. Or, les procédés industriels requièrent une croissance cellulaire la plus élevée possible ainsi qu'une productivité accrue. Par conséquent, la conception d'un milieu de culture sans sérum capable de soutenir de telles performances est fortement souhaitée. Toutefois, cette approche nécessite, non seulement, d'identifier, un ou plusieurs suppléments d'origine

non animale permettant d'assurer une croissance et une production élevées, mais également une compréhension très fine de l'effet de la composition du milieu de culture sur la physiologie des cellules et sur la production de protéines recombinantes. C'est dans cette optique d'optimisation de milieux de culture, dépourvus de molécules d'origine animale, pour la culture en masse de cellules animales, que s'inscrit ce travail.

Des études préliminaires ont permis de montrer que plusieurs hydrolysats protéiques d'origine végétale pouvaient partiellement ou totalement remplacer le sérum de veau foetal. Ainsi, il est apparu que des peptides dérivés de végétaux (blé, soja, riz, pois ou maïs) pouvaient stimuler la croissance des cellules de la même façon que le sérum ou ses composés dérivés. De plus, l'utilisation de ces peptides en tant que suppléments de milieux de culture présente un bénéfice évident d'un point de vue de la validation du procédé. En effet, les produits peptidiques végétaux proviennent le plus souvent de procédés simples et donc bien contrôlés, faisant intervenir une seule étape et une seule enzyme, non animale. En outre, la substitution des acides aminés libres par des peptides est à la fois fort intéressante d'un point de vue coût et d'un point de vue assimilation par les cellules. En effet, il a été précédemment montré que le transport des di- et tripeptides était favorisé par rapport à celui des acides aminés.

Dans le cadre de notre étude, nous nous intéresserons à la source végétale particulière que représente le tourteau de colza, co-produit de l'industrie huil提高 de cet oléagineux. En effet, le tourteau est actuellement disponible en grandes quantités, et constitue une source protéique peu onéreuse et encore peu valorisée. De plus, sa composition en acides aminés aisément assimilables peut présenter un intérêt supplémentaire lors de son utilisation en culture de cellules animales. Ainsi, nous nous proposons tout d'abord de présenter le procédé membranaire permettant d'obtenir différentes fractions peptidiques de colza à partir d'un hydrolysat enzymatique de protéines de tourteau de colza. Puis, dans un second temps, nous évaluerons la capacité de différents hydrolysats végétaux, dont ceux de colza, à favoriser la croissance de cellules CHO lors de leur ajout dans un milieu dépourvu de sérum de veau foetal. D'autre part, nous proposerons un milieu totalement exempt de protéine animale et enrichi en peptides de colza, permettant de conserver de bonnes capacités de croissance et de production. Par la suite, nous décrirons le comportement cinétique et métabolique de cellules CHO, productrices d'interféron gamma, cultivées en milieu sans sérum de référence et en milieu sans sérum supplémenté par une fraction peptidique de colza. Dans le même temps, afin de mieux cerner le rôle potentiel des peptides, soit comme agents nutritifs, soit comme

facteurs de croissance, de production ou de survie, des essais complémentaires seront réalisés avec des apports équivalents en acides aminés libres. Enfin, les atouts de l'ajout de ces peptides de colza dans les milieux de culture sans sérum seront plus précisément mis en avant pour une approche plus applicative. La capacité de la fraction d'intérêt de colza à permettre et à faciliter l'adaptation de différentes lignées cellulaires à des milieux sans sérum, mais aussi à des milieux sans protéine animale, sera alors considérée. L'impact de l'utilisation d'un tel milieu sans protéine animale sur le métabolisme et la production protéique de deux lignées cellulaires sera également apprécié. L'influence de l'extrapolation du système de culture sera évaluée. Enfin, les propriétés cryoconservatrices et les possibilités de stérilisation de cette fraction peptidique de colza seront déterminées.

La démarche expérimentale adoptée durant ce travail est schématisée dans la figure 1.

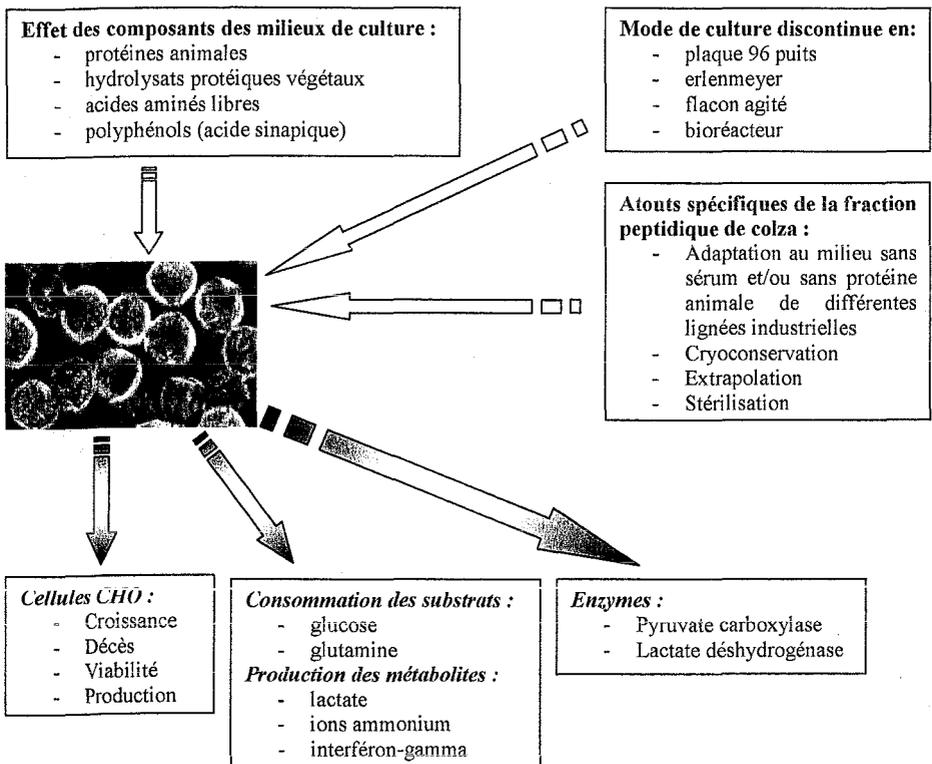
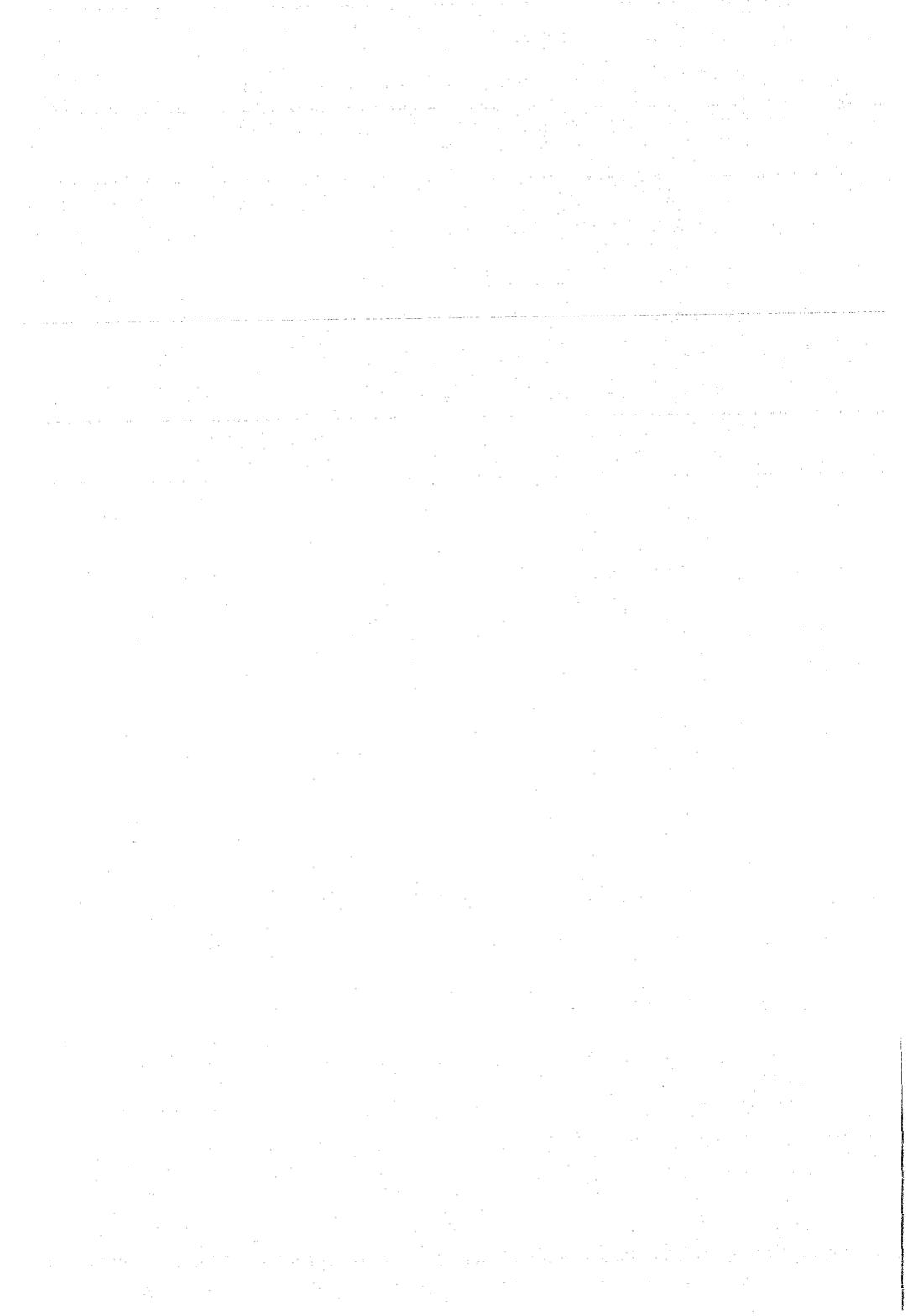


Figure 1 : Démarche expérimentale adoptée au cours de notre étude.



CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Procédés de culture de cellules animales	4
I.1. Principaux systèmes d'expression de protéines recombinantes	4
I.1.1. Avantages et inconvénients	4
I.1.2. Principales protéines produites par cellules animales et commercialisées	8
I.2. Culture en masse de cellules animales	8
I.2.1. Systèmes de culture	8
a. Modes de culture	8
b. Systèmes de culture à grande échelle	11
c. Systèmes de culture à usage unique, utilisables à "grande" échelle	17
d. Paramètres opératoires des cultures en bioréacteur	18
I.2.2. Principaux composants des milieux de culture de base	19
I.3. La lignée cellulaire CHO	22
I.4. L'interféron- γ	23
I.4.1. Présentation	23
I.4.2. Structure	24
I.4.3. Rôle et utilisation thérapeutique	25
I.4.4. Expression de l'interféron gamma humain recombinant	25
II. Les milieux de culture sans sérum animal	27
II.1. Origine des milieux de culture	27
II.2. Suppression du sérum animal dans les milieux de culture	28
II.2.1. Historique	28
II.2.2. Procédures d'adaptation aux milieux sans sérum animal	31
a. Méthode par immersion ou adaptation brutale	32
b. Méthode par diminution de "moitié" de la concentration en sérum	32
c. Méthode par "sous cultures"	33
d. Méthode par densité constante	33
II.2.3. Impact du retrait du sérum sur la cryoconservation	34
II.3. Les hydrolysats protéiques	34
II.3.1. Principaux hydrolysats protéiques	34
a. Protéines d'origine animale	35
b. Protéines d'origine microbienne	37
c. Hydrolysats végétaux	37
d. Peptides synthétiques	39
II.3.2. Mode d'action des hydrolysats peptidiques	40
II.3.3. Transport et métabolisme des peptides chez les cellules animales cultivées <i>in vitro</i>	43
a. Propriétés des transporteurs de peptides	43
b. Caractéristiques fonctionnelles des transporteurs peptidiques	44
c. Devenir des peptides transportés dans la cellule	47
II.4. Le colza et ses hydrolysats	47
II.4.1. Généralités	48
II.4.2. La transformation des graines de colza	49
a. Composition du tourteau de colza	49
b. Valorisation du tourteau de colza	51
III. Métabolisme central des cellules de mammifères en culture	53
III.1. Voies métaboliques du glucose et de la glutamine	54
III.1.1. Le glucose	55
a. La glycolyse	55
b. Le cycle de Krebs	57
III.1.2. La glutamine	58

III.2. Niveaux des enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose et de la glutamine, activités et effecteurs.....	59
III.2.1. Principales enzymes de la glycolyse.....	59
III.2.2. Enzymes de branchement entre la glycolyse et le cycle de Krebs.....	62
III.2.3. Principales enzymes de la glutaminolyse.....	63
III.3. Dynamique du métabolisme cellulaire en culture.....	64
III.3.1. Cinétiques d'assimilation du glucose et de la glutamine.....	64
III.3.2. Rendements et ratios métaboliques.....	65
III.3.3. Interactions entre le métabolisme du glucose et celui de la glutamine.....	65
III.3.4. Contrôle du métabolisme du glucose et de la glutamine.....	66
III.4. Cas des cultures en milieu sans sérum.....	66
III.5. Conclusion.....	67

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce chapitre a pour objectif de situer les travaux, présentés dans ce mémoire, dans le contexte scientifique actuel. La première partie décrira brièvement les différents systèmes utilisés pour la production de protéines recombinantes complexes, les principaux procédés employés pour la culture de cellules en masse et, enfin, les caractéristiques essentielles des cellules CHO productrices d'interféron-gamma, utilisées au cours de ce travail. La deuxième partie traitera plus spécifiquement de l'utilisation de milieux de culture sans sérum et des différentes possibilités de les compléter afin d'accroître leur capacité à promouvoir la croissance et les capacités productrices des cellules animales en culture. Un intérêt particulier sera porté au colza, une plante oléagineuse constituant une source de peptides végétaux susceptibles d'être utilisés en culture cellulaire. Enfin, la dernière partie présentera le métabolisme des lignées cellulaires continues.

I. Procédés de culture de cellules animales

1.1. Principaux systèmes d'expression de protéines recombinantes

1.1.1. Avantages et inconvénients

Jusqu'au milieu des années 80, les protéines utilisées à des fins thérapeutiques étaient extraites de tissus ou de sang (hormone de croissance humaine, facteur VIII de coagulation). Depuis, l'essor du génie génétique et de la biologie moléculaire a permis la production de ces protéines, *in vitro*, par des cellules hôtes. En effet, il est alors devenu possible de conférer aux cellules de nouvelles potentialités : l'opération consistant à isoler un gène codant pour une protéine d'intérêt, à l'associer à des éléments régulateurs capables de diriger la synthèse et la sécrétion de la protéine puis à introduire le tout dans un système d'expression. Ce dernier peut être un organisme unicellulaire procaryote (bactérie) ou eucaryote (levure, champignon, cellules de plantes, cellules animales), un organisme pluricellulaire tel qu'une plante ou un animal (expression dans le lait). Actuellement, de nombreuses recherches s'orientent vers la

production des protéines en grande quantité dans des systèmes d'expression dépourvus de cellules ; c'est le cas du "rapid translation system (RTS) proteomaster" de chez Roche Applied Sciences (Penzberg, Allemagne) qui permet de produire des protéines en quantité variant de quelques microgrammes à une dizaine de milligrammes (Betton, 2003).

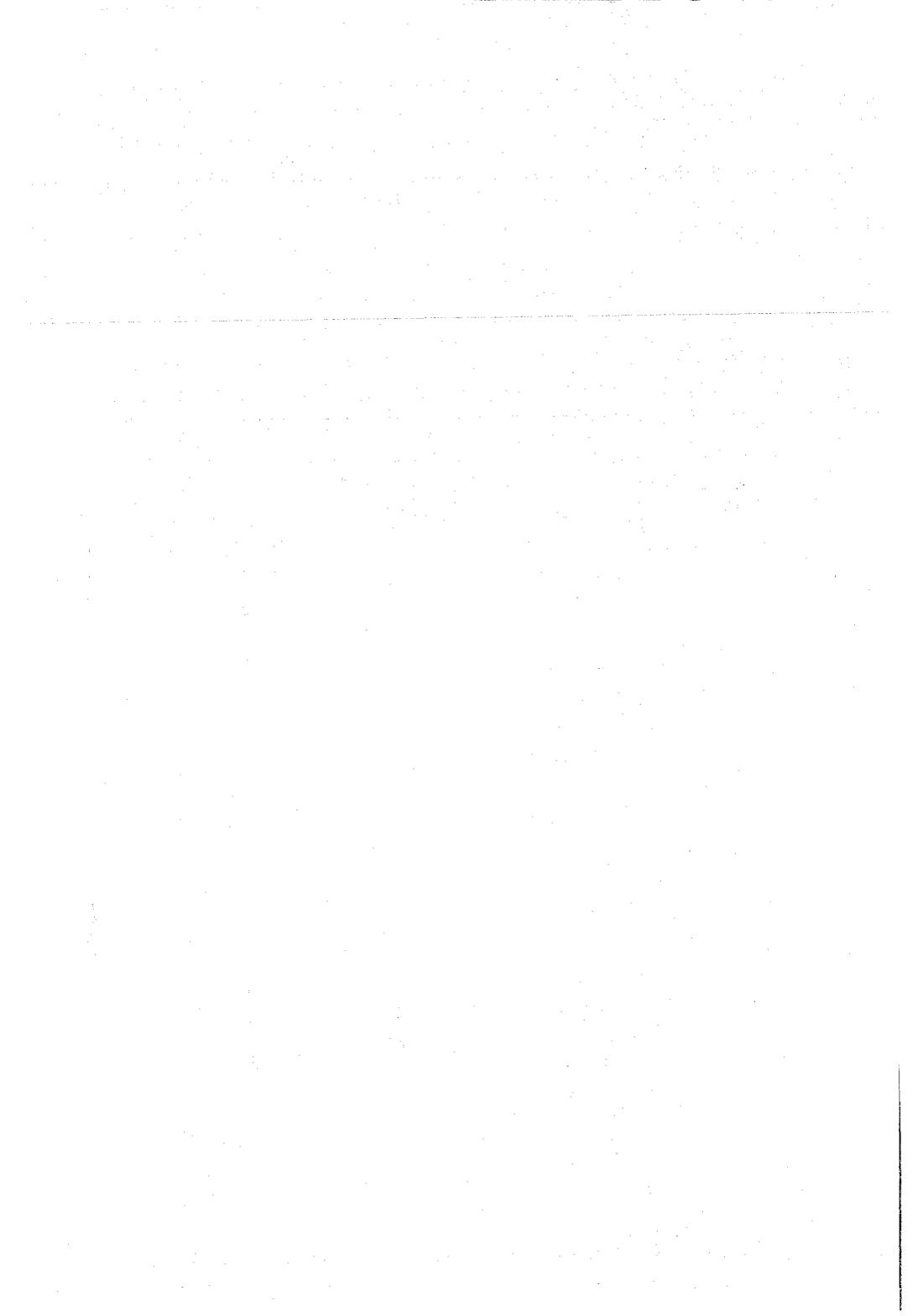
La nécessité d'obtenir une production à faible coût et en grande quantité de protéines recombinantes a conduit à essayer de les produire dans des "bioréacteurs vivants". Ainsi, leur sécrétion dans le lait d'animaux transgéniques tels que les souris, les lapins, les chèvres, les moutons, les cochons ou les vaches fut expérimentée (Pollock *et al.*, 1999 ; Galet *et al.*, 2001 ; Larrick et Thomas, 2001). En effet, grâce à cette technique, une grande quantité de protéines, facile à collecter et à purifier, était produite. Malheureusement, une telle technologie est très longue à développer, très coûteuse et très difficile à mettre en œuvre. Il est d'ailleurs à noter qu'une très petite proportion de ces essais a abouti (Roy et Agarwal, 2003). De plus, d'autres inconvénients existent face à de telles productions : le risque de contamination des animaux par des maladies infectieuses mais aussi quelques problèmes de modifications post-traductionnelles qui peuvent être des caractéristiques des animaux hôtes alors que la séquence protéique est d'origine humaine.

Les plantes ont également été appréhendées comme des systèmes prometteurs pour la production commerciale de protéines pharmaceutiques. L'un des principaux avantages de l'utilisation des plantes est la facilité de passage de l'échelle du laboratoire à la production. Le tabac fut la première plante utilisée pour l'expression d'anticorps recombinants (Raskin *et al.*, 2002). Les plantes sont un système à la fois pratique et bon marché pour la production de protéines recombinantes à grande échelle. En effet, elles représentent 2 à 10% du coût de fermentation microbienne et 0,1% du coût des cultures de cellules de mammifères (Ma *et al.*, 2003). Cependant, cette technologie est limitée par des risques environnementaux qui ont déjà fait l'objet de fortes controverses (Dalton, 2003). En effet, les récents événements de destruction de plusieurs champs démontrent que l'opinion publique n'est toujours pas prête à accepter une telle technologie.

Plus communément, les protéines recombinantes sont produites dans des systèmes de cultures cellulaires. Les premières cellules à avoir été utilisées furent les bactéries (système procaryotique) et en particulier, *Escherichia coli*. Ainsi, en 1982, *E. coli* fut utilisée pour la première fois pour la production commerciale d'insuline recombinante à visée thérapeutique.

Bien que capable d'exprimer des protéines en grande quantité, *E. coli* présente tout de même plusieurs inconvénients. En effet, non seulement l'expression des protéines se fait souvent sous la forme de corps d'inclusion, rendant difficile leur renaturation, mais surtout les modifications post-traductionnelles restent très limitées.

Finalement, il est apparu que les cellules eucaryotiques comme les cellules d'insectes (Hi Five, Sf 9...), les cellules de reins de bébés hamsters (BHK), les cellules d'ovaires de hamsters chinois (CHO), les hybridomes (fusion de lymphoblastes B sécrétant des anticorps avec des cellules de myélomes lymphoïdes qui ont la capacité de se multiplier à l'infini *in vitro* dans un milieu de culture) et les cellules de myélomes murins (NSO ou SP2/O) étaient des systèmes de culture commodes pour produire des protéines complexes nécessitant des modifications post-traductionnelles poussées telles que les ponts disulfure, les N- et O-glycosylations, des ancrages GPI, des oligomérisations.... Ainsi, chaque système d'expression présente des avantages et des inconvénients dont les principaux sont résumés dans le tableau I.1.



	Hôte	Avantages	Inconvénients
Bactéries (1 g/L)	<i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Génétique et physiologie bien connus - Nombreux vecteurs disponibles - Culture en masse - Taux d'expression élevés 	<ul style="list-style-type: none"> - Mauvaise sécrétion des protéines - Pas de modification post-traductionnelle - Entérobactérie : contrôle de l'absence de toxine dans les produits finaux
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pichia pastoris</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Bien connu - Pas de toxicité - Bon taux d'expression - Modifications post-traductionnelles 	<ul style="list-style-type: none"> - Mauvaise sécrétion : seules les petites protéines peuvent être sécrétées (insuline) - Glycosylation oligomannosidique exclusive (≈ 40 unités)
Eucaryotes inférieurs (0,5 g/L)	Cellules de mammifères (CHO – BHK)	<ul style="list-style-type: none"> - Bien connues - Culture en masse en bioréacteur - Synthèse de protéines complexes et de masse moléculaire élevée - Sécrétion - Modifications post-traductionnelles (glycosylation complexe) - Système d'expression stable 	<ul style="list-style-type: none"> - Croissance lente - Rendements assez faibles - Plus fragiles que bactéries ou levures - Milieux de culture coûteux
	Cellules d'insectes (> 400 mg/L)	<ul style="list-style-type: none"> - Facilité d'obtention - Expression simultanée de plusieurs protéines - Expression de protéines de grande taille - Taux d'expression élevés 	<ul style="list-style-type: none"> - Relative fragilité des cellules - N-glycosylation incomplète - Système d'expression transitoire - Production parallèle du baculovirus
	Cellules végétales	<ul style="list-style-type: none"> - Protéines actives - Glycosylation 	<ul style="list-style-type: none"> - Taux d'expression très faibles - Mise en œuvre délicate - Coût élevé - Présence de xylose et de fucose liés en α-1,3 (immunogène)
Organismes complets (> 1 g/L)	Animaux transgéniques	<ul style="list-style-type: none"> - Production en continu - Taux d'expression très élevés (>1 g/L) - Protéine sécrétée dans le lait 	<ul style="list-style-type: none"> - Investissements lourds - Mauvaise reproductibilité des transgénoses - Risque de contaminants
	Plantes transgéniques	<ul style="list-style-type: none"> - Faible coût - Glycosylation complexe 	<ul style="list-style-type: none"> - Rendements faibles - Purification difficile - Présence de xylose et de fucose liés en α (immunogène)

Tableau I.1 : Principaux systèmes d'expression de protéines recombinantes ; avantages et inconvénients. Les chiffres entre parenthèses donnent une valeur moyenne de la concentration de protéines produites dans les différents systèmes.

I.1.2. Principales protéines produites par cellules animales et commercialisées

D'après de nombreux experts, le marché des protéines thérapeutiques commence seulement à émerger et ils prédisent que le nombre de protéines, d'anticorps et de médicaments peptidiques recombinants disponibles va considérablement augmenter dans les 10 à 20 ans à venir (Henry, 2000). Actuellement, une centaine de protéines thérapeutiques est disponible sur le marché et génère autour de 17 milliards de dollars de ventes annuelles. Les experts estiment qu'en 2010, le marché de ces protéines devrait atteindre plus de 100 milliards de dollars (GEN, 2003). Le tableau I.2 donne quelques exemples de protéines, anticorps et vaccins recombinants autorisés dans l'Union Européenne en 2004.

I.2. Culture en masse de cellules animales

I.2.1. Systèmes de culture

a. Modes de culture

- Cellules adhérentes

Par définition, la culture de cellules adhérentes nécessite un support. C'est le mode de culture utilisé pour la majorité des cellules animales non adaptées à la suspension. Dans le cas de cultures statiques, il sera constitué par le fond de la boîte de culture ou la surface de flacons roulants tels que ceux photographiés sur la figure I.1.

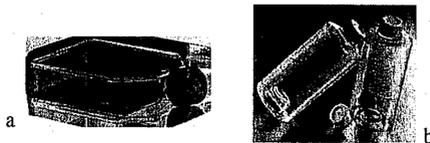


Figure I.1 : Photographies d'une boîte de culture (a) et de flacons roulants (b).

	Indication principale	Producteur	1 ^{ère} homologation pour l'UE	
Protéines recombinantes thérapeutiques	Insuline humaine	Diabète de type I	Lilly, Hoechst, Novo Nordisk	1987
	Interleukine 2	Hypeméphrome (activation des lymphocytes T)	Chiron	1989
	Hormone de croissance humaine	Nanisme	Lilly, Pharmacia, Serono, Ferring Novo Nordisk	1991
	Erythropoïétine beta	Anémie rénale	Boehringer	1992
	Interféron gamma 1b	Granulomatose chronique	Dr. K. Thomae, Boehringer	1992
	Facteur VIII	Hémophilie A	Bayer AG, Baxter, Armour Pharma	1993
	tPA	Thrombose	Dr. K. Thomae	1994
	TSH	Scintigraphie de la thyroïde	Genzyme	1999
	Erythropoietine delta	Anémie rénale	Aventis	2002
	Antagoniste des récepteurs de l'III	Arthrite rhumatoïde	Amgen	2002
	Protéine C activée		Eli Lilly	2002
	Laronidase	Mucopolysaccharidose	Genzyme	2003
Anticorps recombinants	Abciximab, Reopro®	Anticoagulant	Centocor	1995
	Basiliximab, Simulect®	Antirejet	Novartis	1998
	Rituximab, Mabthera®	Leucémie, Lymphome	Genentech	1998
	Palivizumab, IgG humanisé	Anti RSV	Laboratoires Abbott	1999
	Trastuzumab, Herceptin®	Cancer du sein	Roche, Genentech	2000
	Adalimumab, Humira®	Arthrite rhumatoïde	Laboratoires Abbott	2003
	Cetuximab	Carcinomes du colon.	ImClone, Merck	2004
	Erbitux®			
Vaccins recombinants	Antigène de l'hépatite B	Prévention del'hépatite B	Smithkline	1989
	Toxines pertuisiques recombinantes, Triacelluvax®	Tétanos, coqueluche, diphtérie	Chiron	1999
	Toxine diphtérique recombinante glycosylée, Prevenar®	Infections infantiles à pneumocoque	Wyeth-Lederle	2001

Tableau I.2 : Principales molécules recombinantes sur le marché européen en 2004 (source : http://i-s-b.org/business/recombinant_f.htm).

Dans le cas de cultures agitées, les supports les plus couramment utilisés sont les microporteurs. Ce sont des billes de gélatine, sephadex, cellulose, verre ou plastique..., chargées ou non, ayant un diamètre de 100 à 500 μm et une densité légèrement supérieure à celle du milieu de culture (Butler *et al.*, 1987). En bioréacteur agité, le nombre de microporteurs utilisés peut varier de 10^5 à 10^7 par litre de milieu, les cellules se divisant à leur surface. Par la suite, des microporteurs poreux, ou macroporteurs, ont été développés dans le but d'augmenter la surface disponible pour la colonisation mais aussi de protéger les cellules des effets néfastes des forces de cisaillement (Cahn, 1990). En effet, avec ces systèmes, les cellules se multiplient à l'intérieur des pores. Grâce à ceux-ci, il est donc possible d'augmenter les vitesses d'agitation et d'aération. L'utilisation des micro- et macroporteurs présente, de plus, l'avantage de pouvoir séparer rapidement les cellules du milieu par simple décantation, d'où un intérêt majeur lors de cultures de type recharge-récolte ou perfusées mais également lors de l'étape de purification de la protéine d'intérêt. Cependant, quelques inconvénients subsistent : non seulement les porteurs peuvent être à l'origine d'importants gradients et ainsi nuire à l'homogénéité du procédé mais ils posent aussi problèmes lorsque leur surface disponible est saturée par les cellules et que l'extrapolation du procédé est nécessaire.

Une alternative à l'utilisation de ces porteurs est la culture de cellules en agrégats, où chaque cellule devient alors un support pour ses congénères. Ces agrégats peuvent atteindre un diamètre proche du millimètre, sachant que leur taille est directement liée à la vitesse d'agitation (Moreira *et al.*, 1995a) et au milieu de culture utilisé (Moreira *et al.*, 1995b). Cependant, dans ce système, l'accumulation de couches de cellules peut également limiter la diffusion de l'oxygène et des nutriments vers les cellules situées à l'intérieur de l'agrégat, et par là même, engendrer un noyau de cellules nécrotiques.

Une autre méthode permettant de cultiver les cellules adhérentes consiste à les piéger dans des chambres cellulaires de réacteurs membranaires perfusés, tels que les systèmes à fibres creuses (Choi *et al.*, 1995).

- Cellules en suspension

La faculté des cellules à croître en suspension n'est pas toujours innée. Elle nécessite le plus souvent une adaptation progressive aux nouvelles conditions, souvent longue et fastidieuse. Celle-ci requiert, par ailleurs, la désagrégation des amas cellulaires, par action mécanique ou par ajout de trypsine, à chaque transfert des cellules. Néanmoins, une fois l'adaptation

réalisée, l'utilisation de ces cellules présente plusieurs intérêts ; elles peuvent être cultivées en réacteur parfaitement agité ce qui réduit les phénomènes de limitations diffusionnelles tout en facilitant la prise d'échantillons et le dénombrement des cellules. Restent quelques inconvénients tels qu'une sensibilité accrue aux contraintes de cisaillement et parfois une réduction du taux de production de protéines (Chevalot *et al.*, 1994) et de la vitesse spécifique de croissance (Renner *et al.*, 1993). Cependant, la culture de cellules en suspension est le système de choix pour les applications à grande échelle car elle permet un suivi et un contrôle aisé des paramètres environnementaux extracellulaires et donc une possibilité d'extrapolation plus simple.

b. Systèmes de culture à grande échelle

Suite au succès récent de la biopharmaceutique, il est devenu primordial que la production de protéines recombinantes par culture de cellules animales soit suffisante pour faire face à la demande croissante en anticorps monoclonaux et en protéines recombinantes. Ainsi, un intérêt accru a été porté aux techniques de production à grande échelle. L'approche la plus conventionnelle pour ces productions biologiques à grande échelle est l'utilisation de bioréacteurs à cuve agitée mécaniquement pouvant atteindre des volumes de 20 000 litres. (Glaser, 2000 ; Marks, 2003).

Les principales barrières à la culture de cellules de mammifères à grande échelle ont toujours été la nécessité de mieux contrôler le procédé, l'accumulation de produits toxiques et l'oxygénation du fait notamment d'une faible résistance aux forces de cisaillement des cellules animales. Actuellement, ces problèmes, bien que n'étant toujours pas complètement résolus, sont à peu près maîtrisés. Cependant, des obstacles supplémentaires sont apparus. En effet, il est aujourd'hui indispensable de veiller à la qualité du produit fini et de minimiser le risque de contamination par des agents infectieux apportés par les matières premières ou par de mauvaises conditions de culture, tout en maximisant bien évidemment la productivité.

- Culture en mode discontinu ou "batch"

Il s'agit d'un système clos : dans ce type de culture, il n'y a pas d'addition de milieu de culture ou de nutriments en cours de culture, hormis l'apport d'oxygène, de CO₂ ou de base, ni de soutirage, mis à part les prélèvements d'échantillons destinés au suivi cinétique des cultures. Les nutriments sont consommés par les cellules et les métabolites produits s'accumulent dans le milieu au cours du temps. Généralement, les cellules animales cultivées en mode discontinu

présentent une période de croissance de 3 à 7 jours en fonction des lignées et des milieux de culture utilisés. L'arrêt de la croissance survient dans la grande majorité des cas, à la suite, soit de l'épuisement d'un ou plusieurs nutriments, soit d'une concentration excessive de co-produits du métabolisme, inhibiteurs de la croissance. Afin de réaliser plusieurs cultures discontinues successives, il est possible, en fin de phase de croissance, de vidanger partiellement le réacteur et de rajouter du milieu frais; on parle alors de culture "recharge-récolte" ou "discontinue répétée". Grâce à ce système, un nouvel ensemencement cellulaire est inutile.

Au niveau industriel, deux types de bioréacteurs (figure I.2) sont généralement utilisés en mode discontinu, le réacteur à agitation mécanique restant très largement majoritaire (Marks, 2003).

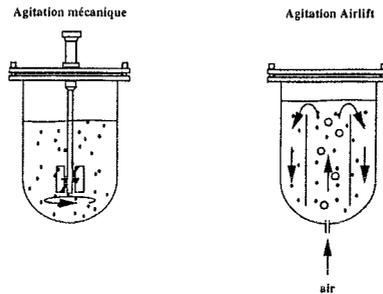


Figure I.2 : Exemples de bioréacteurs agités employés lors de cultures discontinues

✓ Réacteurs mécaniquement agités

Ces derniers sont largement utilisés pour la culture de cellules en suspension depuis les années 60. En effet, les cultures effectuées dans ces réacteurs sont, non seulement, plus faciles à extrapoler, mais surtout, leur relative homogénéité facilite le suivi et le contrôle des différents paramètres opératoires. De plus, grâce à l'utilisation de microporteurs, conventionnels ou macroporeux, les cellules adhérentes peuvent également être cultivées dans ces systèmes. L'agitation, généralement réalisée grâce à un rotor axial, muni de pales, a pour fonction principale le maintien relativement homogène des cellules en suspension. Différents modes d'aération peuvent être employés. A petite échelle, l'utilisation d'un diffuseur ou "sparger" permettant l'injection de l'air ou de l'oxygène au cœur de la culture à travers un fritté est courante mais peut causer des dommages cellulaires. Une technique moins inconfortable

pour les cellules consiste en une aération de surface réalisée grâce au balayage du ciel du réacteur avec de l'air ou de l'oxygène. Cependant, cette méthode ne permet pas de soutenir des densités cellulaires élevées telles que celles habituellement atteintes lors des cultures industrielles. Un autre système d'aération consiste alors à utiliser une canne ou un anneau d'aération plongeant dans le milieu de culture et générant de grosses bulles, mieux tolérées par les cellules en culture (Fenge *et al.*, 1993).

✓ Réacteurs de type gazo-siphon ou "air-lift"

Dans ce type de réacteur, l'agitation et l'aération sont réalisées simultanément à l'aide d'un flux montant de bulles d'air au sein de cuves ayant un faible rapport diamètre/hauteur. Ainsi, tout en induisant des contraintes mécaniques faibles et bien réparties, de bons taux de transfert d'oxygène peuvent être atteints. Ce type de réacteur a été utilisé avec succès pour des cultures en suspension de cellules BHK, des cellules lymphoblastiques humaines, des cellules CHO, des hybridomes et des cellules d'insectes, mais reste néanmoins beaucoup moins fréquent que le réacteur agité par une turbine (Grima *et al.*, 1997).

• Culture en mode semi-continu, ou "fed-batch"

Dans ce cas, le milieu, concentré ou non, est ajouté par paliers ou en continu, sans aucun soutirage. On assiste, au cours du temps, à une augmentation du volume de milieu de culture présent dans le bioréacteur, plus ou moins importante selon le type d'alimentation choisi. Ce système permet, par rapport au mode discontinu, de prolonger la phase de croissance cellulaire, d'augmenter la densité cellulaire maximale des cellules ainsi que la production de la protéine recombinante (Dardenne *et al.*, 1994). Cependant, la culture en mode semi-continu nécessite un travail beaucoup plus important au niveau de la phase de développement afin d'acquérir une bonne connaissance de la physiologie cellulaire, indispensable au contrôle des différents paramètres opératoires. Depuis peu, on assiste à un intérêt croissant pour ce mode opératoire, favorisé par l'accumulation de connaissances physiologiques de la dernière décennie.

• Culture en mode continu, avec ou sans rétention cellulaire

Il s'agit d'un système ouvert dans lequel du milieu frais est apporté en permanence alors qu'est soutiré le milieu usagé contenu dans le réacteur. Ce mode de culture permet de maintenir une viabilité correcte des cellules durant une longue période, pouvant aller jusqu'à plusieurs mois

ainsi qu'un environnement stable. En effet, les nutriments étant apportés en continu et les métabolites étant évacués, le système de culture fonctionne alors en régime permanent.

✓ Cultures continues sans rétention cellulaire

Dans ce cas, les cellules sont soutirées en même temps que le milieu. Ce système est très utilisé, à l'échelle du laboratoire, pour réaliser des études physiologiques des cellules en fonction des paramètres opératoires faisant varier l'environnement cellulaire (Goergen, 1992 ; Hayter *et al.*, 1993). Dans l'industrie, la capacité des réacteurs continus sans dispositif de rétention cellulaire est au maximum de 2 000 litres. Cependant, ce mode de culture reste peu employé du fait des faibles productivités obtenues.

✓ Cultures continues avec rétention cellulaire ou cultures perfusées

De nombreux systèmes de perfusion ont été développés : ils permettent, à la fois l'apport continu de milieu neuf et le soutirage du milieu usagé, tout en maintenant les cellules dans le réacteur. Ces réacteurs supportent des densités cellulaires élevées et permettent d'étendre la durée de production. Le système perfusé présente plusieurs avantages par rapport au système discontinu ou semi-continu. Le changement continu du milieu engendrant l'élimination des co-produits toxiques et des produits sécrétés réduit les risques de dégradation des protéines produites (Castilho *et al.*, 2002 ; Ryll *et al.*, 2000). Une concentration cellulaire élevée et une grande quantité de produits peuvent être obtenus en une seule opération (Deo *et al.*, 1996). Une meilleure efficacité économique, du fait d'une productivité accrue, est également mentionnée (Roth *et al.*, 1997). En effet, les réacteurs de type perfusé sont capables de supporter des productions commerciales sans nécessiter d'équipement à grande échelle car le volume du réacteur peut être diminué de plus de cent fois par rapport à une culture discontinue. Cependant l'utilisation d'une telle technique présente un risque élevé de contamination du fait de la complexité du dispositif mis en oeuvre. Ainsi, très peu d'industries pharmaceutiques ont choisi d'utiliser de tels systèmes perfusés pour des productions GMP à but commercial. Les cultures de cellules de mammifères à grande échelle restent habituellement réalisées avec des procédés discontinus ou semi-continus. Pourtant, depuis quelques années, les industries apportent de plus en plus d'attention aux procédés perfusés (Chu et Robinson, 2001), notamment pour la production d'anticorps monoclonaux à usage diagnostique.

Les réacteurs perfusés peuvent être classés en deux grandes catégories (figure I.3) :

- ceux dans lesquels les cellules sont maintenues statiques, exclusivement dans la chambre cellulaire : le milieu est apporté aux cellules qui sont retenues soit entre 2 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 en céramique (Applegate et Stephanopoulos, 1992), en plastique (Kadouri *et al.*, 1997) ou en gélatine (Tinto *et al.*, 1997). Ces systèmes présentent l'avantage d'être compacts et d'éviter de soumettre les cellules à des forces de cisaillement trop importantes. Cependant, les transferts d'oxygène et de nutriments sont parfois limités et le contrôle des paramètres opératoires s'avère souvent difficile, la prise d'échantillons n'étant pas toujours réalisable.

- ceux dans lesquels les cellules circulent en dehors de la chambre cellulaire : dans ce cas, les cellules sont retenues dans le réacteur à l'aide d'un dispositif placé à l'intérieur ou à l'extérieur du réacteur sur une boucle de recyclage. Les cellules peuvent être séparées du milieu par l'emploi d'une cartouche de micro- ou ultrafiltration (Brotherton et Chau, 1995 ; Pinton, 1991), par un filtre rotatif (Yabannavar *et al.*, 1994), par centrifugation continue (Tokashiki et Takamatsu, 1993), par sédimentation gravitationnelle (Searles *et al.*, 1994) ou acoustique (Sonderhoff, 1996).

Cependant, on retiendra qu'il n'existe pas de système idéal car chacun possède des avantages et des inconvénients. Le choix d'un système sera donc guidé à la fois par la spécificité cellulaire, la faisabilité technique et par les impératifs économiques.

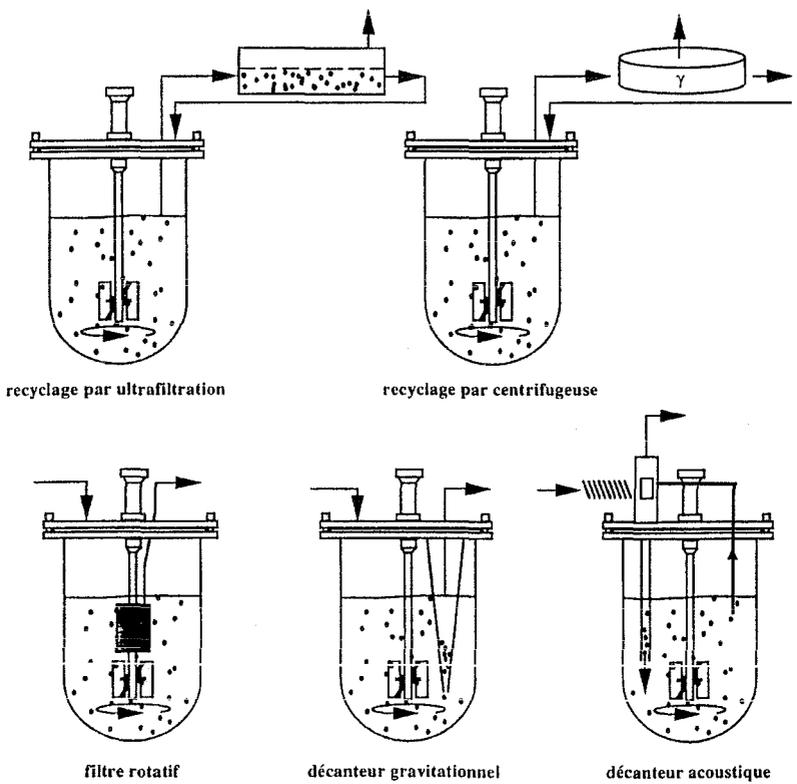
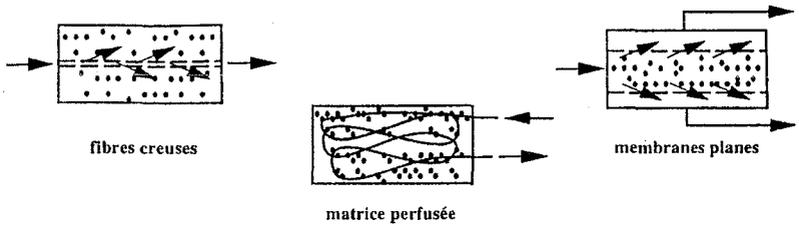


Figure I.3. : Exemples de bioréacteurs employés pour les cultures perfusées de cellules animales.

c. Systèmes de culture à usage unique, utilisables à "grande" échelle

L'utilisation de systèmes de culture à usage unique est actuellement en plein essor. En effet, ces derniers présentent de nombreux avantages. Réalisés le plus souvent en polymères, ils sont stériles et prêts à l'emploi. Les étapes de stérilisation ainsi que les risques de contaminations croisées entre différentes manipulations sont ainsi évités. De plus, le temps d'installation est considérablement réduit car les besoins en équipements en acier inoxydable sont restreints, voire éliminés. De même, l'utilisation de composants jetables permet de minimiser les étapes de validation qui consistent dans ce cas à remplir les certificats correspondants au matériel à usage unique. De nombreux systèmes de ce type sont maintenant commercialisés. Les principaux sont présentés dans le tableau I.3. Leur capacité dépasse rarement quelques litres et reste donc peu compatible avec des productions industrielles massives. Cependant, l'un de ces systèmes permet de réaliser des cultures en mode discontinu, semi-continu ou perfusé pouvant atteindre 500 litres. Il s'agit du bioréacteur à vagues ou "BioWave". Celui-ci génère un mouvement oscillatoire sur le milieu de culture, afin d'obtenir une aération et un mélange sans cisaillement. Une ventilation et aération continues du ciel garantissent un bon apport en oxygène et une élimination des gaz métaboliques.

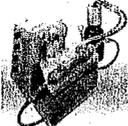
Dispositif	Exemples	Capacité	Principales caractéristiques
Flacons de roux, flacons agités	Flacons de roux Spinners Flacons roulants	10 mL à 3 L	Pas d'extrapolation (limitation en oxygène) Largement utilisé
Systèmes "multiplateaux"	Cell factory 	1200 à 24 000 cm ² (2 à 40 plateaux)	Surface importante Manipulation laborieuse Extrapolation difficile
Fibres creuses	Spectrum Cellmax 	5.10 ⁹ cellules/module	Difficile à mettre en œuvre Risque de contamination Réussites variables
Systèmes en nids d'abeille	Cell Cube, 	Surface d'adhésion (jusqu'à 85 000 cm ²)	Difficiles à manipuler Utiles pour des applications particulières Extrapolation difficile
Systèmes rotatifs (Saarinen et Murhammer, 2000)	3D rotating 	Quelques millilitres	Difficiles à utiliser Utiles pour des applications particulières (thérapie cellulaire) Extrapolation difficile
Systèmes oscillatoires (Hu <i>et al.</i> , 2003)	Bello Cell 	Quelques litres	Extrapolation difficile
Système à bascule (Singh, 1999)	Wave Bioreactors 	100 mL à 500 L	Facilement extrapolable Simple d'utilisation

Tableau I.3 : Principaux systèmes de culture de cellules animales, à usage unique.

d. Paramètres opératoires des cultures en bioréacteur

▪ Température

Les cellules de mammifères possèdent une température optimale de croissance de 37°C, mais la cellule peut-être maintenue en croissance entre 36,5°C et 38°C. (Weidemann *et al.*, 1994 Ducommun *et al.*, 2002). Au-delà de ces valeurs, la croissance est fortement ralentie et le

décès activé dans le cas d'une température supérieure à 38°C ; une régulation précise doit donc être envisagée à l'aide d'une sonde pt 100.

- Oxygène dissous

L'oxygène est un facteur primordial pour la croissance des cellules animales. En effet, sa consommation est généralement comprise entre 0,05 et 0,5 mmol O₂/h.10⁹cellules. La majorité des bioréacteurs comporte un système de contrôle de l'oxygène dissous utilisant une sonde stérilisable et des électrovannes. Son niveau est habituellement fixé entre 40 et 60% de la saturation en air afin d'éviter les effets limitants ou inhibiteurs de concentrations trop faibles ou trop élevées. Pour atteindre ces valeurs, différents systèmes d'aération peuvent être utilisés. On citera par exemple l'aération de surface, l'aération par un sparger, l'aération par des systèmes de colonne à bulles, air-lift ou encore des aérations par membrane, par grille, par une canne ou encore par un anneau aération.

- Agitation

Les cellules animales étant assez sensibles aux effets des forces de cisaillement, une agitation modérée s'avère indispensable (Senger et Karim, 2003). Elle sera établie en fonction du volume utile du réacteur. Ainsi, par exemple, pour une même vitesse en bout de pale, l'agitation sera, dans le cas d'un réacteur de deux litres, d'environ 50 rpm alors qu'elle sera plutôt de l'ordre de 5 rpm dans un réacteur de 1 000 litres.

- Osmolarité

En culture de cellules animales, il est important de maintenir une pression osmotique normale dans le milieu de culture. En effet, une solution hypotonique risque de faire éclater les cellules sans paroi rigide, en provoquant une entrée massive d'eau par osmose. Une solution hypertonique pourra également avoir des effets néfastes sur la vitesse de croissance mais par contre pourra avoir une action positive sur la vitesse de production des protéines recombinantes produites. Pour les cellules de mammifères, la valeur normale est de 300-320 mOsm.

I.2.2. Principaux composants des milieux de culture de base

Lorsqu'une cellule est séparée de son tissu ou organisme d'origine, c'est le milieu de culture qui est chargé de reproduire au mieux les conditions environnementales et nutritives qu'elle a

connus *in vivo*. Grâce à cela, la cellule pourra proliférer et produire des molécules d'intérêt. Traditionnellement, les cellules animales sont cultivées dans des milieux de base contenant une source carbonée, des acides aminés dont la glutamine, des éléments minéraux et des oligoéléments, des vitamines et un système tampon. Ces milieux sont manufacturés sous forme liquide, concentrée ou prête à l'emploi, ou sous forme de poudre. Leurs principaux constituants sont présentés ci-dessous.

- Glucose

La plus importante source d'énergie et de carbone des cellules animales est constituée par les sucres et notamment le glucose (5-40 mM selon les milieux de culture utilisés). Cependant, dans le but de limiter la production de lactate, il peut être remplacé par d'autres glucides, qui seront métabolisés plus lentement. Ainsi, le glucose peut être substitué par du maltose (Duval *et al.*, 1992), du galactose (Wagner, 1990 ; Altamiro *et al.*, 2000), du fructose (Imamura *et al.*, 1982) ou encore du mannose (Jayme, 1991).

- Glutamine

Au niveau de sa concentration, la glutamine est le deuxième composant du milieu de culture. Sa concentration est 10 à 100 fois plus élevée que la teneur des autres acides aminés : 0,7-5 mM. Elle représente une importante source de carbone et d'énergie pour les cellules animales en culture. C'est un précurseur de la synthèse des purines, des pyrimidines, des sucres aminés, de l'asparagine, de l'acide aspartique ainsi que de la proline. Elle sert également de composant régulateur lors de la réplication de l'ADN. Une carence en glutamine peut conduire non seulement à un arrêt de la croissance cellulaire dû à une inhibition de la synthèse de l'ADN et/ou à une réduction de la formation des sucres aminés, mais aussi, au déclenchement du phénomène d'apoptose (Singh *et al.*, 1994 ; Meneses-Acosta *et al.*, 2001). En effet, la plupart des cellules animales étant dépourvues de glutamine synthétase (hybridomes et myélomes) ou ayant une activité très faible (BHK et CHO), elles ne sont pas capables de synthétiser elles-mêmes de la glutamine à partir du glutamate et des ions ammonium (Hayward *et al.*, 1986 ; Bebbington *et al.*, 1992 ; Neermann et Wagner, 1996). Dans le but de réduire la production des ions ammonium, toxiques pour les cellules en culture, la glutamine est parfois substituée par des dipeptides (Dardenne, 1995).

- Acides aminés

La concentration initiale de chaque acide aminé (hormis la glutamine) est généralement inférieure à 1 mM. Ce sont les principaux pourvoyeurs d'azote et ils sont donc impliqués dans la synthèse des protéines et des nucléotides. La culture *in vitro* de cellules de mammifères nécessite non seulement l'emploi des huit acides aminés indispensables à l'homme, (isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane, valine) mais aussi celui de cinq acides aminés supplémentaires, (arginine, cystéine, glutamine, histidine et tyrosine). Certains milieux en contiennent même davantage. En effet, un enrichissement du milieu en acides aminés est souvent bénéfique pour les cultures en bioréacteur.

- Lipides

Ils sont utiles à l'édification des membranes cellulaires et en tant que réserve d'énergie métabolique. En culture de cellules animales, ils sont principalement représentés par les acides gras tels que l'acide linoléique et l'acide oléique ainsi que le cholestérol fournis par le sérum de veau fœtal (Mizrahi et Lazar, 1988). Aussi, lors de l'utilisation de milieu sans sérum, ils sont généralement rajoutés au milieu de base, (Barnes et Sato, 1980 ; Glassy *et al.*, 1988 ; Castro *et al.*, 1992). Cependant, étant difficilement solubles dans l'eau, ils sont généralement apportés sous forme de liposomes constitués d'un mélange de lipides (lécithine, cholestérol, sphingomyéline...) (Kessler, 1994 ; Martial *et al.*, 1995).

- Eléments minéraux

Les ions inorganiques (calcium, magnésium, phosphate, potassium et sodium) présents dans les milieux de culture permettent le maintien du pH et de l'osmolarité du milieu, le transfert de signaux ou de molécules à travers les membranes. Ils jouent encore le rôle de cofacteurs enzymatiques. De plus, des ions métalliques, à l'état d'éléments traces, peuvent également être ajoutés dans les milieux de culture pour favoriser la croissance cellulaire et/ou remplacer la transferrine.

- Vitamines

Généralement, les milieux utilisés pour la culture *in vitro* des cellules de mammifères contiennent huit vitamines, principalement issues du groupe B : l'acide folique, la choline, la nicotinamide, l'inositol, le pantothénate, le pyridoxal, la riboflavine et la thiamine et parfois la biotine.

- Désoxyribonucléotides et désoxyribonucléosides

Ce sont les constituants essentiels de l'ADN et de l'ARN. Ils sont notamment indispensables dans le cas de propagation de lignées déficientes en déhydrofolate réductase qui sont alors incapables de synthétiser une partie d'entre eux.

- Sérum

En dépit du développement important des milieux sans sérum à l'échelle industrielle, force est de reconnaître que le sérum est toujours largement utilisé dans la formulation des milieux de culture pour cellules animales. En effet, son ajout est souvent indispensable pour assurer la croissance cellulaire bien que sa composition ne soit pas complètement définie et connue. Sa concentration dans le milieu de culture varie entre 2 et 20%. Le sérum le plus couramment employé est celui de veau fœtal.

- Surfactants

Afin de protéger du mieux possible les cellules contre les forces de cisaillement, différents surfactants peuvent être ajoutés dans les milieux de culture. L'un des plus utilisés est le Pluronic-F68, un polyol constitué à 50% de polyoxypropylène (hydrophobe) et à 50% de polyoxyéthylène (hydrophile). Son rôle protecteur a été montré pour la première fois en 1977 lors de culture de cellules de mammifères (Mizrahi, 1977).

- Antibiotiques

De nombreux antibiotiques peuvent être utilisés en culture cellulaire : pénicilline, streptomycine, gentamycine, néomycine, kanamycine... Cependant, ils sont coûteux, parfois peu stables au cours du temps et toxiques pour les cellules lorsqu'ils sont présents à des concentrations trop élevées. Aussi, ils sont principalement utilisés pour la sélection des clones et/ou l'amplification des cellules et parfois pour des cultures réalisées à petite échelle.

1.3. La lignée cellulaire CHO

Trois types cellulaires sont principalement utilisés pour l'expression permanente de protéines recombinantes ou d'anticorps monoclonaux. Il s'agit de la lignée CHO, de la lignée BHK et des hybridomes. Cependant, l'utilisation des cellules CHO prévaut toujours actuellement car elles présentent de meilleures performances pour la synthèse et la sécrétion des protéines recombinantes, la résistance aux forces de cisaillement, la tolérance aux changements de

conditions de culture et pour leur temps de génération relativement court. De plus, le nombre important de données physiologiques et métaboliques accumulées font désormais de ces cellules, un hôte de choix.

C'est en 1957, que Puck *et al.* ont établi une lignée fibroblastique à partir de l'ovaire de hamster chinois. Actuellement, la plupart des lignées CHO recombinées utilisées résultent de la transfection du gène d'intérêt et du gène de la dihydrofolate réductase (dhfr) dans une lignée CHO déficiente en cette enzyme, isolée par Urlaub et Chasin en 1980. Cette construction permet la sélection et l'amplification du nombre de copies du gène par le méthotrexate (Morelle, 1993). La température de croissance optimale des cellules CHO est de 37°C, un pH légèrement alcalin (7,2 à 7,4) est souhaitable. Leur temps de génération varie entre 12 et 24 heures selon les lignées et les conditions de culture utilisées. Les cellules CHO ont été propagées dans des milieux avec ou sans sérum voire même sans protéine (Hamilton et Ham, 1977) et ont été utilisées pour la première fois en 1987 pour la production du tPA (Lubiniecki *et al.* 1988) puis par la suite pour celle de cytokines, facteurs de croissance, hormones, constituants sanguins, enzymes et vaccins (Hodgson, 1993). La lignée CHO utilisée au cours de ce travail est productrice de l'interféron- γ .

1.4. L'interféron- γ

1.4.1. Présentation

Dans le système immunitaire, la communication entre les lymphocytes T, les lymphocytes B, les monocytes et les macrophages est réalisée par diverses molécules solubles appelées cytokines. Au-delà du système immunitaire, les cytokines participent au langage universel partagé par toutes les cellules de l'organisme dès lors que celles-ci sont munies d'un récepteur membranaire spécifique. L'expression des cytokines n'est pas constitutive et doit donc être induite. La famille des cytokines est divisée en plusieurs groupes : interleukines (IL-1 à IL-10), interférons (α , β , ω et γ) et tumor necrosis factor (TNF- α et β) pour les principales (Cavaillon, 1993). Les interférons ont en commun une activité anti-virale. Ils sont divisés en deux types distincts : type I (IFN- α , β et ω) et type II (IFN- γ). Les gènes des interférons du type I sont codés sans intron et portés par le chromosome 9 tandis que celui de l'interféron-gamma comporte trois introns. Chez l'Homme, il est porté par le chromosome 12 (Charley et La Bonnardière, 1993). L'interféron-gamma est également appelé interféron immune.

I.4.2. Structure

La séquence de l'ADNc de l'interféron-gamma humain a une taille de 1,2 kb. Elle a été clonée par Gray *et al.*, en 1982. La protéine sécrétée comporte 143 acides aminés et aucun pont disulfure. Son extrémité N-terminale est bloquée par un résidu glutamine sous forme de pyroglutamate (Rinderknecht *et al.*, 1984). L'extrémité C-terminale peut-être partiellement privée de plusieurs acides aminés avant sécrétion par les cellules CHO (Curling *et al.*, 1990). La masse moléculaire théorique découlant de la structure primaire du polypeptide est de 17,1 kDa (Gray *et al.*, 1982). La structure tridimensionnelle de l'interféron-gamma a été déterminée par Ealick *et al.* (1991) et Grzesiek *et al.* (1992). L'interféron gamma est un homo-dimère. La structure dimérique est compacte et relativement symétrique (figure I.5). Chaque monomère est constitué de six hélices alpha reliées par plusieurs boucles. Il n'apparaît pas de feuillet β . La forme monomérique est également active (Saraneva *et al.*, 1994).

La chaîne polypeptidique naturelle ou recombinante présente deux sites de glycosylation de type N : ASN 25 et ASN 97, ainsi que le présente la figure I.5. Cependant, des degrés de glycosylation différents peuvent être retrouvés. En effet, l'interféron gamma peut avoir deux sites (2N), un site (1N) ou aucun (0N) des sites de glycosylation occupés par des glycanes (Kelker *et al.*, 1984). Dans le cas de l'interféron-gamma mono-glycosylé, le glycanne est porté par le site ASN 25 (James *et al.*, 1995).

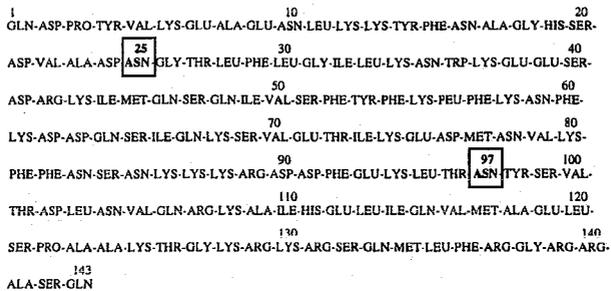


Figure I.5 : Structure primaire d'un monomère de l'interféron-gamma humain (d'après Rinderknecht *et al.*, 1984). Les deux sites potentiels de glycosylation sont encadrés.

I.4.3. Rôle et utilisation thérapeutique

L'interféron-gamma a été mis en évidence en 1957, chez des fibroblastes de poulet par Isaacs et Lindenmann. Depuis, on sait que celui-ci peut-être exprimé par deux types de cellules : les lymphocytes T et les cellules tueuses naturelles (Farrar et Schreiber, 1993). Divers inducteurs peuvent engendrer la production d'interféron-gamma : cytokines, antigènes, lectines, ionophores de calcium et l'interféron-gamma lui-même (Charley et La Bonnardière, 1993).

L'action de l'interféron-gamma sur une cellule nécessite que celle-ci porte un récepteur membranaire spécifique, son extrémité N-terminale étant impliquée dans la liaison avec le récepteur membranaire (Walter *et al.*, 1995). L'interféron-gamma possède une activité antivirale en conférant aux cellules un état réfractaire aux infections virales. Il stimule les macrophages ce qui augmente les capacités phagocytaires, cytotoxiques, bactéricides et anti-parasitaires (Billiau et Dijkmans, 1990). Il agit également directement sur le système immunitaire par modulation de la production d'anticorps chez les lymphocytes B et T.

Les applications thérapeutiques de l'interféron-gamma couvrent plusieurs champs d'action. Les résultats les plus efficaces sont obtenus dans le traitement de pathologies parasitaires et bactériennes (leishmaniose, toxoplasmose, lèpre, salmonellose, listériose). L'interféron-gamma permet également la stimulation du système immunitaire chez des patients immunodéprimés (Lewis et Wilson, 1990). Il est aussi utilisé pour combattre des pathologies cancéreuses. Enfin, des vecteurs rétroviraux codant pour l'interféron-gamma sont aujourd'hui testés dans le cadre des thérapies géniques anticancéreuses et notamment dans le cadre de la lutte contre les mélanomes métastatiques.

I.4.4. Expression de l'interféron gamma humain recombinant

Jusqu'au milieu des années 80, l'interféron-gamma utilisé à des fins cliniques était issu de leucocytes obtenus par transfusion sanguine. La pureté de la préparation était alors trop faible, de l'ordre de 1%, et des quantités importantes de sang étaient requises pour l'obtention de peu d'interféron-gamma. En 1990, la "Food and Drug Administration" donna à la société Genentech, l'autorisation de mise sur le marché américain de l'interféron-gamma humain recombinant. En Europe, la société Boehringer Ingelheim fut autorisée à le commercialiser en 1992. Ces interférons-gamma recombinants étaient tous deux produits chez *E. coli* et donc

non glycosylés. En effet, même non glycosylé, l'interféron-gamma est biologiquement actif (Littman *et al.*, 1985). Bien que le rôle réel de la glycosylation dans l'activité anti-virale reste encore aujourd'hui débattu, il est toutefois avéré que les glycanes portés par l'interféron-gamma améliorent certaines propriétés biologiques. De plus, l'interféron-gamma non glycosylé est éliminé plus rapidement de la circulation sanguine que la forme naturelle (Saraneva *et al.*, 1993) et son antigénicité est modifiée (Meager et Leist, 1986).

Depuis l'obtention de l'ADNc codant pour l'interféron-gamma humain (Gray *et al.*, 1982), diverses équipes ont propagé des cellules CHO le produisant. (Devos *et al.*, 1984 ; Hayter *et al.*, 1991 ; Castro *et al.*, 1992 ; Lamotte *et al.*, 1997...). Leurs travaux ont abouti à une littérature assez abondante sur ce système de production, et, en particulier, sur les relations entre les conditions de culture et la qualité structurale de l'interféron obtenu.

II. Les milieux de culture sans sérum animal

II.1. Origine des milieux de culture

Au commencement de la culture de tissus, au tout début du 20^{ème} siècle, les milieux nutritifs étaient constitués de liquides biologiques tels que la lymphe ou le liquide d'ascite (d'après Butler, 1990). Quelques années plus tard, des solutions salines additionnées de diverses sources énergétiques (hydrolysats de caséine, de lactalbumine, peptones ou vitamines) s'y substituèrent. Cependant, ces milieux nutritifs ne satisfaisaient que très partiellement aux besoins cellulaires. Aussi, parlait-on plutôt de survie cellulaire que de véritable culture cellulaire. A partir des années 30-40, les cellules animales sont cultivées dans des milieux de base contenant des éléments minéraux, des acides aminés, des vitamines, un tampon pH et une source carbonée. Ils sont ensuite supplémentés par du sérum animal (5 à 20%), chargé d'apporter, non seulement, différents facteurs de croissance et d'adhérence et des protéines de transport, mais également, de protéger les produits cellulaires de la dégradation par des enzymes protéolytiques, de jouer le rôle de tampon et de détoxifiant, et de protéger les cellules durant la congélation (Froud, 1999 ; Merten, 1999). Plusieurs types de sérum ont été utilisés et cela à diverses concentrations, mais le sérum de veau fœtal (SVF) s'est imposé comme l'additif le plus utilisé pour la croissance des cellules eucaryotes. Le tableau I.4 résume les fonctions principales du sérum animal.

Fonctions principales	Composant remplissant cette fonction
Transporter des substances nutritives instables ou non solubles dans l'eau	Albumine, globuline, transferrine
Absorber et neutraliser les toxines	Molécules de liaison avec les métaux lourds et les toxines
Inhiber les protéases	α -1 anti-trypsine
Permettre l'adhérence des cellules	Fibronectine, laminine
Fournir des substances nutritives essentielles de faible poids moléculaire	Sulfate, phosphate, éléments traces (zinc, sélénium, manganèse, cobalt, cuivre)
Apporter des vitamines et des co-facteurs	Riboflavine, pyridoxine
Tamponner le milieu	Phosphate, albumine
Promouvoir la croissance	Hormones, insuline, putrescine, facteurs de croissance
Protéger les cellules contre les forces de cisaillement (viscosité)	Albumine
Protéger les cellules durant la congélation	Molécules cryoprotectrices

Tableau I.4 : Fonctions majeures du sérum animal dans les cultures de cellules animales (d'après Froud, 1999).

Bien qu'essentiel pour la culture cellulaire, le sérum présente plusieurs inconvénients importants : une composition exacte inconnue, une variabilité de composition probable et donc d'activité de lot à lot, une concentration en protéine élevée, notamment gênante lors du processus de purification des protéines recombinantes produites, un coût élevé et des problèmes d'éthique. De plus, et surtout, le sérum peut être une source d'agents pathogènes comme les bactéries, les virus ou les agents responsables de l'encéphalopathie spongiforme bovine (Van der Valk *et al.*, 2004). Le tableau I.5 rassemble les différents inconvénients de l'utilisation du sérum animal dans les milieux de culture pour cellules animales.

Inconvénients
Composition non définie <ul style="list-style-type: none"> - variabilité de lot à lot - tests d'évaluation obligatoires - environnement cellulaire non défini
Origine biologique <ul style="list-style-type: none"> - contamination possible (virus, mycoplasmes, prions) - problème de qualité - endotoxines
Teneur élevée en protéines <ul style="list-style-type: none"> - difficulté de purification du produit d'intérêt
Variabilité des prix

Tableau I.5 : Inconvénients du sérum animal utilisé lors des cultures cellulaires.

II.2. Suppression du sérum animal dans les milieux de culture

II.2.1. Historique

Face aux nombreux inconvénients du sérum, les premiers milieux sans sérum furent élaborés dans le but d'obtenir une composition simplifiée et définie, facilitant la purification des protéines produites et, surtout, éliminant les sources potentielles d'agents infectieux (Minamoto *et al.*, 1991).

Deux pionniers, Sato et Ham, choisissant des approches totalement différentes, entamèrent, dès 1974, des recherches dans ce domaine. Tout d'abord, Sato démontra que le rôle principal du sérum en tant que promoteur de la croissance cellulaire était d'apporter diverses hormones aux milieux de culture. Par la suite, il substitua au sérum un mélange complexe d'hormones,

de facteurs de croissance, de facteurs d'attachement et de protéines de transport. Cependant, de tels mélanges étaient spécifiques d'un type cellulaire et nécessitaient donc des optimisations particulières en fonction de chaque lignée mais aussi en fonction du but recherché. Ham, quant à lui, choisit d'optimiser de façon qualitative et quantitative les milieux de base afin de réduire l'addition d'hormones et de facteurs de croissance. Cependant, cette méthode nécessitait d'adapter graduellement chaque type cellulaire au milieu privé de sérum et donc d'imposer certains critères de sélection. Parmi les différentes formulations proposées, on retiendra notamment le milieu appelé Ham's Nutrient Mixtures (F-12 et F-10) qui fut à cette époque l'un des plus utilisés.

D'autres investigateurs montrèrent que la croissance et la viabilité cellulaire pouvaient être augmentées grâce à la supplémentation du milieu de base par un mélange d'acides aminés et de vitamines (Dulbecco et Freeman, 1959) mais aussi par l'ajustement de la concentration en sucre des milieux et par l'ajout d'éléments tampons. Par la suite, Sato (1977), puis Murakami *et al.* (1982), ont rapporté l'intérêt de compléter des formulations de base par quatre éléments nutritifs : l'insuline, la transferrine, l'éthanolamine ou le sélénium.

Ces quatre éléments, commercialisés sous le nom de ITES, sont actuellement toujours utilisés dans la majorité des milieux sans sérum où ils sont généralement accompagnés d'autres additifs :

- Insuline : généralement utilisée à des concentrations variant de 5 à 10 mg/L. C'est un polypeptide qui stimule la croissance *in vitro* et la prolifération de la plupart des cellules somatiques. Elle agit en synergie avec d'autres hormones et facteurs de croissance (PDGF, EGF, FGF). Elle favorise l'assimilation du glucose et des acides aminés, augmente la perméabilité cellulaire aux acides gras, acides aminés et monosaccharides et stimule la synthèse des acides nucléiques et des acides gras. Elle peut-être remplacée par l'IGF (*Insuline-like Growth Factor*) ;

- Transferrine : utilisée à des concentrations variant de 1 à 100 mg/L. Sa fonction principale réside dans le transport du fer mais elle permet également de détoxifier d'autres métaux. Elle peut être remplacée par des transporteurs de fer inorganiques tels que, par exemple, du citrate ferreux, des chélateurs d'ions ferreux...

- Ethanolamine : c'est un précurseur des phospholipides de la membrane cellulaire. Son rôle est particulièrement important pour la culture de cellules épithéliales ;

- Sélénium : c'est un oligoélément intervenant dans le fonctionnement de plusieurs enzymes cellulaires, dont la glutathion peroxydase qui permet la dégradation des peroxydes

toxiques métabolisés par la cellule. Il est essentiel à la croissance cellulaire et particulièrement pour les cellules humaines ;

- Albumine : utilisée à une concentration maximale de 5 g/L. Elle permet le transport de substances lipophiles telles que les acides gras, les éléments traces, les hormones et les vitamines liposolubles, mais aussi, la détoxification du milieu grâce au transport d' H_2O_2 et à la fixation de toxines. De plus, lors de cultures en bioréacteur, l'albumine protège les cellules des effets mécaniques de l'agitation. Dans ce cadre là, elle peut-être remplacée par le PEG-2000, le Pluronic F68 ou le Tween 85. Enfin, elle permet de tamponner le milieu ;

- Facteurs de croissance tels que l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) ou le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) : uniquement nécessaires pour certains types cellulaires. Toutefois, il est important de noter qu'un milieu sans sérum et contenant ces facteurs devient très onéreux et ne sera alors utilisable que pour la recherche, rarement pour la production ;

- Inhibiteurs de trypsine dans le cas des cultures de cellules adhérentes : α -1 anti-trypsine, inhibiteur de la trypsine de soja, aprotinine... ;

- Antioxydants : β -mercaptoéthanol, Na_2SeO_3 , glutathion, pyruvate, vitamines E et C... Ils sont très importants lors de cultures réalisées en milieu sans sérum car ils permettent d'inactiver les peroxydes générés au cours de la croissance ;

- Substances lipidiques : elles sont essentielles pour les cellules car elles constituent les précurseurs de la synthèse des prostaglandines et sont incorporées après d'éventuelles modifications dans les membranes cellulaires. L'éthanolamine fait partie de ces substances ;

- Hormones : plus ou moins nécessaires selon les cellules.

- Substances complexes : peptones, primatone RL, hydrolysats végétaux... Elles apportent des acides aminés, des acides gras, des sels, des oligopeptides, des facteurs de croissance... Ce sont souvent des suppléments essentiels à l'obtention d'une croissance cellulaire et d'une production protéique maximales.

Le tableau I.6 présente différents substituts de sérum, d'origine animale ou non, couramment utilisés pour la formulation des milieux de culture sans sérum.

Constituant du milieu	Source animale	Substitut non-animal
Albumine	Sérum	Hydrolysats végétaux
Insuline	Pancréas bovin ou porcin	Fermentation microbienne
Transferrine	Fraction de plasma bovin / porcin / humain	Chélateurs et transporteurs d'ions inorganiques
Cholestérol, acides gras et lipides	Cholestérol humain/ovin, foie porcin	Stérols végétaux Acides gras végétaux, synthétiques
Éléments traces		Extraction chimique
Acides aminés	Gélatine d'os, plumes, collagène bovin, cheveux humains	Acides aminés végétaux ou synthétiques
Hydrolysats protéiques	Lactalbumine, peptones, caséine	Hydrolysats végétaux
Facteurs de croissance	Digestats d'organes bovins	Facteurs recombinants
Protecteur contre les forces de cisaillement, surfactant	Suif bovin	Synthèse chimique Polysorbate végétal
Enzyme de dissociation (trypsine)	Pancréas porcin	Enzymes végétales Enzymes microbiennes

Tableau I.6 : Composés les plus fréquemment utilisés dans les milieux de cultures de cellules animales sans sérum et substituts non-animaux proposés (d'après Jayme, 1999).

II.2.2. Procédures d'adaptation aux milieux sans sérum animal

Le passage d'un milieu avec sérum à un milieu sans sérum constituant un changement profond d'environnement pour les cellules, et donc un stress pouvant leur être fatal, différents types de procédures permettant d'adapter les lignées cellulaires à des milieux sans sérum ont été établis (Higuchi, 1976 ; Barnes et Sato, 1980 ; Freshney, 1994 ; Mather et Roberts, 1998 ; Sinacore *et al.*, 2000). Elles ont toutes pour but de permettre la croissance des cellules dans leur nouveau milieu de culture.

Nous nous proposons de présenter ici, les quatre procédures les plus couramment utilisées. Il s'agit d'une méthode qualifiée d'adaptation brutale (passage brusque des cellules d'un milieu contenant du sérum à un milieu en étant totalement dépourvu) et de trois adaptations progressives (diminution graduelle de la concentration en sérum du milieu de culture). Pour toutes ces méthodes, le passage des cellules dans un milieu contenant une concentration inférieure en sérum ne sera réalisé qu'après avoir retrouvé une croissance cellulaire stable. La méthode choisie doit être basée sur les connaissances et l'expérience acquises sur la lignée cellulaire à adapter. Cependant, toute procédure d'adaptation à un milieu sans sérum reste toujours relativement empirique : en effet, il est encore aujourd'hui impossible de prévoir la "réaction" des cellules au cours de l'adaptation.

a. Méthode par immersion ou adaptation brutale

Les cellules cultivées dans un milieu à 10% de sérum sont centrifugées et le culot resuspendu directement dans du milieu sans sérum de telle sorte que la concentration cellulaire soit comprise entre 4 et 7.10^5 cellules/mL. Lorsque le milieu devient trop acide, une partie du milieu contenant les cellules est enlevée et un volume approprié de milieu frais sans sérum est ajouté, de façon à maintenir les cellules à une concentration supérieure à 2.10^5 cellules/mL. L'adaptation est considérée comme achevée lorsque 50% du volume du milieu peut être remplacé quotidiennement. Comme cela est indiqué dans la figure I.6, l'utilisation de cette méthode nécessite un minimum de deux étapes afin d'adapter les cellules à un milieu sans sérum (Freshney, 1994).

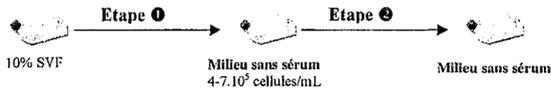


Figure I.6 : Représentation schématique d'une procédure d'adaptation brutale des cellules à un milieu sans sérum

b. Méthode par diminution de "moitié" de la concentration en sérum

Cette procédure, schématisée dans la figure I.7, consiste à transférer les cellules d'un milieu supplémenté avec 10% de sérum à un milieu en contenant 5% puis 1%. Une fois les cellules adaptées dans le milieu à 1% de sérum, la concentration de ce dernier est divisée par deux à chaque passage supplémentaire jusqu'à atteindre une concentration de 0,06%. A partir de cette concentration, les cellules peuvent être directement mises en culture dans un milieu dépourvu en sérum. L'utilisation de cette méthode nécessite un minimum de sept étapes afin d'adapter les cellules à un milieu sans sérum (Freshney, 1994).

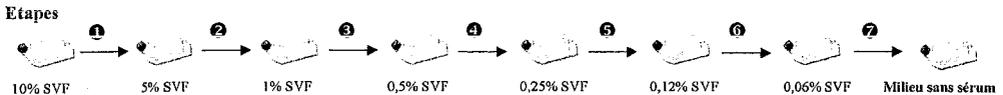


Figure I.7 : Représentation schématique d'une procédure d'adaptation progressive à un milieu sans sérum, par diminution de "moitié". Une centrifugation des cellules et la reprise du culot dans du milieu "frais" sont effectuées à chaque étape.

c. Méthode par "sous cultures"

Cette méthode s'applique lorsque l'on est en présence d'une culture en milieu supplémenté par 10% de sérum dans laquelle les cellules atteignent environ une concentration de 10^6 /mL. La moitié du milieu usagé à 10% de sérum contenant des cellules est alors remplacé par du milieu frais dépourvu de sérum et cela ainsi de suite jusqu'à atteindre une concentration finale de sérum nulle (Freshney, 1994). L'utilisation de cette méthode nécessite un minimum de onze étapes afin d'adapter les cellules à un milieu sans sérum (figure I.8).

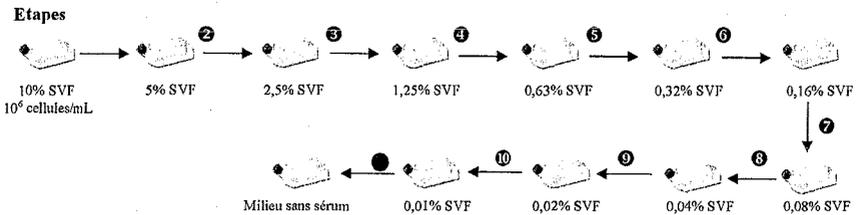


Figure I.8 : Représentation schématique d'une procédure d'adaptation progressive à un milieu sans sérum, par "sous cultures". Les cellules ne sont jamais centrifugées ; à chaque étape, uniquement, la moitié du milieu de culture est remplacée par du milieu frais sans sérum

d. Méthode par densité constante

Il s'agit dans ce cas de posséder une culture de cellules en phase exponentielle de croissance. Un volume de cette culture en milieu avec sérum est prélevé et complété par du milieu sans sérum de telle sorte que la concentration de cellules soit alors de $5 \cdot 10^3$ /mL. Les jours suivants, une densité cellulaire de $5 \cdot 10^5$ cellules/mL est maintenue grâce à des prélèvements de milieu contenant les cellules et à l'ajout de milieu sans sérum, frais. Lorsque le milieu ne contient plus de résidu de sérum et que les cellules ont retrouvé une vitesse de croissance correcte, elles sont considérées comme adaptées au milieu sans sérum. Il est à noter qu'au cours de cette procédure d'adaptation particulière, de nombreuses cellules peuvent mourir. Dans ce cas, et afin de maintenir la viabilité désirée, il est possible de travailler avec un flacon de culture statique plus petit (Freshney, 1994). L'utilisation de cette méthode nécessite un nombre minimum d'étapes indéfini afin d'adapter les cellules à un milieu sans sérum.

II.2.3. Impact du retrait du sérum sur la cryoconservation

Afin d'éviter, à la fois, toute évolution et modification des caractéristiques propres à chaque lignée cellulaire, et des risques de contamination importants, il est indispensable de pouvoir conserver les cellules. Pour cela, des banques cellulaires de travail sont réalisées dans de l'azote liquide, à -196°C . Pour permettre une cryoconservation optimale, du sérum (10 à 50%) et du DMSO (10%), sont généralement utilisés. En effet, ces deux composés possèdent des fonctions cryoprotectrices, protégeant notamment les cellules contre la formation de gros cristaux de glace. Cependant, et cela toujours dans le but de minimiser au maximum les risques de contamination des cultures par des agents infectieux, il est également important de substituer le sérum dans la composition des milieux de conservation. Dans ce but, plusieurs équipes ont formulé des milieux de cryoconservation en utilisant des molécules telles que la méthylcellulose ou le polyvinyle pyrrolidone, connues pour augmenter la viscosité du milieu et donc protéger les cellules (Bryant, 1969 ; Mizrahi *et al.*, 1970). Cependant, les résultats obtenus furent variables. En effet, si Ohno *et al.* (1988) et Kapsi *et al.* (1992) ont montré que ces composés avaient un rôle cryoprotecteur, Merten *et al.* (1995), n'ont observé aucun effet cryoconservateur suite à cette supplémentation.

II.3. Les hydrolysats protéiques

Bien que de nombreux efforts aient été effectués pour le développement de milieux sans sérum chimiquement définis, il en résulte souvent une diminution de la croissance cellulaire et de la production (Jenkins *et al.*, 1996 ; Le Floch *et al.*, 2004) et une augmentation du coût (Castro *et al.*, 1992 ; Stoll *et al.*, 1996 ; Lee *et al.*, 1999). Ainsi, afin d'améliorer ces paramètres, des hydrolysats protéiques à faibles coûts contenant des mélanges non définis de composés de bas poids moléculaire, incluant acides aminés, peptides, vitamines et éléments traces, sont utilisés depuis une dizaine d'années comme additifs aux milieux sans sérum (Dyring *et al.*, 1994 ; Jan *et al.*, 1994 ; Zhang *et al.*, 1994 ; Keen et Rapson, 1995 ; Donaldson et Shuler, 1998 ; Nyberg *et al.*, 1999 ; Heidemann *et al.*, 2000).

II.3.1. Principaux hydrolysats protéiques

L'addition d'hydrolysats protéiques à des milieux de culture a très tôt été appréhendée comme un compromis satisfaisant à l'utilisation de sérum (Keay, 1976 ; Mizrahi, 1977). Divers types

d'hydrolysats ont été utilisés tels que les hydrolysats de tissus animaux (bouillon de tryptose phosphate, protéose-peptone, primatone RL), de protéines de lait (lactalbumine, caséine), de biomasse bactérienne et de levures (bacto-peptone, extrait de levure) ou de végétaux. Ce sont tous des mélanges de peptides obtenus par hydrolyse partielle des protéines. Ils sont considérés comme des sources riches et peu onéreuses d'acides aminés nécessaires pour la synthèse en masse de cellules et pour la synthèse de protéines sécrétées (Franek, 2004).

a. Protéines d'origine animale

De nombreux hydrolysats de viande ont été étudiés. Le primatone RL, un hydrolysats enzymatique de viande, constitue un supplément peu onéreux pour les milieux de culture sans sérum mais également avec sérum et pour les cellules de mammifères (Schlaeger *et al.*, 1996) et d'insectes (Ikonou *et al.*, 2001). En servant de source d'acides aminés, d'oligopeptides, de sels de fer, de lipides et d'autres éléments traces de faible poids moléculaire, il permet d'augmenter la densité cellulaire maximale de plusieurs lignées cellulaires (hybridomes, myélomes, HL-60) ainsi que leur vitesse spécifique de croissance et leur viabilité. Il induit également une prolongation de la phase stationnaire de croissance, retarde la mort cellulaire par apoptose, augmente la concentration de protéines recombinantes produites. De plus, d'après Bonarius *et al.* (1996), son utilisation permet de rendre le métabolisme énergétique plus efficace puisque 50% de lactate en moins est produit et deux fois plus de substrat est utilisé via le cycle de Krebs par rapport à un mélange d'acides aminés libres de composition et de concentration équivalentes à ceux de Primatone. Enfin, Pham *et al.*, ont montré, en 2003, que certains hydrolysats de viande pouvaient également permettre d'augmenter l'efficacité de transfection et de faciliter fortement la purification des protéines produites. Face à tous ces avantages, persiste quand même un inconvénient, relevé par Gu *et al.*, qui a constaté, en 1997, que la sialylation terminale de chaque site de glycosylation de l'interféron sécrété par des cellules CHO est diminuée lors de l'utilisation du primatone. Cet effet est habituellement observé en présence de sérum et notamment pour l'interféron- γ par Lamotte (1997) et pour l'érythropoïétine par Le Floch *et al.* (2004),

Une alternative à l'emploi de sérum est l'utilisation de lysats de plaquettes bovines en tant que promoteurs de croissance de cellules en suspension et de cellules adhérentes (Johansson *et al.*, 2003). En effet, les plaquettes sont la source primaire de nombreux facteurs de croissance et, de plus, elles ont un coût relativement faible (25 à 50% moins élevé que le coût de production

du sérum de veau foetal), peuvent être produites en grande quantité et ne présentent pas les problèmes d'éthiques rencontrés lors de la préparation du sérum de veau foetal. Ainsi, Johansson *et al.* (2003) ont montré qu'un lysat de plaquettes bovines supportait la croissance cellulaire et la viabilité de nombreuses cellules (myélomes, hybridomes, hépatocytes, fibroblastes et cellules épithéliales) ainsi que leur production de protéines de façon comparable voire supérieure au sérum. Cependant, un inconvénient à l'utilisation de ces lysats de plaquettes persiste, les plaquettes, tout comme le sérum, étant un produit biologique, une variation de lot-à-lot ne peut être exclue.

La supplémentation des milieux peut également être réalisée grâce à l'utilisation d'hydrolysats de protéines de lait (Amiot *et al.*, 2004). Il est vrai que le lait contient des facteurs de croissance naturels de masse molaire compris entre 3 et 20 kDa, qui produisent des signaux intracellulaires modifiant l'assimilation des éléments nutritifs, la synthèse d'ADN et la division cellulaire. De plus, il est constitué de protéines renfermant des séquences d'acides aminés qui possèdent des activités biologiques diverses. Après hydrolyse des protéines totales du lait, l'équipe d'Amiot *et al.* (2004) a prouvé que les peptides ayant une activité promotrice de croissance étaient des peptides hydrophobes et de taille moyenne (4-10 acides aminés).

Un autre hydrolysat de protéines de lait couramment utilisé, notamment en culture de cellules d'insectes, est l'hydrolysat de lactalbumine, une protéine majeure du lait. En effet, en 1979, Chou *et al.*, avaient isolé de cet hydrolysat un facteur "mitotique" et avaient ainsi montré que l'hydrolysat de lactalbumine pouvait être utilisé en tant que suppléments de milieux de culture de plusieurs cellules animales.

Enfin, une autre option proposée pour substituer le sérum consiste à utiliser des hydrolysats de séricine, c'est-à-dire des hydrolysats de protéines de cocons de vers à soie. En effet, une fois hydrolysées, ces protéines génèrent des peptides de 6 à 67 kDa qui permettent d'accélérer la croissance d'hybridomes, de cellules HeLa, HEK, 293 et HepG2 (Terada *et al.*, 2002) et de supporter la viabilité cellulaire et la croissance de cellules d'insectes dans des conditions de culture sans sérum (Takahashi *et al.*, 2003). De plus, la séricine étant une protéine albuminoïde, ces hydrolysats peuvent être utilisés à la place de l'albumine sérique bovine ou en combinaison avec cette dernière pour donner des résultats encore plus satisfaisants. Un dernier avantage de ce substitut de sérum, loué par Takahashi *et al.* (2003), est qu'il peut être autoclavé sans perte de son activité, ce qui facilite son utilisation.

b. Protéines d'origine microbienne

L'emploi d'hydrolysats de levure, constituant courant des milieux de fermentation bactérienne, en tant qu'additifs de milieux de culture pour cellules animales, semble également représenter un substitut intéressant de sérum. En effet, Sung *et al.* (2004) ont montré que ce type d'hydrolysats constituait un supplément à faible prix de revient, permettant d'augmenter considérablement la production de protéines recombinantes dans les milieux sans sérum pour cellules animales. De plus, non seulement le temps de culture et la production de protéine sont fortement augmentés mais surtout, on notera que l'ajout de cet hydrolysats ne semble influencer, dans ce cas, ni la glycosylation de la thrombopoïétine humaine produite, ni son activité biologique.

c. Hydrolysats végétaux

Depuis une dizaine d'années, la mise au point de milieux sans aucune matière première d'origine animale se développe afin de garantir la sécurité biologique notamment des produits pharmaceutiques. En effet, les inquiétudes quant aux risques de contamination des milieux de culture par des agents pathogènes d'origine animale, et en particulier bovine, ne concernent pas uniquement le sérum de veau fœtal, mais tous les composants des milieux provenant de sources animales. De ce fait, les hydrolysats végétaux prennent une place de plus en plus importante dans la formulation des milieux de culture sans sérum et surtout sans protéine, comme le montre de nombreux brevets et publications récents (Keen et Rapson, 1995; Amatsuji *et al.*, 1998 ; Blom *et al.*, 1998 ; Donaldson et Shuler, 1998 ; Price *et al.*, 1999; Franek *et al.*, 2000 ; Heidemann *et al.*, 2000 ; Reiter *et al.*, 2001). De nombreux hydrolysats de protéines végétales sont actuellement commercialisés principalement par les sociétés Quest International, Organotechnie ou encore DMV (De Melkindustrie Veghel). Ces hydrolysats sont issus d'espèces végétales variées telles que le soja, le blé, le riz, le pois, la pomme de terre ou encore le coton.

Les premiers résultats encourageants concernant l'utilisation d'hydrolysats végétaux dans des milieux sans sérum furent obtenus en 1995, par Keen et Rapson, qui réussirent à cultiver des cellules CHO dans un réacteur de 8000 litres en utilisant un milieu Iscove's supplémenté en acides aminés, minéraux, insuline bovine et en hydrolysats protéiques de soja. En 1999, Price *et al.*, rapportèrent que des peptones végétales étaient capables de supporter la croissance de

cellules d'insectes et en 2000, Heidemann *et al.*, montrèrent que des hydrolysats végétaux commercialisés par QUEST permettraient d'augmenter la concentration cellulaire maximale de cellules BHK ainsi que leur production de protéines recombinantes et, cela sans modifier la qualité du produit, ni sa glycosylation. Par la suite, Burteau *et al.* (2003) suggérèrent que les peptides végétaux présentaient des propriétés anti-apoptotiques pour les cellules CHO.

Parallèlement à ces travaux, Franek *et al.* (2000), proposèrent une approche plus précise. En effet, dans le but de mieux cibler les molécules responsables des effets promoteurs de croissance et de production, ils décidèrent d'affiner leurs hydrolysats en les fractionnant par chromatographie liquide basse pression d'exclusion de taille. Ainsi, ils obtinrent des fractions peptidiques de composition moins hétérogène que les hydrolysats de soja et de blé initiaux et observèrent que ces différentes fractions n'avaient pas toutes la même capacité promotrice de croissance et de production pour des cellules d'hybridomes cultivées en flacons de culture statique.

En 2004, Mols *et al.*, mirent en évidence un avantage supplémentaire quant à l'utilisation des peptides végétaux en culture cellulaire. En effet, ils montrèrent que les peptones de riz inhibaient certaines activités protéasiques et empêchaient ainsi la protéolyse des protéines recombinantes sécrétées dans le milieu de culture. Ces résultats contredirent ainsi les hypothèses précédemment avancées par Heidemann *et al.*, en 2000. Cependant, il reste indispensable de prendre d'importantes précautions lors du procédé de production de ces hydrolysats afin d'éviter un autre risque de protéolyse dans le milieu de culture, dû à la potentielle présence de résidus d'enzymes utilisées lors de l'hydrolyse initiale des végétaux (Mols *et al.*, 2005).

Suite aux travaux novateurs de fractionnement réalisés par Franek *et al.* (2000) et aux résultats préliminaires forts intéressants qu'ils avaient obtenus, nous avons décidé, au sein de notre laboratoire, d'effectuer le fractionnement d'hydrolysats de protéines de tourteaux de colza, matière végétale ayant une composition en acides aminés aisément assimilable d'un point de vue nutritionnel mais restant encore peu valorisée, et d'étudier l'impact des différentes fractions ainsi obtenues sur la croissance et la production de cellules CHO. Cependant, une autre technique de fractionnement a été choisie : la filtration membranaire. En effet, les techniques membranaires permettent de travailler plus aisément avec des gros volumes d'échantillons (de l'ordre du litre) et donc de séparer plus rapidement de grosses quantités d'échantillons. De plus, elles opèrent dans des conditions douces, non dénaturantes et sans changement de phase d'où une économie au niveau énergétique. Enfin, elles offrent

une grande modularité du fait d'un possible fonctionnement en continu, d'une flexibilité du matériel et de la simplicité de la maintenance et ont un coût relativement faible.

Le tableau I.7 présente les principaux hydrolysats végétaux utilisés et ayant permis de favoriser la croissance et/ou la production de différentes lignées cellulaires.

Auteurs	Source végétale / concentration	Cellules / protéine, anticorps produits	Croissance	Production	Système / volume / mode de culture
Keen et Rapson, 1995	Soja / 2,5 g/L	CHO / anticorps humanisé	nd	nd	Réacteur / 8000 L / Discontinu
Price <i>et al.</i> , 1999	Aloe Vera / 500 mg/L	Hybridomes / IgG	++	+++	Flacons de culture statique / 15 mL / Discontinu
Heidemann <i>et al.</i> , 2000	Soja (QUEST) / 5 g/L	BHK	nd	+	Réacteur / 15 L / Perfusé
Franek <i>et al.</i> , 2000	Soja, fraction / 2 g/L	Hybridomes / Ig	+	+++	Flacons de culture statique / 6 mL / Discontinu
	Blé, fraction / 2 g/L	Hybridomes / Ig	++	+++	
Deparis <i>et al.</i> , 2003	Colza / 8 g/L	SF 9	++	nd	Erlenmeyers / 50 mL / Discontinu
Burteau <i>et al.</i> , 2003	Blé (QUEST) / 2 g/L	CHO / IFN- γ	+	++	Erlenmeyers / 25 mL / Discontinu
Ballez <i>et al.</i> , 2004	Blé (QUEST) / 2 g/L	CHO / IFN- γ	+	++	Réacteur / 1,5 L / Discontinu
	Riz (QUEST) / 1 g/L	CHO / IFN- γ	=	+	Erlenmeyers + microporteurs poreux / 25 mL / Discontinu

Tableau I.7 : Principaux hydrolysats végétaux permettant de favoriser la croissance et/ou la production de différentes lignées cellulaires (le nombre de + correspond à l'augmentation de la croissance ou de la production par rapport à celles observées en milieu témoin, non supplémenté ; nd : non déterminé).

d. Peptides synthétiques

Face à la difficulté que représentent l'isolement et l'identification de peptides individuels à partir d'hydrolysats complexes, Franek et Katinger choisirent, en 2002, une nouvelle approche. Ainsi, ils examinèrent la possibilité d'obtenir des activités promotrices de croissance et de production avec différents peptides synthétiques, allant des di- aux pentapeptides. Ils montrèrent alors que les effets promoteurs de croissance et de production augmentent avec la longueur de la chaîne et pour des concentrations supérieures à 1 mM ; ces deux activités, de croissance et de production, étant indépendantes. Enfin, ils découvrirent que les peptides permettent d'augmenter la viabilité des cellules pendant la phase de déclin cellulaire, indiquant sans doute des propriétés anti-apoptotiques spécifiques à ces suppléments

peptidiques. Par la suite, Franek *et al.* (2003) et Franek (2004) confirmèrent ces premiers résultats et montrèrent de plus que les peptides contenant un acide aminé basique tel que la lysine ou l'histidine supprimaient la croissance cellulaire mais augmentaient la production protéique.

II.3.2. Mode d'action des hydrolysats peptidiques

Bien que l'utilisation d'hydrolysats protéiques en tant que constituants des milieux sans sérum soit maintenant relativement courante, leur mode d'action reste toujours assez obscur. Ainsi, deux hypothèses majeures ont été formulées dans le but d'expliquer l'effet promoteur de croissance et de production des peptones sur la culture de cellules animales : un effet nutritionnel (Jan *et al.*, 1994 ; Schlaeger, 1996 ; Heidemann *et al.*, 2000) ou un effet biologique, spécifique des peptides (Rasmussen *et al.*, 1998 ; Franek et Katinger, 2002 ; Burteau *et al.*, 2003 ; Deparis *et al.*, 2003 ; Franek *et al.*, 2003 ; Ballez *et al.*, 2004). La première hypothèse admet que les peptones agissent uniquement en tant que suppléments nutritionnels et donc en tant que "remplaçants" des acides aminés dans les formulations de milieux de culture. La seconde hypothèse avance le fait que certains peptides interagissent avec des récepteurs de la surface cellulaire et activent ainsi des voies de transduction de signaux menant alors à une réponse biologique spécifique conduisant à la stimulation de la croissance.

Les adeptes de l'effet nutritionnel ont suggéré, en se basant sur une augmentation de la consommation des acides aminés libres, que les mélanges peptidiques apportaient aux cellules plusieurs nutriments de faible poids moléculaire. L'apport nutritionnel des hydrolysats serait alors constitué non seulement par les acides aminés libres de ce dernier mais aussi et surtout par des petits peptides (di- et tripeptides). Il est vrai que dès 1955, Eagle fut l'un des premiers à montrer l'utilisation possible de dipeptides par les cellules animales par clivage des peptidases. Puis, en 1987, Grimble *et al.*, montrèrent que les cellules intestinales utilisaient plus facilement les di- ou tripeptides que les peptides plus longs. En 1991, Minamoto *et al.* confirmèrent que différentes lignées cellulaires (UMCL et BALL) étaient capables de métaboliser des dipeptides tels que glycine-glutamine et alanine-glutamine. De même, Dardenne (1995) a montré que le dipeptide particulier, Ala-Gln, substitut de la glutamine, était hydrolysé par une peptidase intracellulaire des hybridomes. Depuis, il a également été prouvé en nutrition humaine que les hydrolysats protéiques constituaient un moyen efficace

pour accroître la valeur nutritionnelle des protéines, celle-ci étant influencée par la longueur des chaînes peptidiques des substituts azotés qui composent les hydrolysats (Vioque *et al.*, 2000). Ainsi, leur efficacité nutritionnelle est d'autant plus importante que leur teneur en di- et tripeptides est élevée (Hara *et al.*, 1984). De même, Szajewska *et al.* (2001) ont montré que les préparations contenant des proportions élevées de petits peptides, issus de protéines partiellement hydrolysées, ont une valeur nutritionnelle supérieure à celles d'un mélange équivalent d'acides aminés libres ou de la protéine native.

Toutefois, Jan *et al.*, en 1994, en utilisant un mélange d'acides aminés libres pour compléter leur culture, avancèrent que les hydrolysats n'agissaient pas seulement en tant que source d'acides aminés. Bonarius *et al.* (1996), grâce à des analyses de flux métabolique, confirmèrent ces premiers travaux en montrant que la supplémentation d'un milieu de culture était plus efficace avec du Primatone RL qu'avec un mélange équivalent en acides aminés libres pour promouvoir la croissance cellulaire. Ainsi, les auteurs prétendirent que le transport peptidique dans la cellule était plus efficace que celui des acides aminés. Au cours de la même période, Schlaeger (1996) souligna les potentielles propriétés anti-apoptotiques de cet hydrolysate de viande. Par la suite, Rasmussen *et al.* (1998), conclurent également grâce à leurs études sur des cellules CHO que les peptides contenus dans des hydrolysats de plantes pouvaient agir en tant que facteurs de croissance. A leur tour, Nyberg *et al.*, en 1999, montrèrent que la croissance cellulaire d'hybridomes était plus importante lorsque le milieu était enrichi en peptones de viande plutôt qu'en acides aminés libres.

Franek *et al.* (2000), grâce au fractionnement d'hydrolysats par chromatographie d'exclusion de taille, découvrirent que non seulement certaines fractions étaient à elles seules plus actives que l'hydrolysate total mais aussi que certaines fractions étaient plus efficaces que d'autres en tant que promotrices de croissance et de production. Ces résultats prouvèrent alors que les effets promoteurs de croissance et de production ne pouvaient être uniquement la conséquence d'un apport nutritionnel. De plus, il en découla le fait que, seulement certains peptides, étaient susceptibles et capables d'agir en tant que facteurs de croissance et/ou de survie.

Parallèlement à ces études, Deparis *et al.* (2003), suite à des résultats obtenus sur la croissance de cellules d'insectes Sf9, dans un milieu de culture supplémenté avec un hydrolysate de colza, soutinrent l'hypothèse que les peptones végétales contiennent des peptides particuliers, mimant les facteurs de croissance et ayant des activités favorisant la survie cellulaire sur les cultures de cellules d'insectes. Dans le même temps, Burteau *et al.* (2003) confirmaient la

même hypothèse grâce à des cultures de cellules CHO supplémentées par des hydrolysats végétaux QUEST. En effet, ils ont montré que la supplémentation en peptides végétaux augmente les performances de culture au niveau de la concentration cellulaire maximale et de la production en protéines recombinantes mais seulement dans le cas de peptones composées de grands oligopeptides qui peuvent jouer le rôle de simili de facteurs de croissance ou posséder de probables activités anti-apoptotiques. Enfin, Ballez *et al.* (2004) avancèrent à leur tour que certains peptides pouvaient interagir avec des récepteurs cellulaires de surface spécifiques impliqués dans la croissance, les signaux anti-apoptotiques ou la biosynthèse de protéines et que leur fréquence et leur concentration pourrait varier d'un type d'hydrolysats à un autre.

Conjointement à ces travaux, pour étudier plus spécifiquement leur mode d'action, Franek et Katinger, (2002), au lieu de procéder à un isolement et une identification individuelle laborieuse de peptides à partir d'hydrolysats complexes, étudièrent l'effet de peptides synthétiques et en conclurent que plusieurs facteurs influençaient l'action de ces fractions et notamment la taille et la composition en acides aminés.

En 2003, Deparis *et al.* illustrèrent également le fait que le degré de digestion des protéines et donc la taille des peptides obtenus jouaient un rôle crucial dans les propriétés promotrices de croissance de ces hydrolysats. Toujours la même année, Burteau *et al.*, montrèrent que la majorité des effets bénéfiques des peptones était corrélée avec un contenu en "grands" oligopeptides, correspondant sans doute à des peptides ayant des séquences capables de mimer des protéines animales particulières. De plus, ils notèrent que le contenu en acides aminés de leur milieu de culture diminuait pendant la phase exponentielle et stationnaire de leur culture et réaugmentait à la fin d'un batch et cela seulement pour les cultures supplémentées en peptones. Ils suggèrent donc que ces dernières seraient partiellement absorbées et clivées en acides aminés libres au niveau de la membrane plasmique ou dans la cellule par différentes protéases. Durant la phase de décès des cellules, les acides aminés non utilisés seraient relargués et s'accumuleraient alors dans le milieu de culture, augmentant ainsi le taux d'acides aminés libres. Ces résultats et hypothèses furent corroborés, en 2004, par Ballez *et al.* Finalement, Sung *et al.* (2004) démontrèrent que le transport peptidique dans la cellule était, en effet, plus efficace énergétiquement que celui des acides aminés.

L'utilisation d'hydrolysats protéiques et plus particulièrement de peptones végétales pourrait donc constituer une approche attractive à la fois pour fortifier d'un point de vue nutritionnel les milieux sans sérum et surtout sans protéine et pour jouer le rôle de promoteurs de

croissance et de retardateurs du décès cellulaire. Ainsi, les acides aminés libres et les di- et tripeptides apportés par les hydrolysats protéiques végétaux pourraient renforcer les milieux de culture d'un point de vue nutritionnel et les peptides de taille supérieure pourraient interagir avec des récepteurs cellulaires de surface, spécifiques, impliqués dans la croissance, l'inhibition ou le retard de l'apoptose ou encore la synthèse des protéines.

En conclusion, on retiendra tout de même que les peptones restent des mélanges non définis de plusieurs milliers de peptides. Aussi, il semblerait intéressant de les purifier afin d'isoler les peptides biologiquement actifs. Par ailleurs, sur la base d'une caractérisation chimique complète des peptides ainsi que de leur mode d'action moléculaire, des analogues synthétiques pourraient être préparés et utilisés en tant que suppléments nutritifs des milieux.

II.3.3. Transport et métabolisme des peptides chez les cellules animales cultivées *in vitro*

Les peptides sont constitués d'acides aminés qui peuvent représenter une valeur nutritive pour la cellule. Par ailleurs, les peptides possèdent des caractéristiques physicochimiques différentes de celles des acides aminés libres de part leur taille, leur configuration spatiale, leur charge électrique, leur hydrophobicité... Tous ces paramètres peuvent influencer leur transport, leur métabolisme ou leur action biologique. En particulier, leur intégration dans la cellule met en œuvre des transporteurs spécifiques dont les principales caractéristiques vont être précisées ci-dessous.

a. Propriétés des transporteurs de peptides

Un peptide étant constitué d'acides aminés, l'hypothèse première énoncée au sujet de leur absorption était l'utilisation des transporteurs des acides aminés libres. Cependant, des études réalisées avec des cellules intestinales de hamsters et de rats, et conduites par Matthews (1972), Silk *et al.* (1980) et Hara *et al.* (1984) montrèrent que les peptides étaient absorbés plus rapidement que les acides aminés. La possibilité d'un transport privilégié des peptides par rapport à celui des acides aminés fut alors suggéré : soit des systèmes de transport propres aux peptides existaient, soit les peptides avaient un avantage dans le phénomène de compétition au niveau des transporteurs. Par la suite, des études de compétitions entre acides aminés libres et dipeptides ont montré que le transport des peptides était en fait indépendant de celui des acides aminés (Webb, 1990). Enfin, grâce à l'utilisation de vésicules avec des bordures en

brosse, il a été mis en évidence que les di- et tripeptides étaient transportés via un gradient de proton (Okano *et al.*, 1986 ; Tomita *et al.*, 1990) comme cela est représenté sur la figure I.9. On notera également que des études utilisant des vésicules avec des bordures en brosse et des cellules Caco-2 (cellules de l'intestin humain) ont montré que de nombreuses drogues "peptides-like" étaient également transportées par ce type de transporteurs.

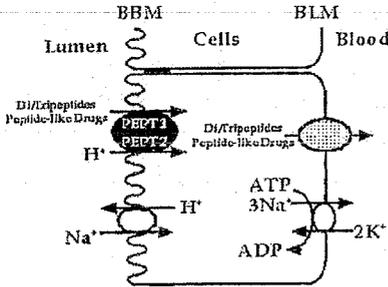


Figure I.9 : Mécanisme moléculaire d'absorption des peptides par des cellules épithéliales (Terada et Inui, 2004).

BBM, brush-border membranes
BLM, basolateral membranes
PEPT1, PEPT2, transporteurs peptidiques

b. Caractéristiques fonctionnelles des transporteurs peptidiques.

Deux transporteurs peptidiques ont été identifiés chez les mammifères (ovins, souris, rats, poulets, humains...) : PepT1 et PepT2 (Fei *et al.*, 1994 et 2000 ; Liu *et al.*, 1995 ; Saito *et al.*, 1996 ; Rubio-Aliaga *et al.*, 2000 ; Pan *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2002). Ils sont tous les deux situés dans la membrane plasmique des cellules, contiennent 12 domaines transmembranaires et ont leur terminaison NH₄ et COOH du côté du cytosol. Chez l'homme, PepT1 est constitué de 708 AA et PepT2 de 729. La figure I.10 présente la structure de ce transporteur. Une des caractéristiques importantes de ces transporteurs est leur capacité à transporter indépendamment de leur séquence et de leur charge, tous les di- et tripeptides mais pas les acides aminés libres, ni les tétrapeptides (Saito *et al.*, 1996 ; Pan *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2002). Ces transporteurs sont également capables de transporter des composés peptidomimétiques tels que des antibiotiques de type β -lactame et certains inhibiteurs de peptidase et de protéase.

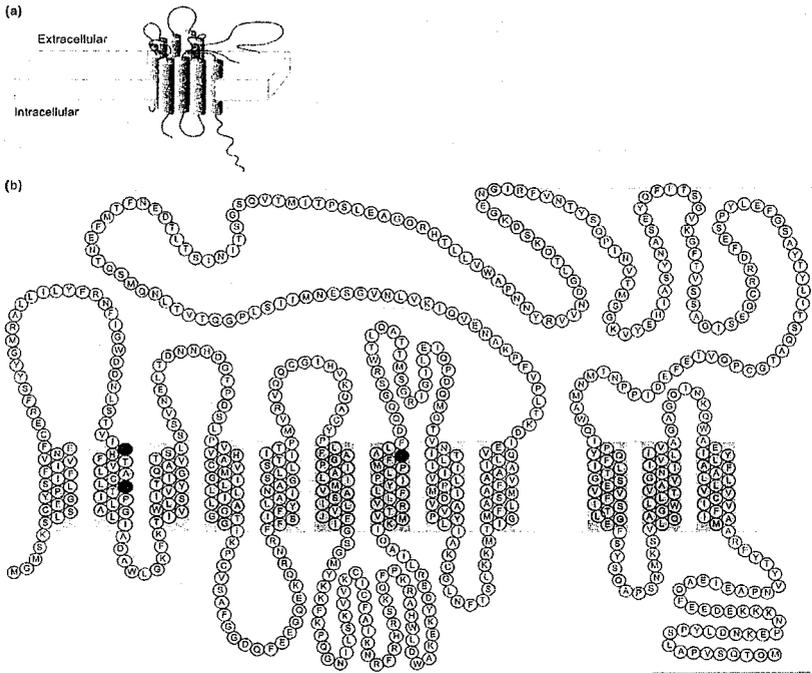


Figure I.10 : Structure du transporteur de peptide PepT1. (a) La protéine contient 12 domaines transmembranaires, avec les résidus N et C-terminaux dans le cytosol. (b) Structure détaillée (Rubio-Aliaga et Daniel, 2002).

Bien qu'ayant une fonction similaire, PepT1 et PepT2 montrent des différences majeures dans la spécificité et l'affinité pour leurs substrats ainsi que dans leur capacité de transport. PepT1 peut être considéré comme un transporteur avec une faible affinité mais avec une grande capacité de transport. L'affinité de PepT2 est plus élevée pour la plupart des substrats. Par contre, il a une capacité de transport plus faible (Daniel et Herget, 1997). Les substrats physiologiques de PepT1 et PepT2 sont des dipeptides et des tripeptides formés classiquement des 20 L- α -AA ce qui revient à 400 dipeptides différents et 800 tripeptides. Ainsi, les substrats de PepT1 et PepT2 représentent une importante variété de structures avec des caractéristiques physicochimiques différentes en terme de masse moléculaire, de charge et de polarité. Cependant, ces transporteurs ne peuvent permettre l'absorption de molécules de taille supérieure aux tripeptides. Aussi, dans le cas de peptides de grande taille, l'intervention

d'ecto-peptidases extracellulaires s'avère nécessaire afin d'hydrolyser les substrats. Celles-ci relarguent des di- et tripeptides à partir du N ou C-terminal des oligopeptides ou des protéines. Une fois que ces peptides ont été générés à l'extérieur de la cellule, les transporteurs peptidiques peuvent alors induire leur internalisation grâce au mécanisme moléculaire, pH dépendant, explicité ci-dessus. Les peptidases mises en jeu peuvent être localisées au niveau de la membrane cellulaire (Howell *et al.*, 1992) ou bien être libres dans le milieu de culture (Christie et Butler, 1994) (figure I.11).

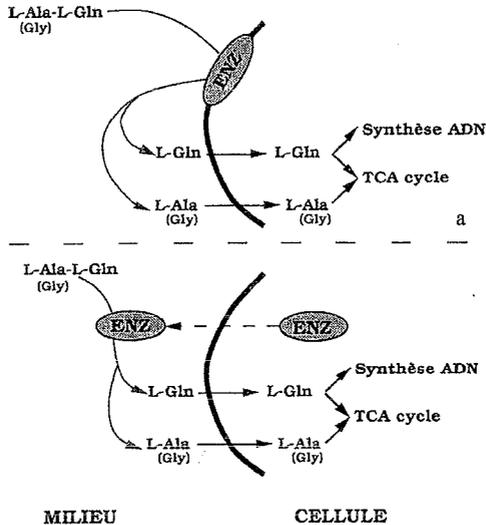


Figure I.11 : Mécanisme d'hydrolyse des peptides par des peptidases cellulaires. Exemples avec des dipeptides. (a) hydrolyse du peptide par une peptidase localisée au niveau de la membrane cellulaire; (b) libération d'une peptidase cellulaire dans le milieu de culture et hydrolyse extracellulaire du dipeptide.

Concernant plus particulièrement les mécanismes de transport des peptides chez les cellules CHO, peu d'informations sont actuellement disponibles. Cependant, il a été reporté en 1998, par Han *et al.*, que les cellules CHO K1 sauvages possédaient une activité de transport de la carnosine, semblable à celle des cellules Caco-2. Ces résultats suggèrent alors que les cellules CHO étaient capables d'exprimer un transporteur peptidique. En 2004, Mols montra que les cellules CHO présentaient une activité de transport de peptides, pH dépendante, indiquant ainsi, l'expression par ces cellules de PepT1, PepT2 ou d'une combinaison de ces deux transporteurs. Enfin, Mols *et al.* (2005), émettent l'hypothèse de l'existence d'une interrelation entre des activités peptidasiques et l'expression de ces transporteurs

c. Devenir des peptides transportés dans la cellule

Une fois à l'intérieur des cellules, les di- et tripeptides sont rapidement hydrolysés par des peptidases cytosoliques, comme le montre la figure I.12. Les acides aminés libres en résultant peuvent alors être utilisés en tant qu'éléments nutritifs via le cycle de Krebs, en tant que précurseurs d'autres acides aminés, acides nucléiques, ou encore être incorporés dans les protéines ou relargués dans la circulation via des transporteurs d'acides aminés (Heidemann *et al.*, 2000).

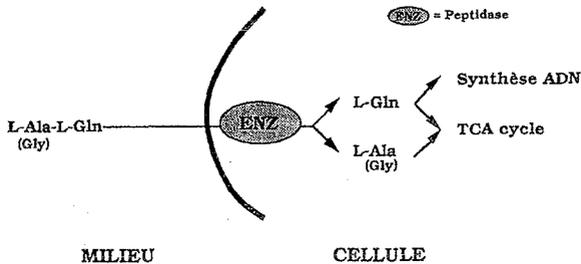


Figure I.12 : Mécanisme d'hydrolyse des peptides par des peptidases intracellulaires. Exemple avec des dipeptides.

II.4. Le colza et ses hydrolysats

Comme nous l'avons vu précédemment, les peptides d'origine végétale connaissent un intérêt grandissant en tant que suppléments de milieux de culture sans sérum. En effet, ils représentent une excellente alternative au sérum animal tout en limitant les risques de contamination des cultures par des éléments biologiques d'origine animale. Des études ont déjà eu lieu avec des milieux sans sérum, dépourvus de matériel d'origine animale, et supplémentés avec des hydrolysats généralement issus de différentes matières végétales telles que, par exemple, le riz (Price *et al.*, 1998, 1999), le blé, le soja (Reiter *et al.*, 2001 ; Shibuya *et al.*, 2000) ou encore le concombre (Heimindinger, 1999). Cependant, de tels hydrolysats sont relativement onéreux à obtenir puisqu'ils proviennent le plus souvent de matières premières à fort potentiel protéique pouvant être utilisées pour d'autres applications à plus forte valeur ajoutée. Or, contrairement aux matières premières utilisées à ce jour, la graine de colza est particulièrement riche en lipides et pauvre en protéines. Aussi, une fois l'huile extraite, le tourteau de colza en résultant reste aujourd'hui encore peu valorisé, son principal

intérêt résidant actuellement dans son emploi en alimentation animale. Or, cette utilisation est relativement décevante d'un point de vue économique. Aussi, une valorisation accrue semble possible grâce à une meilleure exploitation des protéines dans le domaine non-alimentaire. En effet, le tourteau de colza constitue une matière première peu onéreuse qui présente, en plus, l'avantage de posséder une composition en acides aminés équilibrée, c'est-à-dire ayant une forte efficacité nutritive (Godon, 1996) conférant au tourteau de colza un intérêt majeur pour une utilisation en culture de cellules animales (Deparis *et al.*, 2003).

II.4.1. Généralités

Le colza, plante à fleur jaune du genre *Brassica*, appartient à la famille des crucifères. La teneur en huile de ses graines (entre 40 et 50%), permet de le classer dans la catégorie des oléagineux, au même titre que le soja, le tournesol ou l'arachide. La production mondiale des graines oléagineuses a été estimée à 307 millions de tonnes en 2000/2001, contre 128 en 1973/1974, soit une multiplication par 2,4 en 27 ans. Si le soja occupe toujours la première place au niveau mondial en terme de graines produites (56% de la production), c'est le colza qui a enregistré la plus forte progression ; sa production a presque été multipliée par six depuis 1973, notamment grâce à une augmentation régulière des rendements et à une extension importante des surfaces cultivées dans l'Union Européenne et en Chine (1^{er} producteur mondial). En Europe, le colza représente, à lui seul, 75% de la production des graines oléagineuses (PROLEA, 2003). Parmi les pays européens, la France est, avec l'Allemagne, le plus important producteur de cette graine. C'est ainsi la quatrième espèce la plus cultivée sur notre territoire après le blé, le maïs et l'orge. Actuellement, le colza semé appartient à une variété dite double 0 c'est-à-dire sans acide érucique, acide gras cancérigène et responsable de maladies cardio-vasculaires, et sans glucosinolate, composés soufrés responsables de phénomènes d'inappétence et/ou de désordres physiologiques chez les monogastriques (Lee *et al.*, 1984). Il est de plus certifié comme non génétiquement modifié. Parmi les 3000 variétés existantes de colza, deux sont majoritairement utilisées : le colza de printemps (*Brassica napus*) cultivé habituellement au Canada sous le nom de "canola" (CANada Oil Low Acid) et le colza d'hiver (*Brassica campestris*) principalement cultivé en Europe. La composition de la graine de colza est variable selon l'espèce considérée. Cependant, les sélectionneurs ont aujourd'hui pour but d'élaborer des variétés de composition constante entre les espèces (tableau I.8).

	%
Lipides	40-45
Protéines	15-30
Glucides solubles	17
Fibres	4
Cendres	3,5

Tableau I.8 : Composition moyenne de la graine de colza non décortiquée exprimée en % de matière sèche (Tessier, 2004).

II.4.2. La transformation des graines de colza

Le premier produit attendu de la culture du colza est l'huile, qu'elle soit à usage alimentaire ou industriel. Par conséquent, le procédé de base de l'industrie du colza consiste à extraire l'huile des graines. Le "passage" de la graine à l'huile de consommation comprend trois étapes essentielles : la *trituration* qui consiste en une suite d'opérations visant à obtenir, d'une part l'huile brute de pression, et d'autre part, un tourteau gras, l'*extraction* de l'huile résiduelle du tourteau gras par un solvant apolaire, le *raffinage* de l'huile brute pour éliminer les impuretés et améliorer ainsi les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques de l'huile.

Le tourteau, ne contenant plus qu'environ 5% de lipides (g/g de matière sèche), est ensuite désolvaté pour être commercialisé très majoritairement pour l'alimentation animale.

a. Composition du tourteau de colza

Le tourteau de colza double zéro est une matière riche en protéines dont la valorisation est principalement cantonnée à l'alimentation animale. C'est une matière première peu onéreuse : en 2004, son prix sur le marché était de 160 € par tonne (CETIOM, 2004). De la même manière que la graine de colza, la composition du tourteau de colza peut varier selon l'espèce considérée, notamment au niveau des protéines dont la teneur est comprise entre 33 et 50%. Le tableau I.9 présente la composition chimique moyenne d'un tourteau de colza.

	Protéines	Fibres	Cendres	Sucres	Lipides	Polyphénols
Teneur (%)	40	38	9	6,5	4	2,5

Tableau I.9 : Composition chimique moyenne d'un tourteau de colza, exprimée en % de la matière sèche (d'après Viogue *et al.*, 2000).

- Les protéines de colza

La fraction protéique du tourteau de colza est majoritairement constituée de deux familles de protéines, les globulines et les albumines. Les globulines et les albumines se différencient par leur structure : taille, composition en acides aminés, nombre de chaînes polypeptidiques... Ces différences structurales confèrent des propriétés physico-chimiques particulières à chacune de ces protéines et expliquent leur différence de rôle physiologique dans la graine (Lemarié, 1996). De plus, le colza présente la particularité de posséder une composition en acides aminés "équilibrée". En effet, la répartition de ses différents acides aminés permet d'atteindre une efficacité nutritive c'est-à-dire d'assimilation par les animaux de près de 80%, alors que, par exemple, celle du pois, du maïs ou du blé n'atteindra que 20 à 50% (Jeejeebhoy, 2000). Le colza offre donc, une composition en acides aminés bien équilibrée dans l'ensemble, à la fois riche en lysine et satisfaisante en méthionine et en tryptophane et de plus, particulièrement riche en acide glutamique et en glutamine (Godon, 1996), présentant un intérêt particulier en culture de cellules animales.

- Les polyphénols

Les tissus végétaux contiennent tous un grand nombre de molécules à fonction phénol. Cependant, bien que la teneur en acide phénolique soit particulièrement importante dans le tourteau de colza (quatre fois supérieure à celle du soja), elle ne représente que 1 à 3% de sa matière sèche (Naczka *et al.*, 1998). Pourtant, en raison des importantes interactions entre ces composés phénoliques et les protéines, leur prise en compte est indispensable lors d'une démarche de valorisation des protéines du tourteau de colza. Il existe deux grandes classes de composés phénoliques dans le colza :

- les acides phénoliques qui sont présents sous formes estérifiée (80%), libre (15%) et insoluble (5%), l'acide sinapique étant le principal (figure I.13)
- les tannins qui sont des composés phénoliques complexes, de taille comprise entre 500 et 3000 Da.

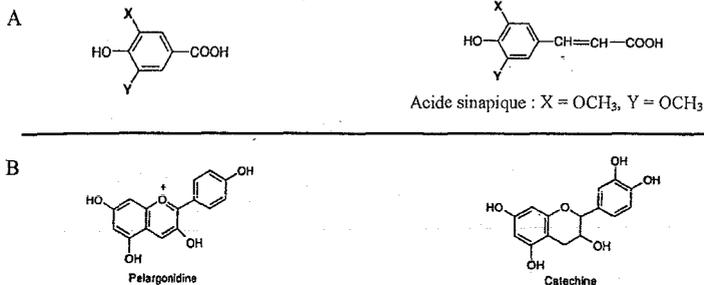


Figure I.13 : Structures des acides phénoliques libres (A) et exemples de tannins (B) présents dans le tourteau de colza (Naczek *et al.*, 1998).

- Autres composés du tourteau de colza

- les fibres : elles constituent environ 40% du tourteau. Elles sont composées à 47% d'hémicellulose, 26% de cellulose, 18% de lignine et 9% de pectine insoluble (Rozan, 1997) ;

- les cendres : ce sont des minéraux et des oligo-éléments ;

- les composés anti-nutritionnels constitués par les acides phytiques et les glucosinolates. Cependant, plusieurs variétés de colza en sont maintenant dépourvues.

b. Valorisation du tourteau de colza

Le principal intérêt du tourteau de colza réside actuellement dans son emploi dans le secteur de l'alimentation animale. Pourtant, cette utilisation reste relativement décevante d'un point de vue économique. Aussi, certaines voies de valorisation non-alimentaires du tourteau de colza ont été envisagées. Des études sont conduites afin d'utiliser le tourteau de colza pour, par exemple, la fabrication de matériaux biodégradables, comme combustible ou en tant que fertilisant (CETIOM, 1998). Pourtant, les débouchés des tourteaux de colza semblent limités et ne sont pas très concluants. La présence de certains composés anti-nutritionnels empêche leur utilisation dans l'alimentation humaine. Il s'avère cependant que les protéines de colza, de par leur diversité de structure, pourraient posséder de nombreuses "propriétés fonctionnelles" intéressantes pour des applications alimentaires ou non-alimentaires. Actuellement, le développement des utilisations non-alimentaires semble constituer la voie la plus intéressante pour le tourteau de colza. Parmi celles-ci, la production de peptides par un procédé d'hydrolyse enzymatique des protéines de colza est prometteuse car les peptides ainsi générés, du fait de leurs multiples propriétés (fonctionnelles, nutritionnelles, sensorielles ou biologiques) présentent plusieurs champs d'applications possibles.

Ainsi, au sein de notre laboratoire des travaux de recherche ont été effectués sur l'hydrolyse enzymatique de protéines de tourteau de colza et sur leur fractionnement. Tessier (2004) a montré que l'utilisation d'un procédé membranaire particulier permettait d'obtenir des fractions peptidiques ayant des activités biologiques différentes de l'hydrolysate initial. Les fractions peptidiques ainsi obtenues sont susceptibles d'être utilisées pour diverses applications dont la supplémentation de milieux de cultures de cellules animales. En effet, depuis l'apparition de la maladie de Creutzfeldt-Jakob et son impact sur la perception du public envers la sécurité des produits obtenus, les législations tant nationales qu'internationales prévoient l'interdiction d'utiliser des produits d'origine animale dans un futur proche. Le procédé utilisé pour l'obtention de différentes fractions peptidiques de colza sera détaillé dans la partie "préambule" précédant la présentation des différents résultats obtenus au cours de ce travail.

III. Métabolisme central des cellules de mammifères en culture

La culture cellulaire, procaryotique ou eucaryotique, est une technologie importante pour la production de protéines pharmaceutiques. La première vague des produits recombinants mis sur le marché consistait en des protéines "simples" c'est-à-dire non glycosylées et qui pouvaient être exprimées de façon intracellulaire par des cellules procaryotiques (hormone de croissance humaine, insuline, interféron- α). Puis, est apparue la seconde génération de produits biotechnologiques, à savoir des glycoprotéines complexes, actives et glycosylées, sécrétées dans le milieu de culture des cellules de mammifères. Actuellement, un nombre important de ces produits pharmaceutiques est sur le marché (érythropoïétine, facteur VIII, tPA (*tissue Plasminogen Activator*), G-CSF (*Granulocyte-colony stimulating factor*), ...) et de nombreux autres sont également sur le point d'être commercialisés.

Ainsi, depuis que la culture de cellules animales a pris une telle importance pour la production de protéines recombinantes thérapeutiques, l'intérêt porté à la connaissance du métabolisme des lignées cellulaires transformées n'a cessé de croître (Miller *et al.*, 1987 ; Fiechter et Gmünder, 1989 ; Ljunggren et Häggström, 1992, 1994, 1995 ; Stephanopoulos et Sinskey, 1993 ; Fitzpatrick *et al.*, 1993 ; Neermann et Wagner, 1996 ; Yallop *et al.*, 2003). En effet, une meilleure connaissance du métabolisme cellulaire permet d'envisager des stratégies de contrôle des procédés dans le but d'obtenir des vitesses de croissance et de production les plus élevées possibles à partir des éléments nutritifs disponibles et de minimiser la formation des co-produits toxiques pour les cellules.

Le métabolisme énergétique primaire des cellules de mammifères est très complexe. Il est réalisé via les voies principales que sont la glycolyse, le cycle de Krebs et la glutaminolyse dans lesquelles certaines enzymes fonctionnent en tant que régulatrices de flux (Glacken, 1988 ; Lanks et Li, 1988). De nombreuses différences existent entre le métabolisme énergétique des cellules de mammifères primaires et transformées. En effet, les lignées cellulaires continues ont subi des altérations génétiques causant des modifications de leur métabolisme. Celles-ci s'observent d'une part, via un flux glycolytique augmenté et une production élevée de lactate, et cela même dans des conditions aérobies complètes et, d'autre part, via un métabolisme accru de la glutamine accompagné par l'excrétion d'ions ammonium et de produits finaux partiellement oxydés, tels que l'alanine (Donnelly et Scheffler, 1976 ; Glacken *et al.*, 1986 ; Schrimpf *et al.*, 1994 ; Elias *et al.*, 2003).

Les sources majeures de carbone et d'énergie pour les cellules de mammifères en culture sont le glucose et la glutamine. La glutamine sert également de source principale d'azote. Les autres acides aminés, consommés en quantité moindre, sont utilisés à plus de 80% pour la synthèse des protéines, contribuant ainsi très peu à la production d'énergie. De la même façon, des composés additionnels tels que les vitamines, les éléments traces et les facteurs de croissance qui sont indispensables à la croissance cellulaire, participent très peu au métabolisme énergétique. Ainsi, pour la majorité des lignées, le glucose et la glutamine sont les deux sources essentielles d'énergie et les ions ammonium, le lactate et l'alanine les produits majeurs du métabolisme central.

III.1. Voies métaboliques du glucose et de la glutamine

Les principales voies métaboliques du glucose et de la glutamine sont présentées dans la figure I.14.

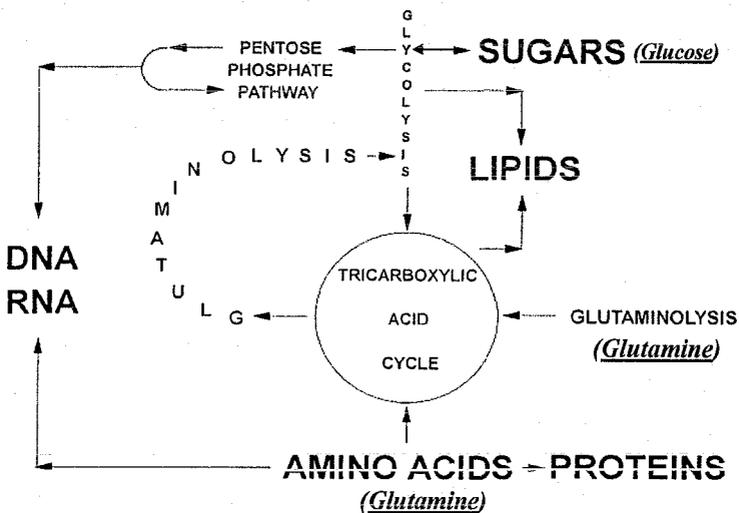


Figure I.14 : Principales voies métaboliques centrales d'assimilation des sucres et des acides aminés pour une lignée cellulaire d'hybridomes et leurs contributions à la synthèses de macromolécules (d'après Paredes *et al.*, 1998).

III.1.1. Le glucose

Les voies principales d'utilisation du glucose sont la glycolyse (étape extra-mitochondriale), les voies anapérotiques et le cycle de Krebs (étape intra-mitochondriale), mais il en existe d'autres : une petite partie du glucose utilisé apporte notamment les précurseurs pour la formation des riboses via la voie des pentoses phosphates, qui tient un rôle essentiel dans la synthèse des acides nucléiques et la régénération des cofacteurs réduits (NADPH) et est ainsi indispensable pour la réplication cellulaire.

a. La glycolyse

La glycolyse est à l'origine des précurseurs métaboliques que sont le glucose 6-phosphate, fructose 6-phosphate, le dihydroxyacétone phosphate et le 3-phosphoglycérate nécessaires à la synthèse du glycogène, des sucres aminés, du glycérol-3-phosphate et d'un carbone de la sérine et de la glycine. Le pyruvate est le dernier métabolite de la glycolyse et constitue ainsi le lien avec le métabolisme mitochondrial.

Selon différentes études (Fitzpatrick *et al.*, 1993; Kurokawa *et al.*, 1994; Neermann et Wagner, 1996; Doverskog *et al.*, 1997; Yallop *et al.*, 2003), il est admis que chez les cellules de mammifères en culture, 60 à 90% du glucose utilisé est transformé en pyruvate, via la glycolyse. La variation de pourcentage obtenu est fonction de la lignée cellulaire utilisée mais aussi des conditions de culture et surtout du moment de la phase de croissance à laquelle les analyses ont été effectuées. Le résidu de glucose est utilisé pour la synthèse de polysaccharides, de lipides ou encore via la voie des pentoses phosphates (5%) (Reitzer *et al.*, 1980).

La glycolyse est une voie catabolique essentielle. En effet, la dégradation du glucose génère non seulement de l'énergie (ATP) et des cofacteurs réduits riches en énergie (NADH+H⁺ et FADH₂) mais également des précurseurs de biosynthèse. Pour que la glycolyse continue à fonctionner, le NADH doit être réoxydé en NAD⁺. Le NAD⁺ cytosolique peut-être régénéré via des navettes transportant le NADH dans la mitochondrie, ou par la réduction du pyruvate en lactate. Si tout le NADH cytosolique était transporté dans la mitochondrie, aucune mole de lactate ne serait formée. Or, contrairement aux cellules de mammifères primaires ou aux cellules d'insectes, les cellules animales transformées convertissent une grande partie du glucose disponible en lactate. Ainsi, bien que la quantité de glucose transformé en pyruvate,

via la glycolyse, soit importante, moins de 0,4% du glucose métabolisé est ensuite converti en intermédiaires du cycle de Krebs (Neermann *et al.*, 1996 ; Fitzpatrick *et al.*, 1993 ; Petch et Butler, 1994). La figure I.15 représente les voies usuelles d'oxydation du glucose dans les lignées cellulaires animales transformées. Dans la mitochondrie, le pyruvate est décarboxylé en acétyl coenzyme A par le complexe pyruvate deshydrogénase et entre dans le cycle de Krebs.

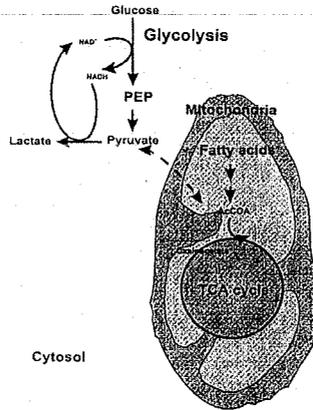


Figure I.15 : Voies usuelles d'oxydation du glucose dans les lignées cellulaires continues (Irani *et al.*, 1999).
PEP = Phosphoénol pyruvate ; TCA cycle = cycle de Krebs

Le pyruvate peut être, soit réduit, grâce à la lactate deshydrogénase, en lactate, qui sera alors sécrété, soit décarboxylé oxydativement, grâce au complexe de la pyruvate deshydrogénase, en acétylCoA qui sera lui-même oxydé via le cycle de Krebs ou encore transaminé pour former de l'alanine. Il peut également être carboxylé via les voies anaplerotiques. Cependant, les cellules transformées convertissent typiquement plus de 90% du glucose consommé en lactate ce qui représente une utilisation inefficace de la source énergétique des carbohydrates. En effet, comparée à la dégradation aérobie complète du glucose via le cycle de Krebs qui génère 36 ATP, la production de lactate en produit seulement 2, ceux de la glycolyse.

Les raisons de ce fort taux de glycolyse inefficace sont difficiles à expliquer. Hume *et al.* (1978) ont suggéré qu'une forte glycolyse aérobie était nécessaire pour maintenir des taux élevés des intermédiaires glycolytiques qui agissent en tant que précurseurs pour la synthèse macromoléculaire et donc pour la croissance cellulaire. Puis en 1992, Nielsen *et al.*, ont montré que les cellules animales ne sont pas limitées par le taux de production d'énergie mais plutôt par le taux de biosynthèse et ajustent donc leur métabolisme énergétique dans ce but. Il

a également été proposé que l'accumulation de lactate dans les lignées cellulaires pourrait être liée à des déficiences enzymatiques aux points de connexion entre la glycolyse et le cycle de Krebs au niveau du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH), de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPck) et de la pyruvate carboxylase (PC) (Fitzpatrick *et al.*, 1993 ; Neermann et Wagner, 1996 ; Petch et Butler, 1994). Ainsi, Irani *et al.*, ont montré, en 1999, que grâce à l'introduction, dans des cellules BHK, du gène exprimant la PC, le lien entre la glycolyse et le cycle de Krebs pouvait être reconstitué et permettre ainsi une meilleure utilisation du glucose induisant une diminution de la consommation de ce substrat d'un facteur quatre. D'autres auteurs pensent que cette accumulation de lactate pourrait être due à une déficience dans le transport des équivalents réducteurs du cytosol à la mitochondrie au niveau des transporteurs aspartate/malate, ce qui entraînerait une accumulation de NADH dans le cytosol et la formation de lactate (Sanfeliu *et al.*, 1997).

b. Le cycle de Krebs

La fonction de ce cycle, localisé dans la mitochondrie, est de fournir des précurseurs et des cofacteurs pour les réactions anaboliques ainsi que pour l'énergie métabolique. En effet, le cycle de Krebs est la principale source métabolique d'énergie, en terme d'ATP, via l'alimentation en NADH du système respiratoire après avoir été relargué lors de l'oxydation des substrats au cours du cycle. Il est situé au carrefour des métabolismes glucidique, lipidique et protéique. La figure I.16 présente les relations du cycle de Krebs avec les autres voies métaboliques.

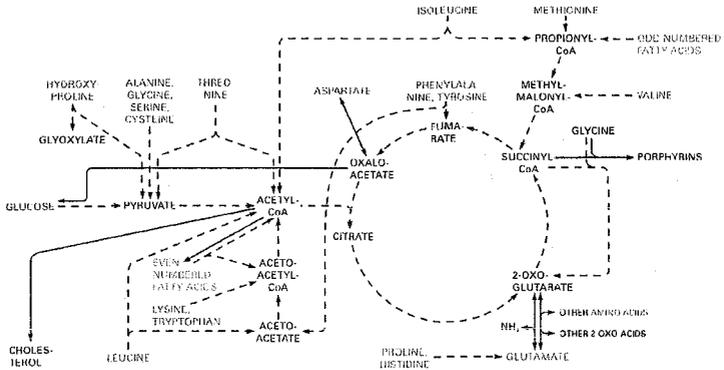


Figure I.16 : Inter-relations entre le cycle de Krebs et les autres voies métaboliques (Stryer, 1992)

III.1.2. La glutamine

La cellule utilise la glutamine, préférentiellement aux autres acides aminés en raison de sa facilité d'intégration dans le cycle de Krebs. La glutamine représente l'une des sources principales d'énergie cellulaire, particulièrement chez les cellules de mammifères transformées, où elle est impliquée dans le contrôle de la prolifération et de l'apoptose (Singh *et al.*, 1994 ; Meneses-Acosta *et al.*, 2001). Elle est également importante pour la biosynthèse des acides aminés, des nucléotides puriques et pyrimidiques et des acides nucléiques. C'est un acide aminé essentiel, particulièrement pour les cellules animales qui sont pour la plupart incapables de la synthétiser car elles sont, soit dépourvues en glutamine synthétase (hybridomes et myélomes) (Bebington *et al.*, 1992), soit possèdent une activité très faible (BHK et CHO) (Neermann et Wagner, 1996).

La première étape de la glutaminolyse est la conversion de la glutamine en glutamate, catalysée par une glutaminase. Le glutamate peut alors, soit servir de substrat pour les voies anaboliques telles que la biosynthèse d'acides aminés : il est alors utilisé par différentes transaminases permettant la formation de nombreux acides aminés (Doverskog *et al.*, 1997), soit il peut-être métabolisé en α -céto glutarate par la glutamate deshydrogénase pour entrer dans le cycle de Krebs (figure I.17). Dans le cas où tout le glutamate serait utilisé pour la formation de l' α KG, une mole de NH_4^+ serait formée par mole de glutamate utilisé. Inversement, si tout le glutamate est utilisé par les transaminases, pour la synthèse des autres acides aminés, il n'y aura pas de libération de NH_4^+ .

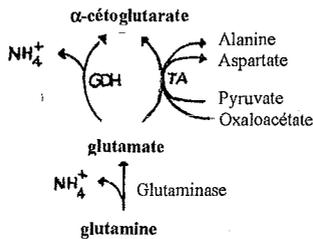


Figure I.17 : Représentation schématique de la glutaminolyse (d'après Häggström *et al.*, 1996).
GDI = Glutamate déshydrogénase, TA = Transaminase

III.2. Niveaux des enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose et de la glutamine, activités et effecteurs

Afin d'expliquer les flux métaboliques observés, les activités des enzymes clés du métabolisme central ont été mesurées dans des extraits de lignées cellulaires industrielles (Fitzpatrick *et al.*, 1993 ; Neermann et Wagner, 1996 ; Vriezen et van Dijken, 1998). Des variations d'activités enzymatiques surviennent en cours de culture, de nombreuses activités augmentant durant la phase exponentielle de croissance d'une culture discontinue (Fitzpatrick *et al.*, 1993).

III.2.1. Principales enzymes de la glycolyse

La figure I.18 présente les différentes réactions de la glycolyse ainsi que les enzymes mises en jeu.

L'hexokinase, (ATP:D-hexose-6-phosphotransférase, EC 2.7.1.1) liée à une porine dans la membrane externe de la mitochondrie est responsable d'un flux glycolytique aérobie élevé dans des cellules tumorales et semble donc tenir un rôle important dans les cellules proliférantes (Golshani-Hebroni et Bessman, 1997). Cette enzyme, qui n'est pas très sensible à l'inhibition rétroactive par le glucose, utilise l'ATP dérivé du métabolisme énergétique mitochondrial pour la phosphorylation du glucose. Il a été suggéré que l'utilisation de cet ATP stimule également le cycle de Krebs en fournissant de l'ADP aux mitochondries. L'activité de

cette enzyme est régulée par la glutamine et semble déterminer le métabolisme global du glucose. Plus précisément, lorsque moins de glutamine est consommée, les ions ammonium sont produits en moindre quantité et la nécessité pour la cellule de les détoxifier en formant du pyruvate est donc moins importante. La consommation de glucose est alors plus faible.

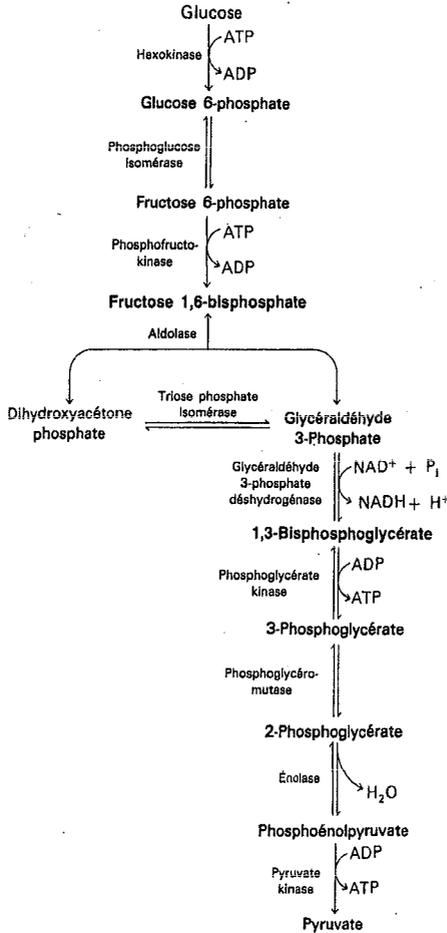


Figure I.18 : Schéma récapitulatif des réactions de la glycolyse.

La phosphoglucose isomérase (D-glucose-6-phosphate keto isomérase, EC 5.3.1.9) catalyse la conversion réversible du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate. Cette enzyme est présente en large excès par rapport au flux métabolique de la glycolyse et n'influence donc pas son contrôle. Elle est utilisée à la fois lors de la glycolyse et de la néoglucogénèse.

La phosphofructokinase (ATP:D-fructose-6-phosphate 1-isotransférase, EC 2.7.1.11) catalyse la phosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-biphosphate. Cette enzyme est inhibée par de fortes concentrations d'ATP, de phosphoenolpyruvate et de citrate, et est stimulée par l'AMP et le fructose 2-6-phosphate. Elle a longtemps été considérée comme régulatrice de la glycolyse (Brand, 1985 ; Newsholme *et al.*, 1987). Cependant, il a depuis été démontré que son activité était 2,5 à 4 fois supérieure à celle de l'hexokinase (Fitzpatrick *et al.*, 1993 ; Neermann and Wagner, 1996) ce qui impliquerait plutôt un contrôle du flux glycolytique par cette dernière.

La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (D-glycéraldéhyde-3-phosphate:NAD⁺ oxydoréductase, EC 1.2.1.12) catalyse la conversion réversible du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3-diphosphoglycérate. Elle est présente en grande quantité chez les cellules de mammifères transformées et est impliquée dans la glycolyse et dans la gluconéogenèse. Cependant, son activité n'est pas prépondérante dans la régulation du flux glycolytique.

La phosphoglycérate kinase (ATP:3-phospho-D-glycérate 1-phosphotransférase, EC 2.7.2.3) catalyse la conversion réversible du 1,3-diphosphoglycérate en 3-phosphoglycérate. Cette étape est génératrice d'ATP. Cette enzyme est présente en grande quantité et n'intervient donc pas dans la régulation du flux glycolytique.

La pyruvate kinase (ATP:pyruvate 2-O-phosphotransférase, EC 2.7.1.40) est la dernière enzyme de la glycolyse. Elle permet d'obtenir le pyruvate tout en générant de l'ATP.

III.2.2. Enzymes de branchement entre la glycolyse et le cycle de Krebs

La figure I.19 présente les différentes réactions anaplerotiques chez les cellules animales ainsi que leurs enzymes.

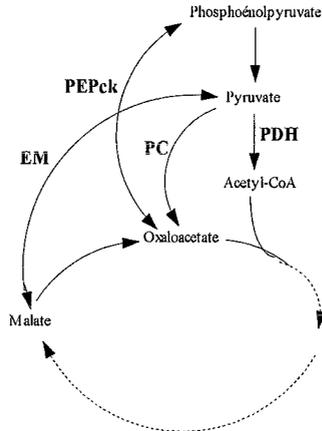


Figure I.19 : Schéma récapitulatif des voies anaplerotiques chez les cellules animales.

PDH = complexe Pyruvate déshydrogénase, PEPck = Phosphoénolpyruvate carboxykinase, PC = Pyruvate carboxylase, EM = Enzyme malique

Le complexe pyruvate déshydrogénase (PDH) permet la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétylcoA. Il possède une faible activité qui pourrait ainsi constituer une barrière à l'entrée des intermédiaires glycolytiques dans le cycle de Krebs. L'augmentation de son activité pourrait alors permettre de promouvoir la fermentation aérobie du glucose.

La pyruvate carboxylase est une enzyme mitochondriale anaplerotique clé. Elle induit l'augmentation du taux d'oxaloacétate dans la matrice et permet, en le carboxylant, le passage du pyruvate dans le cycle de Krebs. Cette réaction est activée allostériquement dans la mitochondrie, par l'acétyl-CoA. Cette activation permet d'augmenter l'activité du cycle de Krebs, en apportant une petite quantité d'oxaloacétate en supplément pour accélérer le cycle. La production d'oxaloacétate permet de conduire le pyruvate et les composés glucoformateurs qui le précèdent (lactate, alanine, sérine, cystéine...) vers la gluconéogenèse. La pyruvate carboxylase est inhibée allostériquement par le malonyl-CoA.

L'enzyme malique carboxyle le pyruvate en malate grâce à l'énergie apportée par l'oxydation du NADPH.

La phosphoénolpyruvate carboxykinase décarboxyle l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate. Cette enzyme fonctionne dans les deux sens et permet ainsi aux intermédiaires du cycle de Krebs d'être convertis en glucose.

III.2.3. Principales enzymes de la glutaminolyse

La glutaminase est une enzyme clé dans le métabolisme de la glutamine. Elle permet la conversion de la glutamine en glutamate avec formation d'ions NH_4^+ . Sa régulation est relativement complexe car bien que possédant un grand nombre d'effecteurs *in vitro*, ses effecteurs *in vivo* les plus importants, excepté pour le phosphate, ne sont pas connus (Curthoys et Watford, 1995). Comme le phosphate est nécessaire à son activité, il est possible qu'un flux glycolytique élevé contrôle indirectement l'activité de la glutaminase en séquestrant les phosphates dans les intermédiaires glycolytiques et diminue ainsi son activité. Ceci a d'ailleurs été vérifié en 1998, par Martinelle *et al.*, qui ont montré que le métabolisme via la glutaminase était significativement augmenté dans des cultures d'hybridomes et de myélomes limitées en glucose. L'activité de cette enzyme est trois fois supérieure à la vitesse spécifique de consommation de la glutamine (Neermann et Wagner, 1996). Ainsi, on peut penser que c'est le transport de la glutamine plutôt que l'activité de l'enzyme qui est limitant. Cependant, Jenkins *et al.* (1992), admettent que la glutaminase peut-être sujette à une régulation intracellulaire et est donc une bonne candidate régulatrice de la glutaminolyse.

L'alanine aminotransférase et l'aspartate aminotransférase permettent, respectivement, la formation d'alanine et d'aspartate à partir du glutamate et fournissent ainsi neuf moles d'ATP par mole de glutamine consommée.

La glutamate déshydrogénase (GDH) est une enzyme importante pour la production d'énergie puisqu'elle permet de générer 27 moles d'ATP par mole de glutamine consommée, si l' α -cétoglutarate est totalement transformé en CO_2 et H_2O . Son activité est augmentée allostériquement en présence d'ADP et inhibée en présence d'ATP. Elle peut-être altérée dans des conditions de stress.

III.3. Dynamique du métabolisme cellulaire en culture

III.3.1. Cinétiques d'assimilation du glucose et de la glutamine

Les vitesses spécifiques de consommation de glucose et de glutamine suivent habituellement la même tendance que la vitesse spécifique de croissance c'est-à-dire qu'elles sont initialement élevées puis décroissent en cours de culture (Hu *et al.*, 1987 ; Ljunggren et Häggström, 1994) et ce, même si la croissance est maintenue en phase exponentielle de façon forcée par des additions ponctuelles de sérum ou d'insuline (Ljunggren et Häggström, 1995 ; Doverskog *et al.*, 1997). Les cinétiques d'assimilation de glucose et de glutamine lors des cultures de cellules de mammifères industrielles sont déterminées par de nombreux facteurs tels que la nature des systèmes d'assimilation de ces substrats et leurs régulateurs spécifiques, leurs concentrations, leurs proportions respectives, le besoin cellulaire en énergie et en précurseurs, la vitesse de croissance, la concentration en oxygène dissous, le pH de culture et la température. De plus, les caractéristiques de consommation du glucose et de la glutamine peuvent être spécifiques de la lignée cellulaire cultivée.

L'assimilation du glucose est déterminée par une diffusion facilitée dans la plupart des cellules de mammifères. Le transporteur existe sous douze isoformes (GLUT1 – GLUT12) qui possèdent des propriétés cinétiques différentes. L'incorporation se fait généralement grâce à un gradient de concentration de glucose à travers la membrane cellulaire. Elle peut également être réalisée grâce à un processus de symport- Na^+ saturable, de grande affinité, conduit par le gradient transmembranaire d'ions sodium. Les vitesses de consommation de glucose par des systèmes saturables et insaturables sont augmentées dans les lignées cellulaires transformées du fait d'un nombre accru de molécules protéiques de transport, particulièrement du transporteur de diffusion facilitée. Le transport du glucose à travers la membrane n'est pas limitant (pour la glycolyse) puisque la vitesse de transport est significativement plus élevée que la vitesse de catabolisation du glucose (Fitzpatrick *et al.*, 1993; Neermann et Wagner, 1996).

La glutamine est assimilée par trois systèmes majeurs de transport : A (Alanine), ASC (Alanin, Sérine, Leucine) et L (Leucine) (Dall'Asta *et al.*, 1990). Tandis que les systèmes A et ASC sont des symports Na^+ conduits par un gradient de sodium, le transport par le système L, qui est un antiport, est dépendant de l'accumulation intracellulaire de méthionine. De plus, l'activité du système A est accrue chez les cellules de mammifères transformées (McGivan et Pastor-Anglada, 1994).

Dans les cultures discontinues de la plupart des lignées cellulaires industrielles, l'accumulation de lactate, d'ions ammonium et d'alanine accompagne la croissance cellulaire. Les concentrations finales de ces co-produits dépendent des concentrations initiales de glucose et de glutamine ; des cas de figures typiques sont : 8-35 mM de lactate, 2-3 mM ammonium et 1-2 mM d'alanine dans le milieu avec des concentrations initiales en glucose de 5-25 mM et en glutamine de 4 mM. La décomposition spontanée de la glutamine contribue à l'accumulation d'ions ammonium.

III.3.2. Rendements et ratios métaboliques

Les rendements et ratios métaboliques sont fréquemment utilisés pour évaluer le métabolisme cellulaire et pour interpréter les effets des changements de conditions de culture. Par exemple, $Y_{\text{cellule}/\text{glucose}}$ et $Y_{\text{cellule}/\text{glutamine}}$ indiquent le nombre de nouvelles cellules formées par quantité de glucose ou de glutamine consommée par les cellules. Un chiffre élevé indique que le substrat est utilisé plus efficacement pour la croissance que si ce chiffre est faible. Les ratios $\text{NH}_4^+/\text{glutamine}$ et lactate/glucose (en mole/mole) sont les témoins des performances métaboliques des cellules et indiquent la formation de NH_4^+ à partir de la glutamine et de lactate à partir du glucose. Les valeurs théoriques maximales sont $Y_{\text{NH}_4^+/\text{glutamine}} = 2$ et $Y_{\text{lactate}/\text{glucose}} = 2$. Les valeurs classiques retrouvées lors de cultures discontinues sont de l'ordre de 1,4-2 pour $Y_{\text{lactate}/\text{glucose}}$ et 0,4-1 pour $Y_{\text{NH}_4^+/\text{glutamine}}$.

III.3.3. Interactions entre le métabolisme du glucose et celui de la glutamine

La compréhension de la relation existant entre le métabolisme du glucose et celui de la glutamine permet de fournir des éléments complémentaires pour le contrôle optimal du processus de production afin de respecter la formation d'énergie pour la croissance et la synthèse des produits, tout en minimisant la formation de co-produits indésirables. Une augmentation de la concentration en glucose augmente la vitesse de consommation du glucose et de production du lactate mais diminue le métabolisme oxydatif, parfois sans inhiber la consommation de glutamine (Luan *et al.*, 1987). A faible concentration en glucose, la consommation de glutamine est augmentée et l'efficacité du métabolisme glutamique augmente du fait de la régulation de la voie de la GDH. La vitesse de consommation de la glutamine augmente en réponse à une augmentation de la concentration en glutamine sans

affecter le métabolisme du glucose ou le métabolisme oxydatif. Il est maintenant généralement admis que les lignées cellulaires continues sont métaboliquement hyperactives, produisant plus d'ATP et de NADH qu'elles n'en ont besoin (Sanfeliu *et al.*, 1997 ; Bonarius *et al.*, 1998).

III.3.4. Contrôle du métabolisme du glucose et de la glutamine

En mode de culture discontinue, les concentrations élevées en glucose et glutamine normalement utilisées augmentent les vitesses initiales de consommation des substrats et les flux métaboliques, conduisant ainsi à une saturation du métabolisme et à l'accumulation des co-produits inhibiteurs que sont le lactate et les ions ammonium. Bien que les niveaux atteints par ces derniers, lors des cultures discontinues, ne soient pas critiques, une attention particulière doit y être portée dans le cas de cultures à hautes densités cellulaires. En effet, au dessus de 40 mM, le lactate commence à devenir un effecteur pouvant inhiber la croissance cellulaire et la production de protéines et activer la vitesse spécifique de décès "kd" (Goergen, 1992). La diminution des concentrations initiales en glucose et en glutamine permet de diminuer la formation de ces co-produits, sans affecter négativement la croissance ou la production. Ljunggren et Häggström (1994 et 1995) ont ainsi montré qu'en contrôlant les concentrations en glucose et en glutamine, dans des cultures semi-continues ou continues, le métabolisme des cellules animales pouvait être contrôlé. La limitation en glutamine réduit non seulement la formation des ions ammonium dans des cultures de myélomes et d'hybridomes mais également la formation d'acides aminés en excès (Ljunggren et Häggström, 1992). Une limitation simultanée en glucose et en glutamine restreint à la fois la vitesse spécifique de consommation du glucose et de la glutamine et par conséquent la formation de lactate et d'ions ammonium (Ljunggren et Häggström, 1994 et 1995 ; Kurokawa *et al.*, 1994). De plus, la production de protéines recombinantes peut-être augmentée dans ces conditions. Ainsi, en utilisant de telles stratégies, et en les combinant avec un apport en acides aminés, des densités cellulaires et des concentrations en anticorps plus élevées ont pu être obtenues.

III.4. Cas des cultures en milieu sans sérum

Lors de cultures sans sérum, les cellules ont un besoin accru de synthétiser des précurseurs de la biomasse. La comparaison du métabolisme de différentes cellules cultivées, soit dans des conditions avec sérum, soit sans sérum, a montré que le rendement molaire de lactate produit

en fonction du glucose consommé est plus élevé dans le cas des cultures sans sérum, indiquant un flux glycolytique plus important dans ces conditions. Cependant, les taux de conversion des métabolites du glucose vers le cycle de Krebs et vers la voie des pentoses phosphates sont les mêmes. Ainsi, cela signifie que lors des cultures avec sérum, le glucose est utilisé de façon non négligeable (32%) par d'autres voies que celles de la glycolyse, du cycle de Krebs et des pentoses phosphates, telles que celles du métabolisme des lipides et de la glycosylation des protéines alors que seulement 18% du glucose est utilisé par ces autres voies dans des conditions sans sérum. Ceci pourrait expliquer la vitesse de division plus élevée des cellules souvent observée en présence de sérum (Neermann et Wagner, 1996). De même, les activités des enzymes de la glutaminolyse sont plus élevées lors de cultures dans des conditions sans sérum. Ceci va de pair avec une vitesse spécifique de consommation et d'oxydation de la glutamine plus élevée en culture sans sérum et indique donc que les activités enzymatiques peuvent être influencées par les conditions de culture. Ainsi, les activités enzymatiques sont fonction de l'état physiologique de la cellule et dépendent des conditions de culture (Neermann et Wagner, 1996).

III.5. Conclusion

La figure I.15 résume les principales voies d'utilisation du glucose et de la glutamine, les deux majeures sources d'énergie et de carbone des cellules de mammifères en culture ainsi que les principaux systèmes de transport des acides aminés et des peptides.

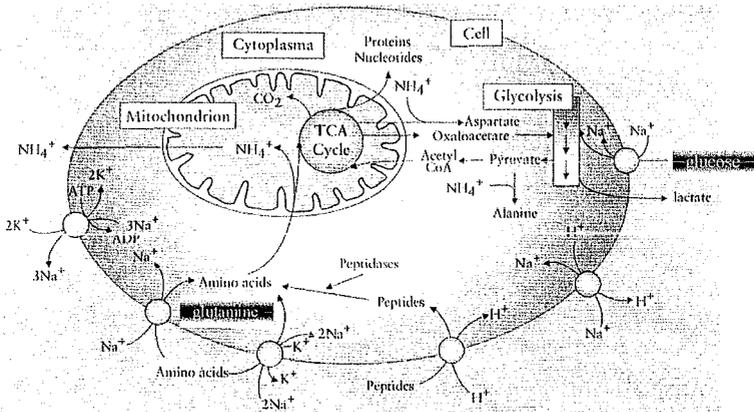


Figure I.15 : Mode d'utilisation, par les cellules en culture, des sources majeures d'énergie : glucose et glutamine et principaux systèmes de transport des acides aminés et des peptides.

Comme nous venons de le voir, les lignées cellulaires continues de mammifères ont l'inconvénient métabolique de ne pas pouvoir oxyder complètement le glucose en CO_2 et H_2O (Miller *et al.*, 1987). La majorité du glucose est oxydé en pyruvate, puis en lactate, ce qui génère seulement 2 moles contre 36 si le pyruvate était dirigé vers le cycle de Krebs. Pour se fournir en énergie, les lignées cellulaires continues recourent à la glutamine, ce qui entraîne l'accumulation de NH_4^+ (figure I.15). Au cours des cultures discontinues, le métabolisme des cellules change en fonction des substrats consommés et des co-produits relargués. Cela conduit à un changement des activités enzymatiques qui peut affecter l'état des cellules et donc leur croissance et leur capacité de production. Les activités catalytiques maximales de certaines enzymes fournissent une indication quantitative des flux à travers les voies métaboliques. Les activités enzymatiques ont donc un rôle d'indicateur et de régulateur de flux, à condition d'examiner les rapports entre différentes activités et les changements relatifs de ces dernières dans des conditions spécifiques.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

I. Culture cellulaire	69
I.1. Lignées cellulaires.....	69
I.1.1. Caractéristiques	69
a. Cellules CHO C5	69
b. Cellules CHO K1	69
c. Cellules Vero	70
d. Hybridomes.....	70
e. Cellules NSO	70
I.1.2. Conservation des lignées cellulaires.....	70
a. Congélation des cellules.....	70
b. Décongélation des cellules.....	71
I.1.3. Propagation des cellules	71
I.1.4. Numération cellulaire	72
a. Par microscope optique.....	72
b. Par système de comptage automatique	72
I.1.5. Adaptation à la suspension	74
I.1.6. Adaptation à la culture en milieu sans sérum	74
I.2. Systèmes de culture.....	75
I.2.1. Culture statique	75
I.2.2. Culture en suspension.....	75
a. Fioles d'Erlenmeyer	75
b. Flacons agités ou "spinners"	75
c. Bioréacteur régulé et parfaitement agité	76
I.3. Milieux de culture	77
I.3.1. Milieux à base de RPMI.....	77
a. Milieu RPMI avec sérum	79
b. Milieu dit de "référence"	79
c. Milieu RPMI supplémenté par des fractions peptidiques végétales.....	80
I.3.2. Milieux à base d' α MEM.....	80
a. Milieu α MEM avec sérum	80
b. Milieu α MEM sans sérum	80
I.3.3. Milieu de culture pour les cellules NSO.....	82
I.4. Analyse des constituants du milieu	82
I.4.1. Dosage du glucose.....	83
I.4.2. Dosage de la glutamine	83
I.4.3. Dosage du lactate	83
I.4.4. Dosage des ions ammonium.....	84
I.4.5. Dosage de l'interféron-gamma.....	84
I.4.6. Analyse d'activités enzymatiques intra- et extracellulaires	85
a. Dosage de l'activité lactico-déshydrogénase.....	85
b. Dosage de l'activité pyruvate carboxylase.....	86
I.5. Exploitation des résultats : calculs des paramètres cinétiques	87
I.5.1. Vitesses spécifiques de croissance et de décès cellulaire.....	87
I.5.2. Vitesses spécifiques de disparition des substrats et d'apparition des produits.....	88
II. Fractionnement peptidique	89
II.1. L'unité de filtration	89
II.1.1. Description.....	89
II.1.2. Mode opératoire	90
II.2. Chromatographie d'exclusion de taille.....	90
II.3. Chromatographie d'échange de cations.....	91
II.4. Caractérisation des fractions peptidiques.....	91
II.4.1. Dosage d'azote par la méthode de Kjeldahl	91

II.4.2. Hydrolyse acide des peptides et dosage des acides aminés.....	92
a. Hydrolyse acide.....	92
b. Dosage des acides aminés.....	93
II.4.3. Dosage de la matière sèche.....	94
II.4.4. Dosage des composés phénoliques.....	94

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

I. Culture cellulaire

I.1. Lignées cellulaires

I.1.1. Caractéristiques

a. Cellules CHO C5

La lignée d'ovaire de hamster chinois CHO C5 utilisée dans la grande majorité de ce travail est un clone issu de la lignée CHO 320, transfectée à l'aide de l'ADNc codant pour l' α 2,6-sialyltransférase de rat (Monaco *et al.*, 1996). La lignée CHO 320 résulte elle-même de la cotransfection dans la lignée CHO Dux-B11 dhfr- des ADNc codant respectivement pour l'interféron-gamma humain et la déhydrofolate réductase (Hayter *et al.*, 1991). Les cellules CHO C5 sont donc pourvues de la déhydrofolate réductase (dhfr+) et sont productrices d'interféron gamma humain (figure II.1). Elles sont adaptées à la culture en suspension et en milieu sans sérum (milieu de référence défini en I.3.1.b).

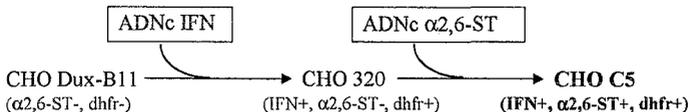


Figure II.1 : Représentation schématique de la construction de la lignée CHO C5 utilisée au cours de notre étude.

b. Cellules CHO K1

La lignée CHO K1 est une lignée sauvage commercialisée par l'ATCC, référence CCL-61, déficiente en déhydrofolate réductase (dhfr-). Elle est cultivée dans du milieu α MEM, supplémenté par des ribo- et des désoxyribonucléosides ainsi que par 5% de sérum de veau fœtal. Cette lignée est dépendante d'une adhérence.

c. Cellules Vero

La lignée de cellules Vero (African green monkey kidney cells) utilisée est une souche qui nous a été fournie par la société Biopharma (Maroc). Ses propriétés biologiques ont été décrites par Terasima et Yasukawa (1987). C'est une cellule adhérente-dépendante, présentant un temps de doublement d'environ 23 heures lors de sa culture en milieu α MEM, supplémenté avec 10 % de SVF. Cette lignée est particulièrement utilisée pour la production de vaccins humains à l'échelle industrielle.

d. Hybridomes

La lignée d'hybridomes utilisée nous a été fournie par A. Martial (Laboratoire de recherche en génie Industriel Alimentaire, Bourg-en-Bresse). Ses caractéristiques (origine et nature des anticorps monoclonaux produits) sont soumises à confidentialité. Ces cellules sont cultivées dans du milieu RPMI supplémenté par 5% de SVF.

e. Cellules NSO

Une lignée cellulaire NSO (myélome de souris) exprimant un anticorps recombinant, nous a été fournie par un partenaire industriel. Elle est soumise à confidentialité et est cultivée dans un milieu sans sérum et sans protéine animale.

I.1.2. Conservation des lignées cellulaires

a. Congélation des cellules

Les lignées cellulaires sont conservées dans l'azote liquide (-196°C) dans des cryules contenant 1.10^7 cellules en suspension dans 1 mL de milieu de congélation constitué de 70% du milieu de culture, de 20% de sérum et de 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) pour les cellules cultivées en présence de sérum et de 90 % du milieu de culture et de 10% de DMSO pour les cellules cultivées en milieu sans sérum.

Afin d'effectuer la congélation des cellules, 1.10^7 cellules sont centrifugées et le culot contenant les cellules à congeler est remis en suspension dans le milieu de culture (+/- sérum). Le DMSO est ensuite ajouté goutte à goutte, tout en maintenant les cryules dans la glace. Le DMSO est un agent cryoprotecteur empêchant la formation de cristaux de glace qui feraient

exploser les cellules lors de la congélation. Il est cytotoxique à température ambiante. La congélation des cellules est alors réalisée en plusieurs étapes à l'aide de l'appareil de congélation Nicool LM. Ainsi, les cryotubes sont maintenus à $-11,5^{\circ}\text{C}$ pendant 25 minutes, puis à -61°C pendant 10 minutes et sont enfin plongés pendant une minute dans l'azote liquide avant d'être stockés dans un container d'azote liquide.

b. Décongélation des cellules

Les cellules sont décongelées rapidement en plaçant le cryotube dans un bain thermostaté à 37°C . La suspension cellulaire est ensuite diluée dans 5 mL de milieu frais avant d'être centrifugée pendant 5 minutes à 800 rpm. Le surnageant est alors éliminé, le culot cellulaire remis en suspension dans du milieu frais, introduit dans un flacon de culture qui sera alors incubé à 37°C .

I.1.3. Propagation des cellules

Dans le cas de cellules adhérentes, lorsque la confluence est atteinte dans les flacons statiques, le surnageant est éliminé et le tapis cellulaire rincé à l'aide de tampon PBS. Les cellules sont détachées par protéolyse ménagée à l'aide d'une solution de trypsine (0,05 g/L trypsine, 0,02 g/L EDTA, 0,85 g/L NaCl) et incubées quelques minutes à 37°C . L'action de la trypsine est alors stoppée par l'addition de milieu de culture frais et la suspension ainsi obtenue centrifugée 5 minutes à 800 rpm. Le culot cellulaire obtenu est repris par une quantité adéquate de milieu frais pour être à nouveau propagé en flacons statiques à bouchons ventilés de manière à permettre les échanges gazeux. Ces flacons sont ensemencés à raison de $0,2 \cdot 10^5$ cellules/cm² puis placés dans un incubateur régulé à 37°C et 5% de CO₂ (Jouan EG 1101R).

Les cultures en suspension peuvent être ensemencées avec des cellules préalablement propagées en adhérence ou en suspension. Elles sont réalisées en flacons agités de type Erlenmeyers en polycarbonate, spinners en verre ou bioréacteur. La densité cellulaire d'ensemencement est de $2 \cdot 10^5$ cellules/mL. La mise en œuvre de tels types de culture sera détaillée dans la partie I.2.2.

I.1.4. Numération cellulaire

a. Par microscope optique

Les cellules sont dénombrées par observation au microscope optique à l'aide d'un hémacytomètre ou cellule de Thoma. Le comptage de 6 grilles contenant chacune entre 20 et 150 cellules est réalisé pour chaque prélèvement. L'incertitude sur la valeur de la densité cellulaire ainsi obtenue est comprise entre 10 et 20% (Nielsen *et al.*, 1991).

La viabilité cellulaire est déterminée par coloration au bleu trypan, colorant qui pénètre dans les cellules dont la membrane est endommagée, donnant ainsi une coloration bleue aux cellules mortes. Pour cela, 0,1 mL de la solution de bleu trypan est ajouté à 1 mL de la suspension cellulaire.

b. Par système de comptage automatique

Le Cellscreen (figure II.2) est un équipement commercialisé par la société Innovatis (Bielefeld, Allemagne).

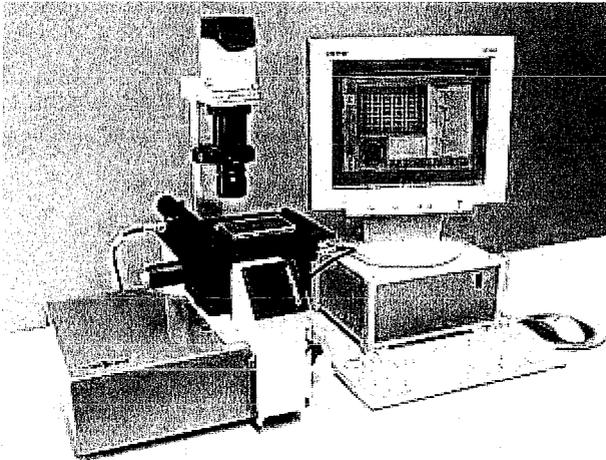


Figure II.2 : Photographie de l'appareil Cellscreen (Innovatis).

Son principe de fonctionnement consiste à acquérir directement des images de cellules en culture dans des plaques 96 puits, sans aucune coloration, ni prélèvement. Les images sont ensuite traitées par un logiciel d'analyse d'images permettant d'évaluer le nombre de cellules totales ainsi que leur répartition selon leur taille. Cet appareil présente l'avantage supplémentaire de pouvoir suivre la croissance des cellules sur une période de temps assez longue, grâce à des mesures successives mais par contre ne permet pas de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes. L'incertitude sur la valeur de la densité cellulaire ainsi obtenue est comprise entre 5 et 10% (Brinkmann *et al.*, 2002).

La phase de préparation consiste à déterminer la configuration de l'expérience. Une sélection et une description détaillées de l'expérience doivent être réalisées : position et surface des puits à compter, volume de culture, type cellulaire et système de culture. Durant la phase de mesure, les échantillons sont photographiés grâce à une camera CCD qui réalise un auto-focus pour chaque image. De plus, la technologie de contrôle de cet appareil permet d'assurer qu'exactement la même région de l'image dans le puit est photographiée à chaque nouvelle lecture. Il est ainsi possible de suivre la croissance des cellules dans chaque région sélectionnée (figure II.3). Les résultats peuvent être présentés de différentes façons : images individuelles, courbes de croissance, graphiques de densité cellulaire ou visualisation de l'évolution de la croissance au cours du temps. Tous les résultats sont automatiquement stockés dans une base de données.

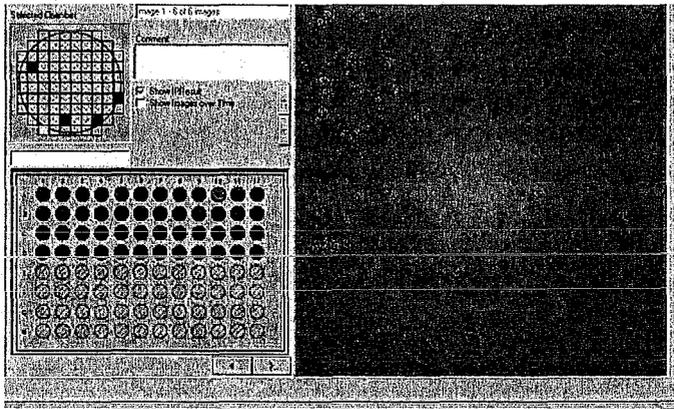


Figure II.3 : Capture d'écran du Cellscreen au cours d'un comptage de cellules en suspension.

I.1.5. Adaptation à la suspension

La lignée CHO K1 a été adaptée à la culture en suspension. Dans un premier temps, les cellules adhérentes sont détachées par trypsination, centrifugées et remises dans du milieu frais (cf I.3.1.). Cette suspension est utilisée pour l'ensemencement de fioles d'Erlenmeyer en polycarbonate, à raison de $3 \cdot 10^5$ cellules/mL. Ces fioles sont placées sur une table d'agitation orbitale (IKA-réf. KS 501), réglée à 70 rotations par minute. Après 48 heures de culture, la suspension cellulaire comporte des cellules libres et des agrégats. Les flacons sont laissés au repos pour permettre la décantation des agrégats. La phase supérieure du surnageant est prélevée de façon à réduire au maximum le prélèvement d'agrégats et les cellules sont centrifugées et réensemencées dans du milieu frais à $2 \cdot 10^5$ cellules/mL. Le protocole décrit ci-dessus est renouvelé durant une dizaine de propagations (environ 20 jours) afin d'obtenir une suspension cellulaire sans agrégat, que l'on peut alors qualifier de lignée adaptée à la suspension.

I.1.6. Adaptation à la culture en milieu sans sérum

Les lignées CHO K1, Vero et les hybridomes ont été adaptés à la culture en milieu sans sérum. Deux protocoles d'adaptation différents ont été utilisés.

Dans le cas de la procédure d'adaptation brutale, les cellules habituellement cultivées dans un milieu contenant du sérum sont directement transférées dans un milieu sans sérum. Nous considérons que les cellules sont adaptées à leurs nouvelles conditions de culture lorsqu'une croissance acceptable est obtenue après plusieurs propagations successives.

Dans le cas de la procédure d'adaptation progressive, les cellules sont placées dans un milieu contenant 75% du milieu initial et 25% du milieu final (sans sérum), puis propagées jusqu'à ce que leur temps de doublement se stabilise. Ce protocole peut alors être répété avec un milieu contenant 50% du milieu initial et 50% du milieu final, puis respectivement 25% et 75%, et enfin 100% du milieu final c'est-à-dire du milieu sans sérum. Les cellules sont considérées comme adaptées au nouveau milieu après qu'une croissance correcte des cellules ait été observée pendant un minimum de cinq propagations dans ce milieu final.

I.2. Systèmes de culture

I.2.1. Culture statique

Les cellules sont propagées en flacons statiques à bouchons ventilés offrant une surface de 25 cm², 75 cm² ou 175 cm² (Greiner). Ces flacons sont positionnés dans un incubateur régulé à 37°C et à une atmosphère à 5% de CO₂ (Jouan EG 1101R).

I.2.2. Culture en suspension

a. Fioles d'Erlenmeyer

Les cellules adaptées à la culture en suspension sont propagées en fiole d'Erlenmeyer, en polycarbonate, à usage unique, de 500 mL, 250 mL ou 125 mL (Corning - réf. 25600). La densité d'ensemencement est généralement de 2 à 2,5.10⁵ cellules/mL. Le ciel de la fiole est rempli durant trois minutes d'un mélange gazeux constitué de 5% de CO₂ et 95% d'air, puis la fiole est fermée et déposée sur une table d'agitation (IKA - réf. KS 501) placée dans une étuve thermostatée à 37°C. La vitesse d'agitation est réglée à 70 tr/min. Le volume utile de la culture est le cinquième de la contenance maximale de la fiole (exemple : 25 mL pour la fiole de 125 mL). Un volume utile supérieur perturbe l'agitation du milieu et peut engendrer la création d'agrégats cellulaires ainsi qu'une moins bonne aération. Le pH et l'oxygène dissous ne sont pas régulés dans ces cultures.

b. Flacons agités ou "spinners"

Ce sont des flacons agités cylindriques (Techne), en verre borosilicaté de 500 mL, pourvus d'une tige aimantée centrale dont l'extrémité supérieure est fixée au bouchon. Ils sont placés sur une table d'agitation magnétique (Techne Mcs 1045) dont la vitesse est fixée à 40 tr/min et qui est disposée dans un incubateur régulé à 37°C et 5% de CO₂ (Jouan EG 1101R). Bien que le volume utile de ces flacons soit de 250 mL, nous nous sommes limités à 160 mL de suspension cellulaire afin de favoriser l'oxygénation de la culture, réalisée par des échanges gazeux avec le milieu extérieur par le biais des bouchons latéraux, légèrement dévissés (figure II.4). Le pH et l'oxygène dissous ne sont pas régulés dans ces cultures.

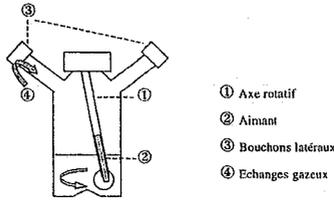


Figure II.4 : Représentation schématique d'un flacon agité, de type "spinner".

c. Bioréacteur régulé et parfaitement agité

Un bioréacteur de 2 L a été utilisé (SGI) pour réaliser des cultures discontinues. Sa configuration est représentée dans la figure II.5. Le bioréacteur est un système de culture particulièrement bénéfique car il permet la régulation de plusieurs paramètres opératoires importants tels que le pH, la température, le pourcentage d'oxygène dissous ainsi que la vitesse d'agitation. Le volume utile des cultures réalisées est de 1,2 L. Avant l'ensemencement, le réacteur contenant du PBS est stérilisé par autoclavage (30 min, 121°C, 1 bar). Ce dernier est ensuite soutiré et la suspension cellulaire injectée de façon stérile, sous une enceinte stérile. L'agitation, fixée à 50 rpm, est réalisée à l'aide d'un module d'agitation à pales inclinées fixées sur un axe central. Les prélèvements pour comptage et dosages sont réalisés directement dans le bioréacteur, toutes les douze heures environ.

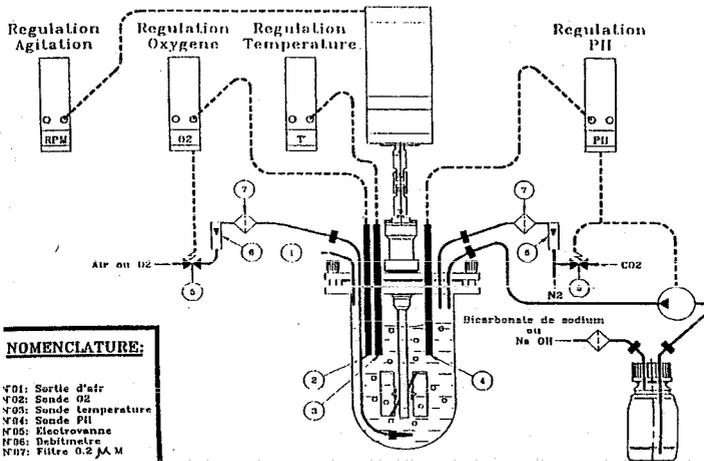


Figure II.5 : Représentation schématique du bioréacteur utilisé (SGI).

- Régulation de la température

La température est contrôlée par un système de bandeau chauffant autour de la paroi de la cuve. La valeur de consigne de température est de 37°C. Une plaque de cuivre, positionnée entre le bandeau et la paroi en verre assure une meilleure régulation en évitant d'éventuels "points chauds".

- Régulation du pH

Le pH est contrôlé par un système de régulation de type PID (Proportionnelle-Intégrale-Dérivée) couplé à une sonde stérilisable de mesure du pH (Ingold). Celle-ci est étalonnée avant stérilisation à l'aide de solutions tampons commerciales de pH 4 et de pH 7. Le système de régulation PID commande l'ajout "d'acide", en l'occurrence le CO₂ pour la dissociation de H₂CO₃ en H⁺ et HCO₃⁻, si le pH mesuré est supérieur à la valeur de consigne. Dans le cas contraire, la régulation actionne l'injection de soude 0,2 N (isotonique) vers le réacteur à l'aide d'une pompe péristaltique. La valeur de consigne appliquée au cours de la culture est de 7,2. En début de culture, l'ajout de CO₂ est privilégié, puis, seule intervient la régulation de pH par ajout de soude, le métabolisme cellulaire ayant tendance à acidifier le milieu.

- Régulation de l'oxygène dissous

La pression partielle en oxygène dissous (pO₂) est également contrôlée par un système PID couplé à une sonde stérilisable (Ingold) qui est étalonnée avant stérilisation. Les valeurs 0 % et 100 % de saturation de l'air sont obtenues en plaçant la sonde dans un flux d'azote puis d'air. Pendant la culture, l'aération est assurée par un diffuseur de gaz situé en fond de cuve, ou par le ciel du réacteur afin d'éviter au maximum l'apparition de mousse. L'injection d'oxygène ou d'azote est soumise à l'ouverture d'une électrovanne pilotée par le système de régulation PID. La valeur de la consigne de pO₂ est fixée à 50 % de saturation de l'air.

I.3. Milieux de culture

I.3.1. Milieux à base de RPMI

La formulation de ces milieux dérive du milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 auquel sont ajoutés des éléments nutritifs de faible poids moléculaire conformément aux recommandations de Hamilton et Ham (1977). Le milieu RPMI-1640 dont la composition est présentée dans le tableau II.1 a été développé par Moore *et al.* (1967).

Composé	g/l	Composé	g/l
ACIDES AMINES		VITAMINES	
L-Arginine	0,2	Biotine	0,0002
L-Asparagine	0,05	Chlorure de choline	0,003
Acide L-aspartique	0,02	Acide folique	0,001
L-Cystine-2HCl	0,0652	Inositol	0,035
Acide L-glutamique	0,02	Niacinamide	0,001
L-Glutamine	0,3	Pantothénate de Calcium D	0,00025
Glycine	0,01	PABA	0,001
L-Histidine	0,015	Pyridoxine-HCl	0,001
Hydroxy-L-proline	0,02	Riboflavine	0,0002
L-Isoleucine	0,05	Thiamine-HCl	0,001
L-Leucine	0,05	Vitamine B12	0,000005
L-Lysine-HCl	0,04		
L-Méthionine	0,015	SELS INORGANIQUES	
L-Phénylalanine	0,015	Nitrate de calcium-4 H ₂ O	0,1
L-Proline	0,02	Sulfate de magnésium	0,04884
L-Sérine	0,03	Chlorure de potassium	0,4
L-Thréonine	0,02	Chlorure de sodium	6
L-Tryptophane	0,005	Phosphate de sodium	0,8
L-Tyrosine-2Na-2H ₂ O	0,02883		
L-Valine	0,02	AUTRES COMPOSES	
		Glucose	2
		Glutathion	0,001
		Rouge de phénol-Na	0,0053

Tableau II.1 : Composition du milieu RPMI 1640.

Les concentrations des éléments nutritifs (hormis les hydrolsats végétaux et les fractions de colza) ajoutés au milieu basal ont été optimisées pour la croissance d'une lignée CHO (Castro *et al.*, 1992). La concentration finale de ces éléments est présentée dans le tableau II.2.

Le milieu RPMI (Sigma), conditionné en poudre pour 1 litre, est dispersé dans 500 mL d'eau stérile de qualité milliQ et 2,5 g de bicarbonate de soude sont ajoutés. Le milieu est alors filtré stérilement à l'aide d'une cartouche stérile de porosité 0,2 µm. Après avoir contrôlé la stérilité du milieu ainsi obtenu, 3 jours à 37°C, celui-ci est conservé à 4°C jusqu'à sa complémentation avec les suppléments particuliers. Ces derniers sont préparés sous forme de solution mère, filtrés à l'aide de filtres ayant des pores de 0,2 µm et dilués dans le milieu de façon à atteindre les concentrations finales données dans le tableau II.2. Ces solutions mères sont conservées à -20°C.

	Suppléments	Solutions mères	Concentration finale	Fournisseur
	L-glutamine	200 mM	2 mM	Gibco
	Glucose	450 g/L	2 g/L	Sigma
TIB	Transferrine humaine	100 mg/L	5 mg/L	Sigma
	Insuline bovine	100 mg/L	5 mg/L	Sigma
	Albumine sérique bovine	100 g/L	5 g/L	Euromedex
	Pyruvate de sodium	100 mM	1 mM	Sigma
ET	L-Alanine	10 mM	0,1 mM	Sigma
	Putrescine, 2HCl	100 µM	1 µM	Sigma
	FeSO ₄ , 7H ₂ O	300 µM	3 µM	Sigma
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	300 µM	3 µM	Sigma
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	1 µM	10 nM	Sigma
	Na ₂ SeO ₃	1 µM	10 nM	Sigma
Hydrolysats commerciaux	HP 1510 - soja			
	HP 4601 - blé			
	HP 4605 Dev - blé	20 g/L	2 g/L	QUEST
	HP 5603 Dev - riz			
	HP 7401 - pois			
	Fractions de colza	20 g/L	variable	Notre travail

Tableau II.2 : Suppléments pour le milieu RPMI de base.

a. Milieu RPMI avec sérum

Ce milieu est constitué du milieu RPMI de base supplémenté par 5% de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine et 2 g/L de glucose. Ce milieu est utilisé pour la culture des hybridomes.

b. Milieu dit de "référence"

Le milieu qualifié de milieu de référence est constitué par le milieu RPMI de base, supplémenté par 5 g/L d'albumine sérique Bovine, 5 mg/L d'Insuline bovine, 5 mg/L de Transferrine humaine (ou TIB), une solution d'Éléments Tracés (ET, concentration de chaque élément détaillée dans le tableau II.2), 2 mM de glutamine et 2 g/L de glucose. Il est utilisé pour la culture des cellules CHO C5.

c. Milieu RPMI supplémenté par des fractions peptidiques végétales

Différents milieux supplémentés par des hydrolysats végétaux ont été utilisés. Ils sont tous constitués du milieu de référence, supplémenté par différentes fractions de colza ou de différents hydrolysats végétaux QUEST. Plus spécifiquement, on appellera milieu d'intérêt, le milieu de référence supplémenté par 4 g/L de la fraction peptidique de colza ultérieurement sélectionnée. Ils sont utilisés pour la culture des cellules CHO C5 et des hybridomes.

Au cours de ce travail, un milieu sans protéine animale a également été formulé. Il est constitué du milieu de "référence" dépourvu de TIB et supplémenté par 4 g/L de la fraction de colza. Ce milieu est utilisé pour la culture des cellules CHO C5.

I.3.2. Milieux à base d' α MEM

Le milieu α MEM avec ribo- et désoxyribonucléosides (Gibco), conditionné en poudre est préparé de façon similaire au milieu RPMI. Sa composition est donnée dans le tableau II.3.

a. Milieu α MEM avec sérum

Ce milieu est constitué du milieu α MEM avec ribo et désoxyribonucléosides supplémenté par 5% de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine et 2 g/L de glucose. Il est utilisé pour la culture des cellules CHO K1 et des cellules Vero.

b. Milieu α MEM sans sérum

Ce milieu est formé du milieu α MEM avec ribo et desoxyribonucléosides, supplémenté par, 5 mg/L de Transferrine humaine, 5 mg/L d'Insuline bovine et 5 g/L d'albumine sérique Bovine (ou TIB), une solution d'Eléments Traces (ET, concentration de chaque élément détaillée dans le tableau II.2), 2 mM de glutamine et 2 g/L de glucose. Il est utilisé pour la culture des cellules CHO K1 et des cellules Vero.

Composé	g/l.
ACIDES AMINES	
Glycine	50
L-Alanine	25
L-Arginine	105
L-Asparagine-H ₂ O	50
L-Aspartic acid	30
L-Cysteine hydrochloride-H ₂ O	100
L-Cystine 2HCl	31
L-Glutamic Acid	75
L-Glutamine	292
L-Histidine	31
L-Isoleucine	52.4
L-Leucine	52.4
L-Lysine	73
L-Methionine	15
L-Phenylalanine	32
L-Proline	40
L-Serine	25
L-Threonine	48
L-Tryptophan	10
L-Tyrosine disodium salt	52
L-Valine	46
SELS INORGANIQUES	
Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	200
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	97.67
Potassium Chloride (KCl)	400
Sodium Chloride (NaCl)	6800
Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)	140

Composé	g/l.
VITAMINES	
Ascorbic Acid	50
Biotin	0.1
Choline chloride	1
D-Calcium pantothenate	1
Folic Acid	1
i-Inositol	2
Niacinamide	1
Pyridoxal hydrochloride	1
Riboflavin	0.1
Thiamine hydrochloride	1
Vitamin B12	1.36
RIBONUCLÉOSIDES	
Adenosine	10
Cytidine	10
Guanosine	10
Uridine	10
DEOXYRIBONUCLÉOSIDES	
2'Deoxyadenosine	10
2'Deoxycytidine HCl	11
2'Deoxyguanosine	10
Thymidine	10
AUTRES COMPOSÉS	
D-Glucose (Dextrose)	1000
Lipoic Acid	0.2
Phenol Red	10
Sodium Pyruvate	110

Tableau II.3 : Composition du milieu α MEM avec ribo- et désoxyribonucléosides.

I.3.3. Milieux de culture pour les cellules NSO

La composition du milieu de culture utilisé pour la croissance des cellules NSO est confidentielle. Il s'agit d'un milieu sans sérum et sans protéine d'origine animale. Au cours de ce travail, il sera également supplémenté par 4 g/L de la fraction peptidique d'intérêt de colza.

I.4. Analyse des constituants du milieu

Le suivi cinétique des cultures en suspension a été réalisé à partir d'échantillons prélevés toutes les 12 heures environ. Leur traitement est décrit dans la figure II.6.

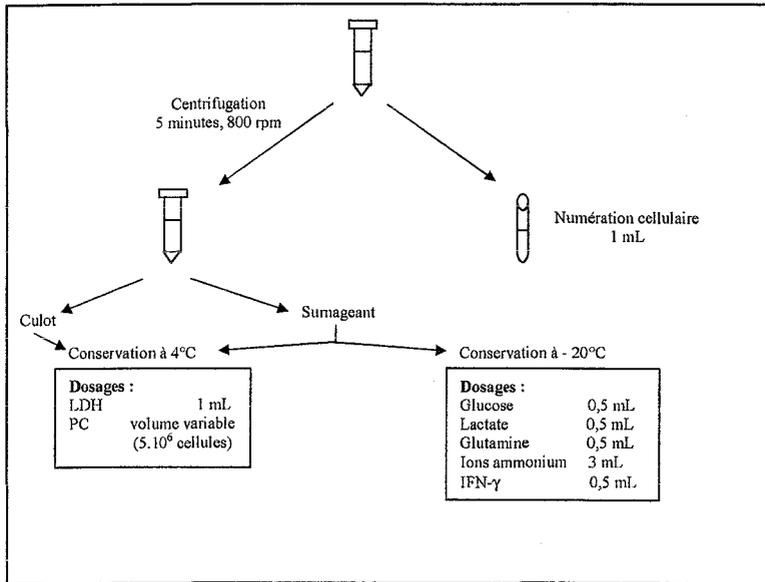
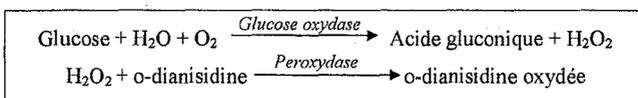


Figure II.6 : Représentation schématique du traitement des échantillons prélevés dans les cultures en suspension.
LDH = Lactate Déshydrogénase, PC = Pyruvate Carboxylase

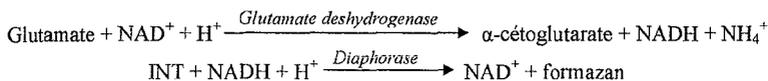
I.4.1. Dosage du glucose

Le glucose est dosé par méthode enzymatique sur des plaques de microtitration de 96 puits à l'aide d'un kit commercial (Sigma, 510A). La concentration de glucose est mesurée par l'apparition de o-dianisidine oxydée, détectée à l'aide d'un spectrophotomètre Multiskan MCC/340 (Titertek) à une longueur d'onde de 450 nm. L'erreur de dosage est inférieure à 10%.



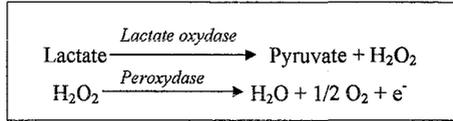
I.4.2. Dosage de la glutamine

La concentration de la glutamine est mesurée par le biais du dosage du glutamate, par méthode enzymatique à l'aide d'un kit commercial (Boehringer Mannheim, réf. 139092). Dans un premier temps, la glutamine est transformée en glutamate à l'aide d'une asparaginase (Boehringer Mannheim, ref 102903) et ce dernier est alors dosé sur plaques de microtitration de 96 puits. L'apparition de formazan est détectée à 492 nm sur un 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. L'erreur de dosage est de l'ordre de 20%.



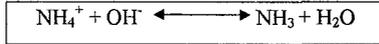
I.4.3. Dosage du lactate

Le lactate est dosé par méthode enzymatique sur plaque de microtitration de 96 puits, à l'aide d'un kit commercial (Sigma, 735-10) utilisant une lactate oxydase et une peroxydase. L'électron libéré oxyde un substrat chromogène dont l'apparition est mesurée à 550 nm. L'erreur sur le dosage est de 10 à 20%.



I.4.4. Dosage des ions ammonium

Le dosage des ions ammonium est réalisé à l'aide d'une électrode à diffusion gazeuse (Orion). En milieu alcalin, les ions ammonium du milieu sont transformés en NH₃ gazeux.



Un volume de 3 mL d'échantillon à doser est placé sous agitation dans une cuve thermostatée par une double enveloppe dans laquelle circule de l'eau à 37°C. L'addition de 3 mL de soude 0,5N élève le pH de l'échantillon aux environs de 12 et permet ainsi de déplacer la réaction vers la formation de NH₃ gazeux, qui diffuse à travers la membrane de l'électrode et entraîne une variation de potentiel selon la loi de Nernst :

$$E = E_0 - S \cdot \log[\text{NH}_3]$$

Avec :

E₀ = potentiel de référence (ordonnée à l'origine)

S = pente de la courbe d'étalonnage

L'étalonnage est réalisé avec des solutions de NH₄Cl de concentrations connues, en traçant log[NH₄Cl] en fonction du potentiel E de l'électrode. L'erreur du dosage est d'environ 10%.

I.4.5. Dosage de l'interféron-gamma

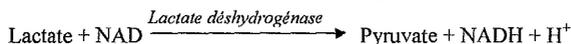
Le dosage de l'interféron-gamma est réalisé, en plaque 96 puits, grâce à un test ELISA à l'aide du kit commercial Duo Set de chez R&D (réf. DY 285). La veille du test, l'anticorps de capture, produit chez la souris et dirigé spécifiquement contre l'interféron gamma humain, est déposé dans les puits de la microplaque. Le lendemain, la plaque est lavée avec le tampon de lavage pour éliminer les anticorps non-fixés. Les sites aspécifiques sont alors bloqués par de l'albumine bovine sérique afin d'éviter la fixation non spécifique de l'interféron. Au bout d'une heure, des lavages sont effectués, puis les échantillons contenant l'interféron sont déposés pour une incubation de deux heures. Après une nouvelle série de lavages, l'anticorps de détection biotinylé (anti-interféron gamma humain) est déposé. Ce dernier sera ensuite

reconnu par de la streptavidine couplée à une peroxydase, générant une réaction colorée lors de l'ajout d'une solution de substrats. L'action du substrat est stoppée par l'ajout d'une solution d' H_2SO_4 , 2N. Les densités optiques des colorations obtenues sont obtenues après lecture à 450 nm sur un spectrophotomètre Multiskan MCC/340 (Titertek).

I.4.6. Analyse d'activités enzymatiques intra- et extracellulaires

a. Dosage de l'activité lactico-déshydrogénase

L'activité lactico-déshydrogénase est déterminée à l'aide d'un kit commercial (Sigma, 228-10). Ce test est basé sur l'apparition du NADH lors de l'oxydation du lactate en pyruvate, catalysée par la lactate déshydrogénase. L'augmentation de l'absorbance, proportionnelle à l'activité de l'enzyme, est mesurée à 340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.



Le dosage de la LDH extracellulaire dans le surnageant de culture permet l'évaluation du nombre de cellules mortes lysées. La méthode utilisée a été décrite en détail par Wagner *et al.* (1992). Brièvement :

1. détermination de l'activité intracellulaire (LDHi) des cellules vivantes (100% viabilité) après lyse provoquée ;
2. détermination de l'activité LDH dans le surnageant de culture ;
3. détermination du nombre de cellules mortes totales = $\text{LDH}/\text{LDHi} = \text{Xm}$
4. détermination du nombre de cellules mortes non lysées par la méthode au Bleu Trypan = Xb ;
5. détermination du nombre de cellules lysées = $\text{Xl} = \text{Xm} - \text{Xb}$.

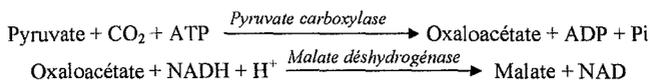
La lyse des cellules vivantes est provoquée artificiellement. Pour cela, ces dernières sont centrifugées, le culot cellulaire resuspendu dans une solution de lyse (Tween-20 à 2% dans du PBS) et placé ainsi à 4°C pendant une nuit. Dans ces conditions, la LDH est relarguée à 100% (Chevalot, 1992).

b. Dosage de l'activité pyruvate carboxylase

- *Mise au point du dosage pour des cultures de cellules CHO en milieu sans sérum*

La mise au point du dosage s'appuie sur les résultats présentés par Yallop *et al.* (2003). Cette publication présente une technique de dosage pour plusieurs enzymes intracellulaires dont la pyruvate carboxylase (PC) qui produit de l'oxaloacétate à partir du pyruvate. L'oxaloacétate est transformé à son tour en malate sous l'action de la malate déshydrogénase.

Le dosage indirect de l'activité pyruvate carboxylase est basé sur la disparition du NADH suite à la réduction de l'oxaloacétate en malate par une quantité non limitante de malate déshydrogénase. La diminution de l'absorbance, proportionnelle à l'activité de l'enzyme, est mesurée à 340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.



La première étape de l'optimisation de ce dosage pour notre lignée cellulaire a consisté à évaluer la quantité minimale de cellules induisant une variation de densité optique lors de la lecture au spectrophotomètre. Les essais réalisés ont permis d'estimer la quantité de cellules nécessaire au dosage à $5 \cdot 10^6$ cellules (résultats non montrés). La deuxième étape de mise au point a permis de vérifier la reproductibilité du dosage selon le mode de conservation des échantillons : réfrigération à 4°C et congélation à -80°C. Nous avons montré que les échantillons peuvent être stockés jusqu'à 2 heures à 4°C et plusieurs jours à -80°C sans variation de l'activité de la pyruvate carboxylase (résultats non montrés).

- *Protocole de dosage*

$5 \cdot 10^6$ cellules sont récupérées et centrifugées 5 minutes à 800 rpm. Le culot cellulaire est alors repris dans 3 mL de PBS, lavé deux fois dans ce même tampon puis dilué dans 1mL de tampon d'extraction (composition donnée dans le tableau II.4).

	Composés	Concentration
Tampon d'extraction	Saccharose	300 mmol/L
	KCl	100 mmol/L
	EDTA	1 mmol/L
	DTT	10 mmol/L
	Triton X-100	0,1 % (v/v)
	Leupeptine	200 µmol/L
	Aprotinine	10 µg/mL
	PMSF	10 µg/mL
	Tampon Tris, pH 7,4	50 mmol/L
Tampon de réaction	Tampon Tris-HCl, pH 7,8	50 mmol/L
	ATP	5 mmol/L
	MgCl ₂	10 mmol/L
	Malate déshydrogénase	2 U
	NADH	0,1 mmol/L
	Pyruvate de sodium	2 mmol/L
	AcetylCoA	0,5 mmol/L

Tableau II.4 : Composition des tampons d'extraction et de réaction pour le dosage de la pyruvate carboxylase.

Par la suite, et cela dans le but de récupérer leur contenu intracellulaire, les cellules sont détruites par sonication. Une centrifugation de 3 minutes à 6000 rpm permet la précipitation des débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et est, soit utilisé immédiatement, soit conservé à - 80°C. Le volume réactionnel permettant le dosage est de 1 mL ; il est composé de 0,1 mL de surnageant supplémenté par 0,9 mL de tampon de réaction (composition donnée dans le tableau II.4). 300 µL de ce mélange sont déposés dans la cuve du spectrophotomètre et la lecture de densité optique est faite à 340 nm et à 25°C. L'addition du pyruvate au bout de 2 minutes de lecture de DO permet le démarrage de la réaction.

L'activité de la pyruvate carboxylase est obtenue de façon similaire à celle de la LDH (voir I.4.6., a).

I.5. Exploitation des résultats : calculs des paramètres cinétiques

I.5.1. Vitesses spécifiques de croissance et de décès cellulaire

Si l'on appelle X_v , la concentration des cellules viables, X_m , celle des cellules mortes (colorées au bleu trypan) et r_x et r_d , respectivement les vitesses de croissance et de décès cellulaire, alors, le bilan matière sur les cellules viables, pour des systèmes de culture en mode discontinu, s'écrit de la manière suivante :

$$r_x - r_d = \frac{dX_v}{dt}$$

Le bilan matière sur les cellules mortes s'écrira :

$$r_d = \frac{dX_m}{dt}$$

La vitesse spécifique de croissance $\mu_{\text{réel}}$ et la vitesse spécifique de décès cellulaire k_d sont définies par :

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

La valeur de $\mu_{\text{réel}}$ est déterminée à l'aide de μ_{app} et de k_d qui sont calculés à partir des données expérimentales de X_v et de X_m . Les points expérimentaux sont interpolés par des polynômes d'ordre compris entre 2 et 4. Ces derniers sont utilisés pour générer des points théoriques espacés d'environ quatre heures sur les courbes de concentration des cellules viables ou mortes. La génération d'un nombre suffisant de points permet alors de calculer la valeur instantanée de la vitesse spécifique apparente de croissance (ou de la vitesse spécifique de décès) à un temps donné t_i en utilisant la formule :

$$\mu_{\text{app}(t_i)} = \frac{1}{X_i} * \frac{(X_{i+1} - X_{i-1})}{(t_{i+1} - t_{i-1})}$$

I.5.2. Vitesses spécifiques de disparition des substrats et d'apparition des produits

Les vitesses spécifiques de consommation des substrats et de formation des produits sont liées aux vitesses r_s de disparition des substrats et r_p d'apparition des produits par les relations :

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

avec :

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

Les données expérimentales correspondant aux concentrations des substrats et des produits sont interpolées par des polynômes. Comme pour les vitesses spécifiques de croissance et de décès cellulaires, ces polynômes sont utilisés pour générer de nouveaux points théoriques espacés d'environ quatre heures, utilisés ensuite pour faire une approximation de la dérivée par rapport au temps en chaque point de la courbe.

II. Fractionnement peptidique

II.1. L'unité de filtration

L'unité de filtration PROSCALE (Millipore) présentée dans la figure II.7, nous a permis d'une part d'effectuer les étapes d'ultrafiltration 3 kDa et 1 kDa, grâce à l'utilisation de deux membranes planes en acétate de cellulose, respectivement PLBC et PLAC (Millipore) et d'autre part une étape de nanofiltration, grâce à l'utilisation d'une membrane spiralée Nanomax 50, en polyamide/polysulfone (Millipore).

II.1.1. Description

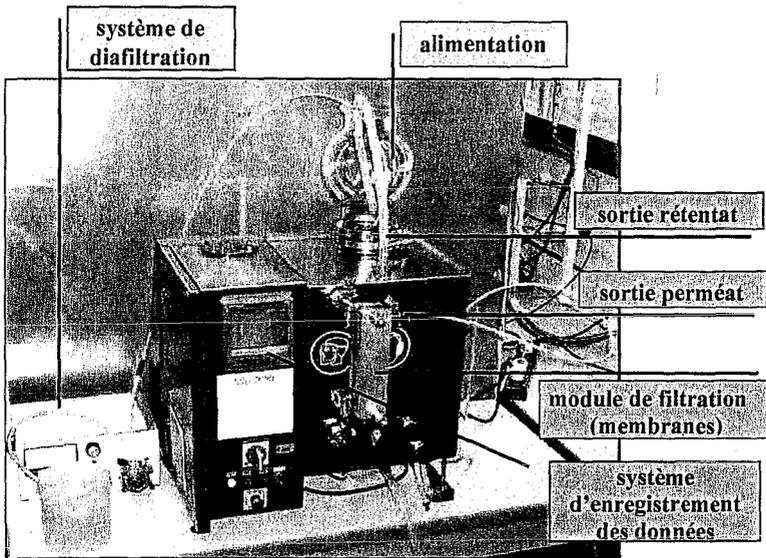


Figure II.7 : Photographie de l'unité de filtration utilisée.

Cette unité de filtration permet d'utiliser des membranes de tous types, et notamment, planes et spiralées. Elle est constituée de plusieurs éléments : un réservoir d'alimentation, une pompe centrifuge conduisant le liquide d'alimentation vers la membrane, un système de diafiltration comprenant un réservoir d'eau osmosée et une pompe péristaltique alimentant le réservoir d'alimentation, plusieurs vannes manuelles, une sonde de température au niveau de la sortie rétentat, deux manomètres, l'un sur la ligne d'alimentation et l'autre sur la sortie du rétentat, un

débimètre massique, à la sortie perméat et le module de filtration permettant de placer différents types de membranes (planes, spiralées...).

II.1.2. Mode opératoire

Lors de l'utilisation de la membrane, l'agent de stockage doit être éliminé. Pour cela, une circulation d'eau osmosée est effectuée dans le circuit. A l'issue de cette étape, la perméabilité de la membrane est mesurée. Cette manipulation consiste à fixer plusieurs paliers de pression transmembranaire, de 1 à 5 bars et, à mesurer dans chaque cas les débits. On parle alors de pente à l'eau initiale. La filtration s'effectue ensuite en trois étapes :

- une étape de mise en régime ou de recirculation totale (environ 5 à 10 min) permettant d'éliminer le maximum d'eau résiduelle du circuit et d'établir le régime au sein du système ;
- une étape de concentration au cours de laquelle le rétentat est recyclé afin d'optimiser le rendement de l'opération ;
- une étape de diafiltration arbitrairement découpée en deux à cinq étapes. Elle permet non seulement de maintenir un volume constant dans le rétentat, évitant ainsi que la solution devienne trop "pâteuse" et donc impossible à filtrer, et également, d'augmenter la transmission des peptides et donc le rendement de la filtration.

II.2. Chromatographie d'exclusion de taille

La séparation et l'analyse des peptides contenus dans les différentes fractions peptidiques a été réalisée à l'aide d'une colonne Superdex Peptide HR 10/30 (7000-200 Da) (Amersham Biosciences, Uppsala, Suède) et d'un système de chromatographie BioCAD[®] 700^E (Applied Biosystems, Foster City, Etats-Unis), couplé à un collecteur de fraction Modèle 203B (Gilson, Middleton, Etats-Unis). La méthode utilisée est celle décrite par Schweizer (2002).

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- Eluant : ACN/H₂O/TFA (40/60/0,1 – v/v/v), filtré sur 0,45 µm, puis dégazé à l'hélium : 5 mL/mn
- Débit de l'éluant : 0,6 mL/mn
- Détection UV : 214 nm
- Volume injecté : 50 µL

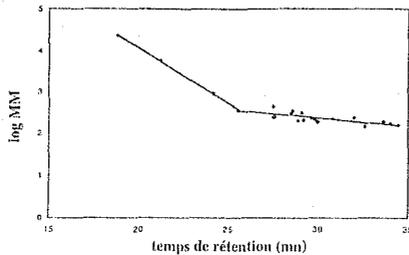


Figure II.8 : Relation obtenue par CLIP-ET, reliant la masse molaire et le temps de rétention de protéines et peptides étalons sur une colonne Superdex Peptide IIR 10/30, UV 214 nm, débit 0,6 mL/mn (Schweizer, 2002).

La colonne a été préalablement étalonnée avec des peptides de masses molaires connues (figure II.8). Deux droites ont été obtenues en traçant le logarithme de la masse molaire en fonction du temps de rétention. La détermination de la relation liant la masse molaire (MM) des molécules à leur temps de rétention sur la colonne a permis de définir la distribution selon la taille des peptides contenus dans les différentes fractions

II.3. Chromatographie d'échange de cations

La séparation ionique des peptides contenus dans la fraction peptidique d'intérêt a été réalisée à l'aide d'une colonne Peek (Perseptive Biosystems), ayant un diamètre interne de 4,6 mm et une longueur de 50 mm. La phase stationnaire POROS 10 SP échangeuse de cations est constituée de groupements fonctionnels sulfopropyl. La méthode utilisée est celle décrite par Raminosa (2003).

II.4. Caractérisation des fractions peptidiques

II.4.1. Dosage d'azote par la méthode de Kjeldahl

La teneur protéique a été déterminée par la méthode de Kjeldahl, suivant la méthode utilisée par Schweizer (2002). Cette méthode de dosage est basée sur la transformation de l'azote organique en azote minéral sous forme de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Le dosage est réalisé de façon automatique avec un appareil de Kjeldahl automatique Vapodest 4S titramatic (Gerhardt GmbH & Co. KG, Bonn, Allemagne). Pour chaque échantillon, l'analyse est effectuée deux fois de manière à pouvoir calculer une valeur moyenne. Il est également

nécessaire de faire un dosage à blanc pour obtenir, après soustraction, une valeur de l'azote total réellement contenu dans l'échantillon.

Les résultats sont exprimés en concentration massique d'azote, selon la formule :

$$\text{taux d'azote (g/l)} = (V - V_0) \times N \times 14 / E$$

avec V : volume d'H₂SO₄ nécessaire à la titration de l'échantillon en mL ;

V₀ : volume d' H₂SO₄ nécessaire à la titration du blanc en mL ;

N : titre de la solution d'H₂SO₄ (mol/L) ;

E : prise d'échantillon en mg ou en mL.

Le pourcentage de protéines est obtenu à l'aide du coefficient de transformation pour les protéines de colza (6,25), lui-même calculé à partir de la teneur en azote de ces protéines (16%) : taux de protéines = 6,25 x taux d'azote.

II.4.2. Hydrolyse acide des peptides et dosage des acides aminés

a. Hydrolyse acide

Une hydrolyse acide des fractions peptidiques est préalablement effectuée pour obtenir un mélange homogène d'acides aminés libres. Un échantillon d'1g ou d'un 1mL est placé dans un tube à essais avec bouchon. Quatre mL d'acide chlorhydrique (6 N) sont ajoutés puis le tube à essais est mis sous atmosphère d'azote avant d'être fermé hermétiquement. L'hydrolyse se fait ensuite dans une étuve à 110°C pendant 24 heures. Après refroidissement, les hydrolysats sont neutralisés jusqu'à un pH d'environ 6 par ajout de soude 4 N. Les échantillons sont finalement filtrés sur filtre seringue à 0,22 µm.

L'inconvénient de l'hydrolyse acide est la destruction du tryptophane et la transformation de la glutamine et de l'asparagine, respectivement en acide glutamique et en acide aspartique. L'analyse du tryptophane peut être effectuée après une hydrolyse basique par chromatographie d'échange d'ions (Hugli *et al.*, 1972). Étant donné que la quantité en tryptophane est très limitée dans le colza (Godon, 1996), cet acide aminé ne sera pas analysé. Quant à la glutamine et l'asparagine, leur quantification sera intégrée avec les acides aminés correspondants, sous les formes Glx et Asx (Glx = Gln + Glu, Asx = Asn + Asp).

b. Dosage des acides aminés

Les acides aminés ainsi que les dipeptides alanyl-glutamine et glycyl-glutamine sont dosés par Chromatographie Liquide en Phase Inverse après dérivation en présence d'o-phthaldéhyde (OPA) et de 9-fluorényl-méthyl chloroformate (FMOC). Le principe de la dérivation est le suivant : les acides aminés primaires sont placés en présence d'OPA et d'acide 3-mercapto-propionique (3-MPA), pour donner des isoindoles hautement fluorescents et absorbants dans le domaine UV (338 nm) (Godel *et al.*, 1992). Selon le même principe, les acides aminés secondaires sont dérivés en présence de FMOC, pour donner des dérivés hautement fluorescents et absorbants dans le domaine UV (262 nm). Le seuil de détection est de l'ordre de 100 pmoles. Les échantillons sont dérivés automatiquement à l'aide d'un système HP 1090 Liquid Chromatograph (Hewlett Packard). Trois μL d'échantillon sont tout d'abord neutralisés avec 1,5 μL de NaOH 2 N pour obtenir une dérivation totale. Puis, le tout est mélangé à 6 μL de tampon borate 0,4 N, 2,5 μL de la solution d'OPA + 3-MPA et 2,5 μL de la solution de FMOC. Le mélange dure 15 mn afin de permettre la dérivation ; enfin, le tout est injecté au niveau de la colonne de séparation Hypersil C18 (Interchim, France).

Le solvant d'éluion est composé de 100% de solvant A (tableau II.4), pendant 17 mn, puis de 40% de solvant A et 60% de solvant B (tableau II.4) pendant 1 mn et enfin de 100% de solvant B, pendant 7 mn. Les acides aminés sont séparés selon leur polarité ; les plus polaires sortent en début d'analyse et les moins polaires en fin d'analyse. En sortie de colonne, les acides aminés primaires et les dipeptides sont détectés par un détecteur UV, à 338 nm, et les acides aminés secondaires sont détectés par un détecteur UV, à 262 nm. La durée totale de l'analyse est de 25 mn.

Solutions d'éluion

Solvant A	20 mM acétate de sodium, 3 H_2O , à 0,024% (v/v) de triéthylamine et 0,5% (v/v) de tétrahydrofurane. Le mélange est ajusté à pH 7,2 avec de l'acide acétique.
Solvant B	20% (v/v) d'un tampon d'acétate de sodium à 100 mM, ajusté à pH 7,2 avec de l'acide acétique, 40% (v/v) d'acétonitrile et 40% (v/v) de méthanol.

Tableau II.4 : Composition des solutions d'éluion nécessaires au dosage des acides aminés par chromatographie liquide en phase inverse.

La détermination du taux d'acides aminés libres est effectuée selon le même protocole, exceptée l'absence d'étape d'hydrolyse acide.

Avant analyse des échantillons, trois solutions, contenant 17 acides aminés aux concentrations de 0,25, 0,5 et 2,5 mM respectivement, sont dérivées et injectées sans neutralisation préalable avec du NaOH 2 N. Les profils obtenus servent à établir une gamme étalon pour chaque acide aminé, ce qui permet ensuite de déterminer la concentration de chaque acide aminé contenu dans un échantillon après intégration des pics (système Hewlett Packard).

II.4.3. Dosage de la matière sèche

La détermination de l'humidité a été faite en portant les échantillons (1 à 5 g) à 105°C dans une étuve jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

II.4.4. Dosage des composés phénoliques

La quantité de composés phénoliques dans les fractions a été estimée en équivalent acide sinapique. L'acide sinapique (Sigma, D 7927), avec une masse molaire de 224 g/mol, a été utilisé comme référence parce qu'il est l'acide phénolique majoritairement présent dans le tourteau de colza (entre 70 et 90%) selon Naczka *et al.* (1992). L'étalonnage et les mesures ont été effectués en utilisant les mêmes conditions chromatographiques que celles qui sont employées en C.L.H.P.-E.T., exceptée la longueur d'onde de détection fixée dans ce cas à 310 nm, ce qui correspond à la longueur d'onde d'absorption maximale de cet acide (Sakakibara *et al.*, 2003). La figure II.9 montre la droite d'étalonnage obtenue en notant l'aire sous le pic en fonction de la quantité d'acide sinapique injectée. La quantité de composés phénoliques dans chaque fraction a été exprimée en mg d'équivalents d'acide sinapique/100g de matière sèche. La teneur en composés phénoliques libres a été estimée en calculant la proportion d'aire du pic ayant un temps de rétention (compris entre 34 et 37 mn) identique à celui du standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage.

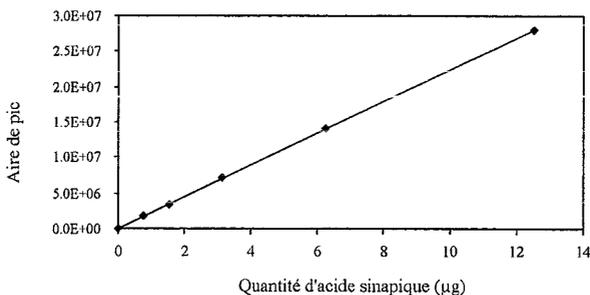


Figure II.9. Détermination de la quantité de composés phénoliques dans les hydrolysats, en équivalents acide sinapique.

CHAPITRE III - PREAMBULE

**OBTENTION ET CARACTERISATION DES
FRACTIONS PEPTIDIQUES DE COLZA**

CHAPITRE III - PREAMBULE : OBTENTION ET CARACTERISATION DES FRACTIONS PEPTIDIQUES DE COLZA

I. Procédé d'obtention des fractions peptidiques.....	95
I.1. Préparation du concentrat de colza.....	95
I.2. Préparation de l'hydrolysate de colza.....	95
I.3. Obtention des fractions peptidiques par filtration membranaire.....	97
I.3.1. Etape 1 : première étape d'ultrafiltration.....	97
I.3.2. Etape 2 : étape de nanofiltration.....	98
I.3.3. Etape 3 : deuxième étape d'ultrafiltration.....	98
II. Caractérisation des fractions utilisées.....	101
II.1. Caractéristiques propres à chaque fraction.....	102
II.1.1. Hydrolysate, fraction 1.....	102
II.1.2. Surnageant, fraction 2.....	102
II.1.3. Précipité, fraction 3.....	102
II.1.4. Rétentat, fraction 4.....	103
II.1.5. Perméat, fraction 5.....	103
II.2. Comparaison des fractions de colza avec des hydrolysats commerciaux.....	104

CHAPITRE III - PREAMBULE : OBTENTION ET CARACTERISATION DES FRACTIONS PEPTIDIQUES DE COLZA

La première partie de ce travail présente les procédés, développés par Tessier (2004), pour l'obtention et le fractionnement d'un hydrolysate de protéines de colza ainsi que la caractérisation de ces fractions. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au tourteau de colza, co-produit de l'industrie huilière de cet oléagineux. Son emploi dans des milieux de culture pour cellules animales pourrait représenter une valorisation innovante de cette matière première, par rapport à son utilisation habituelle pour l'alimentation animale. Le procédé de fractionnement est basé sur l'utilisation de membranes qui offrent un coût relativement modéré et permettent d'obtenir divers mélanges de peptides à partir d'un hydrolysate végétal complexe.

I. Procédé d'obtention des fractions peptidiques

Le procédé d'obtention des fractions peptidiques est résumé dans la figure III.1. Il inclut des étapes d'extraction, d'hydrolyse, de précipitation et de filtration.

I.1. Préparation du concentrat de colza

Dans un premier temps, dans le but d'obtenir une matière première enrichie en protéines, les protéines d'un tourteau de colza déshuilé (Novance, Compiègne, France) contenant 35% de protéines sont extraites à l'aide d'une solution basique de soude à 0,2 M. Le concentrat ainsi obtenu contient alors plus de 75% de matière protéique ; il sera utilisé pour l'hydrolyse ultérieure.

I.2. Préparation de l'hydrolysate de colza

L'hydrolyse de protéines peut-être effectuée soit par voie chimique, soit par voie enzymatique. Cependant, les inconvénients de l'hydrolyse chimique, qu'elle soit acide ou basique, sont trop importants pour que celle-ci puisse couramment être utilisée. En effet, l'hydrolyse acide

engendre la perte complète du tryptophane, la destruction partielle de la méthionine et la transformation de l'asparagine et de la glutamine, respectivement en acide aspartique et en acide glutamique. A l'inverse, l'hydrolyse enzymatique présente de nombreux avantages en permettant notamment de moduler l'importance de l'hydrolyse (en fonction du temps de réaction et du rapport enzyme/substrat) ainsi que la nature des peptides obtenus (en fonction de la spécificité de l'enzyme choisie). De plus, les enzymes sont dorénavant disponibles en grandes quantités et à des coûts de plus en plus modérés (Clémente, 2000). Enfin, l'hydrolyse enzymatique possède le double avantage d'être effectuée dans des conditions opératoires douces (pH, température) et sûres, ce qui limite la racémisation ou la destruction d'acides aminés. L'hydrolyse peut être effectuée de manière discontinue ou continue. Cependant, les procédés discontinus restent les plus conventionnels et les plus souvent rencontrés dans l'industrie du fait de leur facilité de mise en œuvre. Pour cette raison, c'est ce type de réacteur qui a été utilisé dans le cadre de ce travail, selon le procédé développé par Schweizer (2002). Lorsque le degré d'hydrolyse souhaité est atteint, l'enzyme est inactivée en changeant le pH et/ou en augmentant la température (90°C).

Afin d'obtenir une solution constituée majoritairement de petits peptides, le concentrat protéique obtenu précédemment est hydrolysé par l'Alcalase® 2.4 L (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Danemark) à 60°C et à pH 9. Après cinq heures d'hydrolyse, correspondant à un degré d'hydrolyse (DH) de 28% (technique du pH-stat), la réaction est arrêtée par inactivation de l'enzyme (90°C pendant 10 min.). L'Alcalase® 2.4 L est une protéase de la famille des subtilases, issue de *Bacillus licheniformis*. Cette enzyme possède une activité endopeptidasique à large spectre de coupure et permet ainsi de produire un hydrolysate de protéines de colza contenant un maximum de petits peptides. De plus, il est important de souligner que, du fait de son origine microbienne, son utilisation est sans risque de transmission d'éléments biologiques d'origine animale (virus, prions...), à condition que le procédé de production soit bien contrôlé. Une fois l'hydrolysate refroidi, le mélange recueilli contient de nombreuses particules en suspension. Afin de les éliminer et d'obtenir un mélange plus homogène, une étape de centrifugation est nécessaire avant l'utilisation de cet hydrolysate dans la suite du procédé.

I.3. Obtention des fractions peptidiques par filtration membranaire

L'hydrolysats enzymatique obtenu est constitué d'un mélange complexe de polypeptides, de peptides, d'acides aminés, de minéraux et d'autres composés non azotés. Son utilisation comme supplément d'un milieu de culture de cellules animales peut requérir un fractionnement plus sélectif des composés d'intérêt, réalisé ici par filtration membranaire. En effet, cette technique de séparation est couramment employée dans les procédés de valorisation des hydrolysats dans le but d'éliminer les molécules de masses molaires élevées (protéines non hydrolysées, enzymes...) et/ou, inversement, les composés de faibles masses molaires (petits peptides, petits composés non azotés...).

Avant de procéder aux différentes étapes de filtration, un abaissement du pH de l'hydrolysats de 9 à 4 est réalisé. Ce changement de pH provoque l'apparition de composés insolubles, pouvant facilement être séparés de la fraction soluble. Cette précipitation dépendante du pH est couramment utilisée pour purifier les petits peptides contenu dans un hydrolysats (Shimizu *et al.*, 1984), bien que ce phénomène physico-chimique ne soit pas élucidé. Cette précipitation acide permet, dans notre cas, d'éliminer la majeure partie des molécules de haut poids moléculaire présentes dans l'hydrolysats. En effet, sans cette étape, le risque de colmatage des membranes utilisées par la suite serait trop important. Parallèlement, cette étape de précipitation permet la concentration du surnageant en petits peptides.

Les deux techniques membranaires utilisées dans le procédé mettant en œuvre des hydrolysats protéiques sont l'ultrafiltration et la nanofiltration : les molécules azotées contenues dans un hydrolysats ayant généralement une masse molaire comprise entre 150 et 50 000 Da, en fonction du degré d'hydrolyse et de la taille initiale des protéines. Toutes les membranes utilisées sont des membranes Millipore (Bedford, USA).

I.3.1 Etape 1 : première étape d'ultrafiltration

La première étape d'ultrafiltration est réalisée à l'aide d'une membrane plane (PLBC, Millipore), en acétate de cellulose possédant un seuil de coupure de 3 kDa. Cette étape permet de purifier les petits peptides par élimination dans le rétentat des molécules d'une taille supérieure à 3000 Da, c'est-à-dire essentiellement des composés phénoliques et des polypeptides.

I.3.2. Etape 2 : étape de nanofiltration

Elle est réalisée avec une membrane spiralée (Nanomax 50, Millipore), en polyamide/polysulfone ayant un seuil de coupure de 500 Da, les peptides de taille supérieure à 500 Da étant récupérés dans la solution retenue. La nanofiltration est utilisée pour d'une part, diminuer le taux d'acides aminés libres présents et, d'autre part, évacuer les sels pouvant induire une hyper-osmolarité de la solution. Ainsi, grâce à cette nanofiltration, la concentration en sels du mélange est diminuée de 80% ce qui permet ensuite un meilleur fractionnement des peptides selon leur charge. En effet, la force ionique de la solution est un paramètre influençant notablement le fractionnement ; l'augmentation de la teneur en sels engendrant une diminution à la fois des phénomènes de répulsion des peptides acides et d'attraction des peptides basiques (Nau *et al.*, 1992-93).

I.3.3. Etape 3 : deuxième étape d'ultrafiltration

La seconde ultrafiltration est effectuée grâce à une membrane plane (PLAC, Millipore), en acétate de cellulose, ayant un seuil de coupure de 1 kDa. Elle est chargée négativement. Cette étape d'ultrafiltration permet de fractionner les petits peptides, non seulement, selon leur taille, mais également, et surtout selon leur charge. En effet, selon la théorie de Donnan, des interactions électrostatiques apparaissent en fonction de la charge des peptides et de la membrane. Les peptides ayant la même charge que la membrane sont considérés comme des co-ions et ont donc tendance à être repoussés par celle-ci. Au contraire, les peptides de charge opposée (contre-ions) sont attirés par la membrane et sont alors préférentiellement transmis dans le perméat. Ainsi, dans notre cas, les peptides acides (chargés négativement) sont peu représentés dans le perméat, les neutres sont distribués de façon homogène et les basiques (chargés négativement) sont prédominants dans le perméat. Aussi, le rétentat présente une teneur plus élevée en peptides contenant des acides aminés acides tandis que le perméat est plus riche en peptides contenant des acides aminés basiques.

Etant donné le grand nombre de fractions générées par le procédé, nous avons choisi d'approfondir nos travaux avec seulement cinq d'entre elles, identifiées comme suit :

- **hydrolysats** (fraction 1) : obtenu après hydrolyse enzymatique des protéines de colza et centrifugation ;
- **surnageant** (fraction 2) : partie soluble obtenue après précipitation à pH 4 de l'hydrolysats ;

- **précipité** (fraction 3) : culot obtenu après précipitation à pH 4 de l'hydrolysate ;
- **rétenant** (fraction 4) : obtenu après ultrafiltration avec une membrane de 1kDa, correspondant à la partie n'ayant pas traversé la membrane ;
- **perméat** (fraction 5) : obtenu après ultrafiltration avec une membrane de 1kDa, correspondant à la partie ayant traversé la membrane.

Le choix de ces cinq fractions particulières a été réalisé sur la base de leurs principales caractéristiques (pureté peptidique, répartition de taille peptidique, quantité de composés phénoliques et composition en acides aminés libres et totaux), dans le but de rechercher d'éventuelles relations entre une ou des potentielles propriétés "biologiques" sur les cellules en culture et une ou plusieurs particularités de ces fractions.

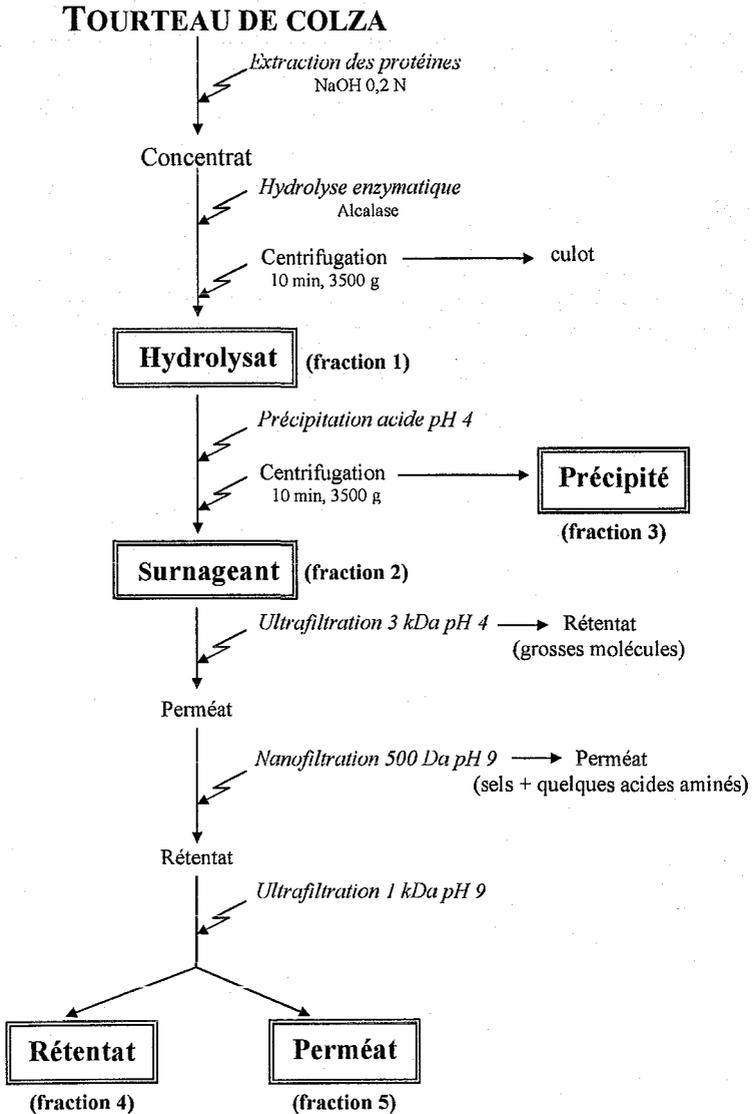


Figure III.1 : Schéma du procédé d'obtention des fractions utilisées (encadrées) en tant que suppléments de milieux de culture pour cellules animales.

II. Caractérisation des fractions utilisées

Les cinq fractions ont été caractérisées selon plusieurs critères :

- leur pourcentage en matière azotée (MA) par apport à la matière sèche totale (M) ;
- leur distribution de taille des peptides ;
- leur teneur en acides aminés libres ainsi que leur composition en acides aminés totaux (acides aminés constituant les peptides + acides aminés libres) ;
- leur teneur en polyphénols.

Le pourcentage en matière azotée par rapport à la matière sèche totale a été déterminé par la méthode de Kjeldahl. L'analyse de la distribution en taille moléculaire de leurs peptides a été réalisée par chromatographie haute pression d'exclusion de taille avec une détection des peptides à 214 nm. Le taux d'acides aminés libres, ainsi que la composition en acides aminés des peptides après leur hydrolyse acide complète, ont été déterminés par chromatographie liquide en phase inverse après dérivation en présence de d'o-phthalaldéhyde et de 9-fluorénylméthyl chloroformate. Enfin, la quantité de composés phénoliques présents a été estimée par chromatographie liquide haute pression en équivalent acide sinapique, acide phénolique majoritairement présent (entre 70 et 90%) dans le tourteau de colza (Naczek *et al.*, 1992).

Toutes les valeurs de ces différents paramètres sont indiquées dans les tableaux III.1 et III.2.

	Matière azotée (% matière sèche)	Taille en Da (% matière azotée)				Acides aminés libres < 110	Composés phénoliques (% matière sèche)
		> 5000	5000-1000	1000-500	500-110		
Hydrolysats (1)	76	6	27	17	46	4	1
Surmagement (2)	80	5	26	17	48	4	0,9
Précipité (3)	50	16	31	13	36	4	1,7
Rétentat (4)	90	0	20	23	54	3	0,9
Perméat (5)	85	0	5	14	72	9	0,6

Tableau III.1 : Contenu des fractions utilisées, en matière azotée, en composés phénoliques et distribution de taille de la matière azotée.

Acides aminés	Ala	Arg	Asx	Cys	Glx	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
	% molaire																
Hydrolysats (1)	6	8	9	0	16	9	3	5	8	4	2	4	5	6	6	2	6
Surmagement (2)	5	8	11	0	15	9	3	4	7	5	2	3	6	4	4	2	7
Précipité (3)	6	8	9	0	11	10	1	6	10	4	2	4	7	5	5	2	8
Rétentat (4)	4	7	12	0	17	9	3	4	7	4	1	3	5	7	7	3	7
Perméat (5)	6	10	7	0	14	10	3	4	8	6	2	4	5	5	5	3	7
	Acides aminés acides																29%
	Acides aminés neutres																14%
	Acides aminés basiques																57%

Tableau III.2 : Composition en acides aminés totaux des cinq fractions utilisées.

II.1. Caractéristiques propres à chaque fraction

II.1.1. Hydrolysats, fraction 1

La fraction 1, ou hydrolysats, a été obtenue par hydrolyse enzymatique d'un concentrat protéique de colza. Elle est définie par un contenu en matière azotée similaire à ce dernier (75%), constituée de peptides de différentes tailles, avec cependant une majorité (67%) de petits peptides (< 1000 Da). La composition en acides aminés totaux est relativement bien équilibrée. Seul le mélange glutamine/glutamate présente une valeur légèrement supérieure aux autres. Le taux d'acides aminés libres de cette matière azotée est faible (4%). D'après Schweizer (2002), l'hydrolysats contient également 8% de fibres et 4% de lipides. Cette fraction contient en outre des composés phénoliques à raison de 1% de la matière sèche totale. Une grande quantité de ces composés (91%) est liée à des peptides à l'origine de la couleur brunâtre de cette fraction (figure III.2) (Tessier, 2004).

II.1.2. Surnageant, fraction 2

La fraction 2, ou surnageant, est la résultante de l'abaissement du pH de l'hydrolysats de 9 à 4 qui induit l'apparition de composés insolubles. Ces derniers sont alors séparés de la fraction soluble, ou surnageant, par centrifugation. Le surnageant est défini par un contenu en matière azotée de 80% comprenant 69% de peptides de taille inférieure à 1000 Da. Son taux d'acides aminés libres ainsi que son contenu en polyphénols sont similaires à ceux de l'hydrolysats. Cependant, les composés phénoliques retrouvés dans cette fraction ne sont plus, pour la majorité, liés aux peptides comme cela était le cas pour l'hydrolysats, mais sont sous forme libres, d'où une couleur plutôt jaunâtre de cette fraction (figure III.2) (Tessier, 2004).

II.1.3. Précipité, fraction 3

La fraction 3, ou précipité, résulte également de l'abaissement du pH de l'hydrolysats de 9 à 4 qui induit l'apparition de composés insolubles constituant le précipité. Cette diminution du pH entraîne également une diminution des interactions ioniques et par conséquent une augmentation du taux d'acides phénoliques libres, retrouvés dans la partie "surnageant". Le précipité est séparé de la fraction soluble par centrifugation. Il est défini par un contenu en matière azotée assez faible (50%). De plus, cette fraction, à la différence des autres, contient

un pourcentage élevé de plus gros peptides ; 47% de peptides ayant une taille supérieure à 1000 Da. Cependant, son taux d'acides aminés libres est le même que pour les deux fractions précédentes. Enfin, on remarquera la teneur élevée (1,7%) en composés phénoliques (principalement liés) du précipité qui est environ deux fois supérieure à celle des autres fractions. Elle est en grande partie à l'origine de la couleur brun foncé caractéristique du précipité (figure III.2).

II.1.4. Rétentat, fraction 4

La fraction 4, ou rétentat, est obtenue après l'ultrafiltration (3 kDa) de la fraction surnageant, suivie par une nanofiltration (500 Da) et par une seconde ultrafiltration (1 kDa). Le rétentat correspond à la partie retenue par la membrane de 1 kDa. Cette fraction est celle qui possède le contenu en matière azotée le plus important (90%), renfermant de plus une forte proportion (80%) de petits peptides c'est-à-dire de taille inférieure à 1000 Da. Du fait de cette forte teneur en matière peptidique, il peut être qualifié d'isolat peptidique. Son taux d'acides aminés libres est faible (3%). De plus, pour des raisons d'interactions électrostatiques entre la membrane et les peptides, le rétentat est enrichi en peptides acides. En effet, la membrane utilisée est porteuse de charges négatives et cela d'autant plus que la filtration est réalisée à pH basique (9). Ainsi, les peptides acides (chargés négativement) sont peu transmis dans le perméat et sont alors retrouvés dans le rétentat, les neutres sont distribués de façon homogène et les basiques (chargés positivement) sont prédominants dans le perméat. Cette fraction contient également des composés phénoliques à raison de 0,9% de la matière sèche totale responsables de la couleur jaune foncée du rétentat (figure III.2).

II.1.5. Perméat, fraction 5

La fraction 5, ou perméat, est obtenue à la suite des mêmes étapes que celles utilisées pour l'obtention du rétentat. Cependant, le perméat correspond à la partie non retenue par la membrane. Cette fraction est caractérisée par un contenu en matière azotée élevé de 85%, elle-même très majoritairement constituée par de très petits peptides (81% inférieurs à 500 Da soit des di-, tri- ou tétra-peptides et des acides aminés libres). Le taux d'acides aminés libres (9%) de cette fraction est supérieur à celui retrouvé dans les quatre autres du fait d'une transmission stérique élevée de ces petites molécules à travers la membrane de 1 kDa. A l'inverse du rétentat, le perméat est, enrichi en peptides basiques. Cette fraction contient peu de composés phénoliques liés aux peptides, expliquant ainsi sa faible coloration (figure III.2).

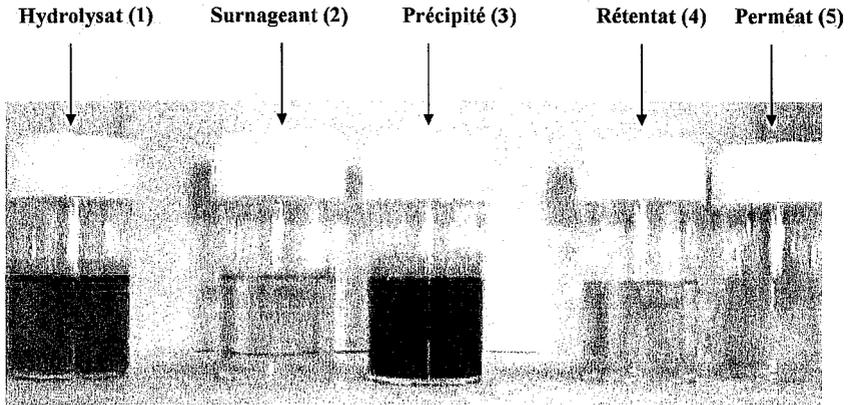


Figure III.2 : Coloration des différentes fractions peptidiques de colza à 2 g/L.

II.2. Comparaison des fractions de colza avec des hydrolysats commerciaux

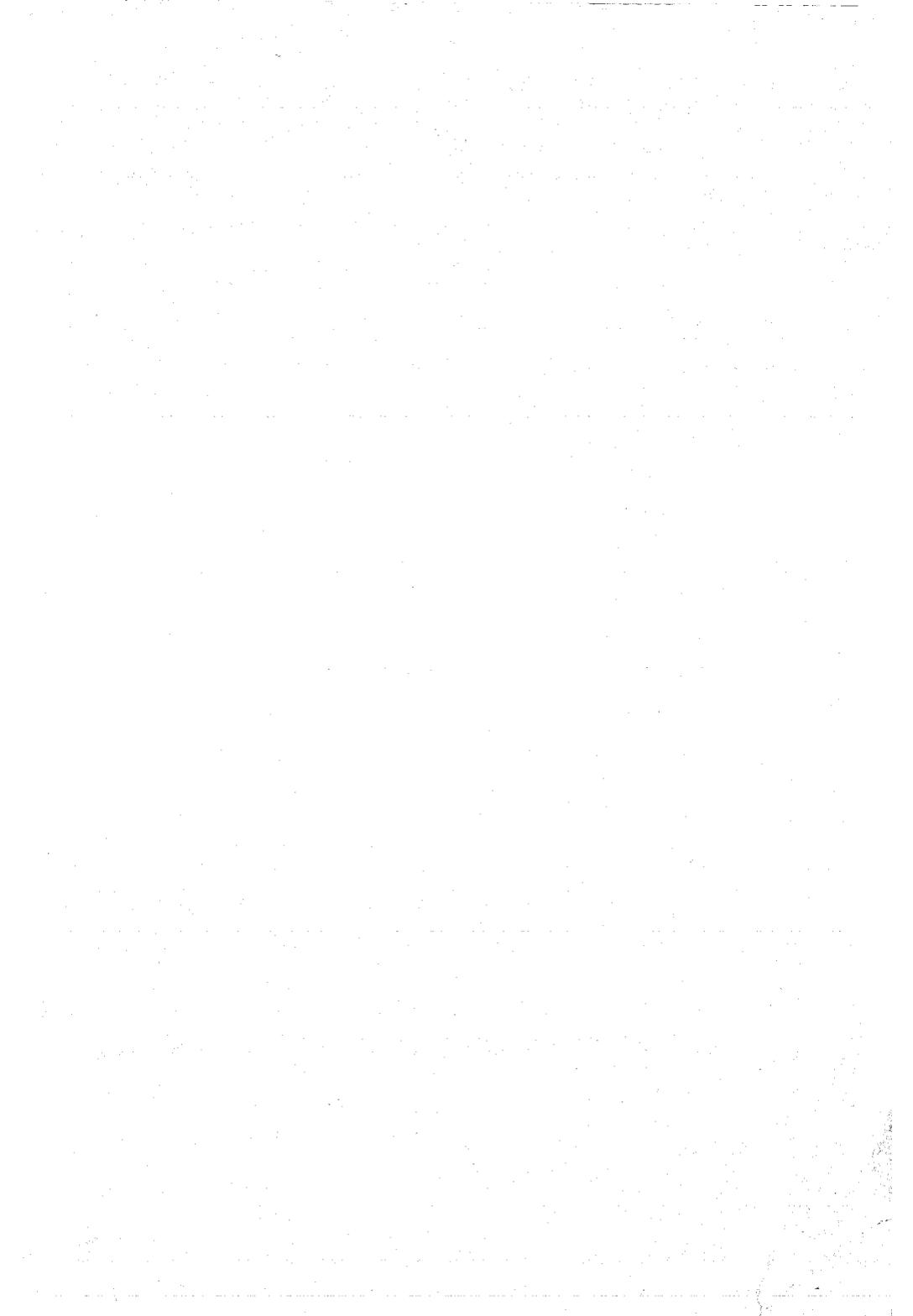
Les caractéristiques principales de chaque fraction de colza et leur comparaison avec celles de cinq hydrolysats commerciaux QUEST sont résumées dans le tableau III.3. Ces données sont les seules dont nous disposons. Les hydrolysats commerciaux sont des hydrolysats végétaux obtenus après hydrolyse enzymatique. Ainsi, l'hydrolysats de soja, HP 1510, qui contient une quantité élevée d'acides aminés libres, est préconisé en tant que source d'acides aminés et de glutamine. L'hydrolysats de blé, HP 4601, contient un niveau relativement élevé de di- et tri-peptides et d'oligopeptides plus grands. Son utilisation est conseillée en tant que substitut du sérum. Le second hydrolysats de blé, HP 4605 Dev, contient peu d'acides aminés libres mais est, par contre, constitué de nombreux peptides de poids moléculaire élevé. Il est, comme l'hydrolysats précédent, recommandé comme remplaçant du sérum. L'hydrolysats de riz, HP 5603 Dev, est également préconisé comme substitut au sérum. Enfin, l'hydrolysats de pois, HP 7401 Dev, contient moins de 1% d'acides aminés libres et est également conseillé en tant que substituant du sérum.

		Teneur en matière azotée	Teneur en petits peptides		Taux d'acides aminés libres	Couleur (teneur en polyphénols)
			/MA	/MS	/MA	
COLZA	Hydrolysats (fraction 1)	++	++	+	+	+++
	Surnageant (fraction 2)	++	++	+	+	++
	Précipité (fraction 3)	+	+	-	+	++++
	Rétentat (fraction 4)	++++	+++	++	+	++
	Perméat (fraction 5)	+++	++++	+++	++	+
QUEST	BLE HP 4601	+++	++++	++	+	+
	HP 4605 Dev	++	++++	+	+	+
	POIS HP 7401 Dev	ND	++++	ND	-	+
	RIZ HP 5603 Dev	++	++++	+	+	+
	SOJA HP 1510	+	++++	+	++	+

Tableau III.3 : Principales caractéristiques des fractions utilisées dans la suite de ce travail (le nombre de + correspond à l'intensité de la particularité).

CHAPITRE IV

**INTERET DE L'UTILISATION DE
FRACTIONS PEPTIDIQUES DE COLZA
DANS LE MILIEU DE CULTURE
DE CELLULES CHO**



CHAPITRE IV : INTERET DE L'UTILISATION DE FRACTIONS PEPTIDIQUES DE COLZA DANS LE MILIEU DE CULTURE DE CELLULES CHO

Les procédés de culture de cellules animales nécessitent l'utilisation de compléments du milieu sous forme de sérum animal ou de protéines animales, susceptibles de contaminer le produit par des agents infectieux. Ainsi, le défi actuel est de développer de nouveaux milieux exempts de toute protéine animale, mais permettant de conserver ou même d'améliorer les performances des procédés. L'utilisation de peptides issus de l'hydrolyse de protéines d'origine végétale constitue une alternative intéressante. En effet, cette supplémentation permet, non seulement, de minimiser les risques de contamination par des agents pathogènes potentiellement présents dans les molécules d'origine animale, mais aussi, semble favoriser la croissance cellulaire. C'est dans ce contexte que se positionne le projet de publication suivant. Cette étude va nous permettre d'étudier l'utilisation d'une source protéique végétale originale, le colza et plus particulièrement le tourteau de colza. En effet, ce dernier, sous-produit de l'industrie huilière, habituellement utilisé pour l'alimentation animale, reste encore peu valorisé. Or, il est disponible en grande quantité, à moindre coût et possède une composition en acides aminés équilibrée qui devrait faciliter son assimilation par les cellules animales. De plus, suite à des travaux préliminaires, le procédé d'extraction et d'hydrolyse enzymatique des protéines, mais également, le fractionnement de l'hydrolysate en plusieurs fractions peptidiques sont maîtrisés (Schweizer, 2002 ; Tessier *et al.*, 2004). Des premiers essais de cultures de cellules d'insectes supplémentées avec un hydrolysate de protéines de colza ont montré un net effet promoteur de la croissance cellulaire (Deparis *et al.*, 2003). A partir de ces acquis, les travaux présentés ci-dessous, sous forme de publication, portent sur l'étude détaillée de l'effet de diverses fractions peptidiques issues d'un hydrolysate de colza, sur des procédés de culture de cellules CHO et sur leur possible capacité à permettre la formulation d'un milieu complètement exempt de protéines animales.

CHAPITRE IV : INTERET DE L'UTILISATION DE FRACTIONS PEPTIDIQUES DE COLZA DANS LE MILIEU DE CULTURE DE CELLULES CHO

I. Controlled peptidic fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in cell culture media	107
II. Influence du sous-fractionnement de la fraction peptidique d'intérêt	127
II.1. Sous-fractionnement par chromatographie d'exclusion de taille.....	127
II.2. Sous-fractionnement par chromatographie d'échange de cations.....	130
III. Conclusion.....	132

I. Controlled peptidic fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in cell culture media

B. Farges-Haddani¹, B. Tessier¹, S. Chenu², C. Harscoat¹, I. Marc¹, J. L. Goergen¹, A. Marc¹

1- Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, UPR CNRS 6811, ENSAIA-INPL, 2 avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-Jès-Nancy Cedex, France

2- Centre d'Immunologie Pierre Fabre, 5, avenue Napoléon III, BP 497, 74164 St-Julien-en-Genevois Cedex, France

Introduction

The formulation of optimal culture media for animal cell cultures has received a lot of interest for many years as a result of its critical impact on the development of bioprocesses based on animal cell technology (Kovar and Franek, 1986 ; Castro *et al.*, 1992 ; Keen and Rapson, 1995 ; Lao and Shalla, 1996). Animal serum, mainly fetal bovine serum, is still often used as a supplement to cell culture media, while it provides a broad spectrum of macromolecules, carrier proteins for lipid substances and trace elements, attachment and spreading factors, low molecular weight nutrients, and hormones and growth factors (Jayme and Smith, 2000). Despite the interest of this biological source, its use presents many disadvantages such as a high protein level, leading to the necessity of eliminating them during downstream processing, the risk of microbial contaminants, like fungi, bacteria, viruses or BSE-agent, a variable quality and high costs. Among these drawbacks, the possible introduction of adventitious agents is the most problematic issue, leading to the extended use of serum-free media (Froud, 1999). Moreover, regulatory authorities in Europe and the United States have strongly encouraged biological companies to eliminate the use of animal-derived substances in their manufacturing processes (Asher, 1999 ; Castle and Robertson, 1999). However, total serum-replacement is still a challenge given the number of functions it assumes in a culture medium (Perrin *et al.*, 1995; Kallel *et al.*, 2002). Thus, an alternative to serum supplemented medium can be a serum-free medium supplemented with protein digests from various raw materials (Jayme and Smith, 2000).

Various acidic or enzymatic protein hydrolysates are proposed to replace fetal bovine serum in mammalian and insect cell cultures. There are produced either from animal tissues (Primateone RL, tryptose broth,...), from milk (lactalbumin, casein,...) or from

microorganisms (yeast hydrolysate, bacto-peptone,...) (Nyberg *et al.*, 1999 ; Jan *et al.*, 1994 ; Schlaeger, 1996 ; Amiot *et al.*, 2004 ; Sung *et al.*, 2004). Their compositions are often complex mixtures of oligopeptides, amino acids, iron salts, lipids and other trace low molecular weight substances and allow to support cell growth and production. For example, Jan *et al.* (1994) showed that the supplementation of a defined medium with meat peptone resulted in significant increases in cell number and specific monoclonal antibody production. Schlaeger (1996) confirmed that the tryptic meat digest Primatone RL, in addition to animal cell culture media, significantly improved the cell growth properties of many cell lines and prolonged their viability. Recently, Sung *et al.* (2004) showed the interest of yeast hydrolysate as a medium additive for human thrombopoietin production in serum-free suspension cultures of CHO cells. It has also been suggested that milk protein hydrolysates may be a source of bioactive small peptides, with specific biological properties that include immunomodulatory, antimicrobial, antithrombotic and antihypertensive effects (Clare and Swaisgood, 2000 ; Smacchi and Gobetti, 2000).

Although the development of these hydrolysates is a step further in the right direction this is not sufficient because the risk of introducing adventitious agents is still present. Therefore, the choice of the raw material source is influenced by the present trend of avoiding ill-defined animal-derived materials in biopharmaceutical processes. This trend provokes heightened interest in plant proteins and more particularly in vegetable enzymatic hydrolysates (Keen et Rapson, 1995 ; Amatsuji *et al.*, 1998 ; Blom *et al.*, 1998 ; Donaldson et Shuler, 1998 ; Price *et al.*, 1999 ; Franek *et al.*, 2000 ; Heidemann *et al.*, 2000 ; Reiter *et al.*, 2001). For example, Amatsuji *et al.* (1998) supplemented a basal media with different vegetable hydrolysates for batch and fed-batch cultures, Price *et al.* (1998) indicated that rice hydrolysates are able to support the growth of insect cells, and Heidemann *et al.* (2000) found that soy peptones confer a nutritional benefit for a recombinant BHK cell line. Burtreau *et al.* (2003) identified some wheat peptones showing a double positive effect on CHO cell growth and recombinant IFN- γ production in protein-free suspension cultures. In the same way, Ballez *et al.* (2004) described the use of rice and wheat protein hydrolysates as non nutritional additives to the culture medium to support productivity and CHO cell growth in suspension or on microcarriers.

However, plant hydrolysates stand in an extremely complex mixture together with amino acids, oligopeptides and numerous other substances such as phenolic compounds and fibers. Secondly, biologically active peptides often present particular physicochemical characteristics essential to their activity (Recio and Visser, 1999). As a consequence, the development of vegetable peptides may require additional purification and fractionation processes. The fractionation of peptide mixtures by chromatographic methods is very efficient to obtain small peptide fractions which can differ by their charge, size or hydrophobic properties (Desportes *et al.*, 2000). In this way, a more precise approach was proposed by Franek *et al.* (2000) who generated soy and wheat peptide fractions with a reduced content of non-peptidic components by chromatographic fractionation of the enzymatic digests. Their different peptide fractions did not equally support mouse hybridoma growth, demonstrating that the plant peptides may exert specific effects on cultured cells in addition to the nutritional one. Franek (2004) also indicated that the common feature of the activity of selected synthetic peptides is the suppression of the apoptosis.

Rapeseed proteins represent another source of plant peptides which could be used for animal cell culture. Indeed, the rape culture is widely developed for oil production (FAO, 2002). The oil extraction leads to defatted rapeseed cake with 30-45% of protein content. This low-cost raw material could represent an interesting alternative for the production of plant protein hydrolysates. Such rapeseed hydrolysates have been already proposed for the fortification of animal foods (Dev and Mukherjee, 1986 ; Zhou *et al.*, 1990). Their advantages with respect to functional and nutritional properties have been also demonstrated (Vioque *et al.*, 2000). Moreover, the well-balanced amino acid composition of rapeseed proteins compared to other oilseed crops like soybean makes them especially interesting to be tested in animal cell culture (Godon, 1996). But until now, only few studies have concerned the production of enzymatic hydrolysates from this vegetable by-product to increase its field of application (Vioque *et al.*, 1999).

More recently, the extraction of rapeseed proteins followed by their well-controlled enzymatic hydrolysis and the peptide fractionation have been studied. Schweizer (2002) realised the hydrolysis of a rapeseed meal by various enzymes and Deparis *et al.* (2003) showed the ability of the resulted rapeseed protein hydrolysate to enhance SF9 cell growth in serum-free medium. Furthermore, Tessier *et al.* (2004) proposed a fractionation process of the hydrolysate peptides based on ultrafiltration and nanofiltration membranes. They also

described a new method for peptide identification in peptide mixtures. While the fractionation of small peptides is classically achieved by chromatographic methods, its scale-up issue generates some high costs because of the use of organic solvents and also because of the low productivity of this technique. So, the membrane fractionation processes could be more advisable due to less expensive equipments, no denaturing conditions and an easier scale-up.

In the present study, the supplementation by new rapeseed peptidic fractions of a simple serum-free medium has been assessed for its growth promoting activity on CHO cells and compared with the addition effect of soy, wheat and rice hydrolysates. Furthermore, an animal protein-free medium adapted to long-term cultivation of CHO cells in stirred systems has also been proposed.

Material and Methods

Cell line and cell culture

CHO C5 cell line is a resultant clone of a transfection of the cDNA coding for the rat alpha2,6-sialyltransferase into the CHO 320 cell line by using an *in vitro* amplification expression method (Monaco *et al.*, 1994). This clone has been adapted to grow in suspension in serum-containing medium and subsequently in serum-free medium (Monaco *et al.*, 1996). Cells were seeded at $0.8 \cdot 10^5$ cells/mL in triplicate 96 well-plates (200 μ L working volume), or at $2 \cdot 10^5$ cells/mL in 500 mL spinner flasks (160 mL working volume) in an incubator at 37°C and 5% CO₂.

Culture media

Cultures were performed with a medium based on RPMI 1640 (Sigma) enriched in glutamine, glucose and trace elements, such as pyruvic acid, L-alanine, putrescine, and inorganic ions (Lamotte *et al.*, 1997). Various components were then added, depending on the culture conditions : TIB mixture (5 mg/L transferrin (Sigma), 5mg/L Insulin (Sigma), 5g/L bovine serum albumin (Euromedex)), plant protein hydrolysates (2g/L) from soy-HP1510, pea-HP7401 and wheat-HP4605dev (QUEST Int.) and five home-made rapeseed peptidic fractions. Medium supplemented with TIB mixture will be called reference medium. A rapeseed protein concentrate was first prepared as reported previously (Deparis *et al.*, 2003). The enzymatic protein hydrolysate was then obtained from protein concentrate as described by Tessier *et al.* (2004). It was further fractionated by successive steps according to the process described by Tessier (2004). Briefly, the fraction 1 corresponded to the non-fractionated hydrolysate. Fractions 2 and 3 were respectively the supernatant and the precipitate following a precipitation at pH 4 and a centrifugation (10 min, 3500 g). Fractions 4 and 5 were respectively the retentate and the permeate obtained after successive steps of ultrafiltration (3 kDa, pH 4 and 1 kDa, pH 9) and nanofiltration (500 Da, pH 9).

Cell counting

Total cell concentration in well-plates were counted without sampling or staining by direct image analysis with the Cellscreen analyser (Innovatis). Viable and dead cell densities in spinner flasks were determined in samples using a hemacytometer and Trypan Blue dye exclusion method.

Analysis of rapeseed peptidic fractions

The Kjeldhal method was employed for the total nitrogen content calculation with a conversion factor of 6.25 for peptide mass determination. The phenolic compounds were directly measured in peptide solutions without any treatment and were expressed from a calibration curve made with sinapic acid (224 g/mol). Size-exclusion chromatography analyses were carried out with a Superdex Peptide HR 10/30 column (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and a solvent mixture of ACN/H₂O/TFA (40/60/0.1 - v/v/v). Wavelengths of detection were 214 nm for peptide determination and 310 nm for phenolic compounds determination. The molar mass distribution was determined using a calibration with papain (23000 g/mol), insulin (5750 g/mol), Lys-Tyr-Lys (437 g/mol), Leu-Leu-Leu (357 g/mol), Ala-Met (220 g/mol), Pro-Ala (186 g/mol), L-Arg (174 g/mol) and L-His (155 g/mol) as molar mass standards. All standards were purchased from Sigma. After derivatization according to Godel *et al.* (1992), the amino acids were analyzed by high-performance liquid chromatography (HP 1090 Liquid Chromatograph system, column Hypersil 5 μ C18 (Interchim, France)) using solvent A (20 mM sodium acetate containing 0.024 % triethylamine and 0.5 % tétrahydrofurane, pH 7.2) and solvent B (acetonitrile/methanol/100 mM sodium acetate (40/40/20– v/v/v), pH 7.2). The amino acid concentrations were calculated from a calibration curve made with an amino acids kit (Sigma).

Results and discussion

1. Membrane fractionation leads to various formulations of peptidic rapeseed fractions

The five rapeseed fractions generated by enzymatic hydrolysis and membrane fractionation processes have been characterized by their content in nitrogen matter, phenolic compounds, free amino-acids and for the peptide size distribution (table 1 and figure 1). The total nitrogen content in the fractions is between 76 and 90% excepted for the fraction 3 which contains only 50% of nitrogen matter. This fraction was also characterized by the highest content in large peptides (47% > 1000 Da) and by a two times higher level of phenolic compounds than the other fractions. The fractions 4 and 5 present the higher purity in nitrogen matter, but the fraction 4 leads to a balanced mixture of small and big peptides. On the contrary the fraction 5 contains the most important quantity of smaller peptides (95% < 1000 Da and 81% < 500 Da) and free amino acids, and very few phenolic compounds. Due to the negative charge of the fractionation membrane, the fraction 5 is enriched in basic peptides while the fraction 4 mainly contains acidic peptides.

The main characteristics of our rapeseed fractions 1 and 4 have been compared to soy, wheat and pea proteic hydrolysates in table 2 and figure 2. The rapeseed hydrolysate which corresponds to fraction 1 contains a higher quantity of peptidic matter than the other hydrolysates, but with a lower proportion of small peptides (< 1000 Da) leading to a balanced peptide mixture. Beside, commercial hydrolysates contain a very little quantity of peptides larger than 1000 Da. Moreover, the quantity of free amino acids changes a lot as a function of the vegetable origin of the hydrolysates. Indeed, soy hydrolysate presents a high percentage of free amino acids whereas rapeseed fractions a lower percentage and wheat and pea hydrolysates a quantity near zero.

Based on these results, it is clear than the composition of the different plant protein hydrolysates depends on the raw matter, on the enzymatic hydrolysis process conditions and on the steps of the fractionation process. Not only the nitrogen matter content, but also, the free amino-acids level, the peptide size and charge distribution or the phenolic compounds percentage lead to very different values. As all these parameters could affect the ability of the hydrolysates to support the cell growth, it is then interesting to generate and compare the effects of fractions with different characteristics. Indeed, free amino acids and small peptides are expected to mainly play a nutritional role, especially when supplemented to a simple basic medium, while the size and nature of peptides could impact as growth or survival factors.

fraction	total nitrogen (% w/w total matter)	size peptide (Da) distribution in fractions (% w/w total nitrogen)				free amino acids (% w/w nitrogen)	phenolic compounds (% w/w total matter)
		> 5000	5000-1000	1000-500	< 500		
1	76	6	27	17	46	4	1
2	80	5	26	17	48	4	0,9
3	50	16	31	13	36	4	1,7
4	90	0	20	23	54	3	0,9
5	85	0	5	14	72	9	0,6

Table 1 : Percentages of total nitrogen matter, phenolic compounds (in w/w of total matter), free amino-acids and size peptide distribution (in w/w of nitrogen matter) in peptidic fractions obtained after enzymatic hydrolysis and membrane fractionation of rapeseed cattle-cake proteins.

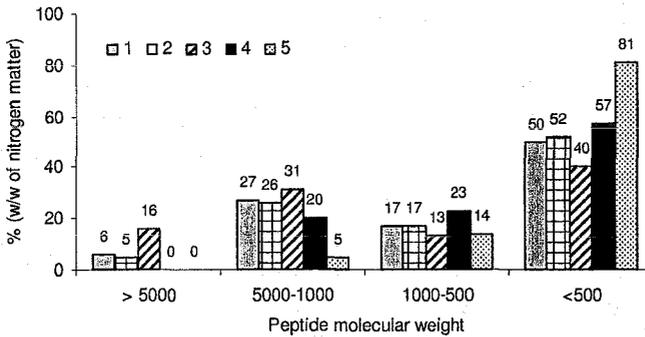


Figure 1 : Size distribution of peptides in five rapeseed fractions obtained after membrane fractionation of an enzymatic hydrolysate of rapeseed proteins.

		total nitrogen content (% w/w of total matter)	free amino acids (% w/w of nitrogen content)
rapeseed fractions	4	90	3
	1	76	4
	soy	51	13
other hydrolysates	wheat	70	1.9
	pea	n.d.	0.7

Table 2 : Percentages of total nitrogen matter (w/w of total matter) and free amino-acids (w/w of nitrogen matter) in two rapeseed peptidic fractions and three commercial protein hydrolysates.

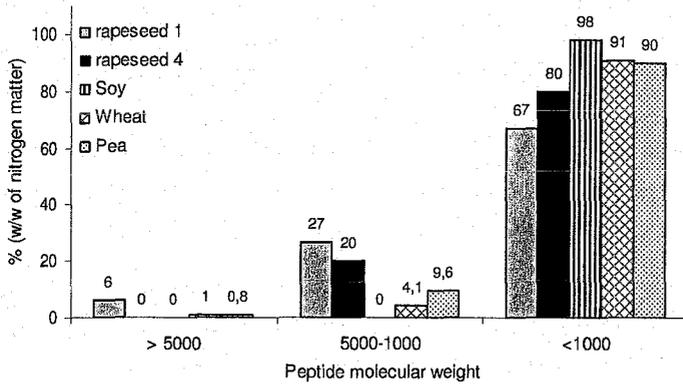


Figure 2 : Comparison of the size distribution of peptides in two rapeseed peptidic fractions and in soy, wheat and pea protein hydrolysates.

2. The cell growth stimulating effect depends on the peptidic fraction composition

To determine the effect of the addition of different rapeseed fractions to our very simple serum-free medium on CHO cell growth, the cells were cultivated in 96 well plates containing 200 μ L reference medium supplemented or not with 4 g/L of the different rapeseed fractions (figure 3). Individual rapeseed peptidic fractions varied significantly in their growth promoting effects. While the addition of the fraction 4 stimulated the cell growth rate, reaching a final cell density of 6×10^5 cells/mL, the fraction 5 did not improve the CHO-C5 cell growth with even a lower maximal cell density (3.7×10^5 cells/mL) in comparison with the reference medium (4.2×10^5 cells/mL). The fractions 1 and 2 did not show any positive or negative effect on this cell line, but the fraction 3 provoked a dramatic inhibition of the cell growth, since the reached cell density (0.7×10^5 cells/mL) was similar to the seeded one.

These results corroborate the notion that plant peptides may have opposite effects on animal cells in culture, depending on the various processes available to obtain them. Some characteristics of the peptide mixtures such as the mass molar distribution, the nitrogen matter purity or the presence of non-peptidic molecules could be hypothesized to explain our results. Franek's team also reported that individual peptide fractions of hydrolysates, from soy protein and wheat gluten, varied significantly in their growth promoting activities when tested on a mouse hybridoma culture in protein-free medium (Franek *et al.*, 2000 ; Franek and Katinger, 2002).

The cytotoxic effect of the fraction 3 could be attributed to its low purity with a 50% (w/w) of nitrogen matter and consequently to the presence of other molecules which are not well controlled such as lipids or polyphenols. Nevertheless, the addition in the reference medium of sinapic acid which is the most important component of phenolic compounds did not inhibit the cell growth (data not shown). Furthermore, this fraction was very poor in small peptides which correspond to less than 20% of the total matter. In this case, the nutritional potential corresponding to the small peptides, which can be easily hydrolysed in free amino acids by the cells, is dramatically decreased. The fractions 1 and 2 contain less nitrogen content than fractions 4 and 5 and have not been processed through membrane fractionation. Their peptide distribution indicates the presence of larger molecules with molecular weight superior to 5000Da. In these cases, the stimulating effect on CHO-C5 cell growth remains very small but the purity level is observed to be sufficient to avoid any cytotoxicity effect.

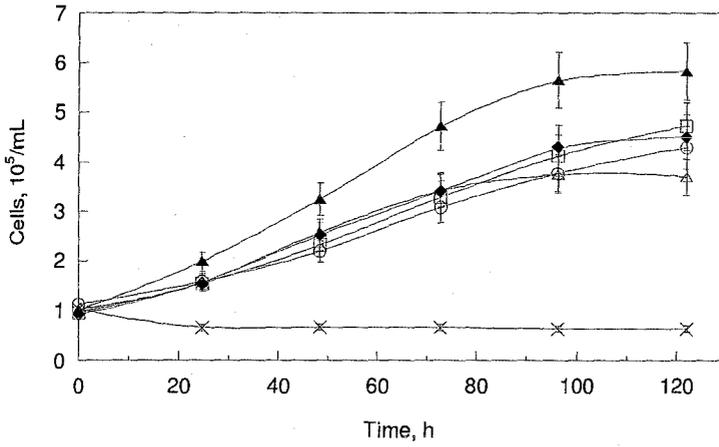


Figure 3 : Evolution with time of viable CHO cell concentration after 120 hours of culture, in 96 well plates, performed in reference medium (O) and in reference medium supplemented with the five rapeseed peptidic fractions presented in table 1 : fraction 1 (□), fraction 2 (◆), fraction 3 (X), fraction 4 (▲) and fraction 5 (△).

The fractions 4 and 5 which result from the same steps of the membrane process, mainly differ by the higher content of peptides smaller than 500 Da and of free amino-acids as well as by the absence of large peptides in fraction 5. Their purity in nitrogen content is high and fraction 5 contains the lower quantity of phenolic compounds. However, this last fraction led to the worst results of both fractions, suggesting that the nutritional contribution of the peptides composed of less than five amino-acids, which could be used through peptide transporters, is not the single parameter which influences the growth promoting activity. A too high level of small peptides could even display a growth inhibition effect, as reported by others authors. Indeed, Franek *et al.* (2000) found a weaker hybridoma growth in presence of small peptides of wheat and soy, while Maranga *et al.* (2003) showed that Sf-9 cultures supplemented with lower molecular weight peptidic compounds of hemolymph displayed some growth inhibition activity. Moreover, the limited effect of the fraction 5 on the cell growth may as well be caused by the fact that peptides with a high molecular weight are missing in this fraction whereas there is only 5% of peptides with a molecular weight between 1000 and 5000 Da and only 19% superior to 500 Da. In this case, the possible role of growth or survival factors displayed by larger peptides can not interfere. Another explanation could be the fact that this fraction is enriched in basic peptides due to the filtration membrane charge, since Franek and Kättinger (2002) showed that basic peptides decrease hybridoma growth.

On the contrary, the fraction 4 which significantly stimulates the cell growth contains the best distribution of peptides smaller than 5000 Da, with less small peptides under 500 Da than in fraction 5 and about 43% peptides larger than 500 Da. Thus, the positive effect of the fraction 4 on the cells is likely to come from the fact that this fraction contains at the same time small and large peptides. Several studies confirm this potential cumulative effect of nutritional role of small peptides and of growth factor role of larger peptides. On the one hand, Grimble *et al.* (1987) found that intestinal cells more easily used di- or tri-peptides than larger peptides and Minamoto *et al.* (1991) reported that cultured animal cells metabolised dipeptides like glycyl-L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine. Moreover, Franek and Kättinger (2002) showed a great impact on hybridoma growth of tri-, tetra- and penta- synthetic peptides than larger peptides. On the other hand, Amiot *et al.* (2004) observed that peptides from milk protein hydrolysate with a molecular weight of about 800 Da could have a growth promoting effect for keratinocytes. They also hypothesized that some very small peptides can lead to a

biological activity while larger peptides with a molecular weight higher than 4000 Da present a growth factor activity. Thus, a mix of big and small peptides seems to be necessary for an optimal cell growth. In the same viewpoint, Burteau *et al.* (2003) have shown that most of the beneficial effects of peptones were in relationship with their content in larger oligopeptides while culture parameters were improved in the presence of peptones having an important quantity of oligopeptides ranging from 1000 to 10 000 Da and a small proportion of peptides higher than 10 000 Da. Another hypothesis to explain the best results of this fraction 4 in comparison with the fraction 5 could be its higher content in acidic peptides. At last, our results show that non peptidic substances, such as polyphenols, have not unfavourable biological activities when they are present in a little quantity in the plant peptidic fractions.

The growth promoting capacity of rapeseed fractions 1 and 4 have been then compared to protein hydrolysates from soy, wheat and pea (table 3). The cell densities obtained after 112 h of culture in 96 well-plates are similar in the rapeseed fraction 1, which corresponds to the non fractionated hydrolysate, and in the hydrolysates from other raw materials. Between the three commercial preparations, wheat hydrolysate appears to be the best additive. On the contrary the rapeseed fraction 4 was much efficient on the cell density than all the hydrolysates. Again, the higher level of peptidic matter in this last fraction compared to the hydrolysates whatever their source can explain these results. They point out the importance of the preparation of more controled peptidic fractions with a high content of nitrogen matter and less heterogeneous composition than in the whole digest, as well as the importance of the raw material source. These results correlate those obtained by Burteau *et al.* (2003) which observed no positive effect of soy and pea hydrolysates on the maximal viable CHO density and an increase with wheat hydrolysate. However, Price *et al.* (1999) showed that soy hydrolysate supported Vero cell growth, rice hydrolysate enhanced it but wheat hydrolysates were toxic. Moreover, soy hydrolysate enhanced the growth of *Bombyx mori* insect cells in suspension culture (Kwon *et al.*, 2004). Thus, it appears that the vegetable source is an important factor in the growth promoting activity and it can be different between the cell lines used.

Thanks to these results, the fractionation of plant protein hydrolysates appears of great interest to point out some growth stimulating effects. Particularly, the proportion of peptides with different molecular weight seems to be an important parameter which has to be well

controlled. Our results suggest that a 80/20 ratio between small (< 1000 Da) and large (> 1000 Da) peptides could be a good compromise to enhance cell growth.

3. Rapeseed peptidic fraction presents antagonist effects depending on its concentration

Based on the previous results, the following experiments have only been performed by addition of the fraction 4 in the reference medium. The influence of the concentration of this fraction was subsequently evaluated on CHO cells cultivated in 96 well plates in reference medium supplemented by rapeseed peptides at concentrations between 1 and 8 g/L, and the cell densities were measured after 96 h of culture (figure 4). Regardless of the different concentrations used, the stimulating effect is observed at a value higher than 1g/L, suggesting a limiting level of the active molecules. For fraction concentrations higher than 4 g/L the total cell density is observed to decrease with the increase of the peptide concentration. In these cases, one or several components probably attained a growth inhibitory level. Also, these higher concentrations may result on higher ammonia production provided by the glutamine and the peptides metabolism. Sung *et al.* (2004) also observed that the supplementation with soy, wheat and rice hydrolysates under a concentration of 5 g/L did not increase significantly and could even decrease the viable cell concentration. This minimum concentration requirement contrasts with the range of active concentrations of most peptide hormones that may perform their physiological functions when present at levels several order of magnitude lower.

In order to better discriminate the 2 and 4 g/L concentrations, two cultures were then performed in spinner stirred flasks with suspension cells and the cell growth kinetics was followed all over the cultures (figure 5). The maximum viable cell concentration reached 5.5×10^5 cells/mL in the reference medium, 6.2×10^5 cells/mL in the reference medium supplemented with 2 g/L of rapeseed fraction 4, and 8.5×10^5 cells/mL with the supplementation with peptidic fraction at 4 g/L. Thus, the optimal effect of 4g/L concentration is confirmed with these kinetics results. Moreover, the culture supplemented with 4 g/L rapeseed fraction allowed a culture duration time more than twice longer than the reference culture with a slower decline of the viable cell density, suggesting that the peptides reduce the specific cell death rate. It is also important to notice that these kinetic results have been obtained in a stirred culture system. Thus, it could be expectable that the rapeseed fraction may be extrapolated to suspension cultures at a greater scale.

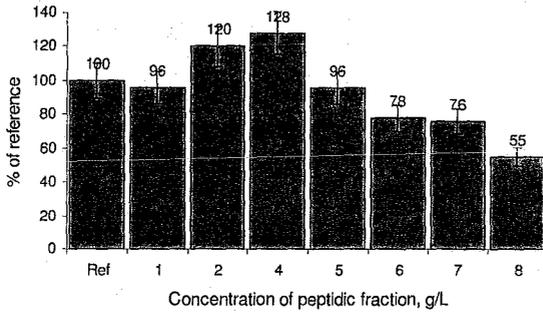


Figure 4 : Influence of the supplementation of various concentrations of rapeseed fraction 4 to reference medium, on CHO cell density after 96 hours of culture in 96 well plates ; the variation of cell density is compared to reference medium result.

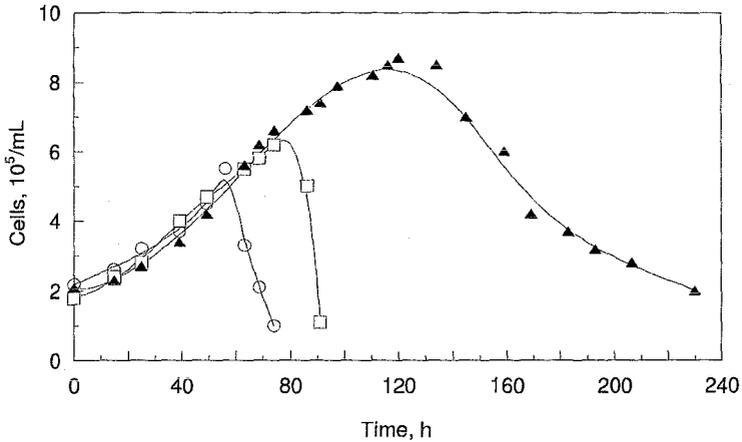


Figure 5 : Evolution with time of viable CHO cell concentration in spinner flasks cultures performed in reference medium (O) and in reference medium supplemented with 2 g/L (□) or 4 g/L (▲) of the rapeseed peptidic fraction

Then, the selected peptide mixture presents a dose-dependent influence on maximal cell density, with antagonist effects depending on the used concentration. To avoid some limiting factors or inhibitory effects, an optimal concentration of 4 g/L seems to be more advisable. Moreover, at this concentration, it induces a decrease of the cell death rate and an increase of the culture longevity, even if the cells are cultivated in suspension in a stirred system.

4. Rapeseed peptidic fraction allows complete protein removal from a very simple medium

Most of the serum-free media presently used in industrial processes or published in scientific journals contain more or less animal derived products such as meat or milk peptones, proteins like insulin, transferrin or albumin. The reason is that for many cell lines, these substances are essential for correct growth and biological production. However, the risk with adventitious agents coming from the use of animal proteins leads to the necessity of the development of safety animal protein-free media. This corresponds to the general trend in the development of animal cell processes in industry (Castle and Robertson, 1999). The serum-free medium previously used in this study still contained three animal proteins : human insulin, bovine transferrin and bovine serum albumin (TIB). Thus, aiming to assure extreme safety of the medium, we have performed some culture experiments in medium depleted from these three proteins. Cells were subcultured at least eight times in their new medium before kinetics studies were performed in shake flasks. The figure 6 compares the growth kinetics of CHO cells in four different medium formulation : reference medium (RPMI + trace elements + TIB), reference medium depleted of TIB, reference medium supplemented with rapeseed peptides and depleted or not of TIB.

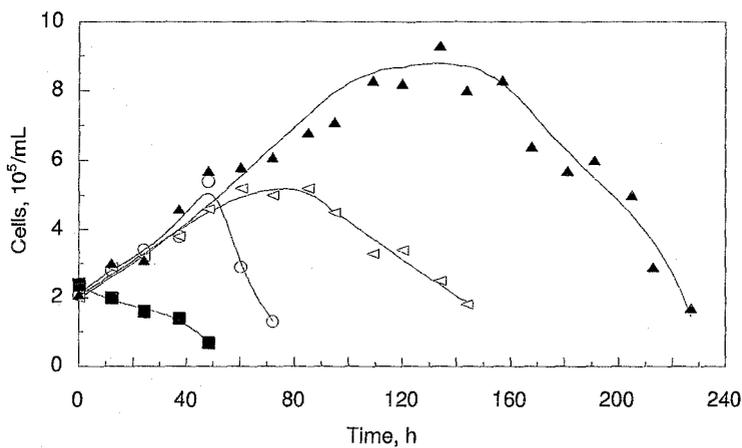


Figure 6 : Evolution with time of viable CHO cell concentration cultivated in spinner flasks cultures performed in : reference serum-free medium containing TIB proteins (O), reference medium without TIB proteins (■), reference medium enriched with 4 g/L of rapeseed fraction 4 (\triangleleft) and reference medium enriched both with rapeseed fraction 4 and TIB proteins (TIB) (\blacktriangle).

We first noticed that in the culture performed in absence of animal proteins and without rapeseed fraction, all the cells died after 50 hours. Obviously, a very simple medium containing only RPMI basal formulation and some trace elements such as pyruvic acid, L-alanine, putrescine, and iron, copper, selenium and zinc salts is not sufficient to support the growth of our CHO-C5 cell line. But, when this medium was enriched with the rapeseed peptides, the CHO cells reached the same maximal cell density as in the reference medium (5.2×10^5 cell/mL). Moreover, we noticed that the addition of rapeseed peptides was more beneficial to reduce the cell death rate than the addition of TIB proteins. So, the culture duration time was extended twice (160 h) with the protein-free medium in comparison with the protein containing reference medium (80 h). Eventually, the culture performed with the medium supplemented at the same time with TIB proteins and rapeseed peptides led to the higher maximal cell density (9×10^5 cell/mL) and culture longevity (220 h). A cumulative or synergic effect of both proteins and peptides seems to occur to allow these best performances.

Taking into account the best positive effect of rapeseed peptides than TIB proteins on the cell longevity, without compromising the cell growth rate, this formulation could be adequate for the routine maintenance of cells in incubator. Indeed, the cells can be maintained longer in the used medium before fresh medium replacement. In this case, the cell propagation in this protein-free medium needs less manipulations and reduces the contamination risks. Moreover, the cell adaptation to serum-free and protein-free medium was found to be easier and faster in presence of the rapeseed peptides with different industrial cell lines such as BHK, Vero or hybridoma cells (data not shown). Also, this medium can be used directly for the cell cryopreservation while the viability of thawed cells after 5 freezing months appeared higher at 120 hours of culture when they have been frozen in it (92%) in comparison with cells frozen in the reference serum-free medium (72%). In comparison with commercial animal protein free media, our medium could be also attractive by its very simple composition and consequently its low cost. Often, suppliers offer expensive and complex animal protein free media generally dedicated to a specific cell line. Moreover, the precise composition of these media can not be known and sometimes companies stopped producing and marketing them (van der Valk *et al.*, 2004). Therefore, it is an important benefit to have a completely define and simple medium.

Conclusion

Culture media used to cultivate the animal cells must be rich in nutrients and supplemented with key substances in order to enable their growth and production capacities. Traditionally, these media contained high protein content, typically due to the addition of mammalian serum which can represent a high risk of contamination. To suppress the animal sera as well as the animal proteins, and then reach a safer media, it is then necessary to find new medium supplements which allow the same or better cell performances when cultivated in mass culture systems.

In the present study, we have demonstrated that a peptide mixture obtained from the fractionation of an enzymatic hydrolysate of rapeseed proteins could represent a new interesting source for animal cell culture. In comparison with other available plant peptones, we pointed out the importance of a membrane fractionation process leading to several peptidic fractions with very different growth promoting effects when added to a very simple serum-free medium. While some fractions did not affect the cell behaviour, some others were found to be cytotoxic. One of them composed of a balanced mixture of large and small peptides, and not only of small peptides, appeared to significantly stimulate the cell growth rate when added at 4 g/L in comparison with a non-supplemented reference medium. On the contrary, whatever the plant origin, we did not observe any interesting effect of the non-fractionated hydrolysates on our CHO cell lines.

Moreover, the selected rapeseed peptidic fraction allowed the design of a very simple animal protein-free medium which did not compromise the cell growth and slowed down the cell death rate in comparison with the animal protein containing reference medium. This safe, very simple and defined medium could be successfully used for suspension cell cultivation in stirred batch cultures, for the rapid adaptation of various cell lines to serum-free medium, for a best cell viability recovery after freezing, and for the routine maintenance of cells inside incubator. All these advantages pointed out the possible interest of such a peptidic rapeseed fraction in industrial processes.

Further studies will be needed to better understand the growth promoting activity of rapeseed peptides. Indeed, it remains not clear which peptide fraction characteristics among the peptide composition, the peptide size or the general amino acid balance are essential to stimulate the

cell growth. So, it is necessary to perform a more precise fractionation and identification of the peptides in different fractions to accurately evaluate the peptides really implicated in these stimulating effects. Moreover, the study of the peptide transport and metabolism in continuous cell lines could help to better understand their mechanisms of action. Another important validation step of such a medium concerns its capacity to offer good recombinant protein productivities without affecting the product quality. If successful, a medium formulation with one or several synthetic peptides based on the rapeseed active peptides would be a final goal for the validation of a completely defined and simple animal-free

Principales contributions de la publication

L'étude précédente a permis de mettre en évidence l'effet "promoteur" de croissance d'une fraction peptidique issue du fractionnement par procédé membranaire d'un hydrolysate de protéines de tourteau de colza. Ainsi, il apparaît envisageable de valoriser plus favorablement la matière première que constitue le tourteau de colza, co-produit de l'industrie huilière utilisé classiquement dans l'alimentation animale. A notre connaissance, ces travaux sont les seuls à avoir envisagé l'utilisation d'hydrolysats de protéines de colza, et qui plus est, de fractions peptidiques, comme suppléments dans des milieux de culture de cellules animales. De plus, les résultats obtenus ont montré l'importance du procédé de fractionnement membranaire pour l'obtention d'une fraction ayant une composition particulière lui conférant des propriétés favorables (pureté en matière peptidique élevée et gamme de taille des peptides assez large) conduisant à l'augmentation de la concentration de cellules en culture. Enfin, grâce à la supplémentation du milieu de culture avec la fraction sélectionnée, la suppression totale des protéines animales a été possible. Un milieu de composition extrêmement simple, exempt de toute protéine animale, permettant de réduire au maximum les risques de contamination des milieux de culture et cela sans compromettre la croissance cellulaire, a ainsi été formulé.

Afin de mieux comprendre le mode d'action de cette fraction peptidique de colza en tant que promotrice de croissance, il serait maintenant intéressant d'étudier plus particulièrement le métabolisme des cellules en présence de cette fraction ainsi que le transport des peptides chez les cellules animales en culture. De plus, l'effet d'une telle supplémentation sur la production en protéines recombinantes des cellules CHO pourra être évalué.

II. Influence du sous-fractionnement de la fraction peptidique d'intérêt

L'étude des effets des différentes fractions de peptides de colza sur la croissance des cellules CHO C5 a révélé des influences variables selon la fraction employée. Ces résultats découlent très probablement de leurs compositions spécifiques en nombreux constituants. Plus précisément, on peut penser que la distribution en masse molaire des peptides mais aussi d'autres propriétés comme la charge électrique et la pureté des fractions peptidiques influencent directement leur activité.

Les cultures réalisées précédemment ont permis d'isoler une fraction peptidique d'intérêt (rétentat), permettant de stimuler la croissance et de prolonger la survie des cellules CHO C5. Cependant, les caractéristiques déterminées sur les différentes fractions ne suffisent pas à identifier les éléments responsables des effets promoteurs de croissance. Aussi, afin de mieux cerner l'origine de cet effet positif, cette fraction peptidique d'intérêt a encore été sous-fractionnée par chromatographie, soit d'exclusion de taille, soit d'échange de cations. Ces deux sous-fractionnements indépendants l'un de l'autre devraient nous permettre de cibler de façon plus précise la nature des molécules conférant cet effet positif à la fraction.

II.1. Sous-fractionnement par chromatographie d'exclusion de taille

La fraction peptidique d'intérêt, ou fraction 4, a été sous-fractionnée, par Chabanon (thèse en cours) par chromatographie d'exclusion de taille haute pression en quatre "sous-fractions" décrites ci-dessous :

- sous-fraction G1 : molécules de taille comprise entre 0 à 500 Da ;
- sous-fraction G2 : molécules de taille comprise entre 500 à 1000 Da ;
- sous-fraction G3 : molécules de taille comprise entre 1000 à 3000 Da ;
- sous-fraction G4 : molécules de taille supérieure à 3000 Da.

La figure IV.2 présente le chromatogramme permettant de visualiser les différentes sous-fractions de la fraction peptidique, séparées sur la base de la taille de leurs molécules.

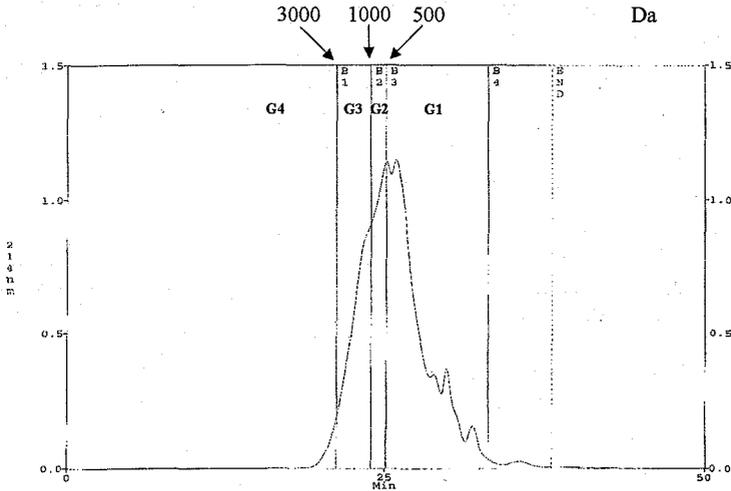


Figure IV.2 : Chromatogramme d'exclusion de taille, présentant les différentes sous-fractions G1, G2, G3 et G4. Exemples d'étalons utilisés : papaine (23000 Da), insuline (5750 Da), Lys-Tyr-Lys (437 Da), Leu-Leu-Leu (357 Da), Ala-Met (220 Da), Pro-Ala (186 Da), L-Arg (174 Da), L-His (155 Da).

L'influence de ces quatre sous-fractions sur la croissance des cellules CHO C5 a ensuite été étudiée au cours de cultures discontinues, réalisées en plaques 96 puits, de $V_u = 200 \mu\text{L}$. Afin de se placer dans les conditions antérieurement utilisées avec la fraction d'intérêt (4 g/L), les concentrations à utiliser pour chaque sous-fraction, ont été définies en fonction du pourcentage des différentes gammes de taille des peptides mesurées dans la fraction peptidique de colza. La distribution de ces peptides et les concentrations de chaque sous-fraction qui en sont déduites, sont données dans le tableau IV.1.

Sous-fraction	G1	G2	G3	G4
Gamme de taille (Da)	0-500	500-1000	1000-3000	> 3000
% dans la fraction de colza	57	23	10	10
Concentration dans la culture (g/L)	2,3	0,9	0,4	0,4

Tableau IV.1 : Distribution de taille des différents peptides de la fraction peptidique de colza.

Ainsi, la sous-fraction G1 qui constitue 57% de la fraction de colza, ajoutée à 4 g/L dans le milieu, devra être utilisée pure à $4 \times 0,57 \text{ g/L}$ pour être en quantité équivalente, c'est-à-dire à 2,3 g/L.

Les résultats concernant la densité cellulaire maximale obtenue au bout de 140 heures de culture sont présentés dans la figure IV.3. Le comptage des cellules totales a été effectué à l'aide d'un appareil de comptage automatique à haut débit (Cellscreen, Innovatis).

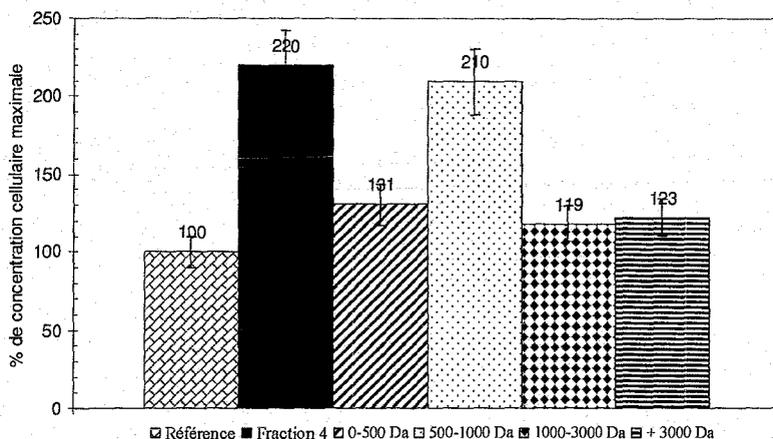


Figure IV.3 : Performances des différentes sous-fractions, issues de la fraction peptidique d'intérêt de colza, pour la culture de cellules CHO C5, au cours de cultures discontinues, en plaques multi-puits (Vu = 200 μ L). Temps de culture = 140 heures.

Ces résultats indiquent clairement que les molécules ayant une taille comprise entre 500 et 1000 Da sont très probablement à l'origine de l'effet promoteur de croissance de la fraction peptidique de colza. En effet, la supplémentation du milieu de référence par 0,9 g/L de sous-fraction G2 permet d'atteindre une densité cellulaire maximale quasiment identique à celle obtenue avec 4 g/L de la fraction peptidique de colza, en augmentant la concentration des cellules de 210% par rapport au milieu de référence. Par ailleurs, aucune des sous-fractions utilisées n'engendre un effet négatif sur la croissance cellulaire. De plus, ce fractionnement plus fin des peptides permet, non seulement, de réduire la quantité de matière peptidique nécessaire à une activité promotrice de croissance (de 4 à 0,9 g/L), mais surtout, de formuler un milieu davantage défini.

Il ressort de ces nos résultats que ce ne sont pas nécessairement les plus petits peptides qui seraient responsables de l'effet promoteur de croissance. Ils confirment les hypothèses émises par Buteau *et al.* (2003) et Amiot *et al.* (2004). En effet, les premiers pensent que les effets bénéfiques attribués aux peptones sont la résultante de la présence de grands peptides

capables de mimer des protéines animales particulières. Les seconds, ont, quant à eux, montré que ce sont les peptides issus d'hydrolysats de protéines de lait ayant un poids moléculaire de 800 Da qui avaient un effet promoteur de croissance sur des kératinocytes. Ainsi, il apparaît que le potentiel nutritionnel des hydrolysats végétaux, constitué par les acides aminés libres et les petits peptides (< 500 Da), n'est pas, à lui seul, responsable de l'augmentation de la densité cellulaire maximale des cellules en culture.

Le fractionnement supplémentaire de la fraction peptidique de colza, effectué par chromatographie d'exclusion de taille, a ainsi permis de cibler plus précisément sa partie "bioactive", mitotique. Son utilisation dans les milieux de culture permet de réaliser une formulation de ces derniers, encore mieux définie. Elle permet, de plus, de réduire les variations d'activités entre différents lots et de simplifier l'étape de purification des protéines recombinantes.

II.2. Sous-fractionnement par chromatographie d'échange de cations

Toujours dans l'objectif de mieux caractériser la nature des molécules impliquées dans l'effet bénéfique de la fraction peptidique de colza, Raminosa (thèse en cours) a utilisé la chromatographie d'échange de cations pour obtenir des "sous-fractions" différenciées par la charge des peptides : B1, B2, B3, B4 et B5. La figure IV.4 présente le chromatogramme permettant de visualiser les différentes sous-fractions séparées sur la base de la charge électrique de leurs molécules. L'effet des ces cinq sous-fractions sur la croissance cellulaire a ensuite été étudié de la même façon que précédemment. Malheureusement, aucune de ces sous-fractions n'a permis d'augmenter la densité cellulaire maximale des cellules CHO C5 par rapport au milieu de référence. Au contraire, l'ajout de ces sous-fractions a même légèrement inhibé la croissance cellulaire car une diminution de 20% de la densité cellulaire maximale a été observée en présence des cinq sous-fractions. Ce résultat peut s'expliquer, soit par la présence potentielle de résidus de solvants utilisés lors de la chromatographie échangeuse d'ions, soit, par une osmolarité trop élevée des échantillons malgré leur dessalage préalable.

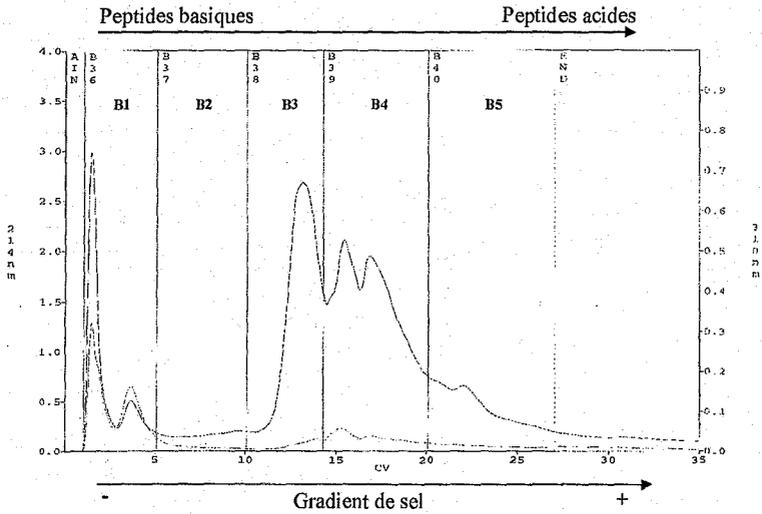


Figure IV.4 : Chromatogramme, obtenu par chromatographie d'échange de cations, présentant les différentes sous-fractions B1, B2, B3, B4 et B5.

III. Conclusion

L'objectif de cette étude était d'évaluer une nouvelle source de peptides végétaux, les protéines de colza, en tant que suppléments de milieux de culture sans sérum, pour des cellules CHO. Les principaux résultats de ce travail sont résumés dans la figure IV.1.

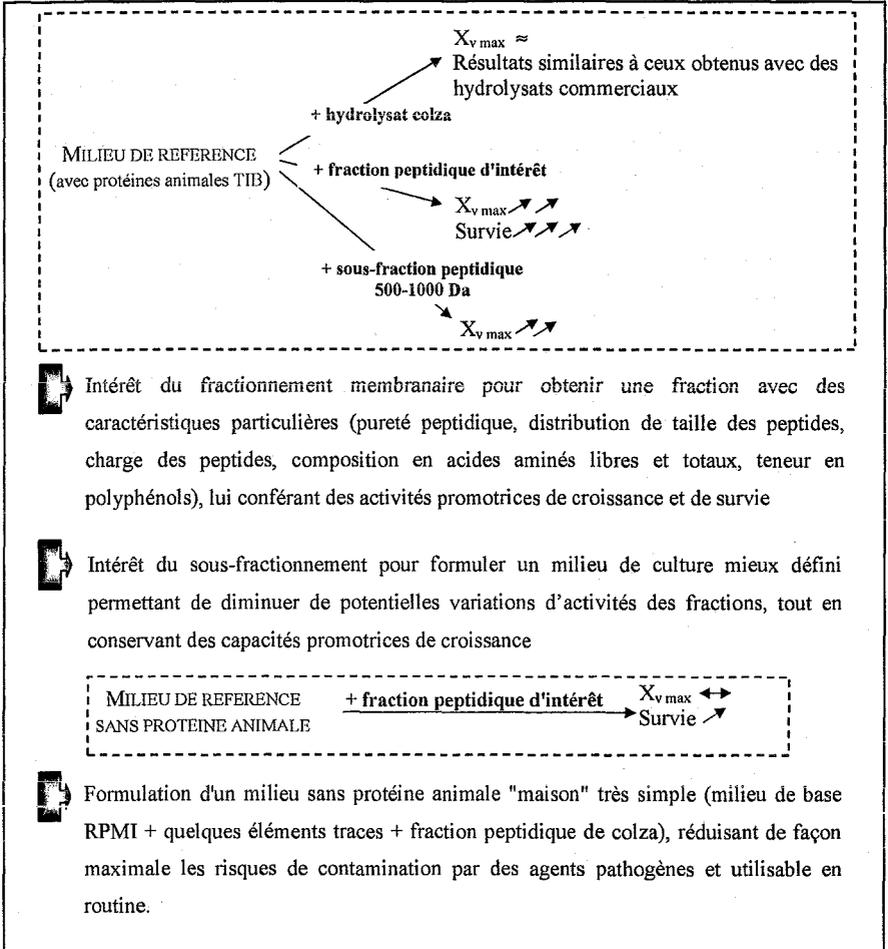


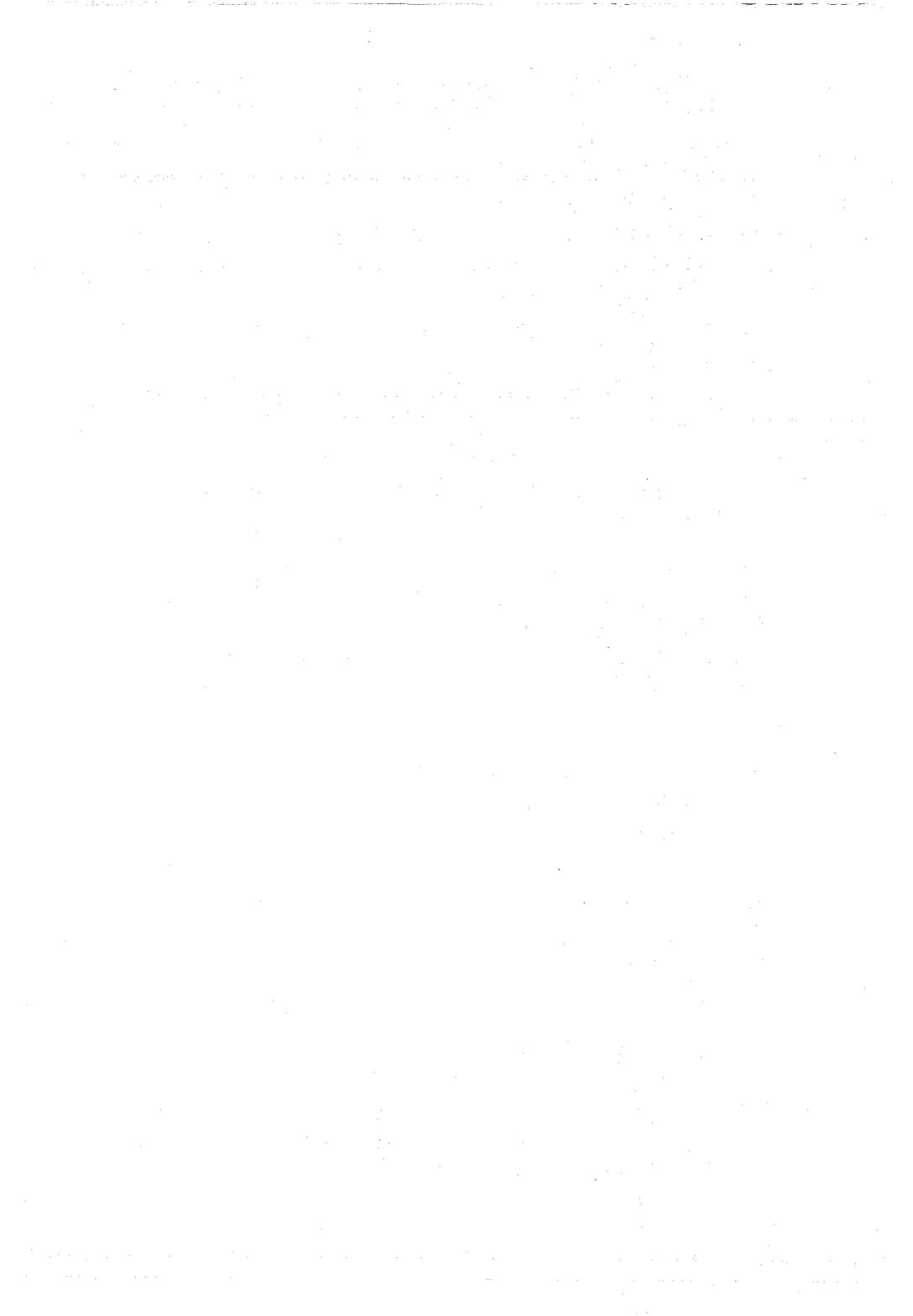
Figure IV.1 : Principales conclusions faisant suite à la supplémentation de milieux de culture sans sérum par des peptides de colza.

La supplémentation du milieu de culture avec différentes fractions de colza a permis de montrer l'importance de l'utilisation d'un procédé de séparation membranaire pour générer une fraction ayant des caractéristiques propres, particulières lui permettant de promouvoir la croissance de cellules animales en culture. Trois critères sont alors apparus comme particulièrement importants : l'origine végétale des peptides, la pureté en matière peptidique et la répartition de taille de ses peptides. En effet, notre fraction peptidique de colza qui possède une composition particulière démontre des propriétés promotrices de croissance supérieures à celles d'autres hydrolysats végétaux commerciaux, non fractionnés. Ces résultats ont, de plus, révélé que la présence d'une majorité de très petits peptides n'était pas un facteur indispensable pour promouvoir la croissance cellulaire. Enfin, un "effet dose" a pu être observé, indiquant la nécessité de définir la concentration optimale de la fraction à utiliser afin d'éviter toute limitation ou inhibition par la présence de quantités trop faibles ou trop importantes de certains de ses composés.

Une fois sélectionnée, la fraction présentant les capacités promotrices de croissance les plus intéressantes, son ajout dans un milieu de base très simple, a permis de formuler un milieu totalement exempt de protéine animale éliminant ainsi tout risque de contamination potentielle des cultures. De plus, ce milieu de composition élémentaire, qui peut-être utilisé en "routine", permet de se libérer des contraintes inhérentes à l'utilisation de milieux sans sérum et sans protéine commerciaux dont la composition est souvent confidentielle.

Enfin, grâce à un fractionnement supplémentaire de la fraction peptidique d'intérêt, par chromatographie d'exclusion de taille, il a été possible de cibler plus spécifiquement la fraction responsable de l'effet promoteur de croissance, à savoir des molécules ayant une taille comprise entre 500 et 1000 Da. L'utilisation d'une telle sous-fraction permettra d'accroître la définition du milieu de culture, de minimiser les potentielles variations d'activités entre lots mais aussi de faciliter la purification des protéines recombinantes. Les perspectives dérivant d'un tel résultat consistent à poursuivre le sous-fractionnement dans le but d'isoler la plus petite fraction biologiquement active possible voire un unique peptide bioactif qu'il serait alors envisageable de synthétiser chimiquement. Ainsi, il sera sans doute plus aisé de comprendre la nature de l'activité promotrice de croissance et de survie.

Pour des questions de disponibilité de la matière peptidique en quantité suffisante, dans la suite de ce travail, nous utiliserons uniquement la fraction peptidique isolée avant le sous-fractionnement par chromatographie d'exclusion de taille.



CHAPITRE V

**CROISSANCE ET METABOLISME DE
CELLULES CHO, EN MILIEU SANS SERUM
EN PRESENCE DE PEPTIDES DE COLZA**

CHAPITRE V : CROISSANCE ET METABOLISME DE CELLULES CHO, EN MILIEU SANS SERUM, EN PRESENCE DE PEPTIDES DE COLZA

I. Kinetics of interferon-producing CHO cells in batch process supplemented with rapeseed peptidic fraction.....	134
II. Cinétique de cultures de cellules CHO supplémentées par un mélange d'acides aminés "sélectionnés".....	155
II.1. Effet d'un ajout d'acides aminés libres "sélectionnés" sur la croissance et le métabolisme de cellules CHO productrices d'interféron- γ	155
II.2. Effet d'un ajout d'acides aminés libres "sélectionnés" sur la production d'interféron- γ des cellules CHO.....	159
III. Effet de la fraction peptidique de colza sur la lyse cellulaire.....	162
IV. Effet de la fraction peptidique de colza sur l'activité pyruvate carboxylase des cellules CHO	165
V. Conclusion.....	167

CHAPITRE V : CROISSANCE ET METABOLISME DE CELLULES CHO, EN MILIEU SANS SERUM, EN PRESENCE DE PEPTIDES DE COLZA

Si l'utilisation de peptides issus de l'hydrolyse de protéines d'origine végétale est apparue depuis ces dernières années comme une alternative intéressante au sérum présent dans les milieux de culture classiques, leur utilisation reste cependant freinée par le manque de connaissances sur l'effet et le mode d'action des composants de ces hydrolysats sur les cellules. Deux hypothèses majeures ont été formulées afin d'expliquer leurs effets sur les cellules en culture, à savoir un rôle nutritionnel et/ou un rôle "bioactif" similaire à celui de facteurs de croissance et de production. Aussi, cette partie, présentée sous forme de projet de publication, propose une étude approfondie de la croissance, du métabolisme et de la capacité de production d'interféron-gamma de cellules CHO dans le nouveau milieu de culture formulé sans sérum et enrichi avec la fraction peptidique de colza dont les capacités promotrices de croissance et de survie cellulaire ont été mises en évidence dans le chapitre précédent. De plus, dans le but de confirmer ou d'infirmer les hypothèses émises sur le mode d'action des peptides végétaux sur les cellules animales, la supplémentation du milieu de référence par différents composés sera étudiée afin d'observer, d'une part, l'impact de l'apport nutritionnel de la fraction et, d'autre part, le rôle plus spécifique des polyphénols.

I. Kinetics of interferon-producing CHO cells in batch process supplemented with rapeseed peptidic fraction

B. Farges-Haddani¹, S. Chenu², A. Marc¹, J. L. Goergen¹

1- Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, UPR CNRS 6811, ENSAIA-INPL, 2 avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

2- Centre d'Immunologie Pierre Fabre, 5, avenue Napoléon III, BP 497, 74164 St-Julien-en-Genevois Cedex, France

Introduction

Industrial production of recombinant proteins for therapeutic or diagnostic purposes emerged as a huge market during the last decade. Chinese Hamster Ovary (CHO) cells are one of the most frequently used cell lines for the expression of recombinant therapeutic proteins that

require post-translational modifications to express their full biological functions (Chu and Robinson, 2001). CHO cells used for large-scale production of recombinant proteins are typically grown in suspension cultures using animal serum-supplemented medium. The latter provides a broad spectrum of macromolecules, carrier proteins for lipid substances and trace elements, attachment and spreading factors, low molecular weight nutrients, hormones and growth factors (Froud, 1999). However, there are several problems with the use of this serum such as availability, cost, non desirable components, variation between batches and complication of the purification of products. But, the main drawback is the potential introduction of microbial contaminants, like fungi, bacteria, viruses or the BSE-agents (van der Valk *et al.*, 2004). Indeed, to produce such recombinant protein therapeutics, it is crucial to ensure biosafety which is a major issue to remove any potential source of infective agents like bovine serum (Keen and Rapson, 1995). Although many works have been made in developing chemically-defined serum free media (SFM), they often yielded to a decreased cell growth and recombinant protein production (Castro *et al.*; 1992, Stoll *et al.* 1996; Lee *et al.*, 1999). As a result, animal derived peptones and low-cost hydrolysates containing undefined mixtures of low-molecular weight components, including amino acids, peptides, vitamins and trace elements, are frequently used as serum-free medium additives to provide nutrients in cell culture (Dyring *et al.*, 1994; Jan *et al.*, 1994; Merten *et al.*, 1994; Keen and Rapson, 1995; Perrin *et al.*, 1995; Donaldson and Shuler, 1998; Nyberg *et al.*, 1999). For example, Primatone RL, an enzymatic digest of meat, has been used as a low-cost supplement in serum-free media for insect cells (Schlaeger *et al.*, 1993) or mammalian cells (Schlaeger, 1996). Although this development is a step further in the right direction, this is not sufficient because the potential risk of introducing adventitious agents is still present (Asher, 1999). Thus, for the production of therapeutic proteins, non-animal derived hydrolysates, such as vegetable hydrolysates are proposed (Franek *et al.*, 2000; Heidemann *et al.*, 2000; Burteau *et al.*, 2003; Deparis *et al.*, 2003; Ballez *et al.*, 2004). Indeed, plant peptones can be used as a partial or total substitute to serum, to respond to biosafety concerns. Vegetable protein hydrolysates may be a source of short chains peptides, with biological properties that include immunomodulatory, antimicrobial, antithrombotic and antihypertensive effects (Clare and Swaisgood, 2000; Smacchi and Gobetti, 2000) and growth promoting activities of mammalian cells (Franek *et al.*, 2000; Heidemann *et al.*, 2000; Burteau *et al.*, 2003; Deparis *et al.*, 2003; Ballez *et al.*, 2004). Several plant protein hydrolysates produced from soy, wheat, rice, pea are now commercially available.

Many hypotheses are made on the role of these hydrolysates on mammalian cell culture. It is obvious that the hydrolysates have at least a partial nutritional role thanks to their content in free amino acids and low molecular weight peptides (Heidemann *et al.*, 2000 ; Nyberg *et al.*, 1999). Thus, in 1991, Minamoto *et al.* showed that cultured animal cells could metabolize dipeptides such as glycyl-L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine and so one could expect that other peptides could be utilized as well. However, more recently, the idea that peptones provide peptides with specific effects on growth and productivity is resurfacing (Franek *et al.*, 2000 ; Franek and Katinger, 2002 ; Burteau *et al.*, 2003). Indeed, it seems that many hydrolysates not only act as a source of amino acids but also that some peptides could interact with specific cell surfaces receptors implicated in growth, anti-apoptosing signalling or protein biosynthesis and that their frequency or concentration could vary from a type of hydrolysates to another (Jan *et al.*, 1994 ; Franek *et al.*, 2000, 2002 ; Burteau *et al.*, 2003 ; Ballez *et al.*, 2004).

In a recent study, we identified a specific fraction of a rapeseed protein hydrolysate inducing a positive effect on CHO C5 cell growth in a serum-free medium (Farges-Haddani *et al.*, 2005). Indeed, the well-balanced amino acid composition of rapeseed protein compared to other oilseed crops like soybean makes them an interesting source for animal cell culture (Godon, 1996).

Thus, the purpose of this work has been to provide a better understanding the effect of this promoting rapeseed fraction on the growth, production and metabolism of animal cells cultivated in serum-free media.

Also, as a first step, we have realized kinetic and metabolic studies of cultures performed in media with and without rapeseed fraction, then, in a second step we have supplemented our reference medium with a mixture of free amino acids corresponding to the total amino acids constituting the rapeseed fraction in the goal to study the nutritional impact of this fraction. Eventually, we assessed the impact of the polyphenols on the growth.

Material and Methods

Cell line

CHO C5 cell line is a resultant clone of a transfection of the cDNA coding for the rat alpha2,6-sialyltransferase into the IFN producing CHO 320 cell line by using an *in vitro* amplification expression method (Monaco *et al.*, 1994). This clone has been adapted to grow in suspension in serum-containing medium and subsequently in serum-free medium (Monaco *et al.*, 1996).

Culture media

Cultures were performed with a medium based on RPMI 1640 (Sigma) enriched in glutamine, glucose and trace elements, such as pyruvic acid, L-alanine, putrescine, and inorganic ions (Lamotte *et al.*, 1997). Various components were then added, depending the culture conditions : TIB mixture (5 mg/L transferrin (Sigma), 5mg/L Insulin (Sigma), 5g/L bovine serum albumin (Euromedex)), rapeseed peptidic fraction (4 g/L), amino acid mixture or sinapic acid (Sigma). Medium supplemented with TIB mixture will be called reference medium. The rapeseed peptidic fraction correspond to the fraction 4 described by Farges-Haddani *et al.* (2005)

To the study the effect of rapeseed fraction, the mixture of free amino acids (Sigma), presented in table 1, was added to the reference medium. This mixture was equivalent to the total amino acids that would be obtained after the acidic hydrolysis of the rapeseed peptidic fraction including free and peptidic amino acids.

In a last experiment, media were supplemented with 25 mg/L of sinapic acid (Sigma). This concentration corresponds to the quantity of polyphenol which was present in the rapeseed peptidic fraction.

Amino Acids mM	Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
	1.2	2.1	2.4	1.1	0	4.4	0.5	2.4	0.7	1.1	1.9	0.96	0.5	0.8	1.2	1.7	1.8	0.8	1.9

Table I : Mixture of free amino acids used to supply the reference medium.

Cell culture

Cultures were initiated in T-flasks and scaled-up to 500 mL (100 mL working volume) polycarbonate Erlenmeyer flasks (Corning) then to 2 L bioreactor (Cytotflow-SGI, 1600 mL working volume). Shake-flask cultures were carried out on an orbitable agitation table (3 cm orbital diameter, 75 rpm) in a 37°C incubator. Head-spaces of flasks were purged with 5% CO₂ in air in order to maintain the pH around 7.2-7.4. Cells propagated in shake-flasks were harvested in mid-exponential growth phase to seed the bioreactor at 2.10⁵ cells/mL. In the bioreactor, the dissolved oxygen tension in the medium was controlled at 50% air saturation by air or oxygen sparging, the pH was maintained at 7.2 by CO₂ and NaOH (0.2N) additions, the temperature was 37°C and the stirring speed was fixed at 50 rpm.

Cell counting and metabolites assays

Twice a day, aliquots were collected from the bioreactor. Samples were centrifuged and supernatants stored at -20°C for glucose, lactate, glutamine, ammonium ions and IFN measurements. Cell density was estimated using a hemacytometer, and viability was measured by the Trypan Blue exclusion method. Glucose, lactate and LDH were enzymatically determined using commercial assay kits (Sigma). Glutamine was converted into glutamate with asparaginase (Roche) and glutamate was measured thanks to an enzymatic method (Roche). Ammonium ions were analysed by means of a selective electrode (Orion). IFN- γ concentrations were measured using a sandwich ELISA procedure thanks to the DuoSet ELISA Development kit (DY285, R&D systems).

Kinetic data analysis

All kinetic data were performed by curve fitting technique. An appropriate polynomial function (as low degree as possible) was fitted by the least squares method to the measured concentration data. The derivative with respect to time was then calculated for the polynomial. The specific consumption or production rates could then be calculated by dividing the derivative by the viable cell concentration at selected time points.

The specific growth rate was calculated using the following equation :

$$\mu = \left(\frac{1}{X^v}\right)\left(\frac{dX^v}{dt}\right)$$

The specific glucose and glutamine consumption rates were calculated according to :

$$qs = \left(\frac{1}{Xv}\right)\left(\frac{dS}{dt}\right)$$

The specific lactate and ammonia rates were calculated according to :

$$qp = \left(\frac{1}{Xv}\right)\left(\frac{dP}{dt}\right)$$

Analysis of rapeseed peptidic fraction

The Kjeldhal method was employed for the total nitrogen content calculation with a conversion factor of 6.25 for peptide mass determination. The phenolic compounds were directly measured in peptide solutions without any treatment and were expressed from a calibration curve made with sinapic acid (224 g/mol). Size-exclusion chromatography analyses were carried out with a Superdex Peptide HR 10/30 column (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and a solvent mixture of ACN/H₂O/TFA (40/60/0.1 - v/v/v). Wavelengths of detection were 214 nm for peptide determination and 310 nm for phenolic compounds determination. The molar mass distribution was determined using a calibration with papain (23000 g/mol), insulin (5750 g/mol), Lys-Tyr-Lys (437 g/mol), Leu-Leu-Leu (357 g/mol), Ala-Met (220 g/mol), Pro-Ala (186 g/mol), L-Arg (174 g/mol) and L-His (155 g/mol) as molar mass standards. All standards were purchased from Sigma. After derivatization according to Godel *et al.* (1992), the amino acids were analyzed by high-performance liquid chromatography (HP 1090 Liquid Chromatograph system, column Hypersil 5 μ C18 (Interchim, France)) using solvent A (20 mM sodium acetate containing 0.024 % triethylamine and 0.5 % tétrahydrofurane, pH 7.2) and solvent B (acetonitrile/methanol/100 mM sodium acetate (40/40/20- v/v/v), pH 7.2). The amino acid concentrations were calculated from a calibration curve made with an amino acids kit (Sigma).

Results and discussion

1. *Composition of rapeseed peptidic fraction*

In our laboratory, we have developed the fractionation of rapeseed protein hydrolysates obtained from defatted cattle-cakes. Even though its protein content is rather low (30-45%), the amino acid composition is well balanced and thus, the preparation of rapeseed protein hydrolysates and their fractionation by membrane processes present certain advantages with respect to functional and nutritional properties (Vioque *et al.*, 2000). In a previous study, we have demonstrated that one of these fractions had a growth promoting effect on CHO cells in a serum-free medium (Farges-Haddani *et al.*, 2005). From now on, this fraction will be called "rapeseed peptidic fraction" (table 3 and table 4).

The total nitrogen content of the rapeseed peptidic fraction was of 90%, including 80% of peptides with a size lower than 1000 Da *i.e.* composed of less than 10 amino acids. None of them displayed a size higher than 5000 Da. Rapeseed peptidic fraction contains 9 g/kg of phenolic compounds (table 2). The amino acids composition of this fraction was found to be rather balanced with a stringly high proportion of Gix *i.e.* glutamic acid and glutamine (table 3). This characteristic makes it especially interesting to be tested in animal cell culture (Stoll *et al.*, 1996 ; Ducommun *et al.*, 2001). The free amino acids content was only 3% of total nitrogen matter.

2. *Kinetics of serum free cultures supplemented or not with rapeseed peptidic fraction*

To determine the effect of the rapeseed peptidic fraction addition to a serum-free medium on cell growth and γ -IFN production, CHO cells were cultivated in a bioreactor containing 1.2 L of a reference medium (RPMI 1640 + TIB + ET + Q + glucose), supplemented with 4 g/L of rapeseed peptidic fraction. Nutrient consumption and metabolite production of CHO C5 cells cultured in two serum-free media were measured over the processes and the consumption and production rates as well as the yields were calculated (figure 1).

	Total nitrogen content (% w/w of total matter)	Molecular weight in Da (% w/w of total nitrogen content)				Free amino acids > 110	Phenolic compounds (% w/w of total matter)
		> 5000	5000-1000	1000-500	500-110		
Rapeseed fraction	90	0	20	23	54	3	0,9

Table 2 : Composition and molecular weight distribution of peptides of rapeseed fraction.

Amino Acids	Ala	Arg	Asx	Cys	Glx	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
% molar	4	7	12	0	17	9	3	4	7	4	1	3	5	7	7	3	7
	Total acid amino acids																29
	Total basic amino acids																14

Table 3 : Amino acids composition of the rapeseed fraction after complete acidic hydrolysis of peptides.

CHO C5 cells have an exponential growth phase that last up to 50 hours of culture in the reference medium whereas 90 hours of exponential growth can be measured in the supplemented medium. As a consequence, the supplementation of rapeseed peptidic fraction to serum-free medium increased the maximum viable cell concentration : in the culture with the reference medium, a maximal viable cell density of 5×10^5 cells/mL was reached at 55 hours whereas supplementation enabled a maximal viable cell density of 12×10^5 cells/mL at 90 to 144 hours. When the rapeseed fraction was added, the viability decreased latter, the culture longevity was extended twice although the maximal specific growth rate did not significantly increase ($\mu_{\max} = 0.02 \text{ h}^{-1}$). However, the supplementation of rapeseed peptidic fraction to serum-free medium allowed to extend the period with a stable maximal specific growth rate to 80 hours (figure 1). After 80 hours of culture, a plateau phase was observed for 70 hours indicating that the rapeseed peptidic fraction is able to keep the cells alive for 150 hours. These observations showed that the rapeseed peptidic fraction had a main positive effect on the cell growth promotion and suggest the presence of some anti-apoptotic factors in the rapeseed peptidic fraction. These results confort the hypothesis that some plant peptones contain bioactive peptides that could mimic growth factors or/and display some antiapoptotic effects on cultured CHO cells and hybridoma (Burteau *et al.*, 2003 ; Franek *et al.*, 2003 ; Franek, 2004).

The energy necessary to the growth and the cell survival is provided by several metabolic pathways including the glycolysis, the Krebs cycle and the respiratory chain. Glutamine is the most consumed amino acid because of its easy entry into the Krebs cycle (Zielke *et al.*, 1984) and of its role in the biosynthesis of amino acids, purine and pyrimidine bases. The evolution with time of the concentration of glucose, lactate, glutamine and ammonia have been followed during CHO C5 batch processes in serum-free medium, in presence or absence of rapeseed peptidic fraction (figure 1). Regardless of the culture medium, glucose utilization was accompanied by a corresponding accumulation of lactate and glutamine consumption by ammonia production.

In the reference medium, when the maximal viable cell density was achieved, glucose and glutamine were not completely depleted, indicating that these nutrients are not limiting. Therefore, we can suppose that there is a lack of another key nutrient (amino acid, vitamins...) or the accumulation of a toxic product (i.e. lactate, ammonia) which is responsible for the death of the cells (Sanfeliu *et al.*, 1996).

The specific rate of glucose consumption was higher at the beginning of the culture ($0.08 \mu\text{mol}/10^5 \text{ cells.h}$) and then, decreased to negligible values after 80 hours of culture. Glutamine concentration was initially at 3.5 mM and remained at 1 mM at the end of culture. The specific rate of glutamine consumption was also higher at the beginning of the culture ($0.014 \mu\text{mol}/10^5 \text{ cells.h}$). Lactate concentration reached a peak (15.5 mM) at 60 hours, then plateaued. The consumption of glutamine and other amino acids from the culture medium yielded to an accumulation of ammonia of 3.1 mM . This accumulation stopped simultaneously to the cell density. These concentrations (lactate and ammonia) were too low to explain the cell growth arrest (Schlaeger and Schumpp, 1989 ; Ozturk *et al.*, 1992 ; Martinelle and Häggstrom, 1993 ; Newland *et al.*, 1994).

Cells started their exponential growth phase with very high specific glucose and glutamine utilization rates as well as very high lactate and ammonia ions formation rates. Then, these specific utilization and formation rates decreased as glucose and glutamine concentrations declined as previously reported (Fitzpatrick *et al.*, 1993 ; Ogata *et al.*, 1993 ; Ljunggren and Häggström, 1994 ; Neermann and Wagner, 1996).

Regarding the culture supplemented with rapeseed peptidic fraction, as the exhaustion of glucose and glutamine coincided with the beginning of the decline phase, it is reasonable to assume that one or both of these nutrients reached a limiting concentration at that time.

Whereas the specific consumption and production rates q_{gle} , q_{gh} , q_{lac} and $q_{\text{NH}_4^+}$ were significantly reduced when rapeseed peptidic fraction was utilised, the specific production rate q_{IFN} is increased strongly (two times higher). The specific glucose consumption rate remained constant during the exponential phase at $0.02 \mu\text{mol}/10^5 \text{ cells.h}$. That was two to five times lower than the rate obtained for the non-supplemented medium. Glutamine was completely consumed after 144 hours in the serum-free medium supplemented with rapeseed peptidic fraction. The maximal specific glutamine consumption rate calculated for these cultures conditions, around $0.007 \mu\text{mol}/10^5 \text{ cells.h}$ was two times lower than the rate obtained with the non supplemented medium. However, similar values were registered after 20 hours of culture. The lactate concentration reached a peak of 28 mM after 152 hours ; then plateaued. The consumption of glutamine and other amino acids brought about an accumulation of ammonium ions (4.7 mM). As for the non supplemented culture, this accumulation was stopped with the glutamine depletion. In accordance with Burteau *et al.* (2004), the growth phase stop could result from the accumulation of lactate or ammonia (or both), with toxic levels at concentrations around 30 mM (lactate) and 5 mM (ammonia).

However, Schlaeger and Schumpp (1989) have shown that 90-110 mM of lactate and 8-10 mM of ammonia were necessary to inhibit of 50% the CHO cell growth. Moreover, Lao and Toth (1997), have revealed that a concentration of 30 mM of lactate have no effect on the specific growth rate of CHO cells and Geaugey *et al.* (1989) that 50 mM of lactate was not toxic for hybridoma.

Our results have shown that the rapeseed peptidic fraction is able to change the cell metabolism. However, in the literature, different phenomena have been related. Indeed, Heidemann *et al.*, (2000) found that all peptone enriched cultures showed benefits compared to the standard medium but however, the cell specific rates (q_{glc} , q_{gin} , q_{lac}) during the exponential growth showed no significant differences. Moreover, Deparis *et al.* (2003) have noticed that no difference in carbohydrate and lactate metabolism of SF9 cells could be detected between cultures in serum-free medium supplemented with or without rapeseed protein hydrolysate. In the contrary and in accordance with our results, Bonarius *et al.* (1996) have shown that peptones significantly change the profile of nutrient consumption for an identical cell line.

Nevertheless, we noticed that the lactate/glucose ratio was maintained whatever the medium used : the specific rates of glucose consumption and lactate production were reduced in the supplemented medium, indicating a reduction of the whole cellular metabolism (Bollati Fogolin *et al.*, 2004).

Generally, in transformed cell lines, glucose and glutamine transport into cells as well as the glycolysis and the glutaminolysis pathways occur at high rates. As a consequence, cells in culture show a poor exploitation of these nutrients, mainly due to the high glucose and glutamine concentrations used in batch cultures which differ greatly from the physiological ones that were found in tissues. Sanfeliu *et al.* (1997) have shown that when glucose and glutamine are added in large amounts to the culture, cells would rapidly consume them without any apparent benefit, since they are not strictly used for growth, but to produce high levels of lactate, ammonium and some amino acids as waste products. Therefore, the presence of rapeseed peptidic fraction in the culture medium reduces the carbohydrates metabolism. Glucose and glutamine consumption are reduced, and hence production of lactate and ammonia. Nevertheless, cell growth is favoured in rapeseed supplemented medium, probably as a consequence of the presence of pro-mitotic agents and/or the supply of biomass precursors present in the rapeseed peptidic fraction.

For both cultures, IFN accumulated only during the growth phase, reaching concentrations of respectively 700 $\mu\text{g/L}$ and 3500 $\mu\text{g/L}$ for the reference and rapeseed supplemented cultures. The maximum specific IFN production rates (q_{IFN}), were of approximately of 5 $\text{ng}/10^5\text{cell.h}$ and 8 $\text{ng}/10^5\text{cell.h}$ for respectively the reference and the supplemented culture. The production of recombinant protein is much higher in the rapeseed peptidic fraction supplemented culture than in the reference culture. This high quantity of protein production can be explained according to different phenomena. Indeed, it results in the same time from an higher maximal cell density, an extended period with maximal specific growth rate and to an higher specific productivity in the rapeseed supplemented culture. Therefore, the quantity of interferon produced is dramatically increased by supplementation of rapeseed peptidic fraction.

This high production of recombinant protein could be explained thanks to different hypotheses. In 1996, Schlaeger, has shown that the complex nutrient mixture Primatone RL increased the volumetric product titers of secreted recombinant proteins by hybridoma. Then, Franek *et al.* (2000) and Franek and Katinger (2002) have reported that peptide hydrolysates exerted production-enhancing effects. Finally, Sung *et al.* (2004), have shown that the enhancement of specific production rate of hTPO in yeastolate hydrolysate supplemented medium is due in the same time to the increased transcription level of the protein in this serum-free medium and also to the peptides of this hydrolysate. Moreover, according to our results, we can think that rapeseed peptidic fraction brought amino acids and small peptides to the cells. Thus, cells economised the energy necessary to synthesize them and were more available to produce recombinant protein.

Nevertheless, detailed molecular mechanisms concerning the specific effect of peptides in vegetable hydrolysates remain to be elucidated.

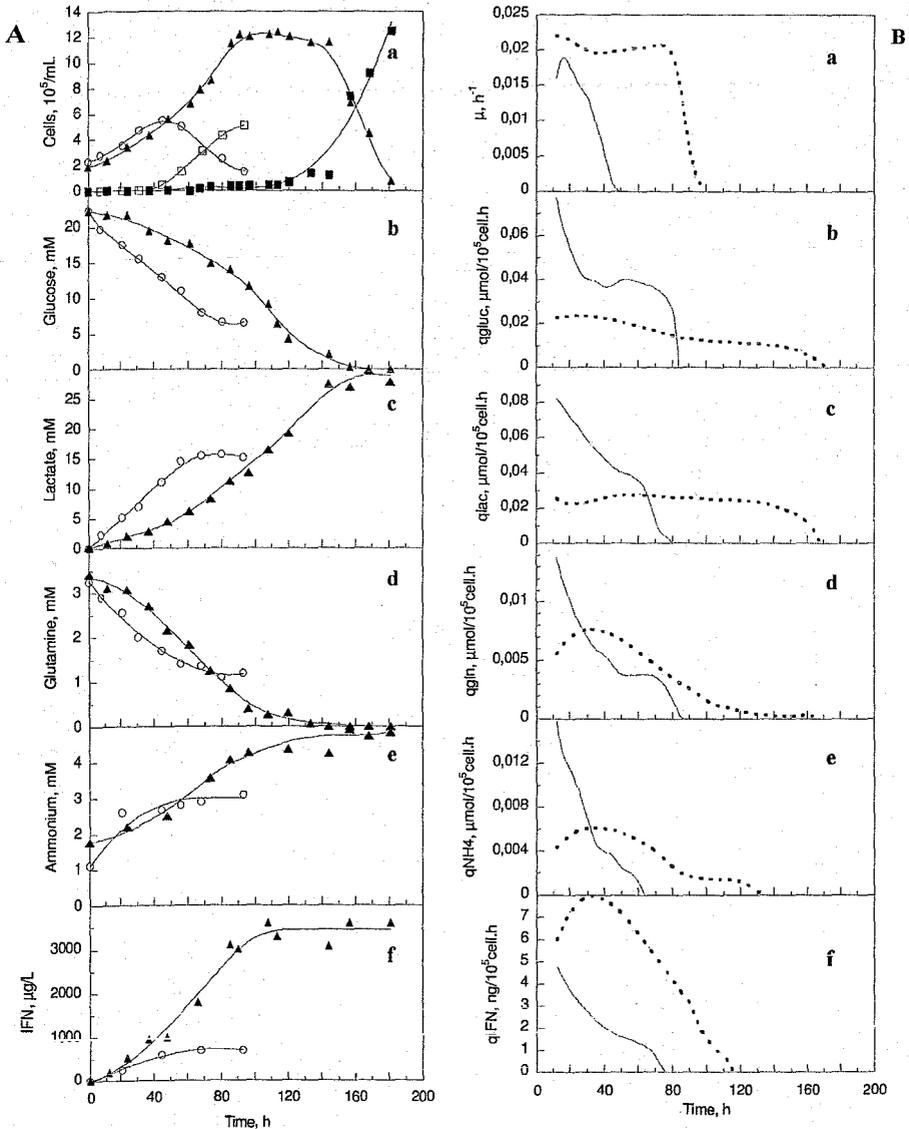


Figure 1 : A : Evolution with time of viable (O, \blacktriangle) and trypan blue dead cells (\square , \blacksquare) (a), glucose (b), lactate (c), glutamine (d), ammonia (e) and γ -interferon (f) in CHO C5 bioreactor batch cultures with (closed symbols) or without (open symbols) 4 g/L of the rapeseed peptidic fraction.

B : Evolution with time of the specific rates of cell growth (a), glucose consumption (b) glutamine consumption (d), lactate production (c), ammonia production (e) and interferon- γ production (f) in 2L bioreactor batch culture with (•••••) or without (—) 4 g/L of rapeseed peptidic fraction.

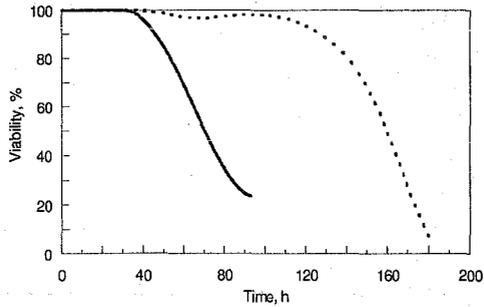


Figure 2 : Cell viability during bioreactor batch culture in reference medium (—) and reference medium supplemented with 4 g/L of rapeseed peptidic fraction (⋯).

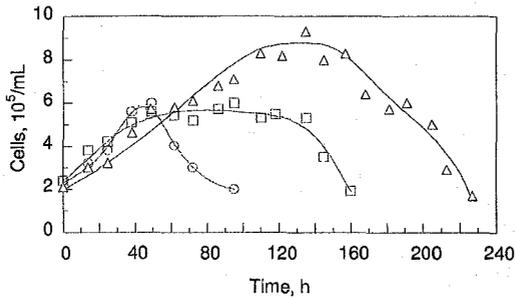


Figure 3 : Cell growth during spinner batch cultures with different media : serum-free reference medium (○), serum-free medium supplemented with 4 g/L of rapeseed peptidic fraction (△) and serum-free medium supplemented with a mixture of free amino acids corresponding to the total amino acids constituting the rapeseed peptidic fraction (□).

3. Effect of free amino acids supplementation on CHO cell growth

Several papers suggest that peptones have a nutritional effect, therefore promoting cell growth when added to the medium of animal cells (Jan *et al.*, 1994 ; Schlaeger, 1996 ; Nyberg *et al.*, 1999 ; Heidemann *et al.*, 2000). In order to give clue regarding the effect of the studied rapeseed fraction, the reference serum-free medium was supplemented with a mixture of free amino acids equivalent to the total amino acids that would be obtained after the acidic hydrolysis of the rapeseed peptidic fraction including free and peptidic amino acids.

As can be seen in figure 3, the replacement of rapeseed peptides by free amino acids did not improve the maximal cell density and did not increase the q_{IFN} production rate. However, the addition of free amino acids strongly extended the maximal cell density duration and the time of culture by comparison with the reference medium. This experiment demonstrated that the effect of the rapeseed peptidic fraction on CHO cells is not equivalent to the effect of the supplementation of the medium with free amino acids constituting the rapeseed peptidic fraction. Therefore, peptides seem to hit specific targets in the cells. However, the duration time of the culture supplemented with free amino acids was longer than the reference culture but shorter than the culture performed with rapeseed peptidic fraction. Thus, we can suggest that the rapeseed peptidic fraction has many various effects on the CHO cells. Free amino acids and peptides with low molecular weight (di- and tripeptides) have a promoting effect on the viability of cells *i.e* a nutritional effect, whereas larger peptides might mimic growth promoting or survival factors with an increase in the maximal cell density (Heidemann *et al.*, 2000 ; Burteau *et al.*, 2004) and in agreement with recent evidence of oligopeptides effects on cultured animal cells (Franek and Katinger, 2002 ; Franek *et al.*, 2003). Another hypothesis to explain these effects is that some peptides could interact with specific cell surface receptors implicated in growth, anti-apoptotic signalling or protein biosynthesis (Ballez *et al.*, 2004).

The uptake of peptones is linked to specialized transport systems, which are different from amino acid transporters (Ganapathy *et al.*, 1984 ; Takuwa *et al.*, 1985 ; Daniel *et al.*, 1991). Inside the cells, the peptones are first clipped by proteases and the resulting free amino acids can then be used as nutrients via the Krebs cycle or as precursors for other amino acids, nucleic acids or incorporated into proteins (figure 4). It was found that the active transport of peptides in kidney is energized by an H^+ gradient rather than a Na^+ gradient commonly seen in amino acid and glucose transport system (Ganapathy and Leibach, 1983). Then, Bonarius *et al.* (1996) noticed that the medium supplementation with Primatone RL was more efficient

to support hybridoma cell growth than the free amino acids addition. While this observation could be linked to an amino acid balance in Primatone RL more adapted to this specific cell line, the authors also hypothesized that peptide transport into the cell is less energy consuming than the transport of free amino acids. The same results were obtained with CHO cells, by Nyberg *et al.* (1999) and with HEK293 cells, by Pham *et al.* (2003). In addition, Deparis *et al.*, 2003, have shown that the very low level of free amino acids contained in the rapeseed hydrolysates was probably not responsible for the increase in maximal cell density of insect cells.

According to Franek *et al.* (2000), the nutritive supply from small peptides and free amino acids is clear but they also considered a possible effect of larger and more specific peptides, *i.e.* bioactive peptides. Burtreau *et al.* (2003) showed that no such positive effect was observed with the replacement of wheat hydrolysate by a mixture of various nutrients (corresponding amino acids), suggesting that the effect of the peptone is probably not only nutritional but also could function as growth, survival and anti-apoptotic factor for CHO cells.

4. Effect of the culture medium supplementation with sinapic acid

Another hypothesis to explain the effects of the peptones on cultured cells is the presence of molecules that are not of peptidic nature, like vitamins, essential fatty-acids or even biologically active molecules such as polyphenols. Indeed, for example, vitamins do not furnish energy, but they are essential for the energy transformation and regulation of metabolism (Sanfeliu *et al.*, 1996). More particularly, plant polyphenols, are a large group of natural antioxidants which are serious candidates in the explanation of the protective effects of vegetable against cancer and cardiovascular diseases (Arts and Hollman, 2005) and which are known to protect mammalian cells from hydrogen peroxide (Nakayama *et al.*, 1992). Thus, in order to identify a potential effect of polyphenols present in the rapeseed peptidic fraction, as free polyphenols or linked to the peptides, on CHO cell cultures, a reference culture was supplemented with sinapic acid. Indeed, this acid is the phenolic acid which is mainly present in the rapeseed (Naczka *et al.*, 1992). Those assays were performed, in triplicate, with CHO cells cultivated in 96 well plates containing 200 μ L of reference medium, 200 μ L of reference medium + 25 mg/L of sinapic acid, 200 μ L of reference medium + 4 g/L of rapeseed peptidic fraction, 200 μ L of reference medium + 25 mg/L of sinapic acid + 4 g/L of rapeseed peptidic fraction.

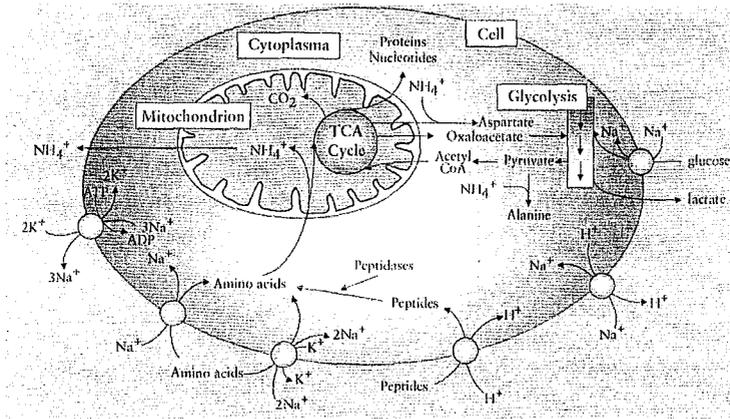


Figure 4 : Some aspects of the metabolism of free amino acids and peptides in animal cell.

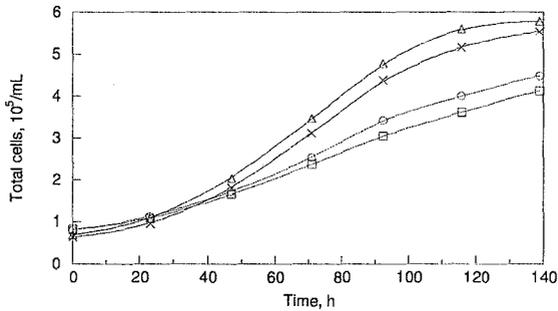


Figure 5 : Kinetics of CHO cell growth, in 96 well plates containing 200 μ L of different media : reference medium (○), reference medium supplemented with 25 mg/L of sinapic acid (◻), reference medium supplemented with 4 g/L of rapeseed peptidic fraction (△) and reference medium supplemented with 25 mg/L of sinapic acid and 4 g/L of rapeseed peptidic fraction (×).

As can be seen in figure 5, the reference culture had an identical growth than the reference culture supplemented with sinapic acid. Moreover, the culture supplemented with both rapeseed peptidic fraction and polyphenols and the culture supplemented only with the rapeseed peptidic fraction displayed similar growth profiles. Thus, the promoting effect of the rapeseed peptidic fraction on the maximal cell density is not due to the polyphenols. However, though the polyphenols seem not to be not responsible for the growth promoting effects, an effect allowing to reduce the specific cell death rate or/and an anti-apototic effect cannot be excluded.

Conclusion

It appears that rapeseed peptidic fraction supplementation improves the performances of an IFN-producing CHO cell line, adapted to suspension conditions and serum-free medium. Significant increases in maximal cell densities, in culture longevity and IFN production have been obtained when rapeseed peptidic fraction was added at a concentration of 4 g/L. This peptidic fraction, characterized by a particular range of molecular weight (0-5000 Da) displayed a growth and production promoting effect. It could be the result of the combination of on the one hand, an improvement of the nutritional performance by small oligopeptides and on the other hand the presence of large oligopeptides that could display some growth factor-like or antiapoptotic activities. Thus, the presence of peptides with high and low molecular weight seems to be an essential characteristic to improve culture performances. Moreover, polyphenols existing in the rapeseed peptidic fraction do not seem to have any effect on cell growth. However, we cannot exclude a potential anti-apoptotic activity of these components. Besides, our results pointed out a different metabolic behaviour of CHO C5 cells cultivated in a reference serum-free medium compared to a serum-free medium supplemented with 4 g/l of rapeseed's peptides. The rapeseed supplementation permitted to reduce the whole metabolism of carbohydrates : a decrease in the consumption rates of glucose and glutamine was registered as well as a conversion of glucose into lactate. These results indicate that rapeseed peptidic fraction could be a potent and widely effective supplement for mammalian cell culture as well as for insect cell culture (Deparis *et al.*, 2003). Further studies will be necessary to give clues regarding the potential anti-apoptotic activities of this fraction. A last, additional separation and identification of peptides from this rapeseed fraction will be performed to precisely identify peptides involved in growth and culture longevity extension.

Principales contributions de la publication

L'étude précédente indique que l'utilisation de la fraction peptidique de colza en tant que supplément d'un milieu de culture sans sérum conduit, non seulement, à l'augmentation de la concentration de cellules, à l'accroissement de la survie cellulaire mais également, à l'élévation importante des capacités de production de la protéine thérapeutique. En effet, à la fois, la quantité finale d'interférons produits et la vitesse spécifique de production sont accrues ; la première étant multipliée par 5 et la seconde par 1,5. De plus, en présence de la fraction peptidique, une réduction globale du métabolisme central des cellules a été observée. Aussi, il semble que la fraction peptidique de colza apporte directement aux cellules différents nutriments, leur permettant d'économiser de l'énergie qui leur est habituellement nécessaire pour les synthétiser et engendrant ainsi une diminution de leurs besoins énergétiques et carbonnés. Par la suite, un enrichissement par un mélange d'acides aminés équivalents aux peptides, a permis de montrer que le rôle joué par la fraction peptidique sur la croissance et le décès cellulaire n'est pas uniquement la conséquence d'un apport en acides aminés, mais également celle de la présence de peptides intègres ayant des activités de facteurs de croissance et/ou de survie. Enfin, la supplémentation du milieu par de l'acide sinapique a indiqué que les polyphénols n'étaient pas responsables, à eux seuls, de l'effet promoteur de croissance de la fraction peptidique. En résumé, il est important de retenir que la supplémentation du milieu de culture par la fraction peptidique de colza sélectionnée permet, à la fois, de promouvoir la croissance et la production des cellules CHO mais également de favoriser leur survie.

Suite à cette étude, il semble maintenant indispensable de vérifier la qualité des protéines produites et en particulier l'impact de la supplémentation du milieu de culture par la fraction peptidique de colza sur la glycosylation de l'interféron-gamma. Il serait également intéressant de mesurer et de comparer l'apoptose des cellules en culture, en présence et en absence de cette fraction peptidique et cela dans le but de caractériser une éventuelle activité anti-apoptotique de ces peptides.

II. Cinétique de cultures de cellules CHO supplémentées par un mélange d'acides aminés "sélectionnés"

Une des hypothèses formulée par plusieurs auteurs (Jan *et al.*, 1994 ; Schlaeger, 1996 ; Heidemann *et al.*, 2000) pour expliquer les effets promoteurs de croissance de peptones serait que ces dernières agissent uniquement en tant que suppléments nutritionnels et donc en tant que substituts des acides aminés dans les formulations de milieux de culture. Afin de tester cette hypothèse dans le cas de la fraction peptidique de colza, la croissance et le métabolisme des cellules CHO C5 ont été comparées avec trois milieux de culture différents : le milieu de référence, le milieu d'intérêt et le milieu de référence supplémenté par un mélange d'acides aminés libres "sélectionnés". Ce mélange correspond aux acides aminés libres après hydrolyse totale des peptides contenus dans la fraction peptidique.

L'étude cinétique et physiologique a été réalisée sur la croissance cellulaire, la consommation en glucose et glutamine, la production en lactate et ions ammonium et la production en IFN- γ . Les cultures discontinues ont été réalisées en flacons agités (spinners) de volume utile de 160 mL. Ces derniers ont été ensemencés avec 2.10^5 cellules/mL. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure V.1.

II.1. Effet d'un ajout d'acides aminés libres "sélectionnés" sur la croissance et le métabolisme de cellules CHO productrices d'interféron- γ

L'étude de la croissance des cellules nous a montrés, au cours de la partie I de ce chapitre, que la supplémentation du milieu de référence par le mélange d'acides aminés ne permet pas d'augmenter la densité cellulaire maximale par rapport au milieu de référence car dans les deux cas, elle atteint $5,5.10^5$ cellules/mL. De même, la durée de la phase exponentielle de croissance des cellules est similaire. Cependant, grâce à l'ajout des acides aminés libres, une phase de plateau apparaît, permettant à la densité cellulaire maximale de se maintenir sur plus de 80 heures, attestant ainsi du maintien d'une croissance cellulaire. Sans ajout d'acides aminés, la concentration des cellules viables décroît très rapidement, sans phase de stabilisation. Les vitesses spécifiques apparentes maximales de croissance, sont sensiblement similaires dans les trois milieux et leur évolution semblable dans les deux milieux ne contenant pas la fraction peptidique de colza. Ces premières observations suggèrent que l'effet promoteur de croissance de la fraction peptidique de colza n'est pas dû à une simple contribution nutritionnelle par l'apport d'acides aminés. En effet, la supplémentation en acides

aminés libres ne suffit pas à retrouver les performances de croissance obtenues lors de l'ajout de la fraction peptidique dans le milieu.

Le glucose, présent à une concentration initiale de 22 mM dans les trois milieux diminue parallèlement à l'augmentation de la croissance cellulaire. Il est entièrement consommé au cours des cultures supplémentées en acides aminés (au bout de 160 heures) ou en fraction peptidique (au bout de 210 heures). Cependant, sa concentration devenant nulle qu'une fois le déclin cellulaire déjà largement amorcé, il ne semble pas être responsable de la mort cellulaire. Le rendement stœchiométrique $Y_{\text{cell/glc}}$, décrivant la capacité à former une quantité de cellules par mole de glucose consommée, est plus important dans le cas des lignées cultivées dans le milieu supplémenté par la fraction peptidique, $0,5 \cdot 10^{11}$ cellules/mole, que dans celui supplémenté par les acides aminés libres, $0,3 \cdot 10^{11}$ cellules/mole. Ces valeurs indiquent que les cellules utilisent plus efficacement le glucose pour la production de cellules lorsque le milieu est enrichi en peptides plutôt qu'en acides aminés.

La vitesse spécifique de consommation de ce substrat est abaissée lors de l'ajout d'acides aminés libres par rapport au milieu de référence, mais dans une moindre mesure que lors de la supplémentation par la fraction peptidique. La présence directe d'acides aminés permet donc aux cellules d'économiser une partie de l'énergie qui leur est habituellement nécessaire pour les synthétiser, réduisant ainsi leurs besoins carbonés et énergétiques. La présence de peptides quant à elle, augmente davantage cette économie d'énergie.

La concentration maximale de lactate est plus importante lors de la culture dans le milieu supplémenté par des acides aminés. Cette quantité importante de lactate est couplée à une vitesse spécifique de production qui reste élevée durant une période de près de 90 heures de culture. Cependant, il est difficile de conclure quant à l'influence de cette concentration (34 mM) sur l'arrêt de la croissance cellulaire. En effet, Schlaeger et Schumpp (1989) ont montré qu'une concentration de plus de 100 mM de lactate était nécessaire pour inhiber la croissance cellulaire de 50% et Lao et Toth, en 1997, que l'ajout de 30 mM de lactate n'avait pas d'effet sur la vitesse spécifique de croissance de cellules CHO. De même, Geaugey *et al.* (1989) et Goergen (1992), ont respectivement montré qu'une concentration de 50 mM et de 55 mM de lactate n'était pas toxique pour une lignée cellulaire d'hybridomes, pourtant plus sensibles à ce type de variations que les cellules CHO. Cependant, Burteau *et al.* (2004) pensent que l'arrêt de la croissance des cellules CHO est la résultante d'une concentration d'environ 30 mM de lactate.

De la même façon que pour le glucose, la concentration en glutamine décroît à mesure que la croissance cellulaire augmente. Elle atteint une valeur de 0 dans les deux cultures supplémentées mais ne semble pas non plus être responsable de la phase de déclin cellulaire.

De même, le rendement stoechiométrique $Y_{\text{cell/gln}}$, décrivant la capacité à former une quantité de cellules par mole de glutamine consommée, est plus important dans le milieu d'intérêt ($1,8 \cdot 10^{11}$ cellules/mole) que dans le milieu supplémenté par les acides aminés libres et dans le milieu de référence ($1,3 \cdot 10^{11}$ cellules/mole). Ainsi, seul l'apport particulier de la fraction peptidique permet aux cellules d'utiliser plus efficacement la glutamine et d'économiser un peu d'énergie.

La production des ions ammonium ainsi que leur vitesse spécifique de production moyenne dans le milieu supplémenté en acides aminés libres sont relativement similaires à celles obtenues avec le milieu de référence ; la concentration finale étant légèrement supérieure, du fait d'une quantité de cellules plus importante, dans le milieu supplémenté par les acides aminés. Pour la culture en milieu d'intérêt, ces deux valeurs sont légèrement supérieures.

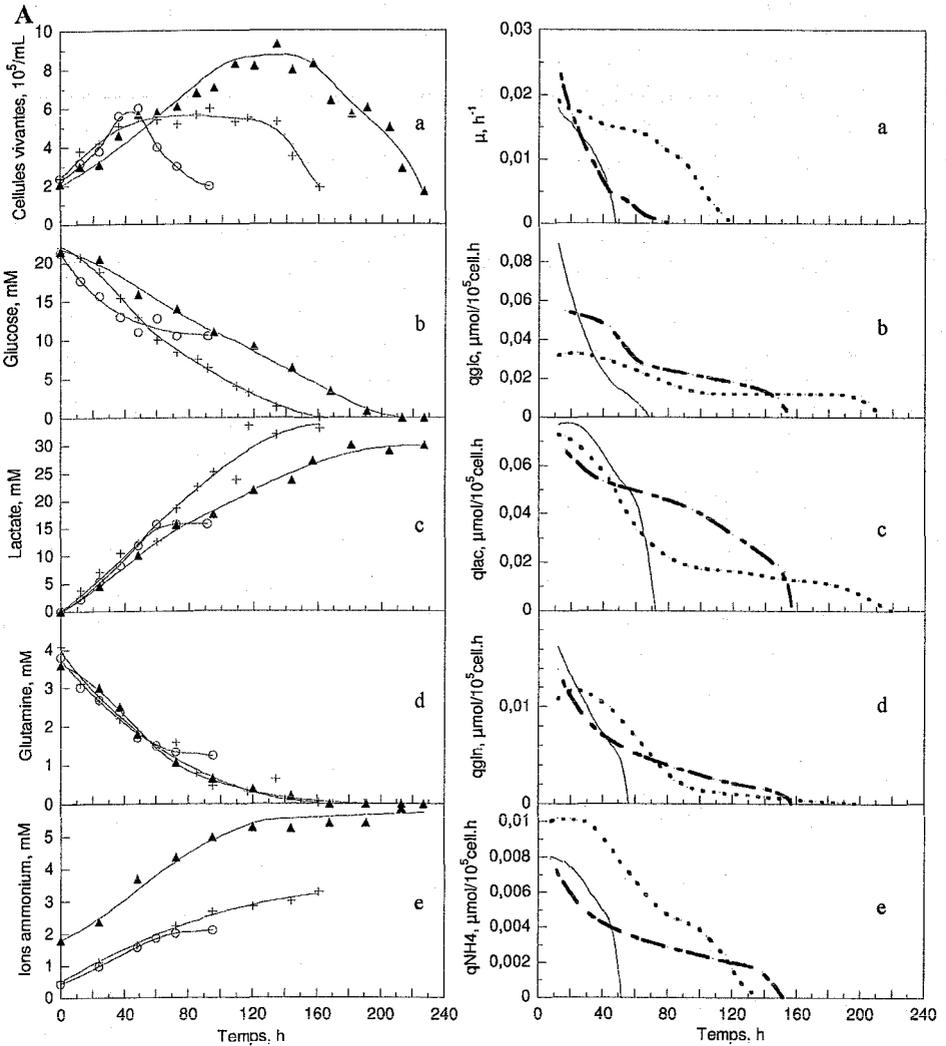


Figure V.1 : A : Croissance (a) et métabolisme des cellules CHO C5, en flacons agités- glucose (b), lactate (c), glutamine (d), ions ammonium (e) - en milieu de référence (o), en milieu de référence supplémenté avec un mélange d'acides aminés libres (+) et en milieu d'intérêt (\blacktriangle)

B : Evolution des vitesses spécifiques des cellules CHO C5 en milieu de référence (—), en milieu référence supplémenté avec un mélange d'acides aminés libres (---) et en milieu d'intérêt (.....) - vitesses spécifiques de croissance (a), de consommation de glucose (b) et de glutamine (d), de production de lactate (c), et d'ions ammonium (e).

Comme nous l'avions précisé dans la partie bibliographique, deux hypothèses majeures ont été formulées dans le but d'expliquer l'effet promoteur de croissance des peptones sur la culture de cellules animales : un effet nutritionnel (Jan *et al.*, 1994 ; Schlaeger, 1996 ; Heidemann *et al.*, 2000) ou un effet bioactif (Rasmussen *et al.*, 1998 ; Franek et Katinger, 2002 ; Burteau *et al.*, 2003 ; Deparis *et al.*, 2003 ; Franek *et al.*, 2003). Nos résultats semblent indiquer que notre fraction d'intérêt de colza présente une activité "mitotique", facteur de croissance qui lui est propre. En effet, le mélange d'acides aminés sélectionné pour fournir un apport nutritionnel similaire à la fraction peptidique de colza, ne permet pas de retrouver tous les effets positifs obtenus par l'ajout de la fraction de colza. Cependant, un effet nutritionnel de la fraction de colza ne peut être complètement écarté au vu de l'obtention d'une phase plateau lors de la supplémentation du milieu de culture, soit par le mélange d'acides aminés, soit pas la fraction peptidique de colza. Ainsi, Geaugey *et al.* (1989) ont montré que la supplémentation d'une culture continue d'hybridomes par du bouillon de tryptose phosphate permettait de maintenir la prolifération cellulaire contrairement à une supplémentation par des acides aminés libres mettant ainsi en évidence l'apport nutritionnel particulier incombant aux peptides. De plus, selon Hopfer (1997), le transport des di- et tripeptides est indépendant du transport des acides aminés libres. En effet, il a été montré que le transport actif des peptides dans ces cellules est réalisé grâce à un gradient de protons plutôt qu'un gradient sodium communément utilisé dans les systèmes de transport d'acides aminés et de glucose. Grâce à ce mécanisme, le transport des peptides serait favorisé par rapport à celui des acides aminés (Heidemann *et al.*, 2000 ; Pham *et al.*, 2003).

II.2. Effet d'un ajout d'acides aminés libres "sélectionnés" sur la production d'interféron- γ des cellules CHO

La figure V.2 présente les résultats concernant la production d'interféron-gamma au cours des cultures discontinues dans les trois milieux de culture étudiés.

Pour les trois cultures, l'interféron-gamma s'accumule dans le milieu essentiellement durant la phase de croissance cellulaire. Les concentrations maximales atteintes et les vitesses spécifiques maximales obtenues sont respectivement de 650, 1500 et 2600 $\mu\text{g/L}$ et 4, 4,5 et 7,5 $\text{ng}/10^5 \text{cellules.h}$ dans le milieu de référence, le milieu de référence supplémenté avec un mélange d'acides aminés libres et le milieu d'intérêt. Ainsi, une augmentation de la quantité maximale d'IFN est observée dans le milieu de référence supplémenté avec un mélange

d'acides aminés libres par rapport au milieu non supplémenté. Celle-ci semble essentiellement être la résultante du maintien en vie des cellules durant la période de 80 heures de la phase stationnaire à X_{max} . La concentration atteinte reste nettement inférieure à celle obtenue avec le milieu d'intérêt. Ces résultats concordent avec ceux précédemment obtenus par Duval *et al.*, (1992) qui avait montré que la supplémentation d'un milieu de culture par un mélange d'acides aminés ne permettait pas d'augmenter la vitesse spécifique de production d'anticorps.

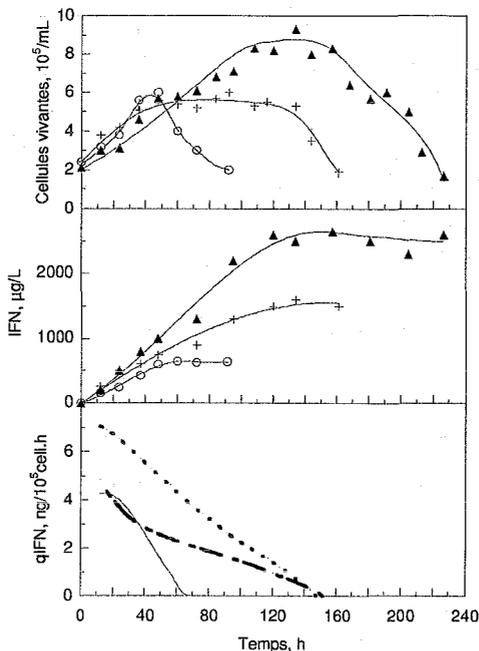


Figure V.2 : Croissance (a), production d'IFN (b) et évolution des vitesses spécifiques de production (c) au cours de cultures discontinues de cellules CHO C5 réalisées, en flacons agités, dans du milieu de référence (o, —), du milieu de référence supplémenté avec un mélange d'acides aminés libres (+, - - -) et du milieu d'intérêt (▲,).

Un effet nutritionnel des petits peptides ne peut être écarté. En effet, l'addition de la fraction peptidique, en apportant des acides aminés sous forme de petits peptides, permet aux cellules d'économiser l'énergie nécessaire pour leur synthèse au profit de la production de molécules recombinantes. Cependant, l'action promotrice de production peut sans doute être imputée à une fonction biologique spécifique résultant de la composition peptidique particulière de la fraction d'intérêt. En effet, les acides aminés doivent être sous forme peptidique pour qu'une

augmentation de la vitesse spécifique de production de l'interféron gamma soit observée. La fraction de colza contient donc vraisemblablement des peptides capables d'interagir avec des récepteurs de surface cellulaire et d'induire ainsi des signaux de transduction conduisant à une réponse spécifique comme le suggèrent Burteau *et al.* (2003) et Ballez *et al.* (2004) dans le cas d'autres hydrolysats végétaux.

III. Effet de la fraction peptidique de colza sur la lyse cellulaire

La mort cellulaire est classiquement évaluée à l'aide de la méthode au Bleu Trypan qui permet de comptabiliser les cellules mortes incapables d'exclure ce colorant ; elles apparaissent alors bleutées au microscope. Cependant, cette technique ne prend pas en compte les cellules mortes lysées et peut donc sous-estimer, dans une proportion non négligeable, le décès cellulaire réel (Goergen *et al.*, 1993). Afin de contourner ce problème, nous avons déterminé la quantité de cellules dites lysées grâce à la mesure de l'activité lactate déshydrogénase (LDH) relarguée dans le surnageant de culture. En outre, ce dosage va nous permettre de vérifier que la présence de la fraction peptidique de colza dans le milieu de culture de référence, n'induit pas une lyse accrue des cellules en culture, caractérisée alors par une activité plus importante de la LDH dans le surnageant de culture.

La LDH est une enzyme glycolytique responsable de la réduction du pyruvate en lactate. Son relargage par les cellules a été largement étudié afin d'estimer la quantité de cellules mortes (Merten *et al.*, 1992 ; Wagner *et al.*, 1992 ; Goergen *et al.*, 1993) et il s'est avéré que la cinétique de relargage de la LDH n'était pas toujours identique d'une culture cellulaire à une autre. Plusieurs paramètres sont à considérer : type de cellules, pH, taux d'oxygénation ou encore composition du milieu de culture (Geaugey *et al.*, 1990 ; Goergen, 1992 ; Chevalot, 1992). D'après Wagner (1990) et Avgerinos *et al.* (1990), les cellules de rein humain, tout comme les cellules CHO mortes relarguent la totalité de cette enzyme cytoplasmique. Ainsi, il existe une corrélation directe entre l'activité LDH dans le surnageant et la concentration de cellules mortes colorées par le bleu trypan. De plus, des études ont montré que l'activité LDH était stable durant environ dix jours (240 heures) à 37°C et durant plus de 30 jours à 4°C (Goergen *et al.*, 1993). La durée des cultures étudiées ne dépassant pas les 200 heures, la perte de l'activité enzymatique peut être négligée.

La figure V.3 représente l'accumulation de cellules mortes colorées par le Bleu Trypan et la quantité de LDH retrouvée dans les milieux de culture testés.

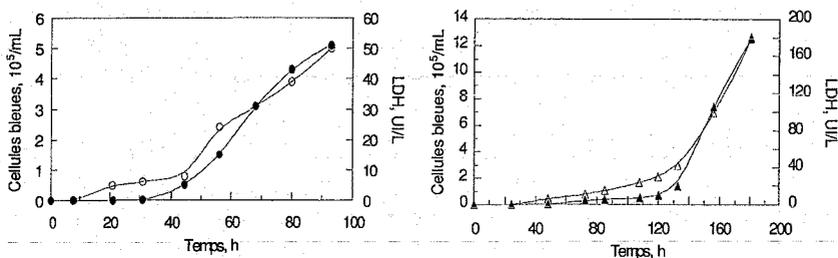


Figure V.3 : Evolution des concentrations de cellules bleues (symboles pleins) et de LDH (symboles vides) dans le milieu de référence (○) ou dans le milieu d'intérêt (Δ). Les cinétiques complètes de ces deux cultures discontinues en réacteurs peuvent être retrouvées dans le paragraphe V.1, figure 1.

La population des cellules mortes visibles reste faible pendant la phase de croissance des deux cultures et également durant la phase de plateau cellulaire jusqu'à environ 120 heures pour la culture supplémentée avec la fraction peptidique de colza. Au delà, le nombre de cellules bleues ainsi que l'activité LDH extracellulaire augmentent rapidement. L'activité LDH extracellulaire maximale est de 50 UI/L pour la culture de référence et de 180 UI/L pour la culture en milieu d'intérêt. La forte activité LDH retrouvée lors de la culture supplémentée avec la fraction de colza s'explique par un nombre de cellules mortes beaucoup plus important et donc un relargage beaucoup plus fort dans le milieu de culture.

Pour évaluer la lyse cellulaire, il suffit alors de connaître le contenu moyen en LDH d'une cellule viable ($Y_{LDH/cellule\ viable}$) et de la confronter à la quantité moyenne de LDH présente dans le surnageant de culture rapportée au nombre de cellules bleues ($Y_{LDH/cellule\ bleue}$). L'activité LDH mesurée après la lyse provoquée des cellules vivantes est représentée dans la figure V.4. Le contenu intracellulaire moyen des cellules en LDH ($Y_{LDH/cellule\ viable}$) correspond à la valeur de la pente de ces droites. Dans les deux cas, il est de 21 UI/10⁸ cellules. Cette valeur, similaire quel que soit le milieu de culture utilisé, indique que l'addition de la fraction peptidique de colza ne modifie pas le contenu intracellulaire en LDH contrairement à l'addition de sucres ou d'acides aminés (Goergen *et al.*, 1992). Le contenu intracellulaire en LDH des cellules CHO C5 est proche de celui d'hybridomes (25 UI/10⁸ cellules) et de celui des cellules CHO DUKXB11 (20 UI/10⁸ cellules) respectivement déterminé par Goergen *et al.* (1993) et Schröder *et al.* (2004).

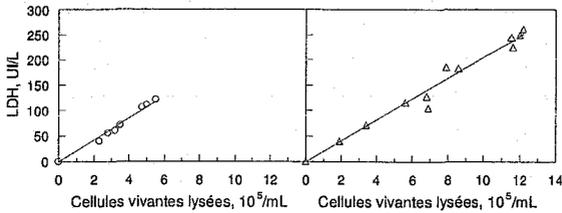


Figure V.4 : Contenu intracellulaire en LDH des cellules vivantes en culture dans le milieu de référence (○) ou dans le milieu d'intérêt (△).

La figure V.5 représente la corrélation entre l'activité LDH accumulée dans le milieu de culture et la concentration des cellules mortes colorées par le Bleu Trypan.

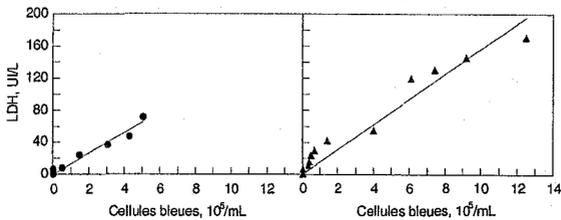


Figure V.5 : Concentration en LDH retrouvée dans le surnageant de culture en fonction du nombre de cellules colorées par le bleu trypan. Milieu de référence (●) et milieu d'intérêt (▲).

La pente de la droite, correspondant à la quantité de LDH extracellulaire en fonction de la concentration de cellules bleues est de $13 \text{ UI}/10^8$ cellules bleues, pour la culture de référence et de $15 \text{ UI}/10^8$ cellules bleues pour celle avec le milieu d'intérêt. Ces valeurs étant inférieures au rendement théorique ($20 \text{ UI}/10^8$ cellules), l'hypothèse d'une absence de lyse peut donc être avancée et cela quel que soit le milieu de culture utilisé. En effet, si les cellules avaient été lysées, la quantité de LDH relarguée en fonction de la concentration en cellules mortes visibles (bleues) serait largement supérieure au rendement théorique, précédemment déterminé.

Ainsi, nous retiendrons que l'ajout de la fraction peptidique d'intérêt dans le milieu de culture ne génère pas de lyse des cellules. Ces résultats viennent corroborer ceux de Ballez *et al.* (2004) qui ont montré que l'ajout d'un hydrolysat de riz dans un milieu sans sérum et sans protéine n'induisait pas de lyse supplémentaire des cellules CHO. Ceci est un avantage car la lyse des cellules en culture peut provoquer la libération dans le milieu de culture de substances telles que des protéases qui peuvent alors être responsables de la dégradation du produit excrété dans le milieu de culture.

IV. Effet de la fraction peptidique de colza sur l'activité pyruvate carboxylase des cellules CHO

Suite à la diminution importante de la vitesse spécifique de consommation du glucose, observée lors des cultures discontinues en réacteur, supplémentées par 4 g/L de fraction peptidique de colza, nous avons étudié plus particulièrement l'activité de la pyruvate carboxylase (PC). En effet, comme nous l'avons vu précédemment, la PC est une enzyme anaplérotique catalysant la carboxylation irréversible du pyruvate en oxaloacétate et, par conséquent, chargée d'approvisionner le cycle de Krebs en molécules à quatre carbones. Le suivi de cette activité a été réalisé selon le protocole décrit dans le paragraphe I.4.6 du chapitre II. Le tableau V.1 présente l'activité pyruvate carboxylase moyenne mesurée et les vitesses spécifiques de consommation du glucose en fonction du milieu de culture utilisé.

	Activité pyruvate carboxylase moyenne (mmole/mn.mg prot)	Vitesse spécifique moyenne de consommation du glucose ($\mu\text{mol}/10^5\text{cell.h}$)
Milieu de référence	350	0,04
Milieu d'intérêt	200	0,02

Tableau V.1 : Activité Pyruvate Carboxylase et vitesse spécifique de consommation du glucose moyennes en fonction du milieu de culture utilisé lors de cultures discontinues en réacteur.

D'après ces résultats, il semble donc que l'activité spécifique moyenne de l'enzyme augmente avec le flux entrant de glucose. En effet, la vitesse spécifique moyenne de consommation du glucose ainsi que l'activité spécifique moyenne de la PC sont environ diminuées de moitié lors de l'ajout de 4 g/L de fraction peptidique dans le milieu de culture. Ces résultats viennent ainsi confirmer les observations de Yallop *et al.* (2003), qui ont montré que l'activité de la PC était corrélée avec le flux entrant dans le cycle de Krebs.

Il est également possible, grâce à ces résultats de calculer la vitesse spécifique moyenne de transformation du pyruvate permise par de telles activités. Ainsi, sachant que 10^6 cellules correspondent à 0,5 mg de poids sec, soit 0,25 mg de protéines, une activité spécifique de 350 nmol/mn.mg protéine équivaut à une vitesse de consommation de $0,5 \mu\text{mol}/10^5$ cellules.h et à une activité de 200 nmol/mn.mg protéine équivaut à une vitesse de consommation de $0,3 \mu\text{mol}/10^5$ cellules.h. Or, comme nous l'avons observé précédemment, la vitesse spécifique moyenne de consommation du glucose est de $0,04 \mu\text{mol}/10^5$ celules.h dans le milieu de référence et de $0,02 \mu\text{mol}/10^5$ cellules.h dans le milieu d'intérêt. Ces différentes valeurs, déterminées *in-vitro* semblent donc montrer que la capacité de transformation du pyruvate par

la PC est largement supérieure à la quantité qui lui est fournie par le catabolisme du glucose. Selon ces données *in vitro* qui restent préliminaires, la PC ne serait donc pas une enzyme limitante pour la croissance des cellules CHO et cela quel que soit le milieu de culture utilisé. Ainsi, ce résultat permettrait d'expliquer le fait que, lors de la culture en milieu de référence, alors que l'activité PC est plus élevée, le rendement lactate/glucose reste tout de même constant. En effet, "habituellement", l'augmentation de l'activité PC est corrélée avec une augmentation du flux du pyruvate vers le cycle de Krebs et de ce fait avec une diminution de la production de lactate, caractérisée par un rendement glucose/lactate plus faible (Irani *et al.*, 1999 ; Elias *et al.*, 2003 ; Yallop *et al.*, 2003).

Finalement, considérant que, lors de l'ajout de la fraction peptidique de colza dans le milieu de culture, le rendement lactate/glucose reste constant, les vitesses spécifiques de consommation du glucose et de production du lactate diminuent et l'activité spécifique de la PC diminue, nous pouvons penser que l'utilisation du milieu d'intérêt induit un ralentissement général du métabolisme cellulaire, pouvant sans doute être expliqué par le fait qu'en présence de la fraction peptidique les cellules ont moins besoin de synthétiser des molécules précurseurs de la biomasse déjà présentes dans le milieu d'intérêt.

V. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était, dans un premier temps, d'évaluer l'impact d'une fraction peptidique de colza sur les cinétiques de croissance de cellules CHO C5 productrices d'interféron-gamma, leur métabolisme et la production d'IFN- γ dans le milieu de culture. Les principaux résultats obtenus sont résumés dans la figure V.6.

	Milieu d'intérêt / milieu de référence	
$[X_v]_{\max}$	++	} Stimulation de la croissance
Phase stationnaire à $X_{v \max}$	+	
μ_{\max}	= mais stable plus longtemps	} Effet positif sur la survie
Viabilité	++	
Déclin cellulaire	-	
Durée de culture	+++	} Ralentissement du métabolisme central

q_{glucose}	-	
q_{lactate}	-	
$q_{\text{glutamine}}$	-	
q_{NH_4}	-	} Stimulation de la production
IFN	+++	
q_{IFN}	+	

Figure V.6. : Principales différences de croissance et de métabolisme des cellules CHO cultivées en milieu d'intérêt par rapport au milieu de référence lors de cultures discontinues, en réacteur.

Il ressort de ces résultats que la fraction peptidique de colza présente, à la fois, des activités promotrices de croissance et de production ainsi que des activités permettant d'accroître la survie cellulaire. De plus, en apportant des nutriments supplémentaires, la fraction de colza permet aux cellules en culture de ralentir leur métabolisme central.

Dans un second temps, nous avons essayé, grâce à différentes suppléments du milieu de culture, de comprendre de quelle façon cette fraction agissait sur les cellules en culture. Ainsi, afin d'évaluer un possible effet nutritionnel de la fraction peptidique de colza, l'addition, au milieu de référence, d'un mélange d'acides aminés libres "sélectionnés" a été effectuée. Puis, dans le but de déterminer le rôle plus particulier des polyphénols contenus dans cette fraction, le milieu de référence a été supplémenté par de l'acide sinapique, polyphénol très majoritairement présent dans le colza. Les principaux résultats découlant de ces travaux sont résumés dans la figure V.7.

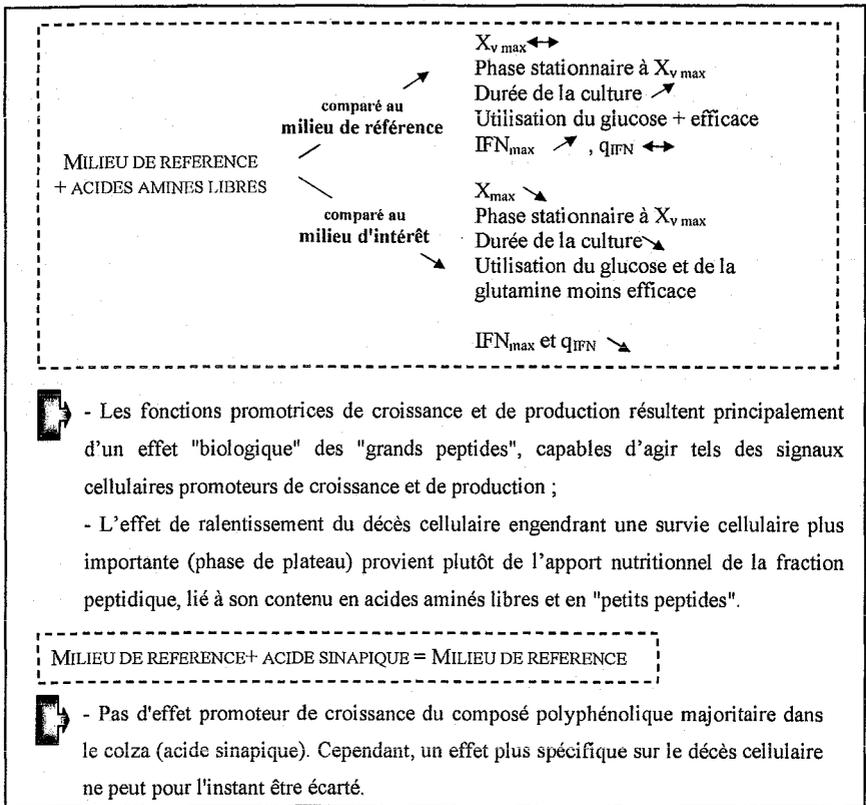


Figure V.7 : Effets de deux suppléments particulières du milieu de référence sur la croissance, la production et le métabolisme des cellules CHO, lors de cultures discontinues en flacons agités : (i) mélange d'acides aminés libres, (ii) acide sinapique.

Il apparaît donc que la supplémentation d'un milieu de culture sans sérum avec la fraction peptidique présente à la fois un intérêt nutritionnel et un intérêt "bioactif", facteur de croissance et de production sur les cellules CHO C5. En effet, la composition en acides aminés libres, di- et tripeptides de la fraction semble diminuer la vitesse spécifique de décès et ainsi prolonger la durée de vie des cellules. D'autre part, sa composition particulière en peptides de plus grande taille, semble être responsable d'un effet "mitotique" et activateur de production protéique. Ainsi, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus suite au "sous-fractionnement" de la fraction peptidique de colza (chapitre IV). Ce fractionnement supplémentaire avait, en effet, permis de montrer que les peptides de 500 à 1000 Da étaient les principaux acteurs, responsables de l'augmentation de la densité cellulaire maximale.

CHAPITRE VI

ATOUTS DE LA FRACTION PEPTIDIQUE DE COLZA AU COURS DES DIFFERENTES ETAPES D'UN PROCEDE DE CULTURE

CHAPITRE VI : ATOUTS DE LA FRACTION PEPTIDIQUE DE COLZA AU COURS DES DIFFERENTES ETAPES D'UN PROCEDE DE CULTURE

I. Adaptation de différentes lignées cellulaires à des milieux sans sérum en présence de peptides de colza	169
I.1. Adaptation de cellules adhérentes CHO K1 dhfr- en milieu sans sérum supplémenté par la fraction peptidique de colza.....	170
I.1.1. Adaptation brutale.....	170
I.1.2. Adaptation progressive.....	171
I.2. Adaptation brutale de cellules Vero au milieu sans sérum supplémenté par la fraction peptidique de colza.....	174
I.3. Adaptation d'hybridomes au milieu sans sérum supplémenté par la fraction peptidique de colza.....	177
I.3.1. Adaptation brutale.....	177
I.3.2. Adaptation progressive.....	178
I.4. Culture de cellules NSO en milieu sans sérum supplémenté par la fraction peptidique de colza.....	179
I.5. Conclusion.....	181
II. Validation d'un milieu sans protéine animale supplémenté avec des peptides de colza	183
II.1. Elaboration d'un milieu de routine dépourvu de protéines animales.....	183
II.2. Etudes cinétiques de cultures de cellules CHO C5 en milieu sans protéine animale supplémenté par des peptides de colza.....	184
II.2.1. Cinétique de croissance de cellules CHO C5 en milieu dépourvu de protéine animale.....	184
II.2.2. Métabolisme de cellules CHO C5 en milieu sans protéine animale.....	187
II.2.3. Production d'IFN par les cellules CHO C5 en milieu sans protéine animale.....	190
II.2.4. Conclusions.....	191
III. Capacité de la fraction peptidique de colza à supporter l'extrapolation à l'échelle du bioréacteur ...	193
III.1. Cinétiques comparées de cultures en flacon agité et bioréacteur en présence de la fraction peptidique de colza.....	194
III.1.1. Comparaison de la croissance et du métabolisme cellulaire, en milieu d'intérêt, pour différentes échelles de culture.....	194
III.1.2. Comparaison des performances de production cellulaire, en milieu d'intérêt, pour différentes échelles de culture.....	197
III.2. L'utilisation du milieu d'intérêt est-elle extrapolable à l'échelle industrielle ?.....	198
III.3. Conclusion.....	200
IV. Autres atouts de la fraction peptidique de colza	202
IV.1. Effet cryoprotecteur.....	202
IV.2. Résistance à la stérilisation.....	203
IV.3. Répétabilité inter-lots.....	204
V. Conclusion	206

CHAPITRE VI : ATOUTS DE LA FRACTION PEPTIDIQUE DE COLZA **AU COURS DES DIFFERENTES ETAPES D'UN** **PROCEDE DE CULTURE**

Suite à la sélection de la fraction peptidique d'intérêt de colza, permettant l'augmentation de la densité cellulaire maximale et de la production protéique, ainsi que la diminution de la vitesse spécifique de décès cellulaire, nous nous sommes attachés aux potentialités d'utilisation de cette fraction au cours des principales étapes du procédé cellulaire, telles que la disponibilité de la matière première, la répétabilité du procédé d'obtention de la fraction peptidique, sa stérilisation, la cryoconservation des cellules, l'adaptation des cellules à un milieu sans sérum et/ou sans protéine et l'extrapolation à des cultures en réacteur.

I. Adaptation de différentes lignées cellulaires à des milieux sans sérum en présence de peptides de colza

Comme nous l'avons abordé dans la partie bibliographique de cette thèse, afin de limiter principalement les risques de présence d'agents de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) lors de la préparation de produits pharmaceutiques, les législations, tant nationales qu'internationales, vont évoluer dans un futur proche vers l'interdiction d'utiliser des produits d'origine animale (Castle et Robertson, 1998). Le sérum, et si possible les protéines d'origine animale, doivent ainsi être éliminés des milieux de culture utilisés pour la production industrielle de protéines recombinantes (Asher, 1999). Par ailleurs, il est parfois utile de débiter une culture dans un milieu avec sérum puis de la transférer rapidement en milieu dépourvu de sérum (et/ou de protéine animale). Tel est le cas, par exemple, lors de l'obtention de nouvelles lignées cellulaires par modification génétique (transfection). En effet, dans le but de favoriser la croissance des cellules qui viennent d'être transfectées, il est préférable de les maintenir dans un milieu contenant du sérum et de ne les passer en milieu sans sérum qu'une fois leurs capacités de croissance retrouvées. De même, l'étape de congélation sera mieux supportée par les cellules si elle est réalisée en milieu avec sérum. Lors de la décongélation la viabilité cellulaire sera alors plus élevée. Il sera alors nécessaire de transférer le plus rapidement possible les cellules en milieu sans sérum. Enfin, l'utilisation de sérum dans les

milieux de culture permettant l'obtention de densités cellulaires généralement plus élevées, il peut être intéressant, dans un premier temps, de faire croître les cellules dans un tel milieu afin d'obtenir une quantité de cellules la plus importante possible et dans un second temps, de passer à un milieu sans sérum pour produire les protéines recombinantes.

Le passage d'un milieu avec sérum à un milieu sans sérum constitue un changement profond d'environnement pour les cellules et donc une perturbation qui peut leur être fatale. Pour éviter cela, le transfert des cellules est, le plus souvent, réalisé graduellement dans des milieux incluant des concentrations décroissantes de sérum de manière à adapter progressivement les cellules au nouveau milieu sans sérum (Higuchi, 1976 ; Barnes et Sato, 1980 ; Freshney, 1994 ; Scharfenberg and Wagner, 1995 ; Mather et Roberts, 1998 ; Sinacore *et al.*, 2000). Cependant, cette adaptation est souvent longue et fastidieuse (Renner *et al.*, 1993 ; Zang *et al.*, 1995 ; Zanghi *et al.*, 2000). De plus, bien que de nombreux milieux de culture de cellules dépourvus de sérum soient actuellement disponibles dans le commerce, aucun n'est encore capable de subvenir aux besoins spécifiques de toutes les principales lignées cellulaires.

Il apparaît donc essentiel de trouver des éléments permettant de faciliter l'adaptation à des conditions de culture sans sérum de différentes lignées cellulaires tout en assurant une prolifération cellulaire convenable. Dans ce but, la fraction peptidique de colza a été utilisée pour tenter d'adapter différentes lignées cellulaires communément utilisées en industrie à croître en milieu dépourvu en sérum. Ses capacités ont été comparées à celles d'hydrolysats végétaux commerciaux de soja, de blé, de riz et de pois. Toutes les adaptations ont été réalisées dans des flacons de culture statique d'un volume utile de 6 mL.

I.1. Adaptation de cellules adhérentes CHO K1 dhfr- en milieu sans sérum supplémenté par la fraction peptidique de colza.

I.1.1. Adaptation brutale

Dans un premier temps, nous avons réalisé des tentatives d'adaptation brutale (passage direct d'un milieu α MEM à 2% de sérum à un milieu α MEM à 0% de sérum) des cellules CHO K1 à des milieux sans sérum supplémentés avec soit notre fraction peptidique de colza, soit avec différents hydrolysats végétaux commerciaux QUEST (soja, blé, riz ou pois). Les concentrations des hydrolysats commerciaux utilisées sont celles préconisées par leur

producteur, soit 2 g/L et celle de la fraction peptidique de colza correspond à la concentration optimale définie précédemment, soit 4 g/L.

Malheureusement, le passage brutal des cellules d'un milieu avec sérum à un milieu sans sérum mais contenant les différents hydrolysats testés (commerciaux ou colza) n'a pas permis la croissance des cellules CHO K1. En effet, la mort cellulaire a été observée dès le 4^{ème} ou 5^{ème} passage, c'est-à-dire dès le 8^{ème} ou 10^{ème} jour. La survie de quelques jours peut s'expliquer par des traces de sérum pouvant subsister dans le milieu de culture et suffisant parfois à maintenir les cellules en vie.

I.1.2. Adaptation progressive

Suite à l'échec de l'adaptation brutale, une procédure d'adaptation progressive, schématisée sur la figure VI.1, a été mise en place. En effet, il a été prouvé que la diminution graduelle du sérum augmentait les chances d'adapter avec succès les cellules à un environnement sans sérum (Kim *et al.*, 2004). Dans un premier temps, le milieu α MEM supplémenté par 10% de sérum est remplacé par du milieu α MEM à 5% puis à 2% de sérum en l'espace de six passages, soit 12 jours. Dans un second temps, une fraction croissante de milieu contenant 2% de sérum est progressivement remplacée par du milieu α MEM sans sérum supplémenté par un hydrolysat protéique et les protéines TIB.

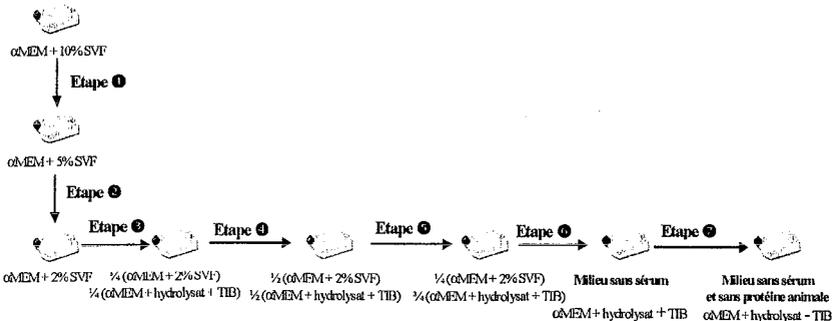


Figure VI.1 : Différentes étapes nécessaires à l'adaptation progressive des cellules CHO, au milieu α MEM, sans sérum et/ou sans protéine animale.

Le critère essentiel engendrant le passage à une étape ultérieure s'effectue lorsqu'un taux de croissance convenable des cellules est retrouvé. Le tableau VI.1 présente les résultats finaux des adaptations dans les différents milieux et le temps nécessaire pour les réaliser.

	Substitut végétal	% de sérum minimal requis pour la croissance	Temps nécessaire à l'adaptation
QUEST	HP 1510 (soja)		57 jours
	HP 4601 (blé)	0,5	45 jours
	HP 4605 Dev (blé)		84 jours
	HP 5603 Dev (riz)		45 jours
	HP 7401 Dev (pois)	2	12 jours
	Colza	0	32 jours

Tableau VI.1 : Résultats des adaptations progressives au milieu sans sérum en fonction des différents substituts utilisés.

Parmi les différents substituts de sérum testés, seule notre fraction peptidique de colza permet d'aboutir à une adaptation des cellules CHO K1 à un milieu complètement dépourvu de sérum. En effet, aucun des autres hydrolysats commerciaux testés, ne permet d'atteindre l'objectif de suppression totale du sérum, le taux minimum atteint étant de 0,5%. De plus, le temps nécessaire pour adapter ces cellules à ce taux minimal est très largement supérieur à celui observé avec le milieu supplémenté par notre fraction peptidique de colza.

Ces résultats suggèrent que les caractéristiques de la fraction peptidique de colza facilitent l'adaptation des cellules CHO K1 au milieu sans sérum. Les principales différences entre cette fraction de colza et les hydrolysats commerciaux QUEST concernent la pureté en matière azotée et la gamme de taille des peptides. Il est probable qu'un contenu en matière azotée de 90%, ainsi qu'une répartition assez large de la taille des peptides, soient des atouts pour favoriser l'adaptation des cellules à un milieu sans sérum.

Les photographies présentées dans la figure VI.2 montrent l'évolution de la morphologie des cellules CHO K1 au cours de leur adaptation au milieu sans sérum, supplémenté par 4 g/L de la fraction peptidique de colza. Ces photographies mettent en évidence un changement graduel de la morphologie cellulaire et cela proportionnellement à la diminution de la concentration en sérum dans le milieu de culture. Ainsi, dans le milieu supplémenté par 2% de sérum, les cellules CHO K1 sont adhérentes, elles présentent une morphologie typiquement fibroblastique. Au fur et à mesure de la diminution de concentration en sérum, les cellules se détachent du flacon de culture pour finalement aboutir à une morphologie sphérique caractéristique des cellules en suspension. Ce type de changement morphologique fut précédemment observé par Chun *et al.* (2003) lors de l'adaptation de cellules CHO à un milieu sans sérum.

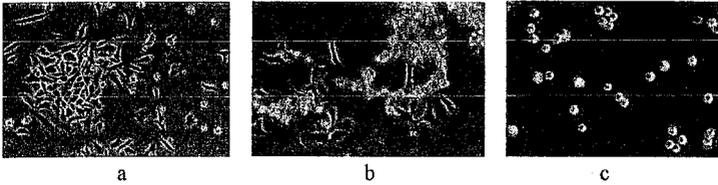


Figure VI.2 : Morphologie des cellules CHO K1 au cours de l'adaptation au milieu sans sérum supplémenté par 4 g/L de fraction peptidique de colza. a. 2% de sérum, b. 0,5% de sérum + 4 g/L fraction de colza, c. 0% de sérum + TIB + 4 g/L de fraction de colza

Suite aux résultats encourageants obtenus grâce à la supplémentation du milieu α MEM avec la fraction peptidique de colza, nous avons étudié la simplification du milieu de culture sans sérum jusqu'à un milieu sans aucune protéine animale. Pour cela, les trois protéines animales (transferrine, insuline, albumine bovine : TIB) présentes dans la formulation initiale du milieu de culture sans sérum ont été éliminées. L'évolution de la croissance des cellules au cours de l'adaptation au milieu sans sérum contenant les protéines TIB, puis au milieu sans sérum et sans protéine est présentée dans la figure VI.3.

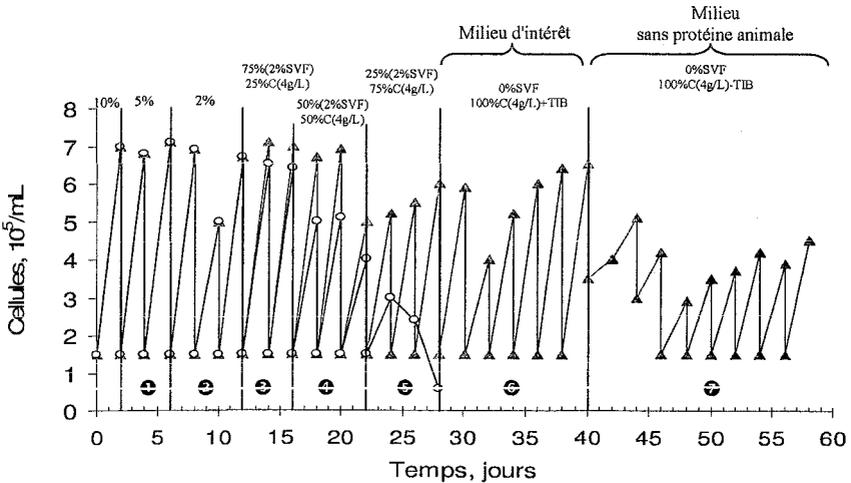


Figure VI.3 : Croissance des cellules CHO-K1 dhfr- lors de l'adaptation progressive à la culture sans sérum puis sans protéine animale.

La courbe (▲) représente l'adaptation en présence de la fraction de colza (C). La courbe (o) représente l'adaptation des cellules en absence de la fraction de colza. De J0 à J12, le SVF est diminué de 10 à 2%. De J12 à J40, le SVF est progressivement supprimé et remplacé par le mélange (fraction peptidique de colza, TIB, ET, Q). A J40, les TIB sont supprimés.

On remarque qu'en absence de fraction végétale, l'adaptation au milieu sans sérum est impossible, la mort des cellules ayant lieu au bout de trois passages lors de l'étape 5. En présence de fraction peptidique de colza et de protéines animales, les CHO-K1 s'adaptent rapidement à leur nouveau milieu de culture sans sérum. Les cellules récupèrent leur vitesse de croissance dès le premier passage. La suppression des protéines animales (TIB) au 40^{ème} jour entraîne un ralentissement de croissance et une adaptation plus longue (environ six passages), mais celle-ci reste tout de même possible. L'obtention d'un tel milieu est très utile en culture de cellules animales. En effet, il permet non seulement de réduire au maximum les risques de contamination par des agents infectieux mais également de faciliter la purification des protéines recombinantes sécrétées dans le surnageant (Merten *et al.*, 1994 et 1999 ; Keen et Rapson, 1995 ; Terada *et al.*, 2002).

Au vu des résultats obtenus avec les cellules CHO K1 et les hydrolysats commerciaux QUEST, nous avons choisi par la suite de réaliser uniquement des adaptations à un milieu sans sérum supplémenté par notre fraction peptidique de colza. En effet, non seulement, elle est la seule à avoir permis l'adaptation des cellules dans un milieu sans sérum mais, de plus, elle correspond à la fraction dont nous maîtrisons le mieux le procédé de production et dont les caractéristiques principales ont été déterminées.

I.2. Adaptation brutale de cellules Vero au milieu sans sérum supplémenté par la fraction peptidique de colza.

Les cellules Vero sont des cellules adhérentes, très largement utilisées en industrie pour la production de vaccins (Lin *et al.*, 2002 ; Kuzuhara *et al.*, 2003 ; Frazatti-Gallina *et al.*, 2004), proliférant habituellement dans du milieu α MEM supplémenté avec 10% de sérum. Après une réduction progressive mais rapide de la concentration de sérum de 10% à 1%, les cellules ont brutalement été transférées dans du milieu α MEM sans sérum supplémenté par 4 g/l. de la fraction peptidique de colza et des protéines animales, TIB (figure VI.4). Cette étape ayant réussi, l'étape suivante a consisté en la suppression des protéines animales du milieu de culture (figure VI.5).

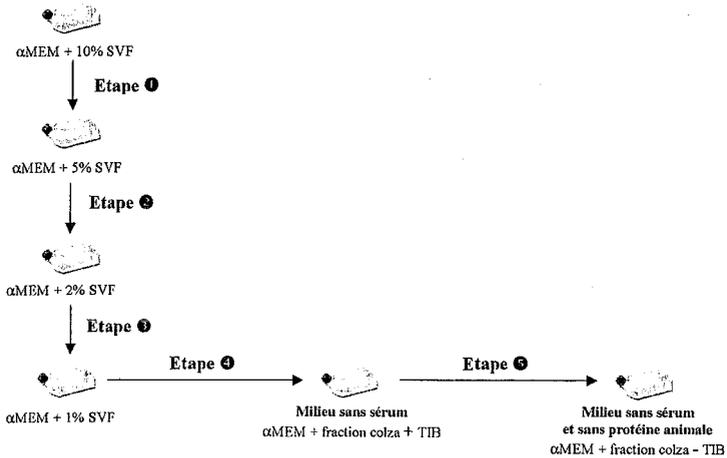


Figure VI.4 : Différentes étapes nécessaires à l'adaptation brutale des cellules Vero, au milieu αMEM, sans sérum et sans protéine animale.

Un témoin négatif montre que sans la fraction de colza, l'adaptation est impossible car la mort des cellules survient au bout de deux passages. Par contre, en présence de protéines animales et de fraction peptidique de colza, les cellules Vero s'adaptent aisément à la croissance en milieu sans sérum ; la récupération de la croissance ayant lieu dès le 3^{ème} passage réalisé dans ce milieu sans sérum (étape 4), soit au bout de 25 jours. Lors de la suppression des protéines animales, les cellules ont une croissance quelque peu ralentie mais qui reste convenable.

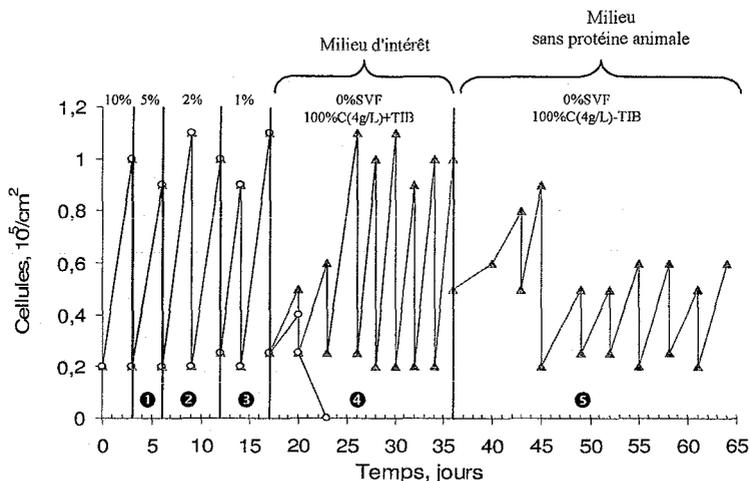


Figure VI.5 : Croissance des cellules Vero lors de l'adaptation brutale à la culture sans sérum puis sans protéine animale. La courbe (▲) représente l'adaptation au milieu sans sérum puis sans protéine en présence de fraction peptidique de colza (C). La courbe (○) représente l'adaptation des cellules en absence de fraction peptidique de colza. De J0 à J17, le SVF est diminué de 10 à 1%. A J17, le SVF est brutalement supprimé et remplacé par le mélange (fraction peptidique de colza, TIB, ET, Q). A J36, les TIB sont supprimés.

Les photographies présentées dans la figure VI.6 montrent une morphologie fibroblastique des cellules Vero, quel que soit le milieu de culture utilisé (avec sérum, sans sérum et avec protéines animales et sans protéine animale). Cette morphologie est caractéristique des cellules adhérentes. Seule une légère différence de taille des cellules apparaît : elles ont tendance à être plus allongées dans le milieu contenant du sérum, indiquant une adhérence des cellules plus importante en présence de sérum. Cependant, même lorsque le sérum est exempt du milieu de culture, les cellules Vero restent adhérentes au plastique du flacon de culture comme cela est visible sur la figure VI.6.b. En présence de milieu sans sérum et sans protéine, les cellules conservent toujours leur capacité d'adhésion (figure VI.6.c), même si elles le sont dans une moindre mesure, et que le temps nécessaire à la trypsination est largement diminué.

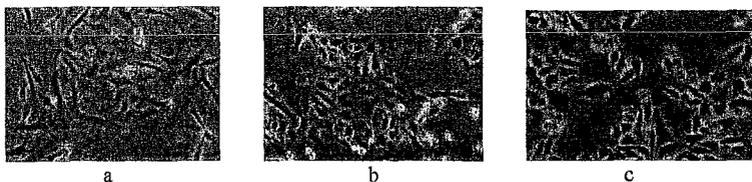


Figure VI.6 : Morphologie des cellules Vero avant et après adaptation au milieu sans sérum supplémenté par 4 g/L de fraction peptidique de colza. a. 1% de sérum, b. 0% de sérum + TIB + 4 g/L de fraction peptidique de colza, c. 0% de sérum + 4 g/L de fraction peptidique de colza

Suite aux adaptations des cellules CHO K1 et des cellules Vero, nous remarquons que si l'utilisation du milieu de culture sans protéine animale permet aux cellules Vero de croître de façon adhérente, ce n'était pas le cas pour les cellules CHO K1. Ce résultat peut-être expliqué par le fait que le besoin en facteur d'adhérence est facultatif pour certaines lignées cellulaires généralement adhérentes. Ainsi, Hewlett *et al.* (1991) ont montré que des cellules CHO placées dans un milieu sans sérum ne restaient pas attachées au flacon mais au contraire se multipliaient en suspension ou sous forme d'agrégats, tout en conservant des caractéristiques normales de croissance. De plus, lors d'une nouvelle supplémentation en sérum, ces cellules CHO se mettaient à nouveau à proliférer de manière adhérente. Par ailleurs, ces auteurs ont montré que des cellules, telles les cellules Vero, MDCK, ou les cellules épithéliales A431, étaient capables de croître de façon adhérente dans un milieu sans protéine, non supplémenté par des facteurs d'adhésions.

I.3. Adaptation d'hybridomes au milieu sans sérum supplémenté par la fraction peptidique de colza.

Les hybridomes sont des lignées de cellules résultant de la fusion *in vitro* d'une lignée tumorale de plasmocytes murins (myélomes), capable de se multiplier indéfiniment et donc immortelle et de lymphocytes sécrétant un anticorps de spécificité donnée. L'hybride obtenu possède donc à la fois les capacités sécrétoires du lymphocyte et la faculté de se multiplier indéfiniment du myélome. Une telle cellule, produit un seul type d'anticorps dirigé contre un unique antigène : un anticorps monoclonal. Ces anticorps sont principalement utilisés en diagnostic et en thérapeutique humaine.

I.3.1. Adaptation brutale

Après une réduction progressive mais rapide de la concentration de sérum de 10% à 1%, les cellules ont brutalement été transférées dans un milieu sans sérum RPMI, supplémenté par 4 g/L de la fraction peptidique de colza et les TIB. Dans ces conditions, la mort cellulaire est rapidement observée, en trois passages ou six jours. Cette lignée cellulaire d'hybridome réagit donc de la même façon que les cellules CHO K1 précédemment étudiées.

I.3.2. Adaptation progressive

Suite à l'échec de l'adaptation brutale, une procédure d'adaptation progressive a été mise en place (figure VI.7). Le milieu RPMI supplémenté par 1% de sérum est progressivement remplacé par du milieu RPMI sans sérum supplémenté par 4 g/L de la fraction peptidique de colza et les protéines animales TIB, comme cela est indiqué sur la figure VI.7. La figure VI.8 présente l'évolution de la croissance des cellules au cours de cette adaptation douce.

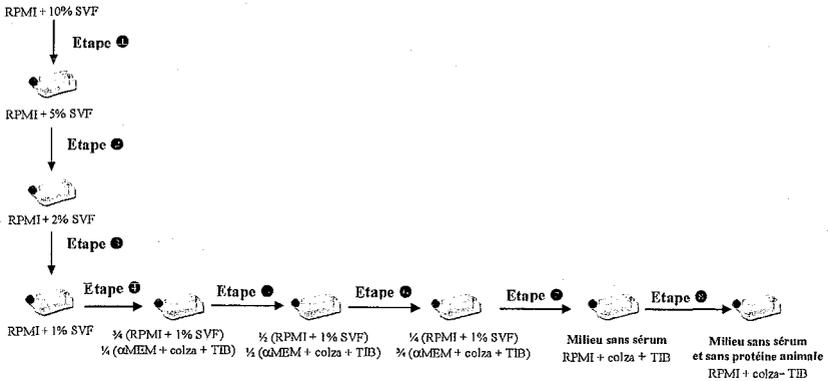


Figure VI.7 : Différentes étapes nécessaires à l'adaptation progressive des hybridomes, au milieu RPMI, sans sérum et/ou sans protéine animale.

En présence de protéines animales et de fraction peptidique de colza, les cellules d'hybridomes s'adaptent correctement à la croissance en milieu sans sérum ; la récupération de la croissance se faisant à partir du 4^{ème} passage de l'étape 7, soit au bout de 42 jours. Cependant, la suppression des protéines animales leur est aussitôt fatale. Le témoin négatif a également montré que, sans la fraction de colza, l'adaptation est impossible. La mort des cellules survient alors au bout de trois passages au cours de l'étape 6.

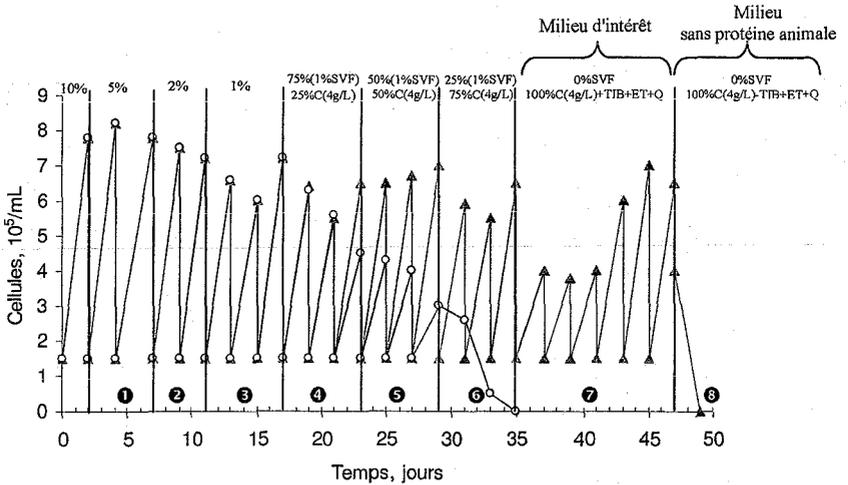


Figure VI.8 : Croissance des cellules d'hybridomes lors de l'adaptation douce à la culture sans sérum puis sans protéine animale. La courbe (▲) représente l'adaptation en présence de la fraction peptidique de colza. La courbe (○) représente l'adaptation des cellules en absence de la fraction de colza (C). De J0 à J17, le SVF est diminué de 10 à 1%. De J17 à J35, le SVF est progressivement supprimé et remplacé par le mélange (fraction peptidique de colza, TIB, ET, Q). A J47, les TIB sont supprimés.

I.4. Culture de cellules NSO en milieu sans sérum supplémenté par la fraction peptidique de colza

Dans une dernière approche, nous avons observé l'influence de notre fraction peptidique de colza, à la fois sur les performances de croissance et de production d'une lignée de cellules NSO, des myélomes couramment utilisés pour des applications industrielles. En effet, elles ont permis de produire 21 des 33 molécules recombinantes mises sur le marché entre 2000 et 2003 (Whitford, 2003).

Dans ce but, la croissance de ces cellules et la production d'une protéine recombinante ont été suivies au cours de cultures discontinues, en fioles d'erenmeyers, dans un milieu sans sérum commercial, riche mais de composition inconnue, avec ou sans supplémentation par la fraction peptidique de colza. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure VI.9. Ces expériences ont été réalisées chez notre partenaire industriel.

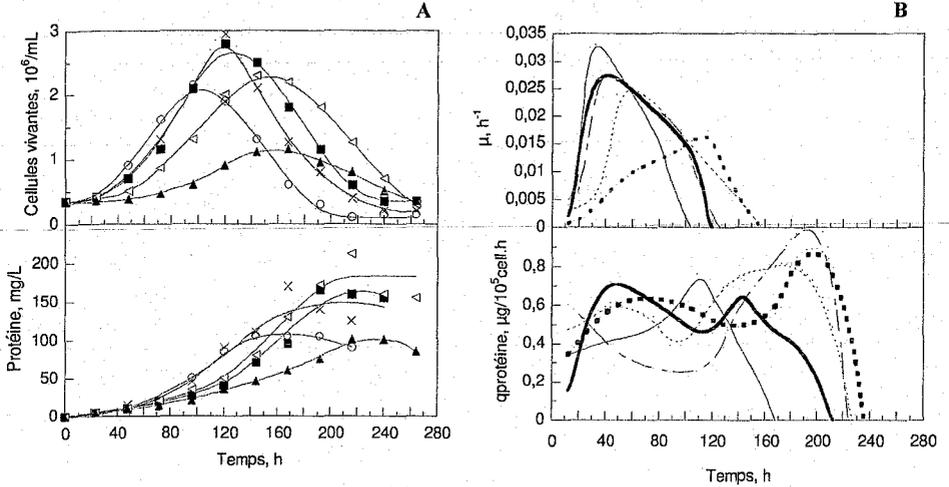


Figure VI.9 : A : Croissance de cellules NSO et production de protéine recombinante lors de cultures discontinues en fioles d'ermeneyers en présence de différentes concentrations de la fraction peptidique de colza : 0 g/L (○), 1 g/L (×), 2 g/L (■), 3 g/L (◁), 4 g/L (▲).

B : Evolution des vitesses spécifiques de croissance cellulaire et de production des cellules NSO lors de cultures discontinues en erlenmeyers avec différentes concentrations de la fraction peptidique de colza : 0 g/L (—), 1 g/L (—■—), 2 g/L (—◁—), 3 g/L (—▲—), 4 g/L (—●—).

L'observation des densités cellulaires maximales atteintes par les cellules NSO montre que la concentration optimale de fraction peptidique de colza à utiliser afin d'obtenir un nombre de cellules élevé est comprise entre 1 et 2 g/L ($2,8 \cdot 10^6$ cellules/mL environ). Une concentration de 3 g/L semble avoir un effet très limité sur la densité cellulaire maximale ($2,3 \cdot 10^6$ cellules/mL avec 3 g/L de fraction peptidique de colza contre $2,1 \cdot 10^6$ cellules/mL dans le milieu de référence). Par contre, une concentration de 4 g/L inhibe fortement la croissance des cellules puisque la concentration maximale atteinte n'est que de $1,1 \cdot 10^6$ cellules/mL. Le calcul de la vitesse spécifique de croissance maximale pour ces différents milieux indique que la présence de la fraction peptidique ne permet pas son augmentation : elle reste aux environs de $0,03 \text{ h}^{-1}$ quel que soit le milieu. Une augmentation de la quantité de colza diminue progressivement cette vitesse : $0,028 \text{ h}^{-1}$ pour 1 et 2 g/L, $0,026 \text{ h}^{-1}$ pour 3 g/L et $0,017 \text{ h}^{-1}$ pour 4 g/L. Cependant, on notera que les vitesses de croissance des cellules cultivées en présence de colza se maintiennent à une valeur élevée pendant une plus longue période que dans le milieu de référence.

Ces résultats confirment donc l'effet de maintien des cellules en phase de croissance active par la fraction peptidique de colza, précédemment observé avec les cellules CHO. En effet, la diminution de la vitesse spécifique de croissance des cellules est ralentie par l'ajout de la fraction de colza. Cependant, la concentration optimale de cette dernière n'est pas identique. En effet, la concentration cellulaire maximale est atteinte avec 4 g/L de fraction peptidique de colza dans le cas des cellules CHO et avec seulement 2 g/L pour les cellules NSO. Cette différence peut vraisemblablement être imputée au fait que le milieu commercial utilisé pour la culture des cellules NSO est un milieu plus riche que le milieu simple utilisé pour les cellules CHO. De plus, l'effet inhibiteur de croissance des cellules NSO induit par des concentrations plus faibles de fraction peptidique de colza (3 g/L au lieu de 5 g/L pour les cellules CHO), suggère la probable présence initiale dans ce milieu d'autres peptones végétales, cumulant ainsi l'effet négatif de certains composés.

Par ailleurs, l'ajout de 1, 2 ou 3 g/L de la fraction peptidique de colza permet d'augmenter de façon assez similaire la concentration maximale de protéines recombinantes produites. A 4 g/L, en dépit d'une concentration cellulaire plus faible, une concentration similaire de protéine est atteinte en comparaison au milieu de référence. Les vitesses spécifiques maximales de production, sont, soit proches de celle obtenue avec le milieu de référence, pour 1 g/L, soit supérieures pour les autres concentrations. Du fait de l'allongement des cultures, elles se maintiennent à leur niveau maximal de production pendant des durées plus longues.

I.5. Conclusion

Les résultats obtenus avec les cellules CHO, Vero et les hybridomes indiquent que la fraction peptidique de colza permet une adaptation, plus ou moins rapide, à des milieux sans sérum, de composition très simple. En effet, ces milieux sont uniquement constitués d'un milieu de base classique (RPMI ou α MEM), de TIB et de fraction peptidique de colza. De plus, la capacité de la fraction peptidique de colza à faciliter l'adaptation à de tels milieux sans sérum a été généralisée pour diverses lignées cellulaires industrielles, de caractéristiques différentes (CHO, Vero, hybridomes). Nous soulignerons également, l'aptitude de cette fraction d'intérêt de colza à favoriser l'adaptation des cellules CHO et Vero à des milieux sans sérum et sans protéine animale, composés exclusivement d'un milieu de base, de peptides de colza et de quelques éléments traces, et qui assurent ainsi une qualité optimale des milieux de culture.

Enfin, nous retiendrons que les performances de croissance, après adaptation aux milieux sans sérum, sont quasiment identiques à celles des milieux avec sérum.

Par ailleurs, il s'est également avéré que la fraction peptidique de colza était capable d'améliorer les performances de croissance et de production de cellules NSO cultivées dans un milieu sans sérum et sans protéine commercial, déjà optimisé pour la culture de ces cellules.

II. Validation d'un milieu sans protéine animale supplémenté avec des peptides de colza

Les inquiétudes quant au risque de contamination des milieux de culture par des agents pathogènes d'origine animale, et en particulier bovine, ne concernent pas uniquement le sérum de veau fœtal, mais tous les composants provenant de sources animales (Castle et Robertson, 1998). Or, la plupart des milieux sans sérum utilisés en culture de cellules de mammifères contiennent encore une quantité plus ou moins importante de molécules dérivées d'animaux (peptones de viande, protéines comme la transferrine, insuline, albumine, ...). En effet, ces substances sont souvent essentielles pour permettre une croissance cellulaire et une production satisfaisantes (Maurer, 1986 ; Merten *et al.*, 1999). Cependant, les autorités réglementaires encouragent de plus en plus fortement les industries pharmaceutiques à éliminer toutes ces molécules d'origine animale de leurs procédés (Asher, 1999 ; Castle and Robertson, 1998). C'est pourquoi, cette partie est dédiée à l'évaluation des performances d'un milieu de culture sans aucune protéine animale et supplémenté en peptides de colza.

II.1. Elaboration d'un milieu de routine dépourvu de protéines animales

Afin de valider l'utilisation des deux milieux sans sérum que nous avons formulé antérieurement, à savoir le milieu d'intérêt et le milieu sans protéine animale, nous avons étudié leur utilisation lors de propagation à long terme de cellules CHO C5 en la comparant au milieu de référence. Les cultures sont réalisées dans des flacons de culture statiques avec un transfert des cellules tous les deux jours pour le milieu de référence et tous les trois jours pour les milieux supplémentés par la fraction peptidique de colza, et cela pendant une durée de trois semaines. Les résultats sont regroupés dans la figure VI.10.

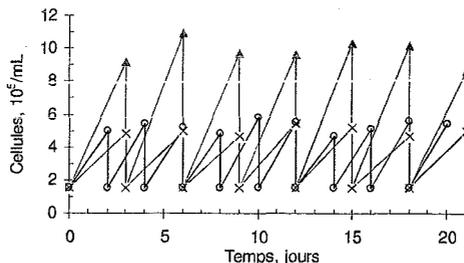


Figure VI.10 : Propagation des cellules CHO-C5 en milieu de référence (o), en milieu d'intérêt (▲) et en milieu d'intérêt sans protéine animale (x), en flacons statiques.

Il ressort, tout d'abord, que l'effet promoteur de croissance et de survie de l'extrait peptidique dans le milieu est conservé pendant au moins dix passages. De même, la propagation des cellules dans le milieu sans protéine animale est identique, en terme de concentration cellulaire maximale, à celle réalisée en milieu de référence pendant plus de 21 jours et cela de façon immédiate, indiquant que l'adaptation des cellules à ce milieu est instantanée. Enfin, les deux milieux sans sérum supplémentés avec la fraction peptidique de colza permettent d'augmenter le laps de temps entre chaque passage puisque seulement un passage tous les trois jours est nécessaire. Ainsi, dans le milieu de référence les cellules ne peuvent pas être maintenues en vie plus de deux jours si le milieu de culture n'est pas renouvelé alors qu'elles peuvent aisément l'être lors de la présence de la fraction peptidique. Les peptides de colza permettent donc probablement de pallier une limitation nutritionnelle du milieu de référence. Ces milieux peuvent donc être commodément utilisés en tant que milieux de "routine" puisqu'ils permettent de réduire le nombre d'interventions, les risques de contamination et les coûts de consommables, mais aussi, la quantité de milieu, paramètre non négligeable lors d'un usage industriel au cours des phases d'amplification des cellules.

II.2. Etudes cinétiques de cultures de cellules CHO C5 en milieu sans protéine animale supplémenté par des peptides de colza

Suite aux résultats encourageants obtenus lors des cultures réalisées en milieux d'intérêt et sans protéine animale, nous avons étudié et comparé les cinétiques des cellules CHO C5 dans quatre milieux de culture : milieu de référence, milieu de référence sans TIB, milieu d'intérêt et milieu d'intérêt sans TIB. Pour cela, des cultures discontinues ont été réalisées en flacons agités de volume utile de 160 mL. Ces derniers ont étéensemencés avec 2.10^5 cellules/mL. Les cinétiques de croissance de ces cultures qui ont été précédemment montrées (chapitre IV, I), seront détaillées et complétées par l'étude du métabolisme des cellules.

II.2.1. Cinétique de croissance de cellules CHO C5 en milieu dépourvu de protéine animale

La figure VI.11 représente l'évolution de la croissance des cellules CHO C5 au cours des cultures discontinues pour les différents milieux étudiés.

Les cellules sont incapables de croître dans le milieu de référence exempt de protéines animales (B). Dans les cultures réalisées, soit en milieu de référence (A), soit en milieu d'intérêt déplété en protéine animale (C), les cellules viables atteignent une densité maximale similaire d'environ $5,2 \cdot 10^5$ cellules/mL. Cependant dans ce dernier milieu, les cellules viables se maintiennent à cette valeur maximale durant plus de 20 heures et le temps de culture est doublé. Dans le milieu d'intérêt (D), la densité maximale atteinte est de $8,8 \cdot 10^5$ cellules/mL et est maintenue à ce niveau durant plus de 50 heures. Les phases de croissance sont de 50, 60 et 100 heures respectivement dans le milieu de référence, dans le milieu d'intérêt sans protéine animale et dans le milieu d'intérêt. Pour les deux cultures en présence de fraction peptidique de colza, l'apparition des cellules mortes commence dès le début de la phase de plateau des cellules viables mais la quantité totale de cellules augmente indiquant que la croissance continue bien que la densité de cellules viables soit stabilisée. En présence de la fraction de colza, il existe une phase stationnaire préalable à la phase de déclin cellulaire qui n'existe pas en absence de cette fraction. Il semble donc que cette dernière puisse avoir une action protectrice contre les effets hydrodynamiques préjudiciables dus à l'agitation et à l'éclatement des bulles, dans le cas de cultures en réacteur (Wu, 1995 ; Michaels *et al.*, 1991). Ainsi, la fraction peptidique pourrait avoir un rôle similaire à celui de certaines molécules du sérum de veau foetal, ou de certains additifs, tels que le pluronic F68, classiquement ajoutés dans les milieux sans sérum pour protéger les cellules contre les forces de cisaillement (Jordan *et al.*, 1994). Cependant, le fait que la mortalité des cellules intervienne moins brutalement en milieux d'intérêt, avec ou sans protéines animales, peut également indiquer que la présence de la fraction peptidique de colza induise une diminution des phénomènes d'apoptose en palliant à une limitation nutritionnelle en glutamine (Simon et Karim, 2002).

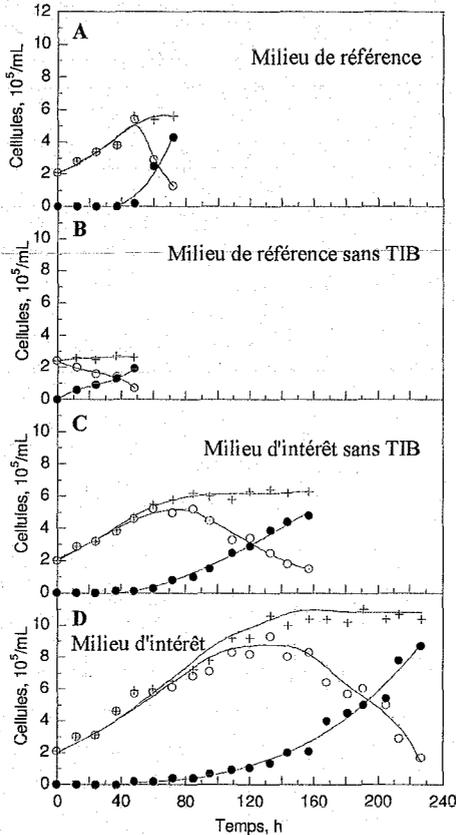


Figure VI.11 : Evolution des concentrations de cellules CHO C5 viables (○), mortes (●) et totales (+) en milieu de référence (A), en milieu de référence sans TIB (B), en milieu d'intérêt sans TIB (C) et en milieu d'intérêt (D), en flacon agité.

Les vitesses spécifiques maximales de croissance (figure VI.12.B.a) sont relativement identiques pour ces trois cultures, elles sont de l'ordre de $0,02 \text{ h}^{-1}$. Ainsi, le remplacement des protéines animales par les peptides de colza n'entraîne pas la diminution de la vitesse spécifique de croissance des cellules CHO C5 ce qui apparaît assez surprenant, compte tenu du rôle des TIB sur le transport et l'assimilation des nutriments par la cellule. En effet, Maurer (1986) a précédemment constaté que les substituts du sérum, tels que le mélange transferrine, insuline et albumine, permettaient de maintenir une vitesse de croissance des cellules importante en favorisant le transport et/ou l'assimilation des nutriments par la cellule. Ces résultats ont par la suite été corroborés par Lamotte (1997) pour les cellules CHO C5 qui

a montré que la supplémentation par ces trois protéines d'un milieu sans sérum permettait à cette lignée de conserver une vitesse spécifique de croissance identique à celle obtenue dans un milieu contenant 5% de sérum de veau fœtal. Ainsi, nos résultats semblent démontrer que la fraction peptidique de colza permette également ce transport et/ou cette assimilation des nutriments par la cellule et de ce fait semblent indiquer qu'elle contient des molécules ayant des propriétés identiques aux TIB, permettant à la fraction, non seulement, de substituer à elle seule ces trois protéines animales, mais aussi de conserver la vitesse spécifique de croissance de ces cellules atteinte en milieu avec sérum.

II.2.2. Métabolisme de cellules CHO C5 en milieu sans protéine animale

La figure VI.12 présente l'évolution de la consommation en glucose et en glutamine et de la production en lactate et en ions ammonium des cellules CHO C5 ainsi que celles de leurs vitesses spécifiques respectives au cours des cultures discontinues pour les différents milieux étudiés.

Au cours des trois cultures, le glucose, présent à une concentration initiale de 22 mM décroît parallèlement à la croissance cellulaire. Il n'est entièrement consommé que dans la culture avec le milieu d'intérêt du fait d'une densité cellulaire atteinte largement supérieure. Le décès cellulaire apparaît avant cette limitation. Le glucose n'est donc pas à l'origine de la mort des cellules et ne représente donc pas un facteur limitant de la croissance des cellules. Le rendement stoechiométrique $Y_{\text{cell}/\text{glc}}$ décrivant la capacité à former une quantité de cellules par mole de glucose consommée est plus important en présence de la fraction peptidique de colza ($5 \cdot 10^{10}$ cellules/mole en milieu d'intérêt, $4 \cdot 10^{10}$ cellules/mole en milieu d'intérêt sans TIB, et $3 \cdot 10^{10}$ cellules/mole en milieu de référence). Les valeurs de ce rendement indiquent que les cellules utilisent plus efficacement le glucose pour la production de cellules dans les milieux contenant la fraction peptidique d'intérêt mais également qu'elles ont besoin d'une quantité plus faible de glucose pour produire 10^{10} cellules. La vitesse spécifique maximale de consommation du glucose est trois fois moins élevée en présence des peptides ($0,03 \mu\text{mol}/10^5$ cellules.h pour le milieu d'intérêt et le milieu d'intérêt sans TIB et $0,09 \mu\text{mol}/10^5$ cellules.h pour le milieu de référence). De ce fait, nous confirmons bien ici les résultats obtenus au cours de l'expérience de supplémentation avec les acides aminés libres, indiquant que la fraction peptidique apporte des molécules nécessaires à la synthèse du matériel cellulaire, en permettant l'économie de glucose.

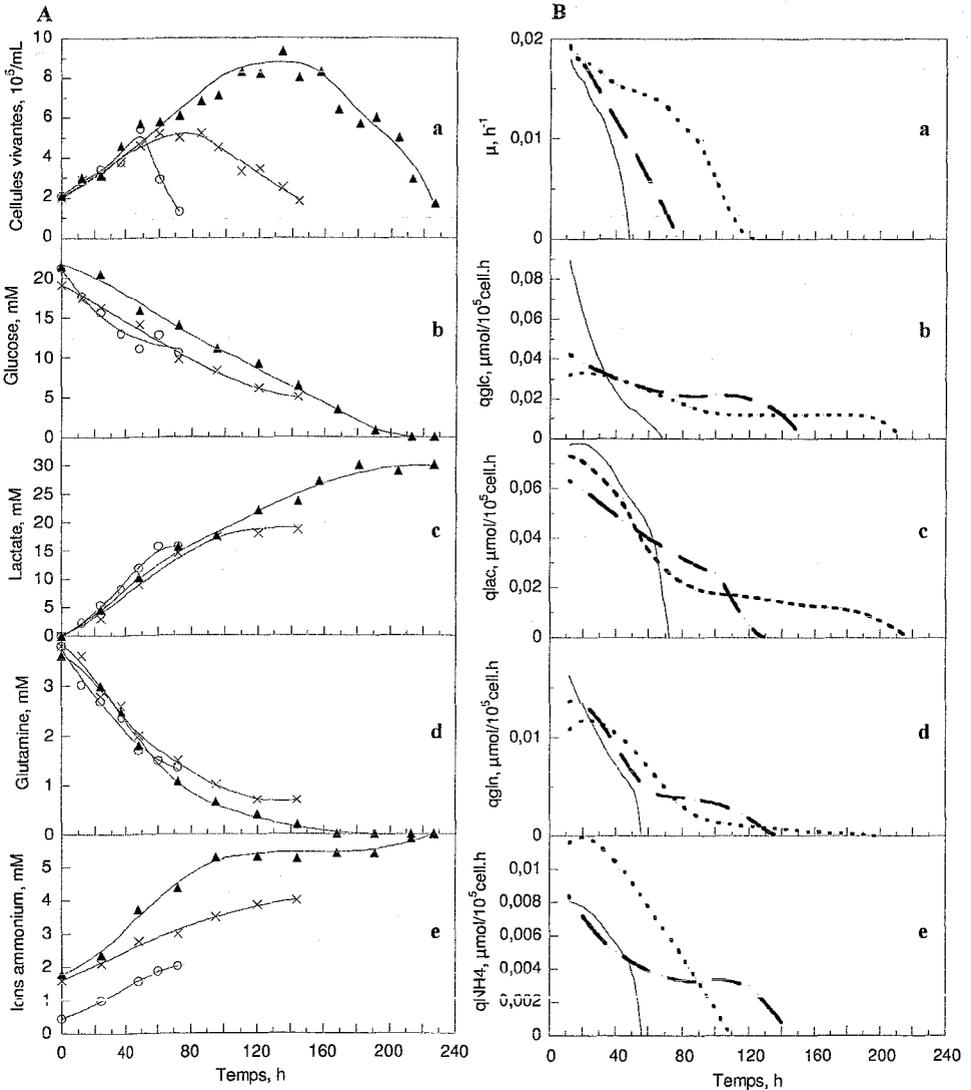


Figure VI.12 : A : Croissance (a) et métabolisme des cellules CHO C5 - glucose (b), lactate (c), glutamine (d), ions ammonium (e) - en milieu de référence (○), en milieu d'intérêt sans protéine (x) et en milieu d'intérêt (▲).

B : Evolution des vitesses spécifiques de croissance (a), de consommation de glucose (b) et de glutamine (d), de production de lactate (c), et d'ions ammonium (e), en milieu de référence (—), en milieu d'intérêt sans protéine (---) et en milieu d'intérêt (.....).

L'apparition du lactate qui provient en partie de la conversion glycolytique du glucose est couplée à la disparition du glucose (Zeng et Deckwer, 1995). La valeur finale de la concentration en lactate est respectivement de 15,5, 20 et 30 mM pour les cultures dans le milieu de référence, le milieu d'intérêt sans TIB et le milieu d'intérêt. Cependant, comme nous l'avons déjà remarqué, des concentrations de lactate inférieures à 30 mM ne semblent pas être la cause du ralentissement de la croissance cellulaire (Geaugey *et al*, 1989 ; Schlaeger et Schumpp, 1989 ; Lao et Toth, 1997). Les vitesses spécifiques maximales de production du lactate sont relativement similaires pour les trois cultures (0,07 $\mu\text{mol}/10^5$ cellules.h).

La glycolyse alimente le cycle de Krebs par l'intermédiaire du pyruvate mais cette voie d'utilisation du glucose est relativement faible par rapport à la formation de lactate. La quantité de mole de glucose transformée en lactate peut être évaluée par le calcul du rendement lactate/glucose qui est égal à 2 moles/mole lorsque tout le glucose est transformé en lactate. Ce rendement permet ainsi d'évaluer la perte d'énergie à l'entrée du cycle de Krebs. Dans nos cultures, les rendements $Y_{\text{lac}/\text{gle}}$ sont de 1,2, 1,3 et 1,4 moles/mole respectivement pour le milieu de référence, le milieu d'intérêt sans protéine animale et le milieu d'intérêt indiquant une transformation moyenne de 60, 65 et 70% de glucose en lactate. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'en présence de la fraction peptidique d'intérêt, les cellules disposent de monomères, nécessaires à la constitution de la biomasse cellulaire, présents dans la fraction et ont donc un besoin énergétique et carboné plus faible.

Le profil de consommation de la glutamine dans les cultures est reporté dans la figure VI.12.A.d. Sa concentration initiale de 4 mM décroît, tout comme le glucose, de manière inversement proportionnelle à la croissance cellulaire jusqu'à s'annuler. La glutamine ne semble pas, non plus, être à l'origine de la mort des cellules, ni être un facteur limitant leur croissance. La vitesse de consommation de la glutamine est un peu abaissée par l'ajout de la fraction peptidique dans le milieu de culture (respectivement 0,016, 0,014 et 0,012 $\mu\text{mol}/10^5$ cellules.h dans le milieu de référence, le milieu d'intérêt déplété en TIB et le milieu d'intérêt). Le rendement stoechiométrique $Y_{\text{cell}/\text{gln}}$ décrivant la capacité à former une quantité de cellules par mole de glutamine consommée est plus élevé dans le cas des lignées cultivées dans le milieu d'intérêt ($1,8 \cdot 10^{11}$ cellules/mole en milieu d'intérêt, et $1,4 \cdot 10^{11}$ cellules/mole en milieu d'intérêt sans TIB et en milieu de référence). Ainsi, le milieu d'intérêt, qui contient à la fois la fraction de colza et des protéines animales, permet aux cellules d'utiliser plus efficacement la glutamine. Cependant, la fraction peptidique seule n'est pas suffisante pour obtenir la même

conclusion. Ces résultats sont en accord avec ceux de Sanfeliu *et al.* (1996) qui ont montré que les effets promoteurs de croissance de différents suppléments (acides aminés, vitamines, sérum) aux milieux de culture étaient cumulatifs.

La production des ions ammonium est couplée à la consommation de la glutamine car ils proviennent majoritairement de la désamination de la glutamine en glutamate. Leur concentration initiale est légèrement plus élevée dans les milieux supplémentés en fraction peptidique de colza en raison d'une dégradation probable de certains acides aminés ou peptides de la fraction d'intérêt. La valeur finale de la concentration en ions ammonium est respectivement de 2, 4 et 6 mM pour les cultures dans le milieu de référence, le milieu d'intérêt sans TIB et le milieu d'intérêt. Comme le lactate, ces ions ont un effet inhibiteur potentiel lorsqu'ils sont présents en quantité importante dans le milieu de culture, en provoquant une acidification du cytoplasme et en réduisant la croissance cellulaire (Martinelle et Häggström, 1993). Cependant, Schlaeger et Schumpp (1989) ont montré que des concentrations minimales de 8 à 10 mM étaient nécessaires pour inhiber de 50% la croissance des cellules CHO. De plus, Lao et Toth (1997) ont, quant à eux, révélé que la présence de 10 mM d'ammonium n'inhibait pas la croissance de cellules CHO. Aussi, nous pouvons penser que dans notre cas, la production des ions ammonium n'est pas à l'origine de la mort des cellules. La vitesse spécifique maximale de production des ions ammonium est augmentée par la présence de peptides de colza dans le milieu de culture. La présence d'une quantité plus importante de ces ions couplée à une vitesse spécifique de production plus élevée dans le cas des cultures supplémentées par notre fraction peptidique provient sans doute d'une utilisation par les cellules d'autres acides aminés que la glutamine ou encore, de la consommation des peptides apportés.

II.2.3. Production d'IFN par les cellules CHO C5 en milieu sans protéine animale

La figure VI.13 présente les résultats concernant la production d'IFN- γ au cours de cultures discontinues dans trois milieux différents. L'interféron-gamma s'accumule dans le milieu de culture exclusivement pendant la phase de croissance cellulaire. Les concentrations maximales atteignent respectivement 650, 1000 et 2600 $\mu\text{g/L}$ dans le milieu de référence, le milieu d'intérêt sans TIB et le milieu d'intérêt. Ces résultats indiquent clairement que, non seulement, le milieu sans protéine animale n'inhibe pas la production d'interféron- γ , mais aussi, qu'il permet de quasiment doubler la quantité finale comparée à celle obtenue avec le

milieu de référence. Dans le milieu sans protéine animale, cette augmentation de concentration en interféron est la résultante d'un maintien en vie des cellules durant une période plus longue. En effet, contrairement à la culture en milieu d'intérêt, il n'y a pas d'augmentation de la vitesse spécifique de production de l'IFN- γ .

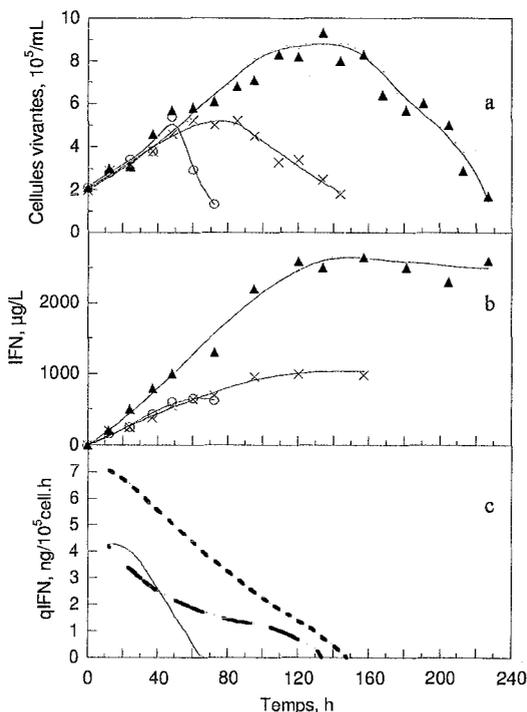


Figure VI.13 : Croissance (a), production d'IFN (b) et évolution des vitesses spécifiques de production (c) au cours de cultures discontinues de cellules CHO C5 réalisées dans du milieu de référence (o, —), du milieu d'intérêt sans TIB (x, - -) et du milieu d'intérêt (▲,).

II.2.4. Conclusions

Cette partie avait pour objectif de valider l'intérêt potentiel d'un milieu simple, dépourvu de protéines animales, mais enrichi en peptides de colza. Dans un premier temps, nous avons montré son application pour la conservation et la propagation de routine des cellules. Puis, au cours de cultures en mode agité, nous avons pu comparer son impact sur les performances de croissance et de production ainsi que sur le métabolisme des cellules CHO, à celui des

milieux contenant des protéines animales. Les principales conclusions sont résumées dans la figure VI.14.

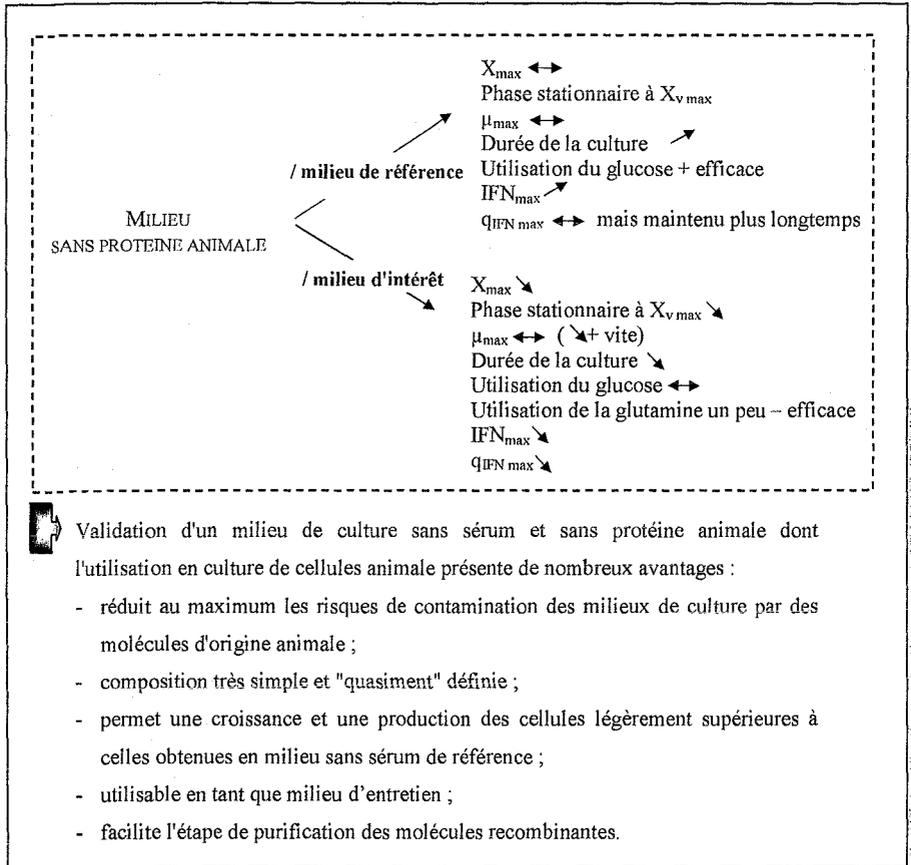


Figure VI.14 : Caractéristiques et intérêt du milieu sans protéine animale, enrichi en peptides de colza, au cours de cultures discontinues de cellules CHO C5, en flacons agités.

III. Capacité de la fraction peptidique de colza à supporter l'extrapolation à l'échelle du bioréacteur

La transposition des résultats obtenus dans des systèmes de culture à petite échelle à des systèmes de culture de plus grande échelle, tout en conservant le même niveau de performances, peut être problématique. En effet, dans un réacteur de grande taille, mécaniquement agité, les cellules peuvent notamment être exposées à des stress mécaniques plus importants. C'est pourquoi, il peut s'avérer utile d'analyser plus précisément le comportement cellulaire dans divers systèmes de culture.

Comme nous l'avons présenté au cours des chapitres précédents, l'ajout de 4 g/L de la fraction peptidique de colza dans un milieu de culture sans sérum a été testé dans différents systèmes de culture : systèmes de cultures statiques (plaques 96 puits, $V_u = 200 \mu\text{L}$ et flacons statiques, $V_u = 5$ à 30 mL), des systèmes de cultures agitées (fioles d'erlenmeyers, $V_u = 50 \text{ mL}$ - et flacons agités, $V_u = 160 \text{ mL}$) et enfin un bioréacteur agité mécaniquement ($V_u = 1,2 \text{ L}$). Le bioréacteur est le système le plus proche de la plupart des conditions de cultures utilisées en milieu industriel, car il permet à la fois le suivi et le contrôle en ligne des différents paramètres opératoires de la culture (pH, température, vitesse d'agitation et oxygène dissous), tout en assurant une homogénéisation du milieu par agitation mécanique. Quel que soit le système et l'échelle de culture, l'effet promoteur de croissance cellulaire et de production de la protéine recombinante induit par fraction peptidique sur les cellules CHO a toujours été observé.

Pour ce chapitre, nous nous proposons de comparer le comportement de cellules CHO en flacon agité ($V_u = 160 \text{ mL}$) et en réacteur ($V_u = 1,2 \text{ L}$), en analysant de façon plus détaillée les cinétiques de croissance mais aussi de métabolisme des cellules en milieu d'intérêt. Les résultats cinétiques sont présentés dans la figure VI.15.

III.1. Cinétiques comparées de cultures en flacon agité et bioréacteur en présence de la fraction peptidique de colza

III.1.1. Comparaison de la croissance et du métabolisme cellulaire, en milieu d'intérêt, pour différentes échelles de culture

La densité cellulaire maximale atteinte est légèrement supérieure lors de la culture en réacteur. En effet, après 100 heures de culture, elle est de $12,2 \cdot 10^5$ cellules/mL alors qu'elle n'est que de $8,4 \cdot 10^5$ cellules/mL en spinner. Dans les deux cultures, une phase plateau d'environ 50 heures est retrouvée. La culture est légèrement moins longue en réacteur (180 heures au lieu de 230 heures). Cependant, la vitesse spécifique de croissance des cellules se maintient à sa valeur maximale durant une période de 80 heures en réacteur alors qu'elle diminue de façon légère mais progressive au cours du temps en flacon agité. Pour ces deux cultures réalisées avec le milieu d'intérêt, la vitesse spécifique de décès cellulaire (k_d) augmente à partir de 140 heures de culture, et ce, de manière beaucoup plus rapide pour la culture en réacteur (figure VI.16). Cette différence peut provenir des contraintes de cisaillement plus importantes dans le réacteur que dans le flacon agité du fait, d'une part, du système d'agitation, et, d'autre part, du mode d'aération par bullage d'air enrichi. En effet, lors de la culture en bioréacteur, à 140 heures, la concentration de glucose est très faible rendant les cellules plus fragiles, du fait d'un état physiologique amoindri.

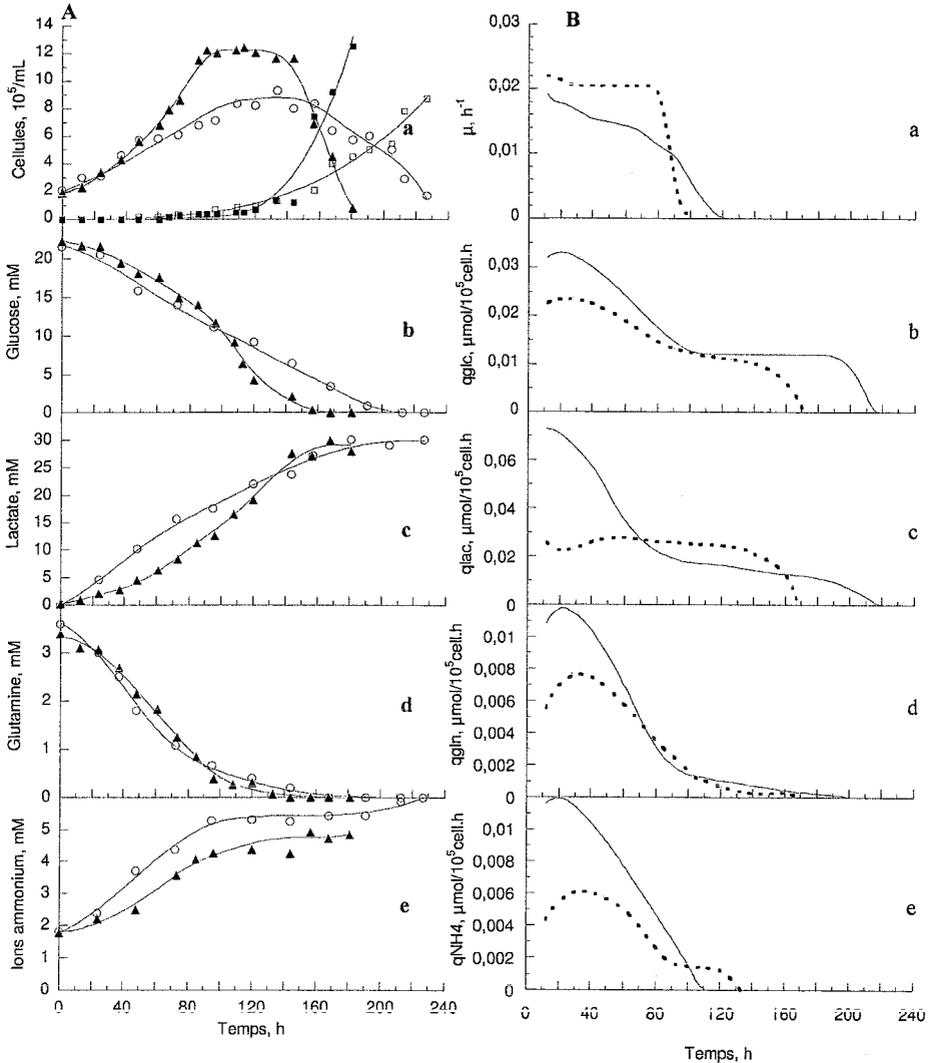


Figure VI.15 : A : Croissance (a) et métabolisme des cellules CHO C5 - glucose (b), lactate (c), glutamine (d), ions ammonium (e) – lors de cultures discontinues réalisées en flacon agité (viables, o ; mortes, □) ou en réacteur (viables, ▲ ; mortes, ■)

B : Evolution des vitesses spécifiques de croissance (a), de consommation de glucose (b) et de glutamine (d), de production de lactate (c), et d'ions ammonium (e), des cellules CHO C5 lors de cultures discontinues réalisées en flacon agité (—) ou en réacteur (.....).

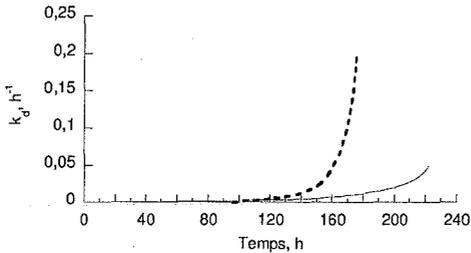


Figure VI.16 : Evolution des vitesses spécifiques de décès des cellules CHO C5 lors de cultures discontinues en milieu d'intérêt, réalisées en flacon agité (—) ou en réacteur (- - -).

Le glucose, présent à une concentration initiale de 22 mM est totalement consommé en 160 heures pour la culture en réacteur et en 200 heures pour celle en flacon agité. La vitesse spécifique maximale de consommation du glucose, présente une évolution semblable mais est légèrement supérieure en flacon agité ($0,03 \mu\text{mol}/10^5 \text{ cellules.h}$) par rapport au réacteur ($0,02 \mu\text{mol}/10^5 \text{ cellules.h}$). Le rendement stoechiométrique ($Y_{\text{cell}/\text{glc}}$) est plus élevé lors de la culture effectuée en réacteur ($9 \cdot 10^{10} \text{ cellules/mole}$) qu'en flacon agité ($5 \cdot 10^{10} \text{ cellules/mole}$). Ainsi, une utilisation plus efficace du glucose pour la production de cellules, est mesurée, dans la culture en réacteur. Bien que la quantité finale de lactate produit soit similaire dans les deux systèmes de culture (30 mM), la vitesse spécifique maximale de production du lactate est plus élevée en flacon agité ($0,07 \mu\text{mol}/10^5 \text{ cellules.h}$) qu'en réacteur ($0,03 \mu\text{mol}/10^5 \text{ cellules.h}$). Le rendement lactate/glucose est supérieur lors de la culture en spinner (1,4 contre 1,2 en réacteur). Ces données vont dans le sens d'une production de lactate légèrement accélérée en début de culture en flacon agité. Celle-ci peut notamment s'expliquer par une limitation en oxygène des cellules dans de tels systèmes. En effet, lors d'une limitation en oxygène, la capacité des cellules à réoxyder les cofacteurs réduits par la chaîne respiratoire est diminuée. De même, certaines réactions enzymatiques du cycle de Krebs ou conduisant à ce cycle, telle que, par exemple, celle de la pyruvate déshydrogénase peuvent être ralenties. Ainsi, la voie alternative conduisant à la formation de lactate à partir du pyruvate grâce à l'action de la lactate déshydrogénase est utilisée pour réoxyder le NADH.

La glutamine, présente à une concentration initiale de 4 mM est totalement consommée aux alentours des 150 heures pour les deux cultures. De la même façon que pour le glucose, la vitesse spécifique maximale de consommation est plus élevée en flacon agité ($0,012 \mu\text{mol}/10^5$

cellules.h) qu'en réacteur ($0,07 \mu\text{mol}/10^5 \text{ cellules.h}$) bien que l'évolution de cette vitesse reste similaire pour les deux cultures. Le rendement stoechiométrique ($Y_{\text{cell/gh}}$) est plus élevé en réacteur ($3,4 \cdot 10^{11}$ cellules/mole) qu'en flacon agité ($1,7 \cdot 10^{11}$ cellules/mole). Une utilisation plus efficace de la glutamine pour la production de cellules, est donc mesurée, dans la culture en réacteur. Les ions ammonium sont produits en quantité légèrement plus élevée en flacon agité. De même, la vitesse spécifique maximale de production des ions ammonium est plus élevée en flacon agité ($0,012 \mu\text{mol}/10^5 \text{ cellules.h}$) qu'en réacteur ($0,006 \mu\text{mol}/10^5 \text{ cellules.h}$), bien que les rendements globaux ions ammonium/glutamine soient relativement similaires (1,1 en flacon agité et 1,2 en réacteur).

III.1.2. Comparaison des performances de production cellulaire, en milieu d'intérêt, pour différentes échelles de culture

La figure VI.17 présente les résultats cinétiques de production d'interféron-gamma au cours des deux cultures réalisées en flacon agité et en réacteur. Dans les deux cas, l'interféron-gamma s'accumule dans le milieu de culture exclusivement pendant la phase de croissance cellulaire. La concentration maximale atteinte est supérieure lors de la culture en réacteur, $3500 \mu\text{g/L}$, contre $2600 \mu\text{g/L}$ en flacon agité. Cependant, les vitesses spécifiques maximales de production sont relativement similaires ($7-8 \text{ ng}/10^5 \text{ cellules.h}$). La quantité d'interféron plus importante en réacteur est donc simplement la conséquence d'une densité cellulaire maximale plus élevée. Enfin, on notera que la protéine produite n'est pas dégradée au cours du temps. Cette observation confirme les résultats obtenus par Mols *et al.* (2005). En effet, ces derniers ont montré que les peptones végétales utilisées pour compléter des milieux de culture sans sérum et sans protéine pouvaient avoir un rôle inhibiteur de protéases, présentes dans le surnageant de culture, permettant d'éviter ainsi la dégradation des protéines produites. Ainsi, l'extrapolation de la culture à l'échelle du réacteur, dans un milieu supplémenté avec notre fraction peptidique ne compromet pas la production, ni la qualité de la protéine recombinante produite.

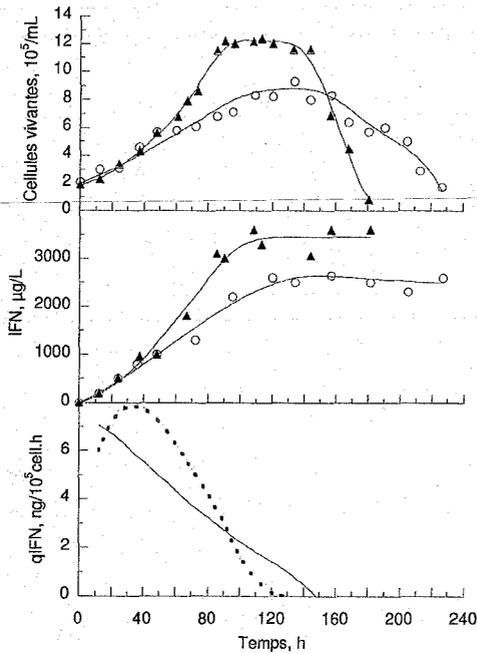


Figure VI.17 : Croissance (a), production d'IFN (b) et évolution des vitesses spécifiques de production (c) au cours de cultures discontinues de cellules CHO C5 réalisées dans un flacon agité (○, —) ou dans un réacteur (▲,).

III.2. L'utilisation du milieu d'intérêt est-elle extrapolable à l'échelle industrielle ?

En vue d'une utilisation industrielle, un autre aspect doit être pris en compte : la production de la fraction peptidique de colza en grande quantité. Dans ce but, deux éléments majeurs doivent être étudiés : l'extrapolation du procédé de production de la fraction mais aussi la disponibilité en matière première, c'est-à-dire en tourteau de colza.

Le procédé de production utilise principalement des procédés membranaires. En effet, il a été conçu de manière à ce qu'il soit facilement extrapolable. Ainsi, les membranes planes utilisées pour l'ultrafiltration 1 kDa et 3 kDa ont une conformation aisément transposable à l'échelle industrielle et présentent de plus l'avantage de pouvoir être disposées en série ce qui permet d'augmenter la surface filtrante. Concernant l'usage de membranes spiralées (nanofiltration), elles sont déjà couramment utilisées à grande échelle, en industrie pharmaceutique. Leur

extrapolation ne pose donc pas de difficulté particulière. Enfin, un autre avantage du procédé utilisé est qu'il ne contient pas d'étape de chromatographie, généralement plus difficile à extrapoler.

Concernant la disponibilité en matière première, un dernier point devait être évalué : quelle serait la quantité de tourteau de colza à hydrolyser pour produire 40 kg de fraction peptidique de colza, soit la quantité nécessaire pour supplémenter 10 000 L de milieu de culture ?

La figure VI.18 démontre ainsi que 2500 kg de tourteau de colza sont nécessaires pour produire 40 kg de fraction peptidique.

En 2003, 3,3 millions de tonnes de colza ont été produites en France (CETIOM, 2004). Aussi, l'approvisionnement en matière première ne constitue manifestement pas un frein à la production de la fraction peptidique.

Finalement, il semble donc que la production de la fraction peptidique de colza soit objectivement réalisable dans des conditions et des quantités "industrielles".

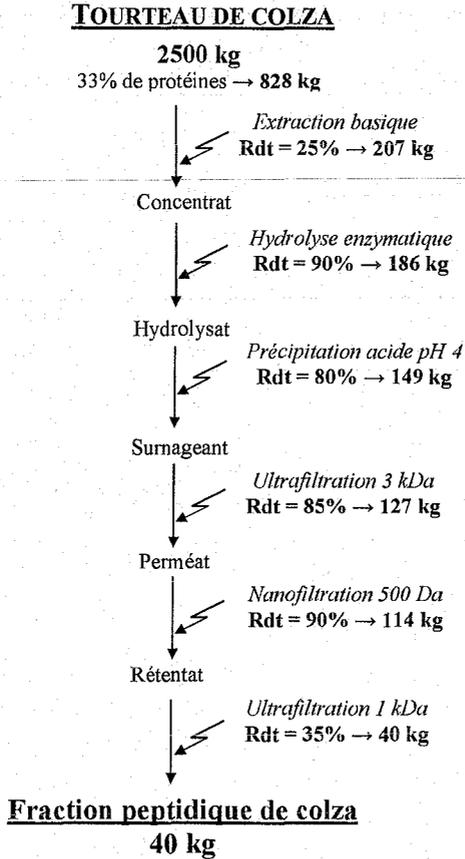


Figure VI.18 : Estimation de la quantité de tourteau de colza à fournir pour produire 40 kg de fraction peptidique, nécessaire à la réalisation de 1000 L de milieu de culture pour cellules animales.

III.3. Conclusion

Le tableau VI.2 résume les principales différences observées lors de l'extrapolation des cultures, à l'échelle du bioréacteur, avec les cellules cultivées dans le milieu d'intérêt, composé du milieu de référence simple, additionné de la fraction peptidique de colza.



$[X_v]_{\max}$	+
Phase stationnaire à $X_v \max$	+
μ_{\max}	=
Déclin cellulaire	+
Temps de culture	-
<hr/>	
q_{glucose}	(+)
q_{lactate}	-
$q_{\text{glutamine}}$	(+)
q_{NH_4}	-
<hr/>	
$Y_{\text{cell/glc}}$	+
$Y_{\text{cell/gln}}$	+
<hr/>	
IFN	+
q_{IFN}	=

Tableau VI.2 : Comparaison de la croissance et du métabolisme des cellules CHO cultivées en milieu d'intérêt (référence + peptides de colza) entre une culture en bioréacteur et une culture en flacon agité.

Au vu des résultats portant sur la croissance, le métabolisme et la production des cellules CHO cultivées dans le milieu d'intérêt, à deux échelles différentes, il apparaît que ce milieu peut être utilisé à l'échelle du bioréacteur sans compromettre ses effets promoteurs de croissance et de production observés à petite échelle. Au contraire, on assiste même à l'obtention d'une concentration plus élevée en cellules et en interféron et à une légère amélioration de l'efficacité du métabolisme énergétique des cellules en bioréacteur, probablement en raison d'une oxygénation mieux contrôlée. De plus, même si les cisaillements plus importants en bioréacteurs induisent une mort cellulaire plus rapide en fin de culture, ils ne compromettent pas les atouts de la fraction peptidique de colza.

Enfin, nous soulignerons le fait que la production de la fraction peptidique de colza en grande quantité semble être réaliste. En effet, le tourteau de colza est actuellement largement disponible et le procédé de fractionnement semble pouvoir être extrapolé sans difficulté majeure. Ainsi, l'utilisation à l'échelle industrielle de la fraction peptidique de colza paraît envisageable.

IV. Autres atouts de la fraction peptidique de colza

IV.1. Effet cryoprotecteur

Comme nous l'avons explicité dans la partie bibliographie, afin d'éviter toute évolution et modification des caractéristiques propres à chaque lignée cellulaire, des banques de cellules congelées doivent être réalisées. Les milieux de congélation classiquement utilisés contiennent entre 20 et 50% de sérum et 10% de DMSO. Cependant, dans le cas de cellules cultivées en milieu dépourvu de sérum, il est préférable que ce dernier soit supprimé du milieu de congélation, ce qui peut compromettre la viabilité des cellules après congélation.

Les cellules CHO C5 sont actuellement conservées dans du milieu sans sérum supplémenté par 10% de DMSO. Cependant, leur remise en culture s'avère difficile et longue. Aussi, dans le cadre de notre travail, nous avons examiné l'effet potentiellement cryoprotecteur de notre fraction peptidique de colza. Pour cela, nous avons congelé des cellules CHO C5, d'une part, dans le milieu de référence supplémenté avec 10% de DMSO et, d'autre part, dans notre milieu d'intérêt supplémenté avec 10% de DMSO (soit, le milieu de référence + 4 g/L de fraction peptidique de colza + 10% de DMSO). Après une période plus ou moins longue de stockage dans l'azote liquide, les cellules ont été décongelées et leur viabilité cellulaire a été suivie au cours des jours suivant la remise en culture dans des flacons de Roux. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VI.3.

Temps écoulé après décongélation et remise en culture (jour)		Durée de la période de stockage à -196°C												
		1 semaine				1 mois				5 mois				
		0	1	2	4	0	1	2	4	0	1	2	4	6
Viabilité %	Référence	61	44	60	81	46	33	36	65	44	34	36	53	72
	Colza	64	52	56	85	58	46	55	74	39	38	45	68	92

Tableau VI.3 : Evolution de la viabilité cellulaire lors de la décongélation de cellules CHO C5.

Ces résultats montrent que la présence de la fraction peptidique de colza facilite la reprise de la croissance pour des temps de congélation supérieures à un mois. En effet, après six jours de remise en culture, la viabilité des cellules congelées cinq mois dans le milieu d'intérêt est supérieure de 20% à celle observée pour les cellules congelées dans le milieu de référence. Ainsi, l'ajout de peptides de colza dans le milieu de culture sans sérum, permet une conservation et une décongélation des cellules plus efficaces. De plus, les cellules peuvent

Trois flacons agités ont étéensemencés avec 2.10^5 cellules/mL et la concentration cellulaire a été mesurée après 80 heures de culture. Dans les trois cas, une densité cellulaire maximale similaire (6.10^5 cellules/mL) a été atteinte. Ces résultats préliminaires permettent donc d'être confiant quant à la répétabilité du procédé d'hydrolyse et de fractionnement. Ils viennent aussi corroborer l'hypothèse émise par Schlaeger (1996) selon laquelle des étapes d'ultrafiltration assurent la reproductibilité des propriétés stimulatrices de la croissance des peptides, et plus particulièrement, dans son cas la reproductibilité de l'action de différentes solutions stock de Primatone. De même, Sung *et al.* (2004) n'ont observé aucune variation significative dans la capacité de différents lots d'hydrolysats de levures à augmenter la production protéique de cellules CHO.

V. Conclusion

Les différents atouts que présente l'utilisation de la fraction peptidique de colza, au cours des différentes étapes d'un procédé de culture cellulaire, qui ont été mis en évidence dans ce chapitre, sont résumés dans la figure VI.21.

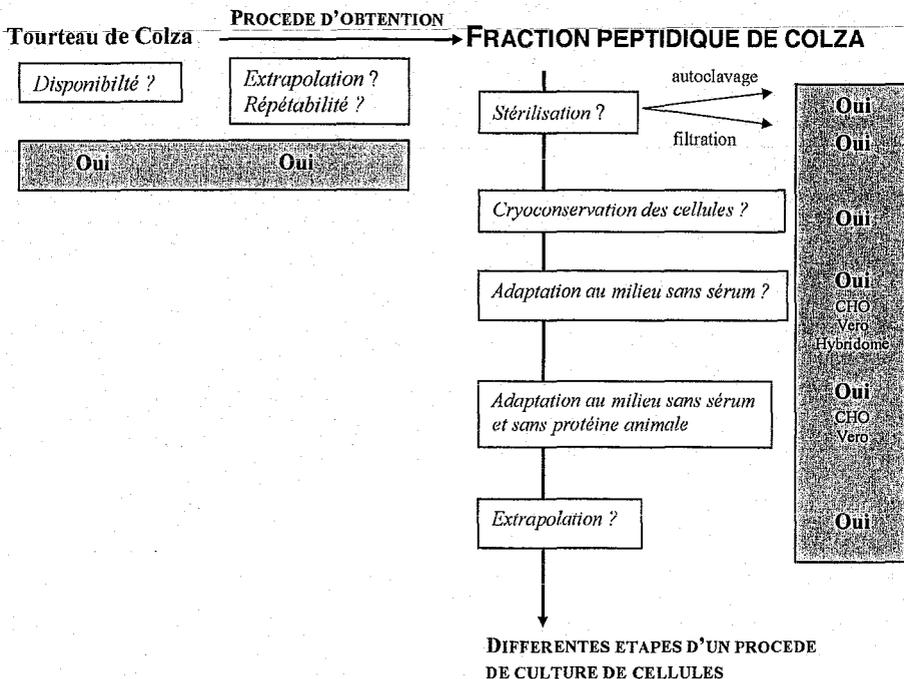
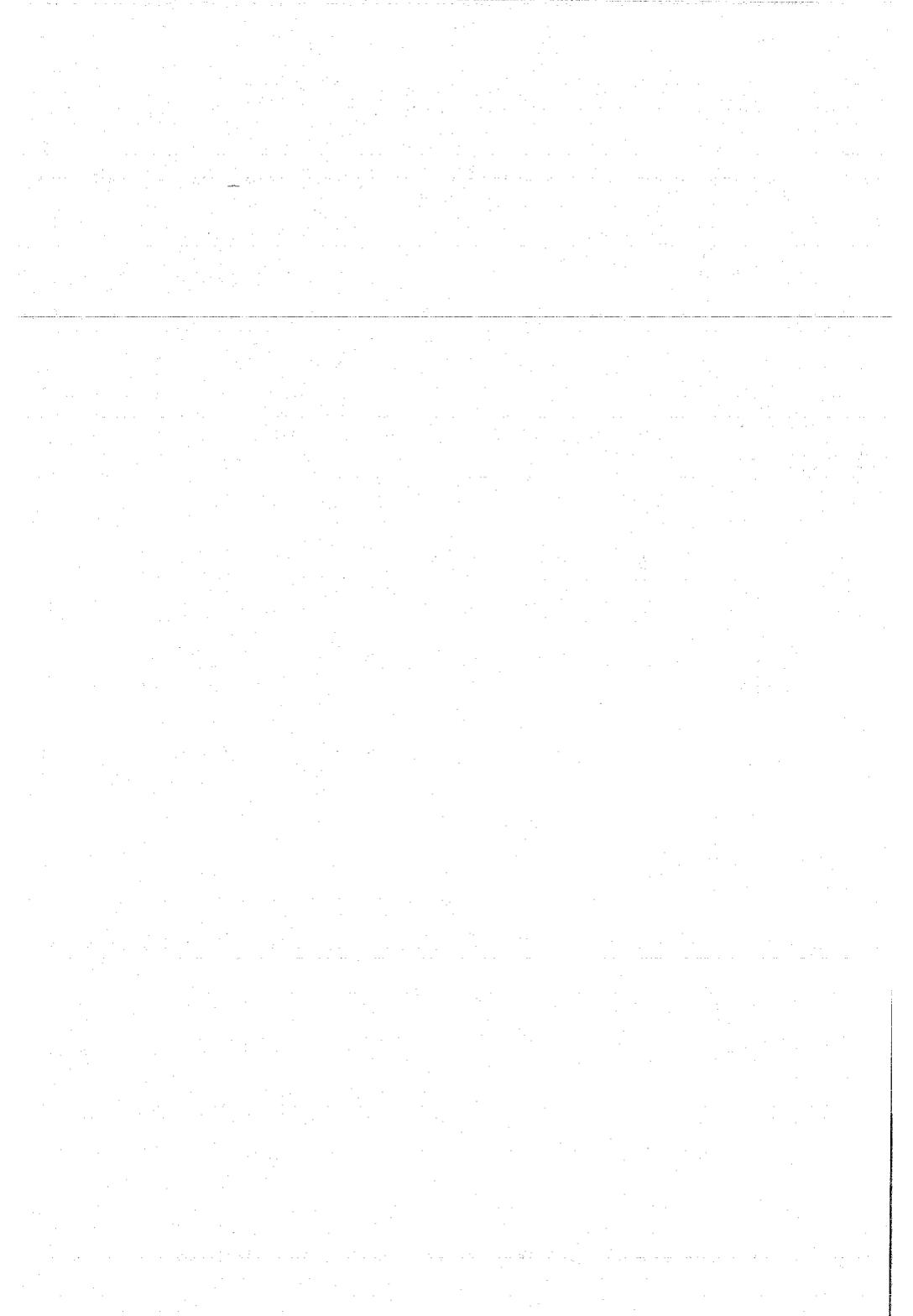
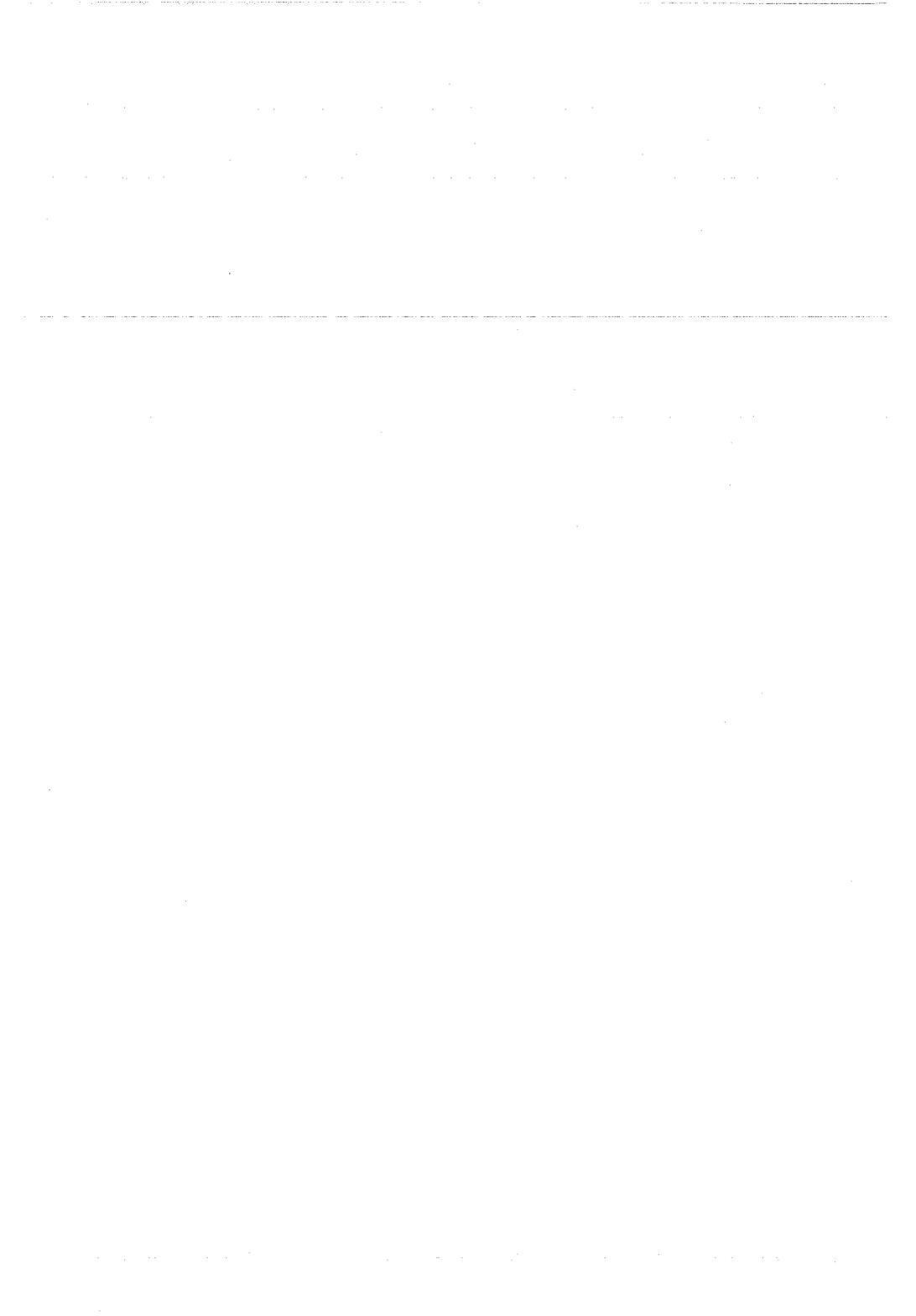


Figure VI.21 : Principaux atouts de la fraction peptidique de colza, au cours des différentes étapes d'un procédé de culture cellulaire.

Ces résultats montrent que l'utilisation de la fraction peptidique de colza présente de nombreux avantages. Ainsi, en plus de ses capacités promotrices de croissance et de production et de son potentiel à augmenter la survie cellulaire, cette fraction de colza permet également, (i) de cryoconserver les cellules dans des conditions sans sérum et de faciliter leur remise en culture, (ii) d'adapter différentes lignées cellulaires industrielles à des milieux très simples sans sérum et/ou sans protéine animale, (iii) et de cultiver les cellules dans plusieurs systèmes et échelle de culture. En outre, sa stérilisation peut-être effectuée sans distinction, soit par autoclavage, soit par filtration, sans altérer ses différentes propriétés.

Le milieu de congélation sans sérum ainsi formulé est d'un intérêt particulier pour conserver les lignées cellulaires cultivées sans sérum pour la production de produits thérapeutiques grâce à la possibilité de réaliser un procédé entièrement sans sérum : cryoconservation, décongélation, croissance des cellules, production des protéines recombinantes, purification.





CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'emploi du sérum de veau fœtal, le supplément le plus largement utilisé pour la culture de cellules animales, présente différents inconvénients dont le principal est le risque de contamination du milieu de culture par des agents pathogènes d'origine animale. Aussi, l'utilisation de milieux sans sérum et/ou sans protéine est devenu l'un des objectifs majeurs à atteindre pour la production de protéines thérapeutiques par des cellules de mammifères. Le principal frein au développement de tels milieux, réside dans le fait que la croissance cellulaire, mais aussi la production en protéines recombinantes, sont généralement beaucoup plus faibles dans ces conditions que lors de cultures réalisées en milieux supplémentés en sérum de veau fœtal et de plus que ces milieux possèdent très souvent une formulation complexe. C'est dans ce contexte que se place l'objectif général de ce travail. En effet, au cours de cette étude, nous avons formulé un milieu sans sérum, permettant, non seulement, d'atteindre et de maintenir une croissance et une production cellulaire élevées, mais aussi, de réduire de façon maximale les risques de transmission d'agents pathogènes d'origine animale. Pour cela, nous avons étudié un procédé de culture en masse de cellules animales en présence de fractions peptidiques végétales, issues de tourteaux de colza.

Dans un premier temps, différentes fractions peptidiques ont été générées grâce à l'utilisation d'un procédé de fractionnement membranaire permettant d'obtenir divers mélanges de petits peptides, à partir d'un hydrolysat enzymatique de tourteau de colza. Chaque fraction a alors été caractérisée et son action sur la croissance de cellules CHO a été étudiée. Une fraction présentant des propriétés promotrices de croissance particulièrement intéressantes a ainsi été sélectionnée. La croissance, la production et le métabolisme des cellules en présence de cette fraction ont alors été étudiés plus précisément afin de mieux comprendre son mode d'action spécifique. Enfin, les atouts de cette fraction peptidique de colza, au cours des différentes étapes d'un procédé de culture, ont été recherchés.

Parmi les résultats obtenus au cours de ces travaux, nous avons dégagé ci-dessous une synthèse des messages essentiels et des contributions qui sont apparues comme les plus originales.

Obtention et caractérisation de fractions peptidiques de colza.

L'hydrolyse des protéines de colza réalisée par l'Alcalase® 2.4L, écarte tout risque de transmission d'agents pathogènes d'origine animale.

L'Alcalase® 2.4L, une enzyme d'origine microbienne et possédant un large spectre de coupure, sans grande spécificité, a permis de générer un hydrolysats riche en peptides de petite taille.

Le procédé de fractionnement membranaire constitue une étape essentielle à l'obtention de fractions peptidiques de diverses compositions.

Le procédé de fractionnement membranaire utilisé permet de purifier l'hydrolysats afin d'en améliorer ses propriétés fonctionnelles ou biologiques et d'obtenir des fractions peptidiques dont la composition est mieux maîtrisée. De plus, ce procédé est simple et facilement extrapolable. Ce procédé nous a permis d'obtenir cinq fractions peptidiques possédant chacune une composition propre, en terme de quantité, de nature, de taille et de charge des peptides, de quantité et de nature des acides aminés et de présence plus ou moins importante d'autres composés tels que les polyphénols.

Evaluation d'une nouvelle source de peptides végétaux, le tourteau de colza.

Les fractions peptidiques de colza présentent des effets variés sur la croissance des cellules CHO, en milieu sans sérum.

La supplémentation d'un milieu de culture sans sérum par différentes fractions peptidiques de colza a montré que leur action sur la croissance des cellules CHO était fonction des caractéristiques propres à chaque fraction ; certaines favorisent, d'autres inhibent et d'autres encore, n'ont aucun effet significatif sur la croissance cellulaire. Ainsi, un effet létal a pu être observé suite à l'ajout de la fraction peptidique contenant la quantité la plus élevée de polyphénols. De plus, une quantité trop importante de petits peptides semble induire un effet inhibiteur de croissance. Enfin, un fort pourcentage en matière azotée par rapport à la matière peptidique totale et une matière azotée constituée de peptides appartenant à une gamme de taille relativement large apparaissent comme deux des paramètres essentiels à l'obtention d'un effet promoteur de croissance. Grâce à ces résultats nous avons donc pu démontrer l'importance de disposer d'un mélange peptidique ne contenant pas uniquement des très petits peptides.

Une étape de sous-fractionnement, par chromatographie d'exclusion de taille permet de mieux cibler la gamme de taille des peptides bioactifs.

Grâce à un sous-fractionnement de la fraction peptidique de colza, il a pu être mis en évidence que c'étaient les peptides de taille comprise entre 500 et 1000 Da qui étaient responsables de l'effet promoteur de croissance. L'utilisation d'une telle sous-fraction permet à la fois d'accroître la définition du milieu de culture, de minimiser les potentielles variations d'activités de lot-à-lot mais aussi de faciliter la purification des protéines recombinantes.

Métabolismes des cellules CHO C5 productrices d'IFN- γ dans un milieu de culture simple, supplémenté par une fraction peptidique de colza.

La supplémentation d'un milieu de culture peu riche, par une fraction peptidique de colza, influence positivement les performances cellulaires.

La supplémentation du milieu de culture par la fraction peptidique de colza a eu un effet positif très marqué sur la croissance et la production des cellules CHO C5 cultivées en milieu sans sérum, doublant la densité cellulaire maximale, triplant la production protéique et ralentissant fortement le déclin cellulaire.

Selon leur taille, les peptides de colza ont un rôle d'apport en acides aminés ou de facteurs de croissance.

Nous avons montré que pour la même quantité en chaque acide aminé, il est nécessaire que ceux-ci soient présents sous forme de "grands" peptides pour que l'effet stimulant sur la croissance et la production cellulaire soit observé. Par contre, le ralentissement de la mort cellulaire semble résulter de l'enrichissement "nutritionnel" de la fraction peptidique par son apport en acides aminés libres et en "petits" peptides (di- et tripeptides).

Le métabolisme central est ralenti lors de l'utilisation de la fraction peptidique de colza.

Les vitesses spécifiques de consommation et de production de différents métabolites sont abaissées lors de la supplémentation du milieu de culture par la fraction peptidique de colza. De même, une diminution de l'activité de la pyruvate carboxylase, une enzyme anaplerotique clé, intervenant dans le métabolisme du glucose, a pu être mise en évidence. Il est ainsi apparu que la fraction peptidique apportait aux cellules des nutriments supplémentaires, sous forme d'acides aminés libres et de di- et tripeptides lui permettant d'économiser l'énergie qu'elle utilise habituellement pour les synthétiser et donc lui permettant de réduire de façon globale, son métabolisme central.

L'effet stimulant de la fraction peptidique ne résulte pas des polyphénols présents.

L'acide sinapique seul, polyphénol majoritaire dans le colza, ne semble pas jouer un rôle majeur dans l'activité promotrice de croissance de la fraction peptidique de colza. En effet, l'ajout d'acide sinapique dans le milieu de culture n'a pas induit d'augmentation de la densité cellulaire maximale. Cependant, un effet permettant de diminuer la vitesse spécifique de décès, favorisant la survie cellulaire ne peut être écarté.

Intérêts supplémentaires de la fraction peptidique de colza.

L'adaptation à la croissance en milieu sans sérum est facilitée pour différentes lignées cellulaires utilisées en milieu industriel.

L'adaptation de cellules animales à la croissance en milieu sans sérum est une des préoccupations majeures des industriels. Or, nous avons montré que grâce à la supplémentation de milieux sans sérum, même très simples, par la fraction peptidique végétale, cette adaptation était non seulement réalisable mais de plus relativement aisée pour diverses lignées cellulaires industrielles. Sans la présence de la fraction peptidique de colza, l'adaptation fut un échec. Il est ainsi apparu que la fraction peptidique de colza utilisée présentait un spectre d'action étendu sur plusieurs lignées cellulaires, lui conférant alors un avantage primordial par rapport à d'autres suppléments de milieux sans sérum existants, qui sont souvent "cellule-spécifique" et dont la formulation reste très complexe, voire inconnue.

La croissance et la production des cellules NSO sont favorisées par la supplémentation de leur milieu de culture par la fraction peptidique de colza.

Les résultats obtenus avec les cellules NSO montrent, non seulement, que l'action de la fraction peptidique de colza n'est pas spécifique à un seul type cellulaire, mais aussi, que son ajout, même dans un milieu de culture commercial plus riche et dont la composition a déjà préalablement été optimisée, permet encore d'améliorer les capacités de croissance et de production des cellules cultivées. Ces conclusions constituent des atouts supplémentaires quant à l'utilisation des peptides de colza.

La fraction peptidique de colza permet la formulation d'un milieu complètement exempt de protéine animale.

Depuis ces cinq dernières années, le défi industriel majeur réside dans la formulation d'un milieu totalement exempt de protéine animale. Nous avons montré qu'un milieu RPMI enrichi

uniquement en peptides de colza et en quelques éléments traces ne diminuait en rien la croissance cellulaire et la production en protéines recombinantes par rapport à un milieu sans sérum classique, tout en facilitant la purification des produits obtenus. Ce milieu, s'il présente un intérêt industriel évident, peut également être utilisé favorablement pour la propagation et l'entretien des cellules. Dans ce cas, il permet, non seulement, d'atteindre des densités cellulaires maximales similaires à celles obtenues dans un milieu sans sérum classique, mais aussi, d'accroître la viabilité des cellules qui nécessitent alors des passages moins fréquents. Enfin, la composition particulièrement simple et connue de ce milieu limite les problèmes rencontrés avec la plupart des milieux commerciaux.

Les peptides de colza facilitent la cryoconservation des cellules.

Le milieu de culture d'intérêt, sans sérum, que nous avons formulé peut également être utilisé en tant que milieu de congélation. En effet, il permet la conservation des cellules sans ajout de sérum de veau fœtal tout en permettant une reprise de croissance plus rapide après des congélations.

L'effet promoteur des peptides de colza est indépendant du système et de l'échelle de culture.

L'influence positive de la fraction peptidique de colza a pu être retrouvée, quel que soit le système, et quel que soit l'échelle de culture employés. Ainsi, cette fraction devrait pouvoir être utilisée dans le cadre de la production de protéines recombinantes à l'échelle industrielle, avec des cellules adhérentes ou en suspension, y compris dans des systèmes agités générateurs de contraintes de cisaillement plus importantes sur les cellules.

L'intérêt de la fraction peptidique se maintient après stérilisation.

La fraction peptidique de colza peut-être stérilisée par de multiples filtrations 0,2 μm ou par autoclavage sans que l'activité de la fraction n'en soit modifiée. Ainsi, selon les exigences spécifiques à chaque culture, la fraction peptidique de colza pourra être réalisée de façon adéquate sans crainte d'une variation dans son activité.

PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans cette étude ont fait ressortir plusieurs points qui mériteraient d'être approfondis pour, d'une part, mieux comprendre le mode d'action de fractions peptidiques végétales sur la croissance, le décès, le métabolisme et la production de cellules animales et, d'autre part, pour encore optimiser leur utilisation.

Un fractionnement plus poussé de la fraction peptidique de colza permettrait sans doute de mieux comprendre la ou les natures des différentes activités (promotion de la croissance, de la production, ralentissement du décès cellulaire) des peptides de colza. Pour cela, la fraction peptidique d'intérêt de colza pourra être fractionnée par différentes méthodes chromatographiques et l'activité des "sous-fractions" en résultant devra être vérifiée grâce à des supplémentations du milieu de culture de cellules animales, d'une part, avec chaque "sous-fraction" et également, avec différentes combinaisons de celles-ci. Ainsi, il pourrait être mis en évidence, non seulement, une, ou des activités biologiques spécifiques, soit d'un unique peptide, soit de la combinaison de plusieurs peptides. De plus, cette identification plus précise des peptides biologiquement actifs devrait permettre de progresser vers des milieux de culture, dénués de composés d'origine animale et mieux définis, indispensables pour la maîtrise des risques dans les procédés pharmaceutiques.

Par la suite, une étude détaillée du métabolisme des cellules en présence des peptides de colza pourrait également apporter des informations essentielles à la compréhension du mode d'action de ces peptides végétaux. En effet, nos travaux ont mis en évidence un ralentissement général du métabolisme central des cellules en présence de la fraction peptidique de colza, et notamment, une diminution de l'activité d'une enzyme particulière, la pyruvate carboxylase. Aussi, il serait maintenant intéressant d'approfondir ces premiers résultats par l'étude des activités intracellulaires d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire du glucose mais aussi de la glutamine et plus particulièrement, l'hexokinase et la glutaminase, qui apparaissent comme deux enzymes susceptibles de réguler respectivement la glycolyse et la glutaminolyse.

De plus, l'effet de la fraction peptidique sur le ralentissement du décès cellulaire mériterait d'être approfondi afin de mettre en évidence une éventuelle activité anti-apoptotique des peptides de colza. Pour cela, il serait utile de mesurer et de comparer l'apoptose des cellules en culture, en présence et en absence de cette fraction peptidique de colza.

En outre, le transport particulier des peptides pourrait être appréhendé grâce à, d'une part, l'étude plus particulière de l'expression, par les cellules CHO, des deux transporteurs peptidiques identifiés chez les mammifères (ovins, souris, rats, poulets, humains...), PepT1 et PepT2 et, d'autre part, grâce à celle des récepteurs spécifiques des peptides pouvant, par exemple induire des cascades de phosphorylation d'effecteurs en aval. De même, l'expression et les activités de peptidases extracellulaires, intracellulaires ou membranaires en présence de peptides végétaux pourraient être examinées.

Dans le but de vérifier la qualité de la protéine produite, la glycosylation de l'interféron- γ produit devra être appréciée. Dans cette optique, il pourrait également être envisagé d'utiliser la fraction peptidique de colza pour la culture de cellules dont la machinerie de glycosylation a été humanisée.

Des études permettant de caractériser les propriétés physico-chimiques de la fraction peptidique pourront également être menées afin d'évaluer l'impact de cette fraction sur la protection des cellules face aux contraintes de cisaillement.

Enfin, dans l'optique d'une utilisation industrielle de la fraction peptidique de colza, une attention particulière devra être portée au procédé d'obtention de la fraction peptidique de colza. En effet, afin d'être complètement reproductible, le procédé entier de génération des peptones devra être rigoureusement contrôlé et cela de façon à diminuer le plus possible les variations de "lot-à-lot".

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes that proper record-keeping is essential for transparency and accountability, particularly in the context of financial reporting and auditing. The text highlights that without reliable records, it becomes difficult to verify the accuracy of financial statements and to identify any potential discrepancies or irregularities.

2. The second part of the document focuses on the role of internal controls in ensuring the integrity of financial information. It explains that internal controls are designed to prevent and detect errors and fraud, thereby safeguarding the organization's assets and ensuring the reliability of its financial data. The text notes that a robust system of internal controls is a key component of a strong corporate governance framework and is critical for maintaining the trust of investors and other stakeholders.

3. The third part of the document addresses the challenges associated with implementing and maintaining effective internal controls. It identifies common obstacles such as lack of resources, insufficient training, and resistance to change, and offers practical suggestions for overcoming these challenges. The text stresses that successful implementation requires a commitment from top management and a culture of continuous improvement, where employees are encouraged to report any weaknesses or areas for enhancement.

4. The final part of the document concludes by reiterating the significance of internal controls and record-keeping in the overall financial management process. It encourages organizations to regularly review and update their internal control systems to adapt to changing business environments and regulatory requirements. The text concludes that a well-implemented system of internal controls is not only a means of risk mitigation but also a tool for enhancing operational efficiency and supporting the organization's long-term success.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Altamiro, C.; Paredes, C.; Cairo, J. J.; Godia, F. Improvement of CHO cell culture formulation : simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 69-75.

Amatsuji, Y.; Takashima, H.; Uemura, Y. A serum-free containing insulin and peptone improved medium for animal cell culture, used for production of e.g. hepatitis B virus surface antigen, monoclonal antibody. *Green Cross*, Patent, **1998**, WO 98/00521.

Amiot, J.; Germain, I.; Turgeon, S.; Lemay, M.; Ory-Salam, C.; Auger, F. A. Peptides from milk protein hydrolysates to improve the growth of human keratinocytes in culture. *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 619-626.

Applegate, M. A.; Stephanopoulos, G. Development of a single-pass ceramic matrix bioreactor for large-scale mammalian cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *40*, 1056-1068.

Arts, I. C.; Hollman, P. C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 317S-325S.

Asher, D. M. Bovine sera used in the manufacture of biologicals : current concerns and policies of the U.S. Food and Drug Administration regarding the transmissible spongiform encephalopathies. *Dev. Biol. Stand.* **1999**, *99*, 41-44.

Avgerinos, G. C.; Drapeau, D.; Socolow, J. S.; Mao, J. I.; Hsiao, K.; Broeze, R. J. Spin filter perfusion system for high density cell culture: production of recombinant urinary type plasminogen activator in CHO cells. *Biotechnology*. **1990**, *8(1)*, 54-58.

Ballez, J. S.; Mols, J.; Burteau, C.; Agathos, S. N.; Schneider, Y. J. Plant protein hydrolysates support CHO-320 cells proliferation and recombinant IFN- γ production in suspension and inside microcarriers in protein-free media. *Cytotechnol.* **2004**, *44*, 103-114.

Barnes, D.; Sato, G. Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal. Biochem.* **1980**, *102(2)*, 255-270.

Bebbington, C. R.; Renner, G.; Thomson, S.; King, D.; Abrams, D.; Yarranton, G. T. High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. *Biotechnol.* **1992**, *10(2)*, 169-175.

Betton, J. M. Rapid Translation System (RTS): A Promising Alternative for Recombinant Protein Production *Current Protein & Peptide Science*. **2003**, *4(1)*, 73-80.

Billiau, A.; Dijkmans, R. Interferon- γ : mechanism of action and therapeutic potential. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 1433-1439.

Blom, W. R.; Kunst, A.; Schie, B. J.; Van, Luli, G. W. Method for in vitro cell growth of eucaryotic cells using low molecular weight peptides. *Quest International Flavors and Food Ingredients Company*, Patent. **1988**, WO 393338, USA.

Bonarius, H. P. J.; Hatzimanikatis, V.; Meesters, K. P. H.; de Gooijer, C. D.; Schmid, G.; Tramper, J. Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *50*, 299-318.

Bonarius, H. P. J.; Houtman, J. H. M.; de Gooijer, C. D.; Tramper, J.; Schmid, G. Activity of glutamate deshydrogenase is increased in ammonia-stressed hybridoma cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *57*, 447-453.

- Brand, K. Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation. Pathways of glutamine and glutamate metabolism. *Biochem. J.* **1985**, *228*, 353-361.
- Brinkmann, M.; Lütkemeyer, D.; Gudermann, F.; Lehmann, J. New technologies for automated cell counting based on optical image analysis "The Cellscreen". *Cytotechnol.* **2002**, *38*, 119-127.
- Brotherton, J. D.; Chau, P. C. Analysis of convective flow effects on the performance of an intercalated-spiral alternate-dead-ended hollow fiber bioreactor. *Chemical Engineering Science.* **1995**, *50(23)*, 3813-3828.
- Bryant, J. C. Methylcellulose effect on cell proliferation and glucose utilization in chemically defined medium in large stationary culture. *Biotechnol. Bioeng.* **1969**, *11*, 155-179.
- Burteau, C.; Verhoeve, F.; Mols, J.; Ballez, J. S.; Agathos, S.; Schneider, Y. J. Fortification of a protein-free cell culture medium with plant peptones improves cultivation and productivity of an interferon- γ -producing CHO cell line. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal.* **2003**, *39*, 291-296.
- Butler, M. A comparative review of microcarriers available for the growth of anchorage-dependent animal cells. In : *Animal Cell Technology.* **1987**, Spier, R. E.; Griffiths, J. B.; Eds. Academic Press, 284-303.
- Butler, M. The use of animal cell and tissue culture in biotechnology. *The Genetic Engineer and Biotechnologist.* **1990**, *10*, 13-15.
- Cahn, F. Biomaterials aspects of porous microcarriers for animal cell culture. *Tibtech.* **1990**, *8*, 131-136.
- Castilho, L. R.; Anspach, F. B.; Deckwer, W. D. An integrated process for mammalian cell perfusion cultivation and product purification using a dynamic filter. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18(4)*, 776-781
- Castle, P.; Robertson, J. S. Animal sera, animal sera derivatives and substitutes used in the manufacture of pharmaceuticals. *Biologicals.* **1998**, *26(4)*, 365-368.
- Castro, M.; Hayter, P. M.; Ison, A. P.; Bull, A. T. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *38(1)*, 84-90.
- Cavaillon, J. M. Le monde des cytokines. In : *Les cytokines.* **1993**, Cavaillon, J. M. Ed. Masson, Paris, 1-11.
- CETIOM, 2004 www.cetiom.fr/CTMSite/page/technique/fiches_brochures/pdf/broch_co/pages38-40.pdf
- CETIOM. Les protéines d'oléagineux. *Oléoscope.* **1998**, *44*.
- Chabanon, G. Obtention de fractions ciblées de peptides par hydrolyse enzymatique de protéines de tourteau de colza. **En cours**, *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine*, Nancy.
- Charley, B.; La Bonnardière, C. Interféron-gamma. In : *Les cytokines.* **1993**, Cavaillon, J. M. Ed. Masson, Paris, 131-143.
- Chen, H.; Pan, Y.; Wong, E. A.; Bloomquist, J. R.; Webb, K. E. Molecular cloning and functional expression of a chicken intestinal peptide transporter (cPepT1) in *Xenopus* oocytes and Chinese hamster ovary cells. *J. Nutr.* **2002**, *132(3)*, 387-93
- Cherlet, M.; Marc, A. Intracellular pH monitoring as a tool for the study of hybridoma cell behavior in batch and continuous bioreactor cultures. *Biotechnol. Prog.* **1998**, *14(4)*, 626-638.
- Chevalot, I. Production d'une protéine membranaire humaine par cultures en réacteurs de cellules animales recombinantes : obtention de la lignée CHO recombinante et études cinétiques en réacteurs discontinus et semi-continus. **1992**, *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine*, Nancy.
- Chevalot, I.; Visvikis, A.; Nabet, P.; Engasser, J. M.; Marc, A. Production of a membrane-bound protein, the human gamma-glutamyl transferase, by CHO cells cultivated on microcarriers, in aggregates and in suspension. *Cytotechnol.* **1994**, *16*, 121-129.

- Choi, S. K.; Chang, H. N.; Lee, G. M.; Kim, I. H.; Oh, D. J. High cell density cultures of anchorage-dependent Vero cells in a depth filter perfusion system. *Cytotechnol.* **1995**, *17*, 173-183.
- Chou, I. N.; Prezyna, C.; Black, P. H. Isolation from lactalbumin hydrolysate of a high molecular weight mitogenic factor. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*(21), 10588-10591.
- Christie, A.; Butler, M. Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase. *J. Biotechnol.* **1994**, *37*(3), 277-290.
- Chu, L.; Robinson, D. K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current opinion in biotechnology.* **2001**, *12*, 180-187.
- Chun, C.; Heineken, K.; Szeto, D.; Ryll, T.; Chamow, S.; Chung, J. D. Application of factorial design to accelerate identification of CHO growth factor requirements. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*(1), 52-57.
- Clare, D. A.; Swaisgood, H. E. Bioactive milk peptides : A prospectus. *Journal of Dairy Science*, **2000**, *83*: 1187-1195.
- Clemente, A. Enzymatic protein hydrolysate in human nutrition. *Trends in Food Sci. Technol.* **2000**, *11*, 254-262.
- Curling, E. M. A.; Hayter, P. M.; Baines, A. J.; Bull, A. T.; Gull, K.; Strange, P. G.; Jenkins, N. Recombinant human interferon-gamma - Differences in glycosylation and proteolytic processing lead to heterogeneity in batch culture. *Biochem. J.* **1990**, *272*, 333-337.
- Curthoys, N. P.; Watford, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **1995**, *15*, 133-159.
- Dall'Asta, V.; Rossi, P. A.; Bussolati, O.; Guidotti, G. G.; Gazzola, G. C. The transport of L-glutamine into cultured human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **1990**, *1052*(1), 106-112.
- Dalton, R. Berkeley accused of biotech bias as ecologist is denied tenure. *Nature.* **2003**, *426*, 591.
- Daniel, H.; Herget, M. Cellular and molecular mechanisms of renal peptide transport. *Am. J. Physiol.* **1997**, *273*, 1-8.
- Daniel, H.; Morse, E. L.; Adibi, S. A. The high and low affinity transport systems for dipeptides in kidney brush border membrane respond differently to alterations in pH gradient and membrane potential. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*(30), 19917-19924.
- Dardenne, M.; Cherlet, M.; Engasser, J. M.; Marc, A. Kinetic studies of fed-batch hybridoma cultures : effect of various feeding compositions and flow rates. In : *Animal Cell Technology.* **1994**, Spier, R. E.; Griffiths, J. B. Eds., 542-544.
- Dardenne, M. Stratégies d'optimisation de la production d'anticorps monoclonaux en réacteurs semi-fermés : enrichissement du milieu de culture, substitution de substrats et ajout d'un effecteur. **1995**, *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine*, Nancy.
- Deo, Y. M.; Mahadevan, M. D.; Fuchs, R. Practical considerations in operation and scale-up of spin-filter based bioreactors for monoclonal antibody production. *Biotechnol. Prog.* **1996**, *12*(1), 57-64.
- Deparis, V.; Durrieu, C.; Schweizer, M.; Goergen, J. L.; Chevalot, I.; Marc, A. Promoting effect of rapeseed proteins and peptides on Sf9 insect cell growth. *Cytotechnol.* **2003**, *42*(2), 75-85.
- Desportes, C.; Charpentier, M.; Duteurtre, B.; Maujean, A.; Duchiron, F. Liquid chromatographic fractionation of small peptides from wine. *J. Chromatogr. A.* **2000**, *893*, 281-291.
- Dev, D. K.; Mukherjee, K. D. Functional properties of rapeseed protein products with varying phytic acid contents. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 775-780.

- Devos, R.; Opsomer, C.; Schahill, S. J.; Heyden, J. V. D.; Fiers, W. Purification of recombinant glycosylated human gamma interferon expressed in transformed Chinese hamster ovary cells. *J. Interferon. Res.* **1984**, *4*, 461-468.
- Donaldson, M. S.; Shuler, M. L. Low-cost serum-free medium for the BTI-Tn5B1-4 insect cell line. *Biotechnol. Prog.* **1998**, *14*, 573-579.
- Donnelly, M.; Scheffler, I. E. Energy metabolism in respiration-deficient and wild type Chinese hamster fibroblasts in culture. *J. Cell. Physiol.* **1976**, *89*, 39-52.
- Doverskog, M.; Ljunggren, J.; Ohman, L.; Haggstrom, L. Physiology of cultured animal cells. *J. Biotechnol.* **1997**, *59(1-2)*, 103-115.
- Ducommun, P.; Ruffieux, P. A.; Kadouri, A.; von Stockar, U.; Marison, I. W. Monitoring of temperature effects on animal cell metabolism in a packed bed process. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *77(7)*, 838-842.
- Dulbecco, R.; Freeman, G. Plaque protection by the Polyoma virus. *Virology.* **1959**, *8*, 396-397.
- Duval, D.; Demangel, C.; Miossec, S.; Geahel, I. Role of metabolic waste products in the control of cell proliferation and antibody production by mouse hybridoma cells. *Hybridoma* **1992**, *11(3)*, 311-322.
- Dyring, C.; Hansen, H. A.; Emborg, C. Observations on the influence of glutamine, asparagine and peptone on growth and t-PA production of Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Cytotechnol.* **1994**, *16*, 37-42.
- Eagle, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science.* **1955**, *122*, 501-504.
- Ealick, S. E.; Cook, W. J.; Vijay-Kumar, S.; Carson, M.; Nagabhusan, T. L. Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science.* **1991**, *252*, 698-702.
- Elias, C. B.; Carpentier, E.; Durocher, Y.; Bisson, L.; Wagner, R.; Kamen, A. Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and *Trichoplusia ni* insects cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19(1)*, 90-97.
- FAO. Rapport d'activité. *Food and Agriculture Organization.* **2002**.
- Farges-Haddani, B.; Tessier, B.; Chenu, S.; Ilarscoat, C.; Marc, I.; Goergen, J. L.; Marc, A. Controlled peptidic fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in cell culture media. Submitted to *Biotechnol. Prog.* **2005**.
- Farrar, M. A.; Schreiber, R. D. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Ann. Rev. Immunol.* **1993**, *11*, 571-611.
- Fei, Y. J.; Kanai, Y.; Nussberger, S.; Ganapathy, V.; Leibach, F. H.; Romero, M. F.; Singh, S. K.; Boron, W. F.; Hediger, M. A. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature.* **1994**, *368(6471)*, 563-566.
- Fei, Y. J.; Sugawara, M.; Liu, J. C.; Li, H. W.; Ganapathy, V.; Ganapathy, M. E.; Leibach, F. H. cDNA structure, genomic organization, and promoter analysis of the mouse intestinal peptide transporter PEPT1. *Biochim. Biophys. Acta.* **2000**, *1492*, 145-154.
- Fenge, C.; Klein, C.; Heuer, C.; Siegel, U.; Fraune, E. Agitation, aeration and perfusion modules for cell culture bioreactors. *Cytotechnol.* **1993**, *11(3)*, 233-244.
- Fiechter, A.; Gmünder, F. K. Metabolic control of glucose degradation in yeast and tumor cells. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1989**, *39*, 1-28.
- Fitzpatrick, L.; Jenkins, H. A.; Butler, M. Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture. *Appl. Biochem. Biotech.* **1993**, *43*, 93-116.

- Franek, F. Peptides modulate growth and productivity of mammalian cell cultures and suppress apoptosis. *BioProcess International*. 2004, June, 48-52.
- Franek, F.; Hohenwarter, O.; Katinger H. Plant protein hydrolysates : preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotechnol. Prog.* 2000, 16, 688-692.
- Franek, F.; Eckschlager, T.; Katinger H. Enhancement of monoclonal antibody production by lysine-containing peptides. *Biotechnol. Prog.* 2003, 19, 169-174.
- Franek, F.; Katinger, H. Specific effects of synthetic oligopeptides on cultured animal cells. *Biotechnol. Prog.* 2002, 18(1), 155-158.
- Frazzatti-Gallina, N. M.; Mourao-Fuches, R. M.; Paoli, R. L.; Silva, M. L.; Miyaki, C.; Valentini, E. J.; Raw, I.; Higashi, H. G. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine*. 2004, 23, 511-517.
- Freshney, R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 1994, 3rd Ed. Wiley-Liss. New York, USA
- Froud, S. J. The development, benefits and disadvantages of serum-free media. *Dev. Biol. Stand.* 1999, 99, 157-166.
- Galet, C.; Menck Le Bourhis, C.; Chopineau, M.; Le Griec, G.; Perrin, A.; Magallon, T.; Attal, J.; Viglietta, C.; Houdebine, L. M.; Guillou, F. Expression of a single alpha/beta chain protein of equine LH/CG in milk of transgenic rabbits and its biological activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001, 174, 31-40.
- Ganapathy, V.; Burckhardt, G.; Leibach, F. H. Characteristics of glycylsarcosine transport in rabbit intestinal brush-border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 1984, 259(14), 8954-8959.
- Ganapathy, V.; Leibach, F. H. Role of pH gradient and membrane potential in dipeptide transport in intestinal and renal brush-border membrane vesicles from the rabbit. Studies with L-carnosine and glycy-L-proline. *J. Biol. Chem.* 1983, 258, 14189-14192.
- Geaugey, V.; Duval, D.; Geahel, I.; Marc, A.; Engasser, J. M. Influence of amino acids on hybridoma cell viability and antibody secretion. *Cytotechnol.* 1989, 2, 119-129.
- GEN. Innovative systems for expression of proteins. *Gen. Eng. News.* 2003, 23(1), 14.
- Glacken, M. W. Catabolic control of mammalian cell culture. *BioTechnol.* 1988, 6, 1041-1050.
- Glacken, M. W.; Fleischaker, R. J.; Sinskey, A. J. Reduction of waste product excretion via nutrient control : possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cell. *Biotechnol. Bioeng.* 1986, 28, 1376-1389.
- Glasser, V. Fermenters and bioreactors for bioprocessing. *Genetic Engineering News.* 2000, 20(14), 13, 15, 81.
- Glassy, M. C.; Tharakan, J. P.; Chau, P. C. Serum-free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* 1988, 32, 1015-1028.
- Godel, H.; Seitz, P.; Verhoef, M. Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC-Cl precolumn derivatization, *LC-GC INTL* 1992, 5, 44-49.
- Godon, B. Protéines végétales. Les méthodes courantes de laboratoire pour la séparation et l'analyse des protéines végétales. In : *Protéines végétales*. 1996, Lavoisier TecDoc eds., Paris, 65-80.
- Goergen, J. L. Cultures continues d'hybridomes : études cinétiques et modélisation de l'influence de paramètres physico-chimiques sur la croissance, le décès et le métabolisme des cellules. 1992, *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine*, Nancy.
- Goergen, J. L.; Marc, A.; Engasser, J. M. Determination of cell lysis and death kinetics in continuous hybridoma cultures from the measurement of lactate dehydrogenase release. *Cytotechnol.* 1993, 11(3), 189-195.

- Goergen J. L., Marc, A.; Engasser, J. M.; Rabaud, J. N.; Pierry, G.; Geaugey, V.; Geahel, I.; Hache, J. Development of a new membrane reactor for large scale mammalian cell culture. *In : Animal Cell Technology*. 1994, Spier, R. E.; Griffiths, J. B. Eds., 287-290.
- Golshani-Hebroni, S. G.; Bessman, S. P. Hexokinase binding to mitochondria: a basis for proliferative energy metabolism. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1997, 29(4), 331-338.
- Gray, P. W.; Leung, D. W.; Pennica, D.; Yelverton, E.; Najarian, R.; Simonsen, C. C.; Derynck, R.; Sherwood, P. J.; Wallace, D. M.; Berger, S. L.; Levinson, A. D.; Goeddel, D. V. Expression of human immune interferon cDNA in *E.coli* and monkey cells. *Nature*. 1982, 295, 503-508.
- Grima, E. M.; Chisti, Y.; Moo-Young, M. Characterization of shear rates in airlift bioreactors for animal cell culture. *J. Biotechnol.* 1997, 54(3), 195-210.
- Grimble, G. K.; Rees, R. G.; Keophane, P. P.; Cartwright, T.; Desreumaux, M.; Silk, D. B. A. Effect of peptide chain length on adsorption of egg protein hydrolysates in the normal jejunum. *Gastroenterol.* 1987, 92, 136-142.
- Grzesiek, S.; Dobeli, H.; Gentz, R.; Garotta, G.; Labhardt, A. M.; Bax, A. ¹H, ¹³C and ¹⁵N NMR backbone assignments and secondary structure of human interferon-gamma. *Biochemistry*. 1992, 31, 8180-8190.
- Gu, X.; Xie, L.; Harmon, B. J.; Wang, D. I. C. Influence of Primatone RL supplementation on sialylation of recombinant human interferon- γ produced by Chinese hamster ovary cell culture serum-free media. *Biotechnol. Bioeng.* 1997, 56, 353-360.
- Hägström, L.; Ljunggren, J.; Ohman, L. Metabolic engineering of animal cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1996, 782, 40-45.
- Ham, R. G. Nutritional requirements of primary cultures : a neglected problem of modern biology. *In Vitro*. 1974, 10, 119-129.
- Hamilton, W. G.; Ham, R. G. Clonal growth of Chinese hamster ovary lines in protein-free media. *In vitro*. 1977, 272, 333-337.
- Han, H. K.; Rhie, J. K.; Oh, D. M.; Saito, G.; Hsu, C. P.; Stewart, B. H.; Amidon, G. L. CHO/hPEPT1 cells overexpressing the human peptide transporter (hPEPT1) as an alternative in vitro model for peptidomimetic drugs. *J. Pharm. Sci.* 1998, 88, 347-350.
- Hara, H.; Funabiki, R.; Iwata, M.; Yamazaki, K. Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions. *J. Nutr.* 1984, 114(6), 1122-1129.
- Hayter, P. M.; Curling, E. M. A.; Baines, A. J.; Jenkins, N.; Salmon, I.; Strange, P. G.; Bull, A. T. Chinese Hamster Ovary cell growth and interferon production kinetics in stirred batch culture. *Appl. Microb. Biotechnol.* 1991, 34, 559-564.
- Hayter, P. M.; Curling, E. M. A.; Gould, M. L.; Baines, A. J.; Jenkins, N.; Salmon, I.; Strange, P. G.; Bull, A. T. The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon-gamma production in glucose-limited chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.* 1993, 42, 1077-1085.
- Hayward, B. E.; Hussain, A.; Wilson, R. H.; Lyons, A.; Woodcock, V.; McIntosh, B.; Harris, T. J. The cloning and nucleotide sequence of cDNA for an amplified glutamine synthetase gene from the Chinese hamster. *Nucleic Acids Res.* 1986, 14(2), 999-1008.
- Heidemann, R.; Zhang, C.; Qi, H.; Rule, J. L.; Rozales, C.; Park, S.; Chuppa, S.; Ray, M.; Michaels, J.; Konstantinov, K.; Naveh, D. The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high-density necessary to cells. *Cytotechnol.* 2000, 32, 157-167.
- Heimindinger, P. Medium and method for viral propagation and growth. *Pasteur Merieux Serums et Vaccins; Meril S.A.S.*, Patent. 1999, WO 99/47648

- Henry, C. The next pharmaceutical century. *Gen. Eng. News*. **2000**, 85-100.
- Hewlett, G. Strategies for optimising serum-free media. *Cytotechnol.* **1991**, 5(1), 3-14.
- Higuchi, K. Cultivation of animal cells in chemically defined media, a review. *Methods Cell. Biol.* **1976**, 14, 131-143.
- Hodgson, J. Expression systems : a user's guide. *BioTechnology*. **1993**, 11, 887-893.
- Hopfer, U. Digestion and absorption of basic nutritional constituents. In: Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. Fourth edition, 1997, Delwin TM (ed.) 1055-1086, Wiley-Liss, New York.
- Howell, S.; Kenny, A. J.; Turner, A. J. A survey of membrane peptidases in two human colonic cell lines, Caco-2 and HT-29. *Biochem. J.* **1992**, 284, 595-601.
- Hu, W. S.; Dodge, T. C.; Frame, K. K.; Himes, V. B. Effect of glucose on the cultivation of mammalian cells. *Dev. Biol. Stand.* **1987**, 66, 279-290.
- Hu, Y. C.; Lu, J. T.; Chung, Y. C. High-density cultivation of insect cells and production of recombinant baculovirus using a novel oscillating bioreactor. *Cytotechnol.* **2003**, 42(3), 145-153.
- Hugli, T. E.; Moore, S. Determination of the tryptophan content of proteins by ion exchange chromatography of alkaline hydrolysates. *J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 2828-2834.
- Hume, D. A.; Radik, J. L.; Ferber, E.; Weidemann, M. J. Aerobic glycolysis and lymphocyte transformation. *Biochem. J.* **1978**, 174(3), 703-709.
- Ikonomou, L.; Bastin, G.; Schneider, Y. J.; Agathos, S. N. Design of an efficient medium for insect cell growth and recombinant protein production. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal.* **2001**, 37, 549-559.
- Imamura, T.; Crespi, C. L.; Thilly, W. G.; Brunengraber, H. Fructose as a carbohydrate source yields stable pH and redox parameters in microcarrier cell culture. *Anal. Biochem.* **1982**, 124(2), 353-358.
- Irani, N.; Wirth, M.; Van Den Heuvel, J.; Wagner, R. Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, 66(4), 238-246.
- Isaacs, A.; Lindenmann, J. Virus interference I. The interferon. *Proc. Roy. Soc. B.* **1957**, 147, 258-267.
- James, D. C.; Freedman, R. B.; Hoare, M.; Ogonah, O. W.; Rooney, B. C.; Larionov, O. A.; Dobrovolsky, V. N.; Lagutin, O. V.; Jenkins, N. N-glycosylation of recombinant human interferon-gamma produced in different animal expression systems. *Biotechnol.* **1995**, 13(6), 592-596.
- Jan, D. C.; Jones, S. J.; Emery, A. N.; Al-Rubeai, M. Peptone, a low-cost growth-promoting nutrient for intensive animal cell culture. *Cytotechnol.* **1994**, 16(1), 17-26.
- Jayne, D. W. Nutrient optimization for high density biological production applications. *Cytotechnol.* **1991**, 5, 15-30.
- Jayne, D. W. An animal origin perspective of common constituents of serum-free medium formulations. *Dev. Biol. Stand.* **1999**, 99, 181-187.
- Jeejeebhoy, K. N. Vegetable proteins: are they nutritionally equivalent to animal protein? *Eur. J. Gastroenterology Hepatology*. **2000**, 12, 1-2.
- Jenkins, N.; Parekh, R. B.; James, D. C. Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14(8), 975-981.
- Jenkins, H. A.; Butler, M.; Dickson, A. J. Characterization of glutamine metabolism in two related murine hybridomas. *J. Biotechnol.* **1992**, 23(2), 167-82.

- Johansson, L.; Klinth, J.; Holmqvist, O.; Ohlson, S. Platelet lysate : a replacement for fetal bovine serum in animal cell culture? *Cytotechnol.* **2003**, *42*, 67-74.
- Jordan, M.; Sucker, H.; Einsele, A.; Widmer, F.; Eppenburger, H. M. Interactions between animal cells and gas bubbles: the influence of serum and Pluronic F-68 on the physical properties of the bubble surface. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 446-454.
- Kadouri, A.; Wang, G.; Zang, W.; Jacklin, C.; Freedman, D. Design and performance of a perfusion based packed bed bioreactor for the production of secreted protein. In : *Animal Cell Technology*. **1997**, Spier, R. E.; Griffiths, J. B. Eds., 307-312.
- Kallef, H.; Jouini, A.; Majoul, S.; Rourou, S. Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells. *J. Biotechnol.* **2002**, *95*(3), 195-220
- Kapsi, L.; Fiorentini, D.; Talmon, R.; Benett, G. Growth subculture and cryopreservation of anchorage-dependent cell : a complete serum-free system. In : *Animal Cell Technology*. **1992** Spier, R. E.; Griffiths, J. B. Eds., 1461-148.
- Keay, L. Autoclavable low cost serum-free cell culture media : the growth of established cell lines and production of viruses. *Biotechnol. Bioeng.* **1976**, *18*, 363-382.
- Keen, M. J.; Rapson, N. T. Development of a serum-free culture medium for the large scale production of recombinant protein from chinese hamster ovary cell line. *Cytotechnol.* **1995**, *17*, 153-163.
- Kelker, H. C.; Le, J.; Rubin, B. Y.; Yip, Y. K.; Nagler, C.; Vilcek, J. Three molecular weight forms of natural human interferon-gamma revealed by immunoprecipitation with monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*(7), 4301-4304.
- Kessler, N. Culture cellulaire en milieu sans sérum. *Biofutur (technoscope)*. **1994**, *133*, 3-17.
- Kim, J. S.; Ahn, B. C.; Lim, B. P.; Choi, Y. D.; Jo, E. C. High-level scu-PA production by butyrate-treated serum-free culture of recombinant CHO cell line. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*(6), 1788-1796.
- Kovar, J.; Franek, F. Serum-free medium for hybridoma and parental myeloma cell cultivation. *Methods Enzymol.* **1986**, *121*, 277-292.
- Kurokawa, H.; Park, Y. S.; Iijima, S.; Kobayash, T. Growth characteristics in fed-batch culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *44*(1), 95-103.
- Kuzuhara, S.; Nakamura, H.; Hayashida, K.; Obata, J.; Abe, M.; Sonoda, K.; Nishiyama, K.; Sugawara, K.; Takeda, K.; Honda, T.; Matsui, H.; Shigaki, T.; Kino, Y.; Mizokami, H.; Tanaka, M.; Mizuno, K.; Ueda, K. Non-clinical and phase I clinical trials of a Vero cell-derived inactivated Japanese encephalitis vaccine. *Vaccine*. **2003**, *21*, 4519-4526.
- Kwon, M. S.; Dojima, T.; Park, E. Y. Use of plant-derived protein hydrolysates for enhancing growth of *Bombyx mori* insect cells in suspension culture. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2004**, Nov 4, on line.
- Lamotte, D. 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. **1997**, *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy*.
- Lamotte, D.; Eon-Duval, A.; Acerbis, G.; Distefano, G.; Monaco, L.; Soria, M.; Jenkins, N.; Engasser, J. M.; Marc, A. Controlling the glycosylation of recombinant proteins expressed in animal cells by genetic and physiological engineering. In : *Animal Cell Technology : from vaccines to genetic medicine*. **1997**, Spier, R. E.; Griffiths, J. B. Eds., 761-765.
- Lanks, K. W.; Li, P. W. End products of glucose and glutamine metabolism by cultured cell lines. *J. Cell. Physiol.* **1988**, *135*, 151-155.

- Lao, M. S.; Schalla, C. Development of serum-free medium using computer-assisted factorial design and analysis. *Cytotechnol.* **1996**, *22*, 25-31.
- Lao, M. S.; Toth, D. Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol. Prog.* **1997**, *13*(5), 688-691.
- Larrick, J. W.; Thomas, D. W. Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current opinion in biotechnology.* **2001**, *12*, 411-418.
- Le Floch, F.; Tessier, B.; Chenuet, S.; Guillaume, J. M.; Cans, P.; Marc, A.; Goergen, J. L. HPCE monitoring of the N-glycosylation pattern and sialylation of murine erythropoietin produced by CHO cells in batch processes. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*(3), 864-871.
- Lee, G. M.; Kim, E. J.; Kim, N. S.; Yoon, S. K.; Ahn, Y. H.; Song, J. Y. Development of a serum-free medium for the production of erythropoietin by suspension culture of recombinant Chinese hamster ovary cells using a statistical design. *J. Biotechnol.* **1999**, *69*(2-3), 85-93.
- Lee, P. A.; Pittam, S.; Hill, R. The voluntary food intake by growing pigs of diets containing treated rapeseed meals or extracts of rapeseed meals. *Brit. J. Nutr.* **1984**, *52*, 159-164.
- Lemarié, J.; De Looze, M. A.; Rivaud, D. Protéines de colza : quels usages industriels? *Oléoscope.* **1996**, *36*, 9-18.
- Lewis, D. B.; Wilson, C. B. Gamma interferon : an immunoregulatory lymphokine with immunotherapeutic potential. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **1990**, *9*, 642-651.
- Lin, Y. C.; Wu, C. N.; Shih, S. R.; Ho, M. S. Characterization of a Vero cell-adapted virulent strain of enterovirus 71 suitable for use as a vaccine candidate. *Vaccine.* **2002**, *20*, 2485-2493.
- Littman, S. J.; Devos, R.; Baelioni, C. Binding of unglycosylated and glycosylated human recombinant interferon-gamma to cellular receptors. *J. Interferon. Res.* **1985**, *5*, 471-476.
- Liu, W.; Liang, R.; Ramamoorthy, S.; Fei, Y. J.; Ganapathy, M. E.; Hediger, M. A.; Ganapathy, V.; Leibach, F. H. Molecular cloning of PEPT 2, a new member of the H⁺/peptide cotransporter family, from human kidney. *Biochim. Biophys. Acta.* **1995**, *1235*, 461-466.
- Ljunggren, J.; Häggström, L. Glutamine limited fed-batch culture reduces the overflow metabolism of amino acids in myeloma cells. *Cytotechnol.* **1992**, *8*(1), 45-56.
- Ljunggren, J.; Häggström, L. Catabolic control of hybridoma cells by glucose and glutamine limited fed batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *44*(7), 808-818.
- Ljunggren, J.; Häggström, L. Specific growth rate as a parameter for tracing growth-limiting substances in animal cell cultures. *J. Biotechnol.* **1995**, *42*(2), 163-175.
- Luan, Y. T.; Muthrasan, R.; Magee, W. E. Effect of various glucose/glutamine ratios on hybridoma growth, viability and monoclonal antibody formation. *Biotechnol. Letters.* **1987**, *9*, 535-538.
- Lubiniecki, A.; Arathoon, R.; Polajstri, G.; Thomas, J.; Wiebe, M.; Garnick, R.; Jones, A.; van Reis, R.; Builder, S. Selected strategies for manufacturing and control of recombinant tissue plasminogen activator prepared from cell cultures. In : *Advances in animal cell biology and technology for bioprocesses.* **1988**, Spier, R. E.; Griffiths, J. B.; Crooy, P. J. Eds., Butterworths, 442-451.
- Ma, J. K.; Drake, P. M.; Christou, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4*(10), 794-805.
- Maranga, L.; Mendonça, R. Z.; Bengala, A.; Peixoto, C. C.; Moraes, R. H. P.; Pereira, C. A.; Carrondo, M. J. T. Enhancement of Sf-9 cell growth and longevity through supplementation of culture medium with hemolymph. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 58-63.

- Marks, D. M. Equipment design considerations for large scale cell culture. *Cytotechnol.* **2003**, *42*, 21-33.
- Martial, A.; Gaillard, I.; Engasser, J. M.; Marc, A. Continuous hybridoma culture in a low-protein serum-free medium supplemented with liposomes. *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, *17*(12), 1062-1066.
- Martinelle, K.; Haggstrom, L. Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: transport across cell membranes. *J. Biotechnol.* **1993**, *30*(3), 339-350.
- Martinelle, K.; Doverstokg, M.; Jacobsen, U.; Chapman, B. E.; Kuchel, P. W.; Haggstrom, L. Elevated glutamate dehydrogenase flux in glucose-deprived hybridoma and myeloma cells : evidence from $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ NMR. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *60*, 508-517.
- Mather, J. P., Roberts, P. E. Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique. **1998**, Plenum Press. New York and London
- Mathews, D. M.; Burston, D.; Addison, J. M. Transport of glycylsarcosine by hamster small intestine in vitro. *Clin. Sci.* **1972**, *42*(5), 1-29.
- Maurer, H. R. Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture. In : *Animal cell culture - a practical approach*. **1986**, Freshney, R. I. Eds, 13-31.
- McGivan, J. D.; Pastor-Anglada, M. Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. *Biochem. J.* **1994**, *299*, 321-334.
- Meager, A.; Leist, T. Antigenic characteristics of glycosylated natural and unglycosylated recombinant human gamma-interferon. *J. Interferon. Res.* **1986**, *6*, 225-232.
- Meneses-Acosta, A.; Mendonca, R.; Merchant, H.; Covarrubias, L.; Ramirez, O. Comparative characterization of cell death between SF9 insect cells and hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *72*(4), 441-457.
- Merten, O. W. Safety issues of animal products used in serum-free media. *Dev. Biol. Stand.* **1999**, *99*, 167-180.
- Merten, O. W.; Keller, H.; van Kan Martin, C.; Moeurs, D. Release of cellular enzymes for evaluating the dead cell number in bioreactor cultures. In : *Animal Cell Technology*. **1992**, Spier, R. E.; Griffiths, J. B.; MacDonald, C. Eds, Butterworth-Heinemann, 319-324.
- Merten, O.W.; Kierulff, J. V.; Castignolles, N.; Perrin, P. Evaluation of the new serum-free medium (MDSS2) for the production of different biologicals: use of various cell lines. *Cytotechnol.* **1994**, *14*(1), 47-59.
- Merten, O. W.; Petres, S.; Couve, E. A simple serum-free freezing medium for serum-free cultured cells. *Biologicals.* **1995**, *23*(2), 185-189.
- Michaels, J. D.; Peterson, J.; McIntire, L. V.; Papoutsakis, E. T. Protection mechanisms of freely suspended animal cells (CRL8018) from fluid-mechanical injury. Viscometric and bioreactor studies using serum, Pluronic F68 and polyethylene glycol. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *38*, 169-180.
- Miller, W. M.; Wilke, C. R.; Blanch, H. W. Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. *J. Cell. Physiol.* **1987**, *132*(3), 524-530.
- Minamoto, Y.; Ogawa, K.; Hideki, A.; Iochi, Y.; Misuki, K. Development of a serum-free and heat sterilizable medium and continuous high-density cell culture. *Cytotechnol.* **1991**, *5*(2), S35-51
- Mizrahi, A. Primatone RL in mammalian cell culture media. *Biotechnol. Bioeng.* **1977**, *19*, 1557-1561.
- Mizrahi, A.; Moore, G. E. Partial substitution of serum in hematopoietic cell line media by synthetic polymers. *Appl. Microbiol.* **1970**, *19*, 906-910.
- Mizrahi, A.; Lazar, A. Media for cultivation of animal cells : an overview. *Cytotechnol.* **1970**, *1*, 199-214.

- Mols, J. Cultivation of Chinese hamster ovary (CHO) cells in protein-free media supplemented with plant peptones is sufficient to prevent proteolysis of secreted recombinant glycoproteins. 2004, *Thèse de l'Université catholique de Louvain*, Belgique.
- Mols, J.; Peeters-Joris, C.; Agathos, S. N.; Schneider, Y. J. Origin of rice protein hydrolysates added to protein-free media alters secretion and extracellular proteolysis of recombinant interferon-gamma as well as CHO-320 cell growth. *Biotechnol. Lett.* 2004, 26(13), 1043-1046.
- Mols, J.; Peeters-Joris, C.; Wattiez, R.; Agathos, S. N.; Schneider, Y. J. Recombinant interferon-gamma secreted by CHO-320 cells cultivated in suspension in protein-free media is protected against extracellular proteolysis by the expression of natural protease inhibitors and by the addition of plant protein hydrolysates to the culture medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2005, on line.
- Monaco, L.; Marc, A.; Eon-Duval, A.; Acerbis, G.; Distefano, G.; Lamotte, D.; Engasser, J. M.; Soria, M.; Jenkins, N. Genetic engineering of alpha2,6-sialyltransferase in recombinant CHO cells and its effects on the sialylation of recombinant interferon-gamma. *Cytotechnol.* 1996, 22, 197-203.
- Monaco, L.; Tagliabue, R.; Soria, M. R.; Uhlèn, M. An in vitro approach for the expression of recombinant proteins in mammalian cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1994, 20, 157-171.
- Moore, G. E.; Gerner, R. E.; Franklin, H. A. Culture of normal human leukocytes. *JAMA.* 1967, 199, 519-524.
- Moreira, J. L.; Alves, P. M.; Aunins, J. G.; Carrondo, M. J. T. Hydrodynamic effects on BHK cells grown as suspended natural aggregates. *Biotechnol. Bioeng.* 1995a, 46, 351-360.
- Moreira, J. L.; Alves, P. M.; Feliciano, A. S.; Aunins, J. G.; Carrondo, M. J. T. Serum-free and serum-containing media for growth of suspended BHK aggregates in stirred vessels. *Enz. Microbiol. Technol.* 1995b, 17, 437-444.
- Morelle, C. Expression de protéines hétérologues. *Biofutur (technoscope).* 1993, 125, 1-15.
- Mostafa, S. S.; Gu, X. Strategies for improved dCO₂ removal in large-scale fed-batch cultures. *Biotechnol. Prog.* 2003, 19(1), 45-51.
- Murakami, H.; Masui, H.; Sato, G. H.; Sueoka, N.; Chow, T. P.; Kono-Sueoka, T. Growth of hybridoma cells in serum-free medium; ethanolamine is an essential component. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 1158-1162.
- Naczek, M.; Shahidi, F.; Sullivan, A. Recovery of rapeseed tannins by various solvent systems. *Food Chem.* 1992, 45(1), 51-54.
- Naczek, M.; Amarowicz, R.; Sullivan, A.; Shahidi, F. Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. *Food Chem.* 1998, 62(4), 489-502.
- Nakayama, T.; Niimi, T.; Osawa, T.; Kawakishi, S. The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat. Res.* 1992, 281(2), 77-80.
- Nau, F.; Kerherve, F. L.; Leonil, J.; Daufin, G.; Aimar, P. Separation of beta-casein peptides through UF inorganic membranes. *Bioseparation.* 1992-93, 3(4), 205-215.
- Neermann, J.; Wagner, R. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *J. Cell. Physiol.* 1996, 166, 152-169.
- Nielsen, L. K.; Smyth, G. K.; Greenfield, P. F. "Hemocytometer cell count distributions : implications of non-poison behaviour. *Biotechnol. Prog.* 1991, 7, 560-563.
- Nielsen, L. K.; Niloperbowo, W.; Reid, S.; Greenfield, P. F. Avoiding rapid growth at high cell densities: A potentially important optimisation criterion for hybridoma cultures. *Cytotechnol.* 1992, 9, 21-27.
- Newland, M.; Kamal, M. N.; Greenfield, P. F.; Nielsen, L. K. Ammonia inhibition of hybridomas propagated in batch, fed-batch, and continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 1994, 43, 434-438.

- Newsholme, P.; Gordon, S.; Newsholme, E. A. Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. *Biochem. J.* **1987**, *242*(3), 631-636.
- Nyberg, G. B.; Balcarcel, R. R.; Follstad, B. D.; Stephanopoulos, G.; Wang, D. I. C. Metabolism of peptides amino acids by Chinese Hamster Ovary cells in a complex medium. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *62*, 324-335.
- Ohno, T.; Kurita, K.; Abe, S. I.; Eimori, N.; Ikwa, Y. A simple freezing medium for serum-free cultured cells. *Cytotechnol.* **1988**, *1*, 257-260.
- Okano, T.; Inui, K.; Maegawa, H.; Takano, M.; Hori, R. H⁺ coupled uphill transport of aminocephalosporins via the dipeptide transport system in rabbit intestinal brush-border membranes. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*(30), 1430-1434.
- Ozturk, S. S.; Riley, M. R.; Palsson, B. O. Effects of Ammonia and Lactate on Hybridoma Growth, Metabolism, and Antibody-Production. *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *39*(4), 418-431.
- Pan, Y.; Wong, E. A.; Bloomquist, J. R.; Webb, K. E. Expression of a cloned ovine gastrointestinal peptide transporter (oPePT1) in *Xenopus* oocytes induces uptake of oligopeptides in vitro. *J. Nutr.* **2001**, *131*(4), 1264-1270.
- Paredes, C.; Sanfeliu, A.; Cárdenas, F.; Cairó, J. J.; Gòdia, F. Estimation of the intracellular fluxes for a hybridoma cell line by material balances. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23*, 187-198.
- Perrin, P.; Madhusudana, S.; Gontier-Jallet, C.; Petres, S.; Tordo, N.; Merten, O. W. An experimental rabies vaccine produced with a new BHK-21 suspension cell culture process: use of serum-free medium and perfusion-reactor system. *Vaccine.* **1995**, *13*(13), 1244-1250.
- Petch, D.; Butler, M. A. Profile of energy metabolism in a murine hybridoma : glucose and glutamine utilization. *J. Cell. Physiol.* **1994**, *161*, 71-76.
- Pham, P. L.; Perret, S.; Doan, H. C.; Cass, B.; St-Laurent, G.; Kamen, A.; Durocher, Y. Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells : peptone additives improve cell growth and transfection efficiency. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *84*(3), 332-342.
- Pinton, H. Cultures perfusées d'hybridomes dans un réacteur agité avec recyclage externe des cellules : mise au point, cinétiques et performances. **1991**, *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine*, Nancy.
- Pollock, D. P.; Kutzko, J. P.; Birck-Wilson, E.; Williams, J. L.; Echelard, Y.; Meade, H. M. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J. Immunol. Methods.* **1999**, *231*, 147-157.
- Price, P. J.; Gorfien, S.; Danner, D. Animal cell culture media comprising plant-derived nutrients. *Life Technologies Inc.*, Patent. **1998**, WO 98/15614.
- Price, P. J.; Gorfien, S.; Danner, D.; Plasvic, M. Animal cell culture media comprising non animal or plant derived nutrients. *Life Technologies Inc.*, Patent. **1999**, WO 99/57246.
- PROLEA. Chiffres et statistiques. **2003**.
- Puck, T. T.; Cieciura, S. J.; Robinson, A. Genetics of somatic mammalian cells : III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* **1958**, *108*, 945-956.
- Raminosa, F. Fractionnement de petits peptides issus de protéines de colza par chromatographie d'échange de cations. **2003**, *DEA, Institut National Polytechnique de Lorraine*, Nancy.
- Raminosa, F. Séparation de petits peptides végétaux par chromatographie d'échange de cations : influence de la composition, des propriétés physico-chimiques et spatiales. **En cours**, *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine*, Nancy.

Raskin, I.; Ribnický, D.; Komarnytsky, S.; Ilic, N.; Poulev, A.; Borisjuk, N.; Brinker, A.; Moreno, D.; Ripoll, C.; Yakoby, N.; O'Neal, J.; Cornwell, T.; Pastor, I.; Fridlender, B. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20* (12), 522-531.

Rasmussen, B.; Davis, R.; Thomas, J.; Reddy, P. Isolation, characterization and recombinant protein expression in Veggie-CHO : a serum-free CHO host cell line. *Cytotechnol.* **1998**, *28*(1), 31-42.

Reccio, I.; Visser, S. Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α_{s2} -casein. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1999**, *1428*, 314-326.

Reiter, M.; Mundt, W.; Dorner, E.; Grillberger, L.; Mitterer, A. Medium for the protein-free and serum-free cultivation of cells. *Baxter Aktiengesellschaft*, Patent. **2001**, WO 01/23527.

Reitzer, L. J.; Wice, B. M.; Kennell, D. The pentose cycle. Control and essential function in HeLa cell nucleic acid synthesis. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*(12), 5616-5626.

Renner, W. A.; Jordan, M.; Leist, C.; Berger, H. M. Cell-cell adhesion and aggregation : influence on the growth behavior of CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *41*, 188-193.

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

Rinderknecht, E.; O'Connor, B. H.; Rodriguez, H. Natural human interferon-gamma - Complete amino sequence and determination of sites of glycosylation. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 6790-6797.

Roth, G.; Smith, C. E.; Schoofs, G. M.; Montgomery, T. J.; Ayala, J. L.; Horwitz, J. I. Using an external vortex flow filtration device for perfusion cell culture. *BioPharm.* **1997**, *10*, 30-35.

Roy, N.; Agarwal, S. Therapeutic protein production; an overview. *Future Drug Discovery.* **2003**, June, 79-82.

Rozan, P. Traitements technologiques et prise alimentaire (exemple du tourteau de colza industriel). **1997**, Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy.

Rubio-Aliaga, I.; Boll, M.; Daniel, H. Cloning and characterization of the gene encoding the mouse peptide transporter PEPT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *276*, 734-741.

Rubio-Aliaga, I.; Daniel, H. Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, *23*(9), 434-440.

Ryll, T.; Dutina, G.; Reyes, A.; Gunson, J.; Krummen, L.; Etcheverry, T. Performance of small-scale CHO perfusion cultures using an acoustic cell filtration device for cell retention: characterization of separation efficiency and impact of perfusion on product quality. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *69*(4), 440-449.

Saarinen, M. A.; Murhammer, D. W. Culture in the Rotating-Wall Vessel Affects Recombinant Protein Production Capability of Two Insect Cell Lines in Different Manners. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2000**, *36*, 362-366.

Saito, H.; Terada, T.; Okuda, M.; Sasaki, S.; Inui, K. Molecular cloning and tissue distribution of rat peptide transporter PEPT2. *Biochim. Biophys. Acta.* **1996**, *1280*(2), 173-177.

Sakakibara, H.; Honda, Y.; Nakagawa, S.; Ashida, H.; Kanazawa, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*(3), 571-581.

Sanfeliu, A.; Cairo, J. J.; Casas, C.; Sola, C.; Godia, F. Analysis of nutritional factors and physical conditions affecting growth and monoclonal antibody production of the hybridoma KB-26.5 cell line. *Biotechnol. Prog.* **1996**, *12*(2), 209-216.

Sanfeliu, A.; Paredes, C.; Cairó, J. J.; Godia, F. Identification of key patterns in the metabolism of hybridoma cells in culture. *Enzyme. Microb. Technol.* **1997**, *21*(6), 421-428.

- Saranaeva, T.; Cantell, K.; Pyhälä, L.; Pirhonen, J.; Julkunen, I. Effect of carbohydrates on the pharmacokinetics of human interferon- γ . *J. Interferon. Res.* **1993**, *13*, 267-269.
- Saranaeva, T.; Pirhonen, J.; Cantell, K.; Julkunen, I. Role of N-glycosylation in the synthesis, dimerization and secretion of human interferon-gamma. *Biochem. J.* **1994**, *303*, 831-840.
- Sato, G. The establishment of hormone-dependent cell lines. *Methods Enzymol.* **1974**, *32*, 557-561.
- Sato, G. H. The growth of HeLa cells in a serum-free hormone-supplemented medium. *Adv. Pathobiol.* **1977**, *6*, 227-232.
- Scharfenberg, K.; Wagner, R. A reliable strategy for the achievement of cell lines growing in protein-free medium. In: *Animal cell technology: Developments towards the 21st century.* **1995**, Beuvery, E. C.; Griffiths, J. B.; Zeijlemaker, W. P.; eds.. Dordrecht: Kluwer, 619-623.
- Schlaeger, E. J. The protein hydrolysate, Primatone RL, is a cost-effective multiple growth promoter of mammalian cell culture in serum-containing and serum-free media and displays anti-apoptosis properties. *J. Immunol. Methods.* **1996**, *194*, 191-199.
- Schlaeger, E. J.; Schumpp, B. Studies of mammalian cell growth in suspension culture. In: *Advances in animal cell biology and technology for bioprocesses.* **1989**, Carrondo, M. J. T.; Griffiths, J. B.; Stephenne, J.; Crooy, P. J. Eds., Butterworth, 386-396.
- Shrimpf, G.; Schröder, M.; Weitnauer, E.; Friedl, P. Metabolic rates of vascular endothelial cells in vitro. *Cytotechnol.* **1994**, *16*, 43-50.
- Schroder, M.; Matischak, K.; Friedl, P. Serum- and protein-free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11. *J. Biotechnol.* **2004**, *108*(3), 279-292.
- Schweizer, M. Fractionnement et identification de petits peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines de colza. **2002**, Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy.
- Searles, J. A.; Todd, P.; Kompala, D. S. Viable cell recycle with an inclined settler in the perfusion culture of suspended recombinant Chinese ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *10*, 198-206.
- Seewöster, T.; Wilmsmann, S.; Werner, A.; Lehmann, J. The biochip. A new membrane bioreactor system for the cultivation of animal cells in defined tissue-like cell densities. *Ann. NY Acad. Sci.* **1997**, *831*, 244-248.
- Senger, R. S.; Karim, M. N. Effect of Shear Stress on Intrinsic CHO Culture State and Glycosylation of Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator Protein. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 1199-1209.
- Shibuya, K.; Atsumi, M.; Tsunakawa, S.; Nogaki, K.; Fletcher, T.; Imada, K.; Ly-Dersen, B. K. Serum-free medium for culturing animal cells. *Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha and Irvine Scientific Sales Company*, Patent. **2000**, WO 00/03000.
- Shimizu, M.; Lee, S. W.; Kaminogawa, S.; Yamauchi, K. Emulsifying properties of an N-terminal peptide obtained from the peptic hydrolysate of α s1-casein. *J. Food Sci.* **1984**, *49*, 1117-1120.
- Silk, D. B. A.; Fairclough, M. L.; Clark, J. E.; Hegerty, T.; Marrs, C.; Addison, J. M.; Burston, D.; Clogg, K. M.; Matthews, D. M. Use of peptide rather than free amino acid nitrogen source in chemically defined "elemental" diets. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* **1980**, *4*, 548.
- Simon, L.; Karim, M. N. Control of starvation-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *78*(6), 645-657.
- Sinacore, S. M.; Drapeau, D.; Adamson, S. R. Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. *Molecular Biotechnology.* **2000**, *15*, 249-257.
- Singh, R. P.; Al-Rubeai, M.; Gregory, C. D.; Emery, A. N. Cell death in bioreactors : a role for apoptosis. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *44*, 720-726.

- Singh, V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnol.* **1999**, *30*, 149-158.
- Smacchi, E.; Gobetti, M. Bioactive peptides in dairy products : synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*, **2000**, *17*, 129-141.
- Sonderhoff, S. Perfusion culture utilizing acoustic resonance to separate and recycle cells. *Gen. Eng. News*. **1996**, *16*, 41.
- Stephanopoulos, G.; Sinskey, A. J. Metabolic engineering - methodologies and future prospects. *Trends Biotechnol.* **1993**, *11(9)*, 392-396.
- Stoll, T. S.; Muhlethaler, K.; Von Stockar, U.; Marison, I. W. Systematic improvement of a chemically-defined protein-free medium for hybridoma growth and monoclonal antibody production. *J. Biotechnol.* **1996**, *45(2)*, 111-23.
- Stryer, L. La biochimie de Lubert Stryer. **1992**, Flammarion, eds. France.
- Sung, Y. H.; Lim, S. W.; Chung, J. Y.; Lee, G. M. Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *63*, 527-536.
- Szajewska, H.; Albrecht, P.; Stoittiska, B.; Prochowska, A.; Gawecka, A.; Laskowska-Klita, T. Extensive and partial protein hydrolysate preterm formulas: the effect on growth rate, protein metabolism indices, and plasma amino acid concentrations. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2001**, *32(3)*, 303-309.
- Takahashi, M.; Tsujimoto, K.; Yamada, H.; Takagi, H.; Nakamori, S. The silk protein, sericin, protects against cell death caused by acute serum deprivation in insect cell culture. *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25*, 1805-1809.
- Takuwa, N.; Shimada, T.; Matsumoto, H.; Himukai, M.; Hoshi, T. Effect of hydrogen ion-gradient on carrier-mediated transport of glycylglycine across brush border membrane vesicles from rabbit small intestine. *Jpn. J. Physiol.* **1985**, *35(4)*, 629-642.
- Terada, S.; Nishimura, T.; Sasaki, M.; Yamada, H.; Miki, M. Sericin, a protein derived from silkworms, accelerates the proliferation of several mammalian cell lines including a hybridoma. *Cytotechnol.* **2002**, *40*, 3-12.
- Terada, T.; Inui, K. I. Peptide transporters : structure, function, regulation and application for drug delivery. *Current Drug Metabolism*. **2004**, *5*, 85-94.
- Terasima, T.; Yasukawa, M. Biological properties of Vero cells derived from the present stock. In : *Vero cells - origin, properties and biochemical*. **1987**, Simizu, B. and Terasima T. eds.
- Tessier, B. Fractionnement par un procédé membranaire de petits peptides issus de tourteaux de colza : caractérisation de propriétés biologiques et développement d'une méthode d'identification. **2004**, Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy.
- Tessier, B.; Schweizer, M.; Fournier, F.; Framboisier, X.; Chevalot, I.; Vanderesse, R.; Harscoat, C.; Marc, I. Prediction of the amino acid composition of small peptides contained in a plant protein hydrolysate by LC-MS and CE-MS. *Food Research International*. **2005**, *38(5)*, 577-584.
- Tinto, A.; Vila, P.; Casas, C.; Godia, F. Selection of an immobilization method for a perfusion bioreactor with hybridoma cells. In : *Animal Cell Technology*. **1997**, Spier, R. E.; Griffiths, J. B. Eds., 423-428.
- Tokashiki, M.; Takamatsu, H. Perfusion culture apparatus for suspended mammalian cells. *Cytotechnol.* **1993**, *13*, 149-159.
- Tomita, Y.; Katsura, T.; Okano, T.; Inui, K.; Hori, R. Transport mechanisms of bestatin in rabbit intestinal brush-border membranes: role of H⁺/dipeptide cotransport system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, *252(2)*, 859-862.

- Urlaub, G.; Chasin, L. A. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, *77*(7), 4216-4220.
- Van der Valk, J.; Mellor, D.; Brands, R.; Fischer, R.; Gruber, F.; Gstraunthaler, G.; Hellebrekers, L.; Hylner, J.; Jonker, F. H.; Prieto, P.; Thalen, M.; Baumans, V. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicology in Vitro*, **2004**, *18*, 1-12.
- Vioque, J.; Sanchez-Vioque, R.; Clemente, A.; Pedroche, J.; Millán, F. Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1999**, *76*(7), 819-823.
- Vioque, J.; Sánchez-Vioque, R.; Clemente, A.; Pedroche, J.; Millán, F. Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **2000**, *77*, 447-450.
- Vriezen, N.; van Dijken, J. P. Fluxes and enzyme activities in central metabolism of myeloma cell grown in chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *59*, 28-39.
- Wagner, A. Production de PUK par des cellules humaines tumorales cultivées en réacteurs discontinues et perfusés : cinétiques, physiologie et modélisation. **1990**, *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy*.
- Wagner, A.; Marc, A.; Engasser, J. M. The use of lactate dehydrogenase (LDH) release kinetics for the evaluation of death and growth of mammalian cells in perfusion reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *39*, 320-326
- Walter, M. R.; Windsor, W. T.; Nagabhushan, T. L.; Lundell, D. J.; Lunn, C. A.; Zauodny, P. J.; Narula, S. K. Crystal structure of a complex between interferon- γ and its soluble high affinity receptor. *Nature*. **1995**, *376*, 230-235.
- Webb, K. E. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. *J. Anim. Sci.* **1990**, *68*(9), 3011-3022.
- Weidemann, R.; Ludwig, A.; Kretzmer, G. Low temperature cultivation - a step towards process optimisation. *Cytotechnol.* **1994**, *15*(1-3), 111-116.
- Whitford, W. NSO serum-free culture and applications. *BioProcess International*, **december 2003**, 36-47.
- Wu, J. Mechanisms of animal cell damage associated with gas bubbles and cell protection by medium additives. *J. Biotechnol.* **1995**, *43*(2), 81-94.
- Yabannavar, V. M.; Sing, V.; Connelly, N. V. Scale-up of spin-filter perfusion bioreactor for a mammalian cell retention. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 159-164.
- Yallop, C. A.; Nørby, P. L.; Jensen, R.; Reinbach, H.; Svendsen, I. Characterisation of G418-induced metabolic load in recombinant CHO and BHK cells : effect on the activity and expression of central metabolic enzymes. *Cytotechnol.* **2003**, *42*, 87-99.
- Zang, M.; Trautmann, H.; Gandor, C.; Messi, F.; Asselbergs, F.; Leist, C.; Fiechter, A.; Reiser, J. Production of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using a protein-free cell culture medium. *Bio/Technol.* **1995**, *13*, 389-392.
- Zanghi, J. A.; Renner, W. A.; Bailey, J. E.; Fussenegger, M. The growth factor inhibitor suramin reduces apoptosis and cell aggregation in protein-free CHO cell batch cultures. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 319-325
- Zeng, A. P.; Deckwer, W. D. A kinetic model for substrate and energy consumption of microbial growth under substrate-sufficient conditions. *Biotechnol. Prog.* **1995**, *11*(1), 71-79.
- Zhang, J.; Kalogerakis, N.; Behie, L. A. Optimization of the physico-chemical parameters for the culture of *Bombyx mori* insect cells used in recombinant protein production. *J. Biotechnol.* **1994**, *33*, 249-258.
- Zhou, B.; He, Z. Q.; Yu, H. M.; Mukherjee, K. D. Proteins from double-zero rapeseed. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 690-694.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Yves-Jacques SCHNEIDER, Professeur, Université Catholique de Louvain, Belgique

Monsieur Gérard DEVAUCHELLE, Professeur, ENSAM, INRA, Saint-Christol-Lez-Ales

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame FARGES Bérandère épouse HADDANI

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

"Les peptides de colza : une alternative aux protéines animales dans les procédés de
culture de cellules de mammifères ?"

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « Procédés biotechnologiques et alimentaires »

Fait à Vandoeuvre, le 14 juin 2005

Le Président de l'I.N.P.L.,

L. SCHUFFENECKER



Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois



Résumé : En vue d'améliorer les performances de procédés de culture en masse de cellules animales pour la production de protéines thérapeutiques, et de limiter les risques de contamination par des molécules d'origine animale, nous avons étudié les effets d'une supplémentation, par des fractions peptidiques de colza, de milieux de culture sans sérum et/ou sans protéine animale. Des fractions peptidiques de diverses compositions ont été générées par hydrolyse enzymatique d'extrait protéique et fractionnement membranaire. Ces fractions, riches en matière azotée, montrent un effet variable sur les cellules CHO, avec un fort effet promoteur de croissance cellulaire d'une fraction composée d'une large gamme de taille de peptides. Des études cinétiques de cultures en masse en bioréacteurs agités ont confirmé l'impact de cette fraction sur : l'accélération de la croissance cellulaire, le prolongement de la survie cellulaire, l'augmentation de la production spécifique de la protéine produite, et le ralentissement du métabolisme central et du décès cellulaire. Nous avons également montré que les peptides présents dans le mélange ajouté au milieu de culture interviennent, non seulement, comme additifs nutritionnels, mais également, comme facteur de croissance et/ou de survie. D'autres atouts supplémentaires de ces peptides ont été mis en évidence, tels que : une adaptation plus facile de diverses lignées cellulaires à ce milieu sans sérum, une bonne cryoconservation des cellules, une bonne filtrabilité. Enfin, nous avons formulé un milieu de culture particulièrement simple, complètement exempt de molécule d'origine animale, et stimulant la croissance de différentes lignées cellulaires utilisées en industrie, soit adhérentes, soit en suspension, à différentes échelles de culture. L'ensemble de nos résultats converge vers un intérêt de cette nouvelle source peptidique comme additif dans les procédés de culture en masse de cellules animales.

Mots-clés : cellules animales, milieux de culture sans sérum et sans protéine, colza, hydrolysats protéiques, fractions peptidiques, fractionnement membranaire.

Abstract : In order to improve the performances of animal cell culture processes for the production of therapeutic proteins, and to limit the risks of contamination by animal derived molecules, the effects of a supplementation of serum-free and animal-protein free culture media with rapeseed peptidic fractions were performed. Peptide fractions of various compositions were generated by enzymatic hydrolysis on proteic extract and membrane fractionation. These fractions, rich in nitrogen matter, displayed a variable effect on CHO cells, with a strong cell growth promoting effect of a fraction containing peptides with a broad range of size. In fact, this fraction increased the cell growth, prolonged cell survival, increased the specific production of the recombinant protein, and reduced the whole metabolism of carbohydrates. We also showed that this peptidic fraction was utilized as nutritional additives, but also, as survival and/or growth promoting factors. Other additional advantages of these peptides were highlighted, such as : an easier adaptation of various cell lines to serum-free conditions, a good cryoprotection of the cells during the freezing process, a good filterability. Indeed, a very simple culture medium was designed, completely free from animal molecules, and stimulating the growth of adherent or suspension cells from different industrial strains, for various culture scales. These results taken together suggest the use of this new particularly interesting peptidic source as an additive in animal cell culture processes.

Key-words : animal cells, serum and protein free medium, rapeseed, proteic hydrolysates, peptidic fractions, membrane fractionation