



**HAL**  
open science

# 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

Isabelle Chevalot

## ► To cite this version:

Isabelle Chevalot. 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. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1992. Français. NNT : 1992INPL129N . tel-01751095

**HAL Id: tel-01751095**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751095v1>**

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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE  
Laboratoire des Sciences du Génie Chimique - Nancy - CNRS

---

[M] 1992 CHEVALOT, I.

**THESE***présentée à l'INPL**par***Isabelle CHEVALOT***pour obtenir le grade de***DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE*****Spécialité: Génie des Procédés***

---

*Sujet :***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**

---

*Soutenue publiquement le 17 Décembre 1992 devant la commission d'examen :*

---

*Membres du jury :*

Président :	M J.M. ENGASSER	Examineurs :	Mme A. MARC
Rapporteurs :	MM O. MERTEN		MM R. COUDERC
	G. SIEST		J. STRACZECK
			M. KOEHL



## Avant-propos

Ce travail a été réalisé au Laboratoire des Sciences du Génie chimique de Nancy, au sein du groupe Génie des Procédés Biotechnologiques sous la direction de Madame Annie MARC, Directeur de Recherche au CNRS. Je la remercie pour l'intérêt qu'elle a témoigné à ce travail et d'avoir accepté de faire partie de ce Jury.

Cette thèse est le fruit d'une collaboration avec le Centre du Médicament, dirigé par Monsieur le Professeur Gérard SIEST et le Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Nancy, dirigé par Monsieur le Professeur Pierre NABET. A ce titre, je les remercie de m'avoir accueillie dans leur laboratoire. Je remercie également Monsieur Gérard SIEST d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce Jury de thèse.

J'exprime ma vive reconnaissance à Monsieur Jean-Marc ENGASSER, Professeur à l'I.N.P.L., de m'avoir permis de réaliser ce travail et d'avoir accepté la présidence de ce jury.

Je tiens également à remercier Monsieur MERTEN, Chargé de Recherche à l'Institut Pasteur de Paris, d'avoir bien voulu juger ce travail en tant que rapporteur du Jury.

Ma reconnaissance va également à Messieurs René COUDERC, responsable du département de cultures de cellules à Sanofi-Elf-Bio-Recherche à Toulouse, Jean STRACZECK, Maître de Conférence et Praticien Hospitalier à Nancy et Michel KOEHL, responsable du Service Développement de Transgène à Strasbourg, d'avoir accepté d'examiner mon travail et de se joindre à ce Jury.

Je remercie tout particulièrement les personnes qui m'ont aidée dans mon travail dans les différents laboratoires où j'ai travaillé.

Je n'oublierai pas les petits plats mitonnés par Tchouf, pendant les soirs de rédaction et la présence de mon petit Quentin qui a été mon moteur ces deux dernières années.



## ABREVIATIONS

<b>aa</b>	: Acides aminés
<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>Ala</b>	: Alanine
<b>Arg</b>	: Arginine
<b>ARN</b>	: Acide ribonucléique
<b>BSA</b>	: Albumine sérique bovine
<b>CHO</b>	: Chinese Hamster Ovary
<b>DEAE</b>	: Diéthyl aminoéthyle
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	: Diméthyl sulfoxyde
<b>EDTA</b>	: Acide éthylène diamine tétra-acétique
<b>GGT</b>	: Gamma-glutamyl transférase
<b>Glc</b>	: Glucose
<b>Gln</b>	: Glutamine
<b>Glu</b>	: Glutamate
<b>GluCNA</b>	: L-Gamma-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide
<b>Gly</b>	: Glycine
<b>Glygly</b>	: Glycylglycine
<b>Ham F12</b>	: Mélange nutritif de Ham
<b>His</b>	: Histidine
<b>Lac</b>	: Lactate
<b>LDH</b>	: Lactate déshydrogénase
<b>NH<sub>4</sub></b>	: Ions ammonium"
<b>PBS</b>	: "Phosphate buffered salt
<b>Pro</b>	: Proline
<b>SDS</b>	: Dodécylsulfate de sodium
<b>Ser</b>	: Sérine
<b>SVF</b>	: Sérum de veau foetal
<b>TMAE</b>	: Triméthyl aminoéthyle
<b>Tris</b>	: Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane
<b>D</b>	: Taux de dilution ( $h^{-1}$ )
$\sqrt{s}$	: Vitesse spécifique de consommation de substrat S ( $10^{-10}$ mmole / cellule.h)
$\pi p$	: Vitesse spécifique de production de métabolites P ( $10^{-10}$ mmole / cellule.h)
$\sqrt{(glob)S}$	: Vitesse spécifique globale de consommation de substrat S : ( $10^{-10}$ mmole / cellule.h)
$\pi(glob)p$	: Vitesse spécifique globale de production de métabolites P : ( $10^{-10}$ mmole / cellule.h)
$\mu_{app}$	: Vitesse spécifique apparente de prolifération cellulaire ( $h^{-1}$ )
$\mu_{réel}$	: Vitesse spécifique réelle de prolifération cellulaire ( $h^{-1}$ )
$\mu_{glob}$	: Vitesse spécifique globale de prolifération cellulaire ( $h^{-1}$ )
<b>kd</b>	: Vitesse spécifique de décès cellulaire ( $h^{-1}$ )
<b>X<sub>v</sub></b>	: Cellules vivantes
<b>X<sub>b</sub></b>	: Cellules susceptibles d'intégrer le bleu Trypan
<b>X<sub>m</sub></b>	: Cellules mortes (bleues + lysées)
<b>X<sub>l</sub></b>	: Cellules lysées
<b>X<sub>tot</sub></b>	: Cellules totales
<b>kb</b>	: Kilo bases
<b>kDa</b>	: Kilo daltons



## PLAN GENERAL

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
Situation actuelle des biotechnologies.....	1
Situation du sujet et objectifs.....	6
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>9</b>
A. Le génie génétique.....	9
B. Production de protéines recombinantes par culture en masse de cellules animales.....	36
C. La gamma-glutamyltransférase.....	54
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>62</b>
A. Génie génétique.....	62
B. Culture cellulaire.....	77
C. Caractérisation et pré-purification de protéines recombinantes.....	101
<b>RESULTATS:</b>	
<b>CHAPITRE I:</b>	
I.1. Avant propos.....	107
I.2. Production d'une enzyme membranaire humaine par des cellules de mammifères recombinantes cultivées en réacteur sur microporteurs.....	109
I.3. Annexes.....	136
I.4. Conclusion du chapitre I.....	158
<b>CHAPITRE II: Influence des conditions de culture sur le comportement des cellules CHO-GGT</b>	
II.1. Introduction.....	159
II.2. Influence de l'adhérence des cellules sur des cultures en flacons agités.....	161
II.3. Cinétiques de cultures de cellules CHO-GGT en réacteurs discontinu et semi continu.....	180
II.4. Conclusion du chapitre II.....	207
<b>CHAPITRE III: Optimisation de la production en masse de la protéine recombinante en vue de son extraction.</b>	
III.1. Introduction.....	209
III.2. Influence de l'ajout d'un agent chimique sur la production et les caractéristiques de l'enzyme recombinante.....	211
III.3. Production de GGT humaine par culture en masse de cellules CHO-GGT avec induction par le butyrate de sodium.....	221
III.4. Pré-purification de la GGT humaine produite par culture de cellules CHO-GGT sur microporteurs.....	234
III.5. Conclusion du chapitre III.....	239
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>240</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>247</b>



## **INTRODUCTION GENERALE**

## **INTRODUCTION GENERALE**

**Situation actuelle des biotechnologies.....1**

**Situation du sujet et objectifs.....6**

## **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

### **Situation actuelle des biotechnologies**

Dans sa préface de "l'Ingénierie du vivant" (Editions Jacob, 1990), François Gros cite: "*Désormais nos techniques ne se contentent plus seulement de ruser avec le vivant, et plus généralement avec le donné de la nature, de composer avec lui, pour l'imiter, accélérer ou freiner ses rythmes et ses mutations. Au contraire, elles travaillent la nature, autant, peut on dire qu'elles la font travailler à notre gré et pour notre bénéfice. La nature n'est donnée à l'homme que pour autant qu'il ne la connaît pas encore. Or les biotechnologies, ces pratiques de maîtrise et de production du vivant qui résultent de l'apport du génie génétique et des avancées de la biologie moléculaire semblent bien annoncer une ère nouvelle: la technique humaine tente, en quelque sorte de s'affranchir des contraintes que la nature faisait peser sur elle, pour s'efforcer de lui imposer désormais sa loi*". Ces quelques phrases illustrent bien l'ampleur et l'impact que les biotechnologies ont pris ces dernières décennies et les influences multiples et profondes qu'elles impliquent. Des domaines aussi variés que la santé, l'agriculture, l'élevage, l'industrie, l'alimentation et même la défense sont concernés par cette science. Les plus optimistes y voient la résolution des problèmes majeurs de la santé et de l'alimentation des pays en voie de développement, mais parlent aussi des bienfaits de la thérapie génique, des médicaments recombinants et des potentialités des animaux transgéniques. Les plus réticents craignent la tentation de l'eugénisme, un bouleversement écologique avec la dissémination d'organismes modifiés dans les sols et une modification de l'hygiène alimentaire. L'essor des biotechnologies entraîne des réactions allant de l'euphorie à une farouche hostilité. Les progrès engendrés par le développement des biotechnologies donnent à rêver mais les risques encourus n'en sont pas moins considérables.

L'essor des biotechnologies date du début des années 70 avec l'émergence des techniques du génie génétique correspondant aux découvertes d'une part des enzymes de restriction, (enzymes capables de couper un fragment d'ADN au niveau d'une séquence spécifique, en générant pour certaines des extrémités complémentaires), avec d'autre part la découverte de l'ADN ligase, outil de base du génie génétique, (enzyme qui permet de recréer une liaison covalente entre deux fragments d'ADN). En 1972, une équipe de chercheurs américains réussit à réaliser des chimères moléculaires constituées de fragments de chromosomes. L'idée de recombinaison s'étendit, suivi du clonage des gènes. Le transfert de gènes dans les cellules conférait à celles-ci de nouvelles propriétés et offrait des potentialités de production à grande

échelle de molécules issues de l'expression du gène transféré. L'essence des biotechnologies était née et allait ouvrir de nouveaux horizons dans de nombreux domaines.

Les biotechnologies ont eu tout naturellement des visées médicales, et de nombreuses substances à usage thérapeutique ont commencé à affluer dont certaines ont déjà reçu l'autorisation de mise sur le marché. La première protéine, fabriquée à l'échelle industrielle par des techniques d'ADN recombinant fut l'insuline en 1982. Depuis, un certain nombre de molécules ont été obtenues par technique de recombinaison génétique et sont actuellement commercialisées. Le tableau I donne quelques exemples de médicaments recombinants (BIOFUTUR, Octobre 1991). Toutes ces molécules sont les premières d'une longue série de produits recombinants qui seront demain proposés pour un usage thérapeutique.

Produit	Société	Indication	Mise sur le marché
hGH (hormone de croissance) Protopin	Genentech	Nanisme hypophysaire Insuffisance rénale chronique Syndrome de Turner	1985 produit sous licence produit sous licence
Humatrope	Eli Lilly	Nanisme hypophysaire	1987
Insuline Humuline	Eli Lilly	Diabète insulino-dépendant	1982
tPA Activase	Genentech	Infarctus du myocarde Embolies pulmonaires	1987 1990
Interféron $\alpha$ 2a Roferon-A	Hoffmann-La-Roche	Leucémie à tricholeucocytes Sarcome de Kapos associé au sida	1986 1988
Interféron gamma Actimmune	Genentech	Granulomatose chronique	1990
Facteur VIII Kogenate	Cutter	Hémophilie de type A	sous licence
Vaccin contre l'hépatite B Recombivax HB Engerix B	Merck SmithKlineBeecham	Prévention de l'hépatite B Prévention de l'hépatite B	1986 1989
Facteur IX Konyne 80	Cutter	Hémophilie de type B	sous licence

Tableau I: Les médicaments recombinants sur le marché Américain d'après la Pharmaceutical Manufacturers Association, 1990 (BIOFUTUR, Octobre 1991).

Dans le domaine de la santé, des recherches ont également débuté pour le traitement de maladies génétiques comme la maladie d'Alzheimer, la Mucoviscidose, la maladie de Parkinson ou la myopathie de Duchenne. Cette nouvelle approche thérapeutique est nommée "thérapie génique" et suscite de grands espoirs pour le traitement de maladies héréditaires et du cancer. La

liste des maladies relevant de la thérapie génique va s'allonger au fur et à mesure du développement des techniques de transfert *in vivo* et de l'isolement de nouveaux gènes. Cependant, toutes ces perspectives de thérapie (médicaments recombinants, thérapie génique) posent le problème du coût de la santé avec des médicaments et des techniques issus de recherches particulièrement coûteuses. Des études sur le rapport coût / efficacité seront de plus en plus nombreuses afin d'évaluer l'intérêt réel de chaque médicament recombinant.

De plus, la thérapie génique ainsi que toutes les techniques visant l'expérimentation sur l'homme posent aussi d'autres problèmes d'ordre éthique. La question de fond posée est de savoir si l'homme peut être assimilé et réduit à une notion d'objet biologique. Ainsi, depuis cette dernière décennie, de nombreux pays ont commencé à légiférer dans le domaine de la recherche biomédicale; le tableau II fournit quelques exemples de législation en vigueur dans différents pays (DAMERVAL et SCHOEN, 1992).

	Allemagne	Danemark	Espagne	France	Italie	Royaume-Uni	Suède
recherche sur l'embryon	1990	1987 1988	1988			1990	1991
expérimentation sur l'être humain				1988	1978		
Registres épidémiologiques		1978				1984 1990	1972
Thérapie génique	1990	1991					
Greffes d'organes		1969 1990	1979	1976	1982 1990	1961 1989	1975
Procréation médicalement assistée	1990	1988	1988			1990	1984 1988
Maternité de substitution	1989 1990	1986 1991	1988			1985 1990	1988
Diagnostic prénatal			1984 1988				
Empreintes génétiques		1987					1991
Tests génétiques							1991

Tableau II: exemples de législation en vigueur dans le domaine de la recherche et des sciences de la vie

Les biotechnologies ont été également mises à profit pour obtenir des animaux transgéniques. Au début des années 80, le gène de l'hormone de croissance humaine a été

introduit dans un ovocyte préfécondé de souris qui fut réimplanté dans des souris porteuses: 23 des 33 souris transformées présentaient une croissance supérieure de 18% à la moyenne; certaines pesaient même le double. Ces résultats intéressèrent les éleveurs et de nombreux tests furent tentés chez les bovins, les porcs, les moutons et les volailles afin d'obtenir davantage de viande moins riche en graisse. Les résultats furent décevants car un gène étranger a un très faible taux d'insertion dans les chromosomes de l'œuf et on préféra injecter directement l'hormone de croissance aux jeunes animaux. Par contre, l'introduction d'une voie de biosynthèse de la cystéine à partir de la sérine chez le mouton a permis d'accroître la production de la laine. Une voie également prometteuse est l'utilisation d'animaux transgéniques comme bioréacteurs vivants pour la production de protéines humaines. Ainsi, un agent anti-coagulant comme le facteur IX a pu être produit dans le lait de brebis; l'hormone de croissance humaine a aussi pu être produit dans le lait de souris à des taux de plusieurs grammes par litre; les médicaments de demain proviendront peut-être du lait ou du sang des animaux...

Les biotechnologies agricoles et alimentaires ont également un avenir florissant et apportent des espérances quant aux problèmes de malnutrition du Tiers Monde. Par exemple, de gros efforts sont accomplis pour améliorer les qualités de la farine de sésame qui est un élément de base dans l'alimentation au Togo et au Nigéria; les procédés biotechnologiques mis en œuvre consistent en une élimination de substances toxiques et une addition d'huile de palme pour équilibrer la ration en protéines. Ces types de biotechnologies locales ne sont pas à dédaigner car ils concernent des millions de consommateurs en Afrique. De même, les nouveaux procédés de reproduction des plantes avec la micropropagation et l'embryogénèse somatique pourraient permettre d'accroître la productivité de cultures régionales et de permettre le reboisement de zones arides ou semi-arides. Enfin, on peut également parler d'un domaine en pleine expansion qui est celui de la culture des algues; il est maintenant reconnu qu'elles peuvent être utilisées pour nourrir les animaux et apporter un complément protéique important à l'homme.

Comme nous venons de le présenter, les biotechnologies ont réussi à atteindre en deux décennies une dimension scientifique et industrielle importante. Mais à l'heure où va se discuter le projet de loi sur le génie génétique, c'est une dimension politique qui s'est imposée ces dernières années, avec la nécessité de diffuser à un plus large public, les connaissances scientifiques acquises. En tout premier lieu, des enquêtes et des sondages ont commencé à apparaître notamment pour savoir comment sont perçues les biotechnologies et le génie génétique par l'opinion publique. Une enquête européenne sur les biotechnologies a été réalisée en 1991 dont les résultats sont appelés "Eurobaromètre 35.1"<sup>(1)</sup> et qui avait pour but d'évaluer la connaissance et la compréhension de ces technologies du vivant. Un dossier résumant les principaux résultats a été publié par Biofutur (Juillet / Août 1992). Il est apparu dans cette

enquête, que la plupart des personnes interrogées s'avéraient être très peu informées sur les biotechnologies: peu de sujets, à part la santé, sont traités dans les émissions de télévision et près d'un tiers de la population Française ne lit jamais de journaux. Aux questions suivantes: "la science est-elle source de progrès?" et "parmi les nouvelles technologies lesquelles amélioreront notre mode de vie dans les 20 prochaines années?", le génie génétique ne recueille que 47% de réponses favorables. D'autres études réalisées par le BVA en 1990 ont montré que les expressions "manipulations génétiques", "génie génétique" et "biotechnologie" suscitaient des réactions de crainte surtout quand il s'agit de toucher le règne animal; le végétal avec les greffes d'arbres fruitiers est nettement mieux perçu mis à part les créations de plantes résistantes aux herbicides. Le tableau III cite différents exemples de réponses obtenues au sujet de la notoriété des biotechnologies.

exemples proposés	Connaissez-vous (% de Oui)	Est-ce une bonne chose (% de Oui)
L'insuline produite par des bactéries	41	91
Les bactéries dévoreuses de marée noire	54	83
Les manipulations génétiques de végétaux pour créer de nouvelles espèces	57	55
Le génie génétique pour améliorer les performances des animaux d'élevage	65	19

tableau III: Exemples concrets de la notoriété et de l'approbation des biotechnologies (Biofutur, Juillet / Août 1992). Source: "*Le guide sociologique de l'environnement en France; attitudes comparées du grand public et des agriculteurs..*" Enquête BVA réalisée en 1990 auprès de 1000 personnes. Méthodes des quotas.

Quel que soit le domaine d'application cité, médicaments et vaccins, microorganismes pour l'environnement, thérapie génique, animaux d'élevages, microorganismes pour l'alimentation et la santé, plus de 80% des personnes interrogées souhaitent que les recherches dans ces disciplines soient contrôlées et réglementées par le gouvernement par le biais de comités d'éthiques indépendants, regroupant scientifiques, sociologues et politiques (Eurobaromètre 35.1, 1991).

---

(1) Eurobaromètre 35.1: "*L'opinion des européens concernant la biotechnologie en 1991.*" Enquête réalisée en Juillet 1991 pour la Commission des Communautés Européennes auprès de 12000 Européens (dont 1070 Français) âgés de 15 ans et plus.

## **Situation du sujet et objectifs.**

Comme nous venons de l'exposer, le génie génétique s'est imposé dans de nombreux domaines, notamment dans la production de molécules recombinantes à intérêt clinique ou thérapeutique. Les cellules eucaryotes et, en particulier, les cellules animales sont appelées à jouer un rôle croissant dans la production industrielle de protéines recombinées en vue d'applications essentiellement thérapeutiques. Grâce au génie génétique, il est actuellement possible d'isoler un gène de son contexte et de l'amplifier afin d'en obtenir des quantités pratiquement illimitées, puis de le réintroduire dans une cellule hôte afin de le faire s'exprimer sous forme de protéine recombinante. Les cellules animales représentent les cellules hôtes les plus performantes quant à la maturation protéique; la production de quantités suffisantes de ces molécules suppose donc l'utilisation de réacteurs pour la mise en œuvre de la culture en masse de ces cellules productrices. Le génie génétique n'est maintenant plus un facteur limitant et est bien maîtrisé: la plupart des sociétés de biotechnologie possèdent des vecteurs d'expression "maisons", mis au point suivant leur besoin propre. Par contre, la mise en œuvre de culture en masse, la caractérisation et la purification des protéines recombinantes restent des éléments clefs dans la mise au point d'un système de production.

De nombreuses protéines recombinantes ont maintenant été exprimées dans des cellules animales et produites en masse dans différents systèmes de culture depuis l'autorisation de mise sur le marché en 1987, du premier médicament produit par cultures de cellules animales: cette molécule, l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) recombinant, produite par culture de cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) a été commercialisée par Genentech et est utilisée dans le cas d'atteintes coronaires lors d'infarctus du myocarde.

Les cultures en masse de cellules animales rencontrent des problèmes d'ordre technologique et économique: milieux de culture (souvent supplémentés en sérum de veau foetal) onéreux, rendements de production faibles, croissance cellulaire lente. Afin d'améliorer ces systèmes, des milieux définis sans sérum de veau ont été mis au point pour certaines lignées cellulaires, différents modes d'écoulement ont été développés tels que la mise en œuvre de réacteur perfusé avec apport et soutirage continu de milieu et maintien des cellules à l'intérieur du réacteur par des systèmes de membranes ou de filtres. De tels systèmes ont permis d'augmenter considérablement les rendements de productivité par rapport à des cultures discontinues, mais sont longs à mettre en œuvre et difficiles à valider au niveau réglementaire. Par contre, des modes d'écoulement comme le semi-continu (ou "Fed-batch"), avec apport continu ou séquentiel de milieu sans aucun soutirage de milieu ou de cellules, recèlent des avantages attractifs: cultures rapides, simples à mettre en œuvre et à valider, permettant de

mieux piloter l'apport de nutriments ou d'agents inducteurs de la production de la protéine d'intérêt, par rapport au mode discontinu. La culture de cellules support-dépendantes a nécessité le développement de différents types de porteurs (microporteurs et macroporteurs) ou plus récemment, des essais de culture en agrégats ou en cellules individualisées de ces cellules adhérentes ont été réalisés, afin de limiter le coût du support et simplifier la purification des produits recombinants. Cependant, peu d'études comparatives ont été réalisées de manière approfondie. Par ailleurs, le cas de la production de protéines membranaires par ces techniques reste encore assez peu abordé dans la littérature.

C'est dans ce contexte que se situe l'objectif de notre travail qui consistera en l'étude de la production d'une molécule d'intérêt clinique par culture en masse de cellules animales recombinantes. Le modèle choisi est la production de  $\gamma$  glutamyltransférase humaine (GGT) par culture de cellules CHO. La  $\gamma$  glutamyltransférase est une enzyme membranaire, glycosylée et l'étude de sa production en masse par cellules animales recombinantes présente des intérêts de plusieurs ordres:

- d'une part, elle apporte une contribution nouvelle à l'étude de base de la production de protéines membranaires;
- d'autre part, elle permet d'évaluer les contraintes de production liées à une protéine non excrétée dans le milieu de culture.

La première étape consistera à obtenir une lignée cellulaire CHO recombinante exprimant de façon stable cette enzyme membranaire; la culture en réacteur de cette souche sera comparée à celle de la cellule sauvage et permettra de vérifier l'impact de la recombinaison génétique sur le métabolisme de la cellule. Les cinétiques de culture seront établies pour les deux souches en réacteur discontinu. Les propriétés structurales et catalytiques de la protéine recombinante seront comparées à celles de GGT d'origines différentes.

Dans un deuxième temps, l'étude de l'influence des conditions de culture sur le comportement de la cellule recombinante sera approfondie. Des systèmes de cultures différents seront testés; la culture sur microporteurs, en agrégats ou l'adaptation des cellules à la culture en suspension seront comparées; les cinétiques de croissance et de production de GGT seront établies en réacteur discontinu et semi-continu. Les phénomènes de décès et de lyses cellulaires seront également abordés.

Dans une dernière partie, seront pris en compte des critères liés à l'évaluation des performances de la production en masse de la GGT, tels que l'induction par le butyrate de sodium, l'intérêt d'une culture en réacteur semi-continu et l'impact du mode de production sur l'extraction ultérieure de l'enzyme membranaire.

Une revue bibliographique définissant les différents éléments nécessaires à l'obtention d'une cellule animale recombinante, la mise en œuvre de la culture en masse de ces cellules et plus particulièrement de cellules support-dépendantes (cas des cellules CHO) ainsi que la présentation de la protéine d'intérêt (la GGT humaine) permettra de définir de manière plus précise le cadre des études entreprises. La description des différentes techniques employées précèdera la présentation des travaux

L'ensemble de cette étude dont la démarche est schématisée sur la figure 1 permettra ainsi de suivre les implications du génie génétique sur la culture en masse ainsi que l'influence du système de culture sur la production d'une protéine membranaire et sur les problèmes d'extraction ultérieurs.

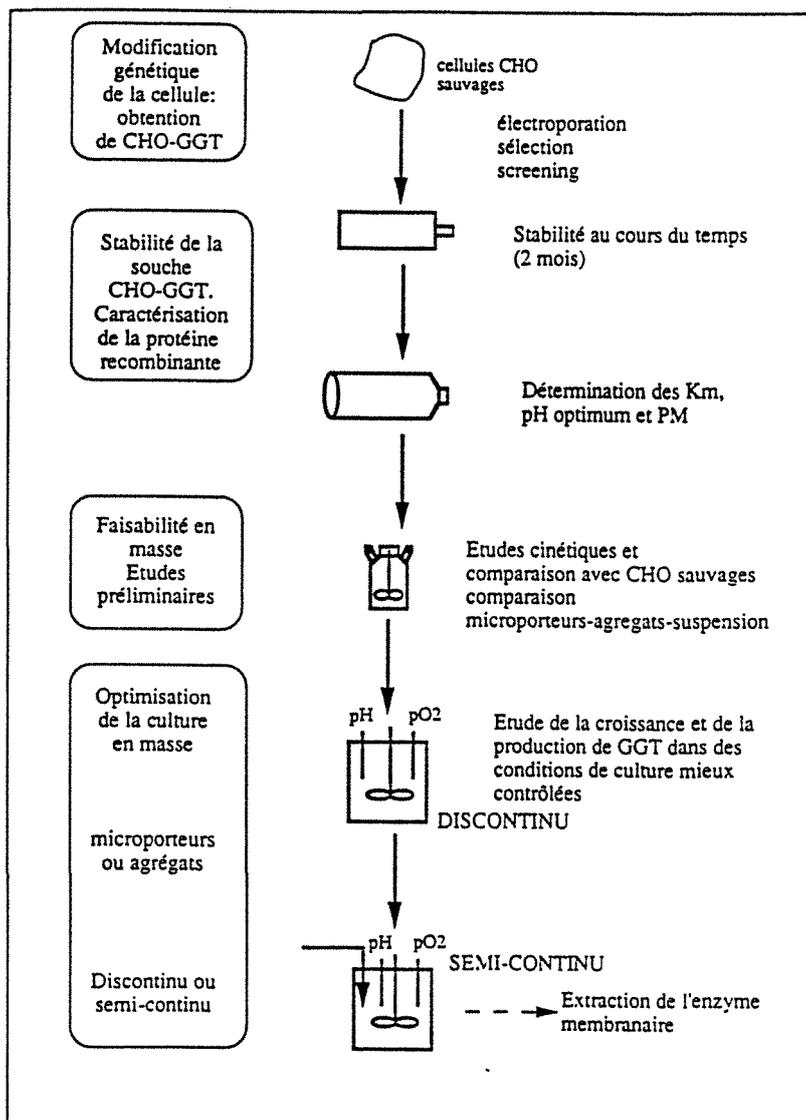


Figure 1: schéma des différentes étapes abordées lors de ce travail

## **BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

<b>A. LE GENIE GENETIQUE.....</b>	<b>9</b>
<b>A.I. Le génie génétique appliqué aux cellules animales.....</b>	<b>9</b>
<b>A.II. Introduction d'ADN dans les cellules animales.....</b>	<b>12</b>
A.II.1 Introduction.....	12
A.II.2 Vecteurs d'expression.....	12
A.II.3 Les différentes techniques de transfection.....	17
<b>A.III. La sélection des cellules animales recombinantes.....</b>	<b>31</b>
A.III.1 Sélection par complémentation.....	31
A.III.2 Sélection par utilisation de marqueurs dominants.....	34
<b>A.IV. Stabilité de l'ADN transfecté.....</b>	<b>35</b>
<b>B. PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES PAR ..... CULTURE EN MASSE DE CELLULES ANIMALES.....</b>	<b>36</b>
<b>B.I. Les cultures en réacteurs.....</b>	<b>36</b>
B.I.1 Introduction.....	36
B.I.2 Les modes de culture.....	36
B.I.3 Les différentes régulations physico-chimiques dans le bioréacteur.....	41
B.I.4 Le milieu de culture et le métabolisme cellulaire.....	42
<b>B.II. Les systèmes de culture en masse pour cellules support-     dépendantes.....</b>	<b>47</b>
B.II.1 Les microporteurs.....	47
B.II.2. Les agrégats.....	49
B.II.3 L'adaptation à la culture en suspension.....	50
<b>B.III. Production de protéines recombinantes par culture de     cellules CHO (Chinese Hamster Ovary).....</b>	<b>51</b>
B.III.1 Introduction.....	51
B.III.2 Les cellules CHO.....	51
B.III.3 Production de protéines recombinantes par des cellules CHO. .....	52
<b>C. LA GAMMA-GLUTAMYLTRANSFERASE HUMAINE (GGT).....</b>	<b>54</b>
<b>C.I. Intérêt de la GGT en biologie clinique.....</b>	<b>54</b>
<b>C.II. Structure et distribution de la GGT humaine.....</b>	<b>54</b>
<b>C.III. Séquences nucléotidiques et ARNm.....</b>	<b>56</b>
<b>C.IV. Traduction et maturation de la GGT.....</b>	<b>57</b>
<b>C.V. Activité catalytique de la GGT et fonctions.....</b>	<b>58</b>
C.V.1 Les activités catalytiques de la GGT.....	58
C.V.2 Mécanisme enzymatique.....	59
C.V.3 Les fonctions de la GGT.....	59
<b>C.VI. Intérêt de la production de la GGT par culture de cellules     animales recombinantes.....</b>	<b>61</b>

## A. LE GENIE GENETIQUE.

### A.1. LE GENIE GENETIQUE APPLIQUE AUX CELLULES ANIMALES.

L'utilisation de cellules animales pour la production de molécules d'intérêt thérapeutique est récente. Auparavant, les cellules utilisées étaient des microorganismes, champignons ou bactéries; celles-ci avaient l'avantage d'avoir des temps de génération courts, proliféraient dans des milieux de culture bons marchés et à de hautes densités. Cependant, les cellules animales ont certains avantages qui les rendent indispensables pour la production de molécules complexes, possédant une activité biologique. L'intérêt majeur des cellules animales réside dans l'exécution de modifications post-traductionnelles de la protéine telles que la glycosylation, la carboxylation, la phosphorylation, la formation de ponts disulfure ou la mise en place de la conformation de la protéine: l'ensemble de ces modifications peut jouer des rôles importants dans l'activité biologique, la stabilité ou l'antigénicité de la molécule. Les différentes caractéristiques des systèmes hôtes pour la production de protéines recombinantes sont données dans le tableau IV (DOBET, 1990).

Système hôte	Expression intracytoplasmique	Sécrétion (1)	Glycosylation
Bactéries: <i>E.coli</i> <i>Bacillus</i> <i>Streptomyces</i>	+++ ++ +	+ à ++ + + à ++	0 0 0
Levures et champignons: <i>Saccharomyces</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Pichia pastoris</i> <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Aspergillus</i>	++	+ à ++ ++ à +++ ++ à +++ ++ + à ++	+ + + + +
Cellules d'insecte <i>Spodoptera frugiperda</i>		++ à +++	+
Cellules de mammifères CHO		++	++

(1) + ordre du mg/l; ++ ordre de la centaine de mg/l; +++ ordre du g/l

tableau IV: caractéristiques des différents systèmes de production de protéines recombinantes à usage thérapeutique (DOBET, 1990).

L'objectif du génie génétique appliqué aux cellules animales est d'obtenir une production en grande quantité d'une protéine particulière par culture d'une lignée cellulaire stable. L'approche générale et les différentes étapes de clonage pour l'expression d'un gène dans une cellule animale sont schématisées sur la figure 2.

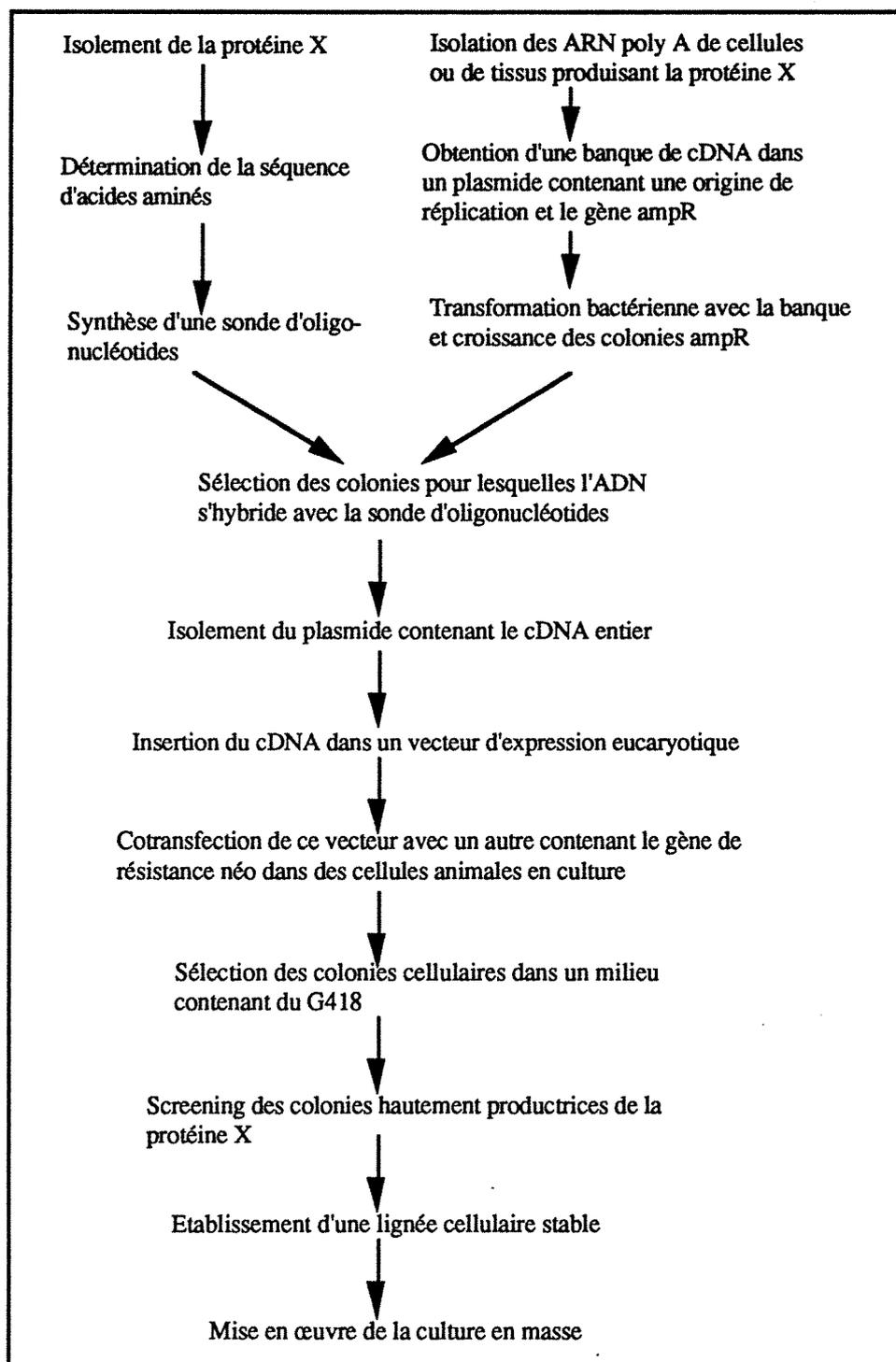


Figure 2: Schéma général pour le clonage et l'expression d'un gène dans une cellule animale (WEYMOUTH ET BARSOU, 1986).

De nombreuses protéines recombinantes ont été maintenant exprimées dans des cellules animales et commercialisées dans différents pays. Les premières molécules mises sur le marché sont consignées dans le tableau V.

Produit	Lignée cellulaire	Pays	Autorisation	Année
Urokinase	HEK	USA, GB, autres	Premier médicament sous licence à partir de cellules humaines en culture	1978
Vaccin poliovirus	Vero	France, Belgique	Premier produit biologique sous licence à partir de lignée cellulaire continue	1982
Interféron	Namalva	GB, Allemagne, Autriche	Premier médicament sous licence à partir de lignée cellulaire humaine tumorale	1986
Anticorps monoclonal OKT-3	Hybridome	USA	Premier anticorps monoclonal à usage thérapeutique sous licence	1987
Activateur tissulaire du plasminogène (tPA)	CHO	Philippines, France, autres	Premier médicament sous licence à partir de lignée cellulaire continue modifiée par recombinaison génétique	1986

Tableau V: exemples de produits autorisés à partir de culture de cellules animales (PROPST et al, 1989).

Pour synthétiser une protéine recombinante, plusieurs éléments doivent être réunis: un vecteur d'expression eucaryotique possédant un système de sélection, dans lequel aura été cloné le gène d'intérêt, et une technique de transfection. Chaque élément sera discuté dans la partie suivante A.II.

## **A.11 INTRODUCTION D'ADN DANS LES CELLULES.**

### **A.11.1 Introduction**

Toutes les cellules eucaryotes sont entourées d'une membrane plasmique imperméable aux grosses molécules: il a donc fallu trouver des techniques pour introduire de l'ADN dans des cellules à travers cette barrière. Si l'ADN que l'on veut transférer provient d'un organisme différent, il est appelé ADN étranger ou hétérologue. La cellule qui reçoit l'ADN est alors une cellule transformée et le procédé est appelé transformation. Cependant, ce terme transformation est ambigu car il est utilisé pour décrire tout changement de propriété d'une cellule sans tenir compte du mécanisme impliqué. Par exemple, lorsqu'une cellule normale devient cellule tumorale, cette dernière est appelée cellule transformée sans qu'il y ait eu introduction d'ADN. Pour cette raison, le terme de transfection est souvent préféré à la place de transformation mais qui, dans son sens strict, concerne uniquement l'ADN provenant d'un virus. Les vecteurs d'expression eucaryotiques contiennent généralement des fragments d'ADN de virus et ce terme de transfection s'est généralisé à la place de transformation dès qu'il s'agit de l'introduction d'ADN dans une cellule eucaryote.

Plusieurs éléments primordiaux doivent être choisis pour réussir l'introduction d'ADN dans une cellule animale et l'expression de la protéine correspondante: d'une part la lignée cellulaire hôte associée à un vecteur d'expression eucaryotique formant un couple vecteur / hôte et d'autre part une technique efficace de transfection préservant l'intégrité de l'ADN et n'endommageant pas trop les cellules.

### **A.11.2 Vecteurs d'expression**

#### **A.11.2.1 Les éléments fonctionnels des vecteurs d'expression.**

La figure 3 schématise un vecteur type (tiré de M&S, supplément n°7, 1987)

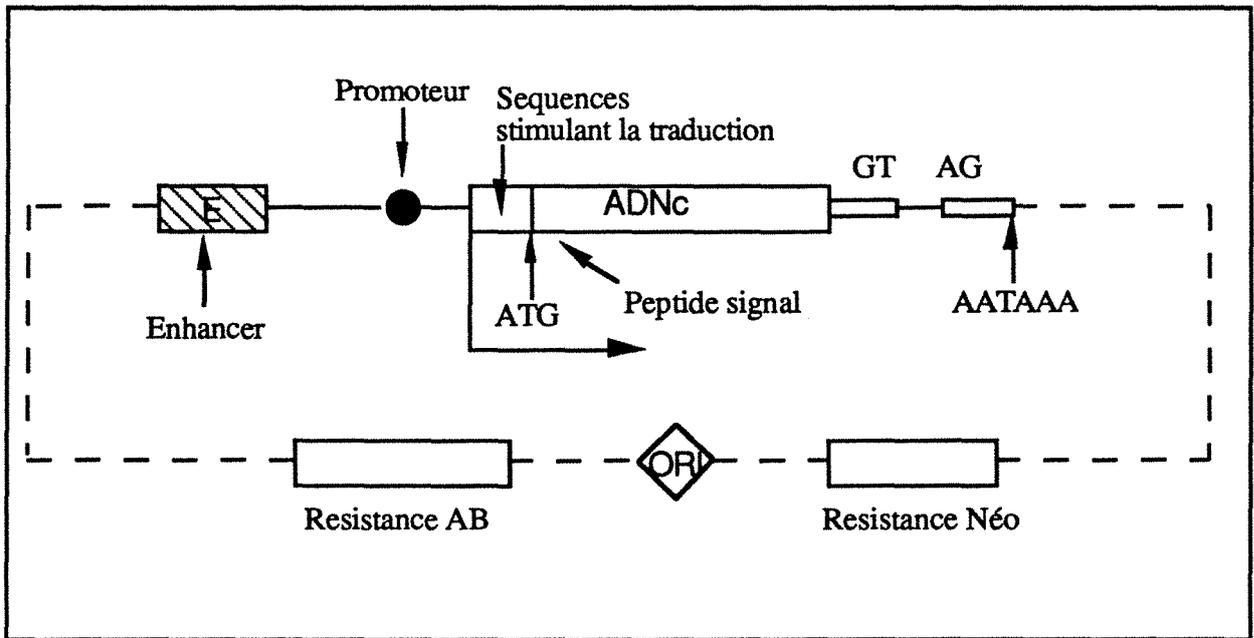


Figure 3: Schéma des différents éléments d'un vecteur d'expression eucaryotique

Les vecteurs d'expression eucaryotiques comportent d'une part, des séquences procaryotiques qui permettent la propagation du vecteur dans les bactéries et d'autre part, plusieurs unités de transcription eucaryotiques comprenant des séquences non codantes et des séquences codantes pour des marqueurs de sélection. Ils sont généralement un assemblage d'éléments dérivés de gènes viraux et de gènes de mammifères. Nous détaillons ci-dessous les différentes parties qui composent les vecteurs d'expression eucaryotiques.

#### A.II.2.1.1 Les éléments procaryotiques.

On trouve généralement, un réplicon bactérien, un gène codant pour une résistance à un antibiotique pour permettre la sélection des bactéries portant le plasmide recombinant, et un certain nombre de sites uniques de restriction pour l'insertion de séquences eucaryotiques.

#### A.II.2.1.2 Les éléments eucaryotiques

##### A.II.2.1.2.a Promoteur et enhancer

Les promoteurs et enhancers consistent en de petites séquences d'ADN qui interagissent spécifiquement avec des protéines cellulaires impliquées dans la transcription (pour revue, MC KNIGHT ET TJIAN, 1986; SASSONE-CORCI ET BORELLI, 1986; MANIATIS et al, 1987).

Un promoteur de transcription type est représenté figure 4 ( WEYMOUTH ET BARSOUM ,1986)

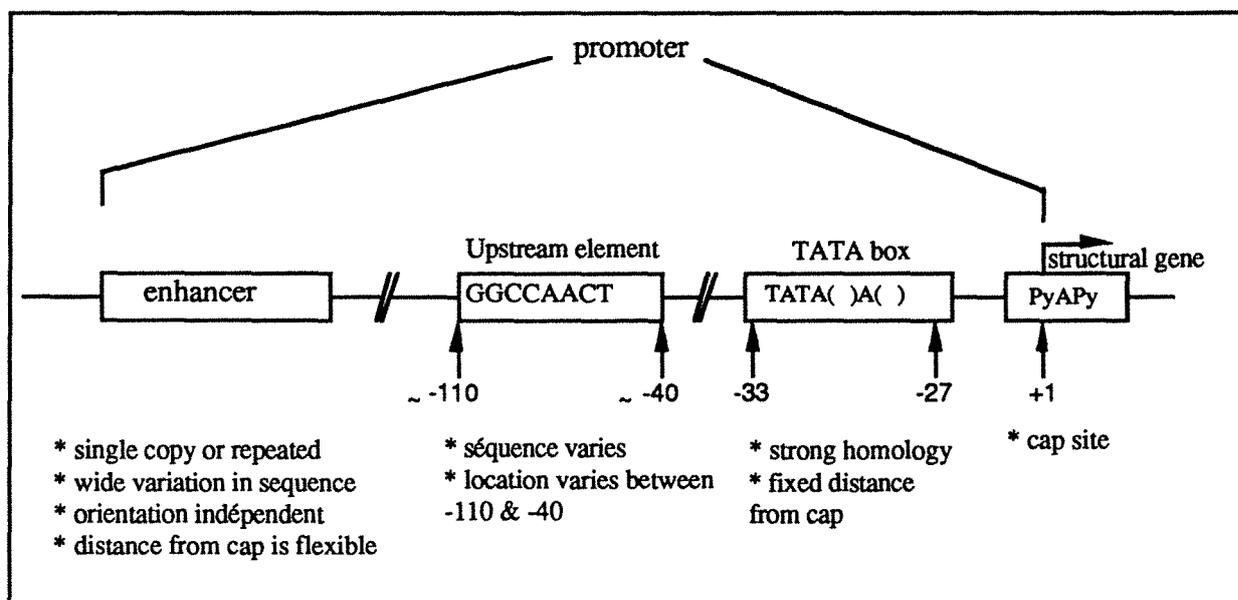


Figure 4: schéma d'un promoteur type de transcription

On peut y retrouver une séquence appelée TATA, nécessaire pour positionner l'ARN polymérase II sur le site d'initiation de la transcription (WASYLYK et al ,1983). La "TATA box" est située à 25-35 paires de bases (pb) en amont du site d'initiation de la transcription et est composée d'une séquence consensus 5'-TATAAAT-3' (CORDEN et al.,1980). D'autres régions semblent nécessaires pour une transcription efficace de la plupart des gènes: ces éléments contrôles, situés de 40 à 110 pb en amont du site d'initiation de la transcription semblent influencer uniquement sur le taux de transcription mais ne changent pas le site d'initiation. Dans certains cas, une inversion d'orientation de cette zone n'affecte pas la transcription (MISHOE et al,1984).

D'autres éléments affectent également le taux de transcription, appelés "enhancers": ceux-ci peuvent améliorer ce taux d'un facteur 100. Ce sont les seuls éléments transcriptionnels qui sont capables d'augmenter le taux de transcription indépendamment de leur orientation et à grande distance en amont ou en aval du gène qu'ils activent. Le mécanisme d'action de ces "enhancers" reste inconnu mais un certain nombre d'hypothèses ont été émises, notamment un rôle de création d'une structure chromatinienne locale, fournissant un site d'entrée à l'ARN polymérase II. Parmi les "enhancers" les plus fréquemment utilisés on trouve l'"enhancer" du gène précoce de SV40. Des vecteurs contenant cet "enhancer" ont été largement utilisés. Mais on trouve également des combinaisons promoteur / "enhancer" actives dans de nombreuses

cellules, dérivées de séquences LTR (Long Terminal Repeats) du génome du virus Rous (GORMAN et al,1982) ou dérivées du cytomégalo virus humain (BOSHART et al,1985).

#### **A.11.2.1.2.b Polyadénylation et terminaison**

Presque tous les ARN messagers eucaryotes possèdent en 3' terminal une queue de 150 à 200 nucléotides d'acides adényliques (PRODFOOT ET WHITE LAW,1986). La transcription ne semble pas s'arrêter à ce site de polyadénylation mais continue en aval jusqu'à un point non défini (aucun site de terminaison n'a été identifié jusqu'à présent dans les cellules de mammifères). La fin en 3' de l'ARN messenger mature est obtenue après coupure nucléolytique du transcrite initial suivie de l'addition d'une queue poly A. La polyadénylation prend place juste avant l'épissage.

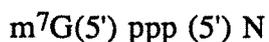
Deux séquences distinctes sont nécessaires pour obtenir une polyadénylation correcte:

\* une séquence de 6 nucléotides, AAUAAA, localisée 11 à 30 nucléotides en aval. Une délétion de cette séquence empêche la formation de l'ARN messenger. Son rôle semble être de positionner le site de coupure nucléolytique de l'ARN messenger. Sa présence est indispensable mais pas suffisante pour que la polyadénylation soit effectuée.

\* une séquence riche en GU ou U située en amont du site de polyadénylation est également nécessaire et il faudra que cette séquence soit insérée dans le vecteur d'expression: ce sont généralement des séquences issues de SV40 que l'on retrouve dans la plupart des vecteurs.

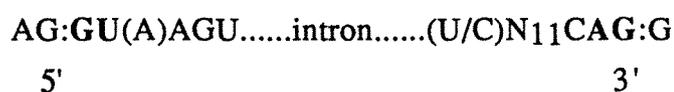
#### **A.11.2.1.2.c. Coiffe ("Capping") et épissage**

Très précocement, l'extrémité 5' du transcrite (c'est-à-dire le site d'initiation de la transcription) est bloquée par une coiffe ("cap") formée d'un acide guanilique méthylé sur un azote en position 7.



Cette coiffe semble prérequis pour que l'épissage ait lieu.

Quant à l'épissage, il consiste à éliminer les introns du transcrite primaire afin d'obtenir l'ARN mature qui sera alors transporté du noyau jusque dans le cytoplasme pour y être traduit. De petites séquences sont nécessaires, situées aux extrémités 5' et 3' de l'intron. La comparaison d'un grand nombre de séquences introniques a permis d'identifier des séquences consensus où les deux premiers ou les deux derniers nucléotides de l'intron sont souvent invariants:



Le mécanisme exact de l'épissage n'est pas encore connu; cependant, ses principales étapes ont été élucidées. Des études ont montré que l'épissage des introns passaient par la formation d'un lasso formé par la liaison de l'acide guanilique en 5' de l'intron avec un résidu adénylique situé au niveau du site de branchement à quelques dizaines de bases de l'extrémité 3' de l'intron. Les signaux d'épissage ne sont pas forcément nécessaires: certains cDNA ont pu être exprimés avec des vecteurs qui ne possédaient pas de signaux d'épissage (GETHING ET SAMBROOK, 1981); cependant, la plupart des vecteurs d'expression possèdent ces signaux.

#### **A.11.2.1.2.d Réplication et sélection**

En plus des éléments décrits ci-dessus, les vecteurs d'expression eucaryotiques peuvent contenir d'autres éléments pour augmenter le taux d'expression des gènes clonés ou pour faciliter l'identification des cellules recombinantes. Des vecteurs portant des réplicons viraux (qui permettent la réplication du génôme viral dans des cellules permissives) peuvent se répliquer si les facteurs appropriés agissant en "trans" sont fournis par le génôme de la cellule hôte. Par exemple, des vecteurs portant des réplicons de papovavirus comme SV40 ou polyomavirus, se répliquent un grand nombre de fois si les cellules hôtes expriment l'antigène T approprié; les cellules transfectées meurent 3 à 4 jours après la transfection quand le nombre de vecteurs dépassent  $10^4$  copies/ cellule; c'est pourquoi ces systèmes ne sont utilisés que pour obtenir une expression élevée mais transitoire des gènes transfectés, par exemple dans des cellules COS (GLUZMAN, 1981).

Le vecteur d'expression doit en plus conférer à la cellule qui le reçoit un avantage sélectif afin d'éliminer les cellules non recombinantes: les différents marqueurs de sélection seront décrits ultérieurement au paragraphe III. L'utilisation de ces vecteurs va permettre d'obtenir une expression stable par intégration de l'ADN dans le génôme hôte: le mode exact d'intégration n'est pas encore actuellement connu.

### ***A.11.3 Les différentes techniques de transfection.***

L'ADN recombinant peut être transféré dans des cellules animales soit par infection virale, soit directement dans une cellule par le biais d'une technique de transfection. On trouvera des revues très détaillées sur les vecteurs viraux et rétroviraux et l'infection virale (NICOLAS ET RUBENSTEIN, 1988; RIDGWAY, 1988) et nous ne développerons ici que les techniques de transfection. Certaines lignées cellulaires étant parfois réfractaires à une technique particulière, une multitude de techniques existent maintenant, dont les plus courantes sont présentées ci-dessous.

#### **A.11.3.1. Technique par le phosphate de calcium**

GRAHAM ET VAN DER ERB (1973) ont été les premiers à utiliser une technique de précipitation au phosphate de calcium ( $\text{CaPO}_4$ ) pour introduire de l'ADN dans des cellules. L'ADN et une solution de chlorure de calcium sont mélangés; une solution de phosphate y est ajoutée afin de former un précipité de phosphate de calcium-ADN. Ce précipité est déposé sur la couche cellulaire et incubé plusieurs heures pour permettre la pénétration de l'ADN dans les cellules. Il est ensuite remplacé par du milieu neuf. Pour de nombreuses cellules, l'efficacité de transfection est augmentée en faisant un choc physiologique par du diméthylsulfoxyde (DMSO) (STOW ET WILKIE, 1976), ou par du glycérol (PARKER ET STARK, 1979). Les conditions ont été optimisées (GORMAN et al, 1983a; CHEN et al, 1982) et il a été constaté que le précipité avait pénétré dans pratiquement toutes les cellules. Cependant, l'ADN n'est détecté dans le noyau qu'à de très faibles proportions (de 1 à 5%): ce qui laisse supposer que le facteur limitant de la transfection est davantage le transport de l'ADN jusqu'au noyau que l'entrée de l'ADN dans la cellule (LOYTER et al, 1982). Le mécanisme de pénétration de l'ADN reste d'ailleurs obscur; un mécanisme d'endocytose est soupçonné.

La technique a été modifiée (CHEN ET OKAYAMA, 1987) en utilisant des conditions telles que le précipité phosphate de calcium-ADN se forme graduellement dans le milieu de culture pendant 15 à 24 heures. Ils arrivent à obtenir de cette façon des taux de transfection atteignant 10 à 50%.

Le traitement des cellules par du butyrate de sodium pendant ou juste après la transfection permet d'augmenter l'expression transitoire ainsi que la fréquence d'expression stable. Le butyrate de sodium affecte la structure de la chromatine et peut stimuler l'expression des gènes transfectés en facilitant leur assemblage dans une structure chromatiniennne active (REEVES et al, 1985).

### 2.11.3.2. DEAE dextrane

Cette technique a été développée pour tester et augmenter les infections virales (MC CUTCHAN ET PAGANO,1968). Elle consiste à mélanger les cellules avec de l'ADN et du DEAE dextrane. En optimisant la concentration de dextrane et le temps de contact, SOMPAYRAC ET DANNA (1981) ont obtenu une efficacité d'infection de 25% dans des cellules de singe (BSC-1) avec de l'ADN de SV40.

Bien que le mécanisme d'action du DEAE dextrane reste inconnu, certains supposent que le polymère pourrait se fixer à l'ADN et empêcher l'action de nucléases et / ou pourrait se lier aux cellules afin de permettre l'endocytose de l'ADN.

Cette méthode diffère de la précipitation au phosphate de calcium vis à vis de trois points importants:

- \* la technique au DEAE dextrane n'est utilisée que pour l'expression transitoire des gènes clonés.
- \* elle n'est efficace que pour certaines lignées cellulaires (BSC-1, CV-1, COS...); ce qui peut être dû à un problème de toxicité du polymère pour d'autres cellules plus sensibles.
- \* par contre, de petites quantités d'ADN sont suffisantes pour utiliser la technique au DEAE dextrane (100 à 200 ng) alors que des quantités plus importantes sont nécessaires pour la technique au phosphate de calcium afin de permettre la formation d'un précipité.

### 2.11.3.3 La microinjection

Une technique employant la microinjection d'ADN cellule par cellule à l'aide de micropipettes en verre a également été développée. Avec de la pratique on peut réussir à transfecter 500 à 1000 cellules par heure avec un taux de transfection compris entre 50 et 100% (CAPECCH,1980). Mais cette technique nécessite un appareillage sophistiqué et ne permet de traiter qu'un nombre limité de cellules.

Il existe également une variante à cette méthode appelée "Pricking" (YAMAMOTO,1982) permettant de traiter 4000 cellules par heure à l'aide d'un "injectoscope". Le principe est schématisé figure 5 et consiste à introduire l'ADN à l'aide d'une microaiguille avec un taux de réussite de 25% de la population cellulaire "piquée". Le désavantage de cette technique par rapport à la microinjection reste la quantité d'ADN, nécessaire nettement supérieure à celle utilisée dans le cas de la microinjection.

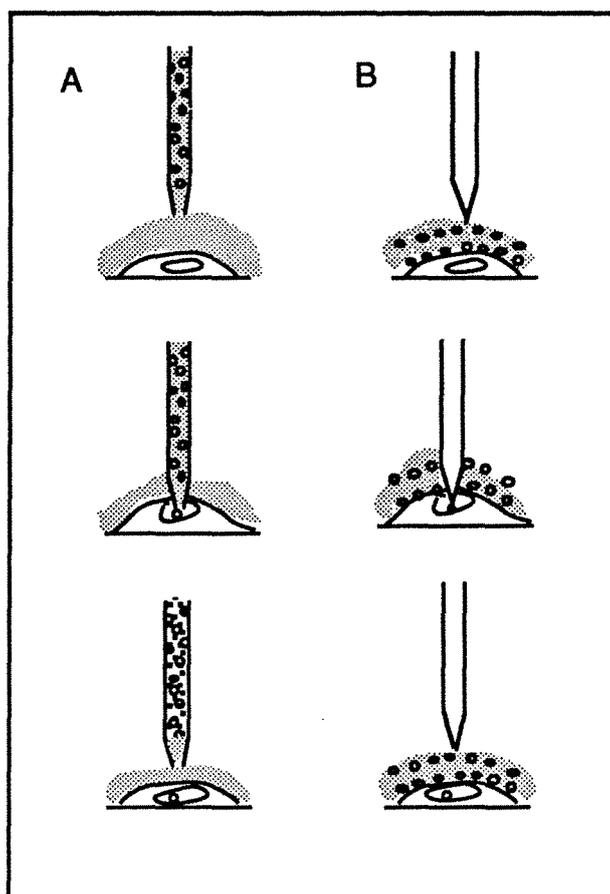


figure 5: principe de la microinjection (A) et du "pricking" (B); les molécules d'ADN sont schématisées par les cercles fermés

#### A.11.3.4 La fusion de protoplastes

Cette nouvelle approche consiste à transférer de l'ADN directement de la bactérie dans une cellule animale (SCHAFFNER,1980). La technique est schématisée sur la figure 6 et a pour principe de traiter les bactéries contenant le plasmide recombinant par du chloramphénicol pour augmenter le nombre de copies du plasmide; les bactéries sont alors transformées en protoplastes et mélangées à des cellules en culture. Cette technique a été optimisée (RASSOULZADEGAN et al,1982) et a montré qu'avec des bactéries contenant l'ADN de SV40 dans un plasmide pBR322, 90 à 100% des cellules de singe (CV1) receveuses, exprimaient transitoirement les antigènes T.

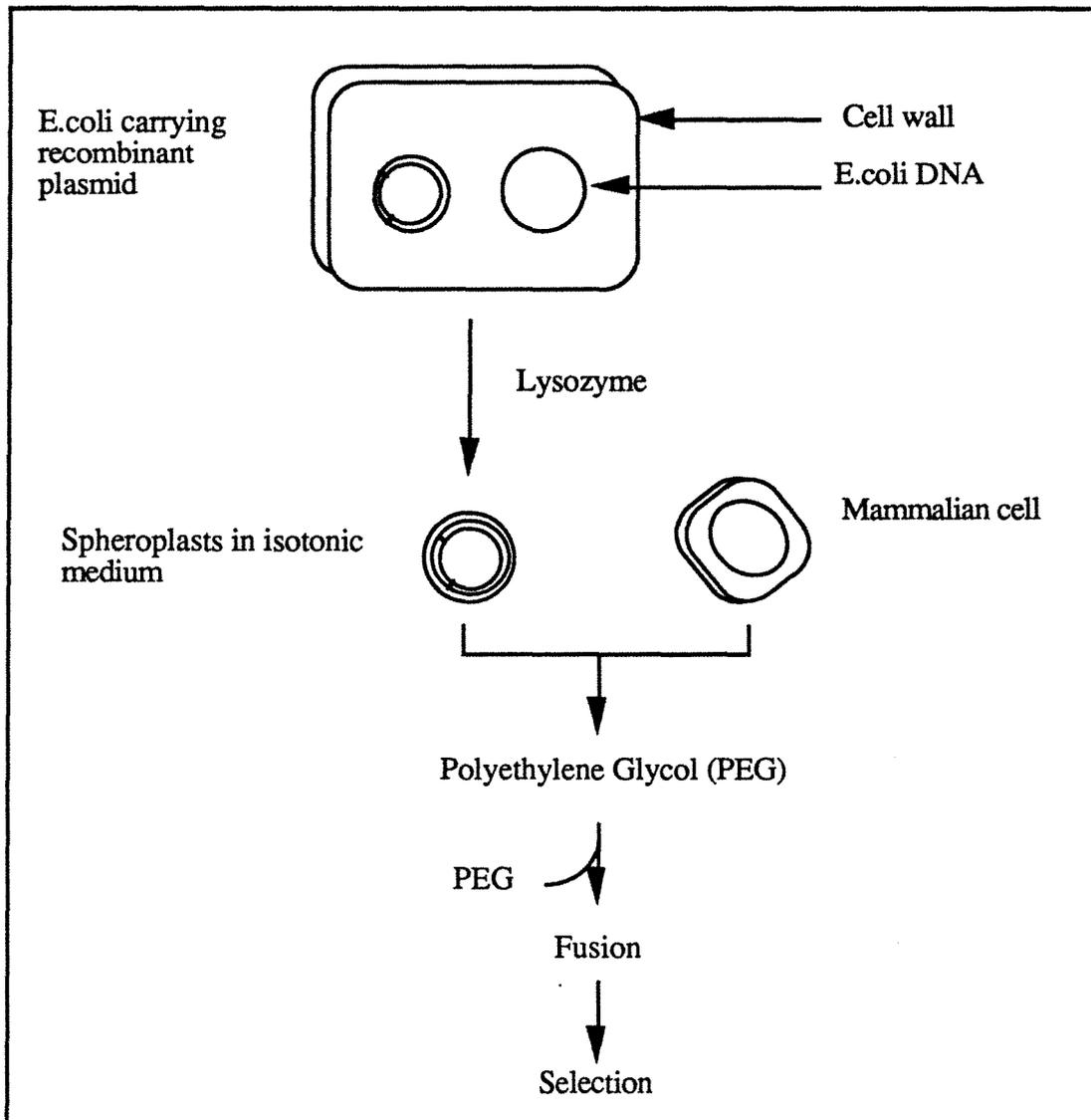


figure 6: La fusion d'une cellule avec un protoplaste

#### 2.11.3.5 Les liposomes

Des vésicules membranaires artificielles peuvent servir de transporteurs aussi bien in vivo que in vitro: les liposomes. Ce sont des vésicules constituées d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides, renfermant un compartiment aqueux. Suivant la technique utilisée pour leur synthèse, les liposomes auront des tailles variables. Ils peuvent contenir, encapsulées de façon stable dans leur compartiment aqueux ou dans leurs membranes lipidiques, différentes molécules telles que des chromophores, des drogues, des protéines et des acides nucléiques.

FRALEY et al (1980) ont encapsulé l'ADN du virus de singe SV40 dans des liposomes et ont optimisé les conditions pour une infection virale de cellules de singe. L'efficacité peut être améliorée en faisant varier le type de lipide, la présence de cholestérol, la charge globale à la

surface des liposomes, le traitement des cellules par du glycérol, du diméthylsulfoxyde ou du polyéthylène glycol. La figure 7 représente le transfert de gènes dans des cellules par l'intermédiaire des liposomes en utilisant le polyéthylène glycol (PEG) ou le glycérol. D'autres travaux (BARBET et al,1981) ont montré qu'il était possible de vectoriser les liposomes sélectivement vers un type cellulaire déterminé, en les couplant à des ligands tels que des anticorps monoclonaux.

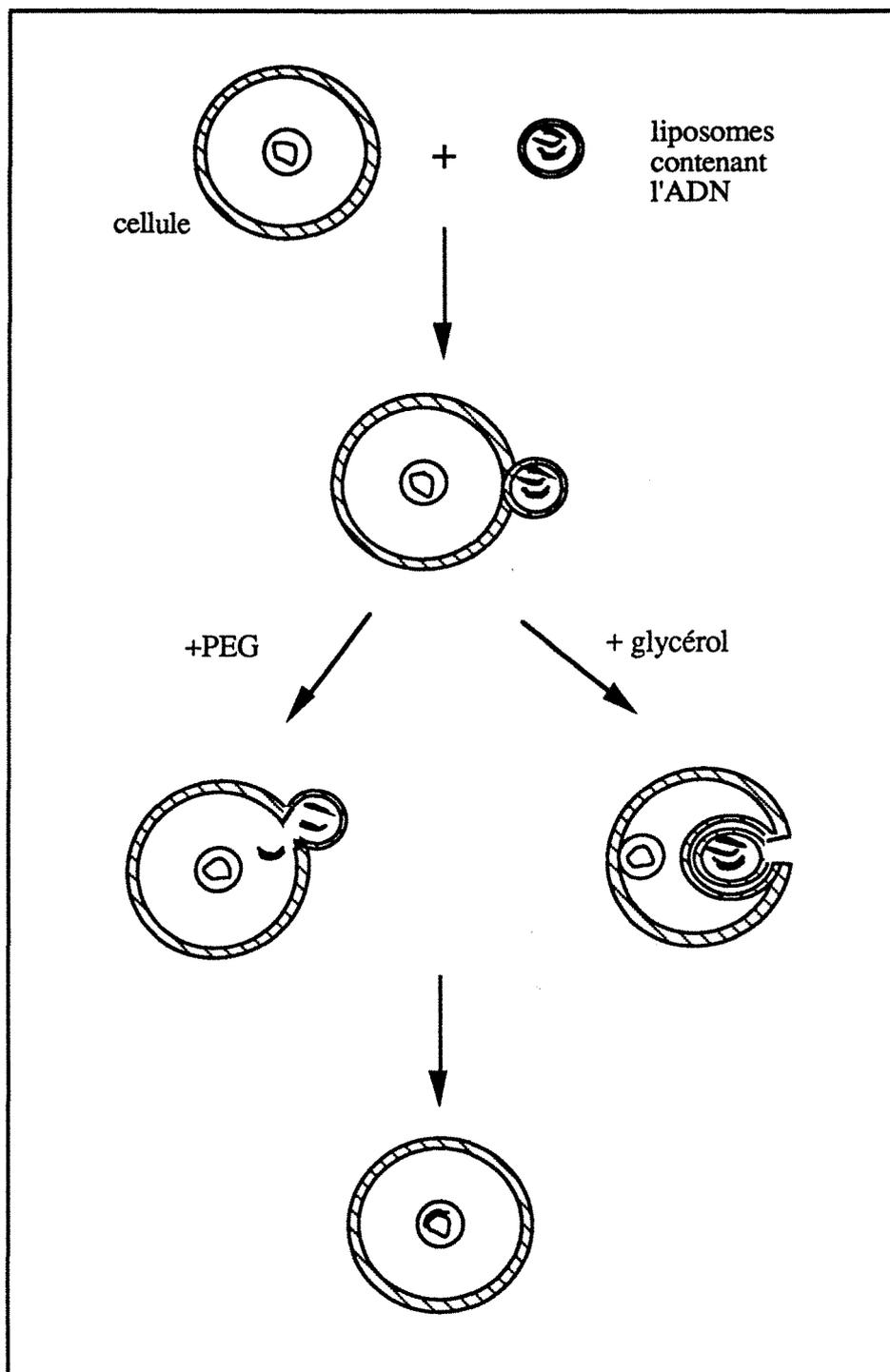


Figure 7: Représentation du transfert de gènes par l'intermédiaire de liposomes

#### A.11.3.6 Transfection par laser

Une perforation de 2  $\mu\text{m}$  de diamètre de la membrane cellulaire de cellules de rein de rat a été obtenue par l'utilisation d'un laser (KURATA et al,1986). L'irradiation par un faisceau laser peut stimuler le transfert de molécules d'ADN dans des cellules animales sans trop les endommager. L'inconvénient de cette technique reste évidemment le coût de ce matériel sophistiqué qui a rendu très rare l'utilisation de cette méthode.

#### A.11.3.7 Transfection par congélation rapide des cellules.

Cette technique consiste à favoriser la formation de cristaux de glace dans des cellules par une congélation rapide (1 min) dans de l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$  (SASAKI et al,1991): ce qui a pour conséquence de créer des fissures et / ou des pores par lesquels l'ADN pourra pénétrer dans la cellule.

Cette technique a l'avantage de ne demander aucun équipement particulier et a permis de transférer des cellules de souris BALB 3T3 avec une viabilité de 65% et un taux de transfection de  $5.10^{-6}$  ( rapport entre le nombre de clones obtenus et le nombre de cellules initialement soumis à transfection). Jusqu'à présent, aucune autre étude n'a été réalisée sur d'autres lignées cellulaires.

#### A.11.3.8 Microprojection

Cette technique, appelée aussi biolistic (biologique et ballistique), a pour principe de propulser, dans des cellules cibles, des microprojectiles (des microbilles de tungstène ou d'or de 0,5 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre) sur lesquels est appliqué l'ADN.

Les cellules sont placées dans une chambre à vide afin de diminuer l'impédance de l'air sur la vitesse des microprojectiles. Le principe est schématisé sur la figure 8 (WILLIAMS et al, 1991). Cette technologie a été initialement employée pour transformer des cellules d'oignons en culture (KLEIN et al, 1987). Depuis d'autres lignées végétales ont été transfectées avec succès (SANFORD, 1988) ainsi que des chloroplastes bactériens (BOYNTON et al, 1988) et végétaux (DANIELL et al ,1990). Plus récemment, des cellules animales ont également été transfectées comme des cellules de souris NIH3T3 (ZELENIN et al, 1988), des organites tels que des mitochondries (JOHNSTON et al, 1990). L'introduction de gènes par microprojection a également été réalisée directement dans le tissu sur l'animal vivant (WILLIAMS et al, 1991).

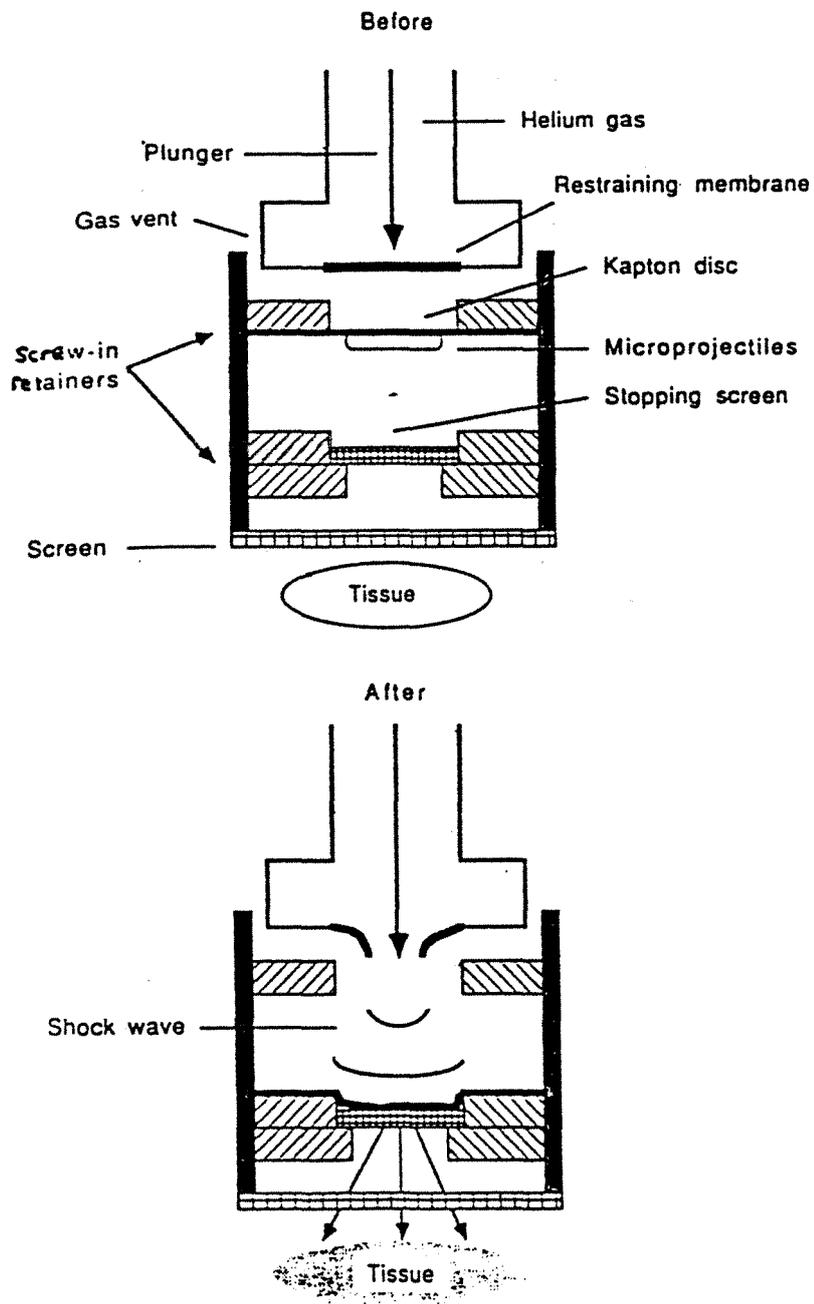


Figure 8: principe de la microprojection; une membrane retenant de l'hélium est rompue par un piston, projetant un disque, sur lequel sont positionnés les microprojectiles, sur le tissu cible.

### A.II.3.9 L'électroporation

Cette technique est née à partir d'observations réalisées sur les membranes cellulaires: celles-ci devenaient transitoirement perméables sous l'influence d'un champ électrique (ZIMMERMANN et al,1973). La première application fut la fusion de cellules via leurs membranes plasmiques (ZIMMERMANN ET VIENKEN,1982) par électrofusion.

La transfection par électroporation découle de ces expériences et a permis en premier lieu de transférer le gène de la thymidine kinase dans des cellules L de souris déficientes en ce gène (NEUMANN et al,1982) . Depuis l'électroporation a été utilisée avec succès sur des lignées cellulaires animales diverses (WONG ET NEUMANN,1982; POTTER et al,1984; SUGDEN et al,1985; TONEGUZZO et al,1986; TUR-KASPA et al,1986) mais également sur des cellules végétales (FROMM et al,1985,1986), des bactéries (revue CHASSY et al,1988), des levures (MEILHOC et al,1990). L'électroporation a de plus un grand potentiel pour la transfection de gènes soit, dans des cellules hématopoïétiques dans l'optique de la thérapie génique (TONEGUZZO ET KEATING,1986), soit dans des cellules souches embryonnaires pour l'obtention d'animaux transgéniques (DOETSCHMAN et al,1987). Des protéines ont également été introduites dans des cellules CHO (LAMBERT et al, 1990) par électroporation et ont été localisées pendant plus de deux divisions cellulaires dans des vésicules cytoplasmiques. L'électroporation permet aussi d'introduire avec succès de l'ARN dans des cellules (LANGRIDGE et al, 1987).

#### **A.II.3.9.1 Théorie et principe de l'électroporation**

La membrane d'une cellule peut être considérée comme une capacitance séparant deux phases aqueuses conductrices. Placée dans un champ électrique, elle se polarise créant ainsi une différence de potentiel ayant pour effet d'augmenter le potentiel transmembranaire. Si on augmente le champ électrique, le potentiel membranaire augmente et atteint une valeur critique (1V environ) au delà duquel il y a formation d'un pore.

La formation et la localisation des pores dépendent de l'orientation de la cellule dans le champ électrique qui induit donc une différence de potentiel transmembranaire en chaque point de la cellule telle que:

$$\Delta\Psi=f.r.E.\cos.(\theta)$$

où r est le rayon de la cellule (considérée comme une sphère), f un facteur de forme propre à chaque cellule,  $\theta$  l'angle que forme la direction du point considérée avec celle du champ électrique (E). La figure 9 représente le processus de transfert d'ADN dans des cellules par électroporation.

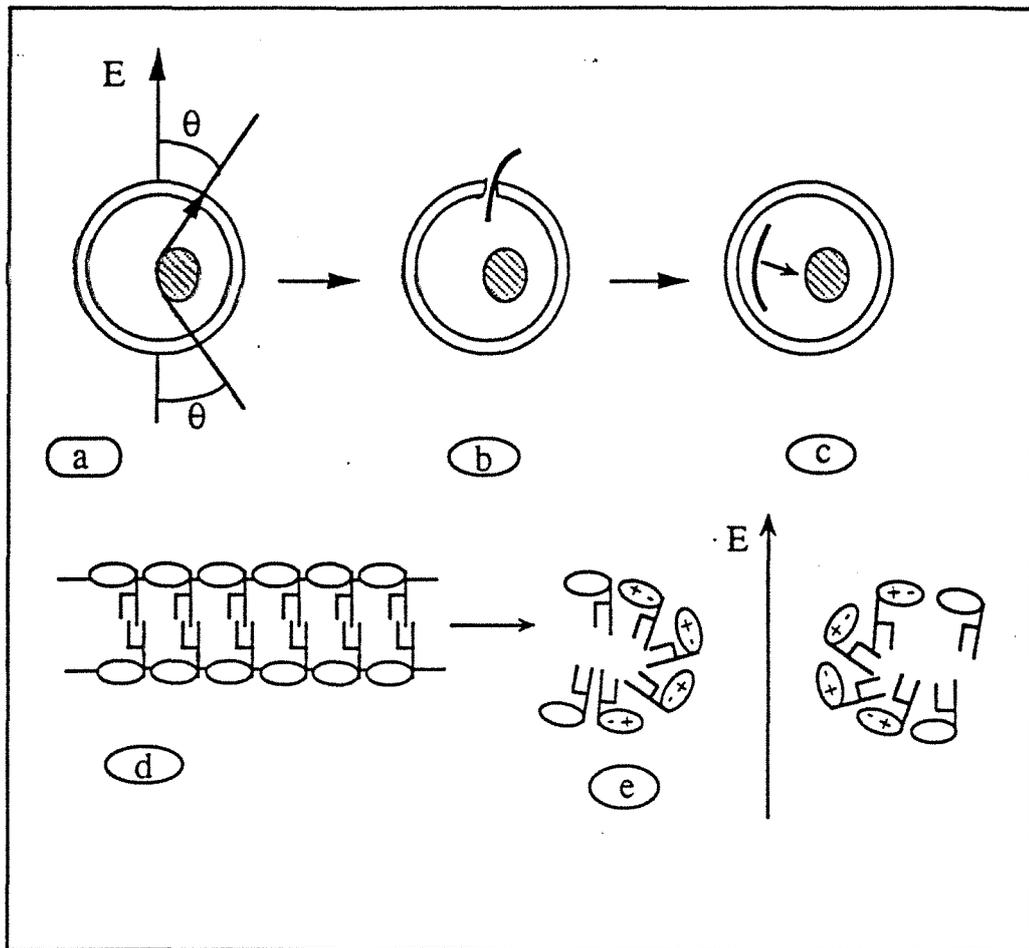


Figure 9: diagramme schématique du transfert d'ADN dans des cellules par électroporation; a) représentation d'une cellule avec un ADN exogène situé à la surface de la cellule; E symbolise le champ électrique;  $\theta$  est l'angle que forme la direction du point considéré avec celle du champ électrique; b): pénétration de l'ADN dans la cellule par un pore induit par électroporation; c): association de l'ADN avec le noyau; d) représentation schématique de la membrane lipidique; e): formation d'un pore avec réarrangement lipidique.

La membrane est perméable, de manière réversible si le nombre et la taille des pores sont faibles par rapport à la surface membranaire totale (ZIMMERMANN ET VIENKEN,1982).

D'une façon générale, ces phénomènes sont interprétés par la création transitoire de pores d'environ 3nm de rayon au sein de la portion lipidique de la bicouche membranaire (figure 9 NEUMAN et al,1982). Une prolongation de la période d'exposition au champ électrique au delà de quelques microsecondes aboutit à la formation de nouveaux pores qui, fusionnant entre eux, créent des lésions de taille supérieure, endommageant de façon irréversible la membrane.

#### **A.II.3.9.2 Instrumentation: l'électroporateur.**

La figure 10 représente schématiquement le montage nécessaire pour réaliser une électroperméabilisation (ANDREASON ET EVANS,1988).

L'équipement est principalement composé de trois éléments:

- \* la cuve d'électroporation
- \* un oscilloscope (facultatif) pour suivre la forme et l'amplitude du champ.
- \* le générateur qui délivrera le champ électrique: ces générateurs sont caractérisés par leur puissance, la forme et la durée du champ produit. La majorité des appareils génèrent un courant à décroissance exponentielle; certains appareils peuvent produire des impulsions de forme carrée.

Dans le cas d'une décharge exponentielle, le condensateur est chargé à l'aide d'un générateur puis se décharge dans le circuit comportant l'échantillon de résistance R entre les deux électrodes. Lors de la décharge, le champ électrique décroît selon la relation:

$$E(t) = E_0 \cdot e^{-t/\tau}$$

où  $\tau = R \cdot C$

et  $E = V/D$

$E(t)$ : champ électrique instantané au temps t (V/cm)

$E_0$ : champ électrique initial (V/cm)

R: résistance entre les électrodes de la chambre d'électroporation (Ohms)

C: capacitance du condensateur (Farads)

$\tau$ : constante de temps (secondes)

V: chute de potentiel entre les électrodes (volts)

D: distance entre les électrodes (cm)

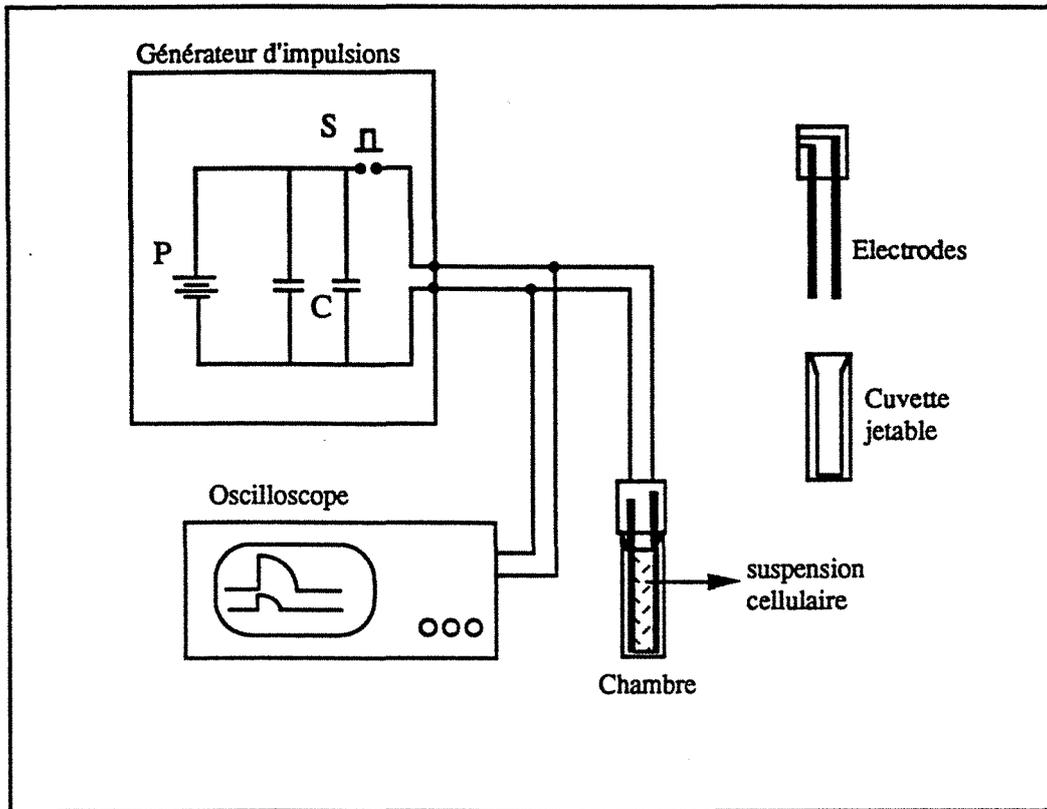


Figure 10: représentation schématique d'un électroporateur; P représente le générateur, C les capacités et S l'interrupteur. La chambre d'électroporation contient la suspension cellule-ADN

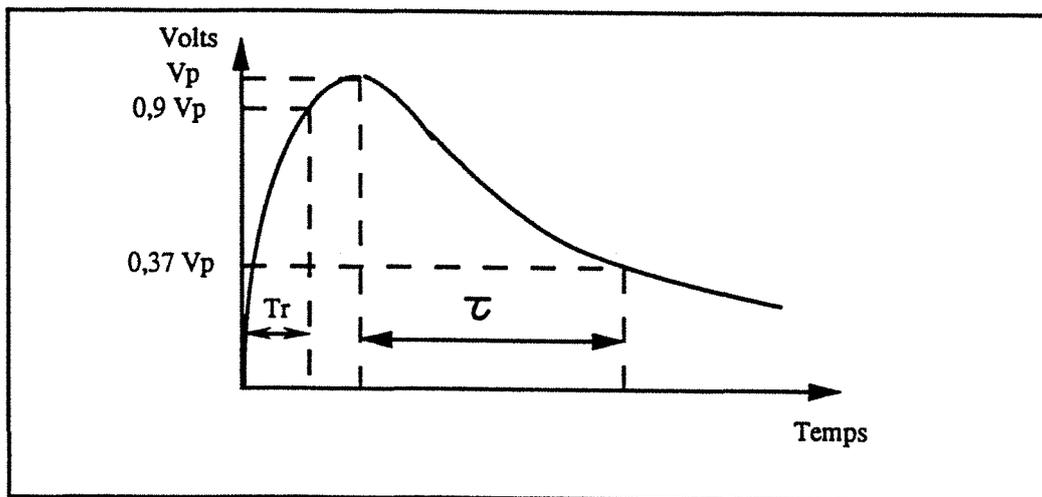


Figure 11: représentation schématique de la forme de la décharge générée dans la cuve d'électroporation:  $V_p$  représente le voltage,  $T_r$  le temps de charge et  $\tau$  est la constante de temps ou durée de l'impulsion qui correspond au temps nécessaire pour que le voltage atteigne 37% de sa valeur maximale

Ainsi  $\tau$  gouverne la forme de l'onde de décharge illustrée sur la figure 11 (tiré de KNUTSON et YEE, 1987) et représente le temps mis par le champ électrique pour décroître de  $1/e$  (0,37) de sa valeur initiale.  $E_0$  et  $\tau$  sont les deux plus importants paramètres électriques; ils doivent être déterminés en fonction du type cellulaire étudié. Il existe un second type de décharge, appelé "vague carrée" qui fait intervenir un champ électrique d'intensité constante pendant une certaine durée.

#### **A.II.3.9.3 Les différents paramètres influençant l'électroporation.**

Plusieurs paramètres importants doivent être déterminés car ils jouent des rôles prépondérants dans l'efficacité de transfection et dans le taux de survie: l'intensité du champ électrique, la constante de temps, le nombre d'impulsions et la température. D'autres variables biologiques peuvent également intervenir telles que le type cellulaire, la force ionique du milieu d'électroporation, la concentration d'ADN, sa taille et sa topologie.

Beaucoup de travaux ont rapporté des études sur l'effet de l'intensité du champ électrique et de la constante de temps sur l'efficacité de transfection et le taux de survie. Les pionniers de l'électroporation utilisaient des intensités de champ électrique entre 3 et 16 kV / cm avec des constantes de temps de l'ordre de la microseconde (NEUMAN et al, 1982; POTTER et al, 1984; MIR et al, 1987; TATSUKA et al, 1988); ces conditions entraînaient une perte importante de la survie des cellules et des conditions moins drastiques ont été préconisées avec des intensités de champ électrique inférieures à 1 kV / cm et des constantes de temps de l'ordre de la milliseconde (KNUTSON et YEE, 1987; CHU et al, 1987; BARSOUM, 1990). L'avantage d'appliquer une succession d'impulsions (3 à 10 impulsions) n'a pas été démontré mais certains auteurs ont obtenu de meilleurs taux de transfection avec une multiplication d'impulsions (HAMA-INABA et al, 1986; NEUMAN et al, 1982; ZERBIB et al, 1985).

La transfection par électroporation est apparue pour certains plus efficace avec de faibles températures de 0 à 4°C (POTTER et al, 1984; STOPPER et al, 1987). D'autres ont obtenu de meilleurs résultats à température ambiante (CHU et al, 1987). La température peut affecter les propriétés physiques de la membrane et notamment influencer la durée de l'état de perméabilisation. Les cellules électroporées peuvent restées perméables plusieurs heures si de faibles températures sont maintenues (TEISSIE et al, 1987); l'incubation à 37°C permet en quelques minutes, la réversibilité de la perméabilisation (MICHEL et al, 1988).

Pour l'électroporation comme pour toutes les autres techniques de transfection, l'état des cellules hôtes est une caractéristique primordiale: il faut que les cellules soient en phase de croissance exponentielle pour obtenir de bons taux de transfection (CHU et al, 1987). Cependant, il reste une variable non contrôlable qui est la capacité naturelle de certaines cellules à intégrer l'ADN. Le milieu de transfection peut également influencer sur la viabilité cellulaire ainsi que sur le taux de transfection; il convient d'employer une solution convenablement tamponnée pour éviter l'électrolyse de la solution au voisinage des électrodes contribuant à un changement de pH. Des milieux tels que HBS (tampon HEPES salin), PBS (tampon phosphate salin) semblent bien adaptés et sont couramment utilisés (KNUTSON et YEE, 1987). La nécessité de cations comme  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  dans le milieu d'électroporation n'a pas été montrée. Les cations divalents sont reconnus pour stabiliser les membranes et leur présence pourrait rendre les membranes cellulaires plus résistantes: l'augmentation des concentrations de  $\text{MgCl}_2$  dans le milieu d'électroporation a eu pour conséquence de diminuer le taux de transfection de certaines cellules (NEUMAN et al, 1982).

La forme de l'ADN a également une influence: l'ADN circulaire et superenroulé est souvent utilisé dans des systèmes d'expression transitoire qui ne nécessitent pas d'intégration dans le génôme hôte. L'ADN linéarisé a une capacité recombinatoire plus importante et permet d'obtenir de meilleurs taux de transfection avec intégration de l'ADN hétérologue dans le génôme hôte (POTTER et al, 1984). Le taux de transfection dépend aussi de la concentration de l'ADN avec de meilleurs résultats lorsque la concentration d'ADN est plus importante (CHU et al, 1987; NEUMAN et al, 1982; STOPPER et al, 1987); les quantités habituelles utilisées varient entre 10 et 100  $\mu\text{g}$ . On ne connaît pas la taille limite d'une molécule d'ADN pouvant être transfectée par électroporation, mais un ADN double brin linéaire de 150 Kb a été introduit dans des cellules CV-1 (KNUTSON et YEE, 1987).

#### A.II.3.10 L'électroporation comparée aux autres techniques de transfection

##### **A.II.3.10.1 Taux de transfection.**

Le tableau suivant (tableau VI) compare les taux de transfection obtenus par différentes techniques de transfection sur diverses lignées cellulaires. Le taux de transfection est défini comme le rapport entre le nombre de clones obtenus après la transfection et le nombre de cellules initialement soumises à la technique de transfection. Ces résultats montrent que l'électroporation est une technique efficace, avec des taux de transfection souvent proches de  $1.10^{-3}$ . La technique qui donne les meilleurs taux de transfection reste la technique par microinjection mais qui ne permet de traiter qu'un petit nombre de cellules et nécessite des cellules de taille importante.

### A.II.3.10.2 Intégrité de l'ADN transfecté.

L'intégration d'ADN dans des cellules par des techniques biochimiques implique le passage de l'ADN à travers des lysosomes avant d'arriver dans le noyau. Ce passage peut entraîner mutations et réarrangements de l'ADN par les enzymes lysosomales (KUCHERLAPATI, R. ET SKOULTCHI, A.I., 1984). Par contre, par la technique d'électroporation, les molécules d'ADN pénètrent directement dans le cytoplasme, évitant ainsi le passage dans les lysosomes; dans la même optique la technique par microinjection va permettre d'intégrer directement l'ADN dans le noyau et d'éviter ce risque de réarrangements.

technique de transfection	Lignées cellulaires	nombre de cellules	ADN introduit	Taux de transfection	Références
technique phosphate de calcium: * standard	CHO tk <sup>-</sup>	2,5.10 <sup>6</sup>	Tk-gene-HSV	3,2.10 <sup>-6</sup>	ABRAHAM et al (1982)
* modifié	NIH 3T3	10 <sup>4</sup>	pcDneo	3,2.10 <sup>-1</sup>	CHEN et OKAYAMA (1987)
Protoplastes	J558L	10 <sup>6</sup>	pSV2gpt	10 <sup>-4</sup>	VERNON et al (1983)
Liposomes	Ltk <sup>-</sup>	10 <sup>5</sup>	pSV2neo	4,5.10 <sup>-4</sup>	FELGNER et al (1987)
Laser	NRK	5.10 <sup>4</sup>	Eco-gpt	6,6.10 <sup>-4</sup>	KURATA et al (1986)
congélation	BALB 3T3	10 <sup>7</sup>	pSV2neo	5.10 <sup>-6</sup>	SASAKI et al (1991)
microinjection	Ltk <sup>-</sup>	2.10 <sup>2</sup>	pTK-1	2,5.10 <sup>-1</sup>	YAMAMOTO et al (1982)
Electro-transfection	CHO-dhfr <sup>-</sup>	1.10 <sup>6</sup>	phIL-4dhfr	9,2.10 <sup>-4</sup>	SONODA et al (1988)

Tableau VI: comparaison des différents taux de transfection obtenus suivant la technique de transfection

## **A.111. LA SÉLECTION DES CELLULES ANIMALES RECOMBINANTES.**

Après la transfection, les cellules sont remises en culture avant de commencer la sélection des cellules qui sont effectivement recombinantes: la sélection consiste à empêcher la croissance des cellules non recombinantes. Lors des premières études réalisées, les gènes codant pour la protéine d'intérêt et pour le marqueur de sélection, étaient inclus dans un vecteur unique. Cependant, WIGLER et al (1979) ont montré qu'il était possible de transférer deux vecteurs simultanément: ce qui a permis d'éviter des constructions de vecteurs complexes. La cotransfection de deux vecteurs portant l'un le gène d'intérêt, l'autre le marqueur de sélection s'est ainsi généralisée.

Il existe plusieurs types de marqueurs basés, soit sur une sélection par complémentation, soit sur une sélection par l'utilisation de gènes dominants. Plusieurs marqueurs sont dépendants des voies de biosynthèse des bases puriques et pyrimidiques représentées sur la figure 12.

Il y a deux voies de biosynthèse des nucléotides impliquant différentes enzymes: une voie endogène et une voie de sauvetage. Il existe des molécules qui inhibent sélectivement une de ces deux voies de synthèse en inactivant de façon spécifique une des étapes. Des mutants sont faciles à obtenir car des cellules déficientes pour une des deux voies peuvent croître en utilisant la seconde voie. Si cette dernière est bloquée par une molécule spécifique, les cellules mourront à moins d'introduire le gène sauvage remplaçant le gène muté. Ce principe est à la base des systèmes de sélection par complémentation.

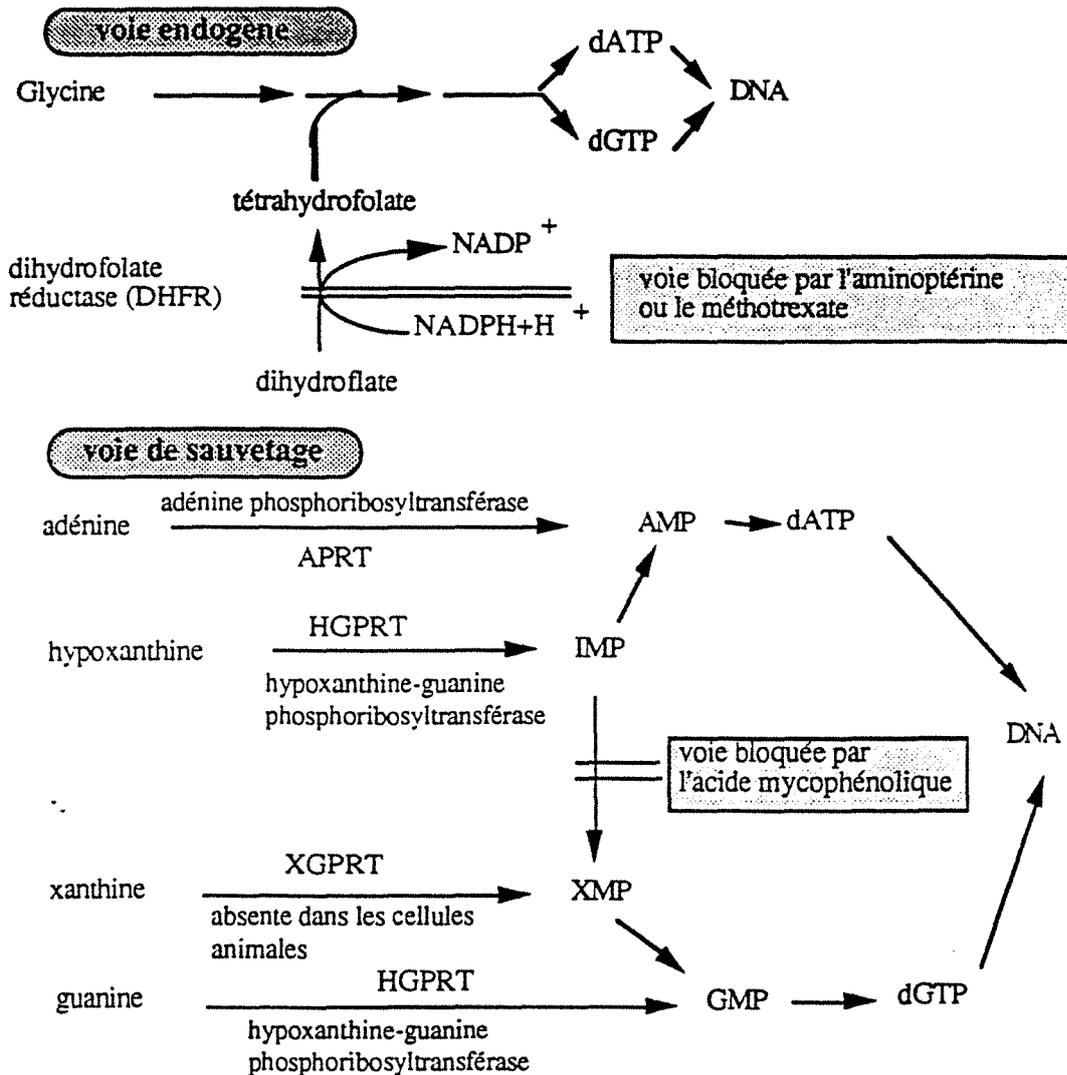
### **A.111.1 Sélection par complémentation**

#### **A.111.1.1 Thymidine kinase.**

Le gène de la thymidine kinase, qui est exprimé dans la plupart des cellules animales, code pour une enzyme impliquée dans la voie de sauvetage de la synthèse de nucléotides à partir de la thymidine. Un certain nombre de lignées cellulaires tk<sup>-</sup> ont été isolées de différentes espèces animales telles que des cellules de souris (cellules L tk<sup>-</sup>) (WIGLER,1977), des cellules humaines (cellules 143 tk<sup>-</sup>) (BACCHETTI ET GRAHAM,1977), des cellules de rat (fibroblastes Rat-2) (TOPP,1981).

Un milieu sélectif a été développé (LITTLEFIELD,1963), contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine (milieu HAT) dans lequel seules les cellules exprimant le gène tk pourront croître (l'aminoptérine bloquant la synthèse endogène de la thymidine monophosphate, la guanine monophosphate et l'adénine monophosphate); le gène de la

## BIOSYNTHESE DES PURINES



## BIOSYNTHESE DES PYRIMIDINES

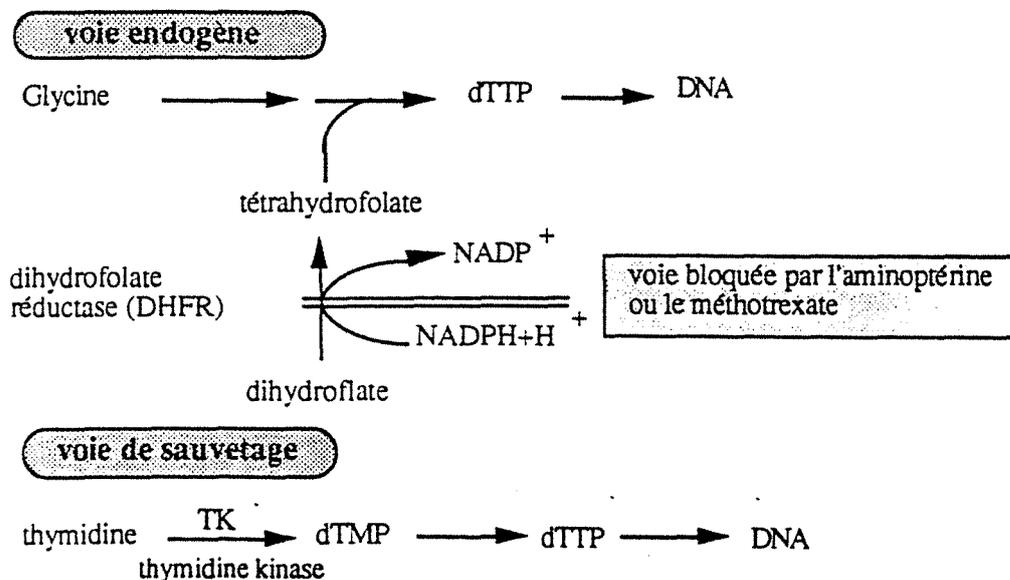


Figure 12: les différentes voies de biosynthèse des nucléotides (OLD ET PRIMROSE, 1985)

thymidine kinase du virus de l'Herpes simplex a été cloné dans un plasmide bactérien (COLBERE-GARAPIN et al,1979) et utilisable pour des constructions d'ADN recombinant. La seule limitation à ce système de sélection reste la nécessité d'obtenir une lignée cellulaire tk<sup>-</sup>.

#### 2.111.1.2 Dihydrofolate réductase

Des mutants de cellules CHO déficientes pour l'enzyme dihydrofolate réductase (URLAUB ET CHASSIN,1980) ne peuvent pas synthétiser le tétrahydrofolate et ne peuvent alors croître que dans du milieu supplémenté avec de la thymidine, de la glycine et des purines. La transfection de ces cellules avec un vecteur qui exprime le gène de la dihydrofolate réductase (dhfr) fournit des clones qui sont capables de croître en absence de ces suppléments (SUBRAMINI et al,1981; KAUFMAN et al,1985).

#### 2.111.1.3 Autres systèmes de complémentation

\* Deux enzymes du métabolisme des purines, l'adénine phosphoribosyltransférase (APRT) et l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase (HPRT) peuvent être utilisées comme marqueurs de sélection dans des cellules déficientes pour l'une de ces deux enzymes. Le gène APRT de hamster a été cloné (LOWY et al,1980) et utilisé pour sélectionner des cellules après transfection (ROBERTS et AXEL,1982). Le gène HPRT humain a également été cloné (JOLLY et al,1983) et peut compléter des cellules HPRT<sup>-</sup>, leur permettant de survivre dans du milieu HAT.

\* Une seule protéine possède trois activités enzymatiques dans la biosynthèse endogène de l'uridine, la CAD (carbamyl phosphate synthétase, aspartate transcarbamylase et dihydroorotase). La transfection d'un vecteur exprimant la protéine CAD d'hamster Syrien dans des cellules CHO CAD-déficientes permet la sélection de transfectants qui sont capables de croître en absence d'uridine (ROBERT DE SAINT VINCENT et al,1981).

La L Phosphonacétyl-L-aspartate (PALA) est un inhibiteur spécifique de l'activité aspartate transcarbamylase de la CAD. La croissance de cellules sauvages ou transfectées en présence de concentrations croissantes de PALA permet d'amplifier le gène CAD ainsi que les séquences d'ADN qui lui sont liées (ROBERTS DE SAINT VINCENT et al,1981;WAHL et al,1984). Le gène codant pour l'aspartate transcarbamylase de E.Coli (pyr B), exprimé dans des cellules CHO déficientes pour l'aspartate transcarbamylase est également amplifié par la sélection au PALA (RUIZ ET WAHL,1986).

### **A.111.2. Sélection par utilisation de marqueurs dominants.**

L'utilisation de marqueurs de sélection dominants élimine le besoin d'isoler des lignées cellulaires mutantes spécifiques. Beaucoup de ces marqueurs de sélection dominants dérivent de gènes procaryotiques et ont été adaptés pour permettre l'expression dans des cellules eucaryotiques.

#### **A.111.2.1. Sélection par résistance au G418.**

L'antibiotique aminoglycoside appelé généticine (G418) est un analogue des antibiotiques antibactériens néomycine et kanamycine. Il agit en inhibant la fonction des ribosomes 80S et bloque ainsi, la synthèse des protéines des cellules eucaryotes. Toutes les molécules de type aminoglycosides peuvent être inactivées par des aminoglycosides phosphotransférases 3' dont les gènes (appelés néo) sont situés sur les transposons Tn601 (903) et Tn5. JIMENEZ ET DAVIES (1980) ont montré que l'expression du gène néo (Tn601) dans des cellules eucaryotes conférait la résistance au G418. Il a également été vérifié que le gène néo sur le transposon Tn5 conférait la résistance au G418 pour les cellules animales transformées par ce gène (COLBERE-GARAPIN, 1981; SOUTHERN ET BERG, 1982). Les cellules animales traitées par le G418 cessent de se diviser et meurent. Si le gène bactérien néo est introduit dans un vecteur sous le contrôle de signaux d'expression appropriés, les cellules transfectées deviennent résistantes au G418 (SOUTHERN ET BERG, 1982).

#### **A.111.2.2 Sélection par résistance à l'acide mycophénolique.**

La xanthine-guanine-phosphorybosyltransférase bactérienne (XGPRT) peut convertir la xanthine en XMP, l'hypoxanthine en IMP et la guanine en GMP. Les cellules animales ne possèdent pas cette activité et meurent si la synthèse de guanine est bloquée par de l'acide mycophénolique. Le gène XGPRT de *E.coli* a été cloné et incorporé dans un vecteur adéquat qui permet de conférer aux cellules animales, la résistance à l'acide mycophénolique (MULLIGAN ET BERG, 1981).

#### **A.111.2.3 Sélection par résistance au méthotrexate.**

Nous avons mentionné précédemment l'utilisation du gène cloné DFHR pour compléter des cellules mutantes DHFR-. Le gène DHFR peut être également utilisé comme marqueur de sélection dominant. En effet, ce gène code pour des dihydrofolate réductases qui sont insensibles au méthotrexate (MTX). Le méthotrexate est un analogue du folate qui se lie

fortement à la dihydrofolate réductase pour inhiber son activité; les cellules meurent alors. Des cellules qui contiennent un gène DHFR muté peuvent devenir résistantes au méthotrexate : le cDNA a été cloné et le transfert de ce gène muté DHFR à des cellules sauvages confère la résistance au méthotrexate (WIGLER et al, 1980), d'où la possibilité de l'utiliser comme marqueur dominant.

D'autres études ont montré que des cellules devenues résistantes au méthotrexate surproduisaient l'enzyme DHFR. Cet autre aspect va être utilisé pour amplifier des séquences d'ADN. En effet, les séquences d'ADN qui seront liées au gène DHFR seront amplifiées. Par ajout progressif de méthotrexate dans le milieu de culture, seules les cellules qui multiplieront le nombre de copies du gène DHFR pourront survivre. Le système le plus utilisé avec amplification de l'ADN exogène est la lignée cellulaire CHO-DHFR<sup>-</sup>, appelée CHO-DUK (URLAUB ET CHASIN, 1980) dans laquelle est transfecté un vecteur possédant le gène DHFR.

### **A.11. STABILITE DE L'ADN TRANSFECTE.**

S'il est maintenant évident que des cellules animales peuvent exprimer une protéine à partir d'un ADN hétérologue transfecté, il est cependant moins connu l'état exact et la stabilité de cet ADN dans la cellule hôte. Plusieurs phases peuvent être définies après l'introduction de l'ADN exogène dans la cellule:

- Immédiatement après transfection de l'ADN, un pourcentage élevé de cellules (10-100%) peut exprimer l'ADN pendant 24 à 72 heures. Cette phase est appelée expression transitoire.
- Après sélection adéquate, un certain nombre de cellules vont continuer de produire la protéine recombinante et seront prénommées transfectants stables. Mais cette stabilité n'est conservée que si les cellules sont maintenues sous pression de sélection (WEIDLE et al, 1988).
- Après une période plus longue (60 jours), certaines cellules peuvent devenir des transfectants stables permanents avec incorporation de l'ADN exogène dans le génome hôte; la pression de sélection peut être alors retirée.

## **B. PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES PAR CULTURE EN MASSE DE CELLULES ANIMALES.**

### **B.1. LES CULTURES EN REACTEURS**

#### **B.1.1 Introduction**

De nombreux types de bioréacteurs pour la culture de cellules animales sont maintenant disponibles sur le marché. Le choix du bioréacteur pour une lignée cellulaire particulière est déterminé en fonction d'un certain nombre de paramètres: le type cellulaire, la nature du produit, l'échelle de l'opération, l'espace disponible et les coûts opérationnels de l'équipement. En général, la culture cellulaire en bioréacteurs peut être divisée en deux catégories:

- la culture avec des cellules support-dépendantes (exemples: cultures primaires dérivées de tissus normaux et lignées cellulaires diploïdes)
- la culture de cellules animales en suspension (exemples: lignées cellulaires dérivées de tumeurs et de tissus cancéreux, les lignées cellulaires diploïdes transformées, les hybridomes, etc).

Dans certains cas, le même bioréacteur peut être adapté ou modifié pour cultiver des cellules en suspension ou support-dépendantes. Un bioréacteur doit, de façon idéale, permettre le maintien de la culture cellulaire stérile dans des conditions de milieu qui favorisent la croissance cellulaire et / ou la productivité. En pratique, on peut rencontrer de nombreuses difficultés:

- des problèmes de contamination peuvent arriver à tous les stades de la culture.
  - de nombreuses interactions complexes coexistent dans le bioréacteur: physiques, chimiques et biochimiques, comprenant l'agitation et l'aération, les cinétiques de croissance et de formation d'un produit par rapport aux besoins nutritionnels des cellules, l'accumulation de facteurs toxiques et les effets néfastes à la culture dûs aux mécanismes d'agitation et d'aération utilisés.
- Tous ces facteurs doivent être pris en compte en fonction de l'échelle, de la géométrie et de la configuration du bioréacteur.

#### **B.1.2 Les modes de culture.**

##### **B.1.2.1. Le mode discontinu ou "batch".**

Dans une culture en mode discontinu, un inoculum de densité connue estensemencé dans le bioréacteur avec un volume défini de milieu préconditionné. Rien ne doit être ajouté, ni retiré du bioréacteur pendant toute la durée de la culture. Cependant, en pratique, des additions d'air,

de CO<sub>2</sub> et d'acides et de bases (pour le contrôle du pH) sont réalisées. Les cultures en mode discontinu de cellules en suspension peuvent être effectuées dans deux types de bioréacteurs (figure 13):

- bioréacteur classique agité.
- air lift

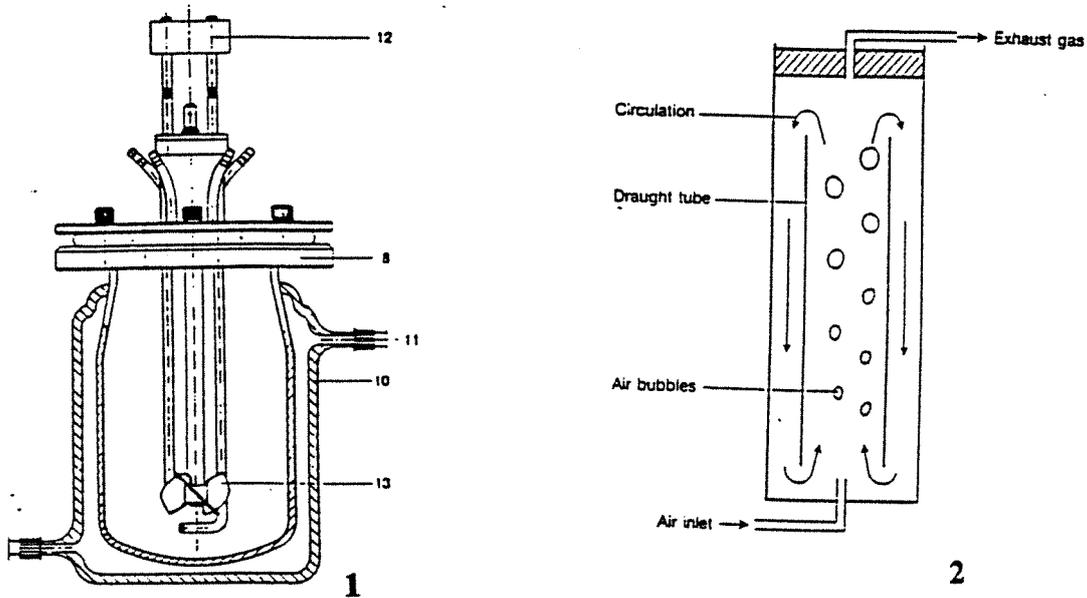


Figure 13: configuration de bioréacteurs pour culture en mode discontinu: 1) réacteur agité; 2) bioréacteur airlift (d'après HANDA-CORRIGAN, 1991).

Les nutriments vont être épuisés au cours du temps tandis que les toxiques et les produits vont s'accumuler dans le milieu (MILLER, 1988; DODGE et al, 1987; BUTLER, 1985). La croissance cellulaire sera brève de l'ordre de 3 à 5 jours suivie du déclin cellulaire. Ce décès peut être attribué notamment à l'épuisement de certains nutriments tels que glucose, glutamine ou acides aminés (BUTLER et al, 1983) ou à l'accumulation de toxiques comme le lactate ou les ions ammonium (DODGE et al, 1987; BUTLER et al, 1983).

#### B.1.2.2 Le mode semi continu ou "fed batch".

Ce mode de culture consiste à alimenter en milieu frais le bioréacteur sans rien soutirer par ailleurs; le volume du milieu de culture dans le bioréacteur va donc augmenté progressivement. L'alimentation peut se faire soit de façon séquentielle soit de façon continue. Le débit d'alimentation doit être choisie de manière adéquate pour permettre le maintien de la croissance cellulaire pendant une durée plus importante. Le terme de culture en mode semi-continu est également employé quand il s'agit de l'addition ponctuelle de glucose ou de glutamine pour limiter les productions de lactate et d'ions ammonium (MILLER et al, 1987, 1988). Ce mode

de culture améliore la croissance et la productivité des cellules (GLACKEN et al, 1989) par rapport à un système en mode discontinu.

#### B.1.2.3. Le mode recharge-récolte.

Ce mode de culture consiste en une succession de cultures en mode discontinu avec réensemencement des cellules de la culture précédente (SMILEY et al, 1989; HU et al, 1986; MURATA et al, 1988). Ce mode de culture a l'avantage de permettre des durées de culture importantes.

#### B.1.2.4. Le mode continu ou perfusé.

Une alternative à la culture en mode discontinu ou en mode semi-continu est la culture en mode continu; elle consiste à apporter continuellement du milieu frais dans le bioréacteur tout en soutirant le milieu usagé. Deux systèmes différents sont alors utilisables:

- soit le milieu soutiré s'accompagne de la sortie des cellules: ce mode de culture est appelé continu ou chémostat et est très utile pour étudier les différentes cinétiques en fonction des conditions d'environnement de la cellule; le volume du milieu dans le réacteur est maintenu constant et un état stationnaire est atteint lorsque la densité cellulaire et la concentration de substrat restent constantes.

- soit les cellules sont maintenues dans le bioréacteur lors du soutirage et le mode de culture est alors appelé "perfusé". Ce mode de culture permet d'obtenir de hautes densités cellulaires tout en utilisant des débits de plusieurs volumes jours (REUVENY et al, 1986). Les inconvénients de tels systèmes sont les risques de colmatage lorsque la perfusion utilise des membranes, les limitations en oxygène ou en nutriments dans les réacteurs perfusés hétérogènes.

Les cinétiques de croissance, de consommation et de production sont comparées suivant le mode de culture sur la figure 14.

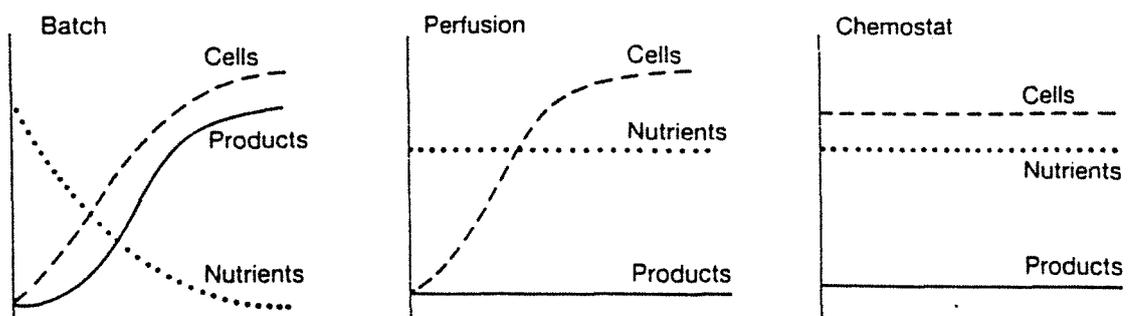


Figure 14: cinétiques de consommation de nutriments et d'accumulation de cellules et de produits suivant le mode de culture (d'après HANDA-CORRIGAN, 1991).

Les différentes productivités suivant le mode de culture employé sont données dans le tableau VII (GRIFFITHS, 1992).

mode de culture	cellules (millions)	rendement de production (mg / semaine)	mg par litre et par mois	durée (jours)
discontinu	3	100	200	7
recharge-récolte	3	200	600	21
semi-continu	6	200	500	14
perfusé	30+	3000	12000	> 30
chemostat	2	300	1200	> 100

tableau VII: productivité optimale suivant le mode de culture employé (GRIFFITH, 1992).

De nombreuses configurations de réacteurs existent maintenant et sont regroupées sur la figure 15 (MARC, 1988).

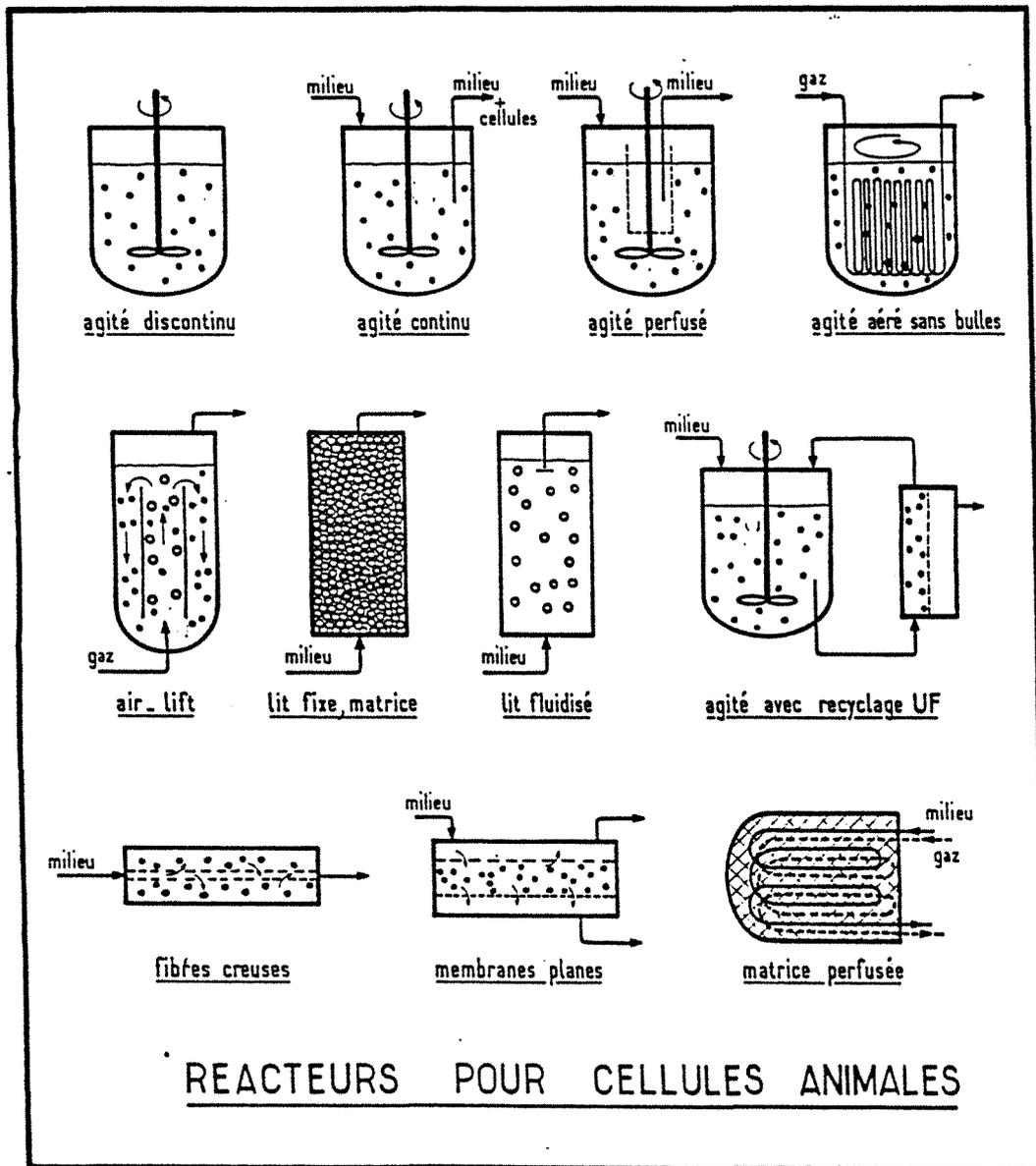


Figure 15: représentation de différentes configurations de réacteurs pour cellules animales (MARC, 1988)

### **B.1.3 Les différentes régulations physico-chimiques dans le bioréacteur**

#### **B.1.3.1 La température.**

La température dans le bioréacteur est contrôlée, soit par une circulation d'eau dans une gaine reliée à un bain marie thermostaté, soit par une circulation d'air chaud à l'intérieur de la gaine (exemple SGI, France). La température usuelle de culture de cellules animales est de 37°C. Pour des températures inférieures à 37°C, un ralentissement du métabolisme a été observé (KURANO et al, 1990a); par contre des températures supérieures à 37°C entraînent la synthèse de protéines de choc thermique intracellulaire accompagnée d'un ralentissement de la croissance (GOOCHEE ET PASSINI, 1988).

#### **B.1.3.2 Le pH.**

Le milieu de culture contenant du bicarbonate de sodium est utilisé pour maintenir constant la pH par addition de CO<sub>2</sub>:



Dans les bioréacteurs, l'acidification du milieu liée en grande partie à la production d'acide lactique est contrebalancée par l'ajout de soude. Le contrôle du pH semble être un point important dans l'attachement et la croissance cellulaires (LEIST et al, 1986; DODGE et al, 1987). Cette régulation peut également accroître la production d'une protéine recombinante par rapport à un système avec pH non régulé (SMILEY et al, 1989). Pour la plupart des lignées cellulaires, la gamme de pH optimale pour la croissance cellulaire varie entre 6,9 et 8 (EAGLE et al, 1973), avec des valeurs usuelles de l'ordre de 7,2; cependant certaines lignées cellulaires telles que CHO ont des pH optimum plus élevés de 7,4 à 7,6 (KURANO et al, 1990a).

#### **B.1.2.3 L'aération dans le bioréacteur**

L'oxygène est un élément essentiel dans la culture de cellules animales. Celui-ci se comporte comme un accepteur d'électron dans la chaîne de transport d'électrons et sert à la production d'énergie via la phosphorylation oxydative. La consommation spécifique d'oxygène varie d'une lignée cellulaire à une autre mais est généralement comprise entre 0,05 et 0,5 mmol O<sub>2</sub> /h.10<sup>9</sup> cell. Pour des cultures avec de faibles volumes, l'aération peut se faire dans le ciel du

réacteur avec une oxygénation qui aura lieu à l'interface air / milieu de culture (HU ET WANG, 1986). Pour des cultures avec des volumes importants, des systèmes d'aération par diffuseur d'air directement dans le liquide sont employés avec diffusion de bulles d'air (GARDNER et al, 1990; PASSINI ET GOOCHEE, 1989); ces systèmes sont cependant peu utilisés lors de culture sur microporteurs, car les bulles de gaz risquent de décoller les cellules de la surface des microporteurs. Il existe également des systèmes d'aération sans bulles par un aérateur de surface (HU et al, 1986) ou par l'intermédiaire de tuyaux en silicone de faibles diamètres, liés à l'axe d'agitation ou fixes (WAGNER ET LEHMAN, 1988; WAGNER, 1990).

#### **B.1.4 Le milieu de culture et le métabolisme cellulaire.**

##### **B.1.4.1 les constituants du milieu de culture**

###### **B.I.4.1.1. Les glucides**

Le glucose est la principale source d'énergie et de carbone des cellules animales en culture. Mais le glucose peut être remplacé par du fructose ou du maltose (IMAMURA et al, 1982) avec des productions d'acide lactique moindres qu'en présence de glucose. L'utilisation de galactose est également possible (WAGNER, 1990). REITZER et al (1979) ont fait pousser des cellules HeLa soit avec du glucose, du galactose ou du fructose et ont montré que la croissance était identique quelle que soit la source carbonée; cependant les voies métaboliques empruntées par les cellules variaient avec chaque composé.

###### **B.I.4.1.2. La glutamine**

La glutamine est un élément énergétique prépondérant du milieu de culture. En présence de glucose, la glutamine fournit 30% de l'énergie cellulaire de cellules HeLa alors qu'en présence de galactose ou de fructose, il a été montré que la glutamine pouvait fournir 98% des besoins en énergie de cellules HeLa (REITZER et al, 1979).

###### **B.I.4.1.3. Les acides aminés**

Les acides aminés jouent un rôle important dans le métabolisme de cellules animales en culture. Ils occupent diverses fonctions, notamment dans la synthèse protéique. De nombreux acides aminés servent de précurseurs dans la formation de petites molécules: par exemple le glutathion à partir de glycine, la choline à partir de sérine, les purines à partir de glycine, glutamine et aspartate (METZLER, 1977).

#### **B.I.4.1.4. Les lipides**

Plusieurs lipides tels que le cholestérol, l'acide linoléique et certains phospholipides stimulent la croissance de certaines lignées cellulaires (SPECTOR, 1972). Généralement, il n'est pas rajouté de lipides dans les milieux de culture en présence de sérum de veau car ce dernier en contient suffisamment. Mais, lors de développement de milieux de culture sans sérum, les lipides ont été inclus dans les formulations de ces milieux (BARNES ET SATO, 1980; GLASSY et al, 1988). Il a par ailleurs été montré que la production d'antithrombine III par culture de cellules CHO ou BHK recombinantes, était fonction des concentrations d'acides gras présentes dans le milieu de culture en absence de sérum de veau (SCHMID et al, 1991).

#### **B.I.4.1.5. Les vitamines**

Les vitamines sont des constituants courants des milieux de culture. Des vitamines telles que choline, acide folique, nicotinamide, pantothénate, pyridoxal, riboflavine et thiamine sont indispensables à la culture des cellules animales (LAMBERT ET BIRCH, 1985). D'autres vitamines comme la biotine, la vitamine B12, l'inositol sont également présentes dans certains milieux de culture (HAM F12). Plus récemment des études ont montré par des dosages de 4 vitamines (l'acide ascorbique, la nicotinamide, la choline et la thiamine), la possibilité de limitations de croissance de cellules CHO par déplétion en vitamines (KURANO et al, 1990b).

#### **B.I.4.1.6. Les sels minéraux**

Un certain nombre d'ions, sodium, potassium, calcium, magnésium et phosphate semblent essentiels à la croissance cellulaire. Ils interviennent notamment dans le contrôle du pH et de l'osmolarité du milieu (LAMBERT ET BIRCH, 1985).

#### **B.I.4.1.7. Autres molécules**

Des molécules d'attachement cellulaire comme la fibronectine ou le collagène sont particulièrement importantes surtout pour les cellules support-dépendantes. D'autres molécules comme les facteurs de croissance jouent un rôle déterminant et sont étudiées et purifiées pour la formulation de milieu défini sans sérum (HEWLETT, 1991; MINAMOTO et al, 1991; JAYME, 1991).

#### **B.I.4.1.8. Le sérum**

Le sérum est un milieu extrêmement complexe avec de petites et grosses molécules mais dont la composition exacte est inconnue. Les composants majeurs et leur fonction sont décrits tableau VIII.

<b>Composants</b>	<b>Fonctions principales</b>
<u><b>PROTEINES:</b></u> * Albumine  * Fibronectine * $\alpha$ 2-Macroglobuline * Fétuine * Transferrine	- transport des lipides, hormones - capacité tampon - attachement cellulaire - Inhibiteur de la trypsine - améliore l'attachement cellulaire - transport du fer
<u><b>POLYPEPTIDES ET FACTEURS DE CROISSANCE:</b></u> * Insuline  * IGF I et II, Somatomédine A et C, MSA * Facteurs de croissance (EGF, FGF, ECGF)	- favorise la consommation du glucose et des acides aminés - Mitogènes - Mitogènes
<u><b>PEPTIDES:</b></u> * Glutathion	- Réaction rédox
<u><b>HORMONES:</b></u> * Hydrocortisone  * Œstrogènes, androgènes * Hormones thyroïdes (T3, T4)	- induit la différenciation cellulaire; favorise l'attachement cellulaire - Mitogènes - consommation d'oxygène, favorise la croissance et la différenciation de différentes cellules
<u><b>LIPIDES:</b></u> * acide linoléique, cholestérol, prostaglandine	- biosynthèse des membranes
<u><b>METABOLITES:</b></u> * acides aminés, pyruvate, polyamines	- prolifération cellulaire
<u><b>MINÉRAUX:</b></u> * Fe, Zn, Cu, Mn, SeO <sub>3</sub> , Co,...	- activation enzymes

Tableau VIII: Composants majeurs du sérum nécessaires à la survie et à la croissance cellulaire. (MAURER, 1986)

#### B.I.4.1.9. Le butyrate de sodium.

Le butyrate est un lipide naturel à quatre atomes de carbone que l'on retrouve couramment dans les aliments notamment dans les acides gras du lait. En 1983, GORMAN et al (1983b) ont montré que des cellules HeLa ou des cellules de singe CV-1 qui avaient été transfectées avec le gène chloramphénicol acétyltransférase (CAT) sous le contrôle du promoteur précoce de SV40, en présence de butyrate de sodium, répondaient à des expositions répétées de butyrate de sodium par une induction de sept fois et demie de l'expression du gène CAT. D'autres auteurs (DORNER et al, 1989) ont montré une augmentation dans la sécrétion du facteur VIII, du facteur Von Willebrand après incubation des transfectants stables avec du butyrate de sodium. Plus récemment, des cellules CHO recombinantes exprimant l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA) (PALERMO et al, 1991) sous le contrôle du promoteur cytomégalovirus et soumises à des incubations répétitives de 5 mM de butyrate de sodium, exprimaient le tPA deux à neuf fois plus par rapport à un témoin non induit. De

même, il a été obtenu une augmentation de l'expression du facteur VIII par des cellules CHO après induction par 3 mM de butyrate de sodium (GANNE et al, 1990).

Au niveau moléculaire, le butyrate de sodium est responsable de changements de la structure de la chromatine dûs à une hyperacétylation des histones résultant d'une activation de transacétylase ou de l'inhibition de déacétylase (KRUH, 1982; REEVES ET CSERJESI, 1979); ce changement serait en relation avec la modification de l'expression des gènes observée (KRUH, 1982; PALERMO et al, 1991). Le mécanisme d'action reste inconnu, mais des auteurs ont noté d'autres effets du butyrate de sodium (BOFFA et al, 1981) tels qu'une inhibition réversible de la phosphorylation des histones H1 et H2A, l'inhibition de la synthèse d'ADN, une réduction dans le taux de synthèse et dans la méthylation des protéines nucléaires. L'acétylation des histones pourrait être un mécanisme entrant en jeu dans l'activation des gènes, par modifications des interactions histones-ADN (KRUH, 1982); l'acétylation des histones modifie l'accessibilité de la chromatine aux DNAses; ces dernières attaquant préférentiellement les gènes actifs. Le butyrate de sodium agit également sur le cycle cellulaire en bloquant les cellules au niveau de la transition entre la phase G1 et la phase S; l'incorporation de [<sup>3</sup>H] thymidine dans l'ADN est par ailleurs stoppée (PALERMO et al, 1991), notamment avec des concentrations de butyrate de sodium supérieures à 2,5 mM (BOFFA et al, 1981).

#### B.1.4.2 Métabolisme cellulaire.

Les diverses voies métaboliques empruntées sont schématisées figure 16 (MILLER et al, 1988); elles comprennent les voies intervenant dans la production d'énergie et dans la synthèse de constituants cellulaires.

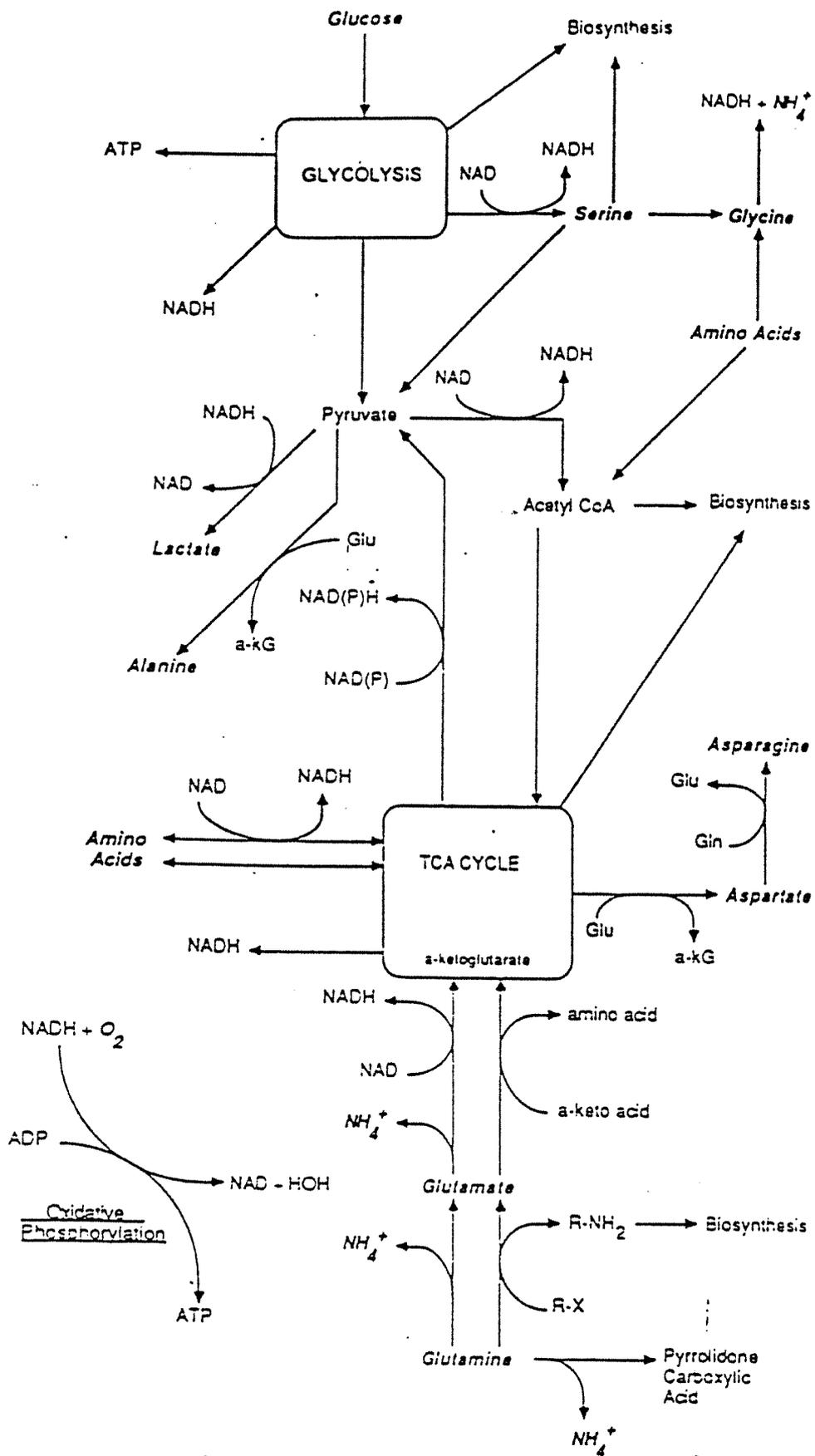


Figure 16: représentation des différentes voies métaboliques (d'après MILLER, 1988).

## **B.11. LES SYSTEMES DE CULTURE EN MASSE POUR CELLULES SUPPORT-DEPENDANTES**

### **B.11.1 Les microporteurs**

Les microporteurs représentent le système le plus courant pour la culture de cellules support-dépendantes. Les caractéristiques les plus importantes communes à tous les microporteurs commercialisés sont décrites ci-dessous.

#### **B.11.1.1. La taille.**

Une grande surface par unité de volume de culture permet d'optimiser le potentiel de croissance cellulaire. Ce qui implique la nécessité d'avoir des particules de dimensions les plus petites possibles. Cependant, les microporteurs doivent être de taille suffisante, pour que l'inoculum initial permette une bonne initiation de la croissance cellulaire. Des observations sur la croissance de cellules BHK sur des billes de verre de différents diamètres, ont montré que la croissance cellulaire diminuait pour des diamètres de bille inférieurs à 50  $\mu\text{m}$  (MAROUDAS, 1972). La plupart des microporteurs commercialisés ont un diamètre optimal entre 100 et 200 $\mu\text{m}$ . Par exemple, la mise en suspension de  $12,6 \cdot 10^6$  microporteurs de dextrane dans un litre de culture fournit une surface de  $10^4 \text{ cm}^2$  et est équivalent à la surface disponible de 20 bouteilles roulantes (BUTLER, 1987b). Cette concentration de microporteurs devrait permettre la croissance de cellules avec une concentration initiale de  $2 \cdot 10^5$  cellules par ml avec obtention de  $2 \cdot 10^6$  cellules par ml finales.

#### **B.11.1.2 La densité.**

Afin d'éviter le stress cellulaire et la formation de mousse, la vitesse d'agitation en bioréacteur doit être maintenue la plus faible possible. Les microporteurs doivent donc être très légers pour rester facilement en suspension dans le milieu. La densité optimale des microporteurs est de 1,03-1,05  $\text{g} / \text{cm}^3$ . Bien sûr, au cours de la culture, la densité des microporteurs colonisés va graduellement augmentée. Des vitesses d'agitation de l'ordre de 40-50 rpm sont adéquates pour de telles cultures.

#### **B.11.1.3 La charge.**

La densité de charge du microporteur est un paramètre critique dans la croissance cellulaire. Si la densité de charge est trop faible, l'attachement cellulaire est inadéquat; au contraire, une densité de charge trop forte a un effet toxique sur les cellules.

#### B.11.1.4. Les types de microporteurs.

De nombreux types de microporteurs sont actuellement commercialisés; les principaux microporteurs commercialisés sont décrits dans le tableau IX:

<u>TYPE</u>	<u>NOM</u>	<u>MARQUE</u>	<u>PAYS</u>	<u>COMPOSITION</u>
<b>Dextrane</b>	* cytodex 1 * cytodex 2 * Superbeads * microdex * dormacell	- Pharmacia - Pharmacia -Flow -DextranProducts -Pfeifer & Langen	Suède Suède USA Canada Allemagne	DEAE-dextrane dextrane DEAE-dextrane DEAE-dextrane dimère DEAE dextran
<b>Plastique</b>	* biosylon * biocarriers * cytospheres * acrobeads * micargel G * bioplas * Mica	-Nunc - Biorad - Lux - Galil - IBF - Solohill Eng. -Muller-Lierheim	Dannemark USA USA Israël France USA Allemagne	polystyrène chargé polyacrylamide/DMAP polystyrène chargé polyacroléine polyacrilamide/collagène polystyrène résine Epoxy
<b>Gelatine</b>	* gelibeads * ventregel * cytodex 3	- KC Biologicals - Ventrex - Pharmacia	USA Suède USA	gélatine dextrane dextrane couche gélatin
<b>Verre</b>	* bioglass * ventreglas	- Solohill Eng. - Ventrex	USA USA	plastique couche verre plastique couche verre
<b>Cellulose</b>	* DE-52 / 53	- Whatman	GB	DEAE-cellulose

Tableau IX: les principaux types de microporteurs commercialisés (BUTLER, 1987a)

Plus récemment, un nouveau type de microporteurs a été décrit: les microporteurs poreux (ou macroporteurs) (CAHN, 1990). Ce type de microporteurs possède les avantages suivants par rapport aux microporteurs classiques:

- ils offrent une surface spécifique supérieure;
- les cellules peuvent croître à l'intérieur de pores; elles sont ainsi protégées des effets néfastes du cisaillement; ce qui permet d'augmenter les vitesses d'agitation et de diffusion d'air.
- la densité cellulaire est plus importante puisque les cellules ne sont pas uniquement confinées à la surface du microporteur.

Il a été montré que la croissance cellulaire avait lieu initialement à la surface des microporteurs poreux puis migrait vers l'intérieur des pores.(NIKOLAI ET HU, 1992). Des cellules CHO recombinantes ont été propagées sur un système de porteurs particulièrement poreux (85% de leur volume sont constitués de pores), et ont donné des densités de l'ordre de  $1$  à  $5.10^8$  cellules / ml (YOUNG ET DEAN, 1987). D'autres auteurs ont également décrit la culture en bioréacteur de cellules CHO sur des porteurs macroporeux en gélatine, dans un système à lit fluidisé (REITER et al, 1990), ou de cellules Vero sur des sphères poreuses en verre dans un système de lit fixe (LOOBY ET GRIFFITHS, 1988). Plus récemment, des porteurs poreux en polyéthylène ont été proposés (BLUML et al, 1992)

Des systèmes d'encapsulation cellulaires ont également été mis au point; ils permettent de protéger les cellules des contraintes de cisaillement. Des cellules CHO recombinantes ont été encapsulées dans des billes d'agarose (NILSSON et al, 1988); malgré l'obtention de haute densité cellulaire, une forte diminution de la production du tPA (activateur du plasminogène tissulaire) recombinant a été observée.

### **B.11.2. Les agrégats.**

Une alternative à la croissance sur microporteurs est la culture en agrégats. Ce système de culture consiste à ensemercer les cellules directement dans le milieu, sans ajout de microporteurs. Des auteurs ont décrit la culture de cellules support dépendantes telles que des cellules embryonnaires de souris NIH dans un système en agrégats (TOLBERT et al, 1980). L'ajout d'ions calcium facilite l'agrégation des cellules (GRINNELL, 1977). La taille des agrégats varie entre la cellule isolée et le paquet de cellules de quelques millimètres de diamètre. Par la taille importante des agrégats, la rétention des cellules dans un réacteur durant une culture en mode perfusé est plus simple à obtenir qu'une culture en suspension avec des cellules individualisées. Une concentration cellulaire plus importante peut être également obtenue par rapport à une culture sur microporteurs. Une limitation à la culture en agrégats est la faible vitesse de formation des agrégats; afin de pallier ce problème, certains auteurs préconisent l'ajout de microsphères qui permettraient l'induction de l'agrégation (GOETGHEBEUR ET HU, 1991); cette méthodologie est analogue à l'induction de la cristallisation. La croissance en agrégats a été notamment décrite pour des cellules CHO et BHK afin de simplifier la culture et de réduire les coûts engendrés par les microporteurs (LITWIN, 1990; MOREIRA et al, 1992). Des cellules CHO recombinantes ont été cultivées en agrégats en bioréacteur en lit fluidisé et une densité de  $2-3 \cdot 10^8$  cellules / ml a été obtenue (REITER et al, 1992). La sensibilité aux contraintes de cisaillement de cellules CHO cultivées en agrégats a été abordée en présence et en absence de sérum et il a été montré que le sérum agissait comme un agent protecteur (JORDAN et al, 1992).

L'un des problèmes majeurs de la culture en agrégats est la difficulté d'estimer le nombre de cellules dans les agrégats. Des techniques d'estimation ont été proposées par la détermination des volumes cellulaires (BORASTON et al, 1992) ou par la technique au cristal violet (LITWIN, 1992). La viabilité des agrégats est par contre difficile à estimer.

### **B.11.3 L'adaptation à la culture en suspension**

Certains auteurs ont tenté d'adapter des cellules CHO support-dépendantes à la culture en suspension. Le principe consiste à désagréger les cellules qui ont tendance à faire de petits paquets entre chaque passage; cette culture est répétée pendant plusieurs semaines. MURATA et al (1988) ont adapté des cellules CHO recombinantes à la culture en suspension; après deux passages successifs, le temps de génération des cellules en suspension était de 87 heures alors qu'il est d'environ 16-20 heures en présence d'un support adéquat. Ce temps de génération fut réduit à 48 heures après 7 passages successifs; ce temps de génération ainsi que la production de la protéine recombinante se stabilisent pendant les 20 passages suivants.

Afin de limiter l'agrégation naturelle des cellules, des auteurs préconisent la réduction du taux de calcium dans le milieu de culture (BORASTON et al, 1992).

La production de protéines recombinantes par ces cellules adaptées à la culture en suspension reste le point crucial. Si certains auteurs ne relèvent aucune différence de production quel que soit le système de culture (FAURE et al, 1989), d'autres études (COCKETT et al, 1990) ont montré une chute de la production de l'inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase avec l'adaptation de cellules CHO à la culture en suspension: la vitesse spécifique de production des cellules en suspension étant cinq fois inférieure à celle des cellules cultivées sur support. Le nombre de copies reste pourtant constant et les cellules adaptées à la culture en suspension recouvrent leur production habituelle dès qu'elles retrouvent un support adéquat. L'analyse des ARN messagers de l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases a montré que la diminution de la production pouvait être attribuée à une chute du taux d'ARN à l'état stationnaire; cette diminution de production n'étant pas retrouvée avec d'autres clones, les auteurs ont conclu à une intégration particulière du vecteur dans le génôme hôte.

## **B.111 PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES PAR CULTURE DE CELLULES CHO (Chinese Hamster Ovary)**

### **B.111.1 Introduction**

Il existe maintenant de nombreuses protéines recombinantes à usage thérapeutique étudiées qui sont issues de culture de cellules animales. Un certain nombre de lignées cellulaires ont été employées dont les plus courantes sont les suivantes:

- \* La lignée C127 de tumeur mammaire de souris
- \* La lignée CHO d'ovaire de hamster chinois
- \* La lignée BHK de rein de bébé hamster.

On peut également citer d'autres lignées telles que Vero ou HeLa qui sont également souvent utilisées.

### **B.111.2 Les cellules CHO**

#### **B.111.2.1 Historique**

C'est en 1948 que le hamster chinois fut introduit comme animal de laboratoire aux Etats Unis. En 1957, PUCK et al (1958) établissent une lignée fibroblastique à partir de l'ovaire de cet animal. Une sous-lignée de cette souche originelle fut isolée et dénommée CHO-K1 (ATCC CCL61). Une autre sous-lignée fut adaptée à la culture en suspension et fut prénommée CHO-S. Il existe entre ces deux sous lignées quelques différences dans le caryotype mais surtout, la différence majeure réside dans la possibilité de la lignée CHO-S de croître en système en suspension alors que la lignée CHO-K1 ne le peut pas.

#### **B.111.2.2 La croissance des cellules CHO**

Les cellules sont auxotrophes pour la proline et nécessitent des milieux contenant cet acide aminé tels que HAM F12. Un mélange DMEM / HAM F12 est également souvent utilisé pour la culture de ces cellules. Les cellules CHO croissent de façon optimale à 37°C et préfèrent un pH légèrement alcalin; selon les auteurs, le pH préconisé varie entre 7,2 et 7,8. Le temps de génération des cellules CHO se situe entre 12 et 18 heures.

### **B.111.2.3. Choix des cellules CHO.**

Les cellules CHO présentent plusieurs avantages qui les font souvent choisir comme cellule d'étude: un temps de génération court, une efficacité d'étalement supérieure à 80% (l'efficacité d'étalement étant le pourcentage de cellulesensemencées donnant une descendance) et une bonne robustesse. Ces avantages en font une bonne candidate pour la culture industrielle et pour l'insertion, par des techniques de génie génétique, de gènes étrangers. Leur avenir est donc dans la production industrielle de protéines recombinantes, d'autant que ces cellules semblent pouvoir pousser dans des milieux exempts de protéines (HAMILTON ET HAM, 1977). De plus, la lignée CHO-K1 est à l'origine de la plupart des mutants de sélection utilisés par le génie génétique, comme la lignée CHO-K1-DHFR<sup>-</sup> (URLAUB ET CHASIN, 1980).

La cellule CHO a donc été très souvent utilisée comme cellule modèle:

- pour développer des milieux sans sérum (GASSER et al, 1985)
- pour tester l'influence de l'environnement cellulaire sur la glycosylation d'une protéine recombinante (HAYTER et al, 1992);
- pour comparer la glycosylation de la protéine recombinante avec celle de cette même protéine issue d'autres cellules (GOTO et al, 1988);
- pour étudier les différences de morphologies cellulaires suivant les constituants du milieu (MENDIAZ et al, 1986)
- pour tester de nouvelle configuration de réacteur (REITER et al, 1991);
- pour étudier l'utilisation et la stabilité de vitamines dans des milieux sans sérum (KURANO et al, 1990b).

### **B.111.3 Production de protéines recombinantes par des cellules CHO.**

Un certain nombre de protéines recombinantes ont été exprimées dans les cellules CHO dont les plus importantes sont consignées dans le tableau suivant (tableau X), ainsi que les différents modes de culture utilisés. Certaines protéines recombinantes, produites par des cellules CHO sont déjà commercialisées; la première ayant été le tPA (tissue plasminogen activator).

Produit	système de culture	mode de culture	milieu sans sérum	Références
tPA	microporteurs	- Flacons agités (100 ml)	non	NILSSON et al (1988)
	suspension	-réacteur 10 000 l	oui	LUBINIECKI et al (1989)
scu-PA	agrégats	- réacteur perfusé (20 l)	oui	AVGERINOS et al (1990)
TIMP	suspension	- Flacons agités	non	COCKETT et al (1990)
	suspension	- Air-lift (100 l)	oui	FIELD et al (1990)
Anticorps	suspension	- Air-lift (1000 l)	oui	RHODES (1989)
Facteur VIII	suspension	-réacteur (1 l) recharge-récolte	oui	FAURE et al (1989)
Facteur IX	support plastique	-flacons de Roux	non	KAUFMAN et al (1986)
Facteur von Willebrand	microporteurs macroporeux	- recharge-récolte (1 à 4l)	oui	MIGNOT et al (1990)
Gamma-interféron	suspension	- chémostat (2 l)	oui	HAYTER et al (1992)
	suspension	- discontinu (2 l)	oui	CURLING et al (1990)
	microporteurs	recharge-récolte	non	NILSSON et al (1988)
	microporteurs	recharge-récolte	non	SMILEY et al (1989)
hGH	support plastique	-flacons de Roux	oui	FRIEDMAN et al (1989)
Beta-interféron	support plastique	-flacons de Roux	non	MC CORMICK et al (1984)
interleukine-4	microporteurs	- réacteur perfusé (1 l)	oui	SONODA et al (1988)
Renine humaine	microporteurs	- réacteur perfusé (0,5l)	oui	PORTNER et al (1991)
IGF-I	support plastique	-flacons de Roux	non	MC KINNON et al (1991)
Human antithrombine III	support plastique	-flacons de Roux	non	ZETTLMEISSL et al (1987)
	suspension	- flacons agités (100 ml)	oui	SCHMIDT et JOHANNSEN (1990)
FGF	support plastique	-flacons de Roux	non	MANSUKHANI et al (1990)
Antigène de surface de l'hépatite B	support plastique	-flacons de Roux	non	MICHEL et al (1985)

Tableau X: exemples de protéines recombinantes exprimées dans des cellules CHO.

## **C. LA GAMMA-GLUTAMYLTRANSFERASE HUMAINE (GGT).**

### **C.1. INTERET DE LA GGT EN BIOLOGIE CLINIQUE**

Le dosage de l'activité GGT est un test couramment pratiqué dans les laboratoires d'analyses médicales. La mesure de l'activité GGT est souvent prescrite pour la détection d'atteintes hépatiques diverses ainsi que pour le suivi de cure de désintoxication de sujets alcooliques. Au cours de désordres hépatobiliaires, on peut observer une augmentation de l'activité de l'enzyme plasmatique; il est admis que la GGT circulante provient du foie. Des causes physiologiques telles que l'âge, le sexe, la surcharge pondérale (SIEST et al, 1983) et la prise d'alcool ou de médicaments peuvent également entraîner une élévation de l'activité GGT. Des variations physiologiques apparaissent également au cours du développement chez l'homme. Ainsi l'organe le plus riche en GGT est le foie chez le fœtus alors qu'elle est prédominante dans le rein chez l'homme adulte. Des activités GGT plasmatiques élevées peuvent être observées dans certaines pathologies comme le cancer du pancréas, le diabète, l'insuffisance rénale, l'infarctus du myocarde, l'hépatite virale...

Mais le suivi de l'activité sérique est surtout destiné au dépistage de l'alcoolisme et pour le suivi du sevrage lors de cure de désintoxication (ROSALKI et al, 1975). L'augmentation de la production de GGT par induction alcoolique a été montrée par un modèle expérimental *in vitro* avec des hépatomes de rat en culture (BAROUKI et al, 1983): des concentrations de 45 mM d'éthanol engendrent une induction de l'activité GGT.

Les médicaments tels que antidépresseurs, contraceptifs oraux, anticancéreux et antiépileptiques sont également responsables d'accroissement de la GGT sérique (SIEST et al, 1983). La GGT serait donc très utile comme témoin indirect de l'induction enzymatique par les xénobiotiques (SIEST et al, 1982).

### **C.11. STRUCTURE ET DISTRIBUTION DE LA GGT HUMAINE**

La GGT (EC.2.3.2.2), enzyme ubiquitaire, est présente à la surface des cellules épithéliales impliquées dans des fonctions d'absorption et de sécrétion. L'activité la plus importante est retrouvée principalement dans le rein, le pancréas et l'intestin; cependant, des activités moindres sont présentes dans le foie, le sérum et le cerveau.

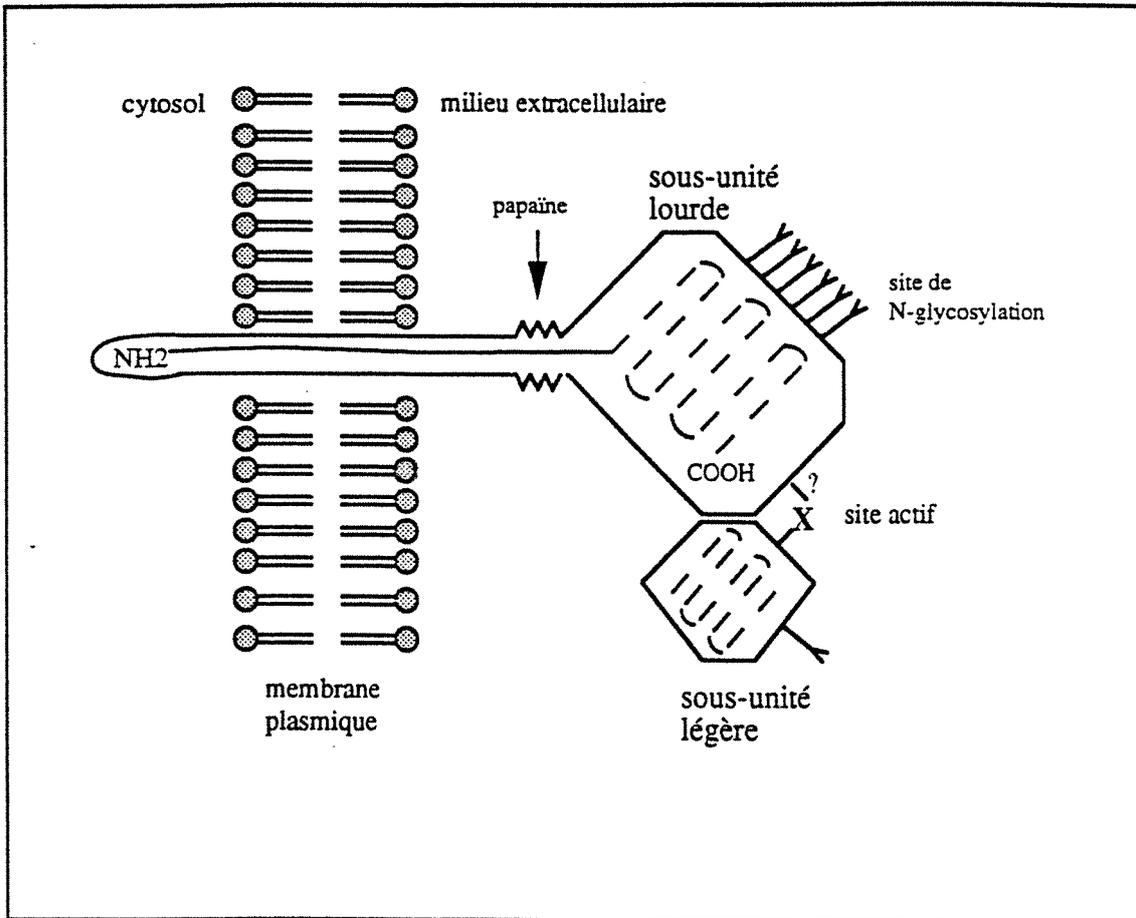


Figure 17: représentation schématique de la GGT (d'après TATE ET MEISTER, 1981); X représente le site actif: sa localisation sur la chaîne lourde est récente (STOLE ET MEISTER, 1991). La flèche indique le clivage éventuel par la papaïne.

La GGT est un hétérodimère glycosylé composé d'une sous-unité légère et d'une sous-unité lourde; cette dernière permet l'ancrage de l'enzyme dans la membrane par son extrémité amino terminale composée approximativement de 40 acides aminés hydrophobes (MATSUDA et al, 1983). Les deux sous-unités ne sont pas liées de façon covalente et sont synthétisées à partir d'un ARN messenger unique. Le site catalytique de la GGT avait été localisé dans un premier temps sur la sous unité légère (TATE ET MEISTER, 1977), mais plus récemment un second site a été identifié sur la sous unité lourde (STOLE ET MEISTER, 1991). Suivant le tissu d'origine, les différences de masses moléculaires sont probablement dues à des différences de glycosylation. La figure 17 schématise la GGT humaine et son ancrage dans la membrane plasmique.

### **C.111. SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES ET ACTIVITE DE TRANSCRIPTION**

Plusieurs cDNA humains provenant de différents tissus ont été jusqu'à présent isolés:

- le cDNA de la GGT placentaire humaine: de taille de 2,6 kb correspondant à 669 nucléotides (RAJPERT-DE MEYTS, 1988).
- le cDNA de foie fœtal humain
- le cDNA de l'hépatome humain HepG2: de taille de 2326 pb (GOODSPEED et al, 1989)

La séquence ouverte de lecture de ces cDNA humains serait de 1707 nucléotides codant pour 569 acides aminés (61,4 kDa de masse moléculaire théorique). Le clivage du précurseur libère deux sous unités dont la structure primaire serait la suivante:

- une sous unité lourde de 380 acides aminés (41,65 kDa)
- une sous unité légère de 189 acides aminés (19,75 kDa).

7 sites de N glycosylation ont été repérés: 6 sur la sous unité lourde et une sur la sous unité légère. De fortes homologues existent entre GGT humaine et GGT de rat; les différences résident dans la séquence d'acides aminés qui est supérieure d'un acide aminé pour la GGT humaine, et une différence d'acides aminés entre les résidus 81 et 135 due à un changement de séquence ouverte de lecture. De plus, la GGT humaine contient des nucléotides supplémentaires en position 898 et 1075.

Selon l'origine tissulaire, les ARN messagers ont des tailles variables. La taille de l'ARN messenger a été estimée à 2,2 Kb dans le foie fœtal humain (LAPERCHÉ et al, 1986). Sa taille dans le foie humain et dans les hépatomes Hep G2 (> à 2,3 kb) est légèrement inférieure à celui issu du rein (GOODSPEED et al, 1989). Un ARN messenger unique de 2,5 kb a été détecté dans des cellules V79 exprimant la GGT humaine (par expression du cDNA de l'hépatome Hep G2).

Les différences de taille peuvent être attribuées en partie aux différences de longueur des régions 5' non codantes.

#### **C.IV. TRADUCTION ET MATURATION DE LA GGT HUMAINE**

D'après les résultats concernant la structure primaire des GGT humaines, il apparaît que les modifications de la nature et du degré de glycosylation déterminent les différentes formes de l'enzyme. La GGT est synthétisée sous la forme d'un précurseur qui sera clivé en deux sous unités; la localisation exacte sub-cellulaire de l'étape de clivage est encore très controversée; elle n'a pour l'instant été étudiée que chez le rat. D'après certaines études (MATSUDA et al, 1983), le précurseur de la GGT de rat est clivé au niveau de la membrane plasmique. Par contre, d'après CAPRARO ET HUGHEY (1983), deux sites sub-cellulaires sont concernés: un des sites serait localisé au niveau du réticulum endoplasmique; la fraction non clivée traverserait le golgi et serait protéolysée avant d'atteindre la membrane plasmique. Un clivage progressif qui serait achevé au niveau de la membrane plasmique est, d'après ces auteurs, plausible.

Concernant des GGT de lignées cellulaires humaines, des auteurs ont montré que la lignée d'hépatome HepG2 synthétisait un précurseur unique glycosylé de 120 kDa; le clivage protéolytique n'ayant pas lieu, dû à l'absence de la protéase concernée (TATE ET GALBRAITH, 1987). Des études sur la GGT recombinante exprimée par des cellules V79 (VISVIKIS et al, 1991) ont montré une hétérogénéité de la glycosylation. Le traitement de la GGT purifiée par la neuraminidase a montré la présence de résidus acide sialique sur les chaînes carbonées de l'enzyme recombinante. Il a également été décrit que les isoformes de cette enzyme humaine recombinante comparées à celles du rein diffèrent uniquement par le degré de maturation variable des chaînes glycosidiques. L'ensemble des chaînes d'oligosaccharides greffées sur cette enzyme recombinante est de nature N-glycosidique.

La structure de différentes chaînes glycosidiques d'enzymes humaines a été étudiée et a montré, dans le cas de l'enzyme rénale que seuls 4 à 5 sites de glycosylation apparaissaient occupés (YAMASHITA et al, 1986).

## **C.V. ACTIVITES CATALYTIQUES ET FONCTION DE LA GGT.**

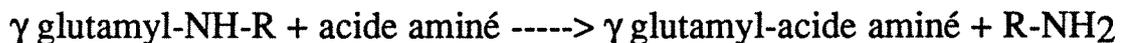
### **C.V.1 Les activités catalytiques de la GGT.**

Les activités catalytiques de la GGT peuvent être classées en trois catégories:

- la réaction de transfert
- l'autotranspeptidation
- l'hydrolyse.

#### **C.V.1.1. la réaction de transfert.**

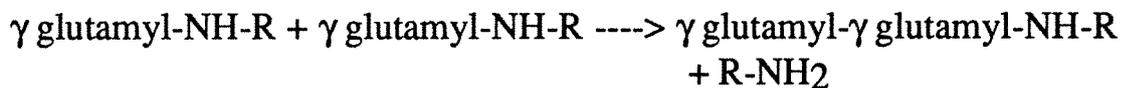
Cette activité implique le transfert d'un résidu  $\gamma$  glutamyl d'un composé  $\gamma$  glutamylé sur un acide aminé ou sur un peptide selon la réaction:



Cette réaction est également appelée transpeptidation; dans beaucoup de systèmes biologiques, le donneur du groupement  $\gamma$  glutamyl est le glutathion.

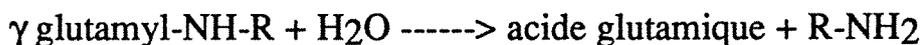
#### **C.V.1.2 . l'autotranspeptidation.**

Dans ce cas, le résidu  $\gamma$  glutamyl est transféré d'une molécule substrat sur une autre molécule du même substrat pour former un  $\gamma$  glutamyl- $\gamma$  glutamyl-peptide selon la réaction:



#### **C.V.1.3 L'hydrolyse.**

Dans ce dernier cas, le résidu  $\gamma$  glutamyl est transféré sur une molécule d'eau avec libération d'une molécule d'acide glutamique libre selon la réaction:



### **C.V.2 Mécanisme enzymatique.**

La réaction enzymatique suit un mécanisme cinétique de type "Ping Pong Bi Bi" en deux temps: il y a d'abord formation d'un intermédiaire  $\gamma$  glutamyl-enzyme, le substrat accepteur pourra alors se fixer sur cette enzyme activée pour donner un groupement  $\gamma$  glutamyl-accepteur avec libération de l'enzyme (TATE ET MEISTER, 1974); lorsque le substrat est présent en faible quantité, une molécule d'eau peut provoquer une hydrolyse

### **C.V.3. Les fonctions de la GGT.**

La GGT joue un rôle important dans le cycle  $\gamma$  glutamyl (figure 18) qui est la voie de synthèse et de dégradation du glutathion. Le premier rôle attribué à la GGT est le transport transmembranaire d'acides aminés et de peptides. En effet, des acides aminés  $\gamma$ -glutamylés sont formés au niveau de la membrane cellulaire par interaction de la GGT, du glutathion et des acides aminés extracellulaires. La GGT est également impliquée dans les réactions de dégradation et d'utilisation du glutathion (CURTOYS ET HUGHEY, 1979). La GGT clive le groupement  $\gamma$ -glutamyl du glutathion; le dipeptide cystéinyl-glycine formé sera ultérieurement clivé par une peptidase; les acides aminés ainsi libérés pourront éventuellement reformer du glutathion.

La GGT intervient dans l'excretion de composés exogènes et a ainsi un rôle de détoxification de nombreux xénobiotiques avec formation d'acides mercapturiques (MEISTER, 1988). La première étape consiste en la réaction du composé exogène avec le groupement S-H du glutathion. Cette réaction est catalysée par la glutathion-S-transférase et mène à la formation d'un conjugué du glutathion. La coupure du groupement  $\gamma$ -glutamyl du glutathion par la GGT est l'étape suivante de la dégradation de ces composés. D'autres étapes permettront la formation d'acides mercapturiques qui seront éliminés de l'organisme. Des réactions du même type peuvent concerner des composés endogènes; par exemple, le leucotriène D<sub>4</sub> provient de la réaction entre leucotriène A<sub>4</sub> et glutathion pour donner un leucotriène C<sub>4</sub>. La GGT intervient en clivant le groupement  $\gamma$ -glutamyl du leucotriène C<sub>4</sub> pour former le leucotriène D<sub>4</sub> (ANDERSON et al, 1982)

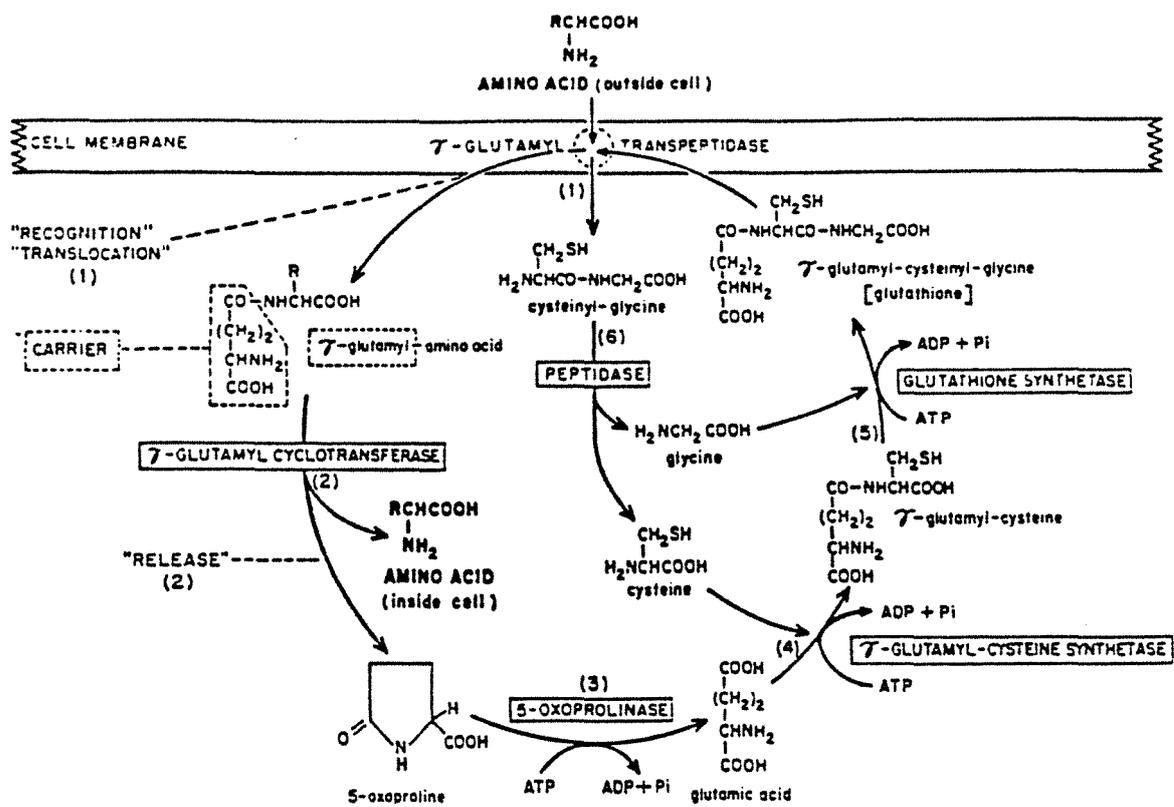


Figure 18: cycle  $\gamma$ -glutamyl pour la synthèse du glutathion et le transport d'acides aminés dans la cellule (MEISTER, 1973)

## C.VI. INTERET DE LA PRODUCTION DE LA GGT PAR CULTURE DE CELLULES ANIMALES RECOMBINANTES.

La purification de la GGT s'effectuait jusqu'à présent à partir d'organes de porcs (rein) afin de constituer un matériel de référence qui permettent de comparer les résultats d'analyses entre les différents laboratoires biologiques. Un programme européen, émanant du Bureau Communautaire de Références a pour objectif de réaliser un lot de référence d'origine humaine. La purification de la GGT humaine à partir d'organes pose des problèmes non seulement d'approvisionnement et de contamination virale mais également d'ordre éthique. Le Centre du Médicament (Nancy) a dans un premier temps, décider d'exprimer cette enzyme (à partir du cDNA de la GGT d'hépatome humain) dans une cellule procaryote (*Escherichia coli*); la protéine recombinante exprimée correspond au précurseur non glycosylé (61 kDa) et l'activité spécifique mesurée est faible (de l'ordre de 60 mU / mg de protéines) (ANGELE et al, 1991).

Des travaux similaires réalisés chez *Saccharomyces cerevisiae* (avec le cDNA de la GGT de rein de rat) a permis l'obtention de deux sous unités apparemment glycosylées (55 et 30 kDa) avec une activité spécifique de 250 mU / mg de protéines. Cette augmentation de l'activité spécifique est vraisemblablement liée à la glycosylation effectuée par la levure.

Afin de se rapprocher de l'enzyme sérique humaine, l'expression de la GGT (à partir du cDNA de la GGT d'hépatome humain) a alors été envisagée dans des cellules de mammifères (V79, cellules de poumon de hamster chinois). La protéine exprimée s'avère posséder une activité spécifique élevée de l'ordre de 2 U / mg de protéines et est constituée de deux sous unités glycosylées (VISVIKIS et al, 1991). L'enzyme recombinante a été purifiée à partir de cellules cultivées en flacons statiques et a servi à la préparation d'un lot de référence. Ces résultats montrent l'intérêt de la production de cette enzyme par culture de cellules animales et nos travaux abordent la production de cette enzyme membranaire par culture en masse d'une cellule animale CHO recombinante.



## **MATERIELS ET METHODES**

## MATERIELS ET METHODES

<b>A Génie génétique</b> .....	62
A.I ADNc, plasmides, vecteurs d'expression et souches utilisées. ....	62
A.II Technique de sous-clonage.....	68
A.III Transfection.....	74
A.IV Sélection.....	76
A.V Détermination du taux de transfection.....	77
A.VI Stabilité.....	77
<b>B Culture cellulaire</b> .....	77
B.I Lignée cellulaire .....	78
B.II Milieux de culture .....	80
B.III Les microporteurs .....	83
B.IV Les agrégats.....	83
B.V Adaptation à la culture en suspension.....	86
B.VI Les systèmes de culture.....	86
B.VII Dosages des différents composants du milieu. ....	91
B.VIII Exploitation cinétique des résultats.....	95
<b>C Caractérisation et pré-purification de protéines recombinantes</b> .....	101
C.I Electrophorèse des protéines.....	101
C.II Electrotransfert en milieu semi-sec .....	102
C.III Western blot.....	103
C.IV Isoélectrofocalisation.....	104
C.V Détermination des constantes catalytiques.....	104
C.VI Solubilisation des protéines. ....	105
C.VII Prépurification par chromatographie échangeuse d'anions.....	106

## MATERIELS ET METHODES

Les principales méthodes utilisées durant ce travail sont développées en détail dans ce chapitre. Dans une première partie seront présentés les protocoles spécifiques au génie génétique (sous-clonage, transfection, sélection, criblage) pour l'obtention d'une souche recombinante; les étapes de culture cellulaire seront décrites dans une seconde partie. La dernière partie explicitera des techniques de purification et de caractérisation de protéine.

### A GENIE GENETIQUE

Les différentes étapes nécessaires pour obtenir un vecteur d'expression eucaryotique recombinant sont schématisées sur la figure 19; les étapes successives de transfection, de sélection et d'étude de l'expression sont décrites figure 20. Les chiffres entre parenthèses renvoient au texte, à l'étape correspondante.

#### A.1 ADN, plasmides, vecteurs d'expression et souches utilisées.

\* Description du cDNA hepG2-GGT (GOODSPEED et al,1989)

Ce cDNA a été fourni par le Pr Siest (Centre du médicament , NANCY). Cet insert purifié de 2326 pb a été sous-cloné dans le plasmide pUC19 (pUC19-HGGT) et une cartographie partielle des sites de restriction a été réalisée (figure 21). Sa séquence nucléotidique complète a été déterminée, ainsi que par déduction sa séquence d'acides aminés.

Ce cDNA comprend une partie codante de 1707 pb (correspondant à 569 acides aminés), une partie 5' non codante de 487 pb et une partie 3' non codante de 132 pb comportant le signal AATAAA de polyadénylation .

\* Description des plasmides et vecteurs d'expression eucaryotiques.

# pUC19 : ce plasmide fait partie de la classe des plasmides pUC développés par MESSING (1983) et a pour caractéristique principale de posséder un segment d'ADN de E.Coli correspondant aux séquences de régulation et l'information codant pour les 146 premiers acides aminés de la  $\beta$  galactosidase (lac Z); ce type de plasmide, utilisé avec des cellules hôtes codant pour la partie carboxy-terminale de la  $\beta$  galactosidase, assure l' $\alpha$  complémentation. Cette particularité facilite le sous-clonage, en permettant l'identification des clones recombinants.

C'est dans ce plasmide que le cDNA hepG2-GGT a été sous-cloné (don du Pr Siest, Centre du médicament).

# **pMAMnéo** (Clontech): ce vecteur d'expression eucaryotique de 8,3 Kb (figure 22a), conçu pour l'expression de gènes eucaryotiques dans des cellules COS, CHO et fibroblastes de souris, possède les caractéristiques suivantes:

- un "enhancer" RSV-LTR lié au promoteur inductible (par le dexaméthasone) MMTV-LTR; cette construction permet d'obtenir un taux d'expression important et contrôlable en présence de dexaméthasone.

- l'origine de répllication de SV40 pour permettre la propagation du vecteur dans les cellules COS;

- les signaux d'épissage et de polyadénylation de SV40 nécessaires à la maturation de l'ARNm chez les cellules animales;

- le gène *neo* de *E.Coli*, précédé du promoteur tardif du SV40, pour la sélection des cellules transfectées en présence de l'antibiotique G418.

C'est pour cette dernière caractéristique que nous avons utilisé ce vecteur en cotransfection avec un second vecteur d'expression eucaryotique.

# **pcDNAI** (Invitrogen): ce vecteur multifonctionnel (figure 22b) a été développé par Invitrogen pour l'expression de cDNA dans des systèmes eucaryotiques et l'analyse de cDNA chez les procaryotes; ce vecteur de 4,2 kb possède le promoteur, "l'enhancer", les signaux d'épissage et de polyadénylation de cytomégalo virus (CMV), l'origine de répllication de SV40 et du virus Polyoma, une origine M13 pour obtenir des simples brins d'ADN pour la détermination de la séquence nucléotidique et la mutagénèse et les promoteurs SP6 et T7 pour la production de transcrits *in vitro* sens et antisens.

C'est dans ce vecteur que sera sous-cloné le cDNA de la GGT humaine sous contrôle du promoteur CMV (BOSHART et al,1985).

\* souches utilisées

# ***E.Coli* HB101** : c'est une souche largement utilisée pour la propagation et l'amplification de plasmides. C'est un hybride *E.Coli* K12 \* *E.Coli* B qui est facilement transformable. Son génotype est le suivant:

SupE44 hsdS20(rb<sup>-</sup>, mb<sup>-</sup>) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rps L20 xyl-5 mtl-1.

# ***E.Coli* MC1061/ P3** (Genofit): cette souche présente le génotype suivant:

Ara Δ139, Δ (ara, leu) 7696, galU, galK, Δ lac Y74, hsr<sup>-</sup>, hsr<sup>m+</sup>, strA

{P3= amber amp<sup>R</sup>, amber tet<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>}

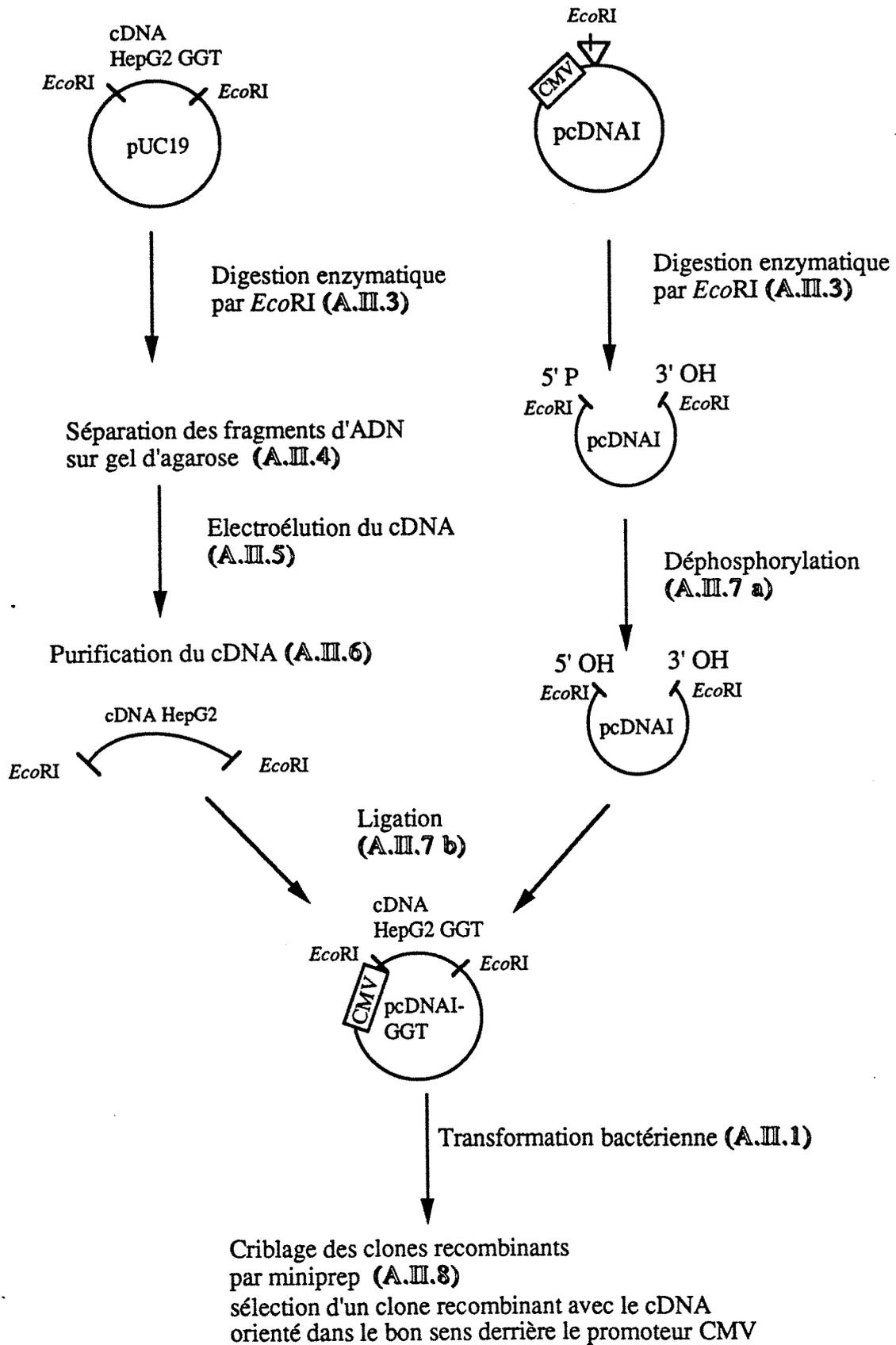


Figure 19: représentation schématique des différentes étapes pour l'obtention d'un vecteur d'expression eucaryotique recombinant

Linéarisation des vecteurs  
par enzyme de restriction  
**(A.III.3)**

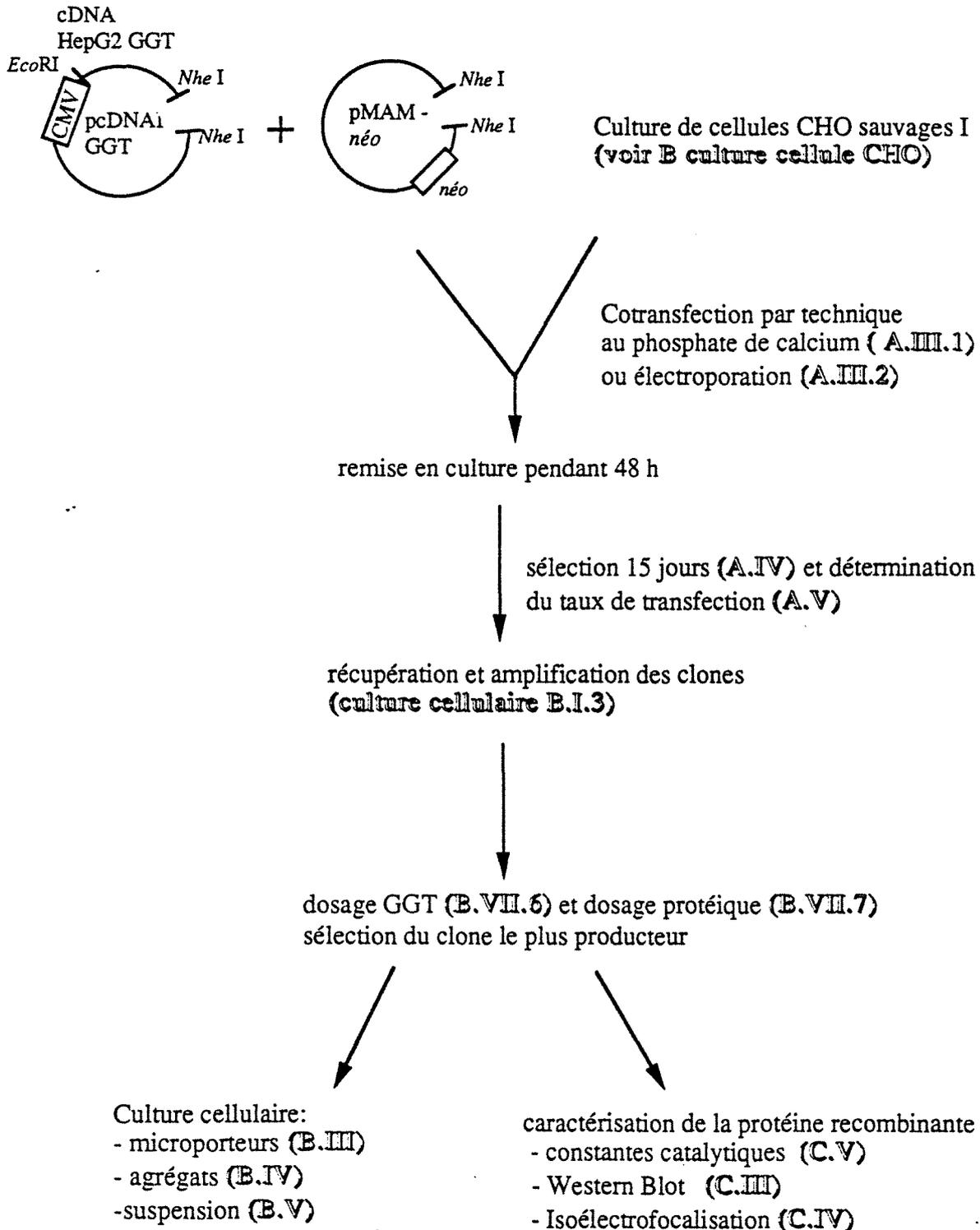


Figure 20: représentation schématique des différentes étapes pour l'obtention d'une cellule animale recombinante

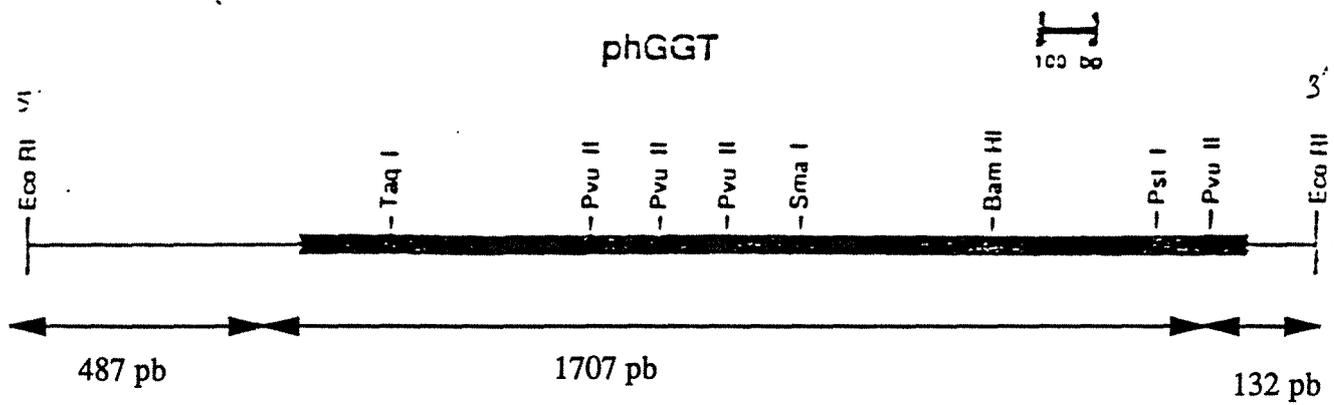
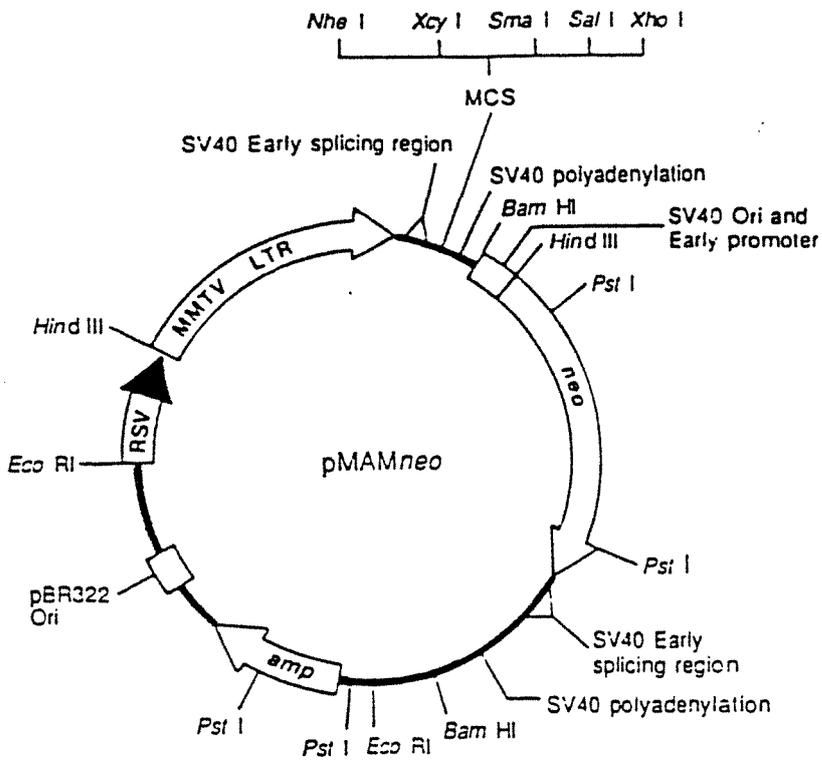
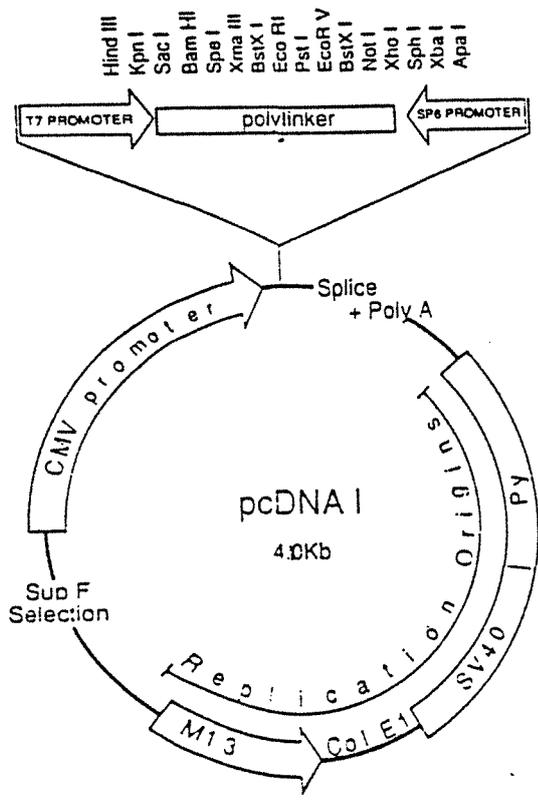


Figure 21: carte de restriction partielle du cDNA HepG2-GGT (GOODSPEED et al, 1989). Le trait gras représente la région codante pour la GGT; les traits fins aux régions 5' et 3' non codantes. Les sites de restriction ont été localisés par digestion par des enzymes de restriction appropriées.



a



b

Figure 22: cartes de deux vecteurs d'expression eucaryotique: (a) pMAMneo; (b) pcDNA1

# **cellules CHO-K1**(Chinese Hamster Ovary) (laboratoire Flow): ces cellules d'ovaires de hamster chinois ont été obtenues à partir d'un hamster chinois adulte (PUCK, 1958). Le sous clone K1 est le plus utilisé; il est auxotrophe pour la proline en raison d'une déficience génétique dans la conversion de l'acide glutamique en glutamique semi-aldéhyde.

## ***A.11 Technique de sous-clonage***

### **A.11.1 transformation de souches bactériennes.**

Des cellules bactériennes en croissance exponentielle sont rendues perméables vis-à-vis de l'ADN par incubation dans du chlorure de calcium: elles sont alors dites compétentes. Un bref choc thermique facilite la pénétration de l'ADN. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu sélectif.

\* Préparation de cellules compétentes par la méthode au chlorure de calcium.

#### ***REACTIFS***

-solution CaCl<sub>2</sub> 50mM stérile.  
-milieu LB (Luria Broth); peptone 10 g/l, extrait de levure 5g/l, NaCl 5g/l. Le pH est ajusté à 7,4 avec NaOH 1N. Le milieu est stérilisé pendant 20 min à 1 bar.

#### ***METHODE***

10 ml de milieu LB sontensemencés avec une colonie bactérienne et incubés à 37°C une nuit sous agitation. Cette préculture sert à inoculer 100 ml de milieu LB à raison de 1/100. La culture est agitée à 37°C pendant 2h30 à 3h de façon à obtenir une absorbance de 0,5 à 600nm; Les cellules refroidies dans la glace pendant 10 min sont centrifugées à 3000g et à 4°C . Le culot cellulaire est resuspendu dans 10 ml de la solution de CaCl<sub>2</sub>. L'homogénéisation doit être douce, les cellules compétentes étant fragilisées. Après une incubation de 20 min dans la glace, les cellules sont centrifugées comme précédemment. Le culot cellulaire est repris dans 2 ml de la même solution de CaCl<sub>2</sub> et conservé à 4°C. Ces cellules peuvent être utilisées après 30 min et dans un délai de deux jours.

\* transformation de cellules compétentes

### *REACTIFS*

- milieu LB
- milieu LB agar sélectif: bacto-tryptone 10g/l, extrait de levure 5g/l, NaCl 5g/l, bactoagar 15g/l. Le pH est ajusté à 7,5 avec NaOH 1N. Le milieu est stérilisé. Il est coulé dans les boîtes de Pétri quand il est refroidi à 50°C, après avoir ajouté 100 µg/ml d'ampicilline pour la sélection.

### *METHODE*

100 µl de cellules compétentes sont mélangés avec 20 à 50 ng de plasmide. Ce mélange est placé dans la glace durant 30 min. Un choc thermique est réalisé en plaçant les cellules à 42°C dans un bain marie pendant 3 min puis aussitôt refroidies dans la glace. Après addition de 0,5 ml de milieu LB, ces dernières sont incubées à 37°C pendant 1 heure puis étalées sur milieu LB agar sélectif et replacées une nuit à 37°C; seules les cellules transformées par le plasmide se développeront sur ces boîtes.

#### A.11.2 Préparation d'ADN plasmidique par la technique du lysat clair.

Cette méthode a été adaptée à partir des techniques de GOBSON et VAPNEK (1973).

### *REACTIFS*

- milieu LB sélectif
- solution de lysozyme: 100mg/ml dans une solution Tris-HCl 25mM, pH 8
- Tampon A: Saccharose 25%, EDTA 5mM, Tris-HCl 50mM (pH 8)
- EDTA: 0,5mM pH 8,5
- Tampon B: Triton X100 0,2%; EDTA 50mM; Tris-HCl 50mM (pH 8)
- NaCl 5M
- Polyéthylène-glycol (PEG) à 40% dans Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1 mM
- Bromure d'éthidium (BEt) 10mg/ml dans H<sub>2</sub>O
- TE: Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8
- Chlorure de césium

### *METHODE*

Une colonie bactérienne est ensemencée dans du LB sélectif et incubée à 37°C pendant une nuit. Cette préculture sert à préparer une culture de 500ml qui est incubée durant une nuit à 37°C. Les cellules sont centrifugées pendant 10 min à 3000g et à 4°C. Le culot cellulaire est

repris dans 15ml de tampon A puis recentrifugé comme précédemment. Le culot est de nouveau resuspendu dans 10 ml de tampon A froid auquel on ajoute 2,5ml de la solution de lysozyme. Après agitation de 8 min dans la glace, sont ajoutés 5ml de la solution d'EDTA et 15ml du tampon B. Le mélange est placé 1h dans la glace puis 15min à 45°C. Une centrifugation est alors réalisée à 20000 rpm pendant 1h et à 4°C dans un rotor Ti50 (Beckman). Le surnageant est prélevé et l'ADN est précipité en ajoutant 1/4 de volume de NaCl 5M et 1/3 de volume de la solution de PEG. Après une incubation d'1h à 0°C, le mélange est centrifugé 30 min à 3000 g et à 4°C. Le culot est repris dans 8 ml de TE contenant 8 g de chlorure de césium. Une solution de bromure d'éthidium à 10 mg/ml est ajoutée à raison de 80 µg/ml de solution d'ADN. Après avoir réparti le mélange en tubes à scellage rapide (Quick Seal, Nalgène), une centrifugation est réalisée dans un rotor vertical Ti65 (Beckman) pendant 7h, à 60000 rpm et à 20°C.

Les bandes d'ADN, plasmidique et chromosomique sont visualisées par fluorescence (ultra- violet, 366nm) du bromure d'éthidium intercallé entre les bases de l'ADN. La bande inférieure représentant l'ADN plasmidique est prélevée à l'aide d'une seringue. Le bromure d'éthidium est extrait à l'isopropanol puis la solution d'ADN plasmidique est diluée avec 4 volumes d'eau. La solution est alors précipitée avec 2 volumes d'éthanol après avoir ajouté 1/10<sup>ème</sup> de volume d'acétate de sodium. Après cette précipitation de 2h à -20°C et après une centrifugation à 10000 g pendant 15 min et à 4°C, le culot obtenu est séché et resuspendu dans du TE et conservé à -20°C.

La solution d'ADN peut être quantifiée par la mesure de son absorbance à 260 nm; une unité d'absorbance correspondant à 50 µg d'ADN /ml.

### ***A.11.3 Digestion enzymatique de l'ADN par des enzymes de restriction.***

Une unité enzymatique correspond à la quantité nécessaire d'enzyme de restriction pour digérer 1 µg du bactériophage lambda en 1 h dans le tampon et à la température appropriés.

Par exemple, pour un volume final de 10 µl, on peut mélanger:

- 1 µl du tampon approprié (10x)
- 1 µl d'ADN (0,1-5µg)
- 1 µl d'enzyme de restriction (0,2-10 unités)
- 7 µl d'eau.

### **A.11.4 Séparation électrophorétique des fragments d'ADN sur gel d'agarose.**

L'électrophorèse horizontale en gel d'agarose est couramment utilisée pour séparer et purifier des fragments d'ADN. La concentration d'agarose la plus fréquemment utilisée est de

0,8% (p/v); elle permet de distinguer des fragments d'ADN de taille compris entre 800 pb et 10000 pb. La migration dépend de la conformation des acides nucléiques, des caractéristiques du gel et des conditions d'électrophorèse.

#### *REACTIFS*

- tampon TBE 10X concentré: Tris-base 1M; acide borique 1M; EDTA 20mM.
- Agarose.
- Bromure d'éthidium (BrEt) à 10 mg/l.
- solution de dépôt: glycérol 50% (p/v); EDTA 50mM; bleu de bromophénol 0,1% (p/v).

#### *METHODE*

L'agarose est dissous dans le tampon TBE (1X) par chauffage jusqu'à ébullition puis refroidi. Après addition de 0,5 µg/ml de BrEt, le gel est coulé sur une plaque horizontale et des petits puits sont formés en positionnant un peigne. L'échantillon d'ADN, mélangé à 1/10<sup>ème</sup> de volume de solution de dépôt, est déposé dans un puit. Un standard avec des marqueurs de taille connue est également déposé, correspondant à un hydrolysate du bactériophage λ coupé par Hind III (les tailles des fragments sont: 23,1 kb; 9,4 kb; 6,5 kb; 4,3 kb; 2,3 kb; 2,1 kb; 0,5 kb; 0,1 kb). Une tension de 1 à 5 V/cm est appliquée entre les électrodes pendant 2 à 10 heures. Les acides nucléiques sont visualisés sous lumière UV.

#### *2.11.5 Electroélution des fragments d'ADN.*

#### *REACTIFS*

- Tampon Tris-acétate-EDTA (TAE) : 40mM Tris; 20 mM acétate de sodium; 1mM EDTA; pH 8)

#### *METHODE*

La bande de gel correspondant à l'ADN d'intérêt est découpée sous UV et est placée dans un boudin de dialyse avec du tampon TAE (1X). Ce sac, fermé par des pinces, est placé dans une cuve d'électrophorèse en position perpendiculaire par rapport au champ électrique. L'électroélution a lieu pendant 1 heure environ à 4 - 5 V/cm, permettant à l'ADN de migrer hors du gel jusque sur la paroi du boudin de dialyse. Une inversion de polarité du courant pendant 1 min permet de décoller l'ADN de la paroi et de le mettre en suspension dans le tampon. Le boudin est alors ouvert et l'ADN est récupéré à l'aide d'une pipette pasteur; le boudin de dialyse

est lavé avec une petite quantité de tampon TAE (1X) pour récupérer la totalité de l'ADN. L'ADN sera alors purifié.

#### A.11.6 Purification d'acides nucléiques.

Afin de purifier l'ADN et d'éliminer les protéines, notamment les enzymes employées lors d'une étape de sous-clonage, une extraction phénolique suivie d'une extraction au chloroforme et d'une précipitation alcoolique est réalisée.

##### *REACTIFS*

- TE (Tris-EDTA): Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM; pH 7,4
- Phénol saturé en tampon TE pH 7,8.
- chloroforme
- acétate de sodium 3M
- éthanol.

##### *METHODES*

Les acides nucléiques en solution sont mélangés à volume égal avec du phénol saturé jusqu'à obtention d'une émulsion. Après centrifugation de 30 s à 12000 g et à température ambiante, la phase aqueuse est prélevée et extraite au chloroforme comme précédemment. L'ADN est ensuite concentré par précipitation en présence d' 1/10<sup>ème</sup> de volume d'acétate de sodium et de 3 volumes d'éthanol. Après deux heures à -20°C, une centrifugation à 12000 g est réalisée et le culot d'acides nucléiques est séché à l'air et repris dans un volume adéquat de TE.

#### A.11.7 Ligation

Cette étape consiste à liguer le plasmide préalablement linéarisé et déphosphorylé au cDNA purifié comme indiqué précédemment.

La ligation est réalisée grâce à la ligase du bactériophage T4, qui en présence d'ATP, catalyse la formation de liaisons phosphodiester entre les groupements phosphate en 5' et hydroxyl en 3' de l'ADN.

##### **A.II.7.a Déphosphorylation du vecteur.**

##### *REACTIFS*

- Phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIP)
- Tampon de déphosphorylation (10X): Tris-HCl 0,5M, pH9; MgCl<sub>2</sub> 10mM; ZnCl<sub>2</sub> 1mM; spermidine 10mM.
- EDTA 0,5M; TE pH 8.

- Phénol, chloroforme, acétate de sodium 3M, éthanol

### *METHODE*

La quantité de phosphatase alcaline nécessaire est de 1 unité pour 100 pmoles de phosphate 5' terminal libre en présence du tampon de déphosphorylation 1X. Par exemple, pour un volume final de 50 µl, on additionne 4 µl d'ADN en solution, 5 µl de tampon de déphosphorylation, 1 µl de phosphatase alcaline (1U/µl) et 40 µl d'eau. Les conditions d'incubation sont de 30 min à 37°C. La réaction est arrêtée en ajoutant 1 µl d'EDTA et 100 µl de TE, puis en incubant 10 min à 68°C pour inactiver l'enzyme. L'ADN est ensuite purifié par extraction phénolique et précipitation à l'éthanol après ajout de 15 µl d'acétate de sodium.

#### **A.II.7.b Ligation du vecteur et de l'insert.**

### *REACTIFS*

- Tampon de ligation 10X: Tris-HCl 200mM pH 7,6; ;MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- ATP 10mM
- DTT 50mM
- T4 ADN ligase

### *METHODE*

La ligation entre l'insert purifié et le vecteur linéarisé se fait avec un rapport molaire de 1:3. Le mélange de ligation est le suivant:

- environ 20 ng de vecteur
- quantité adéquate de cDNA
- 1 µl d'ATP 10mM
- 1 µl de DTT 50mM
- 1 µl de tampon de ligation 10X
- 1 µl de T4 ADN ligase (1 U)
- H<sub>2</sub>O qsp 10 µl

Ce mélange est incubé une nuit à 15°C et sert ensuite à transformer directement des cellules compétentes (voir A.II.1).

La sélection des clones est réalisée par une préparation rapide de plasmides appelée minipréparation d'ADN.

### A.II.8 Minipréparation d'ADN.

La technique la plus simple pour préparer de petites quantités d'ADN est la méthode alcaline de BIRNBOIM et DOLY (1979). Elle consiste à lyser les cellules par lysozyme puis ajout de SDS à pH élevé, puis à neutraliser en présence d'acétate de potassium. L'ADN plasmidique se renature alors que l'ADN chromosomique reste dénaturé et précipitera dans un complexe protéines-SDS-ADN.

#### *REACTIFS*

- solution A: glucose 50mM; Tris-HCl (pH 8) 25mM; EDTA 10mM.
- lysozyme 8mg/ml dans la solution A.
- NaOH 0,2M ; SDS 1%
- acétate de potassium 3M (pH 4,8 avec de l'acide acétique glacial)
- RNase pancréatique 20µg/ml
- tampon TE
- acétate de sodium 3M
- phénol, chloroforme

#### *METHODE*

Une colonie bactérienne contenant le plasmide d'intérêt sert à ensemercer une petite culture de 3 ml dans du milieu LB en présence de la sélection appropriée pendant une nuit à 37°C. Les cellules correspondant à 1,5 ml de la culture sont récupérées par centrifugation à 2000 g et resuspendues dans 100 µl de la solution A et 12 µl de la solution de lysozyme. Après incubation 5 min à température ambiante est ajoutée 200 µl d'une solution 0,2M et SDS 1%, l'ensemble est placée 10 min dans la glace. Après ajout de 150 µl de la solution d'acétate de sodium, et incubation 10 min dans la glace, un précipité se forme. Une centrifugation à 12000 g à 4°C pendant 15 min permet de récupérer en solution l'ADN plasmidique. L'élimination des protéines est obtenue par une extraction phénolique suivie d'une extraction chloroformique et d'une précipitation à l'éthanol comme décrit au A.II.6. Le précipité est repris dans du tampon TE contenant 20 µg/ml de RNase.

## **A.111 Transfection.**

Deux techniques de transfection sont décrites: la technique classique au phosphate de calcium et l'électroporation.

Les vecteurs d'expression eucaryotiques sont au préalable linéarisés par *NheI*

### **A.111.1 transfection par la technique au phosphate de calcium.**

Le protocole utilisé pour la transfection par le phosphate de calcium a été adapté à partir des travaux de GRAHAM ET VAN DER ERB (1973).

On peut distinguer deux phases dans cette méthode:

- \* La précipitation de l'ADN en présence de cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et de phosphate.
- \* La mise en contact du précipité phosphate de calcium-ADN avec les cellules.

#### **REACTIFS**

- \* Tampon 2X HBS filtré (filtre 0,22  $\mu$ ): 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 10 mM KCl; 280 mM NaCl; 12 mM Glucose; 50 mM HEPES, pH 7)
- \*  $\text{CaCl}_2$  2M
- \* Tampon PBS (sans calcium ni magnésium)
- \* Milieu de culture: HAM'S F12 + 10% SVF + 2mM Glutamine

#### **METHODE**

Préparation du précipité  $\text{CaPO}_4$ -ADN.

Pour un volume final de 1ml, on place dans l'ordre:

- 18  $\mu\text{l}$  d'eau
- 20  $\mu\text{l}$  d'ADN (10-20  $\mu\text{g}$ )
- 62  $\mu\text{l}$  de la solution de chlorure de calcium
- 500  $\mu\text{l}$  du tampon 2X HBSP.

Après avoir homogénéisé délicatement le mélange, le précipité se forme en une demi-heure, donnant un aspect trouble au milieu.

Préparation des cellules et transfection.

Vingt heures avant la transfection, des cellules CHO en phase exponentielle de croissance sont trypsinées, centrifugées et sontensemencées dans des boîtes de culture de 25  $\text{cm}^2$  à raison de  $5 \cdot 10^5$  cellules par boîte. Le jour de la transfection, le milieu de culture est remplacé par du milieu frais et 4 heures plus tard, le précipité de phosphate de calcium-ADN est ajouté dans la

boîte de culture. Après une demi-heure d'incubation à 37°C, on peut visualiser au microscope les précipités autour des cellules (photo 1).

L'incubation est prolongée 4 h dans une étuve à 37°C. Le milieu est ensuite retiré et remplacé par du milieu frais. La sélection des cellules recombinantes débutera 48 h plus tard.

### 2.111.2 Transfection par électroporation.

La méthode employée est tirée des premiers travaux de NEUMAN (1982).

#### *APPAREILLAGE*

- électroporateur Apelex
- capacité de 35 à 222 nF
- de 1 à 15 impulsions
- voltage réglable de 500 à 5500 volts.
- distance entre les électrodes de 6 mm

#### *REACTIFS*

- Tampon PBS sans calcium, sans magnésium
- Milieu HAM'S F12 + 10% SVF

#### *METHODE*

Les cellules CHO sont cultivées dans du milieu de culture jusqu'à environ 75% de la confluence. Elles sont alors récoltées par trypsination, lavées dans du PBS et resuspendues dans du PBS à raison de  $1 \cdot 10^7$  cellules par ml.

1 ml de cette suspension cellulaire est déposée dans la cuvette d'électroporation et placée dans la glace pendant 10 min en présence du (ou des) vecteur(s) linéarisé(s) (10 à 20 µg de vecteur). Après cette incubation, les cellules sont électroporées puis replacées dans la glace pendant 10 min. Elles sont alors remises en culture dans le milieu habituel dans des boîtes de Pétri à raison de  $10^6$  cellules par boîte et replacées à 37°C pendant 48 h avant de commencer la sélection adéquate afin d'éliminer les cellules non recombinantes.

### *2.11 Sélection.*

#### *REACTIFS*

- Généticine (G 418)
- Tampon HEPES 100 mM (pH 7,4)

## **METHODE**

La quantité de G 418 nécessaire à la sélection sera déterminée au préalable par des expériences sur les cellules sauvages pour évaluer la concentration létale de G 418.

La sélection débute par l'addition dans le milieu de culture de la quantité appropriée d'une solution d'antibiotique préparée dans un tampon HEPES. Ce milieu sélectif est renouvelé tous les trois jours. Après une semaine de sélection, commencent à apparaître des petits clones de quelques cellules.

Après quinze jours de sélection, les colonies sont trypsinées individuellement à l'aide de petits cylindres de clonage. Elles sont repiquées dans des boîtes de culture à 96 puits, cultivées jusqu'à confluence avant d'être placées dans des plaques à 24 puits puis en boîtes de culture de 25 puis de 75 cm<sup>2</sup>. C'est au niveau des plaques à 24 puits qu'une première sélection de clones producteurs sera réalisée.

### **A.V Détermination du taux de transfection**

#### **REACTIFS**

- Colorant: bleu Giemsa
- Méthanol

#### **METHODE**

Après quinze jours de sélection, les clones sont fixés au méthanol pendant 5 min, puis colorés au bleu Giemsa. Ils sont alors dénombrés; le taux de transfection est obtenu par le rapport entre le nombre de clones obtenus et le nombre de cellules initialement soumis à la transfection.

### **A.VI Stabilité**

Afin de vérifier la stabilité du clone recombinant concernant la production de GGT, les cellules CHO-GGT sont cultivées et repiquées régulièrement durant plusieurs semaines. A chaque passage, un tapis cellulaire correspondant à une boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup> est récupéré à l'aide d'un grattoir approprié, les cellules sont lavées dans du PBS sans calcium et sans magnésium, afin d'éliminer toute trace du milieu de culture et resuspendues dans du PBS. Cette suspension cellulaire servira à réaliser un dosage de l'activité GGT et un dosage des protéines totales pour suivre l'évolution de la production de GGT en présence puis en absence de pression de sélection. A partir du 5<sup>ème</sup> passage, les cellules CHO-GGT seront cultivées en présence de G418 et en parallèle sans G418 dans le milieu de culture.

## **B Culture cellulaire**

### **B.1 Lignée cellulaire**

#### **B.1.1 Caractéristiques**

La lignée cellulaire utilisée au cours de ce travail, CHO-K1 (ATCC CCL 61), a été achetée aux Laboratoires Flow. CHO-K1 est une sous-lignée obtenue par PUCK et al (1958) à partir d'une lignée originale d'ovaires de hamster chinois. Cette sous-lignée est auxotrophe pour la proline et support-dépendante.

#### **B.1.2 Conservation des cellules**

##### **B.I.2.1 Congélation**

###### **REACTIFS**

- DMSO
- SVF
- milieu de culture : Ham F12

###### **METHODE**

Les cellules sont conservées dans de l'azote liquide, dans des cryotubes d'un volume d'un ml contenant de  $5.10^6$  à  $1.10^7$  cellules. Les cellules sont congelées dans une solution cryoprotectrice dont la composition finale est la suivante:

\* 20% DMSO (Diméthyl-sulfoxyde)

\* 80% SVF

0,5 ml de cette solution cryoprotectrice est ajouté à 0,5 ml de la suspension cellulaire. Les cellules sont congelées, soit en passant progressivement dans un congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  puis dans un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ , soit en utilisant un appareil Nicoool LM 10 (Produits oxygénés). Ce dernier permet un refroidissement progressif jusqu'à  $-11,5^{\circ}\text{C}$ ,  $-18^{\circ}\text{C}$ , et  $-61^{\circ}\text{C}$ , par évaporation d'azote liquide. Les cryotubes sont stockés dans l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ .

##### **B.I.2.2 Décongélation**

La décongélation est obtenue rapidement, en incubant le cryotube dans un bain marie à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 1 à 2 minutes jusqu'à décongélation complète. Les cellules sont alors récupérées et resuspendues dans 10 ml de milieu frais, puis centrifugées afin d'éliminer le DMSO qui est toxique pour les cellules. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du milieu et remises en

culture à raison de  $2 \cdot 10^5$  cellules par ml et placées dans une étuve à 37°C et à atmosphère régulée à 5% CO<sub>2</sub>.

### B.1.3 Propagation des cellules

#### *REACTIFS*

- solution de trypsine: 0,05 g/l trypsine; 0,02 g/L EDTA; 0,85 g/l NaCl
- milieu de culture: Ham F12 + 5% SVF
- PBS sans calcium ni magnésium

#### *METHODE*

Les cellules CHO étant adhérentes, la récolte est réalisée par protéolyse ménagée grâce à une solution de trypsine. Après rinçage du tapis cellulaire avec du PBS afin d'éliminer les protéines du milieu qui inhibent la protéolyse, la solution de trypsine est ajoutée. Après une incubation de quelques minutes à 37°C, le tapis cellulaire se disloque et l'action de la trypsine est stoppée par ajout de milieu neuf contenant du sérum. La suspension cellulaire est centrifugée à 800 RPM pendant 5 min. Le culot est alors resuspendu dans du milieu frais et les cellules réensemencées dans de nouveaux flacons de culture. Les cellules sont propagées dans des boîtes de culture de différentes tailles suivant les besoins (boîtes de 25, 75, 175 cm<sup>2</sup>, et bouteilles roulantes de 800 cm<sup>2</sup>). Ces boîtes sont placées dans des incubateurs régulés à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> (Jouan EG 1101R, Heraeus Cytoperm)

### B.1.4 Méthodes d'énumération

#### *REACTIFS*

- bleu trypan
- Solution de cristal violet: citrate de sodium 0,1M; cristal violet (0,1%, p/v)
- Trypsine EDTA
- PBS

#### *METHODE*

Les cellules sont dénombrées par observation microscopique à l'aide d'un hémacytomètre. Les échantillons sont dilués de manière à pouvoir compter de 30 à 150 cellules et un minimum de six comptages est effectué afin de limiter le risque d'erreur: la marge d'erreur reste comprise cependant entre 10 et 20% (NIELSEN et al, 1991)

#### B.I.4.1 Cellules en suspension

La viabilité des cellules est déterminée par coloration de la suspension cellulaire au bleu Trypan (10% final en volume). La membrane des cellules viables est imperméable au bleu

trypan alors que les cellules mortes laissent pénétrer le colorant et apparaissent bleu au microscope. Dans le cas de cellules CHO adaptées à la culture en suspension, un dénombrement des cellules totales est également effectué par la méthode de coloration des noyaux décrite ci-dessous.

#### **B.I.4.2 Cellules sur microporteurs ou agrégées**

Deux méthodes peuvent être utilisées pour détacher les cellules des microporteurs ou agrégées entre elles, afin de les énumérer:

**\* a: Méthode de coloration des noyaux:**

Cette méthode permet d'énumérer toutes les cellules adhérant à la surface des microporteurs ou agrégées, sans tenir compte de la viabilité. L'échantillon contenant les cellules et les microporteurs est décanté ou centrifugé dans le cas de cellules agrégées, le surnageant est éliminé et remplacé par la solution de cristal violet. Après une incubation d'une heure à 37°C, les cellules sont lysées et les noyaux colorés en violet peuvent être énumérés au microscope à l'aide d'un hémacytomètre.

**\* b: Méthode de détermination de la viabilité:**

Les cellules sur microporteurs ou agrégées sont rincées avec du PBS et incubées quelques minutes dans une solution de trypsine. La viabilité de la suspension cellulaire est alors déterminée par coloration au bleu Trypan comme décrit au B.I.4.1. Cette méthode étant drastique, une sous-estimation de la viabilité réelle est probablement obtenue. En pratique, pour les cellules agrégées, la viabilité est impossible à obtenir; en effet, ces dernières étant très fragiles, l'action de la trypsine entraîne une coloration de pratiquement toutes les cellules en présence de bleu Trypan.

## **B.11 Milieux de culture**

### **B.11.1 Composition du milieu de base.**

Deux milieux de base différents ont été utilisés pour cultiver les cellules CHO. Leur composition est donnée tableau XI.

Les cellules sont cultivées soit dans du milieu Ham'S F12, soit dans un mélange Ham F12 / DMEM (1/1). Ces milieux sont commercialisés soit, en liquide directement prêt à l'emploi, soit en poudre et reconstitués dans de l'eau ultra pure et tamponnés par du bicarbonate de sodium. Le pH est ajusté par de la soude 1N. Le milieu ainsi préparé est filtré sur une cartouche de 0,22µm de porosité (Millipore) et stocké dans des bouteilles stériles à 4°C.

Mélange Nutritif F-12 de Ham<sup>1</sup>

Composant	mg/L
<b>SELS INORGANIQUES:</b>	
CaCl <sub>2</sub> (anhyd.)	-
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	44.00
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0024
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.83
KCl	223.60
MgCl <sub>2</sub> (anhyd.)	-
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	122.00
NaCl	7599.00
NaHCO <sub>3</sub>	1176.00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhyd.)	142.00
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.86
<b>ALTRES COMPOSANTS:</b>	
D-Glucose	1802.00
Hypoxanthine	4.00
Hypoxanthine (sel sodique)	-
Acide Linoléique	0.084
Acide Lipoique	0.20
Rouge de Phénol	1.20
Putrescine 2HCl	0.161
Pyruvate de Sodium	110.00
Thymidine	0.70
<b>ACIDES AMINES:</b>	
L-Alanine	8.90
L-Arginine · HCl	211.00
L-Asparagine · H <sub>2</sub> O	-
L-Asparagine (base libre)	13.00
Acide L-Aspartique	13.30
L-Cystéine (anhyd.)	36.00
L-Cystéine HCl · H <sub>2</sub> O	-
Acide L-Glutamique	14.70
L-Glutamine	146.00
Glycine	7.50
L-Histidine · HCl · H <sub>2</sub> O	21.00
L-Isoleucine	4.00
L-Leucine	13.00
L-Lysine · HCl	36.50
L-Méthionine	4.50
L-Phénylalanine	5.00
L-Proline	34.50
L-Sérine	10.50
L-Thréonine	12.00
L-Tryptophane	2.00
L-Tyrosine	5.40
L-Tyrosine (sel disodique)	-
L-Valine	11.70
<b>VITAMINES:</b>	
Biotine	0.0073
Pantothénate de Calcium D	0.50
Chlorure de Choline	14.00
Acide Folique	1.30
i-Inositol	18.00
Niacinamide	0.036
Pyridoxine HCl	0.06
Riboflavine	0.037
Thiamine HCl	0.30
Vitamine B <sub>12</sub>	1.40

Milieu DMEM/F12(1:1)

Composant	mg/L
<b>SELS INORGANIQUES:</b>	
CaCl <sub>2</sub> (anhyd)	116.60
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0013
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	0.05
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.417
KCl	311.80
MgCl <sub>2</sub>	-
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	61.00
MgSO <sub>4</sub>	-
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	100.00
NaCl	6996.00
NaHCO <sub>3</sub>	1200.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	62.50
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	134.00
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.432
<b>ALTRES COMPOSANTS:</b>	
D-Glucose	3151.00
HEPES	3075.40
Hypoxanthine de Na	2.39
Acide Linoléique	0.042
Acide Lipoique	0.105
Rouge de Phénol	8.10
Putrescine de Sodium · 2HCl	0.081
Pyruvate de Sodium	55.00
<b>ACIDES AMINES:</b>	
L-Alanine	4.45
L-Arginine · HCl	147.50
L-Asparagine · H <sub>2</sub> O	7.50
Acide L-Aspartique	6.65
L-Cystéine HCl · H <sub>2</sub> O	17.56
L-Cystine · 2HCl	31.29
Acide L-Glutamique	7.35
L-Glutamine	365.00
Glycine	18.75
L-Histidine HCl · H <sub>2</sub> O	31.48
L-Isoleucine	54.47
L-Leucine	59.05
L-Lysine · HCl	91.25
L-Méthionine	17.24
L-Phénylalanine	35.48
L-Proline	17.25
L-Sérine	26.25
L-Thréonine	55.45
L-Tryptophane	9.02
L-Tyrosine · 2Na · 2H <sub>2</sub> O	55.79
L-Valine	25.35
<b>VITAMINES:</b>	
Biotine	0.0035
Pantothénate de Calcium D	2.24
Chlorure de Choline	8.98
Acide Folique	2.65
i-Inositol	12.60
Nicotinamide	2.02
Pyridoxal HCl	2.00
Pyridoxine HCl	0.031
Riboflavine	0.219
Thiamine HCl	2.17
Thymidine	0.365
Vitamine B <sub>12</sub>	0.68

Tableau XI: composition des milieux de culture utilisés: Ham F12 et DMEM / Ham F12

(1 / 1)

### B.11.2 Supplémentation du milieu de base.

#### B.II.2.1 Sérum de veau fœtal (SVF) (seromed)

Le sérum est stocké à -20°C. Il est décongelé et décomplémenté par chauffage au bain marie à 56°C pendant 30 min. Il peut alors être ajouté au milieu de base au taux de 5% pour les conditions habituelles de culture.

#### B.II.2.2 Glucose et glutamine (Seromed)

Du glucose et de la glutamine peuvent être ajoutés au milieu de base à partir de solutions stériles concentrées: - glucose (450 g/l)  
:- glutamine (200mM).

#### B.II.2.3 Acides aminés (Seromed)

Deux solutions concentrées stériles sont utilisées:

\* des acides aminés essentiels: Arginine (Arg ou R), Cystéine (Cyst ou C), Histidine (His ou H), Isoleucine (Ile ou I), Leucine (Leu ou L), Lysine (Lys ou K), Méthionine (Met ou M), phénylalanine (Phe ou F), Thréonine (Thr ou T), Tryptophane (Trp ou W), Tyrosine (Tyr ou Y) et Valine (Val ou V). Deux % (v/v) de cette solution sont ajoutés au milieu de base.

\* Des acides aminés non essentiels: Alanine (Ala ou A), Asparagine (Asp ou N), acide aspartique (Asp ou D), acide glutamique (Glu ou G), proline (Pro ou P) et Sérine (Ser ou S). 1% (v/v) de cette solution est ajouté au milieu de base.

#### B.II.2.4 Antibiotique

Une solution de généticine ou G418 est préparée à partir de généticine en poudre (Gibco) à raison de 4 g/l dans du tampon HEPES (100mM), pH 7,4. Cette solution est ajoutée au milieu de base pour la sélection et la culture des cellules transfectées par le vecteur pMAMnéo.

#### B.II.2.5 Chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) (Merck)

Afin de faciliter l'agrégation des cellules, du chlorure de calcium peut être ajouté au milieu de base à partir d'une solution de CaCl<sub>2</sub> 0,5 M filtrée (porosité 0,22 µm)

#### B.II.2.6 Butyrate de sodium.

Afin d'améliorer la productivité, du butyrate de sodium peut être ajouté au milieu de base à partir d'une solution de butyrate de sodium 500 mM, filtrée (porosité 0,22 µm).

### **B.111 Les microporteurs**

L'utilisation de microporteurs est le mode le plus courant pour la culture de cellules support-dépendantes; les autres modes possibles étant la culture en agrégats ou l'adaptation à la culture en suspension. La figure 23 schématise ces trois systèmes de culture.

Des microporteurs Cytodex 1 et Cytodex 3 (Pharmacia) ont été utilisés pour la culture des cellules CHO. De nombreux types de microporteurs existent et le tableau XII résume les principales caractéristiques de certains microporteurs.

#### **B.111.1 Hydratation et stérilisation des microporteurs.**

Le protocole utilisé est celui préconisé par le fabricant (PHARMACIA, 1981). Il consiste à hydrater les billes avec du PBS pendant trois heures à température ambiante. Après décantation des microporteurs, le surnageant est éliminé et deux rinçages successifs avec du PBS sont de nouveau réalisés. Les microporteurs (solution à 10 g/l) sont alors autoclavés à 120°C pendant 20 min puis conservés à 4°C et serviront de stock pour les cultures.

#### **B.111.2 Utilisation des microporteurs.**

La quantité de microporteurs nécessaire à la culture est prélevée à partir de la solution stock. Le PBS est éliminé après sédimentation des billes. Celles-ci sont rincées deux fois avec le milieu de culture et sont ainsi prêtes pour l'ensemencement.

### **B.112 Les agrégats.**

Une autre alternative pour la culture en masse de cellules adhérentes non adaptées à la culture en suspension est la culture des cellules en agrégats.

A partir de tapis cellulaire, obtenus en boîtes ou en bouteilles roulantes, les cellules sont trypsinées de façon douce afin d'obtenir des paquets de cellules, qui seront directement ensemencés en spinners ou en réacteur (sans ajout de microporteurs).

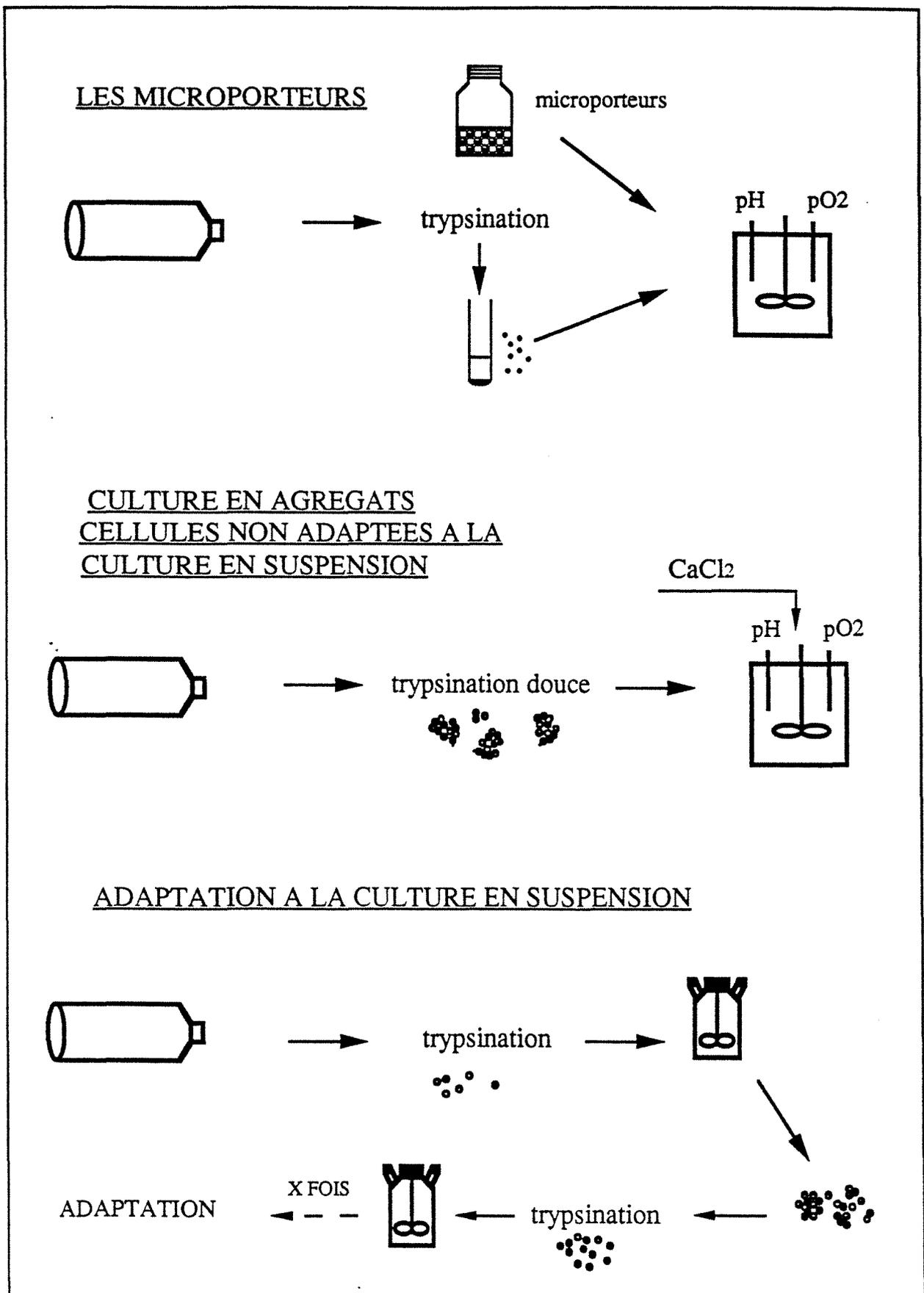


Figure 23: représentation des trois systèmes de culture possibles pour la culture de cellules support-dépendantes.

Type	Name	Density (g cm <sup>-3</sup> )	Diameter (μm)	Surface area (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> of microcarriers)	Number of microcarriers g <sup>-1</sup>
Dextran	Cytodex 1	1.03	131-220	6000 (d)	6.8 × 10 <sup>6</sup> (d)
	Cytodex 2	1.04	114-198	5500 (d)	5.8 × 10 <sup>6</sup> (d)
	Dormacell	1.05	140-240	7000 (d)	6.2 × 10 <sup>6</sup> (d)
	Microdex	1.03	150	250	3.5 × 10 <sup>5</sup>
Plastic	Biosilon	1.05	160-300	225	3.4 × 10 <sup>4</sup>
	Acrobeads	1.04	100-200	500	7.1 × 10 <sup>5</sup>
	Cytospheres	1.04	160-230	250	2.1 × 10 <sup>5</sup>
Gelatin	Cytodex 3	1.04	133-215	4600 (d)	4.8 × 10 <sup>6</sup> (d)
	Ventregel	1.03 (e)	150-250	4300 (d)	3.6 × 10 <sup>6</sup> (d)
Glass	Bioglas	1.03	150-210	350	5.0 × 10 <sup>5</sup>
Cellulose	DE-53	1.03 (e)	(40-50) × 80-400	1000	2.7 × 10 <sup>6</sup>
Liquid	Fluorocarbon	ND	100-500	ND	ND

ND = not determined; e = estimated; d = dry weight of microcarrier.

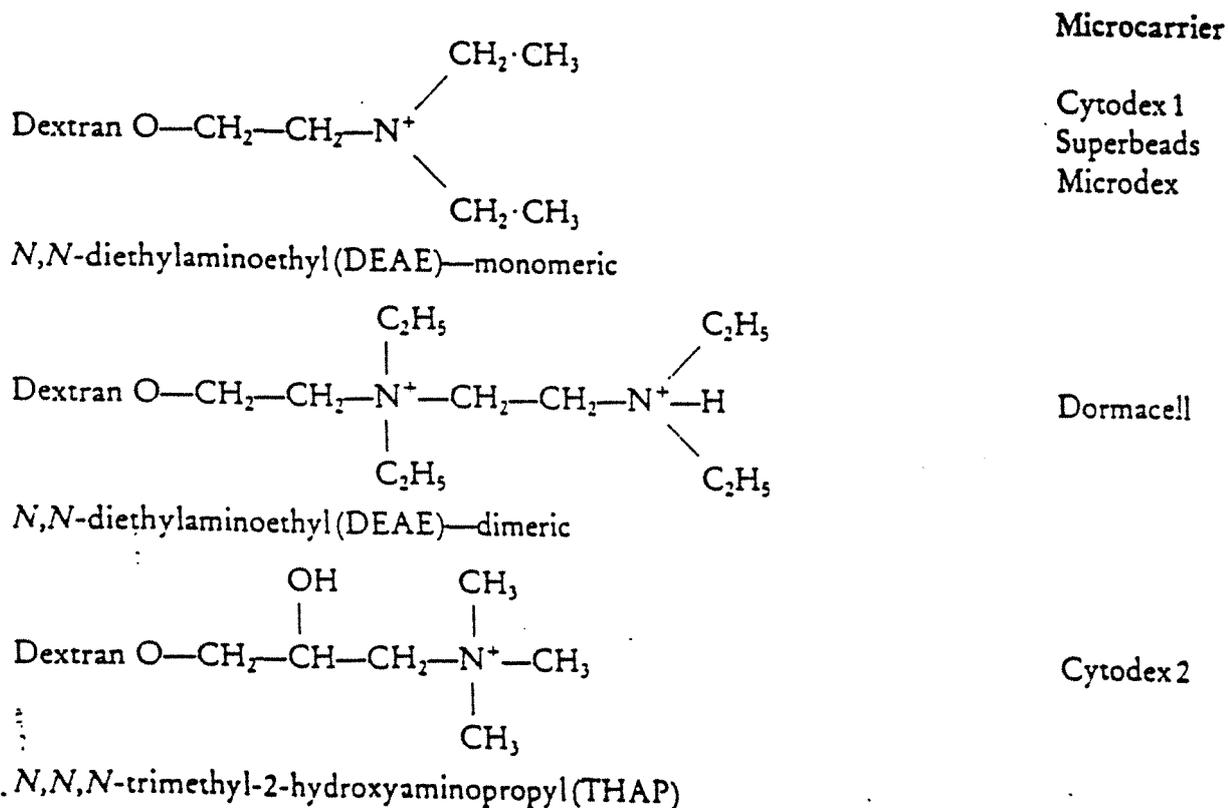


Tableau XII: les différentes caractéristiques de microporteurs.

Du chlorure de calcium peut être ajouté dans le milieu, qui facilitera l'agrégation. La quantité adéquate de chlorure de calcium devra être au préalable déterminée expérimentalement.

Le comptage des cellules agrégées est assez délicat, notamment la détermination de la viabilité des cellules. Le comptage des cellules totales agrégées sera obtenu comme pour les cellules sur microporteurs par coloration des noyaux au cristal violet (B.I.4.2).

### **B.V. Adaptation à la culture en suspension.**

Des cellules support-dépendantes peuvent être adaptées à la culture en suspension, en absence de microporteurs.

Pour cela, des passages successifs sont réalisés, pendant plusieurs semaines, avec trypsination des cellules entre chaque passage pour désagréger les petits agrégats qui pourraient se former. Le milieu de culture est identique à celui utilisé pour la culture des cellules sur microporteurs.

### **B.VI Les systèmes de culture.**

#### **B.VI.1 Culture statique de cellules adhérentes.**

L'amplification des cellules est réalisée en boîtes de culture (25, 75 175 cm<sup>2</sup>; Falcon, Becton Dickinson) ou en bouteilles roulantes (rollers de 850 cm<sup>2</sup>).

Les tapis cellulaires obtenus sont trypsinés et les cellules après centrifugation sont dénombrées et servent à l'ensemencement, soit de nouvelles boîtes de culture, soit de flacons agités ou d'un réacteur.

#### **B.VI.2 Flacons agités ou spinners.**

Ce sont de petits réacteurs agités de 250 ou 500 ml de volume utile, de forme cylindrique en verre borosilicaté et pourvus d'une tige aimantée (Techne). Ils sont placés sur un agitateur magnétique (Techne Mcs 1045) à l'intérieur d'une étuve régulée à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. L'agitation varie entre 20 et 40 rpm suivant la culture, en microporteurs, en agrégats ou en suspension. Le pH est régulé manuellement par ajout de bicarbonate de sodium ou de NaOH 0,5 N. Le dévissage des bouchons permet de favoriser les échanges gazeux; l'oxygénation de la culture se fait par transfert à l'interface liquide-gaz.

L'utilisation de spinners permet de réaliser des études comparatives simples, rapidement car leur mise en œuvre est facile et ne nécessite pas de quantités importantes de milieu et de cellules. L'influence de divers paramètres peuvent être ainsi testés (types de microporteurs, taux

d'ensemencement, ajout de quantités variables de butyrate...) afin de choisir les conditions optimales de croissance ou de production qui seront alors extrapolées au niveau du réacteur.

### B.VI.3 Réacteurs

Le réacteur utilisé pour toutes les expériences est un réacteur de 4 l de marque Setric (SGI). La figure 24 représente le schéma du réacteur utilisé avec ses systèmes de régulation. La température est contrôlée et maintenue à 37°C par un système de chauffage à air chaud dans une gaine en plexiglass qui enveloppe le réacteur. Le refroidissement est réalisé grâce à la circulation d'eau, commandée par une electrovanne, dans une épingle plongeant dans le réacteur (figure 25).

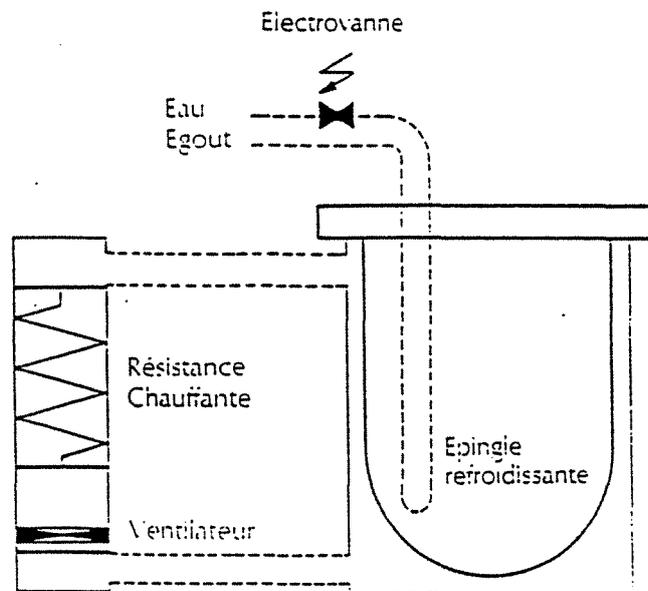
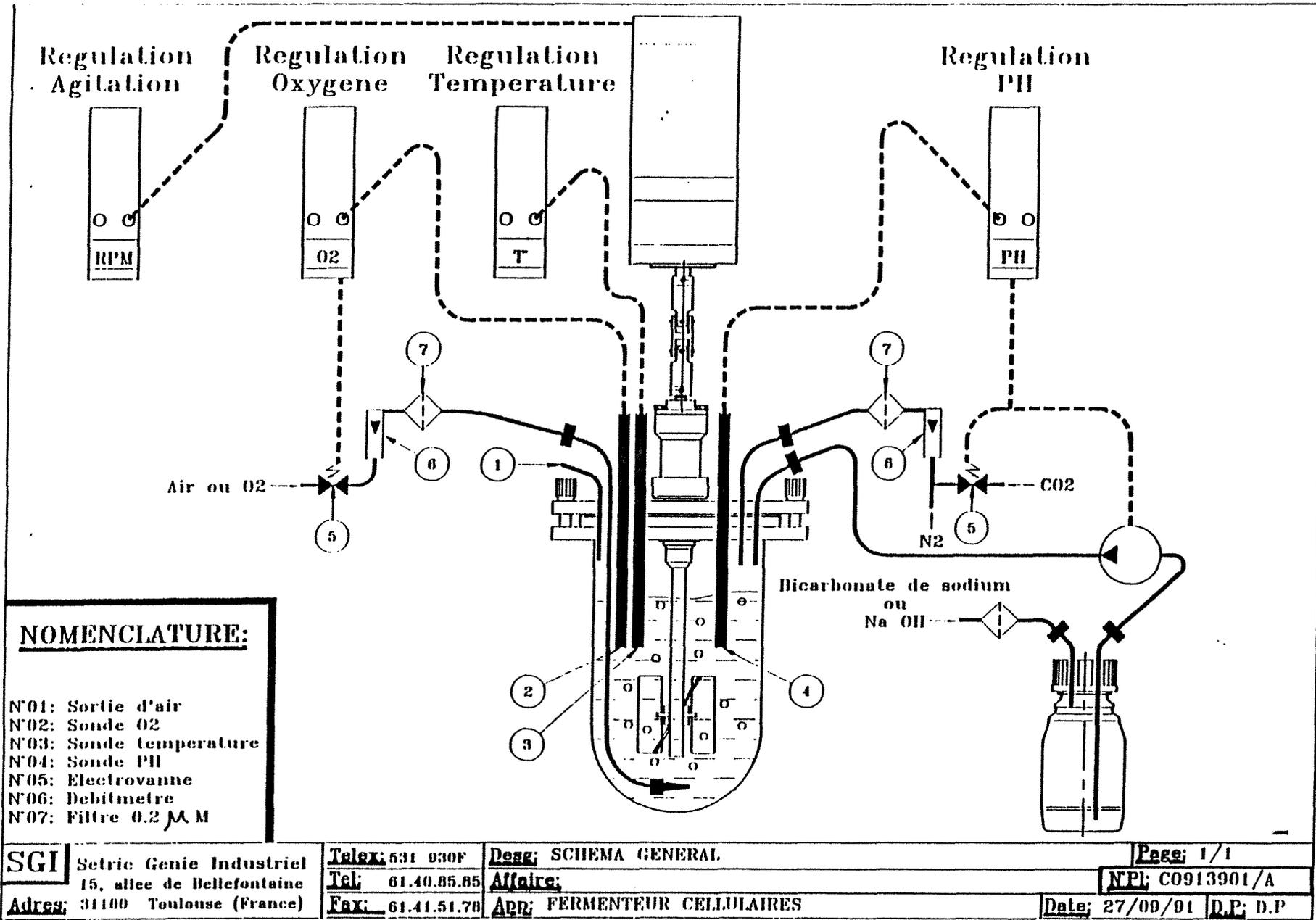


Figure 25: représentation schématique du système de refroidissement du réacteur Setric

#### B.VI.3.a Régulation de l'oxygène

L'oxygène dissous ( $pO_2$ ) est contrôlé en ligne par un système PID (Proportionnelle-Intégrale-Dérivée) couplée à une sonde Ingold, stérilisable avec le réacteur. L'étalonnage de la sonde est effectué avant et vérifié après l'autoclavage, tel que le 100% corresponde à la saturation de l'eau en oxygène lorsque l'on fait barboter de l'air dans le réacteur, et le 0% corresponde à la valeur obtenue en faisant barboter de l'azote dans le réacteur.

Figure 24: représentation schématique d'un réacteur agité et des différentes régulations.



Pour les cultures, l'aération est réalisée par un diffuseur d'air ou sparger en fond de cuve avec des injections d'air ou d'oxygène en fonction de la consigne imposée par l'expérimentateur. Cette consigne est en général fixée à 50%.

L'azote est envoyé dans le ciel du réacteur pour limiter l'apport d'oxygène. Afin d'obtenir une meilleure régulation, un balayage continu d'azote est réalisé dans le ciel du réacteur.

#### B.VI.3.b Régulation du pH.

La régulation du pH est effectuée de la même manière par un système PID couplé à une sonde stérilisable Ingold. L'étalonnage de la sonde est réalisé avant la stérilisation grâce à des solutions standards à pH 7 et à pH 4. Aucune dérive de la sonde n'a été observée lors des cultures en mode discontinu ou semi-continu (environ 200 h).

La consigne de pH choisie est de 7,4 pour la culture des cellules CHO.

Le système de régulation PID commande l'arrivée de CO<sub>2</sub> dans le ciel du réacteur si le pH mesuré par la sonde est supérieur à la consigne affichée. Dans le cas d'une acidification du milieu, la régulation déclanche l'envoi de soude 0,5N par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique.

#### B.VI.3.c Stérilisation du réacteur.

Le réacteur rempli au 3/4 avec du PBS est stérilisé par autoclavage (30 min, 120°C, 1 bar) avec les sondes pH et pO<sub>2</sub> en place ainsi que la bouteille de soude.

### **B.VI.4 Les modes de culture**

Plusieurs modes de culture seront utilisés au cours de ce travail: le mode discontinu ou batch, le mode semi-continu ou fed-batch et le mode recharge-récolte: ce dernier ne sera utilisé que pour les flacons agités. Les évolutions des différents débits suivant ces modes de culture sont représentées sur la figure 26

#### B.VI.4.a Le mode discontinu

Dans ce mode de culture, après ensemencement, aucun ajout, aucun soutirage de milieu n'est réalisé. Le système est fermé, seuls le pH et la pO<sub>2</sub> sont régulés. En pratique, les cultures en batch durent environ une semaine.

Des prélèvements sont effectués deux fois par jour afin de permettre les dosages des différents composés du milieu ainsi que les comptages cellulaires.

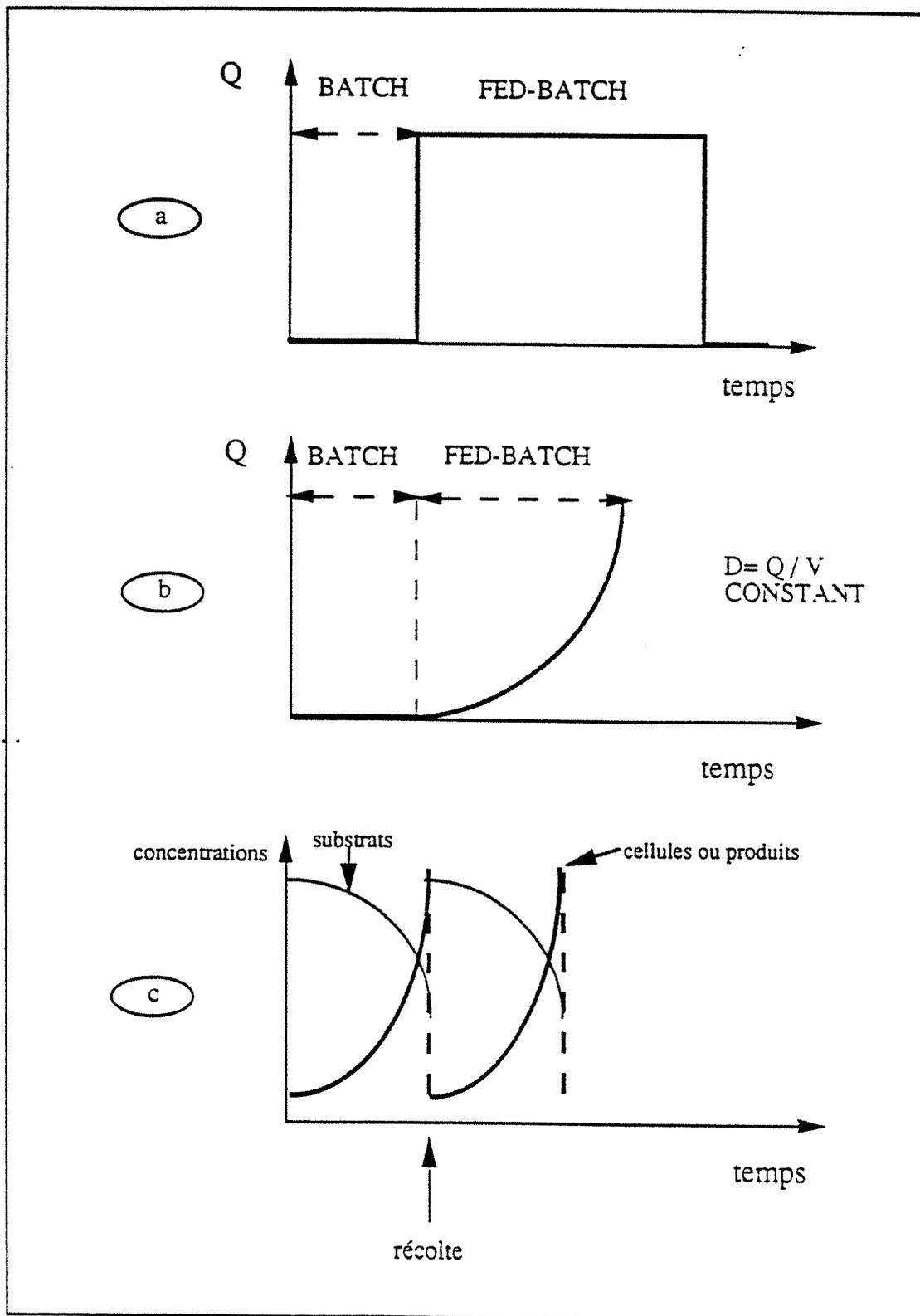


Figure 26: représentation de l'évolution du débit suivant différents types d'alimentation: (a) alimentation à débit constant; (b) alimentation à débit variable; (c) mode recharge-récolte.

#### B.VI.4.b Le mode semi-continu.

Il consiste à alimenter le réacteur sans rien soutirer par ailleurs. Le volume va donc augmenter au cours de la culture. Deux types d'alimentation sont possibles: une alimentation à débit constant avec un taux de dilution qui va varier ou une alimentation à taux de dilution constant avec un débit qui variera au cours de la culture (figure 26 a et 26b). Ces cultures durent une semaine à 10 jours et permettent de poursuivre la croissance cellulaire plus longtemps qu'en discontinu, en retardant les limitations nutritionnelles. L'apport de milieu neuf est réalisé à l'aide d'une pompe péristaltique. La température, la pO<sub>2</sub> et le pH sont régulés comme indiqué auparavant.

#### B.VI.4.c Le mode recharge-récolte

Ce mode de culture ne sera utilisé dans notre travail que sur des flacons agités mais il peut être également utilisé en réacteur. Il consiste à changer le milieu de culture par du milieu frais séquentiellement, au cours de la culture (figure 26c). Pour ce faire, lorsqu'il s'agit de culture sur microporteurs, les cellules adhérentes aux microporteurs sont décantées, le milieu usager est soutiré et du milieu frais est ajouté afin de remettre cellules et microporteurs en solution dans le même volume initial. Dans le cas de cellules agrégées ou adaptées à la culture en suspension, l'ensemble, milieu et cellules, est centrifugé et les cellules sont remises en culture dans du milieu frais.

Ce mode de culture permet de s'affranchir de tout phénomène de limitations nutritionnelles ou d'accumulations de toxiques.

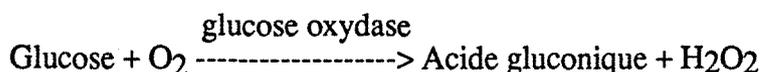
### **B.VII Dosages des différents composants du milieu.**

Le prélèvement et la répartition des échantillons à doser sont représentés sur la figure 27.

#### **B.VII.1 Glucose.**

Le glucose a été, tout au long de ce travail, dosé à l'hôpital central de Nancy, au laboratoire du Pr Nabet.

C'est un dosage colorimétrique, réalisé sur un automate à flux continu Technicon (SMA 2) à l'aide d'un kit de dosage Biotrol. Le principe est le suivant:



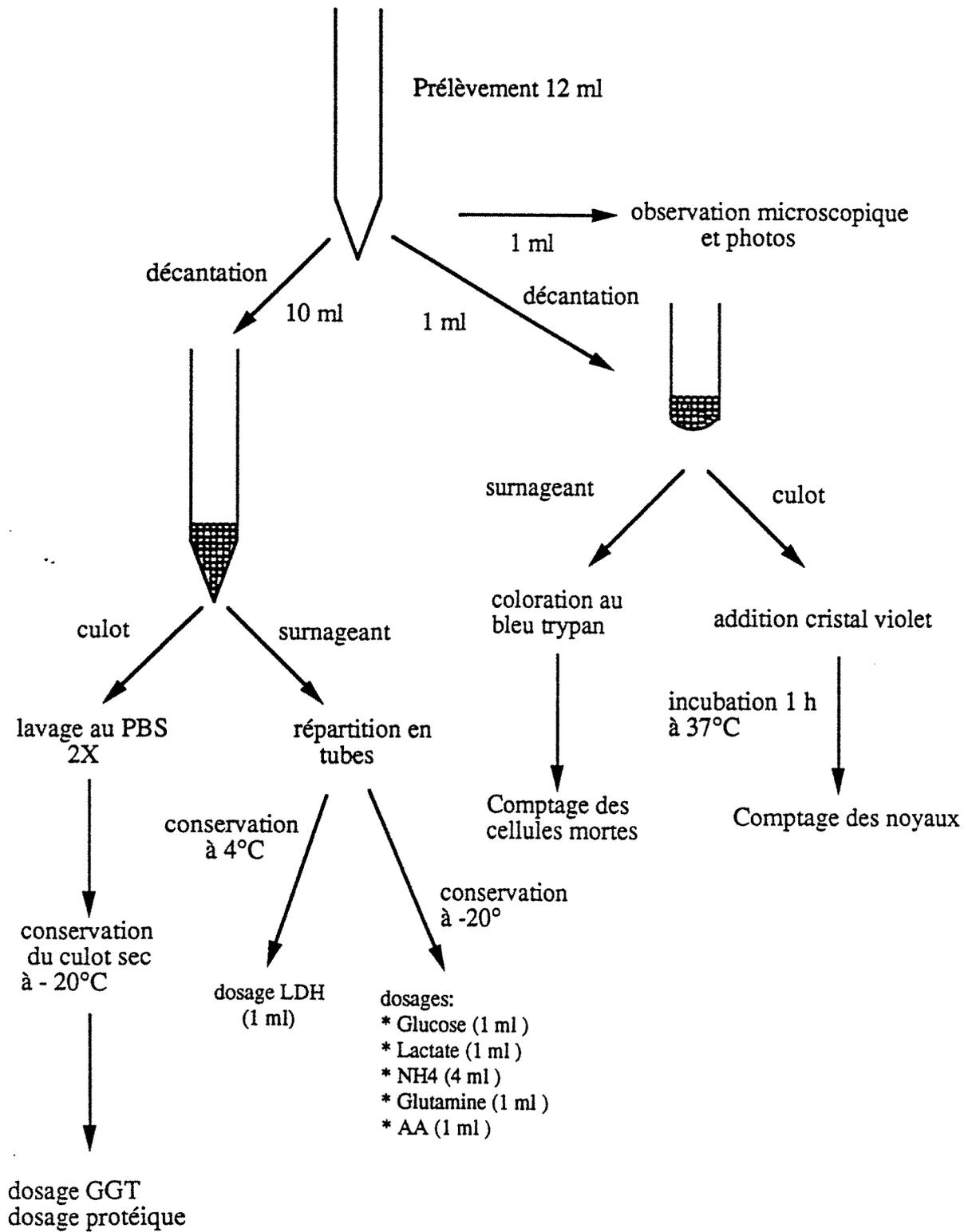
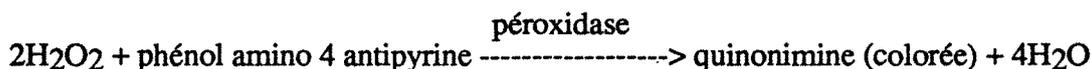
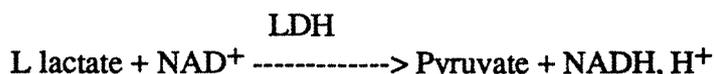


Figure 27: prélèvement de cellules sur microporteurs pour les différentes analyses: glucose, lactate, glutamine, NH<sub>4</sub>, acides aminés, LDH, GGT et comptages cellulaires.

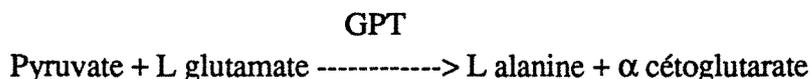


### **B.V11.2 Lactate.**

Il est également dosé à l'hôpital central, sur un analyseur centrifuge (BECKER). C'est un dosage enzymatique réalisé avec un kit Boehringer Mannheim. Le principe du dosage est le suivant:



La variation de densité optique à 340 nm est proportionnelle à la quantité de NADH, H<sup>+</sup> apparue. La réversibilité de la réaction est évitée par la transformation du pyruvate en L alanine grâce à la transaminase glutamopyruvique (GPT) selon la réaction suivante:



### **B.V11.3 Ions ammonium.**

Il est dosé par méthode colorimétrique selon la technique de BERTHELOT, grâce à un coffret Biolyon (France, Lyon). Après déprotéinisation, une coloration bleue (630 nm) est obtenue en présence de phénol et d'hypochlorite de sodium. La concentration est déterminée à partir d'un échantillon standard.

### **B.V11.4 Glutamine et acides aminés.**

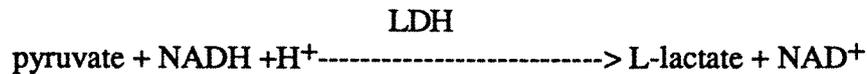
Ces dosages ont été réalisés par le service du Pr Nabet à l'hôpital central de Nancy. Les échantillons sont analysés par chromatographie d'échange d'ions (Beckman 7300) et coloration à la ninhydrine après déprotéinisation par addition d'un volume égal d'acide sulfosalicylique à 5% (p/v) dans de l'eau. L'intégration permet d'évaluer la surface des pics et la concentration de chaque acide aminé est déduite à partir d'une solution standard. Les erreurs de dosage sont évaluées de l'ordre de 10 à 20%.

### **B.V11.5 LDH (activité lactico-deshydrogénase).**

Ces dosages ont été réalisés au Centre du Médicament à Nancy, laboratoire du Professeur Siest.

Les dosages sont réalisés sur un analyseur centrifuge automatique COBAS (Cobas-Bio-Roche-Instruments) par la méthode SFBC grâce à un kit Boehringer-Diagnostic (543-047). L'erreur estimée est de l'ordre de 5 à 10%.

L'activité catalytique de la LDH est déterminée par la mesure de la vitesse de disparition du NADH à 340 nm dans la réaction suivante:



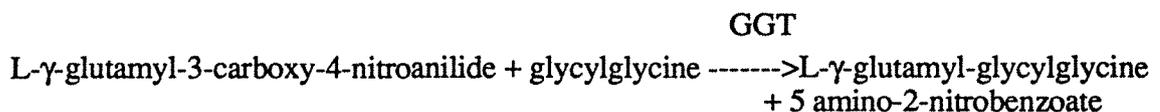
Les échantillons à doser sont conservés à 4°C après élimination par centrifugation des cellules.

### B.VII.6 La gamma-glutamyltransférase (GGT).

#### B.VII.6.a Principe.

L'enzyme GGT hydrolyse spécifiquement la liaison amide où se trouve impliqué le carboxyle en position  $\gamma$  de l'acide glutamique, qui est transporté sur un accepteur: le dipeptide glycylglycine.

Un substrat synthétique, le  $\gamma$ -L-glutamyl-3-carboxy-nitroanilide (GluCNA) libère en s'hydrolysant l'acide 5-amino-2-nitrobenzoïque, jaune, dont la vitesse d'apparition, lue à 405 nm, est proportionnelle à l'activité GGT de la prise d'essai. La réaction est la suivante:



Les concentrations finales en substrats et les conditions expérimentales sont les suivantes:

- Température d'incubation: 30°C
- Substrat donneur GluCNA: 6 mM
- Substrat accepteur Glygly: 150 mM dans tampon Tris-HCl 100 mM pH=8,25.

Deux protocoles sont utilisés suivant le mode de culture, sur microporteurs ou en agrégats.

#### B.VII.6.b Dosage de GGT de cellules sur microporteurs: dosage au point final.

Dans un tube à essai sont additionnés:

- \* 100 µl de suspension cellulaire sur microporteurs ou 100 µl d'eau pour le témoin
- \* 1 ml de tampon Tris / Glygly
- \* 100 µl de solution GluCNA

Le tube est placé dans un bain marie thermostaté à 30°C pendant 10 min. La réaction est stoppée par ajout de 1 ml d'une solution d'acide acétique à 25% (v/v). L'absorbance de chaque échantillon est lue à 405 nm, après décantation des porteurs et la quantité de 5-amino-2-nitrobenzoïque libérée est déterminée d'après une courbe étalon.

#### B.VII.6.c Dosage de GGT de cellules en suspension

Le dosage est alors réalisé sur un spectrophotomètre Uvikon 860 (Kontron). Les conditions opératoires sont identiques au dosage précédent.

Un programme spécifique au dosage est entré dans le spectrophotomètre qui trace la cinétique d'apparition du 5-amino-2-nitrobenzoate par minute et à 30°C. L'activité enzymatique exprimée en unité par litre (U/l) correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour obtenir une micromole de 5-amino-2-nitrobenzoate par minute (à 30°C).

#### B.VIII.7 Dosage protéique.

Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford (1976) à l'aide d'un kit commercialisé par Bio-Rad, le kit "Protein Assay". La gamme d'étalonnage, réalisée à chaque dosage, a été effectuée avec l'albumine sérique bovine (BSA).

### **B.VIII Exploitation cinétique des résultats.**

#### B.VIII.1 Vitesses spécifiques de croissance et de décès cellulaire.

Avant-propos:

Selon le mode de culture, sur microporteurs ou en agrégats ou encore en suspension, différentes évaluations de la population cellulaire sont obtenues. Dans le cas de culture sur microporteurs, les cellules adhérant aux microporteurs seront considérées comme vivantes et seront toutes dénombrées par coloration des noyaux par la technique au cristal violet (décrite au

B.I.4.2.b). La vitesse spécifique de croissance apparente sera déterminée à partir de cette évaluation cellulaire. Les cellules détachées des porteurs sont, elles, colorées au bleu Trypan afin d'évaluer la viabilité de ces cellules en suspension. Les cellules colorées sont considérées comme mortes et permettront de déterminer la vitesse spécifique de décès cellulaire, et celles qui ne le sont pas ont deux alternatives: soit elles adhéreront à nouveau à un microporteur, soit dans le cas contraire, elles mourront rapidement. En réalité le nombre de ces cellules en suspension, non colorées par le bleu Trypan, est négligeable et ne sera pas pris en compte dans les calculs.

Dans le cas de cellules agrégées, ou adaptées à la culture en suspension, c'est le nombre total de cellules qui sera estimé par la technique de coloration de noyaux par le cristal violet. La viabilité est difficilement estimable; en effet, l'action de la trypsine sur des agrégats cellulaires entraîne, quelles que soient les conditions expérimentales, une fragilisation des cellules et une coloration de pratiquement toutes les cellules. C'est donc une vitesse spécifique de croissance globale (tenant compte des cellules mortes et des cellules vivantes) qui sera obtenue. Dans le cas de cellules adaptées à la culture en suspension, la viabilité peut être approximativement appréciée mais c'est également une vitesse spécifique de croissance globale qui sera calculée pour être comparée à la culture de cellules agrégées.

### MODE DISCONTINU.

On définit deux vitesses spécifiques différentes selon le mode de culture, sur microporteurs ou en agrégats. Pour la culture sur microporteurs, la vitesse spécifique apparente de croissance est définie telle que:

$$r_x - r_d = \frac{dX_v}{dt} \text{ avec } r_x = \mu_{\text{réel}} \cdot X_v \text{ et } r_d = k_d \cdot X_v$$

$\mu_{\text{réel}}$  et  $k_d$  sont respectivement les vitesses spécifiques de croissance réelle et de décès cellulaire et  $X_v$  la concentration de cellules sur microporteurs. La vitesse spécifique apparente est définie telle que:

$$\mu_{\text{app}} = \mu_{\text{réel}} - k_d$$

$$\mu_{\text{app}} = \frac{1}{X_v} \cdot \frac{dX_v}{dt}$$

avec  $X_v$  : cellules vivantes = cellules adhérentes aux microporteurs

et

$$k_d = \frac{1}{X_v} \cdot \frac{dX_m}{dt}$$

avec  $X_m$ : cellules mortes.

Pour la culture en agrégats ou adaptées à la culture en suspension, on définit une vitesse spécifique de croissance globale  $\mu_{glob}$

$$\mu_{glob} = \frac{1}{X_{tot}} \cdot \frac{dX_{tot}}{dt}$$

avec  $X_{tot}$ : cellules totales =  $X_v + X_b$ .

( $X_b$ ): nombre de cellules colorées par bleu Trypan

En fait, lorsque le nombre de cellules mortes (colorées par le bleu trypan) est nul ou négligeable devant le nombre de cellules vivantes, on obtient:

$$\mu_{glob} = \mu_{app} ;$$

par exemple, pour la culture sur microporteurs, le nombre de cellules mortes est négligeable pendant toute la phase exponentielle de croissance.

La vitesse spécifique maximale moyenne de croissance  $\mu_{max}$  est déterminée graphiquement par la courbe:  $\text{Log } X_{tot}$  ou  $\text{Log } X_v$  en fonction du temps. La pente de cette droite correspond à  $\mu_{(glob)max}$  ou à  $\mu_{(app)max}$

## MODE SEMI-CONTINU

Dans ce cas, le bilan réalisé sur les cellules vivantes pour la culture des cellules sur microporteurs donnent:

$$V \cdot (r_x - r_d) = V \cdot \frac{dX_v}{dt} + X_v \cdot \frac{dV}{dt} \quad \text{avec } dV/dt = Q; \text{ Q étant le débit du milieu d'alimentation (ml / h)}$$

$$r_x - r_d = \frac{dX_v}{dt} + X_v \cdot \frac{Q}{V}$$

$$\mu_{réel} - k_d = \frac{1}{X_v} \cdot \frac{dX_v}{dt} + \frac{Q}{V} = \mu_{app}$$

$$k_d = \frac{Q}{V} \cdot \frac{X_m}{X_v} + \frac{1}{X_v} \cdot \frac{dX_m}{dt}$$

avec Q: débit d'alimentation (ml/h) et

V: volume de milieu dans le réacteur (ml)

Le taux de dilution D est égal à  $Q/V$  et est exprimé en  $h^{-1}$ .

Sous forme discrétisée, on calcule entre chaque intervalle de temps:

$$\mu_{app} = \frac{Q}{V} + \frac{1}{X_{v \text{ moyen}}} \cdot \left[ \frac{X_{v \text{ } i+1} - X_{v \text{ } i}}{t_{i+1} - t_i} \right] \text{ avec } \mu_{app} \text{ correspondant au temps } (t_{i+1} + t_i) / 2 \text{ et}$$

$$X_{v \text{ moyen}} = \frac{X_{v \text{ } i} + X_{v \text{ } i+1}}{2}$$

Dans le cas de cellules cultivées en agrégats ou adaptées à la culture en suspension:

$$\mu_{glob} = \frac{1}{X_{tot}} \cdot \frac{dX_{tot}}{dt} + \frac{Q}{V}$$

### MODE RECHARGE-RECOLTE

Le mode recharge-récolte est traité comme une succession de cultures en mode discontinu et les vitesses spécifiques de croissance et de décès sont calculées comme défini précédemment.

### B.VIII.2 Vitesses spécifiques de consommation de substrats et de production de métabolites.

#### MODE DISCONTINU

La vitesse spécifique de consommation  $\gamma_s$  d'un substrat est définie tel que:

$$\gamma_s = - \frac{1}{X_v} \cdot \frac{dS}{dt} \quad \text{ou} \quad \gamma_{s \text{ (glob)}} = - \frac{1}{X_{tot}} \cdot \frac{dS}{dt} \quad \text{dans le cas de cellules en agrégats ou adaptées à la culture en suspension}$$

et la vitesse spécifique de production

$$\pi_p = + \frac{1}{X_v} \cdot \frac{dP}{dt} \quad \pi_{p \text{ (glob)}} = + \frac{1}{X_{tot}} \cdot \frac{dP}{dt}$$

En pratique, les prélèvements ont lieu toutes les 8 à 12 heures. On calculera, en fait, les vitesses spécifiques moyennes sur ces intervalles de temps;

$$\gamma_s = - \frac{1}{X_{v \text{ moyen}}} \cdot \frac{S_{i+1} - S_i}{t_{i+1} - t_i} \quad \text{et} \quad \gamma_{s \text{ (glob)}} = - \frac{1}{X_{tot \text{ moyen}}} \cdot \frac{S_{i+1} - S_i}{t_{i+1} - t_i}$$

$$\pi_p = + \frac{1}{X_{v \text{ moyen}}} \cdot \frac{P_{t_{i+1}} - P_{t_i}}{t_{i+1} - t_i} \quad \text{et} \quad \pi_p(\text{glob}) = + \frac{1}{X_{\text{tot moyen}}} \cdot \frac{P_{t_{i+1}} - P_{t_i}}{t_{i+1} - t_i}$$

$$\text{avec } X_{v \text{ moyen}} = \frac{X_{v_{t_i}} + X_{v_{t_{i+1}}}}{2} \quad \text{et} \quad X_{\text{tot moyen}} = \frac{X_{\text{tot}_{t_i}} + X_{\text{tot}_{t_{i+1}}}}{2}$$

## MODE SEMI-CONTINU

Les vitesses spécifiques sont données comme suit:

$$\gamma_s = - \frac{\frac{dS}{dt} - \frac{Q}{V} \cdot (S_0 - S)}{X_v} \quad \text{avec } S_0: \text{ concentration de substrat dans l'alimentation.}$$

et

$$\pi_p = + \frac{\frac{dP}{dt} + \frac{Q}{V} \cdot (P - P_0)}{X_v} \quad \text{avec } P_0: \text{ concentration de produit dans l'alimentation.}$$

Sur un intervalle de temps, entre deux prélèvements successifs, les vitesses sont calculées de la façon suivante:

$$\gamma_s = \frac{1}{X_{v \text{ moyen}}} \cdot \left[ - \frac{Q}{V} \cdot (S_0 - S_{\text{moyen}}) + \frac{S_{t_{i+1}} - S_{t_i}}{t_{i+1} - t_i} \right]$$

$$\text{et } \pi_p = + \frac{1}{X_{v \text{ moyen}}} \cdot \left[ + \frac{Q}{V} \cdot (P_{\text{moyen}} - P_0) + \frac{P_{t_{i+1}} - P_{t_i}}{t_{i+1} - t_i} \right]$$

avec  $S_0$  et  $P_0$  sont les concentrations respectives en substrat et en produit dans le milieu d'alimentation.

$$X_{v \text{ moyen}} = \frac{X_{v_{t_i}} + X_{v_{t_{i+1}}}}{2} \quad S_{\text{moyen}} = \frac{S_{t_i} + S_{t_{i+1}}}{2} \quad P_{\text{moyen}} = \frac{P_{t_i} + P_{t_{i+1}}}{2}$$

Pour la culture en agrégats ou pour les cellules adaptées à la culture en suspension, toutes les vitesses spécifiques de consommation et de production seront ramenées à  $X_{\text{tot}}$  (concentration cellulaire totale).

#### B.1111.4. Evaluations des rendements.

Le rendement  $Y_{P/S}$  correspond au rapport molaire entre le produit de conversion et le substrat correspondant; par exemple, le rendement  $Y_{lac/glc}$  définira la quantité de lactate formé par conversion glycolytique du glucose.

#### MODE DISCONTINU

A partir des courbes expérimentales d'évolution des concentrations de substrats S et des concentrations de produit P, le rendement de conversion est calculé entre deux instants donnés tel que:

$$Y_{P/S} = \frac{[P]_{t_i} - [P]_{t_{i-1}}}{[S]_{t_i} - [S]_{t_{i-1}}}$$

$[P]_{t_i}$  et  $[S]_{t_i}$  sont les concentrations respectives en P et en S au temps  $t_i$

$[P]_{t_{i-1}}$  et  $[S]_{t_{i-1}}$  sont les concentrations respectives en P et en S au temps  $t_{i-1}$

#### MODE SEMI CONTINU

A un instant  $t_i$  et un taux de dilution D ( $Q/V$ ), le rendement est défini comme suit:

$$Y_{P/S} = \frac{D \cdot ([P]_{\text{moyen}} - [P]_0) + \frac{[P]_{t_i} - [P]_{t_{i-1}}}{t_i - t_{i-1}}}{D \cdot ([S]_0 - [S]_{\text{moyen}}) - \frac{[S]_{t_i} - [S]_{t_{i-1}}}{t_i - t_{i-1}}}$$

avec  $D = Q/V$

$[S]_0$  et  $[P]_0$  sont les concentrations respectives de substrat et de produit dans le milieu d'alimentation; D est le taux de dilution entre  $t_i$  et  $t_{i-1}$ ;  $[S]_{\text{moyen}}$  et  $[P]_{\text{moyen}}$  sont définis par:

$$S_{\text{moyen}} = \frac{S_{t_i} + S_{t_{i-1}}}{2}, \quad P_{\text{moyen}} = \frac{P_{t_i} + P_{t_{i-1}}}{2}$$



## **C Caractérisation et purification de protéines recombinantes**

### **C.1 Electrophorèse des protéines**

Les protéines sont des macromolécules constituées d'acides aminés dont certains d'entre eux peuvent être chargés électriquement, lorsque le pH de la solution est différent de leur pKa. Il en résulte une charge nette électrique dont le signe et l'intensité varient en fonction du pH de la solution et leur point isoélectrique: à un pH inférieur à leur point isoélectrique, les protéines auront une charge nette positive et se comporteront donc comme des cations lorsqu'elles seront soumises à un champ électrique; à l'inverse, à un pH supérieur à leur point isoélectrique, elles se comporteront comme des anions.

En théorie, si l'on applique un champ électrique, les protéines migreront plus ou moins vite selon leur densité de charge. Au moment où le courant électrique va être appliqué, les molécules de glycine en contact avec la solution tampon de l'échantillon, dont le pH (6,8) est voisin de leur pKa, vont être peu dissociées. Ainsi faiblement chargées, elles vont migrer moins vite que les ions chlorures. Cette différence de mobilité entre un ion "leader" (Cl<sup>-</sup>) et un ion "retardataire" (glycine<sup>-</sup>) crée une zone intermédiaire de plus faible conductivité, qui va permettre de concentrer les protéines dans le gel de concentration. De plus, en présence d'un détergeant ionique, le dodécylsulfate de sodium (SDS), il est possible de profiter au maximum de l'effet taille, en chargeant les protéines de telle sorte qu'elles se comportent comme des anions; elles auront la même charge nette et le seul critère de séparation sera la taille.

Le système électrophorétique utilisé est discontinu avec un gel de concentration et un gel résolusif selon la technique de Laemmli (1970).

#### **REACTIFS**

- Acrylamide 30% (p/v) et bisacrylamide 0,8% (p/v): solution toxique à conserver à l'abri de la lumière à 4°C.
- SDS 20% (p/v)
- Tris-HCl 1,5M pH 8,8
- Tris-HCl 0,5M pH 6,8
- Glycérol 50% (v/v)
- Temed
- Ammoniumperoxodisulfate 10% (p/v)
- Tampon de migration: glycine 14,4 g/l; Tris-base 3 g/l; SDS 1 g/l
- Tampon BERNHARD: Tris 200 mM; sucrose 0,5 M; EDTA 5mM; méthionine 1% (p/v); bleu de bromophénol 0,01% (p/v)
- DTT 0,05M
- Iodoacétate 0,5M

## METHODE

La préparation des échantillons protéiques se fait de la façon suivante.

A un volume V d'échantillon est ajouté un volume V de tampon de BERNHARD, puis 0,2 V de SDS 20% (p/v) et 0,2 V de DTT 0,05M. Ce mélange est chauffé à 90°C pendant trois min puis centrifugé 2 min à 10000 g. Après ajout de 0,2 V d'iodoacétamide 0,5M, les échantillons sont à nouveau centrifugés 2 min à 10000xg et sont prêts à être déposés sur le gel.

La préparation des deux gels, gel de concentration et gel de résolution se fait de la manière suivante par addition des réactifs dans l'ordre indiqué dans le tableau suivant:

	Gel de concentration (5%)	Gel de résolution (12,5%)
Solution acrylamide (ml)	2,5	6,25
Tris-HCl pH8,8 (ml)	-	3,75
Tris-HCl pH 6,8 (ml)	1,88	-
Glycérol 50% (ml)	0,75	1,5
H <sub>2</sub> O (ml)	10,3	3,34
	dégazage sous vide	dégazage sous vide
SDS 20% (ml)	0,15	0,15
Persulfate d'ammonium (µl)	150	75
Temed (µl)	5	10
Temps de polymérisation	30 min	1 h

La migration se déroule à 200 V pendant environ une heure pour des gels de dimensions 70 X 80 X 0,75 mm dans le tampon de migration.

### C.11 Electrotransfert en milieu semi-sec

L'électrotransfert des protéines a été réalisé en milieu semi-sec sur un appareil Novablot-Multiphor LKB (Pharmacia), avec une membrane en fluorure de polyvinylidène (Immobilon-P, Millipore IPVM 15150)

#### REACTIFS

- Tampon d'électrodes (anode et cathode en système continu): glycine (39 mM) 2,93 g; Tris (48 mM) 5,81 g; SDS 0,375 g; méthanol 20% 200 ml;; eau ultra pure qsp 1000 ml.
- Rouge ponceau 0,2% dans 3% TCA

## METHODE

Le gel de polyacrylamide-SDS et la membrane sont mis en sandwich entre 3 feuilles de papier Whatman 3MM et 6 feuilles de papier filtre, les filtres étant imprégnés du tampon d'électrodes. L'ensemble est déposé sur l'anode de graphite; la cathode de graphite est ensuite placée au dessus du sandwich et connectée à la cuve. La migration se déroule pendant deux heures à température ambiante avec une intensité de courant de  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  de membrane. A la fin du transfert, la membrane est colorée avec la solution de rouge ponceau puis décolorée avec de l'eau distillée; ce qui permet de visualiser le profil électrophorétique et de vérifier l'efficacité du transfert.

### C.111 Western blot

Cette technique consiste à fixer sur l'antigène un premier anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt; le complexe ainsi formé est détecté par un deuxième anticorps marqué, dirigé contre le premier anticorps.

#### REACTIFS

- Tampon TBST 10X: NaCl 90 g; Tris 12,12 g; Tween (20) 7 ml; pH ajusté à 7,4 avec HCl; H<sub>2</sub>O qsp 1000 ml.
- Tampon de développement 1X: Tris 12,12 g; NaCl 5,84 g; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1,02 g; pH ajusté à 9,5 avec HCl; H<sub>2</sub>O qsp 1000 ml.
- Substrats phosphatase alcaline: Nitro blue tétrazolium (NBT): 200 µl (50 mg/ml dans 70% N-N-diméthylformamide); 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP): 100 µl (50 mg/ml dans 100% N-N-diméthylformamide); ajout de 30 ml de tampon de développement.
- Albumine sérique bovine

#### METHODE

La procédure consiste à incuber successivement la membrane, sous agitation dans les bains suivants:

- \* lavage 10 min dans tampon TBST
- \* saturation de 30 min avec 1% (p/v) BSA dans TBST
- \* incubation pendant 2 h avec le premier anticorps anti-GGT rénale humaine (antisérum de lapin) dilué au 1/500<sup>ème</sup> dans TBST
- \* 4 lavages de 15 min avec TBST
- \* incubation pendant 1 h avec le deuxième anticorps de chèvre anti-IgG de lapin (Sigma n° A-0407) conjugué à la phosphatase alcaline dilué au 1/2000 dans TBST
- \* lavage de 5 min avec le tampon de développement

- \* incubation avec les substrats de la phosphatase alcaline
- \* rinçage avec de l'eau distillée
- \* séchage de la membrane.

### **C.11 Isoélectrofocalisation**

L'isoélectrofocalisation est une méthode d'analyse et de séparation des protéines basée sur leur différence de charge électrique nette. Les protéines vont migrer dans un gradient de pH jusqu'à ce qu'elles rencontrent une zone de pH où elles sont électriquement neutres. Ce pH correspond à leur point isélectrique. Le gradient de pH est créé par des ampholytes, molécules synthétiques présentant des fonctions acides et basiques. Elles sont introduites dans la préparation du gel. La composition des ampholytes est statistiquement telle qu'un gradient linéaire de pH va s'installer tout le long du gel.

Les gels de polyacrylamide que nous avons utilisés sont commercialisés par Pharmacia et contiennent des ampholytes prêts à l'emploi (pH 3,5-10).

#### **MATERIELS**

- Kits Ampholine PAG Plate (Pharmacia) gradient de pH 3,5-10. Les électrolytes  $H_3PO_4$  1M pour l'anode et NaOH 1 M pour la cathode sont fournis avec le kit.
- Appareil d'isoélectrofocalisation LKB
- Générateur STAVIP 3000 de chez Apelex
- Tampon de révélation de la GGT: Tris-HCl 0,1M, pH 8,25; Glycylglycine 150mM; L-gamma-glutamyl $\alpha$ -naphtylamide 5mM.

#### **METHODE**

Un volume de 5 à 20  $\mu$ l d'échantillon correspondant à 0,5-10 mg/ml de protéines est déposé sur le gel. L'isoélectrofocalisation dure 2h30 à 1600 V, 50 m A et 25 W avec refroidissement par un cryostat à 10°C.

Après la migration, le gel est incubé à 37°C dans le tampon de révélation de la GGT et la localisation enzymatique de la GGT sera détectée par fluorescence sous UV.

### **C.12 Détermination des constantes catalytiques**

Les constantes catalytiques ( $K_m$ ) pour la glycylglycine et pour le L- $\gamma$ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide ont été déterminées sur un analyseur centrifuge Cobas Bio (Roche Diagnostica) dans les conditions expérimentales définies au B.7.6.

Pour la détermination du  $K_m$  pour le Glu-CNA, une gamme de concentration de ce substrat est réalisée jusqu'à 9 mM; pour le  $K_m$  vis à vis de la glycylglycine, une gamme jusqu'à 150 mM est préparée.

## **C.VI Solubilisation des protéines.**

La GGT étant une protéine membranaire, il a fallu pour l'extraire, solubiliser les protéines. Pour cela, deux techniques ont été utilisées: soit par emploi d'un détergent, soit par addition d'enzymes protéolytiques.

### **C.VI.1 Solubilisation des protéines par ajout de détergent.**

**PRINCIPE :** L'utilisation détergent comme le Triton X-100 va permettre l'extraction de la totalité de l'enzyme de la membrane.

#### **REACTIFS**

- Triton X100
- Acétone
- PBS sans calcium ni magnésium
- Tris-HCl 50 mM, pH 8

#### **METHODE**

Le culot cellulaire avec ou sans microporteurs est lavé puis repris dans du tampon PBS; du Triton-X100 est additionné afin d'obtenir une concentration finale de 0,5% (v/v). Le mélange est incubé une nuit à 4°C sous agitation. Les molécules insolubles sont éliminées après une centrifugation à 105000 g pendant une heure et à 4°C. Les protéines solubilisées sont alors précipitées par de l'acétone. Un volume d'acétone identique au volume de la solution protéique est ajouté goutte à goutte au froid et sous agitation. Après une nouvelle centrifugation à 20000g pendant 30 min, le culot est séché à l'air puis est repris dans un petit volume de Tris-HCl 50 mM, pH 8.

### **C.VI.2 Utilisation d'enzymes protéolytiques.**

**PRINCIPE:** La papaïne ou la bromélaïne coupent l'enzyme au niveau de son peptide d'ancrage.

#### **REACTIFS**

- Papaïne (EC 3.4.22.2, Bœhringer Mannheim)
- Bromélaïne (EC 3.4.22.4, Bœhringer Mannheim)
- EDTA
- $\beta$  mercaptoéthanol

## *METHODE*

Le culot cellulaire avec ou sans microporteurs est lavé avec du tampon PBS et incubé avec l'enzyme en présence d'EDTA à 1mM et de  $\beta$  mercaptoéthanol à 10 mM à 37°C. La suspension cellulaire est alors centrifugée à 105000 g pendant 2 heures à 4°C. Après séparation du culot et du surnageant, un dosage des protéines totales et un dosage de l'activité GGT sont effectués sur les deux fractions.

### **C.VII Purification par chromatographie échangeuse d'anions.**

*PRINCIPE:* La chromatographie échangeuse d'anions est une chromatographie d'adsorption qui est basée sur la séparation des protéines en fonction de leur charge électrique nette. La phase stationnaire est un support sur lequel des groupements ionisables ont été fixés dont l'électroneutralité est assurée par des contres ions mobiles. Une première étape consiste à équilibrer la colonne. Les protéines vont se fixer sur les groupements ionisables par des interactions de nature électrostatique. Les protéines pourront être éluées en fonction de leur charge en augmentant la force ionique de la phase mobile.

#### *REACTIFS ET MATERIELS*

- Gel Fractogel EMD TMAE-650 (M) (Merck)
- Tris-HCl 50mM, pH 8,25
- NaCl 1M

#### *METHODE*

La colonne a été réalisée avec une mini-colonne dans laquelle est coulé le gel. La colonne est équilibrée avec du tampon Tris-HCl. La chromatographie a été réalisée à basse pression. L'échantillon est introduit dans la colonne à l'aide d'une seringue par fraction de 1 ml; puis la colonne est lavée avec la solution de Tris-HCl. L'éluion sera effectuée avec du NaCl dont la concentration adéquate aura été évaluée. L'échantillon est récupéré par fractions de 1 ml. Un dosage protéique et un dosage enzymatique de GGT seront réalisés pour chaque fraction. En fin d'expérience, le gel est lavé avec une solution de NaCl 1M puis est rééquilibré comme décrit initialement.



## CHAPITRE 1

## CHAPITRE I

<b>I.1. Avant-propos</b> .....	107
<b>I.2. Production d'une enzyme membranaire humaine par des cellules de mammifères recombinantes cultivées en réacteur sur microporteurs</b> .....	109
I.2.1. Résumé .....	109
I.2.2. Introduction .....	109
I.2.3. Matériels et Méthodes.....	110
* Vecteurs: .....	110
* Transfection d'ADN dans les cellules CHO.....	111
* Dosage des protéines. ....	111
* Stabilité de la souche CHO-GGT. ....	111
* Western-blot .....	112
* Culture sur microporteurs en bioréacteur en mode discontinu. ....	112
* Méthodes analytiques.....	112
* Calculs cinétiques .....	112
I.2.4. Résultats.....	113
* Obtention d'une lignée CHO exprimant la GGT humaine.....	113
* Western-blot de la GGT humaine recombinante.....	115
* Caractéristiques cinétiques de la GGT.....	117
* Culture en bioréacteur des cellules sauvages: études cinétiques en mode discontinu.....	119
* Culture en bioréacteur des cellules recombinantes CHO-GGT: comparaison des cinétiques en mode discontinu avec celles des cellules sauvages. ....	127
I.2.5. Discussion et conclusion .....	134
<b>I.3. Annexes</b>	
Annexe 1: Clonage du cDNA-HepG2 dans un vecteur d'expression eucaryotique. ....	136
Annexe 2: L'électroporation et les cellules CHO: .....	138
1. Optimisation de la transfection des cellules CHO par électroporation. ....	138
2. Comparaison de la transfection de cellules CHO par la technique au phosphate de calcium et par électroporation.....	150
Annexe 3: Sélection des cellules CHO recombinantes par résistance au G418..	153
Avant-propos .....	153
Influence du G418 sur les cellules CHO. ....	154
Annexe 4: Mise au point de la culture de cellules CHO sur microporteurs.....	156
<b>I.4. Conclusion du chapitre</b> .....	158

# CHAPITRE 1

## 1.1. AVANT PROPOS

Les objectifs du travail décrits dans ce premier chapitre sont, dans un premier temps, l'obtention d'une lignée CHO recombinante, exprimant la GGT humaine de façon stable, puis dans un deuxième temps la comparaison des caractéristiques cinétiques de croissance et du métabolisme cellulaire avec celles de la souche sauvage. La réalisation de cette étude passe par la mise au point d'une part d'une technique de transfection et de sélection, d'autre part par la détermination des caractéristiques catalytiques et structurales de l'enzyme recombinante et enfin, la culture en réacteur discontinu de la cellule sauvage, puis de la souche recombinante. La figure I.1 schématise les différentes contributions apportées pour la mise au point de la cellule recombinante. L'ensemble de ce travail devrait apporter des éléments de réponse à plusieurs questions telles que: la recombinaison génétique consécutive à la transfection d'un ADN hétérologue dans une cellule animale va-t-elle modifier les caractéristiques cinétiques de celle-ci par rapport à la cellule sauvage dans des cultures en réacteur discontinu ? ; la culture en masse d'une cellule animale recombinante pour la production d'une enzyme membranaire est-elle réalisable ?

La rédaction de cette étude sera présentée sous la forme globale d'une pré-publication, ce qui entraîne inévitablement des redondances par rapport aux chapitres Matériels et Méthodes et Bibliographie mais qui permet de réaliser une première ébauche assez synthétique des résultats. Cette présentation a l'inconvénient majeur de donner un ensemble décousu où les mises au point nécessaires ne seront pas incluses dans le texte mais détaillées dans des annexes à la fin du chapitre. On trouvera donc successivement, un résumé, une introduction, une description brève des méthodes (le détail des techniques sera retrouvé dans le chapitre Matériels et Méthodes), l'ensemble des résultats et la discussion.

Les mises au point et études complémentaires seront plus amplement décrites dans des annexes regroupées à la fin du présent chapitre, notamment une étude sur la perméabilité, la viabilité et le taux de transfection de cellules CHO en fonction de différents paramètres d'électroporation. L'électroporation sera comparée à la technique au phosphate de calcium, les conditions de sélection seront déterminées ainsi que les expériences préliminaires pour définir les conditions appropriées de culture des cellules CHO.

Les résultats numériques expérimentaux correspondant aux comptages cellulaires et aux différents dosages seront représentés sous forme de courbes sans filtrage; en effet, aucun système de filtrage disponible actuellement ne nous a paru adapté aux résultats expérimentaux dont nous disposons; ceci probablement en raison d'un nombre de points expérimentaux insuffisants et surtout en raison d'erreurs d'estimations cellulaires et de dosages importantes. Cependant, les différentes vitesses spécifiques de croissance, de consommation et de production seront lissées afin de montrer une allure générale plus représentative des courbes.

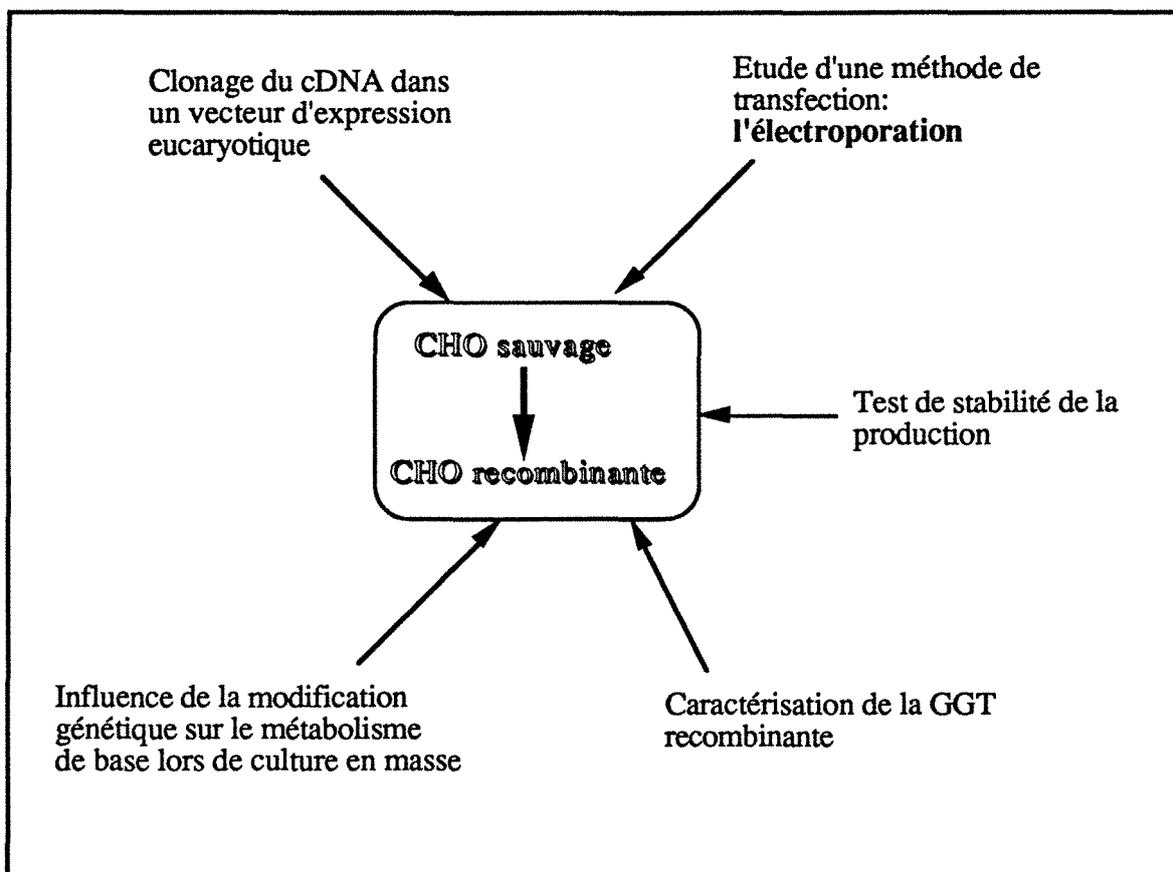


Figure I.1: schéma des différentes études nécessaires à la mise au point de la cellule CHO-GGT recombinante.

## **1.2. PRODUCTION D'UNE ENZYME MEMBRANAIRE HUMAINE PAR DES CELLULES DE MAMMIFERES RECOMBINANTES CULTIVEES SUR MICROPORTEURS EN REACTEUR.**

### **1.2.1. RESUME.**

Des cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) ont été cotransfectées par deux vecteurs d'expression eucaryotiques: un vecteur dans lequel a été cloné le cDNA de la GGT humaine, derrière le promoteur de cytomégalovirus (CMV) et un deuxième vecteur portant le gène de résistance *neo*; l'expression de ce dernier étant dirigée par le promoteur précoce de SV40. La production de gamma-glutamyltransférase (GGT) humaine a été testée sur les cellules transfectées, résistantes à la généticine (G418) et le clone le plus producteur a été sélectionné. La stabilité de ce clone a été étudiée au cours du temps et une productivité moyenne de GGT de 2500 mU / mg de protéines a été obtenue sur 18 passages. Les cellules CHO sauvages ont été ensuite cultivées sur microporteurs en bioréacteur en mode discontinu afin de déterminer les caractéristiques cinétiques de la souche et de les comparer à celles de la souche recombinante cultivée dans les mêmes conditions: il n'est pas apparu de différences significatives dans les analyses cinétiques réalisées. Il a été obtenu 250 unités de GGT humaine par litre de réacteur avec une densité cellulaire de  $8,5 \cdot 10^5$  cellules / ml.

### **1.2.2. INTRODUCTION.**

L'application des techniques du génie génétique à des organismes eucaryotiques a permis d'accroître considérablement le potentiel de la culture de cellules animales. L'expression de protéines humaines dans des cellules de mammifères en culture fournit une bonne approximation de la synthèse protéique *in vivo*. En effet, la glycosylation des protéines peut être réalisée par des cellules de mammifères recombinantes alors qu'elle n'est pas effectuée par la plupart des systèmes procaryotiques, ce qui peut être primordial pour des protéines dont l'activité biologique dépend des modifications post-traductionnelles (BUSBY et al,1985; DUBE et al,1988).

Plus particulièrement, des cellules support-dépendantes ont largement été employées pour la production de diverses protéines thérapeutiques: des vaccins, des enzymes, des facteurs de croissance et des hormones à l'aide de supports variés tels que microporteurs, billes de verre, billes macroporeuses, matrices céramiques (MIGNOT et al, 1990; SONODA et al, 1988). Dans cette optique, la culture de cellules CHO a prouvé être un bon modèle pour la production de

protéines hétérologues telles que  $\beta$ ,  $\gamma$  interféron, facteur VIII, tPA, facteur IX (NILSSON et al, 1988; FAURE et al, 1989; MC CORMICK et al, 1984; HAYTER et al, 1992; KAUFMAN et al, 1986).

La mesure de l'activité GGT dans le sérum humain est couramment utilisée en biologie clinique car elle est un excellent marqueur de désordres hépatobiliaires. Cette enzyme membranaire glycosylée intervient à plusieurs niveaux dans le métabolisme: régulation du taux de glutathion, synthèse des leucotriènes, détoxification des composés électrophiles .

Par ailleurs, peu d'études sur la production d'autres glycoprotéines recombinantes membranaires ont été réalisées jusqu'à présent, mais on peut citer l'expression d'antigène de cellule T humaine comme T8 et T4 (LITTMAN et al,1985), de récepteurs de surface de l'interleukine 2.

L'étude présentée ici a plusieurs objectifs: en premier lieu, elle a pour but de mettre au point une lignée cellulaire CHO exprimant de façon stable une enzyme membranaire humaine: la  $\gamma$  glutamyltransférase (GGT). Quelques caractéristiques structurales et catalytiques seront comparées à celles de GGT d'origines diverses. La culture en masse de cette souche recombinante sera alors envisagée en bioréacteur en mode discontinu et la faisabilité de l'expression d'une enzyme membranaire par cellules recombinantes cultivées en masse sera vérifiée. La croissance et le métabolisme cellulaire de la cellule recombinante seront comparés à ceux de la lignée sauvage afin de voir si les modifications génétiques d'une cellule peuvent modifier le comportement de celle-ci cultivée en masse.

### 1.2.3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### \* Vecteurs:

Le cDNA de la GGT humaine inséré dans le plasmide pUC19 est un don du Pr Siest (Centre du médicament). Ce cDNA comprend la partie codante (1710pb), la région 5' non codante (487 pb) et la région 3' non codante (129 pb) contenant le signal de polyadénylation. Une ligation entre l'insert *EcoRI* du cDNA de la GGT (2,4 kb) et du vecteur d'expression pcDNA1 (Stratagène) digéré par *EcoRI* a été effectuée. Un clone recombinant pcDNA1-GGT, dans lequel le cDNA est inséré dans le bon sens derrière le promoteur CMV, a été isolé puis amplifié dans *E.Coli* MC1061/P3 et purifié {le protocole détaillé est donné dans le chapitre Matériels et Méthodes; on trouvera les cartes de restriction des vecteurs et du cDNA dans l'annexe 1 à la fin de ce chapitre.}

Un deuxième vecteur d'expression pMAMneo (Clontech) possédant un gène de résistance à la généticine (G418) servira à la sélection des cellules transfectées.

#### \* transfection d'ADN dans les cellules CHO.

Les cellules CHO-K1 sauvages sont propagées dans du milieu de culture Ham F12 supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal. Les cellules sont incubées à 37°C dans une étuve régulée en humidité et en taux de CO<sub>2</sub>. Les cellules CHO-K1 (1.10<sup>7</sup> cellules) ont été cotransfectées avec 10 µg de pMAMneo linéarisé et 20 µg de pcDNAI-GGT linéarisé, par électroporation. Une étude plus complète sur la viabilité et le taux de transfection en fonction des conditions d'électroporation a été réalisée et est détaillée dans l'annexe 2. Les conditions expérimentales optimales d'électroporation (électroporateur APELEX) ont été déterminées et sont les suivantes: après 10 minutes de mise en contact des cellules avec les deux vecteurs et à 4°C, 5 impulsions de 30 µs à 9 kV/cm sont appliquées. Après une nouvelle incubation de 10 minutes à 4°C, les cellules sont remises en culture dans des boîtes de pétri à raison de 10<sup>6</sup> cellules par boîte. 48 heures après est débutée la sélection en additionnant 400 µg/ml de G418 (Généticine, Gibco): l'annexe 3 explicite la détermination de la concentration de G418 nécessaire à la sélection.

Le milieu est renouvelé tous les trois jours et 14 jours après l'addition du milieu de sélection, les clones sont récupérés avec des cylindres de clonage et sont cultivés séparément en puits puis en boîtes. Pour les différents dosages, les cellules à confluence sont grattées puis lavées au PBS et congelées sous forme de culot sec à -20°C.

#### \* dosage des protéines.

L'activité GGT et les constantes cinétiques sont déterminées comme décrit par PETITCLERC et al (1980): une unité enzymatique étant définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer 1 µmole de L-γ-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide par minute.

La concentration protéique totale est dosée par la méthode de Bradford (BRADFORD, 1976) en utilisant l'albumine de sérum bovin comme standard.

#### \* Stabilité de la souche CHO-GGT.

Le clone ayant la plus grande activité spécifique est cultivé en boîtes de 75 cm<sup>2</sup> pendant 18 passages (54 jours) en présence ou en absence de généticine (G418) pour vérifier la stabilité de la productivité de GGT au cours du temps. A chaque passage, une mesure de l'activité GGT et un dosage de protéines totales sont réalisés.

#### \* Western-blot

A partir de culots cellulaires congelés puis repris dans une solution de Tris HCl 50 mM, pH 8, les protéines sont solubilisées par 0,5% de Triton X100 pendant une nuit à 4°C puis précipitées à l'acétone.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS est effectuée selon la technique de Laemmli (1970). Le transfert est réalisé sur membrane Immobilon-P (Millipore) selon la technique de Burnette (1981). La détection des antigènes de la GGT est réalisée avec un premier anticorps polyclonal de GGT de rein humain (don du Pr Siest) et un deuxième anticorps IgG anti-rat marqué à la phosphatase alcaline (Sigma).

#### \* culture sur microporteurs en bioréacteur en mode discontinu.

Les cellules CHO ou CHO-GGT sont cultivées en bouteilles roulantes dans du milieu Ham F12/DMEM (1:1) + 5% SVF + 4mM Glutamine +1% d'acides aminés essentiels + 0,5% d'acides aminés non essentiels (ATGC). Après trypsination, elles sontensemencées dans un bioréacteur de 4 l (Sétric) avec 5 g/l de cytodex 1 (Pharmacia) [une culture comparée de cellules CHO-K1 sur cytodex 1 et 3 sera montrée dans l'annexe 4]. L'agitation, de 20 rpm les deux premières heures pour faciliter l'adhésion des cellules aux microporteurs, est maintenue à 40 rpm durant le reste de l'expérimentation.

Les conditions fixées pour les régulations sont de 7,5 (régulée par CO<sub>2</sub> ou NaOH, 0,5M) pour le pH et une pO<sub>2</sub> correspondant à 50% de la saturation de l'air.

#### \* méthodes analytiques

Des prélèvements sont effectués deux fois par jour pour permettre les dosages des concentrations de substrats (glucose, glutamine, acides aminés) et de produits (ions ammonium et lactate) sur le surnageant ainsi que la mesure de l'activité GGT sur le culot cellulaire pour la culture des cellules CHO-GGT. Pour la détermination de la croissance cellulaire, un échantillon est prélevé et après sédimentation des microporteurs, le surnageant est éliminé et remplacé par une solution acide citrique et cristal violet. Après incubation 1 h à 37°C, les microporteurs sont agités afin de décrocher les noyaux ; les noyaux colorés sont alors dénombrés à l'aide d'un hémacytomètre.

### \* calculs cinétiques

L'ensemble des calculs cinétiques seront retrouvés en détail dans le chapitre Matériels et Méthodes.

En mode discontinu, la vitesse spécifique de croissance est définie telle que:

$$\mu_{app} = 1 / X_v \cdot dX_v / dt \quad \text{avec } X_v : \text{cellules vivantes attachées aux microporteurs}$$

sachant que,  $\mu_{réel} = \mu_{app} + k_{décès}$  et  $\mu_{réel} = 1 / X_v \cdot dX_{tot} / dt$   
avec  $X_{tot}$ : cellules totales dans le bioréacteur

et  $k_{décès} = 1 / X_v \cdot dX_m / dt$   $X_m$ : cellules mortes

La vitesse spécifique maximale de croissance moyenne est déterminée, pendant la phase exponentielle de croissance, par la pente de la droite obtenue lorsque l'on porte  $\text{Log } X_v$  en fonction du temps.

Les vitesses spécifiques de consommation et de production sont définies comme suit:

$$\nu_s = 1 / X_v \cdot dS / dt \quad \text{avec } S : \text{concentration du substrat}$$

et  $\pi_p = 1 / X_v \cdot dP / dt$  avec  $P$  : concentration du produit

Les différentes vitesses spécifiques de consommation et de production seront exprimées en  $10^{-10}$  mmole / cellule. h.

## **1.2.4. RESULTATS**

### **1.2.4.1. Obtention et caractérisation d'une protéine membranaire recombinante exprimée par des cellules CHO recombinantes**

La première étape consiste à transférer un vecteur d'expression eucaryotique, dans lequel a été cloné le cDNA d'intérêt, dans des cellules CHO. Parmi les différents clones obtenus après sélection, le clone le plus producteur a été sélectionné; la stabilité de la production au cours du temps a été vérifiée en absence ou en présence de pression de sélection. Les propriétés structurales et catalytiques ont été comparées à des GGT d'origines diverses.

### obtention d'une lignée CHO exprimant la GGT humaine

Les deux vecteurs d'expression eucaryotiques, l'un portant le cDNA de la GGT humaine et l'autre le gène de résistance à la généticine ont été cotransfectés dans les cellules CHO-K1, par électroporation (voir annexe 2 pour l'optimisation de l'électroporation sur les cellules CHO). Le taux de transfection (nombre de clones obtenus / nombre de cellules transfectées initialement) calculé après deux semaines de sélection est de  $1.10^{-3}$ .

Après deux semaines de sélection (voir annexe 3, l'étude des conditions de sélection) dans du milieu additionné de 400 µg / ml de G418, une trentaine de clones ont été repris, cultivés et des dosages de GGT ont été effectués.

Une grande disparité dans la morphologie cellulaire et dans les vitesses de croissance de ces différents clones a pu être observée: certains clones présentant une morphologie plus ronde et une vitesse de croissance plus lente que celles des cellules sauvages.

Parmi ces 30 clones, 22 ont montré une activité GGT allant de 50 à 2500 mU / mg de protéines; les cellules sauvages ayant, elles, une activité GGT non détectable.

Le clone 21, le plus producteur a été appelé CHO-GGT et l'étude de la stabilité de ce clone a été entreprise durant 18 passages en flacons statiques (54 jours) en présence de G418 et, en parallèle, à partir du cinquième passage sans G418. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure I.2.

Notons qu'il a été vérifié que la GGT était très peu excrétée dans le milieu de culture (de l'ordre de 11 U / l).

En présence comme en absence de G418, le clone CHO-GGT présente une activité stable au cours du temps, pendant près de deux mois (c'est-à-dire environ 77 générations), indiquant une intégration du cDNA dans son génôme. Ceci permettra par la suite de cultiver en masse les cellules CHO-GGT sans addition de G418 dans le milieu de culture. Des études similaires réalisées sur des cellules CHO déficientes pour DHFR, exprimant le tPA (BARSOUM, 1990) ont montré une stabilité dans le taux d'expression et dans le nombre de copies d'ADN, sans appliquer de pression de sélection pendant plus de 185 générations. Par contre, d'autres auteurs (WEIDLE et al, 1988) ont trouvé une instabilité de l'ADN transfecté en absence de pression de sélection.

L'activité spécifique mesurée en boîte de culture pour CHO-GGT de 2500 mU / mg de protéines correspond à 20 mU /  $10^5$  cellules. Dans la suite de ce travail, l'activité GGT sera rapportée au volume afin de faciliter les interprétations et les comparaisons entre cultures; l'activité GGT sera donc donnée en U / l.

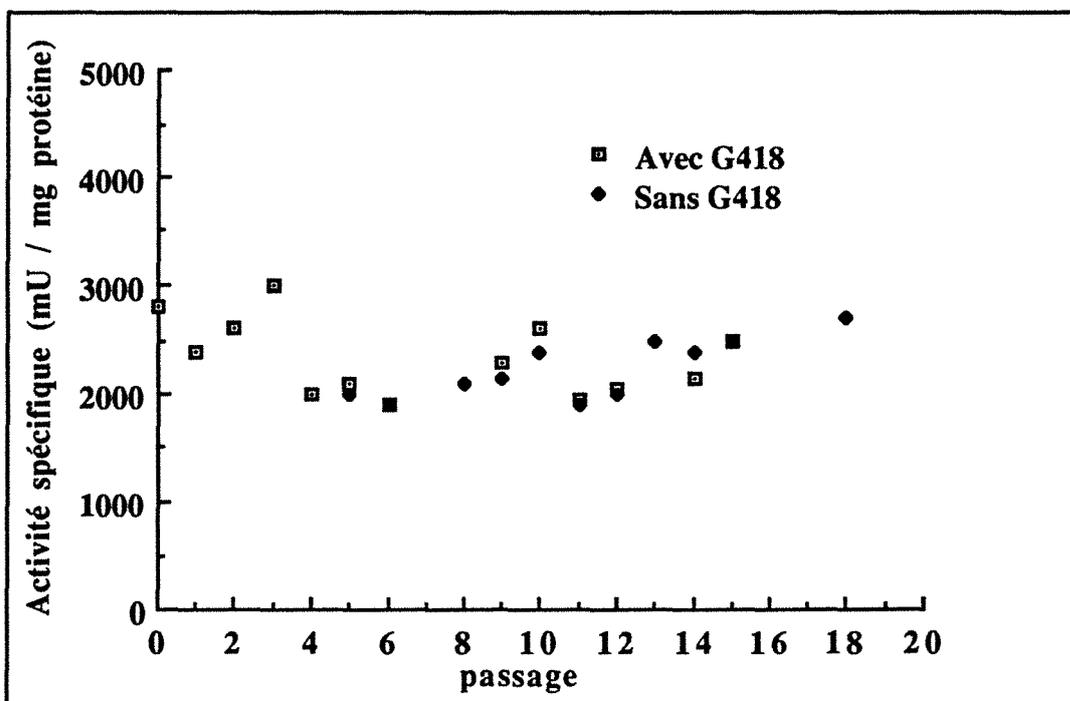


Figure I.2.: Etude de la stabilité de l'activité spécifique de la GGT au cours de passages successifs; cette étude a été réalisée en flacons statiques, avec ou sans pression de sélection.

#### Western-blot de la GGT humaine recombinante.

A partir de culots cellulaires, les protéines ont été dans un premier temps solubilisées par du Triton X-100 puis, dans un deuxième temps, précipitées à l'acétone.

Ces protéines ainsi que des extraits cellulaires bruts ont été analysés après immunoblotting, avec des anticorps polyclonaux dirigés contre la GGT de rein humain.

La photo I.A montre le résultat du Western Blot obtenu; le profil des protéines issues des cellules sauvages (piste 1) ne montre aucun signal caractéristique de la GGT; le profil de l'homogénat de cellules CHO-GGT (piste 2) présente de nombreuses bandes non spécifiques de la GGT (ce phénomène est lié à l'utilisation d'un antisérum non purifié); par contre après solubilisation des protéines issues de cellules CHO-GGT, deux signaux distincts ont pu être mis en évidence. Ainsi, deux classes de peptides ont été séparées avec des masses moléculaires respectivement de 65-70kDa et 25-30 kDa, correspondant probablement aux deux sous-unités respectivement lourde et légère de la GGT. Le précurseur de la GGT recombinante de CHO-GGT n'est pas visible comme pour la GGT recombinante de cellules V79-HGGT (VISVIKIS et al, 1991). Les deux sous-unités apparaissent sous forme de bandes diffuses, qui pourraient être attribuées à des "glycoformes" différentes. Le tableau I.A montre quelques exemples de masses moléculaires des sous-unités de GGT d'origines différentes. Les deux sous-unités de la GGT recombinante de cellules CHO-GGT présentent des masses moléculaires comparables de celles de GGT issues de différents tissus.



origine	MM (kDa) de l'enzyme native	MM (kDa) de la sous-unité lourde	MM (kDa) de la sous-unité légère	Références
Rein humain	86	62	22	Tate et Ross (1977)
Foie humain	90	68	20	Visvikis et al (1990)
Sérum humain	variable <sup>a</sup>	ND	ND	Huseby (1977)
HepG2	120	chaîne unique > 100 kDa		Visvikis et al (1990)
V79-HGGT	-	60-64	27-31	Visvikis et al (1991)
CHO-GGT	-	65-70	25-30	ce travail

tableau I.A: masse moléculaire de GGT d'origines différentes: ND non déterminé; MM masse moléculaire.

a: Différentes masses moléculaires ont été trouvées dans le sérum humain; ceci est probablement dû à des associations de la GGT avec d'autres protéines du sérum: voir la revue de Huseby (1977).

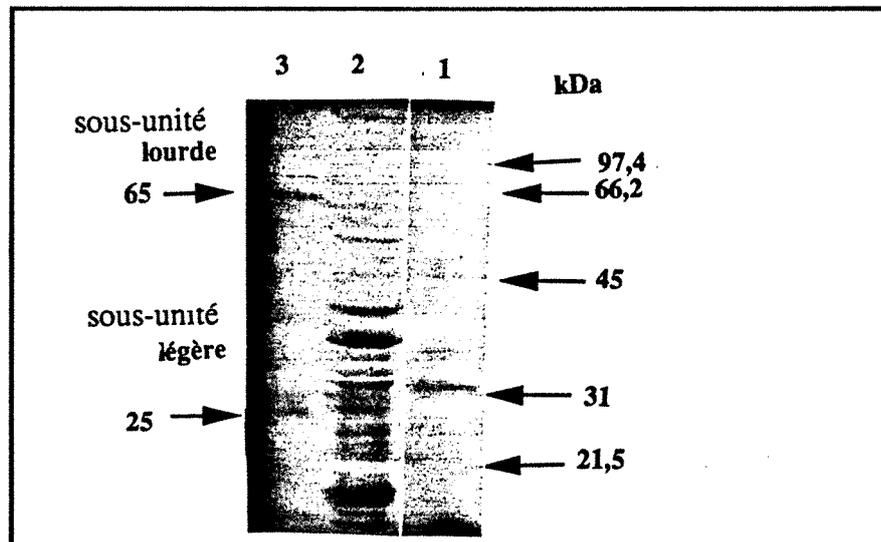


Photo I.A.: profil protéique obtenu après immunodétection d'un western blot; la révélation a été réalisée à l'aide d'un antisérum anti-GGT de rein humain.

1. protéines solubilisées par du Triton X-100 puis précipitées à l'acétone à partir de cellules sauvages CHO (20 µg de protéines)
2. homogénat de cellules CHO-GGT (20 µg de protéines)
3. protéines solubilisées par du Triton X-100 puis précipitées à l'acétone à partir de cellules CHO-GGT (20 µg de protéines)



### Caractéristiques cinétiques de la GGT

Les constantes catalytiques ont été déterminées à partir d'extraits cellulaires bruts. L'influence de la concentration en gamma-L-glutamyl-3-carboxy-4-nitranilide et en glycyglycine sur l'activité GGT de la protéine recombinante est représentée sur la figure I.3. A partir des tracés en double inverse (représentation de Lineweaver-Burk's), les  $K_m$  pour le substrat donneur (GluCNA) et pour le substrat accepteur (glygly) ont été déterminés, en extrapolant les portions de droites obtenues. L'influence du pH sur l'activité enzymatique est également présentée.

Les valeurs de  $K_m$  sont respectivement de  $0,7 (\pm 0,05)\text{mM}$  pour le  $K_m^D$  (donneur) et de  $6,5 (\pm 0,5)\text{mM}$  pour le  $K_m^A$  (accepteur). Le tableau I.B résume les valeurs des  $K_m$  apparents, obtenues pour la lignée CHO-GGT, comparées à d'autres valeurs de constantes cinétiques pour des GGT de différentes origines. Il montre que les valeurs des constantes catalytiques sont très proches de celles obtenues pour HepG2 (VISVIKIS, Thèse, 1989) et pour la GGT du sérum. Le pH optimum est de 7,9, identique à celui du sérum et du foie humain.

SHAW et al (1978) ont montré que le taux initial obtenu en absence de glycyglycine, était dû à l'autotranspeptidation, lorsque le  $\gamma$ -glutamyl-carboxynitroanilide ou le  $\gamma$ -glutamylnitroanilide était utilisé comme substrat donneur. La GGT recombinante présente également une activité non nulle en absence de glycyglycine, représentant environ 15% de celle mesurée avec 0,15 M de glygly. Ceci présume donc d'une fonction catalytique d'autotranspeptidation. D'autres auteurs (PETITCLERC et al, 1980) ont suggéré que l'autotranspeptidation n'était pas la seule réaction possible en absence de glycyglycine, et que l'hydrolyse du substrat donneur entraînait également en jeu.

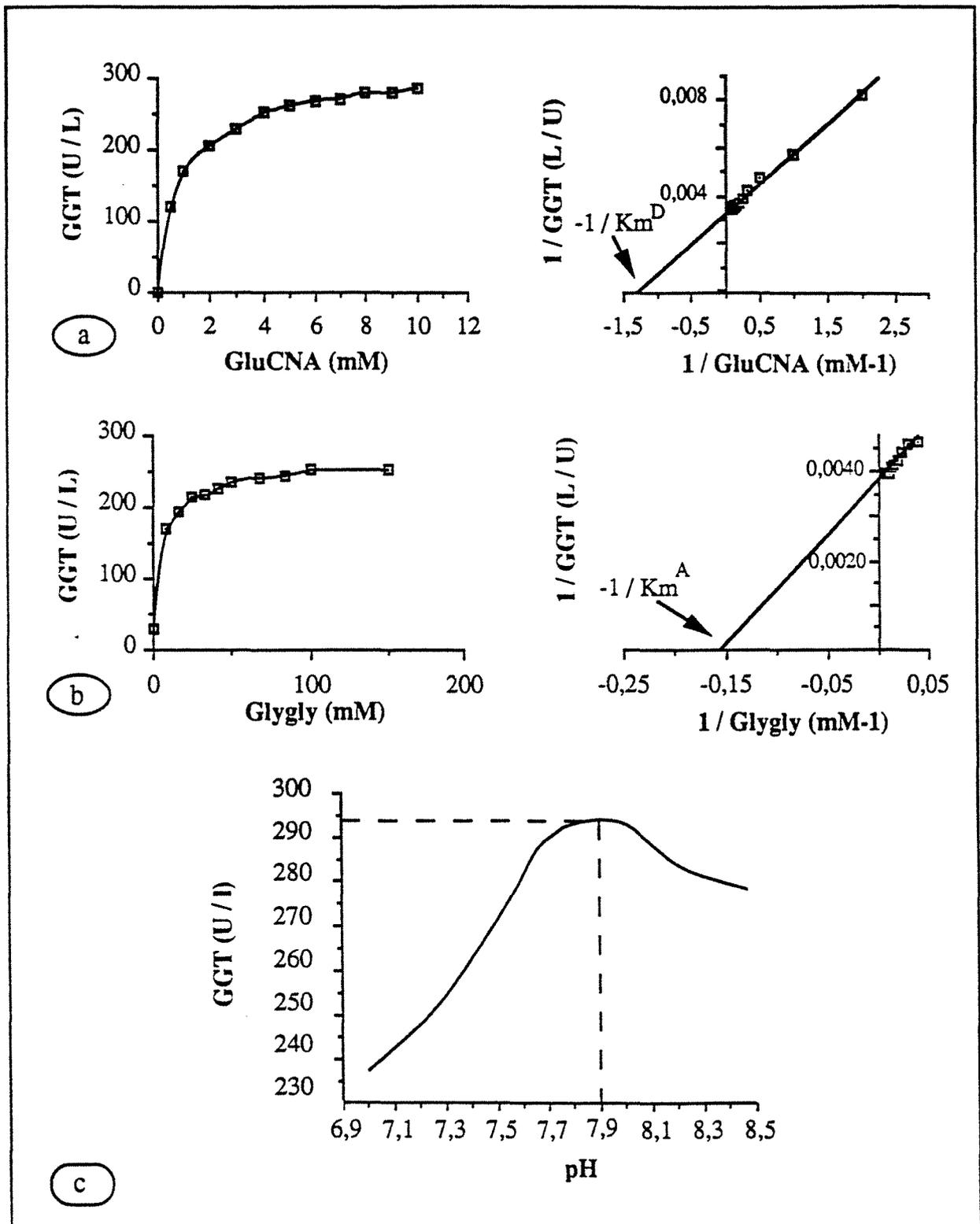


figure 1.3: effet de la concentration du GluCNA (a), de la glycylglycine (b) et du pH (c) sur l'activité enzymatique de la GGT recombinante; les conditions expérimentales sont les suivantes: 30°C; 0,1M Tris-HCl, pH 8,25; 0,15 M glygly pour la variation de l'activité GGT en fonction de la concentration en GluCNA et 30°C; 0,1 M Tris-HCl; pH 8,25; 6mM GluCNA pour la variation de l'activité GGT en fonction de la concentration en glygly.

Origine	GGT	pH optimal	K <sub>mD</sub> (mM)	K <sub>mA</sub> (mM)	Références
produite <i>in vitro</i>	HepG2 -GGT	7,6	0,74	9,5	Visvikis et al (1989)
GGT extraite de tissus	Rein de porc	8,3	1,12	31	Schiele et al (1987)
	Sérum humain	7,9	0,83	17,2	Schiele et al (1987)
	Rein humain	8,25	1,15	12,5	Visvikis et al (1989)
	Foie humain	7,9	0,61	ND	Visvikis et al (1989)
produite <i>in vitro</i> par cellules animales recombinantes	V79HGGT	8,1	0,85	7,5	Visvikis et al (1991)
	CHO-GGT	7,9	0,7	6,5	ce travail

Tableau I.B: comparaison des propriétés catalytiques de GGT issues de différentes origines  
K<sub>mD</sub>: constante d'affinité pour le substrat GluCNA  
K<sub>mA</sub>: constante d'affinité pour le substrat Glygly  
ND: non déterminé

#### 1.2.4.2. Comparaison de culture de cellules CHO sauvages et de cellules CHO recombinantes en bioréacteur.

Ayant maintenant à disposition une souche recombinante exprimant de façon stable la GGT, la culture en masse de ces cellules va être abordée afin d'établir les caractéristiques cinétiques de croissance et de métabolisme de cette lignée. Dans un premier temps, ce sont les caractéristiques de la lignée sauvage qui seront déterminées puis dans un deuxième temps, elles seront comparées avec celles de la lignée recombinante.

##### Culture en bioréacteur des cellules sauvages: études cinétiques en mode discontinu.

Les cellules sauvages ont été cultivées en bioréacteur de 4 litres. Le pH est maintenu à 7,4 et la pO<sub>2</sub> à 50% de la saturation de l'air. Le milieu de culture est supplémenté avec 5% de

SVF, 2,5mM de glutamine et des acides aminés essentiels et non essentiels; les cellules sont ensemencées dans le réacteur avec 5g/l de microporteurs cytodex 1 {voir annexe 4 pour la mise au point de la culture de cellules CHO (type de microporteurs, taux et conditions d'ensemencement)}.

Les cinétiques de culture: prolifération cellulaire, consommation de substrats (glucose, glutamine), formation de déchets (lactate et ions ammonium), sont représentées sur la figure I.4.

Le taux d'ensemencement choisi est de  $10^5$  cellules par millilitre correspondant à  $6.10^3$  cellules /  $\text{cm}^2$  de microporteurs. La courbe suivant l'évolution de la concentration cellulaire au cours du temps peut se diviser en deux phases, une phase de croissance d'environ 90 heures avec obtention d'une concentration cellulaire maximale de  $8,5.10^5$  cellules / ml et un  $\mu_{\text{app}}(\text{max})$  de  $0,037 \text{ h}^{-1}$  puis une phase de décroissance cellulaire, due au ralentissement de la croissance et à l'accélération du décès, pendant laquelle les cellules se décrochent des microporteurs et sont considérées comme étant des cellules mortes. L'ensemble de la culture en mode discontinu s'étend environ sur une durée totale de 175 h.

Le glucose est rapidement consommé et est totalement épuisé en 80 h. L'apparition de lactate est couplée à la disparition du glucose; sa concentration dans le milieu se stabilise à environ 12mM, après qu'il ait été légèrement reconsommé. Leist (1988) a montré des résultats similaires et suppose une utilisation du lactate comme source de carbone lorsque le glucose a été complètement épuisé dans le milieu.

La conversion glycolytique du glucose en lactate, caractérisée par le rendement  $Y_{\text{lac}/\text{glc}}$  est représentée par la courbe du lactate produit en fonction du glucose consommé à chaque instant. A pH 7,4, le calcul du rendement donne  $Y_{\text{lac}/\text{glc}} = 1,5 \text{ mole / mole}$  (figure I.5a) correspondant à 75 % du glucose initial transformé en lactate, résultat analogue à celui obtenu pour des cellules CHO recombinantes exprimant l'interféron humain (SMILEY ET AL, 1989).

La consommation de glutamine est parallèle à celle du glucose. Sa concentration devient inférieure à 1 mM après 80 h de culture et peut être également considérée comme limitante pour la croissance. Sa consommation coïncide avec la production d'ions ammonium et le rendement  $Y_{\text{NH}_4/\text{gln}} = 0,5 \text{ mole / mole}$  (figure I.5b); cette valeur est proche de celle obtenue pour des cellules CHO productrices d'antithrombine III humaine (SCHMID ET JOHANNSEN, 1990).

La figure I.6 regroupe les évolutions des différentes vitesses spécifiques obtenues à partir des tracés de la figure I.4. Nous pouvons observer (figure I.6.a) une vitesse spécifique de croissance,  $\mu_{\text{app}}$ , qui augmente pendant 48 h jusqu'à une valeur de  $0,04 \text{ h}^{-1}$ , correspondant à

un temps de génération de 16 h. Après 48 h de culture, cette vitesse chute pour atteindre une valeur nulle à environ 80 h.

Les vitesses spécifiques de consommation de glucose et de glutamine (figure I.6.b) sont maximales en début de culture puis décroissent. La vitesse spécifique de consommation de glucose s'annule après 90 h de culture alors que celle de la glutamine chute rapidement les 40 premières heures de culture puis se stabilise avant de s'annuler.

Les vitesses spécifiques de production d'ions ammonium et de lactate (figure I.6.c) montrent une diminution de la vitesse de production de lactate jusqu'à une valeur nulle après 90 h de culture, et une vitesse spécifique de production d'ions ammonium faible et fluctuante autour de 0,5 mmole / cellule.h.

L'arrêt de la croissance cellulaire et le décès cellulaire après 90 h de culture sont liés aux limitations nutritionnelles (glucose, glutamine, acides aminés) ou à une accumulation de produits toxiques autres que le lactate ou les ions ammonium. En effet, des études (HAYTER et al,1991) ont montré que l'addition de concentrations de 17,5mM de lactate et de 2mM d'ions ammonium en début de culture n'affectaient pas la croissance de cellules CHO-K1. D'autres études (SCHLAEGER ET SCHUMPP, 1989) ont précisé que des concentrations de 8-10 mM d'ions ammonium et 90-110 mM de lactate étaient requises pour avoir 50% d'inhibition de la croissance cellulaire de cellules CHO.

Quant aux limitations nutritionnelles, la disparition du glucose dans le milieu de culture coïncide avec l'arrêt de la croissance cellulaire et pourrait être considéré comme limitant; cependant de nombreuses études réalisées sur diverses lignées cellulaires telles que cellules HeLa, hybridomes, cellules CHO (REITZER ET AL,1979; MILLER ET AL,1989; HAYTER ET AL, 1991) ont montré qu'une augmentation de la concentration du glucose dans le milieu, augmentait la vitesse spécifique de consommation de ce substrat avec une augmentation parallèle de la vitesse spécifique de production de lactate, sans améliorer pour autant la croissance cellulaire. Ce phénomène suggère que les cellules utilisent le glucose moins efficacement en présence de fortes concentrations en glucose. L'augmentation de la concentration de glucose dans le milieu initial de culture n'est donc pas une solution envisageable pour empêcher une limitation en glucose; une alimentation en glucose au cours du temps, en fonction du besoin des cellules, serait préférable.

De même pour la glutamine, une concentration initiale de 6 mM ( résultats non présentés ici) a été testée et a abouti à une augmentation de la production en ions ammonium sans améliorer la vitesse spécifique de croissance.

D'autres limitations nutritionnelles peuvent intervenir, notamment en acides aminés; c'est pourquoi l'évolution des concentrations en acides aminés au cours de la culture a également été examinée et est résumée sur les courbes de la figure I.7. Ce suivi du profil des acides aminés de la cellule sauvage permettra d'établir quels sont les acides aminés consommés et ceux produits. La figure I.7a indique les voies d'entrées des acides aminés dans les cycles métaboliques (THOMAS, 1990).

Un certain nombre d'acides aminés ne varient pas ou peu au cours de la culture, thréonine (92% résiduel en fin de culture), tyrosine (96% résiduel), proline (80% résiduel), phénylalanine (91% résiduel).

La glutamine est l'acide aminé le plus rapidement consommé mais sont également consommés la sérine (16% résiduel en fin de culture), l'arginine (50% résiduel), l'isoleucine (70% résiduel), la leucine (70% résiduel) et l'histidine (65% résiduel). (figure I.7c)

Au contraire, on remarque une nette production d'alanine, de glycine et de glutamate (figure I.7b). Ces produits sont également retrouvés dans des cultures d'autres lignées cellulaires (MILLER ET AL,1989). L'accumulation de glycine peut être attribuée à la consommation rapide de la sérine (SNELL ET AL,1987) alors que glutamate provient certainement du métabolisme de la glutamine.

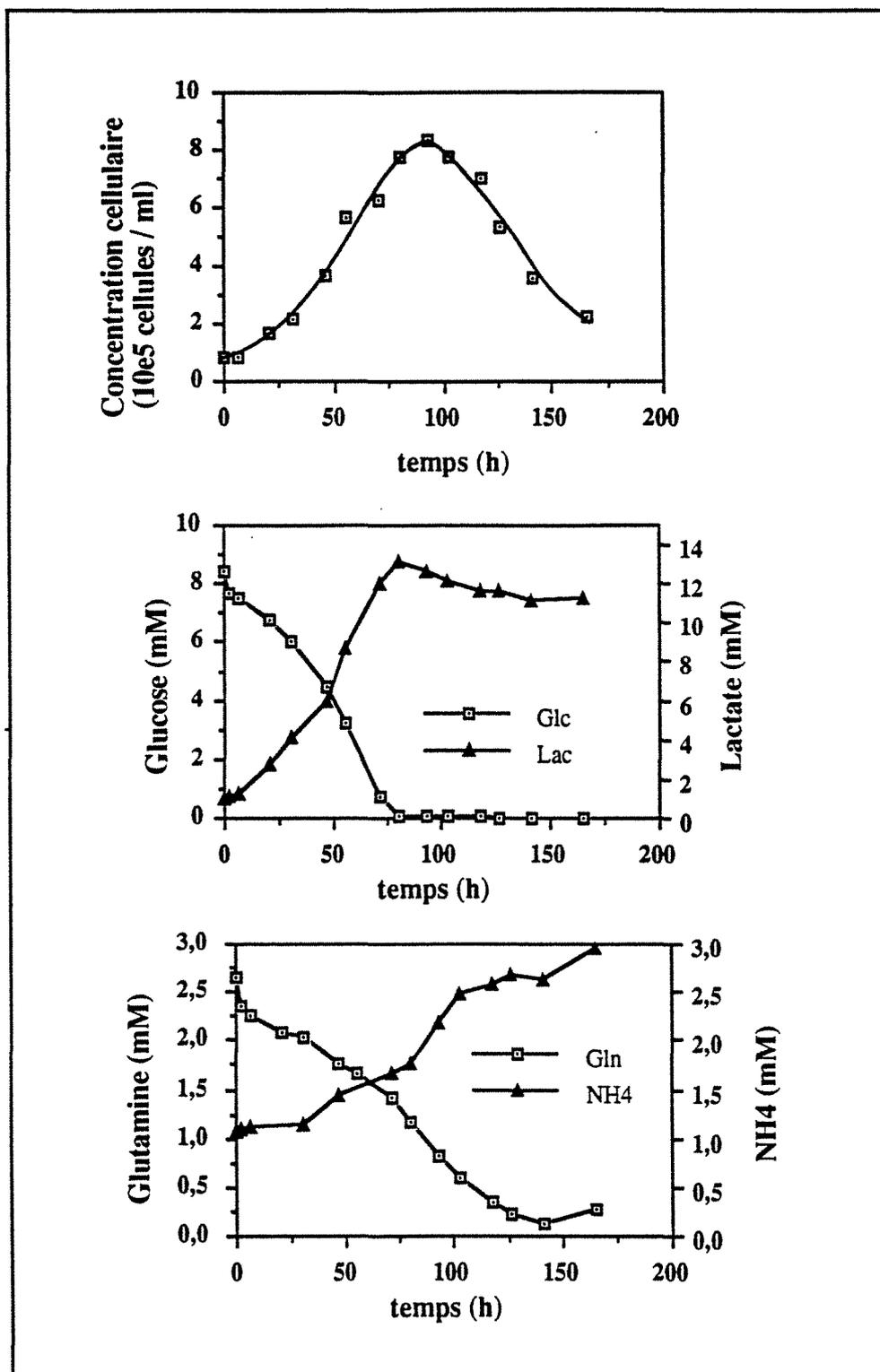


Figure I.4: cinétiques d'une culture de cellules CHO sauvages sur microporteurs en mode discontinu. Le milieu de culture est du DMEM/Ham F12 avec 9 mM de glucose et 2,5 mM de glutamine et 5% de SVF; la concentration de microporteurs est de 5 g/l et l'ensemencement est de  $1 \cdot 10^5$  cellules/ml.

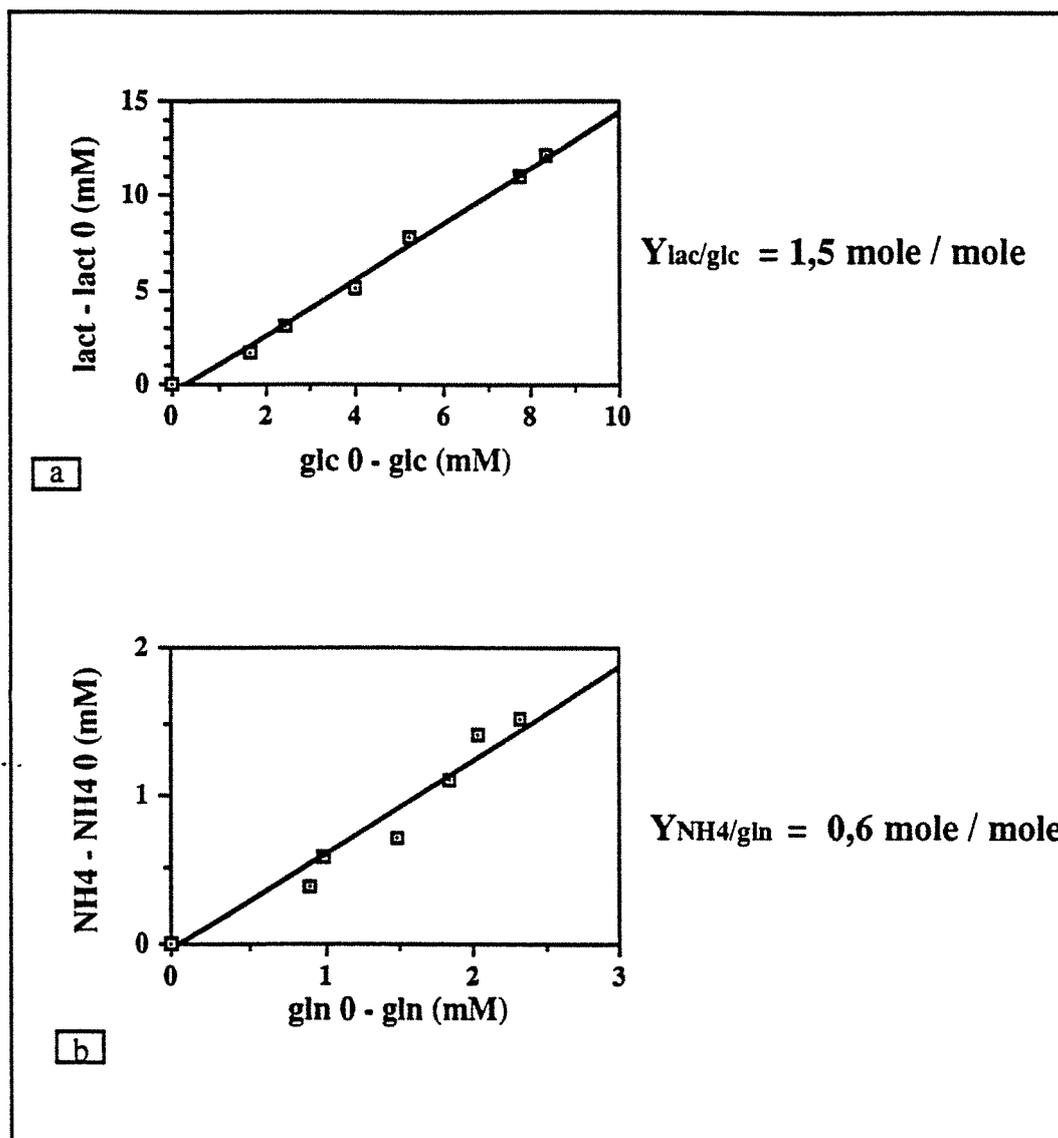


Figure I.5: détermination des rendements de conversion du glucose en lactate ( $Y_{lac/glc}$ ) et de la glutamine en ions ammonium ( $Y_{NH4/gln}$ ) pour une culture en mode discontinu;  $lac_0$ ,  $glu_0$ ,  $gln_0$  et  $NH_4_0$  sont les concentrations respectives de lactate, glucose, glutamine et ions ammonium dans le milieu au moment de l'ensemencement; les cinétiques de cette expérience sont données sur la figure I.4.

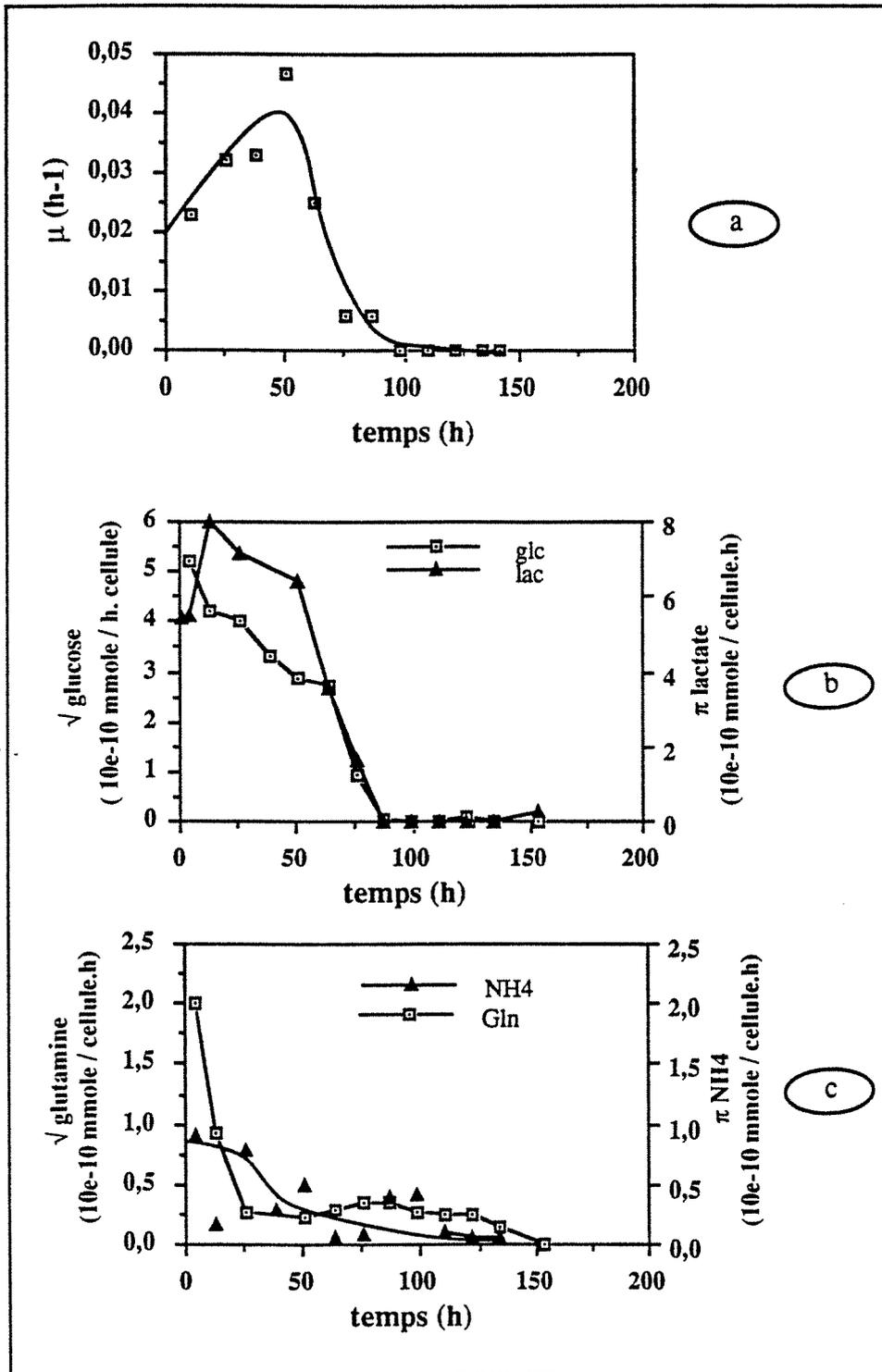


Figure I.6: évolutions des vitesses spécifiques de prolifération ( $\mu_{app}$ ), de consommation de glucose ( $\sqrt{glc}$ ), de glutamine ( $\sqrt{gln}$ ) et de production de lactate ( $\pi_{lac}$ ) et d'ions ammonium ( $\pi_{NH4}$ ) au cours de la culture en mode discontinu des cellules CHO sauvages; les cinétiques complètes de la culture sont tracées sur la figure I.4.

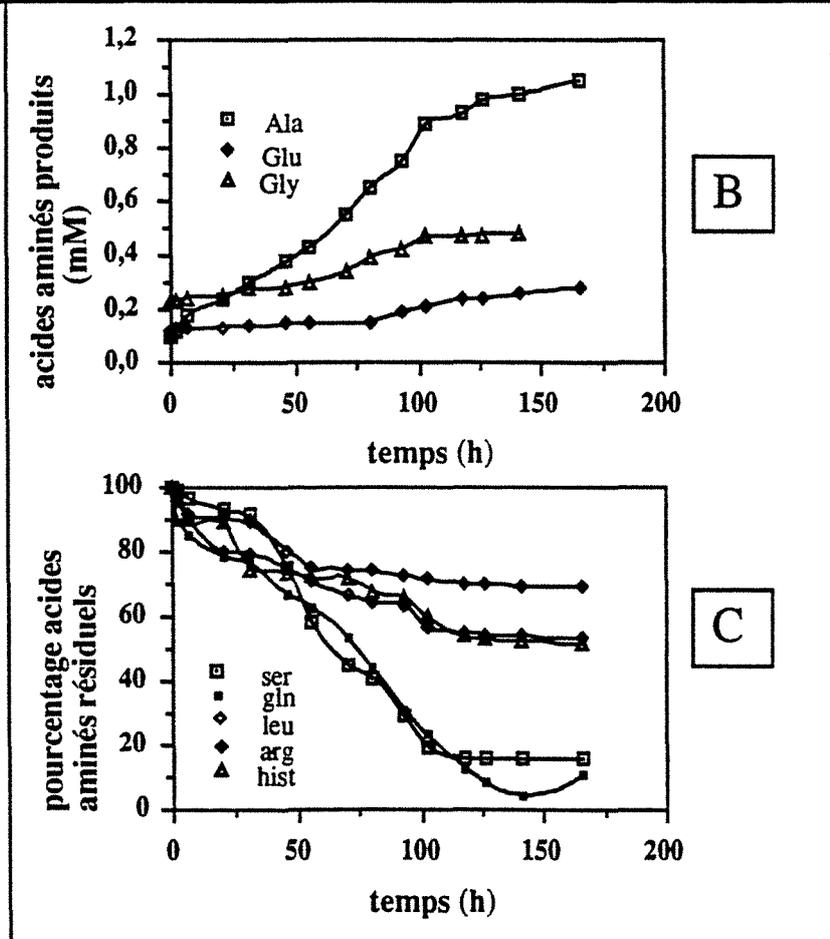
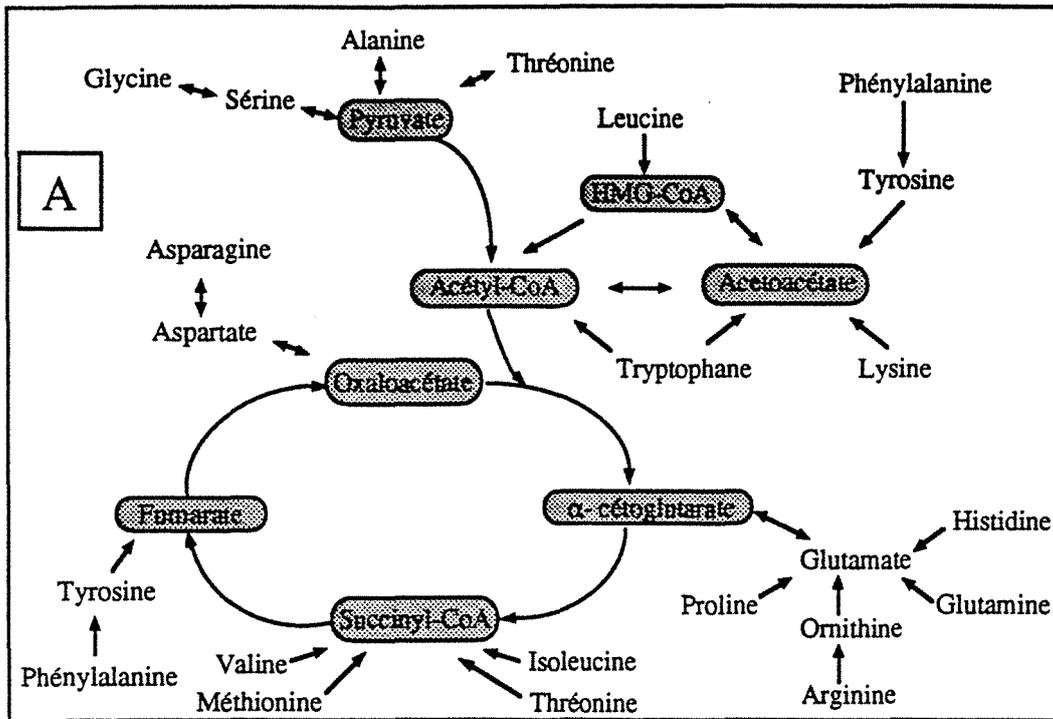


Figure I.7: métabolisme des acides aminés; (A): les voies d'entrées des acides aminés dans les différents cycles métaboliques (THOMAS, 1990); (B): évolution des acides aminés produits au cours d'un réacteur discontinu; (C): pourcentage d'acides aminés résiduels lors d'une culture de cellules CHO sauvages en mode discontinu.

Culture en bioréacteur des cellules recombinantes CHO-GGT: comparaison des cinétiques en mode discontinu avec celles des cellules sauvages.

Les cellules recombinantes ont été cultivées dans les mêmes conditions (même milieu de culture sans ajout de généticine) que les cellules sauvages. Les cinétiques de croissance cellulaire, de consommation de glucose et de glutamine, de production de lactate, d'ions ammonium et de GGT sont représentées sur la figure I.8. Les consommations de glucose et de glutamine par la souche recombinante montrent des profils identiques à ceux de la souche sauvage, avec une déplétion en glucose en 75h de culture et de glutamine en 125h. Les concentrations cellulaires maximales pour les deux souches avoisinent  $9.10^5$  cellules / ml.

La vitesse spécifique de croissance maximale  $\mu_{(app)max}$  moyenne est de 0,038 h<sup>-1</sup>, identique à celle des cellules sauvages.

Les rendements  $Y_{Lac/Glc}$  et  $Y_{NH_4/Gln}$  (figure I.9a et I.9b) sont de 1,5 mole / mole et 0,6 mole / mole respectivement comme pour les cellules sauvages.

Les vitesses spécifiques de consommation du glucose, de la glutamine et de production de lactate et d'ions ammonium pour les cellules CHO-GGT présentent les mêmes variations que celles des cellules sauvages (figure I.10).

Enfin, on ne remarque aucune différence significative dans le métabolisme des acides aminés (figure I.11).

La production de GGT est parallèle à la croissance avec un léger décalage dans le temps; elle augmente jusqu'à 240 U / l après 90 h de culture puis chute lors du décès cellulaire. Le dosage de l'activité GGT est réalisé sur les cellules qui adhèrent aux microporteurs; lorsque les cellules se décrochent des microporteurs, le dosage de l'activité dans le milieu de culture montre que l'enzyme est soit dégradée, soit rendue inactive par l'action de protéases, car l'activité enzymatique retrouvée dans le milieu de culture est négligeable.

La production de GGT par les cellules CHO recombinantes peut être comparée à celle de différents systèmes d'expression (tableau I.C): ces résultats montrent une activité GGT spécifique des cellules CHO-GGT proche de celle obtenue avec des cellules V79 et de plus de 25 fois supérieure à celle de cellules d'hépatomes humains (HepG2). La production en masse de GGT par des cellules en réacteur n'avait été jusqu'à présent testée que sur ces cellules HepG2; l'activité totale de GGT par litre de culture obtenue à partir des cellules CHO-GGT est la plus élevée rapportée jusqu'à présent; de plus, l'enzyme issue des cellules CHO-GGT se présente sous la forme de deux sous-unités glycosylées, contrairement à celle des cellules HepG2.

	Activité spécifique (mU / mg protéine)	Activité totale par litre de culture (U / l))	Structure protéique	références
E.Coli transformé	56	12	1 chaîne unique non glycosylée	ANGELE et al (1991)
S.cerevisiae transformée	250	2	2 sous-unités glycosylées?	ANGELE et al, (1991)
cellules d'hépatomes HepG2	90	30	1 chaîne unique glycosylée	VISVIKIS et al (1990)
cellules V79 transfectées	2000	ND	2 sous-unités glycosylées	THIOUDELLET (1992)
cellules CHO transfectées	2500	240	2 sous-unités glycosylées	ce travail

Tableau I.C: production de GGT dans différents systèmes d'expression.

La vitesse spécifique de production de GGT est représentée figure I.12 ainsi que la vitesse spécifique de croissance  $\mu_{app}$  au cours de la culture. La vitesse spécifique de production de GGT reste constante et élevée pendant toute la phase de croissance puis chute régulièrement avec la diminution de la vitesse spécifique de croissance. Il n'apparaît pas de relation linéaire entre la vitesse spécifique de croissance cellulaire et la vitesse spécifique de production de GGT (figure I.13).

Si on représente le taux d'expression de GGT par cellule (figure I.14), il apparaît une augmentation de cette production tout au long de la culture. Au maximum de la croissance cellulaire, la productivité spécifique est de  $25 \text{ mU} / 10^5$  cellules, valeur identique à celle obtenue en flacons statiques. Cette expression par cellule augmente encore durant la phase de décès cellulaire, indiquant une accumulation de la GGT lorsque la vitesse spécifique de croissance apparente est nulle.

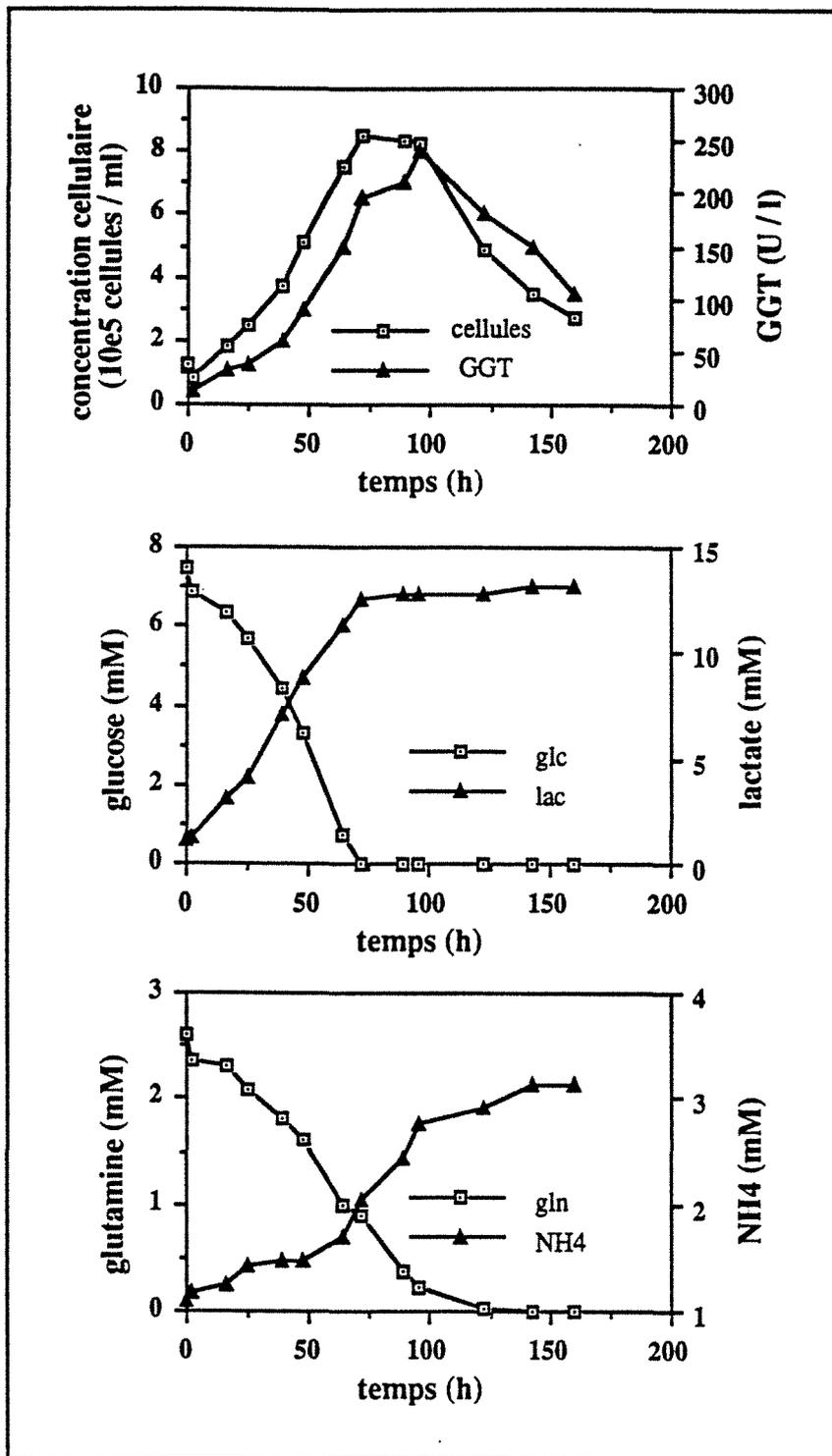


Figure I.8 : cinétique d'une culture en réacteur discontinu des cellules CHO-GGT. Le milieu de culture est du DMEM/Ham F12 avec 9mM de glucose et 2,5 mM de glutamine et 5% de SVF. Les cellules ont étéensemencées à raison de  $1.10^5$  cellules / ml.

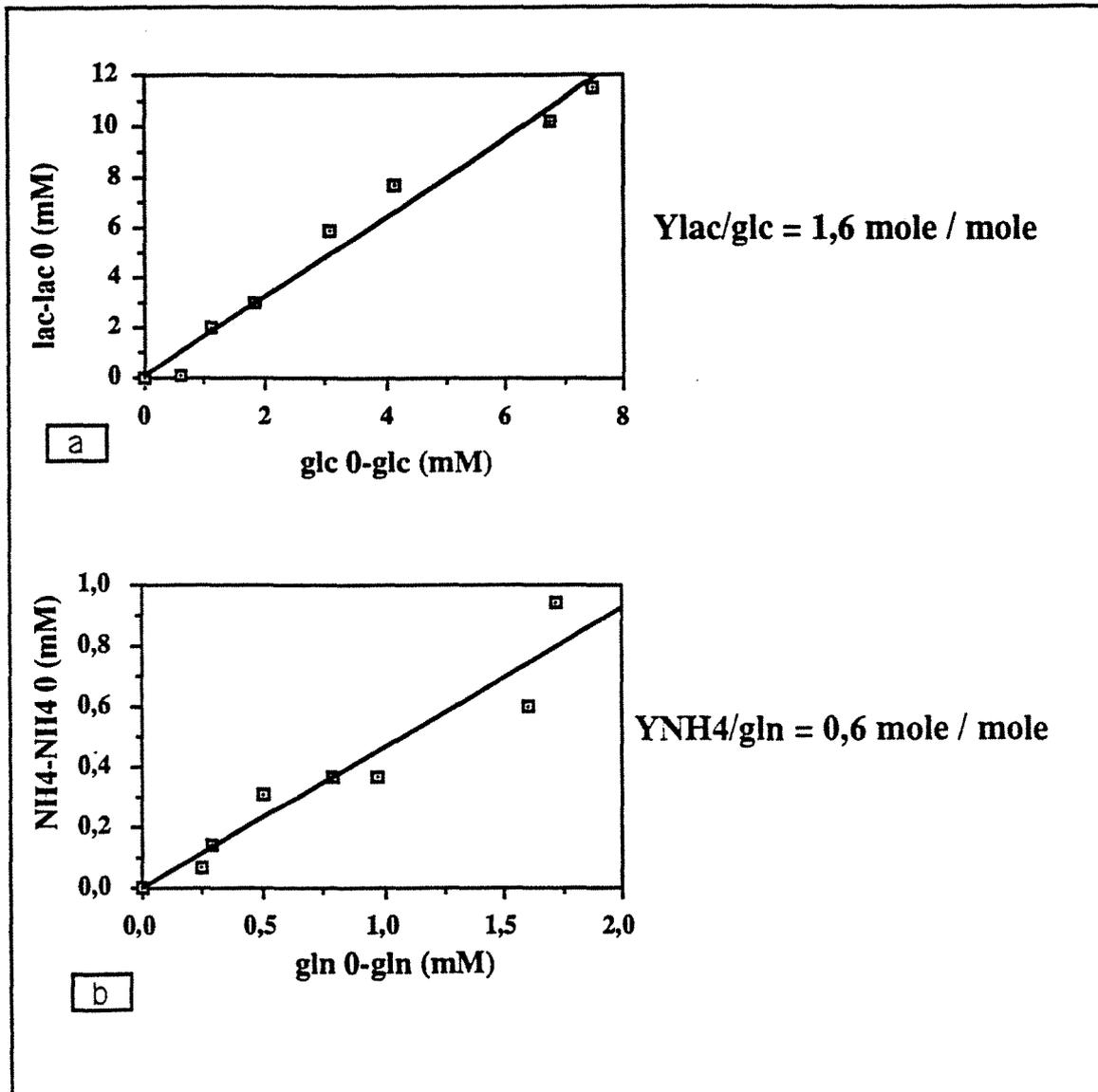


Figure I.9: détermination des rendements de conversion métabolique  $Y_{lac/glc}$  et  $Y_{NH_4/gln}$  pour la culture des cellules CHO-GGT en réacteur discontinu; ces rendements ont été établis pendant les 75 premières de culture avant que le glucose et la glutamine ne soient totalement épuisés;  $glc_0$ ,  $lac_0$ ,  $gln_0$  et  $NH_4_0$  sont respectivement les concentrations initiales de glucose, de lactate, de glutamine et d'ions ammonium. Les cinétiques de culture correspondantes sont représentées sur la figure I.8

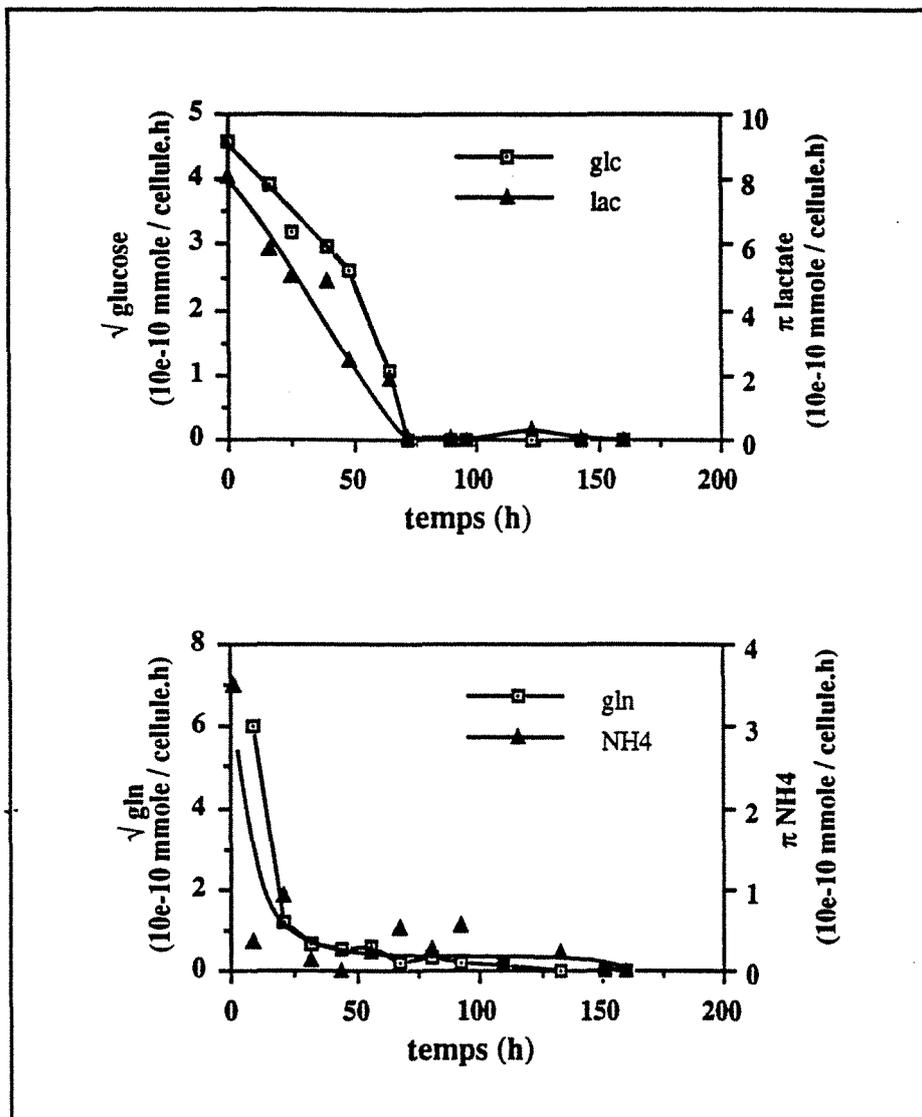


Figure I.10: comparaison des évolutions des vitesses spécifiques de consommation de glucose ( $\sqrt{\text{glucose}}$ ), de glutamine ( $\sqrt{\text{glutamine}}$ ) et de production de lactate ( $\pi \text{ lactate}$ ) et d'ions ammonium ( $\pi \text{ NH}_4$ ). Les cinétiques correspondantes sont montrées sur la figure I.8.

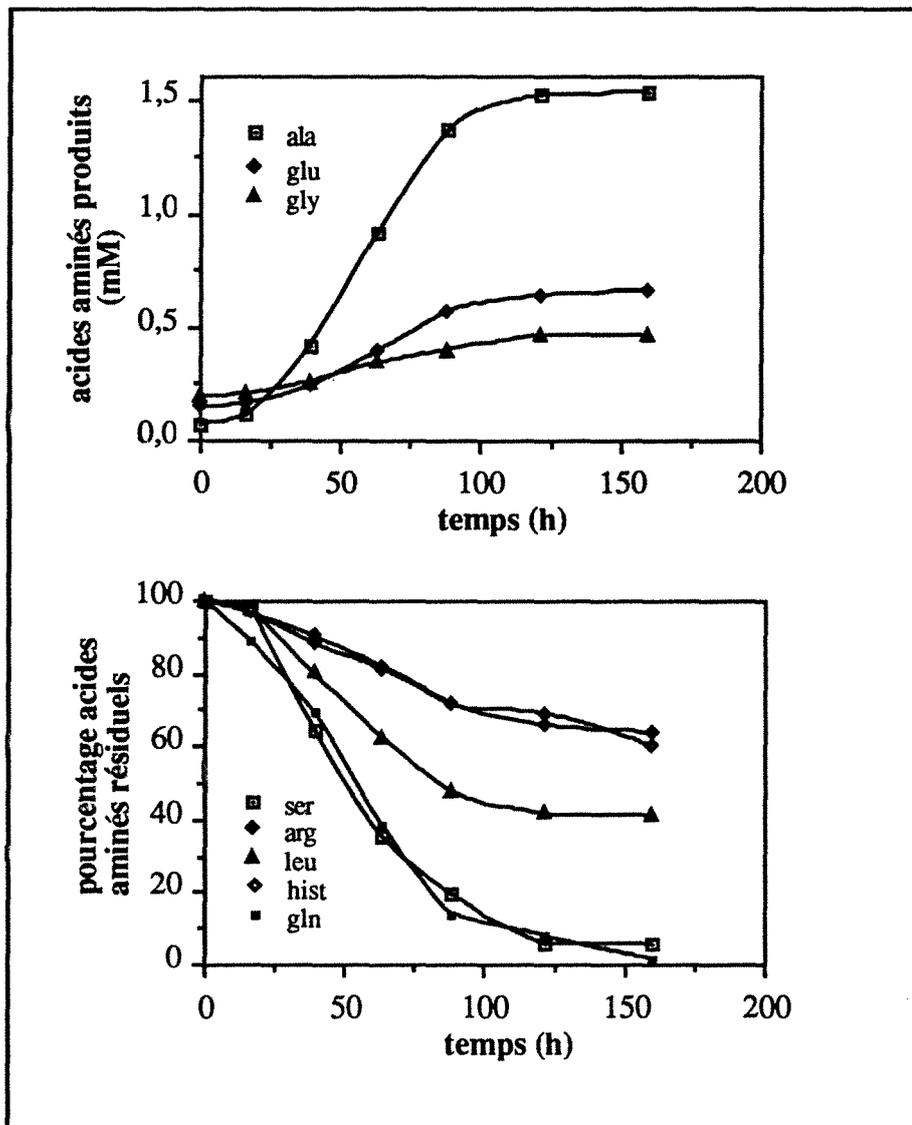


Figure I.11:évolutions des différents acides aminés produits (alanine, glycine et glutamate) ainsi que le pourcentage d'acides aminés résiduels (sérine, arginine, leucine, histidine et glutamine) au cours de la culture des cellules CHO-GGT en réacteur discontinu.

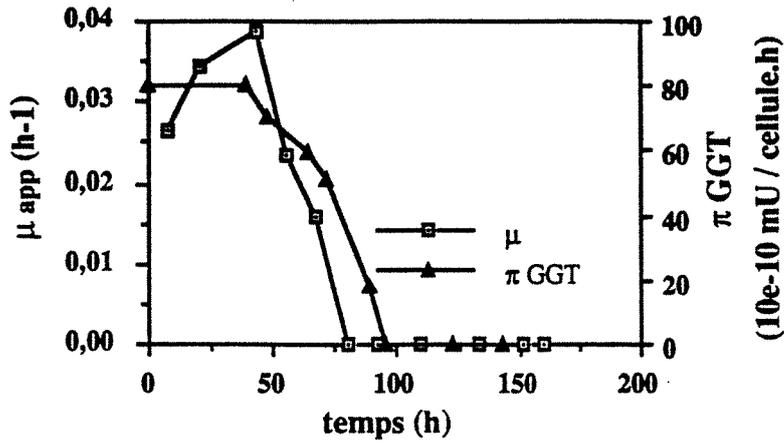


Figure I.12: détermination des vitesses spécifiques de prolifération cellulaire et de production de GGT; les cinétiques de cette culture sont montrées sur la figure I.8.

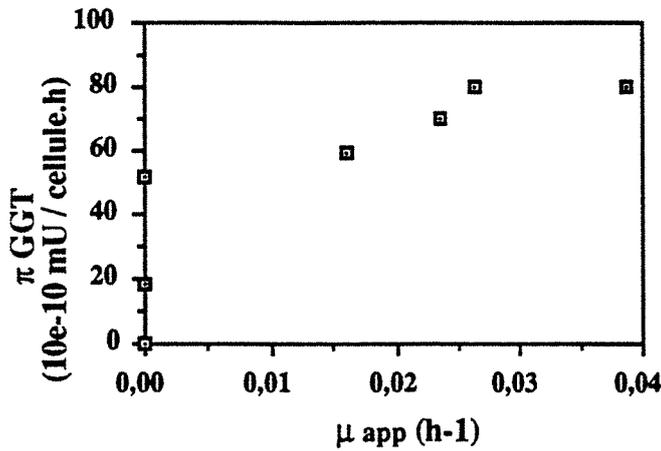


Figure I.13: représentation de la vitesse spécifique de production de GGT en fonction de la vitesse de prolifération ( $\mu_{app}$ )

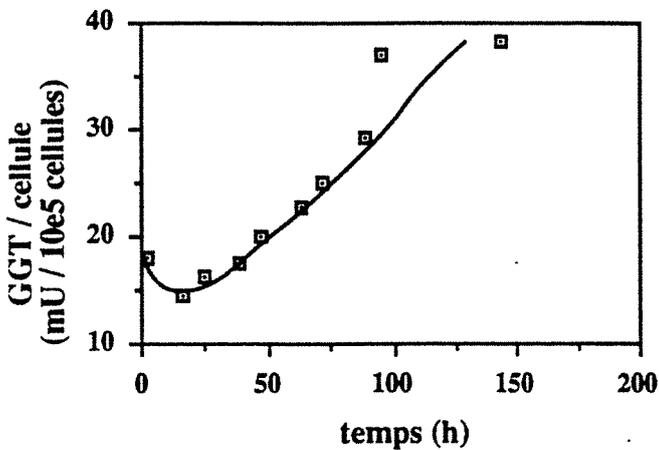


Figure I.14: évolution du taux d'expression de GGT par cellule; les cinétiques de la culture seront retrouvées sur la figure I.8

### 1.2.5. DISCUSSION ET CONCLUSION

Peu de travaux ont rapporté jusqu'ici l'expression de protéines membranaires par culture de cellules animales recombinantes. On trouve cependant l'expression du récepteur de surface de l'interleukine 2 (LEONARD et al, 1984) et du récepteur du NGF (Nerve Growth Factor) (CHAO et al, 1986), ainsi que la purification de ces deux protéines; mais ces travaux n'ont pas abordé la culture en masse de ces cellules recombinantes. Quelques protéines virales ont également été purifiées. La GGT humaine a, de même, été exprimée et purifiée dans des cellules V79 (fibroblastes de poumon d'hamster chinois) (VISVIKIS et al, 1991).

La production en masse de protéines membranaires, comme la GGT humaine, par cellules animales recombinantes n'a jamais été abordée, et l'étude réalisée ici montre la faisabilité de ce type de culture. Il apparaît que les contraintes auxquelles sont soumises les cellules lors de la mise en œuvre d'un réacteur (agitation, adhérence sur des microporteurs) n'affectent pas leurs capacités de synthèse de GGT.

L'observation de la morphologie des cellules recombinantes ne fait pas apparaître de différences entre celles-ci et les cellules sauvages, contrairement à d'autres études (THIOUDELLET, 1992), qui rapportaient une morphologie plus ronde des cellules recombinantes ainsi qu'un temps de génération plus lent; ces études ayant été faites en flacons statiques. L'activité spécifique de la GGT recombinante produite par les cellules CHO-GGT est la plus élevée jusqu'à présent obtenue avec celle produite par la cellule V79 (environ 2 à 2,5 U / mg de protéine). La culture en réacteur discontinu des cellules CHO-GGT a montré une production d'environ 240 U / l de GGT; cette production étant directement liée à la densité cellulaire. Les cellules CHO-GGT présentent la même vitesse spécifique maximale apparente de croissance que les cellules sauvages avec un temps de génération d'environ 18 heures.

Les cellules CHO recombinantes expriment la GGT sous forme de deux sous-unités probablement glycosylées. Ceci suggère que les cellules CHO possèdent une protéase capable de reconnaître la séquence du site de coupure du précurseur de la GGT. Les caractéristiques catalytiques sont proches d'autres GGT, notamment celle du foie humain ou celle de GGT recombinante à partir de cellules V79-HGGT.

La localisation du cDNA dans le génôme hôte n'a pas été réalisée, mais il semble que l'intégration de celui-ci dans le génôme hôte s'est faite de telle façon qu'elle n'entraîne pas de modifications dans le métabolisme lié à la croissance de la souche, ce qui permettra de cultiver la souche recombinante dans les mêmes conditions que la souche sauvage. La culture de

cellules CHO sauvages sur microporteurs a beaucoup été étudiée depuis de nombreuses années, avec différents modes de culture, aussi bien en discontinu qu'en perfusé (HAYTER et al, 1991; AVGERINOS et al, 1990; PORTNER et al,1991), ce qui va permettre d'obtenir en masse une cellule productrice de GGT. Le mode de culture approprié à la production de GGT doit, cependant, être étudié; en effet, l'enzyme étant membranaire, les cellules doivent être rapidement récupérées avant le début de la phase de décès cellulaire (avant décrochement des cellules des microporteurs). Le mode semi-continu ou fed-batch semblerait, à priori, un mode de culture intéressant: en effet, il permettrait de maintenir une croissance cellulaire plus longue qu'en mode discontinu tout en fournissant des cultures de courtes durées, faciles à valider.

En conclusion, les résultats présentés dans cette partie ont permis d'atteindre les objectifs suivants:

- la mise au point d'une lignée recombinante stable pour la production de GGT a été effectuée.
- la faisabilité de la culture en masse de ces cellules en vue de la production de GGT a été vérifiée, montrant une production couplée à la densité cellulaire.
- les caractéristiques métaboliques de cette souche recombinante ont été comparées à celles de la souche sauvage; le clone sélectionné ne présente pas de caractéristiques cinétiques différentes lors de culture en réacteur discontinu par rapport à la cellule sauvage.

Le cas de la purification d'une protéine membranaire sur des cellules en culture sur microporteurs n'a cependant pas été envisagé. La GGT a été purifiée à partir de nombreux tissus (références) et plus récemment à partir de cellules animales recombinantes en culture sur boîtes de Pétri (THIOUDELLET, 1992); mais, la purification à partir d'une cellule en culture sur microporteur sera peut-être plus délicate: en effet, la purification de l'enzyme membranaire implique la récupération des cellules; le traitement par la trypsine des microporteurs ne peut pas être envisagé, car il fait perdre plus de 50% de l'activité enzymatique. Une alternative serait de faire croître les cellules en absence de microporteurs, ce qui permettrait de faciliter la purification tout en diminuant les coûts de la culture. Dans cette optique, d'autres modes de culture, tels que les agrégats ou l'adaptation des cellules à la culture en suspension pourraient être envisagés. Ces approches feront l'objet du deuxième chapitre de ce rapport.



## **ANNEXE 1**



## ANNEXE 1

### CLONAGE DU cDNA-HEPG2 DANS UN VECTEUR D'EXPRESSION EUKARYOTIQUE.

La stratégie initiale consistait à cloner le cDNA-HepG2 dans le vecteur d'expression eucaryotique pMAMneo (Matériels et Méthodes: fig 22a), portant le gène de résistance *neo*, afin de transfecter ultérieurement ce vecteur recombinant dans les cellules CHO. Le "polylinker" de pMAMneo est composé de trois sites de restriction uniques *NheI*, *SalI* et *XhoI*, différents du site de clonage du cDNA-HepG2 inséré dans le plasmide pUC19 (site *EcoRI*). Après extraction et purification du cDNA, des essais ont été réalisés afin de créer un site de restriction adéquat par addition d'un oligonucléotide de synthèse (*NheI*) sur le cDNA. Différentes conditions de ligation entre oligonucléotides et cDNA ont été testées mais ont échoué. C'est pourquoi, une autre stratégie a été engagée à l'aide d'un deuxième vecteur d'expression eucaryotique, pcDNA1 (Matériels et Méthodes, figure 22b); ce dernier possède un site de restriction adéquat *EcoRI*, un promoteur fort CMV mais sans système de sélection; ce qui obligera à réaliser une cotransfection de ce vecteur avec un vecteur possédant un système de sélection (c'est-à-dire avec pMAMneo).

Le clonage du cDNA a donc été réalisé dans pcDNA1 (figure I.15) et après transformation bactérienne une cinquantaine de clones ont été obtenus et testés. Parmi ces cinquante clones, huit se sont avérés recombinants dont un seul dirigé dans le bon sens derrière le promoteur CMV.

La déphosphorylation du vecteur nécessaire pour empêcher la religation du vecteur sur lui-même lors de la ligation vecteur-cDNA, semble être l'étape limitante dans les différentes expériences réalisées: une déphosphorylation incomplète entraînant une religation du vecteur sans avoir inséré le cDNA; au contraire, une mauvaise inactivation de la phosphatase alcaline après l'étape de déphosphorylation, empêche toute ligation de se réaliser. C'est pourquoi, nous n'avons pas obtenu un bon taux de recombinaison quel que soit le protocole utilisé.

Malgré tout, nous avons réussi à obtenir un vecteur recombinant pcDNA1-HepG2, où le cDNA de la GGT était orienté dans le bon sens de transcription à partir du promoteur CMV. Ce vecteur recombinant après amplification et linéarisation, sera cotransfecté, avec pMAMneo lui aussi linéarisé, par électroporation dans les cellules CHO.

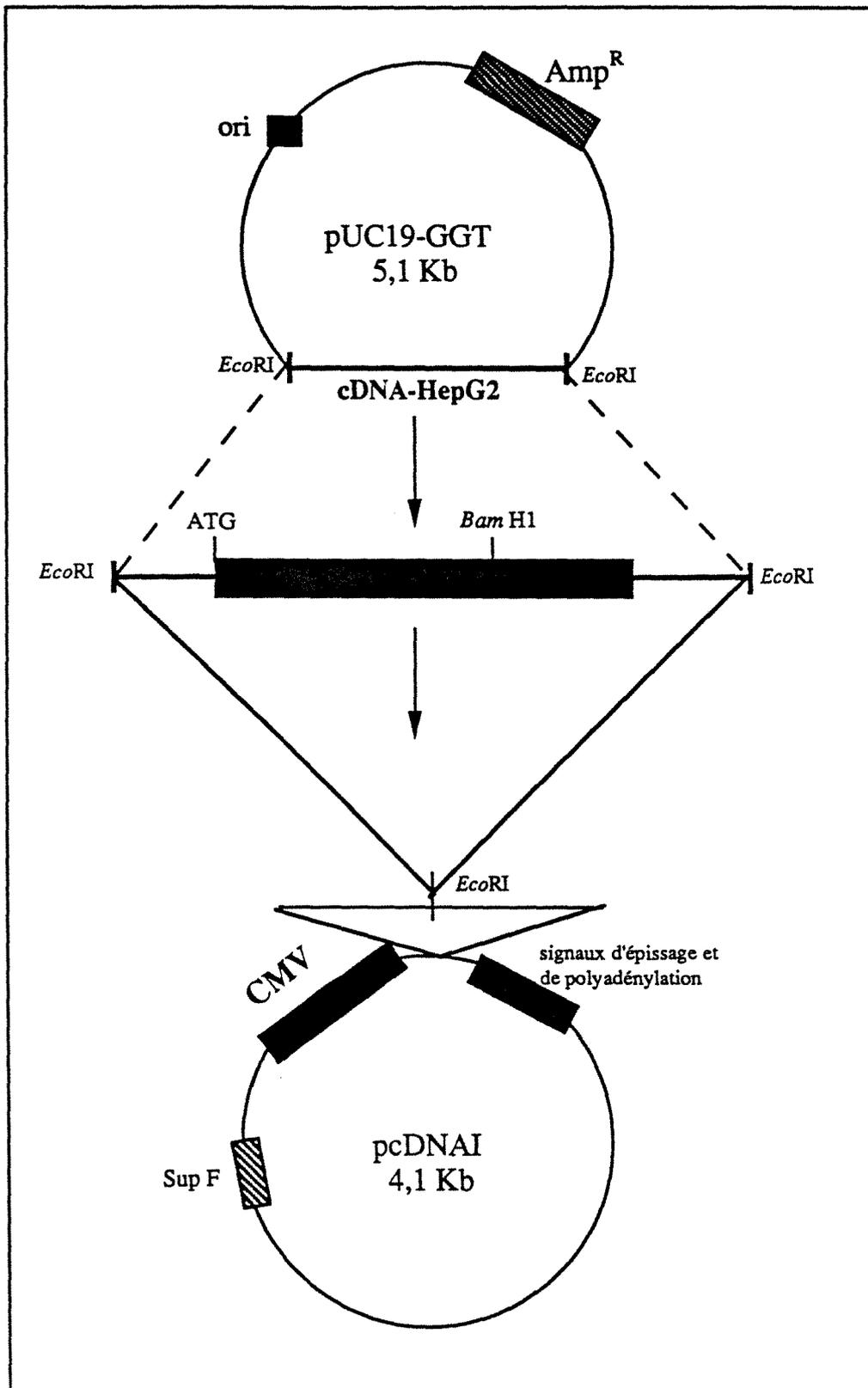


Figure I.15: construction du vecteur recombinant pcDNA1-GGT: le plasmide contenant le cDNA codant pour la GGT de l'hépatome humain a été digéré par *EcoRI*. Le fragment obtenu a été alors sous cloné derrière le promoteur de cytomégalovirus dans le vecteur d'expression eucaryotique pcDNA1

**ANNEXE 2**



## **ANNEXE 2 L'électroporation et les cellules CHO:**

### **1. Optimisation de la transfection des cellules CHO par électroporation.**

L'étude des conditions optimales de transfection par électroporation nécessiterait, en toute rigueur, la détermination du taux de transfection de la lignée cellulaire considérée en fonction des différents paramètres d'électroporation (voltage, nombre d'impulsions, durée des impulsions, température...), le taux de transfection étant calculé après sélection adéquate c'est à dire après 15 jours de culture sur milieu sélectif dans notre cas. De plus, des quantités importantes de vecteurs sont nécessaires pour une transfection (de l'ordre de 10 à 100 µg de vecteurs linéarisés). C'est pourquoi, une étude complète pour la détermination des conditions optimales de transfection prendrait un temps et une quantité de matériel génétique considérables.

Une approche différente a donc été réalisée, qui consiste à étudier la capacité proliférative des cellules ainsi que leur perméabilité à un colorant (le bleu Trypan) après électroporation afin d'évaluer l'influence des impulsions électriques sur les cellules CHO. Un compromis entre une perméabilisation convenable et la survie d'un nombre suffisant de cellules devra être trouvé. Cette étude, qui nécessite beaucoup moins de temps qu'une transfection, permettra d'éliminer les conditions trop drastiques ou, au contraire, les conditions qui ne perméabilisent pas assez les cellules.

Des transfusions parallèles seront réalisées pour vérifier si une corrélation existe entre perméabilité cellulaire et efficacité de transfection.

L'appareil utilisé est un électroporateur de marque Apelex permettant de régler l'intensité du champ électrique entre 0,9 et 9kV/cm (la distance entre les électrodes est de 6mm; l'intensité effective du champ varie donc entre 540 et 5400V), le nombre d'impulsions (entre 1 et 15) et le temps entre chaque impulsion (de 1 à 9 secondes). Il est, de plus, possible de choisir entre des capacités mobiles permettant de modifier la constante de temps des impulsions jusqu'à 35 µs. La décharge est de type exponentiel.

La membrane des cellules CHO est imperméable au Bleu Trypan. La perméabilisation induite par le champ électrique peut donc être quantifiée par le pourcentage de cellules colorées après un traitement de 20 minutes avec ce marqueur à 4°C; cette perméabilité transitoire étant

maintenue stable à cette température (TEISSIE et al,1987). La réversibilité de cette perméabilisation est vérifiée par le même critère après des incubations à 37°C. Le pourcentage de cellules perméabilisées transitoirement est obtenu par la différence entre le pourcentage de cellules bleues après électroporation et le pourcentage de cellules mortes (cellules bleues après réversion de la perméabilité).

La figure I.16 schématise le plan d'expérience de cette étude. Il consiste, dans un premier temps, à électroporer les cellules CHO et à évaluer le pourcentage des cellules perméabilisées, à l'aide d'un colorant (le bleu Trypan). Le pourcentage de cellules mortes est en parallèle déterminé (pourcentage de cellules irréversiblement perméabilisées qui intègrent le bleu Trypan après réversion de la perméabilité, par une incubation à 37°C). Dans un deuxième temps, la capacité proliférative des cellules après électroporation est déterminée, après culture en flacons statiques pendant 48 h. L'ensemble de ces informations devrait permettre de repérer les conditions d'électroporation qui ne permettent pas d'obtenir un bon pourcentage de cellules perméabilisées ou qui diminuent de façon importante la capacité de prolifération des cellules.

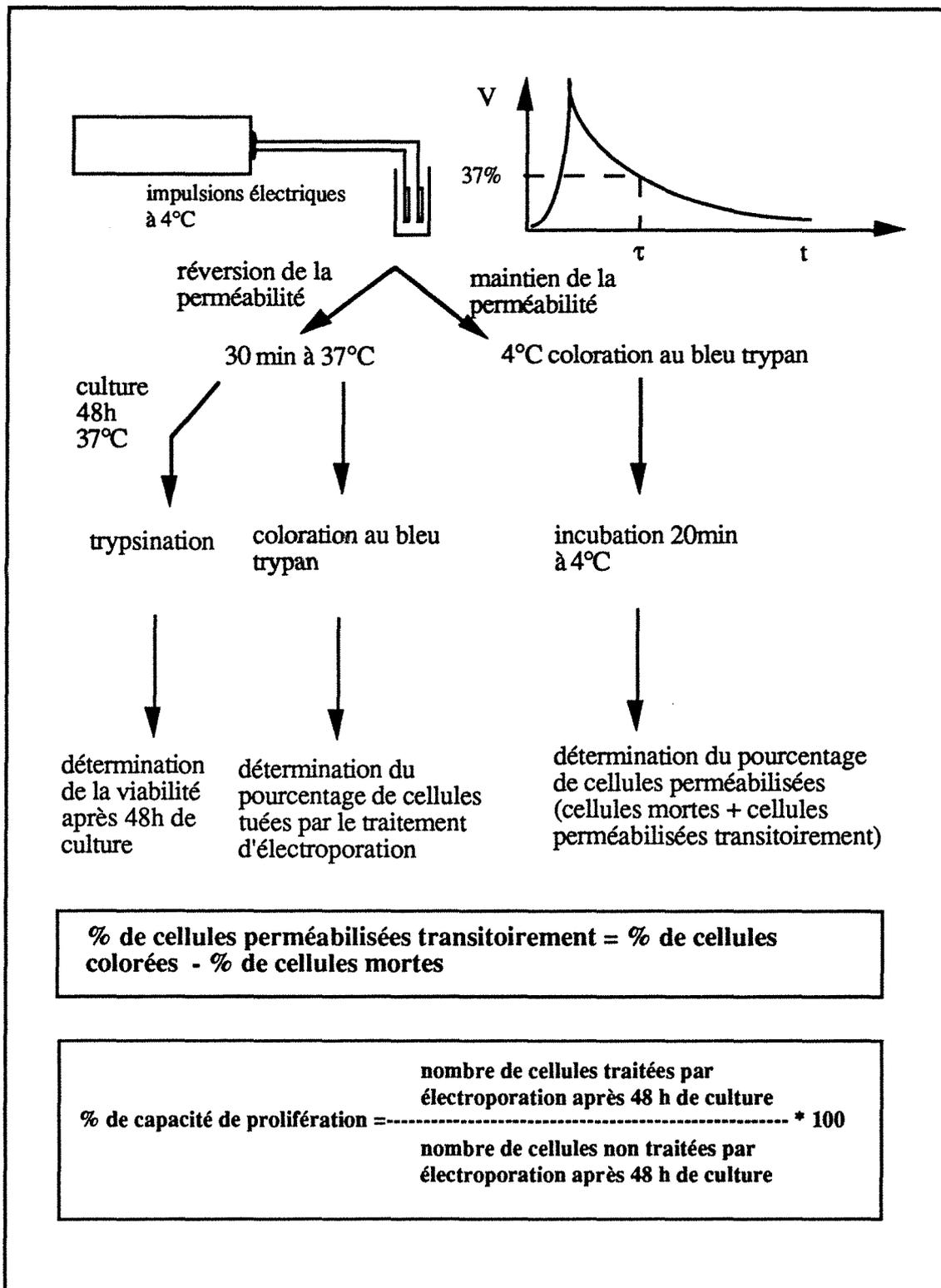


figure I.16 : plan d'expérimentation pour la détermination du pourcentage de cellules perméabilisées transitoirement (par un colorant), de la mortalité et de la capacité de prolifération de cellules, soumises à électroporation.

### 1.1 perméabilité et capacité proliférative des cellules CHO en fonction de l'intensité du champ électrique appliqué

**conditions expérimentales:** 5 impulsions à 5 secondes d'intervalle  
constante de temps : 30  $\mu$ s (196nF)  
intensité du champ électrique de 1 à 9 kV/cm  
milieu d'électroporation: PBS sans  $Ca^{2+}$  ni  $Mg^{2+}$

La figure I.17 regroupe les résultats obtenus pour cette étude de perméabilité et de capacité de prolifération cellulaire en fonction du champ appliqué.

La figure I.17.(a) représente le pourcentage de cellules totales perméabilisées ainsi que le pourcentage de cellules irréversiblement endommagées et donc mortes, en fonction du voltage appliqué. La différence entre ces deux courbes correspondant donc au pourcentage de cellules réversiblement perméabilisées.

Au dessous de 3 kV/cm, moins de 50% de cellules sont perméabilisées; elles le sont toutes de façon transitoire et récupèrent leur imperméabilité au Bleu Trypan après 30 minutes d'incubation à 37°C.

A partir de 6kV/cm, 70 à 80% de la population cellulaire est perméabilisée transitoirement mais la mortalité augmente aussi de 5 à 20% entre 6 et 9 kV/cm. A 9 kV/cm, 100% des cellules sont perméabilisées, mais 20% le sont irréversiblement.

Des méthodes ont été mises au point pour mesurer la viabilité cellulaire résiduelle et l'activité métabolique en fonction des tensions de charge appliquées. Le principe repose sur la faculté qu'ont les cellules vivantes de transformer un sel de tétrazolium incolore (MTT) en un dérivé formazan coloré (MOSSMAN, 1983).

Nous avons préféré étudier la viabilité cellulaire après 48h de culture afin de vérifier si le choc engendré par les impulsions électriques n'affectait pas la croissance à plus long terme.

L'étude de la capacité proliférative après 48 h de culture permet ainsi de vérifier si la réversion de la perméabilité est suffisante pour qu'une cellule soit toujours viable en culture.

La figure I.17.(b) montre la perméabilité transitoire ainsi que la capacité de prolifération exprimée en nombre de cellules électroporées vivantes après 48 h de culture par rapport au nombre de cellules d'un témoin, dans les mêmes conditions expérimentales (à part le traitement électrique). Cette capacité de croissance après le choc électrique est déterminée par la moyenne des comptages de trois boîtes de culture pour chaque condition d'électroporation.

On remarque une décroissance progressive de la survie cellulaire en fonction de l'intensité du champ électrique imposé, bien que le pourcentage de cellules viables reste toujours supérieur à 50%. Les cellules CHO semblent être particulièrement résistantes par rapport à d'autres cellules (KNUTSON et al, 1987).

Au dessus de 6 kV/cm, la perméabilité n'est augmentée au maximum que de 5% alors que le taux de survie chute de 70% (à 6 kV/cm) à 55% (9 kV/cm). Le champ électrique de 6 kV/cm semble être une limite au dessus de laquelle on n'améliore pas la perméabilité cellulaire tout en augmentant le stress cellulaire et l'incapacité de ces cellules à survivre en culture. La figure I.17.(c) montre qu'une amélioration légère de la perméabilité au dessus de 75% s'accompagne d'une chute brutale de la capacité de prolifération de ces cellules. Ce seuil critique correspond à 6 kV / cm.

Une étude réalisée sur des cellules CHO (ZERBIB et al ,1985) montrait un taux de transfection optimal pour 3 impulsions à 50nF et à 6 kV/cm dans un tampon HBS (140mM CaCl<sub>2</sub>; 0,75mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25mM HEPES). Cependant, ces conditions opératoires ne sont pas comparables aux nôtres car réalisées avec une décharge de forme vague "carré".

#### Corrélation viabilité et taux de transfection:

la viabilité est très variable d'un type cellulaire à un autre et il est très difficile de corréliser le taux de transfection optimal avec le taux de survie et le taux de perméabilité. Des cellules 721 (transfectées avec l'antigène T de SV40) présentaient un taux optimal d'expression de l'antigène T pour un taux de survie supérieur à 50% (après 24 h de culture); des cellules Hep 2, dans les mêmes conditions d'électroporation, présentaient un taux optimal de transfection pour un taux de survie inférieur à 50% (KNUTSON et YEE, 1987).

D'autres auteurs (ANDREASON et EVANS, 1988), obtiennent un taux de transfection optimal pour une viabilité cellulaire (après une semaine de culture) inférieure à 20% pour des cellules de neuroblastomes de rat. TATSUKA et al (1988) obtiennent, eux, un taux de transfection optimal avec 30% de viabilité pour des cellules BALB/C 3T3.

De tous ces résultats , il apparaît que la capacité proliférative des cellules CHO reste convenable (supérieure à 50%) quelle que soit l'intensité du champ électrique imposée, mais que leur capacité à proliférer commence à chuter de façon importante au dessus de 6 kV/cm. Au dessous de 3 kV/cm, la perméabilité reste inférieure à 50% et sera considérée comme insuffisante. Pour les expériences suivantes, l'intensité du champ électrique sera imposée à 6 kV/cm, qui semble être un bon compromis entre une bonne perméabilité transitoire et une bonne survie cellulaire.

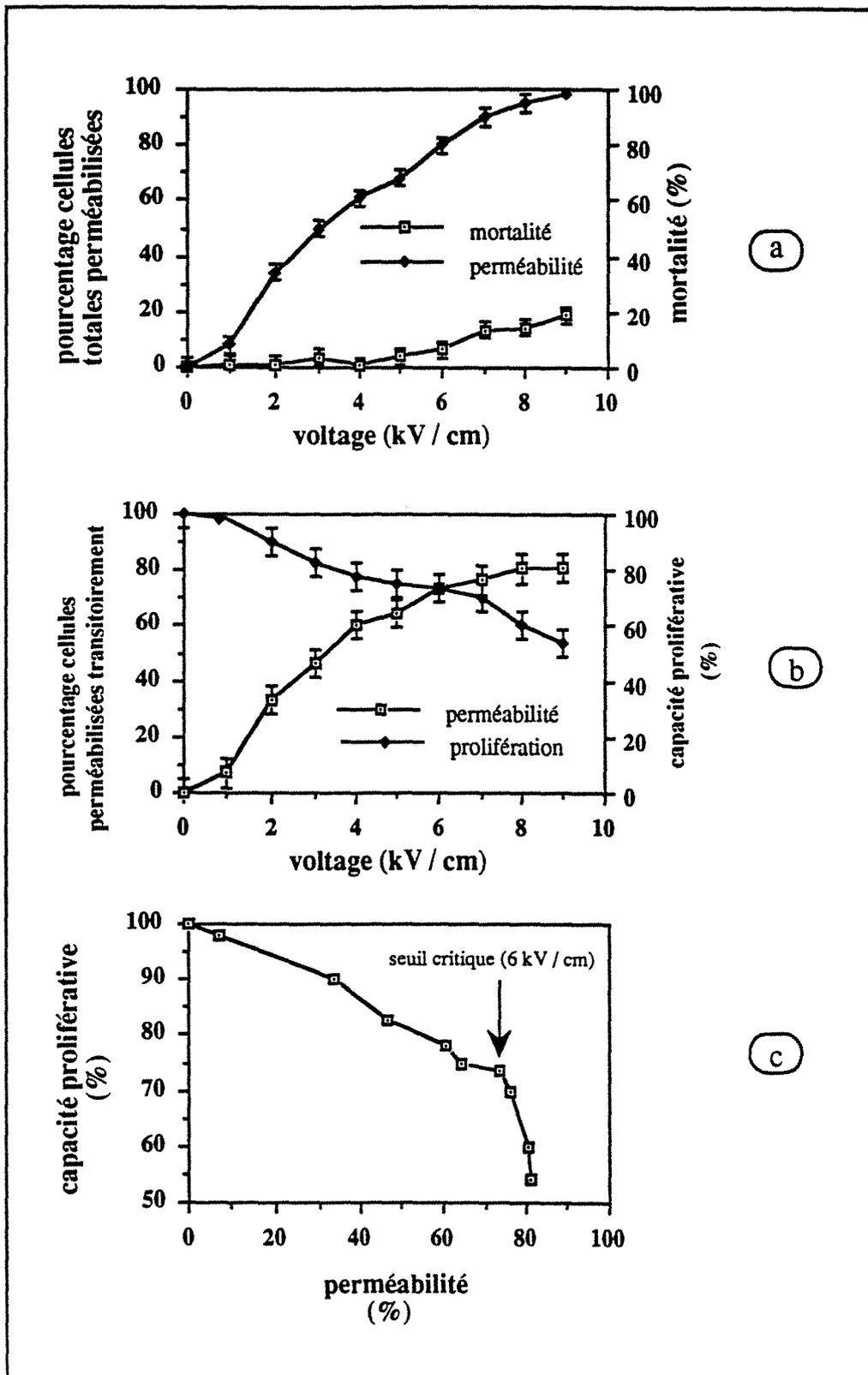


Figure I.17: représentation du pourcentage de cellules perméabilisées, de la mortalité (a), de la perméabilité transitoire et de la capacité proliférative (b) ainsi que de la détermination du seuil critique (c) en fonction du voltage appliqué. Le plan d'expérimentation est schématisé sur la figure I.16.

## 1.2 perméabilité et viabilité en fonction de la constante de temps.

**conditions expérimentales:** 5 impulsions à 5 secondes d'intervalle  
constante de temps : de 5 à 35  $\mu\text{s}$  (40 - 196 nF)  
intensité du champ électrique: 6 kV/cm  
milieu d'électroporation: PBS sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$

La figure I.18 résume l'ensemble des résultats obtenus pour le taux de perméabilisation et la capacité proliférative des cellules en fonction de la capacité choisie, déterminant la constante de temps ou durée de l'impulsion.

Comme le montre la figure I.18 (a), l'augmentation de la constante de temps a pour effet d'augmenter la perméabilité des cellules CHO de façon presque linéaire entre 5 et 35  $\mu\text{s}$ . En dessous de 20  $\mu\text{s}$ , quelle que soit la constante de temps appliquée imposée 100% des cellules retrouvent leur imperméabilité après incubation à 37°C. La mortalité, après traitement électrique à 6kV/cm, commence à être détectable pour des impulsions d'une durée supérieure à 20  $\mu\text{s}$ .

La capacité de prolifération des cellules après 48 h de culture (figure I.18b) chute linéairement au dessus de 14  $\mu\text{s}$ , mais est toujours supérieure à 60% quelle que soit la constante de temps entre 5 et 35  $\mu\text{s}$ . Le tracé de la perméabilisation transitoire montre une augmentation de celle-ci de façon quasi linéaire lors de l'augmentation de la constante de temps pour des valeurs supérieures à 14  $\mu\text{s}$ . La représentation 3c illustre bien qu'une augmentation de la perméabilité s'accompagne d'une chute parallèle de la capacité de prolifération des cellules. Dans ces conditions expérimentales, une augmentation de la constante de temps au dessus de 50  $\mu\text{s}$ , entraînerait probablement une diminution de la capacité proliférative (inférieure à 50%), sans améliorer pour autant la perméabilité transitoire des cellules.

Les conditions utilisées lors de cette expérience ne permettent pas d'éliminer des constantes de temps entraînant une perte trop importante de la capacité proliférative (toujours supérieure à 60%). Par contre, pour des capacités inférieures à 88 nF (c'est-à-dire pour des constantes de temps inférieures à 14  $\mu\text{s}$ ), on obtient des perméabilités transitoires inférieures à 50% qui seront considérées comme insuffisantes et écartées. Nous retiendrons pour les autres expériences une constante de temps de 30  $\mu\text{s}$  qui semble être un bon compromis entre perméabilisation transitoire de 70% et capacité proliférative de 70%.

Un certain nombre de travaux ont rapporté des études sur l'influence de la constante de temps sur le taux de transfection. Les premiers travaux faisaient état d'impulsions de l'ordre de la microseconde à des intensités de champ électrique élevées de l'ordre de 1 à 9 kV/cm (NEUMANN et al, 1982; TONEGUZZO et al, 1986; TATSUKA et al, 1988). Dans ce cas, les constantes de temps étaient comprises entre 5 et 50  $\mu\text{s}$ . Avec l'évolution de cette technique

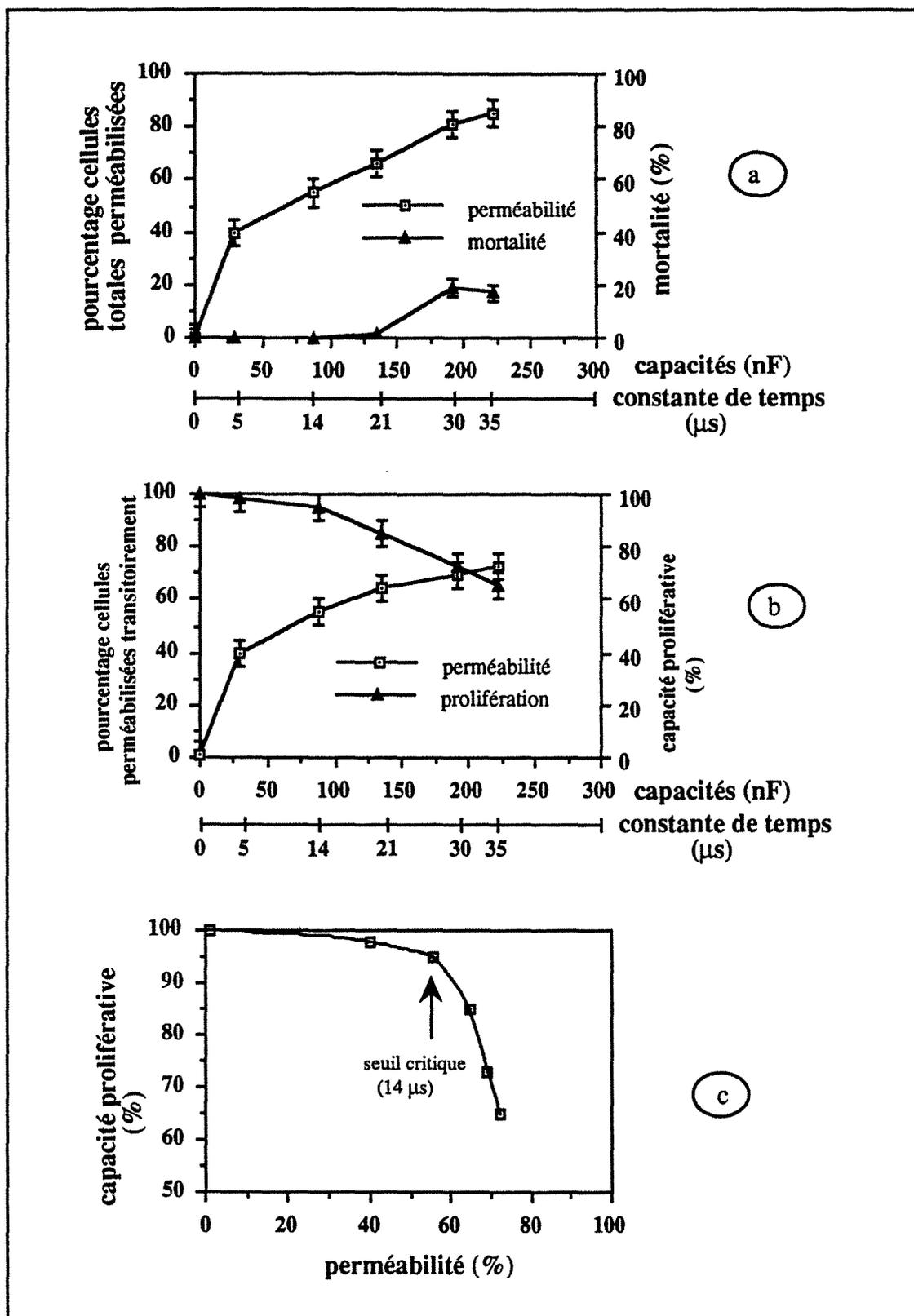


Figure I.18: représentation du pourcentage de cellules perméabilisées, de la mortalité (a), de la perméabilité transitoire et de la capacité proliférative (b) ainsi que que la détermination du seuil critique (c) en fonction de la constante de temps. Le plan d'expérimentation est schématisé sur la figure I.16.

d'électroporation, la tendance consiste à utiliser des champs plus faibles (400-1000 V/cm) avec des constantes de temps de l'ordre de la milliseconde (CHU et al, 1987; KNUTSON et YEE, 1987; BARSOU, 1990).

La forme de la décharge (exponentielle ou carrée) a également été testée (ZERBIB et al, 1985; HAMA-INABA et al, 1986), mais aucune conclusion sur l'efficacité de transfection suivant la forme de la décharge n'a pu être tirée. Mais, dans la majorité des cas, c'est la décharge exponentielle qui est préférée pour des raisons de simplicité et de coût de matériel.

### 1.3 Perméabilité et viabilité en fonction du nombre d'impulsions.

**conditions expérimentales:**      **entre 1 et 10 impulsions (5 secondes d'intervalle)**  
   **constante de temps : 30  $\mu$ s (196 nF)**  
   **intensité du champ électrique: 6 kV/cm**  
   **milieu d'électroporation: PBS sans  $Ca^{2+}$  ni  $Mg^{2+}$**

La figure I.19 regroupe l'ensemble des résultats obtenus pour la perméabilité, la mortalité et la capacité de prolifération des cellules CHO après une ou plusieurs impulsions électriques; cette multiplication d'impulsions pouvant être assimilée à une addition de constante de temps donnant globalement une constante de temps plus longue.

La figure I.19 (a) montre une augmentation du pourcentage de cellules perméabilisées en fonction du nombre d'impulsions, mais surtout une augmentation brutale de la mortalité jusqu'à 30% des cellules soumises à dix impulsions, alors que cette mortalité n'était que de 5% pour trois et cinq impulsions. On peut également remarquer que, dès la première impulsion, presque 70% des cellules sont perméables au colorant. Cependant, la perméabilité transitoire maximale est obtenue pour 5 impulsions (figure I.19 (b)) avec une capacité de prolifération supérieure à 70%; cette dernière chute en dessous de 50% pour 10 impulsions successives. La figure I.19 (c) indique une perméabilité maximale pour une capacité proliférative des cellules de 75%, correspondant à 5 impulsions. Une addition de 10 impulsions, équivalente à une constante de temps cumulée de 300  $\mu$ s, semble être trop drastique pour les cellules CHO, à ce voltage élevé utilisé.

En général, pour des intensités de champs électriques comprises entre 400 et 1000 V et des constantes de temps de l'ordre de la milliseconde, une seule impulsion est réalisée (références). Pour des conditions expérimentales proches de celles utilisées dans notre travail, les avis divergent: certains préconisent une seule impulsion (référence); d'autres multiplient les impulsions. Les premières expériences réalisées sur l'électroporation de cellules animales (NEUMAN et al, 1982) sur des cellules de souris LTK<sup>-</sup> utilisaient une série de trois impulsions à 8 kV/cm avec une capacité totale de 21 nF (correspondant à une constante de temps de 5,4

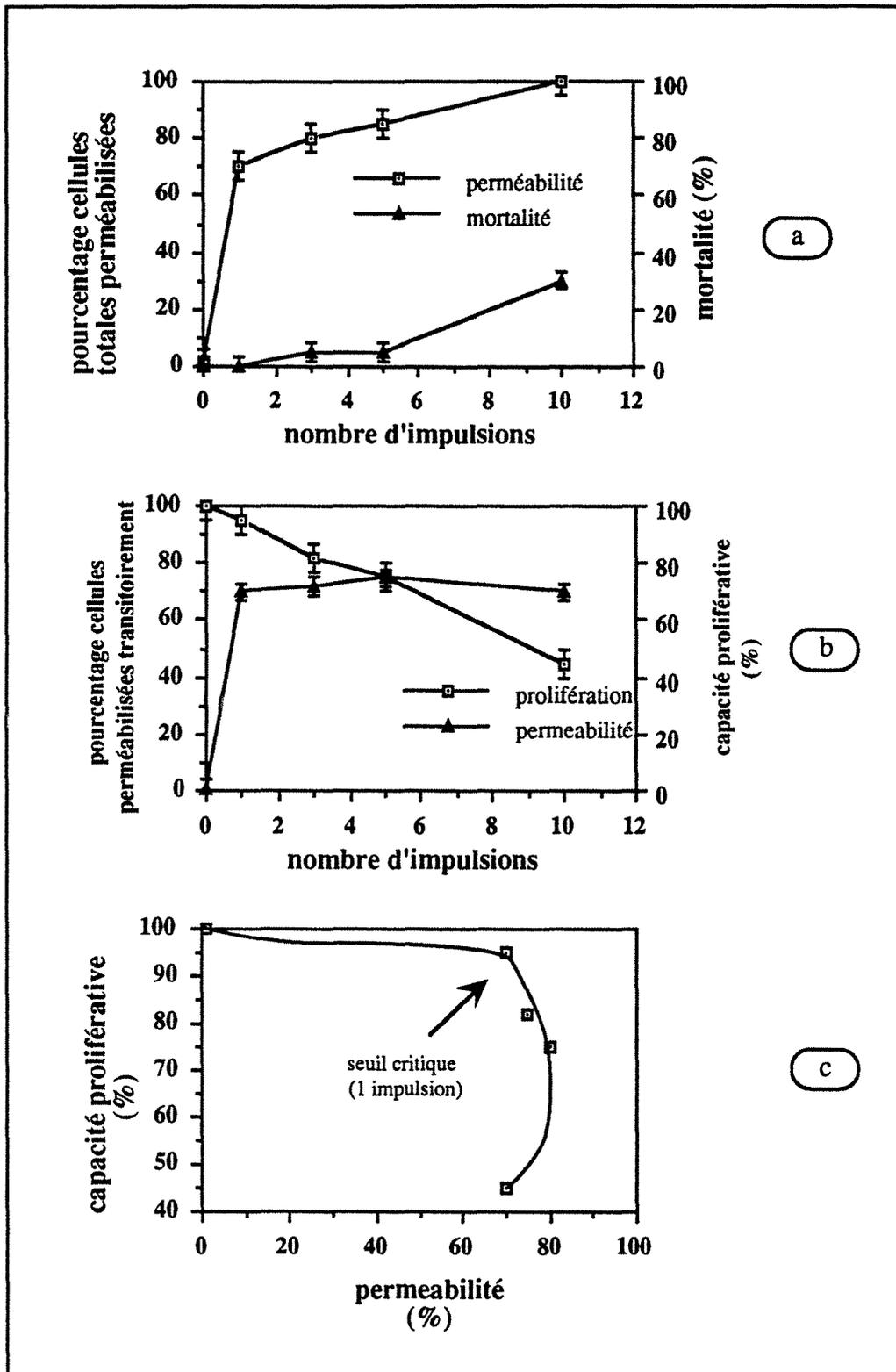


Figure I.19: représentation du pourcentage de cellules perméabilisées, de la mortalité (a), de la perméabilité transitoire et de la capacité proliférative (b) ainsi que de la détermination du seuil critique (c) en fonction du nombre d'impulsions. Le plan d'expérimentation est schématisé sur la figure I.16.

$\mu$ s). Ce nombre d'impulsions a été repris par d'autres auteurs (ZERBIB et al, 1985) sur d'autres cellules (cellules CHO et C1D), dans des conditions d'électroporation similaires. Un nombre supérieur d'impulsions a également été testé et a donné de bons résultats.

#### 1.4 Taux de transfection en fonction du nombre d'impulsions.

D'après les différents travaux réalisés dans la littérature, il est difficile de trancher sur le nombre d'impulsions nécessaire pour obtenir une bonne transfection. Notre étude permet de voir que 70% des cellules sont perméabilisées transitoirement après une seule impulsion, mais il n'est pas possible de dire si cette impulsion sera suffisante pour créer des pores de tailles adéquates pour la pénétration de l'ADN dans les cellules. C'est pourquoi, nous avons décidé de réaliser une transfection dans les mêmes conditions expérimentales que l'expérience de perméabilisation en fonction du nombre d'impulsions. Le vecteur pMAMneo linéarisé a été transfecté dans les conditions décrites dans le chapitre Matériels et Méthodes (A.IV). Après électroporation, les cellules sont ensemencées dans des boîtes de culture et la sélection débute 48 h après la transfection par addition de G418 dans le milieu de culture. Le milieu est renouvelé tous les trois jours pendant quinze jours; les clones sont alors fixés, colorés et dénombrés afin de déterminer le taux de transfection suivant le nombre d'impulsions.

Les résultats obtenus sont tracés sur la figure I.20.

Nous pouvons noter un taux de transfection maximal de l'ordre de  $1,7 \cdot 10^{-3}$  pour cinq impulsions comme le prédisait l'étude sur la perméabilisation des cellules CHO. De plus, il semblerait qu'une seule impulsion permette de perméabiliser les membranes des cellules vis-à-vis du colorant de façon satisfaisante, mais le taux de transfection obtenu est relativement faible de l'ordre de  $3 \cdot 10^{-4}$ . L'augmentation du nombre d'impulsions n'améliore guère le pourcentage de cellules perméabilisées, mais augmente le taux de transfection de manière significative.

Par ailleurs, il existe des électroporateurs plus récents (Cellject commercialisé par Eurogentec) qui programment deux impulsions automatiquement: une première impulsion brève (quelques  $\mu$ s) à haut voltage pour perméabiliser la cellule suivie d'une deuxième impulsion plus longue (quelques ms) mais à voltage plus faible pour permettre à l'ADN de migrer vers l'intérieur de la cellule. L'appareil d'électroporation dont nous disposons ne permet pas une telle programmation, mais la multiplication du nombre des impulsions, dans la mesure où elle n'affecte pas trop la capacité de prolifération des cellules, doit en fait jouer le même rôle que cette succession de deux impulsions et favoriser la pénétration de l'ADN.

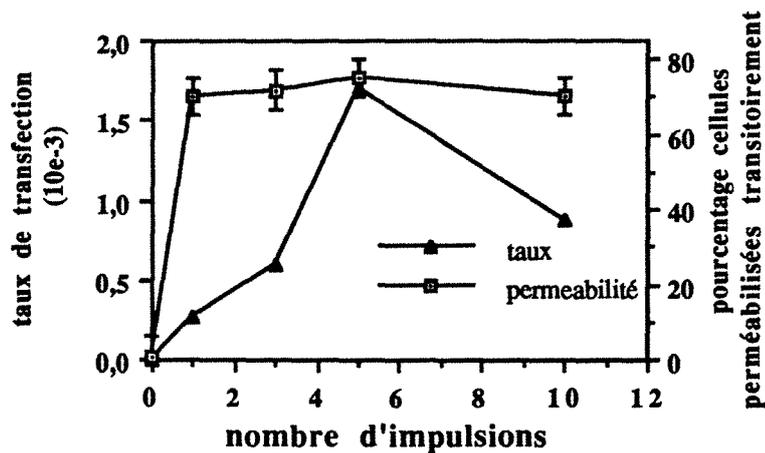


figure I.20: taux de transfection et pourcentage de cellules perméabilisées transitoirement en fonction du nombre d'impulsions; les conditions d'électroporation sont de 6 kV / cm; constante de temps de 30  $\mu$ s; la transfection s'effectue avec 20  $\mu$ g de vecteur pMAMneo linéarisé comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes.

### 1.5 Conclusion

Il est bien sûr impossible à partir de cette étude de déterminer les conditions précises pour obtenir un taux de transfection optimal, mais elle permet d'éliminer certaines conditions limites d'électroporation, notamment celles qui ne permettent pas une perméabilisation suffisante des cellules ou qui sont trop néfastes pour la capacité de prolifération des cellules. Les cellules CHO semblent être des cellules particulièrement résistantes aux impulsions électriques et seule la condition opératoire de dix impulsions (constante de temps de 30  $\mu$ s; voltage de 6 kV / cm) a donné une capacité proliférative inférieure à 50% après 48 h de culture, sans améliorer la perméabilité transitoire des cellules et sera considérée comme trop drastique: le taux de transfection pour cette condition, confirme les résultats obtenus pour la capacité proliférative et la perméabilité des cellules CHO.

L'étude de la perméabilité transitoire couplée à l'étude de la capacité proliférative nous a permis cependant, de cerner les conditions qui devraient être favorables à une bonne perméabilisation tout en maintenant une capacité de prolifération suffisante des cellules en culture. Ces conditions sont les suivantes:

- voltage: entre 3 et 9 kV / cm.
- une constante de temps comprise entre 14 et 35  $\mu$ s
- une succession de cinq impulsions.

## **2. Comparaison de la transfection de cellules CHO par la technique au phosphate de calcium et par électroporation.**

Afin d'évaluer l'efficacité de transfection par électroporation, nous avons testé une autre technique de transfection et comparé leur taux de transfection respectif. Nous avons choisi la technique au phosphate de calcium, qui est la technique la plus couramment utilisée et qui ne nécessite pas d'appareillage spécifique. Les avantages et les inconvénients de ces deux techniques sont explicités dans le chapitre Bibliographie.

### **2.1. conditions opératoires.**

Le protocole utilisé est celui détaillé dans le chapitre Matériels et Méthodes. La transfection a été réalisée avec le vecteur pMAMneo préalablement linéarisé par l'enzyme de restriction *NheI*. 20 µg de ce vecteur linéarisé sont employés pour obtenir le précipité phosphate de calcium-vecteur qui est mis en contact avec le tapis cellulaire. La sélection est réalisée avec 400 µg/ml de Généticine additionnée au milieu de culture (voir annexe 3 pour la détermination de la concentration adéquate d'antibiotique). Les clones obtenus sont fixés, colorés et dénombrés après quinze jours de sélection. Le taux de transfection est déterminé par le rapport entre le nombre de clones résistants au G418 après deux semaines de sélection et le nombre de cellules initialement mis en contact avec le précipité. Dans le cas de l'électroporation, le protocole exact est défini dans le chapitre Matériels et Méthodes et le taux de transfection correspond au rapport du nombre de clones résistants au G418 et du nombre de cellules initialement électroporées.

### **2.2. résultats:**

#### **2.2.1. transfection par la technique au phosphate de calcium.**

Cette expérience a été réalisée à partir de 9 boîtes de culture différentesensemencées au jour j-1 à raison de  $5 \cdot 10^5$  cellules par boîte de 25 cm<sup>2</sup>. Au jour j de la transfection, trois boîtes sont trypsinées et comptées; les six autres sont mises en contact avec les précipités de phosphate de calcium et le nombre de clones après sélection sera déterminé pour chacune de ces six boîtes. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant:

	nombre de cellules / boîte	nombre de clones par boîte	taux de transfection	taux de transfection moyen
boîte 1	$1 \cdot 10^6$	-	-	-
boîte 2	$1,4 \cdot 10^6$	-	-	-
boîte 3	$1,2 \cdot 10^6$	-	-	-
boîte 4		9	$7,5 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6}$
boîte 5		4	$3,3 \cdot 10^{-6}$	
boîte 6		5	$4 \cdot 10^{-6}$	
boîte 7		0	0	
boîte 8		9	$7,5 \cdot 10^{-6}$	
boîte 9		1	$8,3 \cdot 10^{-6}$	
boîte 10 témoin sans vecteur		0	0	0

Tableau I.D: résultats obtenus lors de la transfection de cellules CHO par la technique au phosphate de calcium

Par la technique au phosphate de calcium, une moyenne de  $4 \cdot 10^{-6}$  a été obtenue pour le taux de transfection. Celui-ci sera comparé ultérieurement avec celui obtenu lors de transfection par électroporation.

### 2.2.2. transfection par électroporation.

Des cellules CHO ( $1 \cdot 10^7$  cellules) sont soumises à 1 ou 5 impulsions de 30  $\mu$ s avec des voltages différents (3, 6, 9 kV / cm). Les taux de transfection ont été déterminés comme décrit précédemment après quinze jours de sélection dans du milieu additionné de 400  $\mu$ g / ml de G418. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau et correspondent aux taux de transfection moyens calculés sur trois boîtes de culture distinctes.

	3 kV / cm	6 kV / cm	9 kV / cm
1 impulsion	$1,2 \cdot 10^{-4} \pm 3 \cdot 10^{-5}$	$3,5 \cdot 10^{-4} \pm 2,5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-4}$
5 impulsions	$2 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-3} \pm 1,5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3} \pm 5 \cdot 10^{-4}$

Tableau I.E: taux de transfection de cellules CHO par électroporation en fonction du nombre d'impulsions et du voltage appliqué. Les résultats coorespondent à la moyenne obtenu sur trois boîtes de culture.

Ces résultats montrent des taux de transfection supérieurs par la technique d'électroporation comparés à ceux obtenus par la technique au phosphate de calcium. Le taux de transfection maximal correspond à 5 impulsions de 9 kV / cm avec une constante de temps de 30  $\mu$ s. La technique d'électroporation permet donc d'améliorer considérablement le taux de transfection par rapport à une technique telle que le phosphate de calcium d'un facteur 100 (taux de transfection obtenu:  $4.10^{-6}$ ); de plus, cette technique est rapide, simple et reproductible. La variabilité des taux de transfection obtenue est davantage liée à l'état physiologique des cellules au moment de l'électroporation; il est important de réaliser la transfection avec des cellules en phase exponentielle de croissance. L'inconvénient majeur de cette technique est la mise au point préalable des conditions de transfection; mais, une étude simple comme celle présentée précédemment avec l'étude de la perméabilité à un colorant et de la viabilité des cellules permet de mieux cerner les conditions adéquates en éliminant celles qui sont trop drastiques pour les cellules et celles qui ne permettent pas de leur fournir une perméabilité suffisante. Notre étude montre la faisabilité de la mesure de la perméabilité transitoire comme technique rapide d'évaluation de la capacité des cellules à être transfectées.



**ANNEXE 3**



## ANNEXE 3

### SELECTION DES CELLULES CHO RECOMBINANTES PAR RESISTANCE AU G418

#### Avant-propos

Parmi les méthodes de sélection par utilisation de marqueurs dominants, le système de sélection porté par pMAM $neo$  utilise un marqueur de sélection dominant pour l'intégration stable d'ADN exogène, le gène 3' phosphotransférase qui confère la résistance à l'antibiotique G418. Lorsqu'un ADN est introduit dans des cellules eucaryotiques par transfection (par la technique au phosphate de calcium, DEAE dextrane ou électroporation), très peu de cellules vont intégrer, de façon stable, l'ADN hétérologue dans leur génôme. Pour identifier cette intégration stable, il est utile de posséder un marqueur génétique dominant cloné dans le vecteur transfecté qui générera un changement dans le phénotype des cellules recombinantes. On compte parmi les marqueurs dominants, le gène codant pour la thymidine kinase (employé avec des cellules tk-), le gène codant pour la dihydrofolate réductase qui confère la résistance au méthotrexate, le gène codant pour la xanthine-guanine-phosphoribosyltransférase qui permet à la xanthine d'être utilisée comme substrat dans la voie de sauvetage des purines, dans un milieu de culture contenant de l'acide mycophénolique.

Le mécanisme de sélection au G418 est basé sur la sensibilité des cellules à cet antibiotique qui est un aminoglycoside apparenté à la gentamycine. Il est toxique pour les cellules bactériennes, les cellules de levures (JIMENEZ et DAVIES, 1980), de végétaux et de mammifères (SOUTHERN, 1981; CANAANI et BERG, 1982) ainsi que pour les protozoaires. Cet antibiotique affecte la fonction des ribosomes 80S et la synthèse protéique. Le G418 peut être inactivé par l'enzyme bactérienne phosphotransférase APH (3') II ( $neo$ ) qui est localisé sur le transposon Tn5. Lorsque les séquences codantes pour ce gène sont clonées dans un vecteur eucaryotique et transfectées dans des cellules eucaryotiques, ces dernières deviennent résistantes à l'antibiotique G418.

Les cellules animales présentent des sensibilités différentes au G418 et la concentration nécessaire pour la sélection doit être déterminée pour chaque souche cellulaire.

La méthode la plus simple est de faire croître des cellules sauvages dans le milieu de culture additionné de différentes concentrations d'antibiotiques afin de déterminer le taux létal.

En général, une cellule en multiplication sera plus vite affectée par la présence de G418 qu'une cellule qui n'est pas en multiplication, mais pourtant, une cellule en multiplication aura besoin de 3 à 7 jours pour être tuée. C'est pourquoi nous avons décidé de déterminer la concentration minimale de G418 nécessaire pour tuer les cellules CHO en 7 jours.

#### Influence du G418 sur les cellules CHO.

Les expériences ont été réalisées dans des boîtes de 24 puits avec différentes concentrations de G418 à raison de 200 µg/ml, 400 µg/ml, 600 µg/ml et 800 µg/ml dans du milieu Ham F12 +5% SVF. Les puits ont étéensemencés à raison de  $2 \cdot 10^4$  cellules par puits. Des comptages sont réalisés après trypsination au temps 24 h, 48 h, 72 h, 96 h et 168 h (7 jours).

Ces expériences ont été renouvelées trois fois et comparées, dans les mêmes conditions expérimentales, à la croissance des cellules dans du milieu sans antibiotique.

Les résultats obtenus sont représentés sous la forme de pourcentage de cellules viables, à un temps t, dans du milieu additionné avec G418 par rapport aux cellules cultivées sans antibiotique. La figure I.21 montre la moyenne des pourcentages obtenus sur trois expériences distinctes.

La concentration minimale de G 418 nécessaire pour tuer les cellules CHO en 7 jours semblent être de 400 µg/ml. Pour des concentrations inférieures à cette valeur, c'est-à-dire pour 200 µg /ml , il faut attendre 15 jours pour obtenir moins de 1% de cellules viables. Pour des concentrations supérieures à 400 µg /ml , toutes les cellules sont mortes (viabilité inférieure à 2%) dès 96 h de culture.

De plus, jusqu'à 48 h de culture, aucune différence dans la viabilité des cellules n'a pu être observée, quelle que soit la concentration d'antibiotique dans le milieu.

Ces résultats confirment ceux obtenus par différents auteurs sur l'action létale du G418. En tout premier lieu, il avait été montré que le G 418 était létal pour les levures (JIMENEZ et DAVIES 1980) et que le gène de résistance à la kanamycine, porté par le transposon Tn 601, conférait, aux levures transformées, le phénotype G418-résistant. D'autres auteurs (COLBERE-GARAPIN et al, 1981) ont étendu ces investigations aux cellules de mammifères et ont montré que le G 418 était toxique pour toutes les cellules animales testées. Il a également été montré que la fréquence de résistance spontanée au G418 est inférieure à  $10^{-7}$  (SOUTHERN et BERG, 1982). De plus, il a été prouvé que le processus létal du G418 est très lent et qu'il ne bloque pas la division cellulaire les deux premiers jours suivant l'addition de l'antibiotique dans le milieu (COLBERE-GARAPIN et al, 1981).

Pour la plupart des cellules animales, une concentration comprise entre 100  $\mu\text{g/ml}$  et 1  $\text{mg/ml}$  semble adéquate pour effectuer la sélection des cellules recombinantes.

La concentration de 400  $\mu\text{g/ml}$  de G418 sera celle retenue pour la sélection des cellules CHO recombinantes, cotransfectées par les vecteurs pcDNAI-GGT et pMAMneo. Après une semaine de sélection, les cellules non recombinantes auront été éliminées alors que des colonies de cellules résistantes apparaîtront et seront repiquées ultérieurement.

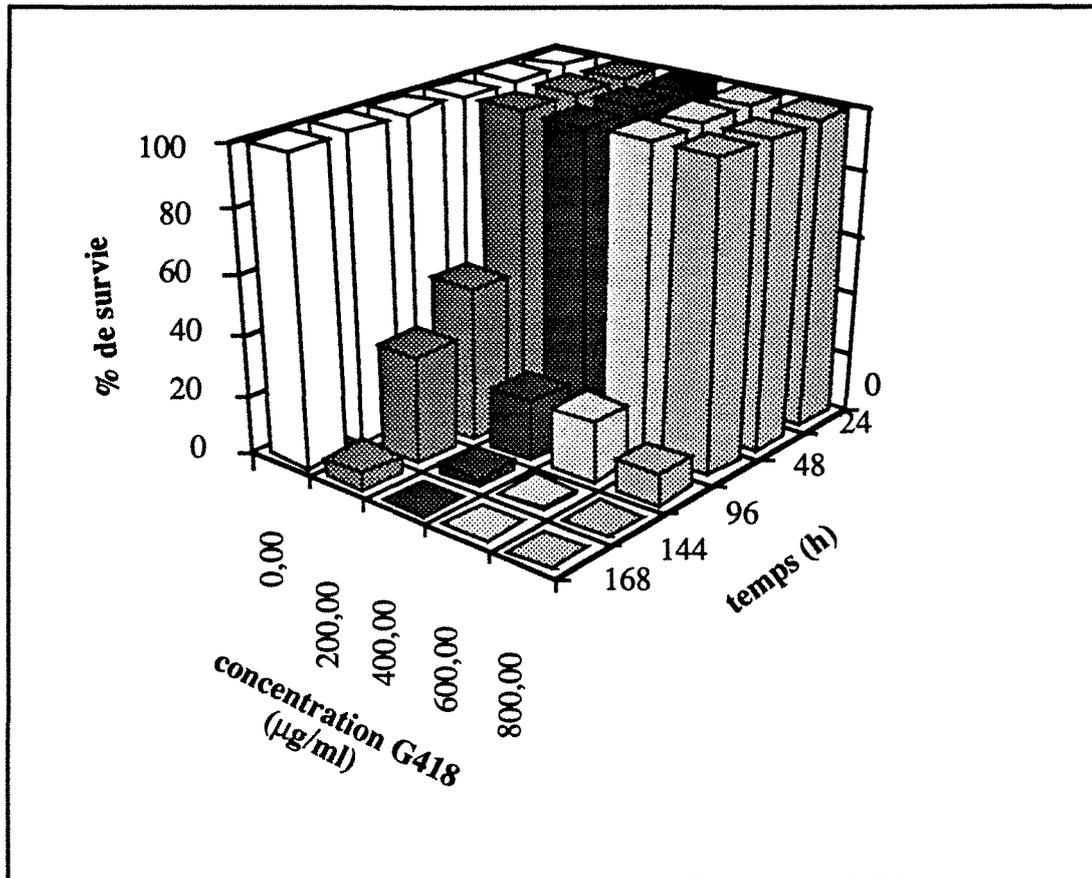


Figure I.21: pourcentage de cellules CHO viables en fonction de la concentration d'antibiotique G418 additionnée au milieu de culture et au cours du temps.



**ANNEXE 4**



## ANNEXE 4

### MISE AU POINT DE LA CULTURE DE CELLULES CHO SUR MICROPORTEURS

Différentes expériences ont été réalisées en flacons agités afin de déterminer les conditions appropriées pour la culture de cellules CHO sur microporteurs. En particulier, nous avons défini le taux d'ensemencement adéquat, le type de microporteurs et le pH optimal de croissance.

Deux types de microporteurs ont été testés: les microporteurs cytodex 1 et cytodex 3 (dont les caractéristiques seront retrouvées dans le chapitre Matériels et Méthodes au paragraphe B.3). L'expérience a été réalisée en flacons agités de 250 ml dans du milieu HAM F12 + 5% SVF + 2mM glutamine. L'ensemencement a été effectué à raison de  $2,5 \cdot 10^5$  cellules / ml. La figure I.22 compare la croissance cellulaire sur les deux types de microporteur lors d'une culture en mode discontinu.

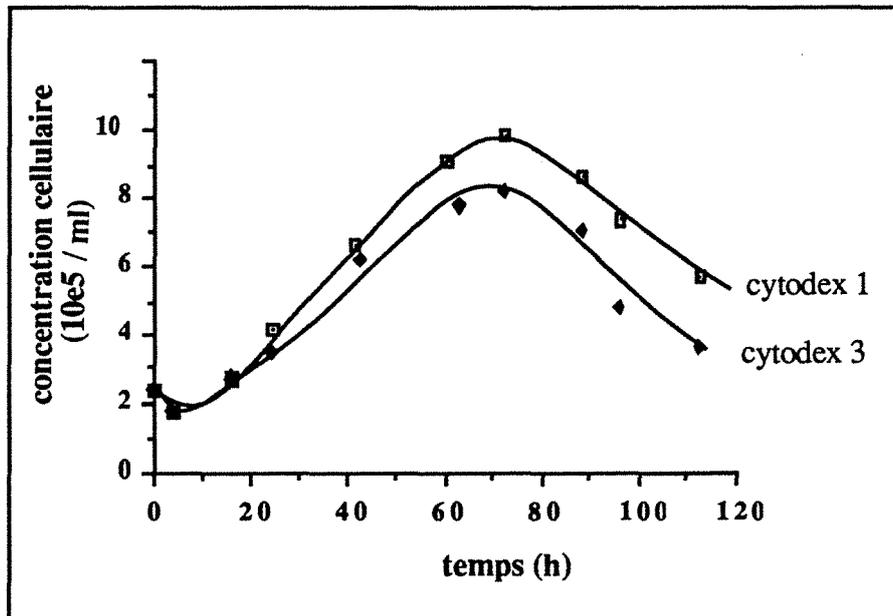


Figure I.22 : croissance de cellules CHO sur microporteurs cytodex 1 ou cytodex 3: expériences réalisées en mode discontinu, en flacons agités

Ces tracés montrent un maximum de concentrations cellulaires pour la culture sur cytodex 1 de  $1 \cdot 10^6$  cellules par ml alors que sur cytodex 3 le maximum de concentration cellulaire atteint

seulement  $8.10^5$  cellules par ml. Ces résultats confirment des travaux réalisés sur des cellules CHO avec des cultures sur microporteurs cytodex 1 (HAYTER et al, 1991). Les cultures de cellules CHO effectuées dans ce travail seront réalisées sur cytodex 1 exclusivement.

Des expériences similaires ont été réalisées pour tester le taux d'ensemencement adéquat. Des taux d'ensemencement compris entre  $0,5.10^5$  cellules par ml et  $4.10^5$  cellules par ml ont été essayés sur des cultures de cellules CHO en flacons agités avec des microporteurs cytodex 1 (5 g / l). Pour les concentrations de  $0,5$  et  $1.10^5$  cellules par ml, un temps de latence de 24 à 35 heures a pu être observé et indique que le nombre initial de cellules par microporteur est trop faible. Par contre, pour la concentration de  $4.10^5$  cellules par ml, de nombreux microporteurs sont colonisés en moins de 30 heures et le décès cellulaire intervient à partir d'environ 30 h de culture. La concentration de  $2.10^5$  cellules par ml permet l'obtention d'une concentration maximale de cellules en 50 heures de culture avec une colonisation progressive des microporteurs. C'est cette concentration qui sera retenue pour les expériences ultérieures.

De même, nous avons pu observé que le maintien du pH à 7,4 au cours de la culture par addition de bicarbonate de sodium toutes les 12 h permettait l'obtention de concentration cellulaire supérieure à des cultures en pH non régulé. En effet, en absence de régulation, une chute importante de pH a été observée avec l'obtention de  $\text{pH} < 6,8$ , entraînant un décès cellulaire non négligeable.

En dernier, il nous a semblé intéressant de tester les conditions initiales d'ensemencement: en effet, lors des premières expériences réalisées en flacons agités, une hétérogénéité de la colonisation des microporteurs avait été observée dès les premières heures de culture; les conditions expérimentales correspondantes étaient les suivantes: l'agitation n'avait lieu que 4 h après ensemencement pour permettre l'adhésion des cellules sur les microporteurs et éviter le stress mécanique des cellules. Une très faible mortalité était effectivement observée, mais il a été noté une hétérogénéité trop importante de la colonisation des microporteurs. Deux autres conditions d'ensemencement ont été tentées: une agitation douce (20 rpm) pendant les 4 premières heures de culture puis agitation normale (40 rpm) ou une agitation de 40 rpm dès l'ensemencement. L'agitation initiale de 40 rpm entraîne une mortalité de près de 20% dans les 8 premières de culture alors qu'une agitation progressive de 20 rpm puis 40 rpm, 4 heures après l'ensemencement, permet de réduire cette mortalité à environ 10%. Ce sont ces conditions expérimentales d'ensemencement qui seront utilisées tout au long de ce travail.

## 1.4. CONCLUSION DU CHAPITRE 1

La première partie de ce travail a permis d'obtenir **une cellule CHO recombinante exprimant la GGT humaine de façon stable**. Les différentes étapes successives nécessaires à la réalisation de ce premier objectif ont été les suivantes:

- la mise au point d'une technique de transfection adaptée à la transfection de cellules CHO, impliquant une étude sur la viabilité et la perméabilité des cellules en fonction des différents paramètres qui influent sur le taux de transfection;
- la mise au point des conditions de sélection nécessaire à l'élimination des cellules non transfectées.
- enfin, les caractéristiques structurales et catalytiques de la GGT recombinantes ont été comparées à celles de GGT issues de différentes origines.

Le deuxième objectif consistait à établir les caractéristiques cinétiques de croissance et métaboliques de la souche sauvage afin qu'elles soient comparées à celles de la souche recombinante: l'ensemble des résultats obtenus a permis de montrer que **le clone sélectionné, ayant la meilleure activité spécifique (2 U / mg de protéines), possède les mêmes caractéristiques cinétiques que celles des cellules sauvages**, présument de l'intégration de l'ADN de telle façon qu'il ne modifie pas le métabolisme de base des cellules.

Le dernier objectif était **la production d'une enzyme membranaire par culture en masse**: une production d'environ 250 U / l de culture a été obtenue avec une production directement corrélée à la densité cellulaire; cette activité maximale a été obtenue en fin de phase exponentielle de croissance des cellules; ce qui suggère que la récupération de l'enzyme nécessitera l'arrêt de la culture à un moment opportun en vue de l'extraction de cette enzyme membranaire. L'ensemble de ces travaux montrent la faisabilité de la culture en masse d'une cellule animale produisant une enzyme membranaire.

Afin d'affiner ces travaux, différentes expériences complémentaires, n'entrant pas dans le cadre de nos objectifs, pourraient être envisagées et apporterait des indications intéressantes: d'une part, l'évaluation du nombre de copies de l'ADN dans le génôme ainsi que sa localisation dans un site de transcription actif, d'autre part, l'analyse des ARNm pour mettre en évidence le produit de transcription du cDNA.



## CHAPITRE 11

## CHAPITRE II.

### INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR LE COMPORTEMENT DES CELLULES CHO-GGT

<b>II.1. Introduction.....</b>	<b>159</b>
<b>II.2. Influence de l'adhérence des cellules sur des cultures en flacons agités.....</b>	<b>161</b>
II.2.1. Mise en œuvre de la culture en agrégats.....	162
II.2.2. Cinétiques comparées de cultures de cellules CHO-GGT sur microporteurs ou en agrégats.....	165
II.2.3. Adaptation des cellules CHO-GGT à la culture en suspension. ....	174
II.2.4. Comparaison des trois systèmes de cultures de cellules CHO recombinantes testés.....	177
II.2.4.1. Influence sur la croissance cellulaire et la production de GGT.....	177
II.2.4.2. Influence sur les propriétés catalytiques de l'enzyme. .....	178
<b>II.3. Cinétiques de cultures de cellules CHO-GGT en réacteurs discontinus et semi-continus.....</b>	<b>180</b>
II.3.1. Cinétiques comparées en réacteur discontinu de cellules CHO-GGT sur microporteurs ou en agrégats.....	180
II.3.2. Influence du système de culture sur le décès et la lyse cellulaire.....	186
II.3.2.1. Détermination du rendement cellulaire en LDH.....	188
II.3.2.2. LDH extracellulaire et concentration en cellules mortes.....	189
II.3.2.3. Evaluation de la lyse cellulaire à partir du dosage LDH.....	191
II.3.2.4. Application à la culture sur microporteurs.....	191
II.3.2.5. Application à la culture en agrégats .....	193
II.3.3. cinétiques de culture en réacteur semi-continu de cellules CHO-GGT en agrégats.....	196
II.3.4. Conclusions sur le comportement des cellules CHO-GGT en réacteurs discontinus et semi-continus.....	203
II.3.4.1. Comparaison des cultures sur microporteurs ou en agrégats en réacteur discontinu. ....	203
II.3.4.2. Comparaisons des cultures en agrégats en réacteur discontinu ou semi-continu ou en flacons agités en mode recharge-récolte.....	205
<b>II.4. Conclusion du chapitre II.....</b>	<b>207</b>

## CHAPITRE 11.

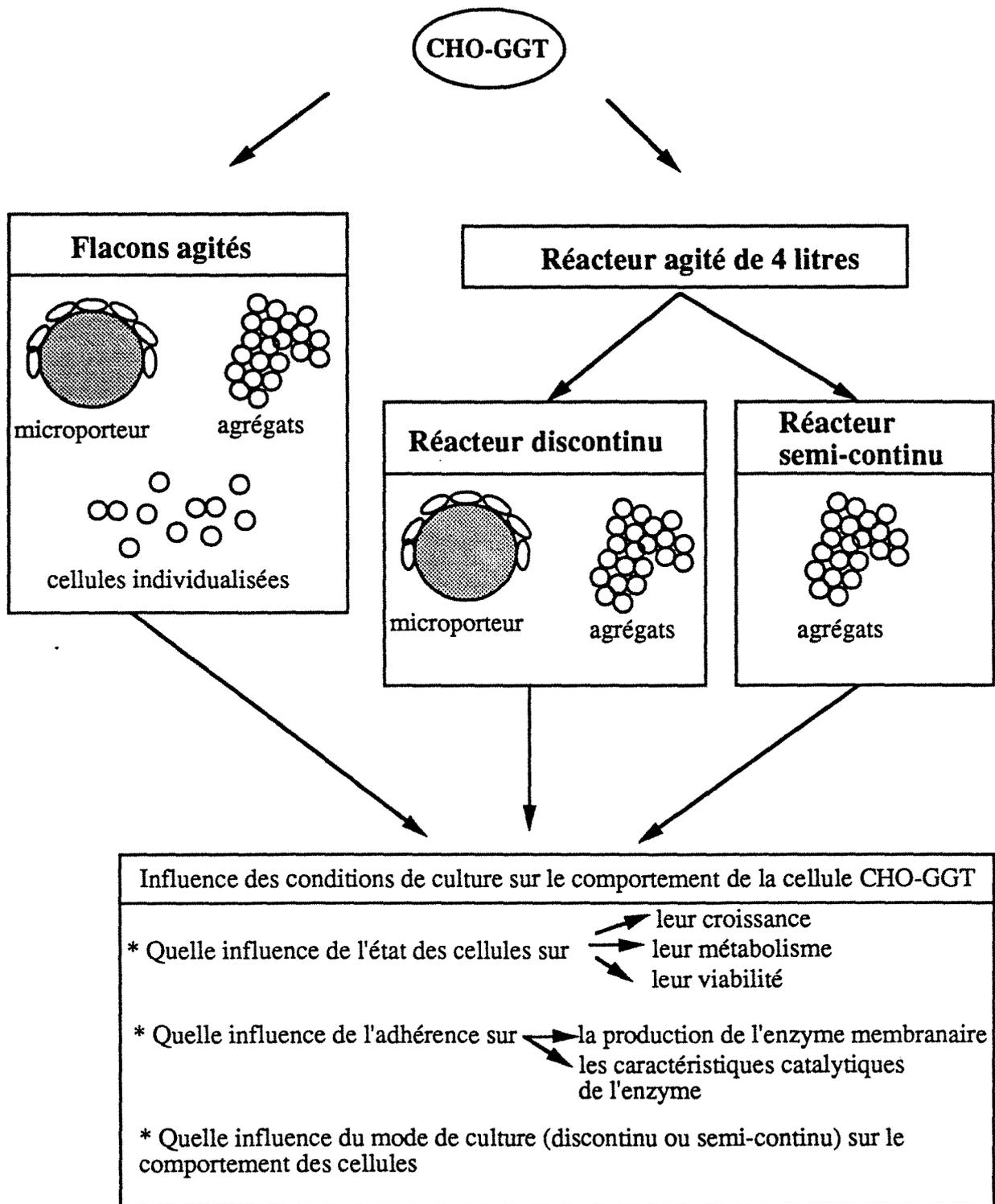
### INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR LE COMPORTEMENT DES CELLULES CHO-GGT

#### 11.1. INTRODUCTION.

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer l'influence des conditions de culture, notamment le mode de culture (discontinu ou semi-continu) ou le système de culture (microporteurs, agrégats, cellules individualisées), sur le comportement des cellules recombinantes et leur production de GGT. Plusieurs facteurs doivent être pris en compte: la GGT est une enzyme membranaire, non excrétée dans le milieu de culture et nécessitera la récupération des cellules en vue de la purification de cette enzyme. De plus, le système de culture choisi devra permettre la conservation des propriétés catalytiques et le maintien d'une bonne production de GGT. Un autre aspect de cette étude consistera à vérifier si les différentes conditions de culture testées peuvent induire des modifications dans le métabolisme de la cellule ou dans la production d'une protéine hétérologue. Un schéma général des objectifs de cette étude est présenté sur la figure II.1.

Le système de culture le plus couramment utilisé pour des cellules adhérentes est la culture sur microporteurs et sera considéré comme culture témoin. Outre l'aspect coûteux des microporteurs, la culture sur ce type de support a deux inconvénients majeurs: d'une part, la difficulté au niveau de la culture, notamment des problèmes de colonisation hétérogène des cellules à la surface des porteurs et de comptages cellulaires, et, d'autre part, la difficulté de récupérer les cellules adhérentes sur les microporteurs en vue de la purification de l'enzyme membranaire. En effet, la trypsination des cellules sur microporteurs entraîne une perte d'au moins 50% de l'activité enzymatique et sera donc évitée. De plus, l'extrapolation à une échelle industrielle serait compliquée par la manipulation des cellules sur microporteurs lors de la propagation.

Une alternative à la culture sur microporteurs est la culture en agrégats. Elle consiste à ensemercer les cellules directement dans le flacon agité; celles-ci se serviront mutuellement de support et formeront des paquets de cellules de tailles croissantes au cours de la culture. L'addition d'ions calcium peut être effectuée afin de faciliter l'agrégation des cellules. (GRINNEL et al,1977). Ce système présente lui aussi des inconvénients: celui de ne pas fournir un environnement homogène aux cellules et donc probablement d'engendrer des



limitations nutritionnelles au niveau des cellules situées au cœur des agrégats. De plus, comme nous le verrons ultérieurement, la viabilité n'est pas accessible par mesure directe et il sera nécessaire d'utiliser une méthode indirecte pour appréhender le phénomène de la mortalité cellulaire dans les agrégats.

Une autre possibilité pour la culture de cellules adhérentes est l'adaptation de celles-ci à la culture en suspension. Ce système de culture est peu répandu: il consiste à réaliser des passages successifs pendant plusieurs semaines en désagrégeant les petits paquets de cellules à chaque passage avant de les réensemencer dans le flacon agité. Cette adaptation en mode recharge-récolte est longue et incertaine, mais elle a déjà donné de bons résultats dans certains cas (MURATA et al, 1988, BORASTON et al, 1992).

Le mode discontinu est le mode de culture le plus simple à mettre en œuvre et permet des cultures d'environ une semaine; mais c'est également le moins performant pour la production de protéines recombinantes. L'utilisation d'un autre mode de culture tel que le mode semi-continu permettrait d'allier simplicité de mise en œuvre et amélioration des performances en maintenant une croissance pendant une durée plus longue. L'augmentation de la densité cellulaire devrait favoriser la production de la protéine d'intérêt. Les avantages de ce mode de culture seront discutés au cours de ce chapitre.

La démarche suivie dans ce chapitre sera la suivante: dans un premier temps, des cultures de cellules CHO-GGT sur microporteurs, en agrégats ou adaptées à la culture en suspension seront comparées dans des systèmes à petite échelle, en flacons agités; en particulier, seront analysées la croissance, les caractéristiques métaboliques, la production de GGT et les propriétés catalytiques de cette protéine. Une deuxième partie concernera la culture de ces cellules en réacteur en mode discontinu et en mode semi-continu; les avantages et les inconvénients de ces modes de culture ainsi que les performances de la souche seront discutés. Dans cette partie, l'évolution des différentes populations cellulaires (vivantes, mortes ou lysées) sera prise en considération de manière plus précise.

## **11.2. INFLUENCE DE L'ADHÉRENCE DES CELLULES SUR DES CULTURES EN FLACONS AGITÉS.**

La culture en agrégats de cellules support-dépendantes paraît une alternative intéressante car elle est simple à mettre en œuvre sans adaptation particulière; elle permet ainsi de supprimer les microporteurs. Une première étape va consister à vérifier la faisabilité de la culture en

agrégats des cellules CHO recombinante puis à comparer la culture en agrégats ou sur microporteurs.

### **11.2.1 Mise en œuvre de la culture en agrégats.**

La présence de cations, notamment les ions calcium, dans le milieu de culture, favorise l'agrégation des cellules (GRINELL, 1977). Des essais préliminaires ont été réalisés en flacons agités afin de trouver la concentration adéquate de  $\text{CaCl}_2$  pour favoriser l'agrégation des cellules. Le milieu de base utilisé DMEM / Ham F12 contient initialement environ 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Nous avons testé l'ajout de 7, 15, 31 mM de  $\text{CaCl}_2$  afin d'obtenir des concentrations finales de 8, 16 et 32 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Les flacons de culture ont été préalablement siliconés afin d'éviter l'attachement des cellules sur le verre. Les cellules ont étéensemencées à raison de  $2 \cdot 10^5$  cellules / ml dans 200 ml de milieu additionné de 5% de SVF, 4 mM de glutamine et différentes concentrations de  $\text{CaCl}_2$ . La figure II.2 représente les courbes de croissance des cellules CHO-GGT cultivées en agrégats avec différentes concentrations de  $\text{CaCl}_2$ . La concentration cellulaire correspond à la totalité des cellules, mortes plus vivantes; en effet la trypsination des petits agrégats entraîne une coloration par le bleu trypan de toutes les cellules: il est donc impossible de déterminer la viabilité de ces agrégats et l'estimation de la concentration cellulaire totale sera obtenue par coloration des noyaux au cristal violet. La culture a été réalisée en mode recharge-récolte avec changement, soit de la totalité du milieu de culture (v) du flacon agité, soit de la moitié de son volume (v/2). Après centrifugation des cellules, celles-ci sont réensemencées dans du milieu frais.

Il apparaît que pour la concentration de 32 mM de  $\text{CaCl}_2$ , aucune agrégation ne se produit et aucune croissance cellulaire n'est observée. Pour 16 mM, une légère croissance débute pendant les 100 premières heures de culture avec formation de petits agrégats de 3 à 5 cellules, mais malgré le changement de milieu, le nombre de cellules a chuté durant les 64 h suivantes. Ces deux concentrations 16 et 32 mM paraissent inappropriées pour obtenir des agrégats. Le mode recharge-récolte permet de s'affranchir des problèmes de limitations nutritionnelles ainsi que des problèmes d'accumulation de toxiques mais une augmentation de l'osmolarité ou un problème de toxicité du  $\text{CaCl}_2$  à de trop fortes concentrations peuvent contribuer à inhiber la croissance cellulaire.

La concentration de 8 mM a permis d'obtenir une densité cellulaire totale d'environ  $1 \cdot 10^6$  cellules / ml en 175 h avec un  $\mu_{\text{max}}$  global d'environ  $0,01 \text{ h}^{-1}$  (calculé sur les 175 premières heures de culture); cependant, ces agrégats semblent fragiles car la trypsination de ceux-ci entraîne une coloration par le bleu trypan de toutes les cellules; l'utilisation de concentrations

plus faibles de trypsine ne permettant pas de dissocier les agrégats. Afin d'éviter de trop fragiliser les cellules au moment de la centrifugation lors d'une récolte, nous avons essayé à 175 h de culture, de ne changer que la moitié du volume du flacon de culture; les cellules sont réensemencées dans le même volume de milieu. Malheureusement 48h plus tard aucune croissance cellulaire n'est détectable, indiquant une accumulation de toxiques ou une limitation en nutriments et présume d'une sensibilité accrue des cellules agrégées à leur environnement. Le changement de la totalité du milieu permet un redémarrage de la croissance cellulaire.

Quant à l'évolution de la taille des agrégats au cours de la culture, nous avons pu observer l'apparition de petits agrégats de 2 à 10 cellules, après seulement 100 h de culture (photo II.1a). La taille de ceux-ci croît ensuite au cours de la culture, avec des agrégats d'une trentaine à une cinquantaine de cellules vers 175-200 heures de culture (photo II.1b). A la fin de la culture (environ 325 h) nous pouvons observer des agrégats de plus d'une centaine de cellules (photo II.1c et II.1d); nous ne pouvons pas, cependant, déterminer la viabilité de ces agrégats par comptage direct.

Dans ce premier essai, les cellules avaient été bien dissociées par trypsination avant ensemencement, mais l'agrégation semble difficile à être initialisée: c'est pourquoi dans les expériences ultérieures, une trypsination plus douce et plus courte sera réalisée avant ensemencement de manière à favoriser l'obtention de petits agrégats.

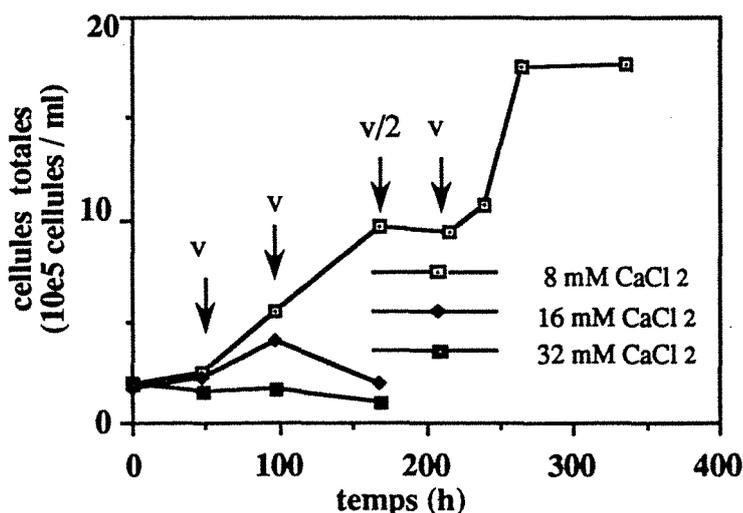


figure II.2: concentration de cellules totales CHO-GGT en agrégats avec différentes concentrations de CaCl<sub>2</sub> additionnées dans le milieu de culture. Les flèches indiquent les changements de milieu de la totalité (v) ou de la moitié du volume du flacon agité (v/2).



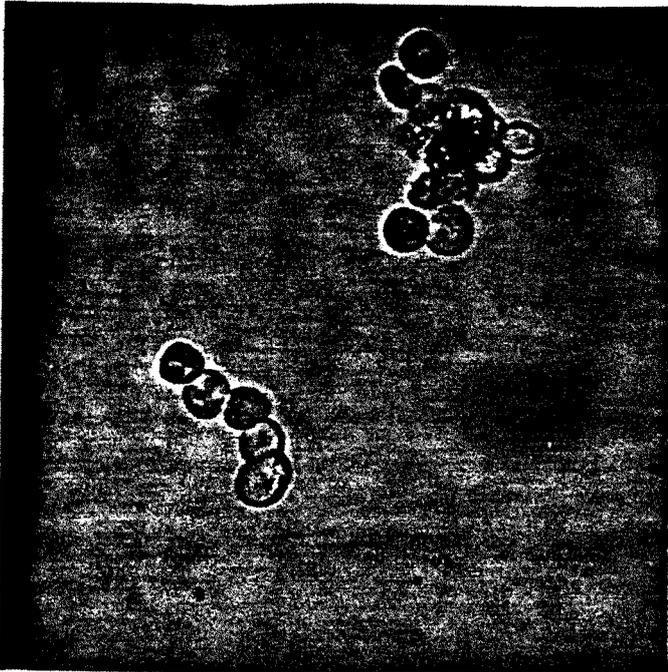


Photo II.1.a: agrégat obtenu après 100 h de culture (grossissement x 320)

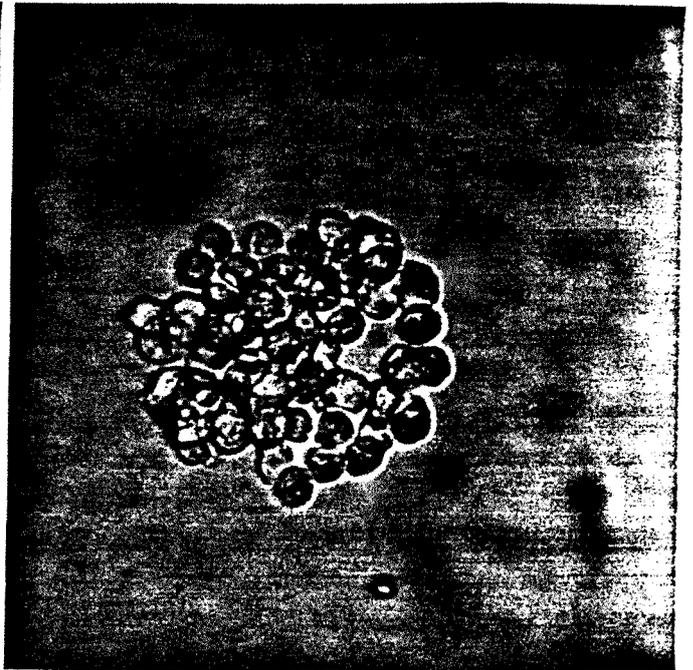


Photo II.1.b: agrégat obtenu après 200 h de culture (grossissement x 320)

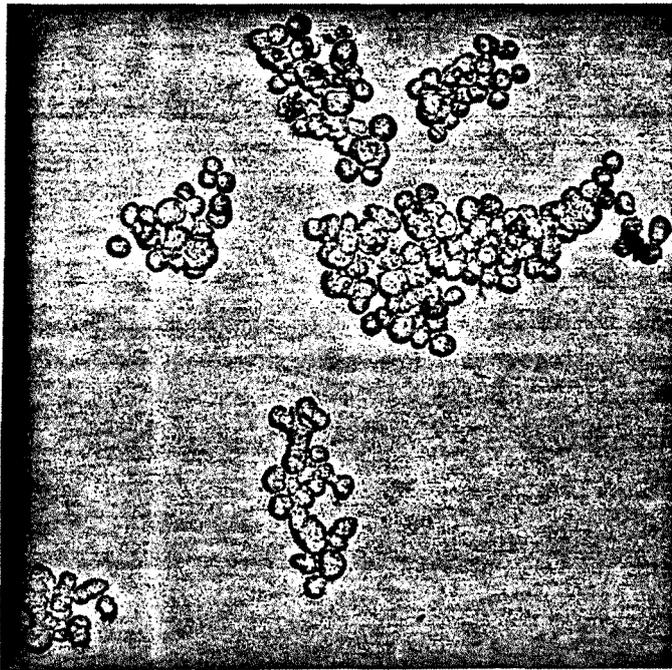


Photo II.1.c: agrégats obtenus après 300 h de culture (grossissement x 100)

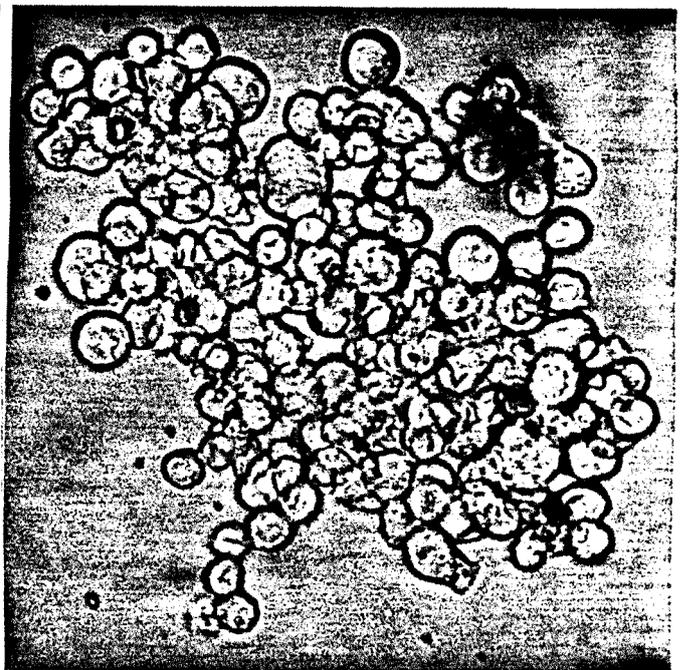


Photo II.1.d: agrégat obtenu après 325 h de culture (grossissement x 320)



Ainsi, dans cette première expérience nous avons pu montrer la faisabilité de la croissance de cellules CHO-GGT en absence de microporteurs avec l'obtention d'agrégats de taille croissante au cours de la culture.

### **11.2.2. Cinétiques comparées de cultures de cellules CHO-GGT sur microporteurs ou en agrégats.**

Afin de comparer les performances de la culture en agrégats avec celles du système sur microporteurs, une expérience a été réalisée, toujours en mode recharge-récolte, avec ensemencement des cellules en présence de microporteurs ou sans microporteurs, mais avec ajout de 8 mM de CaCl<sub>2</sub> dans le milieu de culture, pour la culture en agrégats. Deux flacons agités ont été ensemencés dans les mêmes conditions expérimentales à raison de  $2,5 \cdot 10^5$  cellules / ml dans du milieu DMEM / Ham F12 avec 5% SVF et 4 mM de glutamine. La culture en agrégats est initialisée en ensemençant directement des petits agrégats. Aux temps 45 h et 156 h de culture, le milieu a été éliminé, soit après décantation des microporteurs, soit après centrifugation des cellules agrégées, et remplacé par du milieu frais, sans addition de CaCl<sub>2</sub>: la présence initiale de CaCl<sub>2</sub> dans le milieu d'ensemencement devant être suffisante à l'initialisation de l'agrégation.

La figure II.3 regroupe les résultats obtenus lors de cette expérience pour la croissance des cellules (figure II.3a) et pour la production de l'enzyme GGT recombinante (figure II.3b) dans les deux systèmes de culture.

Ces tracés font apparaître une croissance plus lente pour les cellules agrégées avec un maximum de  $1,4 \cdot 10^6$  cellules / ml alors que dans les mêmes temps, nous obtenons des concentrations cellulaires de près de  $4 \cdot 10^6$  cellules / ml pour la culture sur microporteurs. Cette différence dans la croissance cellulaire peut s'expliquer par plusieurs phénomènes, notamment par le processus d'adhérence cellulaire qui doit être modifié en absence de support adéquat.

L'adhérence des cellules sur une surface implique une succession d'étapes telles qu'une adsorption de facteurs d'attachement sur la surface de culture, le contact entre les cellules et la surface de culture, l'adhérence de ces cellules, puis leur étalement sur cette surface (HIRTENSTEIN et al, 1980). Deux éléments du milieu de culture sont importants dans le processus d'adhérence cellulaire: les cations divalents et les protéines d'adhérence cellulaire (GRINELL, 1977). Ces protéines d'adhérence cellulaire appelées CAM (Cell Adhesion Molecules) sont des glycoprotéines de membrane dont il existe plusieurs types, dépendants ou non du calcium. Le sérum de veau foetal contient de telles protéines, comme la fibronectine, qui

vont dans un premier temps "tapisser" la surface du microporteur; ces molécules seront dans un deuxième temps reconnues par les cellules et ces dernières viendront adhérer sur le microporteur. La reconnaissance de ces sites spécifiques par les cellules semblent nécessaires pour promouvoir le métabolisme intracellulaire et le début de la division cellulaire (SUZUKI et al, 1991). Un certain nombre de familles de molécules responsables de l'adhérence ont été purifiées et caractérisées ces dernières années (voir revue FISHER, 1991; MEGE, 1991).

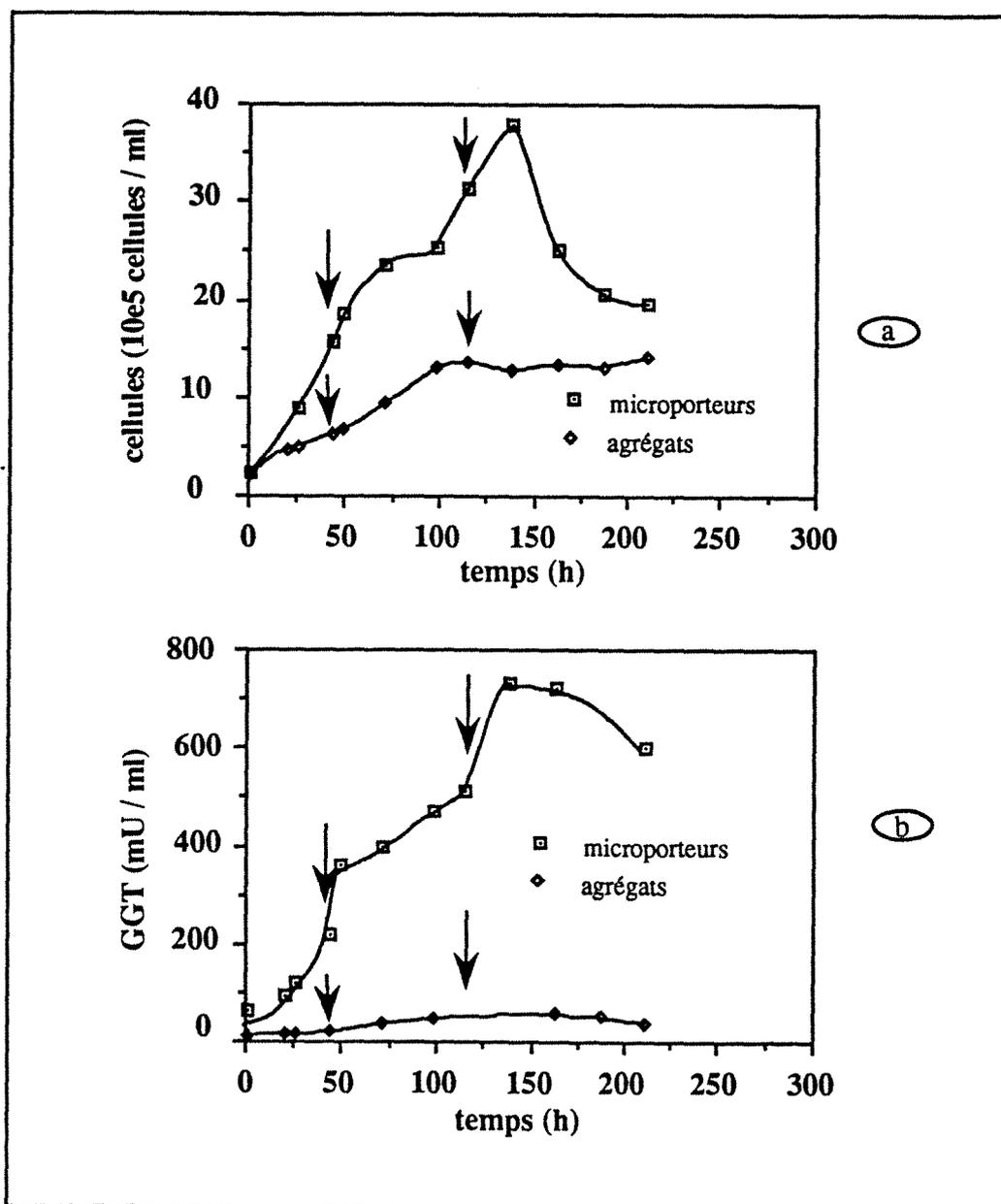


Figure II.3: cellules CHO-GGT en culture sur microporteurs ou en agrégats; évolution de la densité cellulaire (a) et de l'activité GGT (b); les flèches indiquent le changement de milieu usagé par du milieu frais avec réensemencement de toutes les cellules. Pour les cellules sur microporteurs, ce sont les cellules vivantes qui sont dénombrées; dans le cas des cellules agrégées, c'est une estimation de la densité cellulaire totale qui est effectuée. Le dosage de GGT se fait donc respectivement sur les cellules vivantes ou sur les cellules totales.

En absence de support, ces protéines d'adhérence cellulaire vont se trouver en solution dans le milieu de culture et seront peut-être plus difficilement accessibles aux cellules. Le phénomène d'adhérence entre les cellules proviendra alors d'interactions physiques dues à des forces ioniques, entre les cellules qui sont globalement chargées négativement (SHERBET et al, 1972) et les ions chargés positivement (comme les ions  $\text{Ca}^{2+}$ ). La distinction entre l'adhérence des cellules agrégées et celle des cellules sur microporteurs se traduit également par des différences morphologiques; les cellules sur microporteurs vont s'étaler et être de forme allongée alors que les cellules agrégées resteront rondes (voir photo II.2 g et h).

L'évolution de la colonisation des microporteurs et de la croissance des cellules en agrégats est illustrée par la photo II.2. La taille des agrégats croît au cours de la culture, avec des petits paquets de cellules de 3 à 10 cellules dès les 25 premières heures de culture (photo II.2b), qui seront de 50 à 100 cellules après 80 h de culture (photo II.2d) et de plus d'une centaine de cellules après 115 h de culture (photo 2 f et 2 h). Au delà, la taille des agrégats n'évoluera plus jusqu'à la fin de l'expérience. On peut cependant remarquer, que malgré le changement de milieu réalisé à 156 h, aucune croissance des cellules n'est observée pour la culture en agrégats, contrairement à l'expérience précédente; ceci pourrait être imputable, soit à des limitations nutritionnelles ou d'oxygénation à l'intérieur des agrégats, soit à l'absence de  $\text{CaCl}_2$  dans le milieu de recharge: la présence de  $\text{CaCl}_2$  étant peut-être toujours indispensable pour induire la croissance des agrégats.

La colonisation des microporteurs est très hétérogène avec quelques cellules sur les microporteurs après 25 h de culture, un certain nombre de microporteurs restant vides (photo II.2a). Après 80 heures de culture, une grande partie de la surface des microporteurs est colonisée par les cellules (photo II.2c). Au delà de 100 heures de culture les microporteurs colonisés ont la totalité de leur surface recouverte de cellules (photo II.2e et 2g); cependant il reste toujours quelques microporteurs très faiblement ou non colonisés.

Par ailleurs, la figure II.3b soulève un problème important qui est une perte considérable de la production de GGT par les cellules cultivées en agrégats. La culture sur microporteurs permet d'obtenir une production de GGT recombinante de plus de 700 mU / ml de milieu de culture, alors que le maximum de production pour la culture en agrégats est au moins dix fois inférieur, de l'ordre de 60 mU / ml de milieu de culture. Cette différence pourrait être liée au dosage de la GGT sur les agrégats; en effet, ayant obtenu de très gros agrégats, les cellules situées au centre des agrégats sont peut être plus difficilement accessibles aux substrats accepteur et donneur de la GGT, ce qui fausserait le résultat du dosage. Une autre éventualité serait une diminution de la synthèse de GGT par les cellules agrégées.



## MICROPORTEURS

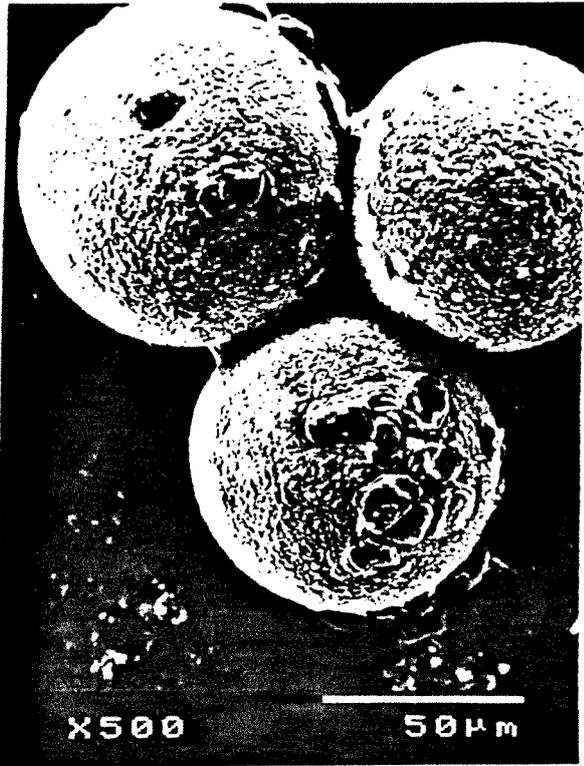


Photo II.2.a: cellules sur microporteurs lors d'une culture recharge-récolte (t=25 h)

## AGREGATS

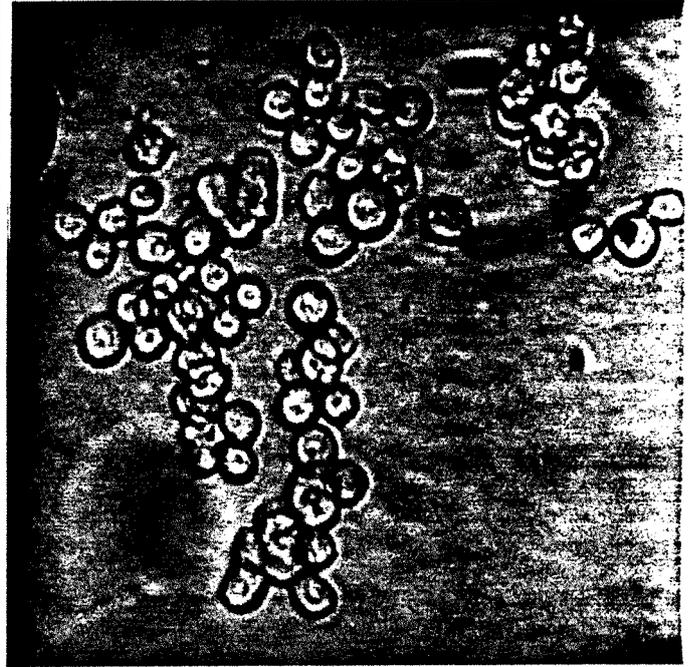


Photo II.2.b: cellules agrégées lors d'une culture recharge-récolte (t=25 h)

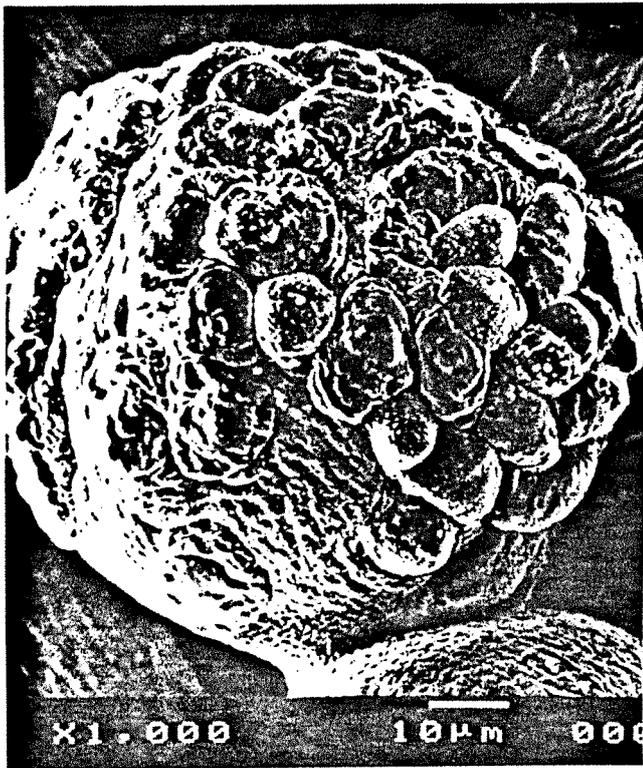


Photo II.2.c: cellules sur microporteurs lors d'une culture recharge-récolte (t=80 h)

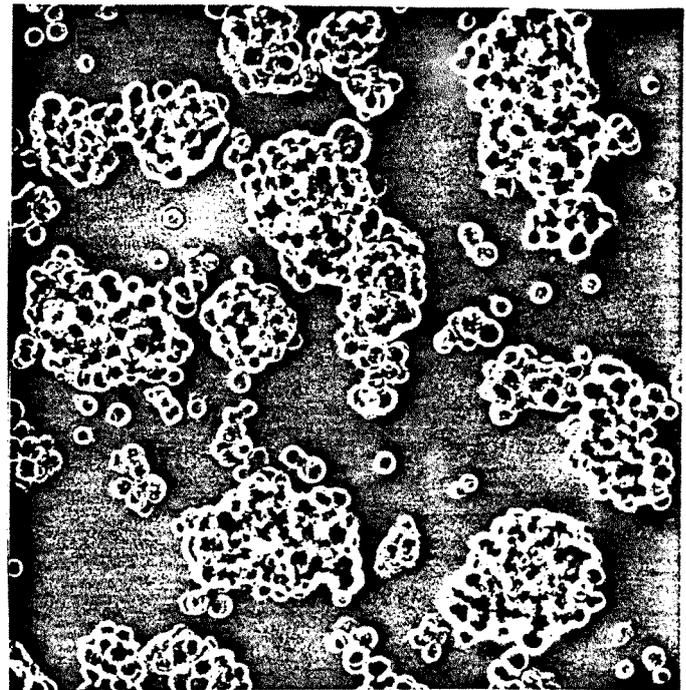


Photo II.2.d: cellules agrégées lors d'une culture recharge-récolte (t=80 h)



## MICROPORTEURS



Photo II.2.e: cellules sur microporteurs lors d'une culture recharge-récolte (t=125 h)

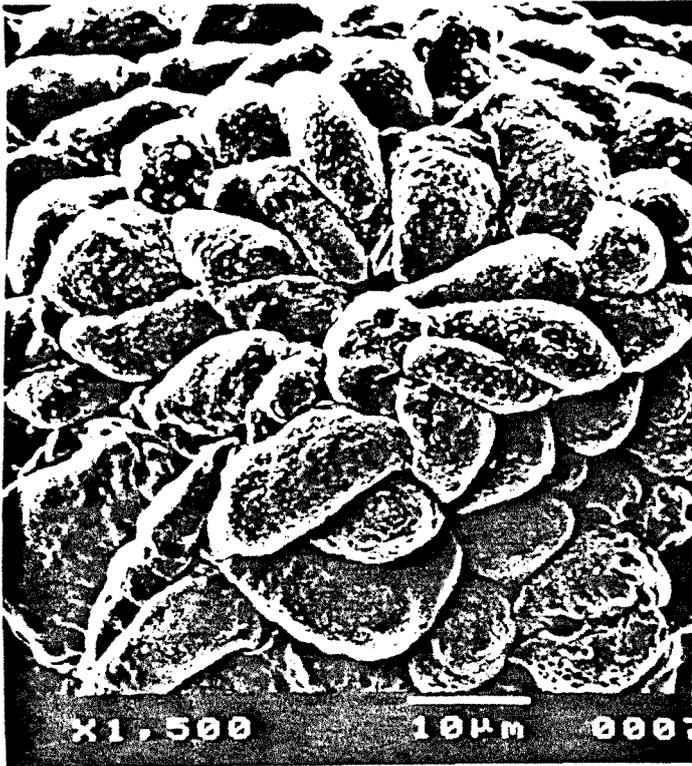


Photo II.2.g: cellules sur microporteurs lors d'une culture recharge-récolte (t=150 h)

## AGREGATS

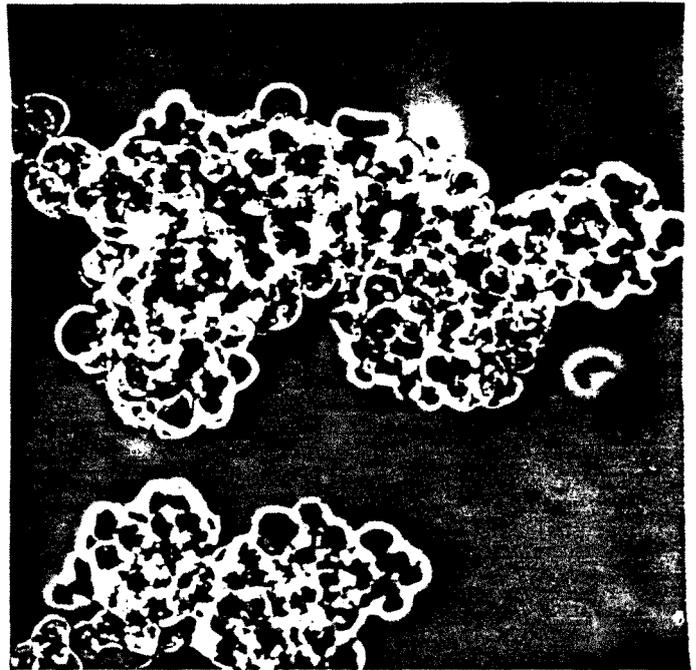


Photo II.2.f: cellules agrégées lors d'une culture recharge-récolte (t=125 h)

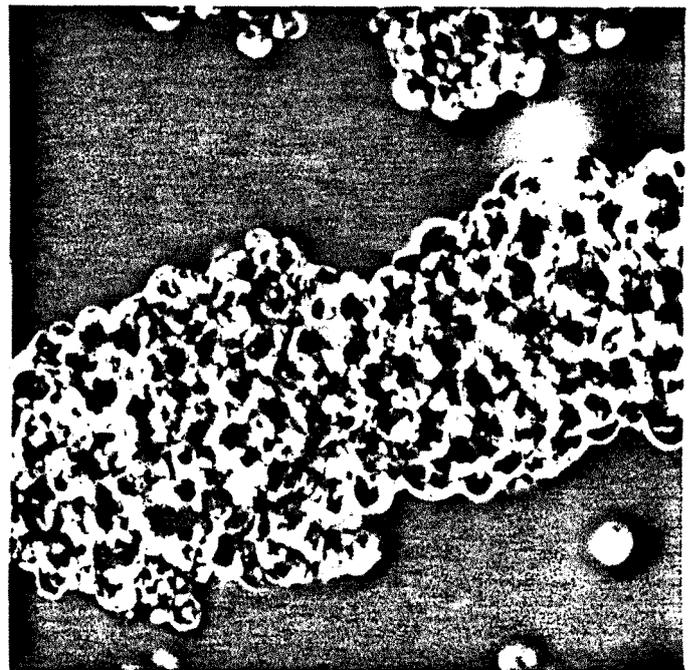


Photo II.2.h: cellules agrégées lors d'une culture recharge-récolte (t=150 h)



La figure II.4 rassemble les consommations de glucose et de glutamine et les productions de lactate et d'ions ammonium des cellules CHO-GGT cultivées sur microporteurs ou en agrégats en flacons agités. Ces tracés montrent une forte production de lactate par rapport au glucose consommé des cellules cultivées en agrégats; de même, les ions ammonium sont produits de façon importante (avec une concentration maximale supérieure à 5 mM) et pourraient avoir un effet toxique sur les cellules agrégées. Par contre, le glucose et la glutamine ne sont pas limitants pour la culture des cellules agrégées.

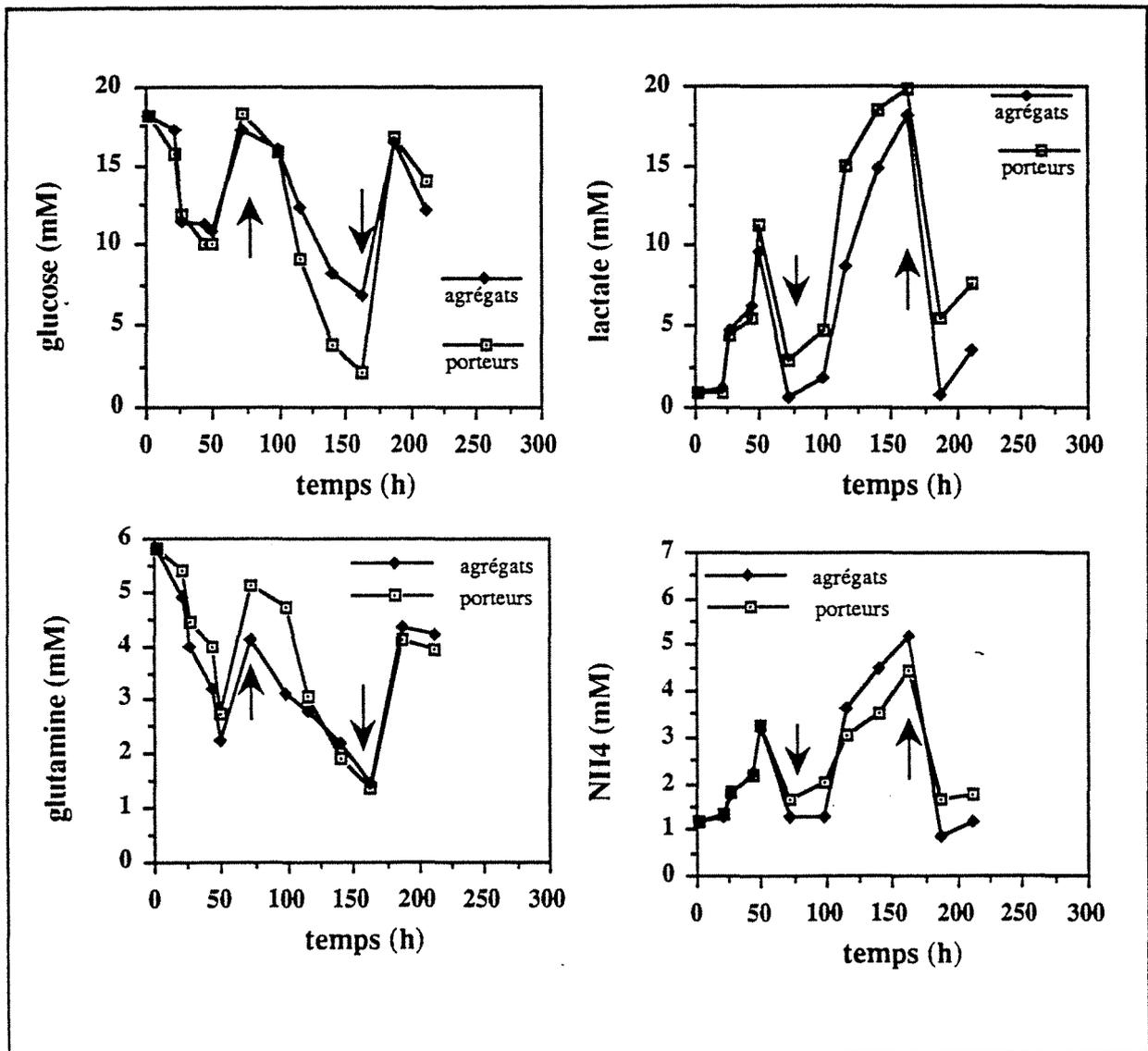


Figure II.4: évolution des concentrations de glucose, glutamine, lactate et ions ammonium lors de la culture en flacons agités en mode recharge-récolte; les flèches indiquent les recharge en milieu frais.

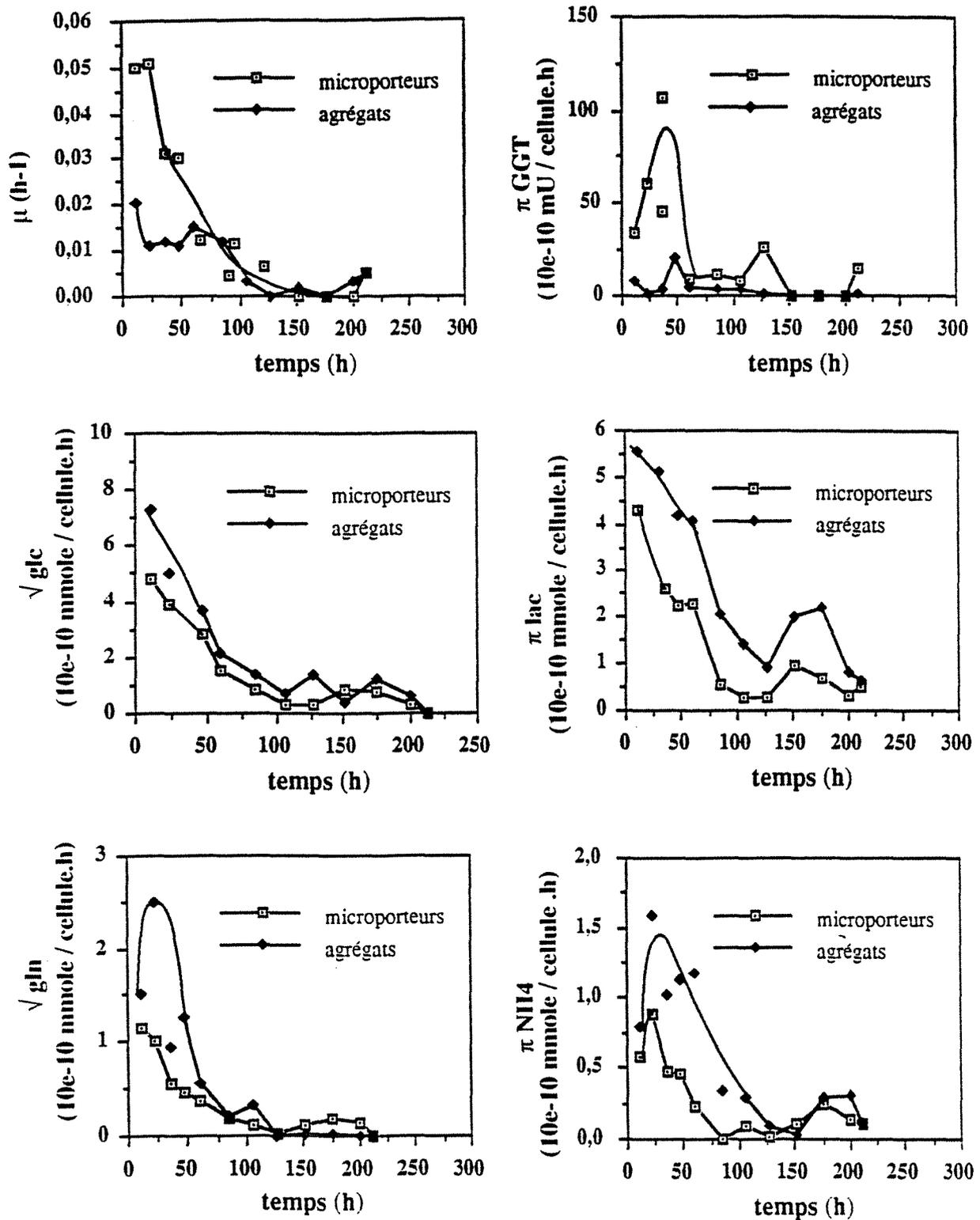


Figure II.5: comparaison des évolutions des vitesses spécifiques de prolifération cellulaire, de consommation de glucose, de glutamine et de production de lactate, d'ions ammonium et de GGT des cellules CHO-GGT cultivées en mode recharge-récolte sur microporteurs ou en agrégats. Les différentes vitesses spécifiques sont calculées d'après les équations données dans la partie Matériels et Méthodes. Les cinétiques complètes sont montrées sur les figures II.3 et II.4. Ces vitesses correspondent à des vitesses spécifiques apparentes pour les cellules sur microporteurs et à des vitesses spécifiques globales pour les cellules agrégées.

La figure II.5 regroupe l'ensemble des vitesses spécifiques de croissance, de consommation de substrats et de production de métabolites suivant le système de culture. Il faut noter que toutes ces vitesses sont rapportées au nombre de cellules vivantes dans le cas de cellules sur microporteurs, alors qu'elles le sont par rapport au nombre de cellules totales comptées dans le cas de cellules agrégées; en effet, nous n'avons aucun moyen d'estimer directement la viabilité des agrégats. Dans le premier cas, c'est la vitesse spécifique de croissance apparente qui est obtenue alors que dans le deuxième cas, c'est la vitesse spécifique de croissance globale qui est calculée; ces deux vitesses étant égales lorsque le nombre de cellules mortes est négligeable. L'ensemble des équations cinétiques seront retrouvées dans le chapitre Matériels et Méthodes. Cependant, en culture recharge-récolte, nous pouvons considérer, en première approximation, que ces grandeurs peuvent être comparées; en effet, le décès doit être négligeable.

D'après ces tracés, nous pouvons noter certaines tendances intéressantes, notamment des vitesses spécifiques de production de lactate et d'ions ammonium légèrement supérieures pour la culture en agrégats en comparaison avec la culture sur microporteurs. Par contre les vitesses spécifiques de croissance et de production de GGT sont inférieures pour la culture en agrégats. Les différences obtenues pour ces vitesses ne peuvent être attribuées au mode de calcul utilisé; en effet, si le nombre de cellules mortes est important dans le cas de cellules cultivées en agrégats, les vitesses spécifiques de la figure II.5 sont sous-évaluées, intensifiant alors l'augmentation des valeurs des vitesses spécifiques de consommation de la glutamine et de production de lactate et d'ions ammonium. Cependant, on peut penser qu'en l'absence de limitation et de toxicité, le décès cellulaire est faible pendant les 100 premières heures de culture; ce point sera approfondi ultérieurement par l'utilisation d'un marqueur physiologique du décès cellulaire.

Les rendements  $Y_{NH_4} / Gln$  et  $Y_{Lac} / Glc$  qui en découlent sont tracés figure II.6, et sont résumés dans le tableau suivant (tableau II.A)

	$Y_{NH_4} / Gln$	$Y_{Lac} / Glc$
cellules sur microporteurs	0,65 mole / mole	1 mole / mole
cellules agrégées	1 mole / mole	1,7 mole / mole

Tableau II.A: comparaison des rendements métaboliques obtenus par culture de cellules CHO-GGT en flacons agités sur microporteurs ou en agrégats.

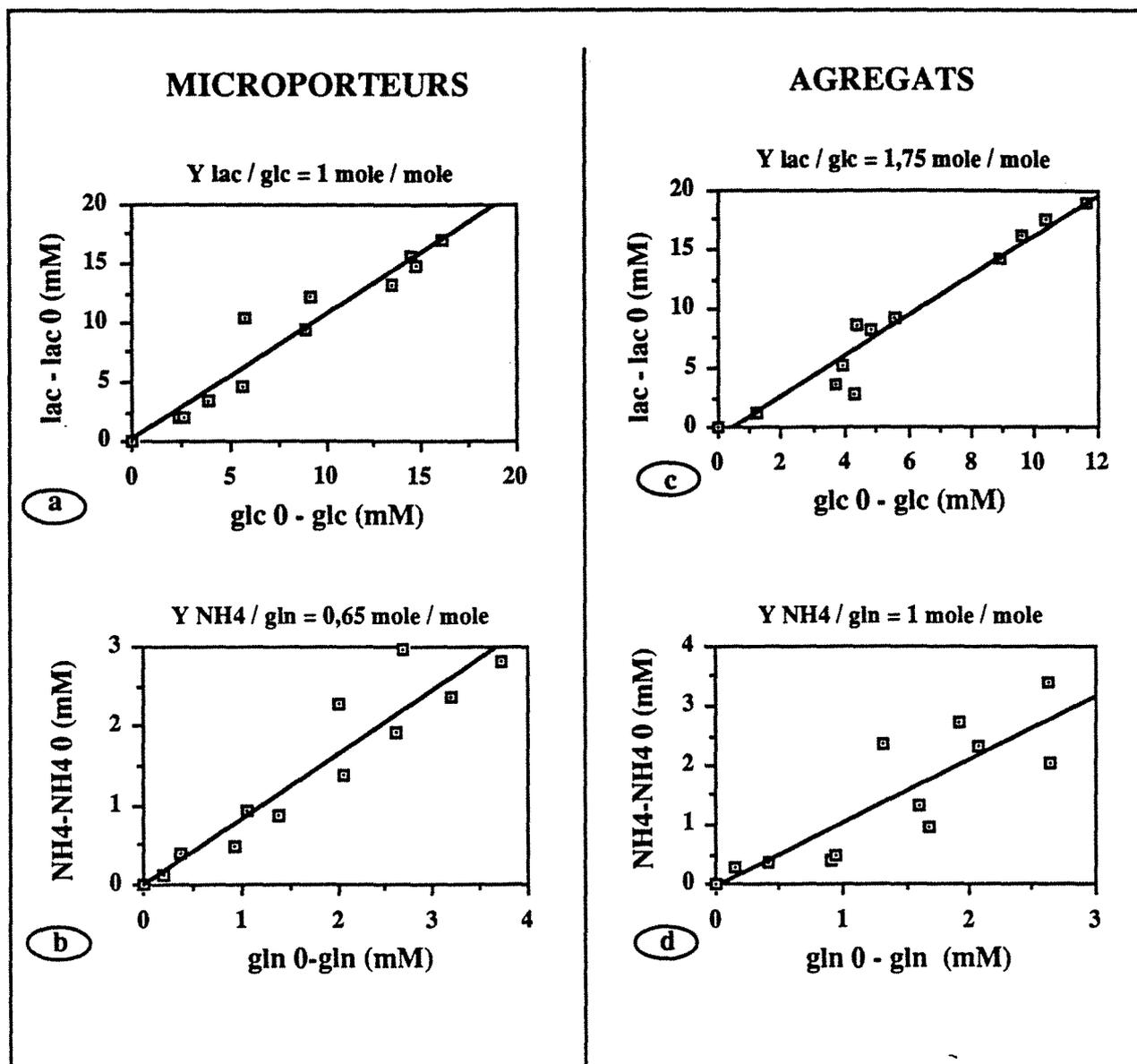


Figure II.6: détermination des rendements de conversion glucose-lactate et glutamine-ions ammonium, respectivement pour les cellules cultivées sur microporteurs (a et b) et pour les cellules cultivées en agrégats (c et d) lors de culture recharge-récolte; les cinétiques de cette expérience sont données sur la figure II.4.

En premier lieu, nous pouvons remarquer une différence du rendement de conversion glucose-lactate dans la culture sur microporteurs en flacon agité, par rapport à la culture en réacteur en mode discontinu du chapitre 1 où ce rendement était de 1,5 mole / mole. Cette différence peut facilement s'expliquer par les différences de mode de culture, d'aération (l'expérience en réacteur discontinu avait été réalisée avec une aération en surface, ne favorisant pas le transfert d'oxygène), d'agitation et l'absence de régulation de pH dans l'expérience en flacons agités. Si nous comparons les rendements obtenus pour la culture en agrégats à ceux sur microporteurs en flacons agités en mode recharge-récolte, il apparaît des différences avec des valeurs supérieures pour la culture en agrégats, indiquant une conversion glycolytique ainsi qu'une conversion de la glutamine en ions ammonium plus importantes. Ces résultats peuvent s'expliquer par des limitations en oxygène dans les agrégats, favorisant la production de lactate à partir du glucose par ces cellules; en effet, nous avons obtenu de très gros agrégats lors de cette expérience. Pour les ions ammonium, nous pouvons noter un changement de métabolisme, mais il est difficile de formuler des hypothèses avec le peu d'éléments dont nous disposons.

Il ressort de ces premières expériences, des différences notoires dans le métabolisme des cellules cultivées en agrégats en comparaison avec ces mêmes cellules cultivées sur microporteurs. La caractéristique la plus marquante est la faible production de GGT par les cellules cultivées en agrégats. Ces cultures ayant été réalisées en flacons agités, sans régulation de l'aération et du pH, avec des conditions de récolte des cellules différentes suivant le système de culture (centrifugation des agrégats mais décantation des microporteurs), il est bien sûr difficile de définir exactement les différences métaboliques et nous ne pouvons noter que des tendances globales sur le comportement des cellules dans ces deux systèmes de culture. C'est pourquoi, ces tendances seront approfondies ultérieurement par des études en réacteur.

### **11.2.3. Adaptation des cellules CHO-GGT à la culture en suspension.**

La culture en agrégats ne permettant pas d'obtenir une bonne productivité en GGT, nous avons décidé d'adapter des cellules CHO-GGT à la culture en suspension en vue de rétablir une production et une croissance des cellules proches de celles obtenues lors de culture sur microporteurs. Des travaux rapportent l'adaptation de cellules CHO à la culture en suspension (MURATA et al, 1988), avec des techniques différentes pour éviter l'agrégation naturelle de certaines lignées CHO soit par agitation (WYATT, communication personnelle) soit en réduisant le taux de calcium dans le milieu de culture (BORASTON et al, 1992).

Cette adaptation consiste à réaliser des passages successifs en flacon de culture dans du milieu DMEM / Ham F12 + 5% SVF sans addition de  $\text{CaCl}_2$  (comme indiqué figure 23 dans le chapitre Matériels et Méthodes). Les cellules sontensemencées à raison de  $2 \cdot 10^5$  cellules / ml dans 250 ml de milieu. A chaque passage, les cellules sont trypsinées pour désagréger les petits paquets de cellules, centrifugées et sont réensemencées de nouveau à  $2 \cdot 10^5$  cellules / ml. Les cellules sont comptées et un dosage de GGT est réalisé: les vitesses spécifiques de croissance et la production de GGT par cellules correspondant ont été tracées sur la figure II.7.

On peut remarquer une augmentation de la vitesse spécifique de croissance et de la production de GGT par cellule pendant les cinq premiers passages. Des petits paquets de cellules de l'ordre de 3 à 10 cellules se forment naturellement à chaque passage de 3 jours; ils sont désagréés par une douce trypsination avant d'être réensemencés sous forme de cellules individualisées; après une dizaine de passages successifs, le nombre de petits agrégats a considérablement diminué mais ces cellules ne perdent cependant pas leur capacité d'adhérence, même après deux mois de culture en suspension. Au delà des cinq premiers passages, la vitesse spécifique de croissance se stabilise vers  $0,02 \text{ h}^{-1}$  (temps de génération d'environ 35 heures) et la production par cellule stagne entre 3 et 4 mU /  $10^5$  cellules (alors qu'elle était de 20 mU /  $10^5$  cellules pour les cellules cultivées sur microporteurs), pendant les quinze passages suivants. Ces premiers résultats montrent la faisabilité de la croissance de cellules CHO-GGT individualisées (avec des petits agrégats de maximum 5 cellules) en suspension, mais avec un temps de génération double de celui de cellules cultivées sur microporteurs. Le temps d'adaptation est peut-être trop court et il est possible que quelques mois supplémentaires d'adaptation auraient permis d'améliorer encore leur capacité de production de GGT.

Les travaux réalisés par MURATA et al (1988) sur l'adaptation de cellules CHO à la culture en suspension, en vue de produire un facteur de différenciation, montrent des résultats similaires quant à la croissance des cellules: ils notent un temps de génération de 87 h après deux passages (passage de 8 jours) qui est réduit à 48 h après 8 passages successifs; ces caractéristiques sont maintenues après 20 passages. Par contre la production du facteur de différenciation ne semble pas affectée par le système de culture alors que la production de GGT est faible comparée à la production de cette même enzyme par des cellules cultivées sur microporteurs. D'autres auteurs (SUGIMOTO et al, 1992) ont comparé la production d'interleukine 2 par des cellules BHK cultivées en suspension ou sur microporteurs et ils ont observé une dégradation de l'interleukine 2 dans le milieu de culture pour les cellules cultivées en suspension; ils en ont conclu que le passage de la culture sur un support, à la culture en suspension, entraînait un changement dans la quantité et / ou la qualité des activités protéolytiques; ce dont il faut tenir compte dans l'évaluation de ce procédé. Ces activités protéolytiques pourraient dans notre cas contribuer à la perte d'activité GGT dans les cultures

de cellules sans support adéquat. D'autres hypothèses sont également plausibles pour expliquer la diminution de l'activité GGT des cellules en suspension, comme une réduction de l'expression de la GGT par les cellules; en effet, la GGT n'est pas une enzyme indispensable à la survie de la cellule et cette dernière favoriserait son métabolisme pour la croissance cellulaire. Une autre hypothèse serait la modification de la conformation de la GGT dans la membrane, entraînant une variation du site catalytique de la GGT, qui se traduirait par une diminution de l'activité mesurée. Cette dernière hypothèse peut être vérifiée par la détermination des constantes catalytiques de la GGT issue de culture dans les différents systèmes de culture.

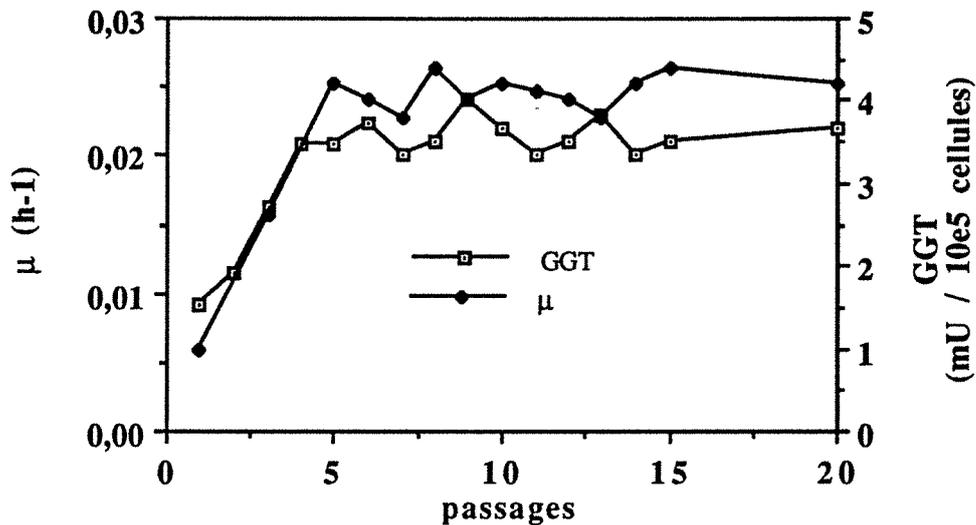


Figure II.7: vitesse spécifique de croissance et contenu en GGT par cellule de GGT de la souche CHO-GGT cultivée en suspension; culture réalisée en flacons agités en mode recharge-récolte

L'ensemble de ces résultats ne montrent pas d'amélioration dans les performances de la souche, notamment dans la production de l'enzyme membranaire recombinante, par rapport à la culture en agrégats. C'est pourquoi nous n'avons pas poursuivi davantage notre étude sur la culture de cellules adaptées à la culture en suspension en cellules individualisées.

#### 11.2.4. Comparaison des trois systèmes de cultures de cellules CHO recombinantes testés.

##### 11.2.4.1. Influence sur la croissance cellulaire et la production de GGT.

Nous avons tenté de cultiver des cellules CHO exprimant la GGT humaine, sans support, soit en agrégats, soit en cellules individualisées, afin de posséder un système de culture simple à mettre en œuvre et simplifiant également la purification ultérieure de la GGT, par rapport à un système de culture avec des cellules adhérant à des microporteurs. Cependant la comparaison de la culture en agrégats avec celle sur microporteurs a montré des différences aussi bien au niveau morphologique que métabolique: la croissance et surtout la production de GGT sont affectées par ce changement de système de culture avec en parallèle des rendements de conversion glutamine-ions ammonium et lactate-glucose (liés à la présence de gros agrégats) modifiés pour la culture en agrégats.

L'adaptation des cellules CHO-GGT à la culture en suspension, en mode recharge-récolte n'améliore pas les performances de la souche, par rapport à la culture en agrégats, même après deux mois d'adaptation. Le tableau II.B résume les résultats obtenus pour la vitesse spécifique de croissance maximale moyenne et pour la quantité de GGT par cellule obtenues dans les trois systèmes de culture testés. Les valeurs retenues pour la culture sur microporteurs et en agrégats sont celles obtenues dans la culture en mode recharge-récolte au maximum de la phase de croissance des cellules avant d'effectuer la première recharge (correspondant à 50 h de culture). Dans le cas des cellules adaptées à la suspension, le mode recharge-récolte peut être considéré comme une succession de culture en mode discontinu, et les valeurs retenues sont celles correspondant au 12<sup>ème</sup> passage.

Système de culture	Vitesse spécifique de croissance $\mu$ max (h-1)	Quantité de GGT / cellule (mU / 10 <sup>5</sup> cellules)
Culture sur microporteurs (cytodex 1)	0,04	20
Culture en agrégats	0,025	3,5
Adaptation à la culture en suspension	0,02	3,5

Tableau II.B.: comparaison des vitesses spécifiques de croissance maximales et contenu en GGT des cellules cultivées sous divers états.

L'aspect attractif de la suppression de microporteurs pour la culture de cellules support-dépendantes, est ici partiellement occulté par les faibles performances de production de la protéine membranaire d'intérêt par ces cellules cultivées en agrégats ou adaptées à la culture en suspension. Ces deux systèmes de culture sont cependant réalisables et nous obtenons des temps de génération de l'ordre de 30 heures pour la culture en agrégats et de 35 heures pour la culture des cellules individualisées; ces temps de génération sont très légèrement supérieurs à ceux de la plupart des cellules animales qui ont des temps de génération voisins de 24 heures. En accord avec les résultats que nous avons obtenus, des auteurs (TOLBERT et al, 1980) rapportent des temps de générations compris entre 26 et 48 heures pour six lignées cellulaires différentes, support-dépendantes, cultivées en agrégats.

#### 11.2.4.2. Influence sur les propriétés catalytiques de l'enzyme.

Nous avons vu précédemment que la culture en absence de support adéquat provoquait des bouleversements aussi bien au niveau de la croissance, que de la morphologie et du métabolisme de cellules support-dépendantes. L'adhérence des cellules sur un support met en jeu des liaisons entre des récepteurs membranaires et des molécules spécifiques d'adhérence qui recouvrent le support. Il est difficile de définir l'ensemble des modifications engendrées par l'absence d'adhérence, mais il serait plausible que l'ancrage de l'enzyme GGT dans la membrane varie, entraînant une conformation différente de la protéine ainsi qu'un accès différent du substrat au site catalytique: ce qui pourrait expliquer cette diminution de l'activité GGT mesurée, pour la culture en agrégats ou adaptées à la culture en suspension. D'autres facteurs peuvent également intervenir dans la conformation et dans le transport d'une protéine: ce sont les modifications post-traductionnelles, et en particulier la glycosylation. De nombreux travaux ont montré l'influence du mode de culture et de l'environnement des cellules sur la glycosylation des protéines (GOOCHEE et MONICA, 1990; HAYTER et al, 1991, 1992; CURLING et al, 1990) et rien n'empêche d'envisager une modification de la glycosylation de la GGT exprimée par des cellules en agrégats ou en cellules individualisées, entraînant des modifications de la conformation de la protéine et de l'accessibilité du substrat au site catalytique. Cette hypothèse de modification du site catalytique peut être vérifiée par la détermination des constantes catalytiques de la GGT dans les différents systèmes de culture étudiés. Des études plus précises sur la glycosylation devront être envisagées pour vérifier si le système de culture peut modifier les chaînes glycosidiques de la protéine recombinante.

Le tableau II.C regroupe l'ensemble des constantes catalytiques pour le substrat donneur (GluCNA) et pour le substrat accepteur (Glygly) suivant les différents systèmes de culture. Pour cela, des cellules CHO-GGT cultivées en boîtes de culture ont été grattées, en phase exponentielle de croissance et serviront de témoins. Trois cultures parallèles en flacons agités

ont été réalisées avec des cellules, soit sur microporteurs, soit en agrégats, soit en cellules individualisées. Le milieu de culture est identique pour les trois systèmes de culture: DMEM / Ham F12 + 5% SVF + 4mM glutamine. Des microporteurs sont ajoutés à raison de 5 g / l pour la culture sur microporteurs et 7 mM /de CaCl<sub>2</sub> sont additionnés dans le milieu de culture pour la culture de cellules agrégées. Les cellules sontensemencées à raison de 2,5.10<sup>5</sup> cellules / ml avec des cellules individualisées pour la culture sur microporteurs et avec des petits paquets de cellules pour favoriser la culture des cellules en agrégats. Les cellules adaptées à la culture en suspension du quinzième passage de l'expérience décrite précédemment servent à ensemen- cer un flacon agité, dans les mêmes conditions expérimentales que pour les deux autres cultures. Les milieux de culture sont renouvelés tous les trois jours et après 10 jours de culture, les cellules sont récupérées après centrifugation, soit sur microporteurs, soit sans microporteurs et sont congelées. Ces culots cellulaires serviront à la détermination des constantes catalytiques. Les conditions expérimentales sont celles décrites dans le chapitre Matériels et Méthodes; les concentrations finales des substrats donneur et accepteur varient respectivement de 0 à 8,3 mM et de 0 à 150 mM en présence de 0,1 M de Tris-HCl; la température du dosage est de 30°C. Les mesures d'activité GGT ont été effectuées par la méthode automatique.

Systèmes de culture	Km <sup>D</sup>	Km <sup>A</sup>
cellules CHO-GGT cultivées en boîtes	0,71 ± 0,15	6,5 ± 1,0
cellules CHO-GGT cultivées sur microporteurs	0,73 ± 0,11	6,6 ± 1,2
cellules CHO-GGT cultivées en agrégats	0,71 ± 0,10	6,6 ± 1,0
cellules CHO-GGT adaptées à la culture en suspension	0,73 ± 0,13	6,5 ± 1,1

Tableau II.C: comparaison des constantes catalytiques de la GGT en fonction du système de culture employé

Km<sup>D</sup>: substrat donneur: GluCNA

Km<sup>A</sup>: substrat accepteur: glygly

Nous pouvons remarquer que quel que soit le système de culture utilisé, les valeurs des constantes catalytiques sont d'un ordre de grandeur comparable pour le substrat accepteur et pour le substrat donneur. Les hypothèses d'une modification de l'accessibilité du substrat au site catalytique, entraînant une diminution de l'activité enzymatique, ne sont donc pas vérifiées. Nous pouvons donc penser que la perte de l'activité GGT mesurée pour les cellules en absence de support est d'avantage liée à la diminution de l'expression de cette enzyme par les cellules

suite à des modifications de métabolisme intracellulaire. D'autres auteurs relatent également des difficultés à maintenir l'expression de protéines recombinantes lors de l'adaptation de cellules à la culture en suspension (TOLBERT et al, 1980).

La conservation de l'intégrité du site catalytique confirme la faisabilité de la mise en œuvre de culture en masse de cellules CHO pour la production de GGT dans les trois systèmes de culture testés. Cependant, comme nous l'avons montré, le contenu en GGT des cellules est au moins cinq fois inférieur lorsque les cellules sont cultivées en absence de support adéquat. Les expériences réalisées jusqu'ici dans ce chapitre ont été effectuées dans des flacons agités non régulés; il serait intéressant de vérifier si dans des conditions de pH, d'agitation, de température et d'oxygénation contrôlées, les performances de la souche seraient améliorées. C'est pourquoi nous avons décidé d'évaluer les potentialités de la culture en bioréacteur de cellules agrégées comparées à des cellules cultivées sur microporteurs. Le système en agrégats a été privilégié par rapport à la culture de cellules individualisées car il est potentiellement plus adapté à des cultures perfusées dans le but éventuel de produire à grande échelle cette protéine membranaire.

### **11.3. CINÉTIQUES DE CULTURES DE CELLULES CHO-GGT EN REACTEURS DISCONTINU ET SEMI-CONTINU.**

#### **11.3.1. Cinétiques comparées en réacteur discontinu de cellules CHO-GGT sur microporteurs ou en agrégats.**

L'objectif de cette expérience est d'étudier le comportement cinétique de croissance, de production de GGT, de consommation des substrats et de production de différents métabolites des cellules CHO-GGT cultivées en réacteur, soit sur microporteurs, soit en agrégats. Les expériences précédentes avaient montré que l'obtention et la culture de cellules agrégées étaient réalisables, mais que ses performances de croissance et de production semblaient modifiées par rapport à la croissance sur microporteurs. Cette expérience permettra de comparer les deux systèmes de culture dans des conditions expérimentales similaires et régulées:

- \* DMEM / Ham F12 + 5% SVF
- \* pH régulé à 7,4
- \* pO<sub>2</sub> régulé à 50% de la saturation en air
- \* Vitesse d'agitation maintenue à 40 rpm
- \* ensemencement à 2.10<sup>5</sup> cellules / ml.

Deux différences subsistent cependant entre les deux types de culture: d'une part l'addition de 7 mM de  $\text{CaCl}_2$  (8 mM final dans le milieu), pour favoriser l'agrégation et d'autre part une concentration de glutamine de 6 mM pour la culture sur microporteurs et de 3,5 mM pour la culture en agrégats. Ce choix a été fait à la suite des résultats obtenus lors de l'expérience précédente; en effet le rendement de conversion glutamine en ions ammonium était plus important pour la culture en agrégat: afin de limiter la production d'ions ammonium, nous avons choisi une concentration de glutamine inférieure pour la culture en agrégats.

La figure II.8 regroupe l'ensemble des résultats comparés de la densité cellulaire, de la consommation de glucose et de glutamine et la production de lactate, d'ions ammonium et de GGT pour la culture en réacteur soit de cellules agrégées soit de cellules sur microporteurs. Les figures II.8(a) et II.8(b) montrent l'évolution de la densité cellulaire (viable ou totale) et de la production de GGT au cours de ces deux cultures. Il apparaît comme dans l'expérience précédente, en mode recharge-récolte, une meilleure croissance et surtout une meilleure production de GGT pour la culture sur microporteurs. La densité cellulaire maximale obtenue pour les cellules agrégées est de  $9 \cdot 10^5$  cellules / ml alors qu'elle avoisine  $1,3 \cdot 10^6$  cellule / ml pour les cellules sur microporteurs; la production de GGT est également plus importante avec environ 300 mU / ml de milieu pour les cellules sur microporteurs en 50 h alors que dans les mêmes temps, la production de GGT des cellules agrégées reste inférieure à 30 mU / ml soit un facteur 10 entre les productions de GGT par les deux systèmes de culture.

Il faut noter que les agrégats sont restés de petites tailles de l'ordre d'une vingtaine de cellules au maximum pendant la durée de l'expérience; la taille des amas après 50 heures de culture est la même que celle obtenue au même temps lors de la culture en flacons agités en mode recharge-récolte; par contre le renouvellement du milieu dans la culture en mode recharge récolte permet l'obtention de gros agrégats de plusieurs centaines de cellules. Le problème de limitations diffusionnelles de substrats ou d'oxygène devrait donc être beaucoup plus faible dans cette expérience en mode discontinu contrairement à l'expérience précédente, en étuve régulée.

Le glucose est totalement consommé en 75 h pour la culture sur microporteurs alors qu'en fin de culture il reste encore plus de 5 mM de glucose pour la culture des cellules agrégées (figure II.8(c) et 8(d)). Les rendements de conversion glycolytique correspondants (tableau II.D) sont proches, contrairement à l'expérience précédente où  $Y_{\text{lac}/\text{glc}}$  était bien supérieur pour la culture en agrégats; cette différence confirme que les limitations en oxygène dans les agrégats sont probablement plus limitées ici. Dans le cas des cellules sur microporteurs, l'arrêt de la croissance cellulaire coïncide avec la déplétion totale de glucose dans le milieu; la glutamine étant inférieure à 1 mM sera considérée comme limitante également. L'arrêt de la croissance

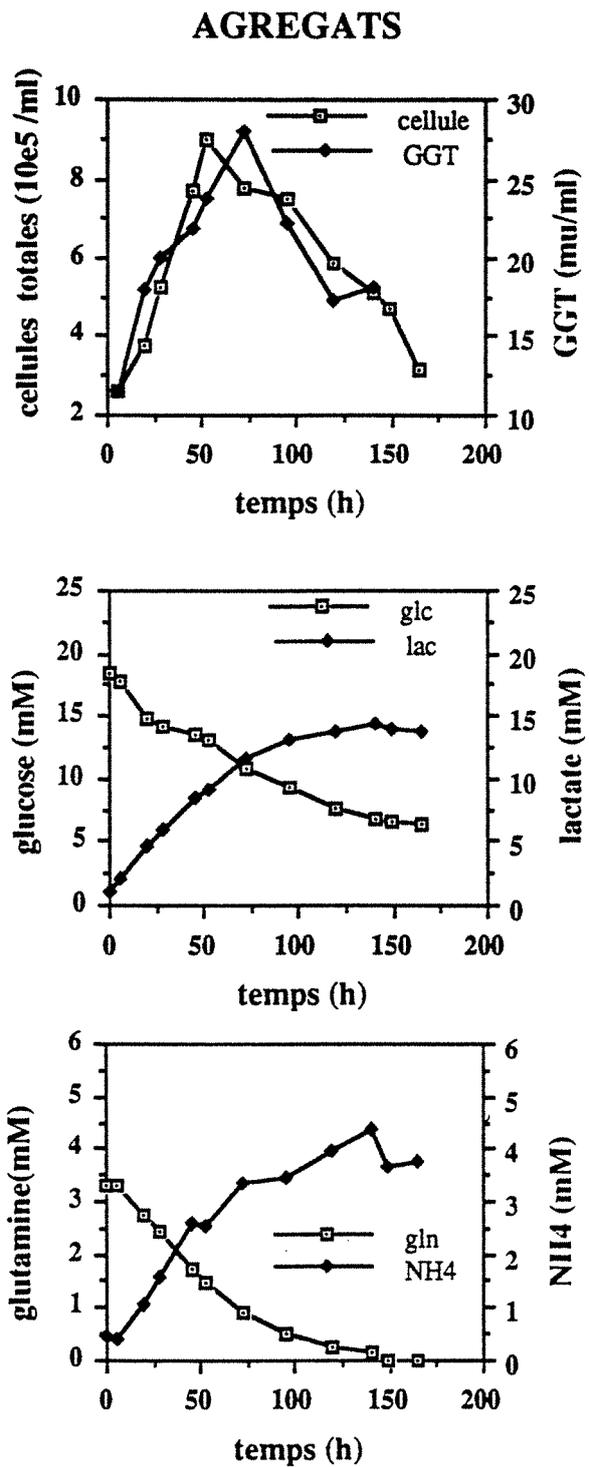
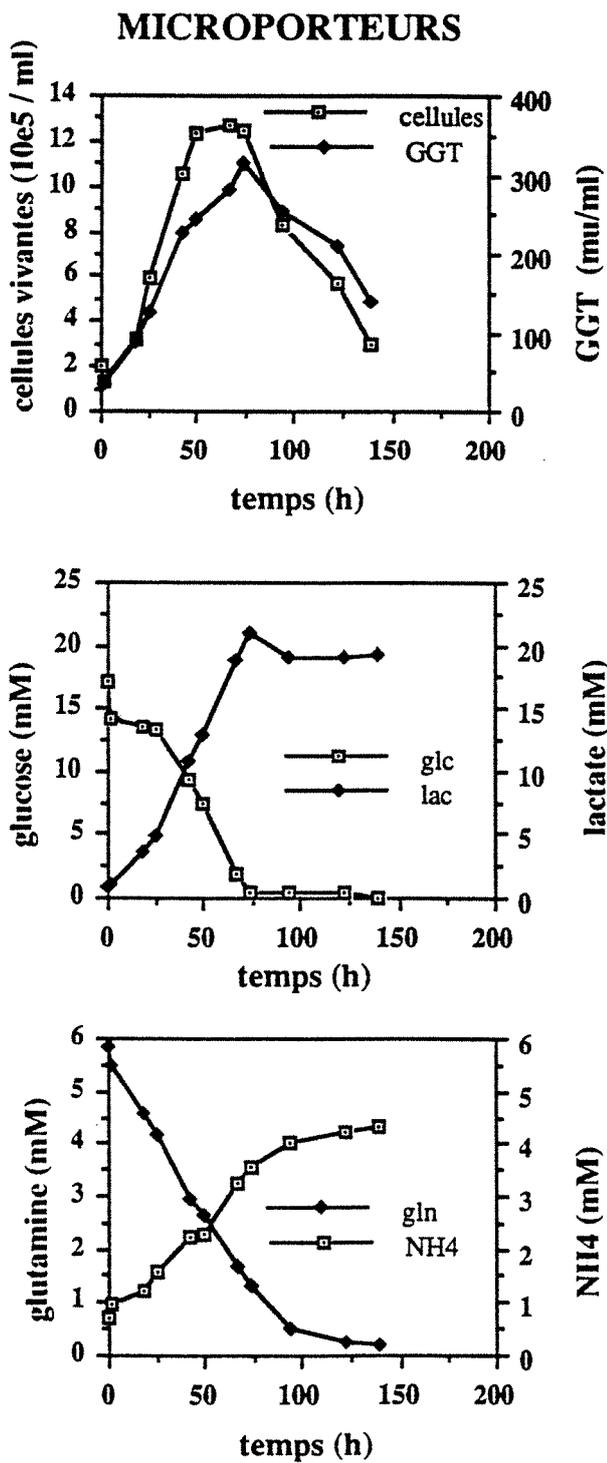


Figure II.8: évolution des cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de glutamine et de production de lactate, d'ions ammonium et de GGT, comparée pour des cellules CHO-GGT cultivées sur microporteurs ou en agrégats

après 75 heures de culture pour les cellules en agrégats ne correspond pas à une limitation en glucose qui reste supérieur à 5 mM mais pourrait être lié à une limitation en glutamine, la concentration de celle-ci étant inférieure à 1mM. L'accumulation de toxiques auxquels les cellules en agrégats seraient plus sensibles que les cellules sur microporteurs peut être aussi envisageable. De plus, l'adhérence des cellules sur un support approprié engendre des mécanismes intracellulaires liés à la division cellulaire; l'absence de support adéquat couplée à une limitation en glutamine et à l'accumulation de toxiques pourraient expliquer la mort cellulaire observée .

La glutamine est totalement consommée en fin de culture, quel que soit le système de culture, alors que la concentration initiale était deux fois plus importante dans la culture sur microporteurs. La concentration d'ions ammonium dans le milieu est identique dans les deux systèmes de culture (figure II.8(e) et 8(f)), indiquant un rendement de conversion  $Y_{NH4} / Gln$  pour les cellules agrégées supérieur à celui des cellules sur microporteurs (tableau II.D), comme dans l'expérience précédente.

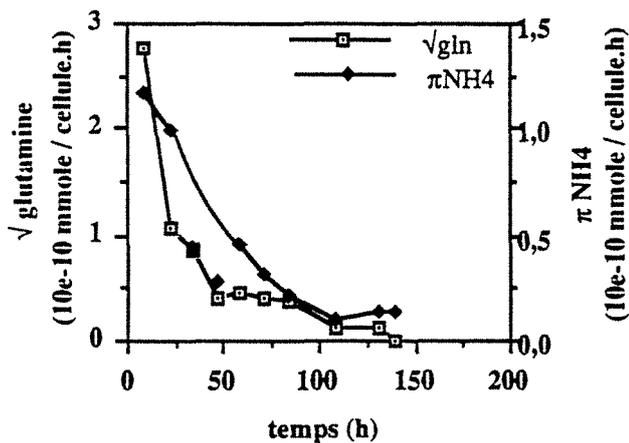
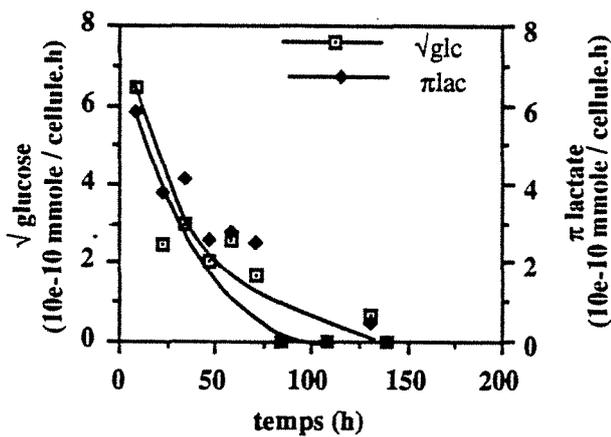
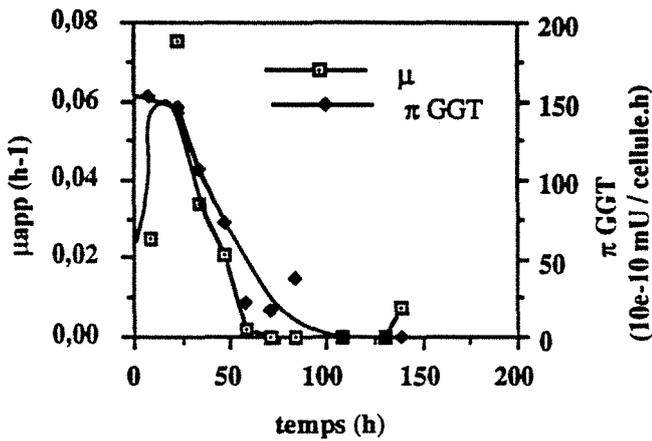
	$Y_{NH4} / Gln$	$Y_{Lac} / Glc$
cellules sur microporteurs	0,6 mole / mole	1,2 mole / mole
cellules agrégées	1 mole / mole	1,2 mole / mole

Tableau II.D: rendements métaboliques des cellules CHO-GGT suivant le système de culture utilisé lors de la culture en réacteur en mode semi-continu; la méthode de calcul sera retrouvée dans le chapitre Matériels et Méthode

Ces résultats confirment l'existence de différences métaboliques entre les cellules CHO-GGT cultivées sur microporteurs ou en agrégats, notamment dans la conversion de la glutamine en ions ammonium.

Les vitesses spécifiques de croissance, de consommation de glucose et de glutamine, de production de lactate, d'ions ammonium et de GGT pour les cellules cultivées dans les deux systèmes de culture sont comparées sur la figure II.9; il est bien sûr difficile de faire des comparaisons précises entre ces courbes car le mode de calcul utilisé est différent; en effet, toutes ces vitesses sont rapportées à la concentration de cellules vivantes dans le cas des cellules sur microporteurs alors qu'elles le sont par rapport aux cellules totales (vivantes + mortes) dans le cas des cellules agrégées. Cependant, si les valeurs des vitesses spécifiques de consommation de glucose et de glutamine et de production de lactate et d'ions ammonium évoluent au cours du temps de façon similaire, quel que soit le système de culture, les valeurs des vitesses spécifiques instantanées de croissance et de production de GGT sont notablement

## MICROPORTEURS



## AGREGATS

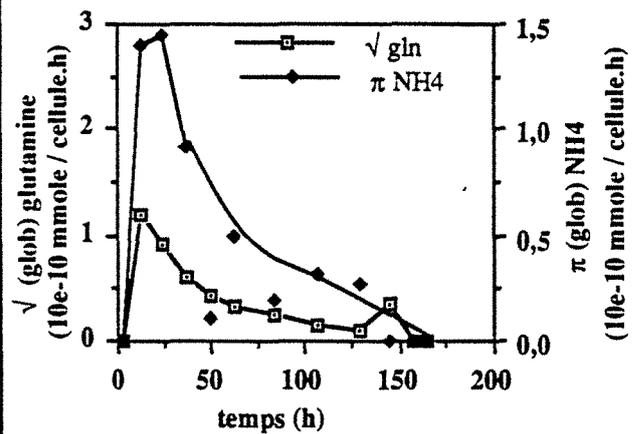
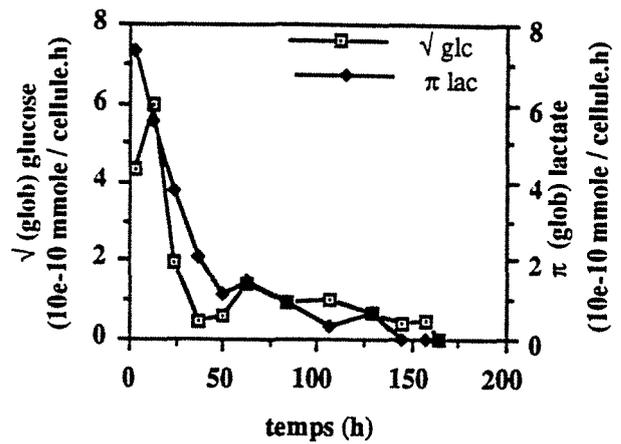
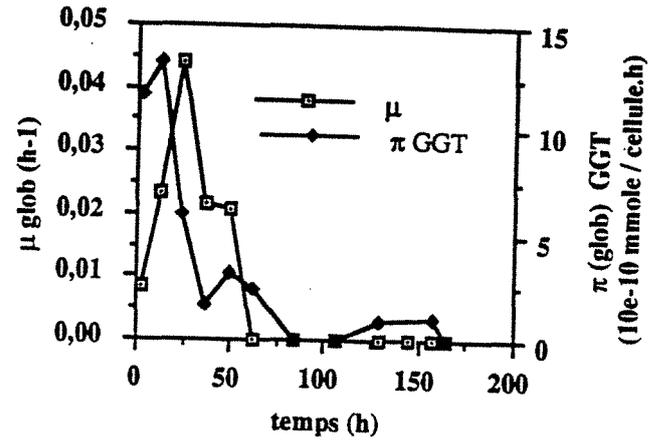


Figure II.9: évolution des vitesses spécifiques de croissance ( $\mu_{app}$ ) et de consommation de glucose ( $\sqrt{glc}$ ), de glutamine ( $\sqrt{gln}$ ) et de production de lactate ( $\pi lac$ ), d'ions ammonium ( $\pi NH_4$ ) et de GGT ( $\pi GGT$ ) suivant le système de culture utilisé (microporteurs ou agrégats). Les cinétiques de culture de cette expérience sont présentées sur la figure II.8.

inférieures pour la culture de cellules agrégées. Les vitesses spécifiques maximales moyennes calculées sur les 50 premières heures de culture sont tracées sur la figure II.10 et montrent un  $\mu_{\max}$  apparent de  $0,038 \text{ h}^{-1}$  pour la culture sur microporteurs et un  $\mu_{\max}$  global de  $0,025 \text{ h}^{-1}$  pour la culture de cellules agrégées. Ces vitesses ne sont bien sûr comparables que si le décès cellulaire est négligeable pendant les 50 premières heures de culture.

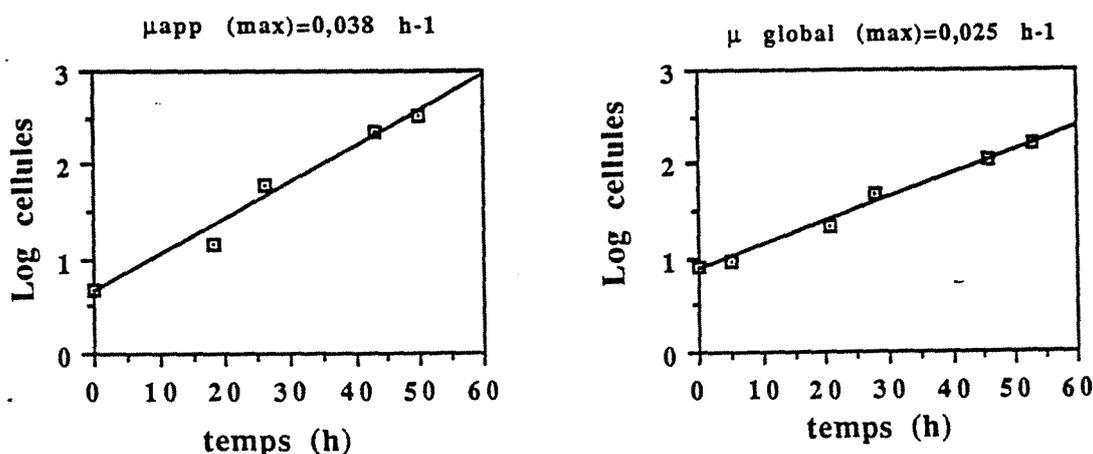


Figure II.10: détermination des vitesses spécifiques de croissance maximales pour des cellules CHO-GGT sur microporteurs ( $\mu_{\text{app}}$ ) ou en agrégats ( $\mu_{\text{glob}}$ )

Ainsi, cette expérience a permis de confirmer des différences métaboliques entre des cellules support-dépendantes cultivées sur un support ou en agrégats, engendrant notamment une diminution de la vitesse spécifique de croissance, une modification de la morphologie et une perte de la production de l'enzyme recombinante d'un facteur 10 pour les cellules agrégées (300 U / l de GGT pour la culture sur microporteurs pour environ 30 U / l pour la culture des cellules agrégées). Une modification dans le rendement  $Y_{\text{NH}_4 / \text{gln}}$  a également pu être observée.

De plus, le mode discontinu n'est certainement pas le mode de culture approprié pour l'obtention d'agrégats. Afin de prolonger cette agrégation, de maintenir plus longtemps la croissance cellulaire et d'éviter une limitation nutritionnelle trop précoce, il serait intéressant de tester les performances de cette souche en mode semi-continu ("Fed-batch"). Ce mode de culture présente un certain nombre d'avantages par rapport à la culture en mode discontinu ou en continu; d'une part la mise en œuvre est plus simple que la culture en continu avec des

temps de culture proches du mode discontinu et donc plus facile à reproduire et à valider; d'autre part, il permet de maintenir plus longtemps la croissance cellulaire tout en pilotant mieux le système grâce à l'alimentation, permettant par exemple l'ajout de substances activatrices de la synthèse de la protéine d'intérêt à un moment déterminé de la culture. Ce mode de culture a bien évidemment ses inconvénients: en particulier celui du choix délicat du profil d'alimentation en substrats et celui de la non évacuation de produits toxiques qui vont s'accumuler dans le milieu de culture, contrairement à la culture en mode continu. Cette approche sera développée dans la suite de ce chapitre.

### **11.3.2. Influence du système de culture sur le décès et la lyse cellulaire.**

Le problème majeur rencontré avec la culture en agrégats est l'impossibilité de compter le nombre de cellules mortes. La mort cellulaire peut être appréhendée indirectement par la mesure de l'activité lactate deshydrogénase (LDH) dans le surnageant de culture. La LDH est une enzyme glycolytique responsable de la réduction du pyruvate en lactate. Cette enzyme est localisée dans le cytoplasme et est libérée dans le milieu de culture lorsque la membrane cellulaire est endommagée. Un nombre important de travaux ont été réalisés ces dernières années sur le relargage de la LDH pour évaluer la quantité de cellules mortes dans différents types de réacteurs avec des cellules en suspension, immobilisées ou sur microporteurs et des corrélations ont pu être établies (GEAUGEY et al, 1990); WAGNER et al, 1992; BOUR et al, 1988; GERVAISE, 1989; MERTEN et al, 1992; RACHER et al, 1990). D'autres enzymes telles que la phosphatase alcaline et l'adénylate kinase ont également été étudiées pour l'évaluation de la mortalité cellulaire (MERTEN et al, 1992; BOUR et al, 1988). Des études ont montré la stabilité de l'activité LDH à 37°C lors de culture et à 4°C pour sa conservation (WAGNER et al, 1992). Dans notre cas l'objectif de ce dosage va être l'estimation du nombre de cellules mortes non lysées, mais susceptibles d'intégrer le bleu trypan dans les agrégats afin de vérifier si la perte de production serait liée à une faible viabilité des agrégats.

En premier lieu, nous nous intéresserons à la caractérisation des cellules en croissance sur microporteurs afin d'évaluer les différentes populations: cellules vivantes, cellules mortes en suspension et cellules lysées. Le processus de lyse et de détachement cellulaire n'est pas connu mais les différents états sont schématisés sur la figure II.11.

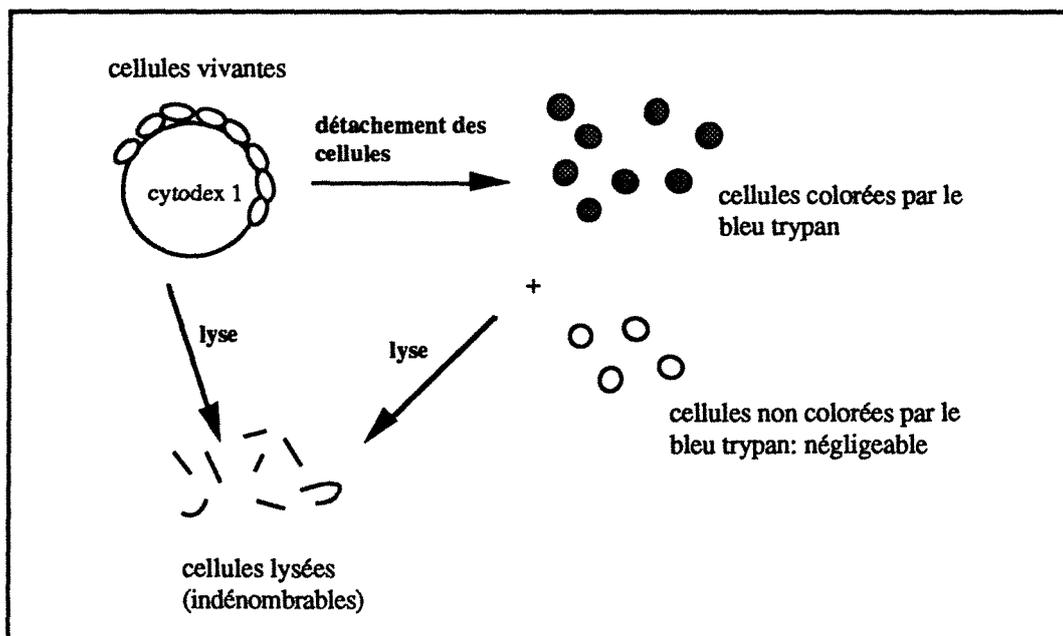


Figure II.11: Les différentes populations cellulaires lors de la culture sur microporteurs.

Le dénombrement par comptage cellulaire ne permet d'appréhender que les évolutions des cellules vivantes attachées aux microporteurs et celles des cellules en suspension colorées au bleu trypan. Le suivi de la LDH dans le milieu de culture, après détermination du rendement cellulaire en LDH, devrait permettre l'estimation de la quantité de cellules lysées.

Dans le cas de la culture en agrégats, les différentes populations cellulaires sont schématisées sur la figure II.12.

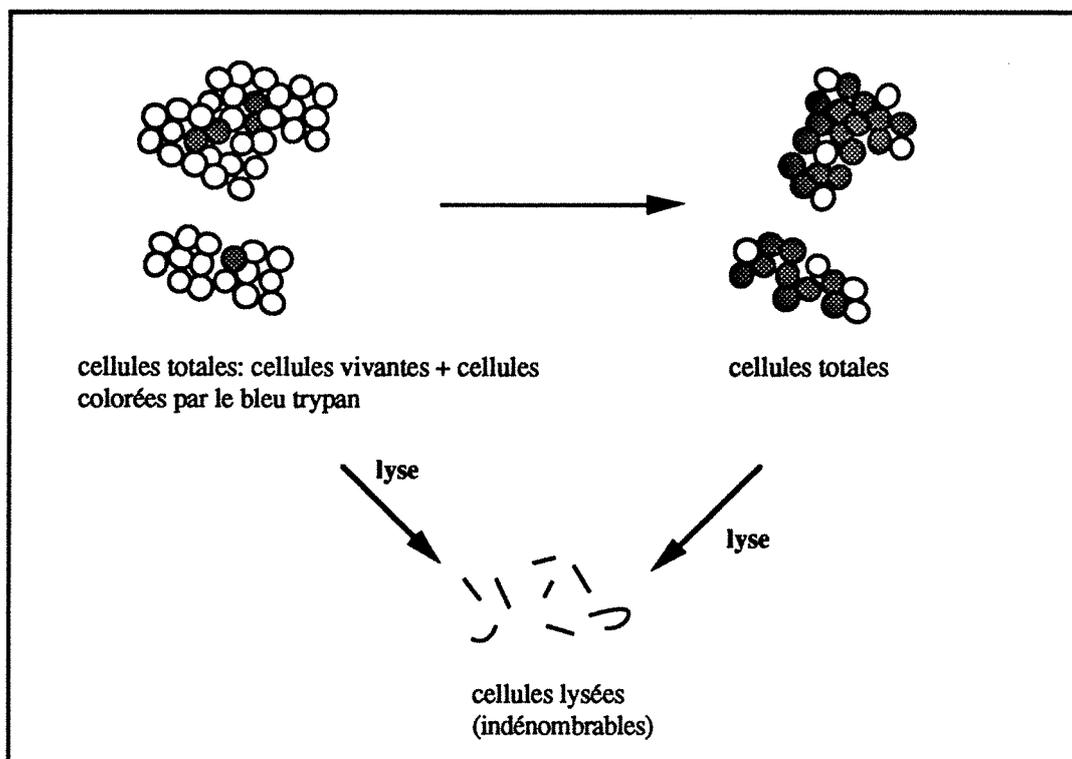


Figure II.12: les différentes populations cellulaires lors de la culture en agrégats.

Le nombre de cellules qui seraient colorées par le bleu trypan dans les agrégats n'est pas accessible par comptage direct comme expliqué précédemment. Le dosage extracellulaire de LDH devrait permettre l'estimation de la population de cellules mortes totales, lysées ou susceptibles d'intégrer le bleu trypan.

#### 11.3.2.1. Détermination du rendement cellulaire en LDH.

Cette détermination est basée sur la mesure du contenu intracellulaire en LDH des cellules vivantes. Au cours de cultures en flacons agités en mode discontinu, des échantillons de cellules sur microporteurs sont prélevés. Après comptage des cellules vivantes, les cellules sont resuspendues dans une solution de lyse (PBS, tween 20 à 2 pour 1000). L'activité LDH mesurée est représentée en fonction de la concentration de cellules vivantes lysées. La courbe obtenue est tracée sur la figure II.13.

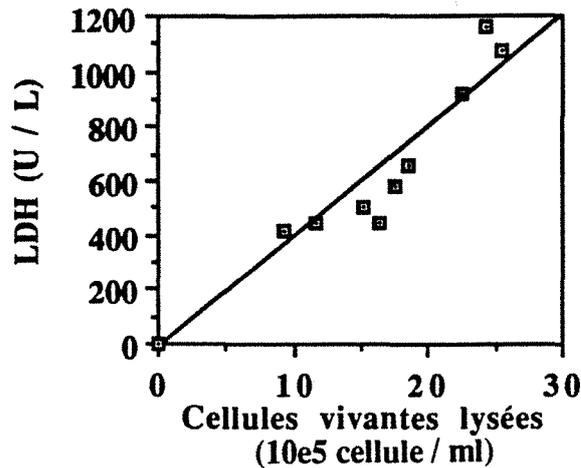


Figure II.13: contenu intracellulaire en LDH des cellules vivantes

Le rendement  $Y_{LDH}$  / cellule peut être déterminé par la pente de cette droite et est égal à 4000 UI / 10<sup>10</sup> cellules vivantes lysées.

#### 11.3.2.2. LDH extracellulaire et concentration en cellules mortes.

En émettant l'hypothèse que 100% de la LDH est relarguée lors du décès cellulaire (AVGERINOS et al, 1990; KIM et al, 1989), une corrélation directe devrait apparaître entre l'activité LDH et la concentration de cellules mortes colorées par le bleu trypan. La figure II.14 représente l'accumulation des cellules mortes colorées par le bleu trypan en suspension dans le milieu de culture et de la LDH dans le réacteur en mode discontinu avec cellules sur microporteurs décrit au paragraphe II.3.1

La population de cellules mortes colorées par le bleu trypan reste faible pendant la phase de croissance jusqu'à 75 heures de culture environ. Au delà, le nombre de cellules mortes ainsi que l'activité LDH extracellulaire augmentent brutalement jusqu'à des valeurs respectives de 6.10<sup>5</sup> cellules / ml et 450 U / l.

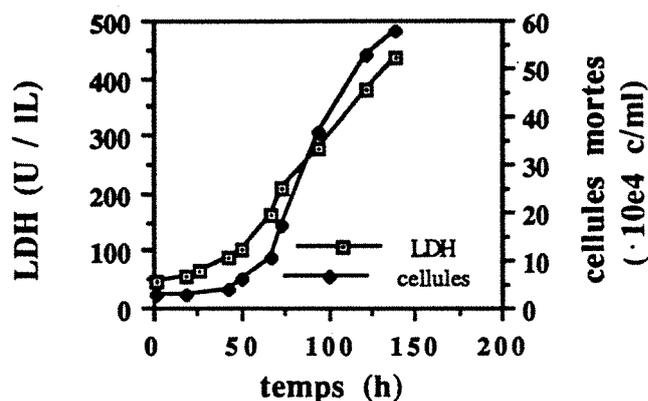


Figure II.14: Evolution des concentrations de cellules colorées par le bleu trypan et de LDH dans le milieu de culture; les cinétiques complètes de culture seront retrouvées au paragraphe II.3.1.

La pente de la droite correspondant à la quantité de LDH extracellulaire en fonction de la quantité de cellules colorées au bleu trypan permet de vérifier le contenu cellulaire (figure II.15). La pente de cette droite donne une valeur de 6300 UI / 10e10 cellules. La différence obtenue entre cette pente et celle correspondant au contenu intracellulaire de cellules vivantes obtenue précédemment peut s'expliquer par une lyse non négligeable des cellules mortes ou vivantes provoquant un relargage de la LDH; les cellules lysées ne sont bien sûr pas dénombrables par comptage direct. Une autre hypothèse peut être également formulée et qui serait l'activation de l'enzyme lors de sa libération. Les différentes observations microscopiques des cellules privilégient la première hypothèse avec une lyse conséquente des cellules que nous allons essayer d'évaluer par le calcul.

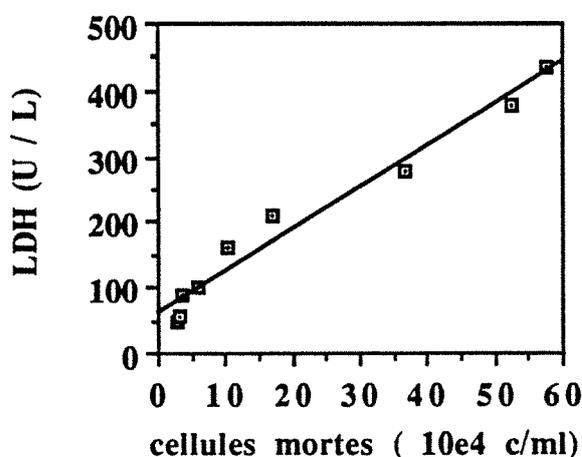


Figure II.15: Concentration en LDH cumulée en fonction du nombre de cellules colorées par le bleu trypan; réacteur en discontinu sur microporteurs présenté au paragraphe II.3.1.

### 11.3.2.3. Evaluation de la lyse cellulaire à partir du dosage LDH

Le calcul sera basé sur les équations suivantes, établies pour un réacteur discontinu:

$$[X_{tot}] = [X_v] + [X_b] + [X_{lys}]. \quad \text{équation 1}$$

avec  $[X_{tot}]$ : concentration des cellules totales dans le réacteur;  $[X_v]$ : la concentration de cellules vivantes attachées aux microporteurs;  $[X_b]$ : concentration de cellules en suspension colorées par le bleu trypan;  $[X_{lys}]$ : concentration de cellules lysées.

$$Y_{LDH} / \text{cellule} \cdot ([X_{lys}] + [X_b]) = ([LDH] - [LDH]_0) \quad \text{équation 2}$$

$Y_{LDH} / \text{cellule}$  correspond au contenu intracellulaire en LDH obtenu après lyse de cellules vivantes;  $[LDH]$ : activité LDH du milieu extracellulaire à un temps  $t$ ;  $[LDH]_0$ : activité LDH du milieu initial de culture = 40 U / l environ

### 11.3.2.4. Application à la culture sur microporteurs.

A l'aide des équations définies précédemment, la concentration de cellules lysées a été estimée pour la culture en mode discontinu décrite au paragraphe II.3: l'évolution des concentrations de cellules colorées par le bleu trypan et la LDH ont été tracées figure II.14. L'ensemble de ces données permet de présenter les différentes concentrations cellulaires, vivantes, bleues et lysées au cours de la culture (figure II.16).

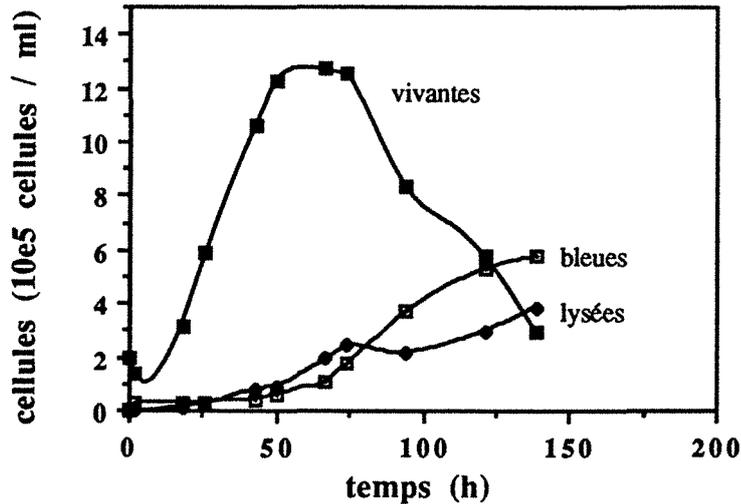


Figure II.16: Evolution des différentes populations de cellules dans une culture sur microporteurs en réacteur en mode discontinu: les cellules vivantes et les cellules en suspension colorées par le bleu trypan sont obtenues par comptage ; les cellules lysées sont estimées par l'équation 2.

Jusqu'à 50 heures de culture, les cellules croissent rapidement jusqu'à environ  $1,3 \cdot 10^6$  cellules / ml. Pendant ce temps, les cellules en suspension colorées par le bleu trypan et les cellules lysées sont peu nombreuses. Entre 50 h et 75 h de culture, le nombre de cellules vivantes reste approximativement constant tandis que le nombre de cellules bleues et de cellules lysées commence à augmenter (environ  $2 \cdot 10^5$  cellules / ml). Au delà de 75 h, on peut observer un fort déclin des cellules vivantes accompagné d'un accroissement des cellules bleues (jusqu'à  $6 \cdot 10^5$  cellules / ml) et des cellules lysées (jusqu'à  $4 \cdot 10^5$  cellules / ml)

Lors de culture en mode discontinu, le système étant fermé, il est relativement aisé de vérifier si l'estimation effectuée sur les différentes populations (cellules vivantes, cellules bleues et cellules lysées) est juste; en effet, la somme des trois populations doit rester constante lors du décès cellulaire. La figure II.17 compare les évolutions respectives des cellules vivantes, des cellules bleues + lysées et des cellules totales (vivantes + bleues + lysées) en fonction du temps

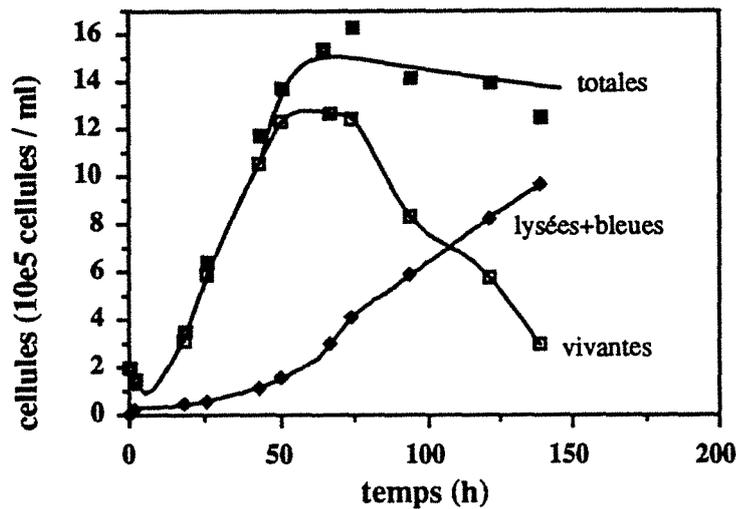


Figure II.17: evolution de la concentration des cellules vivantes, des cellules mortes (lysées + suspension) et des cellules totales (vivantes + lysées + suspension)

On vérifie bien que au delà de 50 h de culture, la valeur de la densité des cellules totale reste globalement constante; ainsi, l'estimation du décès cellulaire et des différentes populations de cellules lysées et bleues est correcte.

#### 11.3.2.5 Application à la culture en agrégats

Dans le cas des cellules agrégées, le comptage cellulaire direct par coloration au cristal violet permet d'évaluer le nombre de cellules vivantes + bleues. D'après l'équation 2 définie au paragraphe II.3.2.3, le dosage en LDH du milieu extracellulaire permet d'estimer la concentration des cellules bleues + lysées. Nous poserons pour cela l'hypothèse que le contenu intracellulaire en LDH est identique quel que soit le système de culture, en agrégats ou sur microporteurs. Pour déterminer le nombre de cellules bleues dans les agrégats, il est donc nécessaire de faire une estimation des cellules lysées. Pour cela, nous considérerons que la décroissance de la densité cellulaire (vivantes + bleues) correspond à une lyse des cellules bleues ou vivantes. Ceci implique de faire l'hypothèse que la lyse cellulaire est négligeable lors de la phase exponentielle de croissance. L'estimation des différentes populations cellulaires (vivantes + bleues, lysées, lysées + bleues) est schématisée sur la figure II.18.

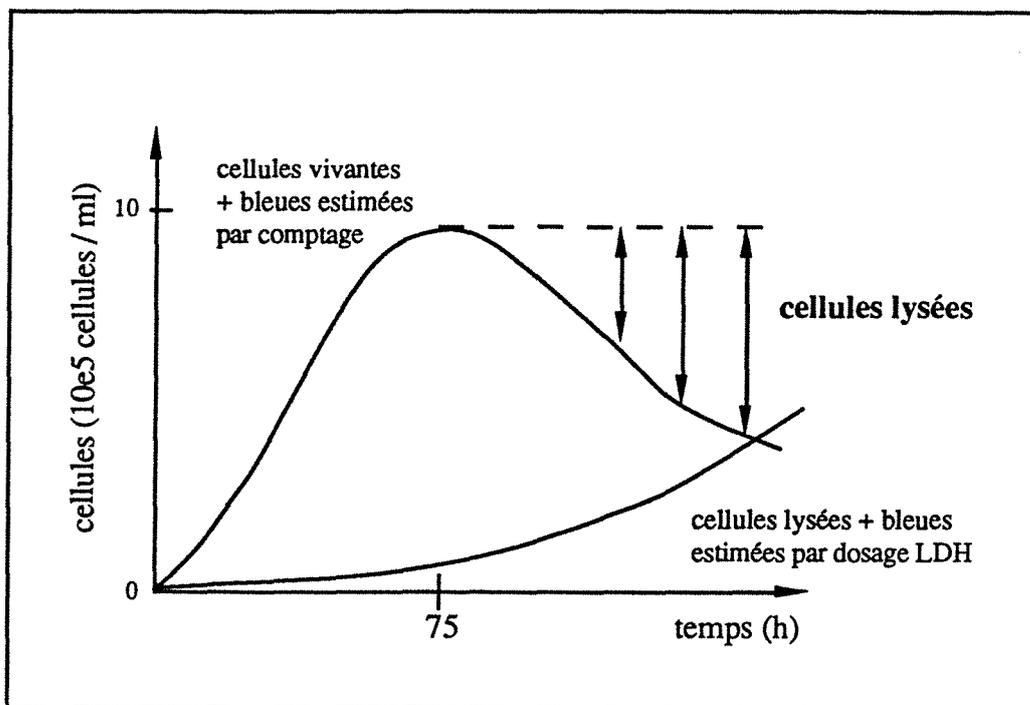


figure II.18: schéma des différentes populations cellulaires évaluables lors de culture de cellules support-dépendantes , en agrégats.

A partir de la culture en agrégats en réacteur discontinu décrite au paragraphe II.3.1. et la quantité de LDH dosée dans le milieu de culture présentée sur la figure II.19, les différentes populations vivantes + bleues et lysées + bleues ont été estimées et sont représentées sur la figure II.20.

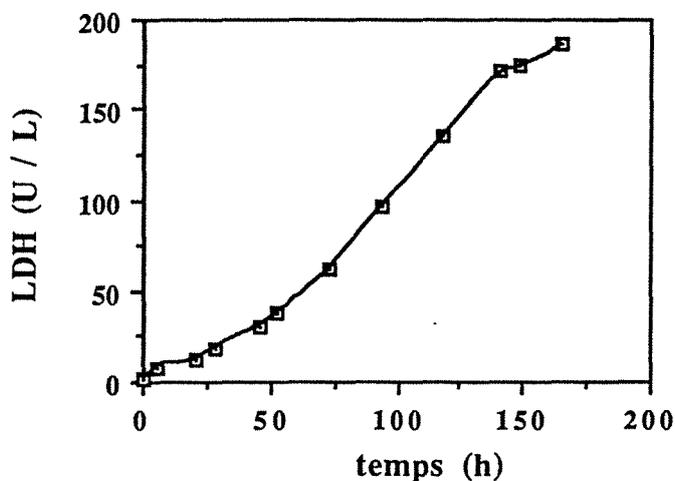


Figure II.19: évolution de l'activité LDH dans le milieu de culture lors d'une culture en agrégats de cellules CHO-GGT en mode discontinu; les cinétiques de culture de cette expérience sont représentées sur la figure II.8

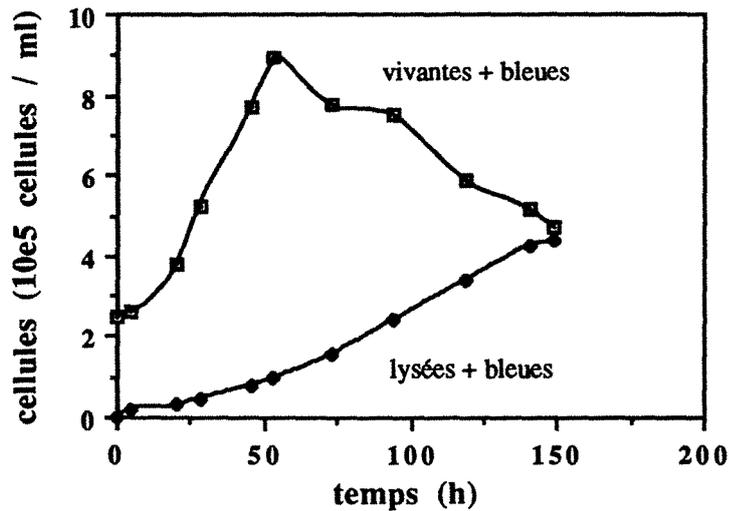


Figure II.20: évolution au cours du temps des cellules vivantes + bleues et des cellules bleues + lysées.

A partir de la courbe de la densité des cellules lysées + bleues et par différence avec la concentration de cellules lysées déterminées comme décrit sur la figure II.21, il est possible d'évaluer le nombre de cellules bleues, puis d'en déduire la concentration de cellules vivantes. La figure II.22 représente l'ensemble des populations cellulaires, vivantes, lysées et bleues ainsi que la somme de ces trois populations.

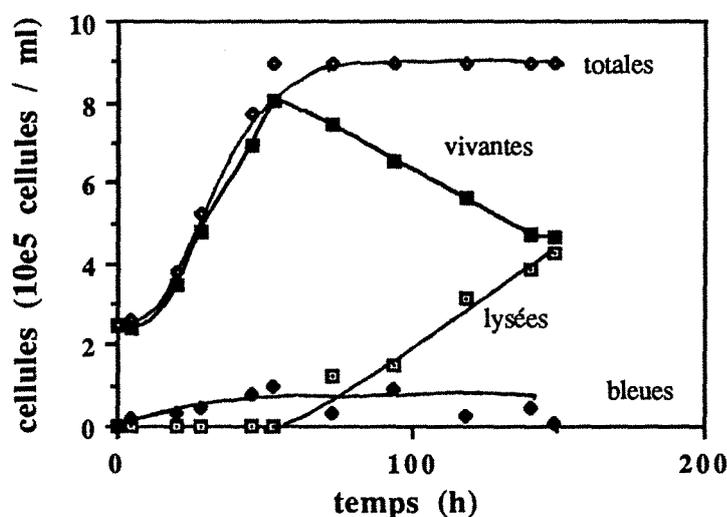


Figure II.21: estimation des différentes populations cellulaires lors d'une culture en réacteur discontinu avec des cellules agrégées.

Ces tracés montrent que la lyse cellulaire est le phénomène prédominant lors du décès cellulaire dans le cas de cellules agrégées; en effet le nombre de cellules bleues estimé reste faible de l'ordre de  $1.10^5$  cellules / ml alors que le nombre de cellules lysées avoisine  $4.10^5$  cellules / ml en fin de culture. Au contraire lors de culture sur microporteurs, il y a accumulation plus rapide des cellules en suspension colorées par le bleu trypan et le nombre de cellules lysées reste inférieur à  $4.10^5$  cellules / ml.

L'estimation des cellules bleues indiquent une bonne viabilité des agrégats; la faible productivité en GGT des cellules agrégées ne provient donc pas d'une faible viabilité des agrégats mais plutôt d'un faible taux d'expression de la GGT recombinante. Les différentes activités spécifiques calculées au paragraphe II.3.1 sont donc bien comparables.

### **11.3.3. cinétiques de culture en réacteur semi-continu de cellules CHO-GGT en agrégats**

Le but de cette expérience est de prolonger la croissance cellulaire pour permettre l'agrégation des cellules afin d'améliorer la production de GGT. Elle devrait conduire à une augmentation de la densité cellulaire et donc à une meilleure production de GGT. Elle permettra également d'évaluer un mode de culture qui a été jusqu'à présent peu étudié malgré les potentialités qu'il recèle et de comparer son comportement à celui d'un système discontinu. Différents profils d'alimentation sont possibles comme décrits dans le chapitre Matériels et Méthodes; soit avec un débit d'alimentation constant soit avec un débit d'alimentation variable mais avec un taux de dilution constant (débit  $Q$  / volume  $V$ ). Nous avons choisi dans cette culture d'imposer un débit d'alimentation constant dans un premier temps pour éviter une dilution trop importante des cellules défavorisant l'agrégation.

La culture a été réalisée avec un volume initial de 1,3 l de milieu DMEM / Ham F12 + 5% SVF + 2,5 mM de glutamine. Du  $CaCl_2$  est aussi ajouté dans le milieu afin d'avoir une concentration finale de 8 mM. Les cellules ont étéensemencées à raison de  $2,5.10^5$  cellules / ml après traitement ménagé à la trypsine pour obtenir des petits agrégats. Comme dans l'expérience précédente, le pH est régulé à 7,4, la  $pO_2$  à 50% de la saturation en air et la vitesse d'agitation est maintenue à 40 rpm. Après 48 heures de culture débute l'alimentation constituée des mêmes ingrédients que le milieu d'ensemencement. Le taux de dilution initial choisi est de 0,01 h<sup>-1</sup> impliquant un débit de 13 ml / h; ce débit restera constant jusqu'à environ 125 h; il sera alors diminué à 7 ml / h. L'alimentation sera stoppée vers 150 h de culture.

La figure II.22 présente les profils du volume et du taux de dilution au cours du temps. Le volume initial était de 1300 ml de milieu; en fin de culture, le volume a presque doublé avec un volume de 2500 ml. Le taux de dilution diminue tout au long de la culture.

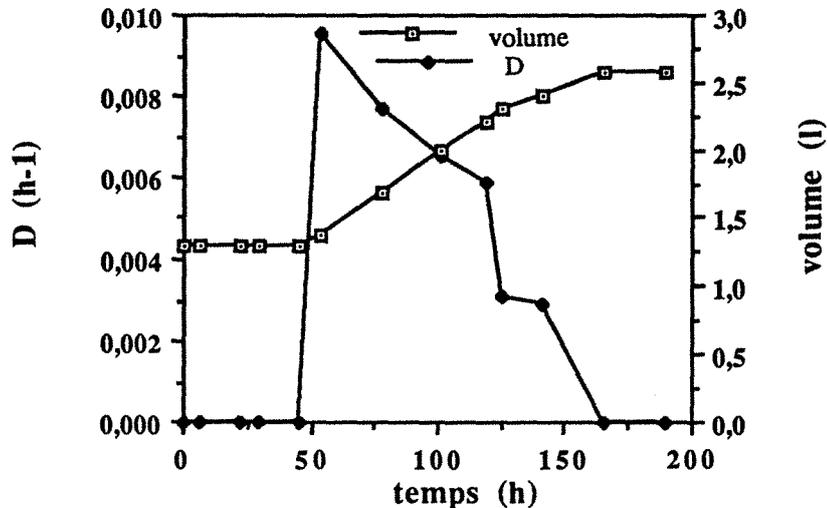


Figure II.22: évolution du volume et du taux de dilution au cours du temps

La figure II.23 (a) montre l'évolution des concentrations cellulaires et de GGT lors de cette expérience. Nous pouvons remarquer que la concentration cellulaire maximale reste peu élevée entre  $6$  et  $7 \cdot 10^5$  cellules / ml mais que cette concentration est maintenue pendant près de 100 heures. Le débit a été diminué à  $7 \text{ ml / h}$  consécutivement à la diminution de la concentration cellulaire observée vers 125 h de culture; cette diminution du débit n'a pas eu de conséquence et la concentration cellulaire a continué de chuter. 24 h plus tard, l'alimentation a été coupée et la concentration cellulaire s'est stabilisée à environ  $3 \cdot 10^5$  cellules / ml. L'évolution de la concentration de GGT est parallèle à celle de la densité cellulaire. Cette concentration est d'ailleurs faible avec un maximum d'environ  $25 \text{ mU / ml}$  après 30 h de culture.

Les agrégats sont de taille modeste au cours des 40 premières heures de culture (de l'ordre de la dizaine de cellules) puis vont croître jusqu'à 125 heures de culture avec des agrégats d'une cinquantaine de cellules.

Les profils de consommation du glucose et de la glutamine (figure II.23 (b) et II.23 (c)) montrent des concentrations non limitantes de ces deux substrats au moins jusqu'à 150 heures de culture (concentration de glucose supérieure à  $5 \text{ mM}$  et celle de la glutamine de l'ordre de  $1 \text{ mM}$ ). L'arrêt de la croissance et le début du décès cellulaire observés à 115 heures de culture ne

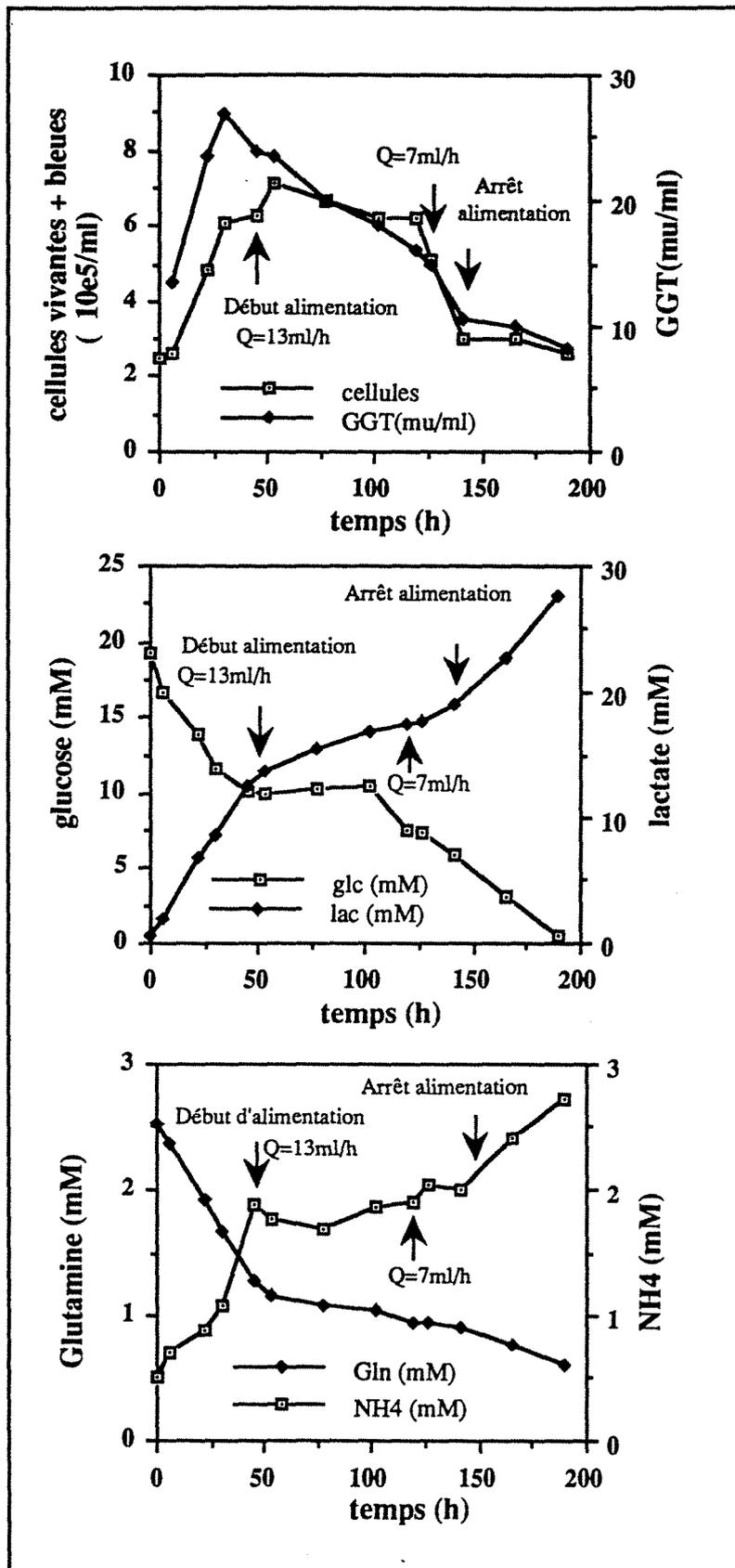


Figure II.23: évolution des concentrations de cellules totales (vivantes + bleues), de consommation du glucose et de glutamine et de production de lactate, d'ions ammonium et de GGT lors d'une culture en mode semi-continu de cellules CHO-GGT en agrégats.

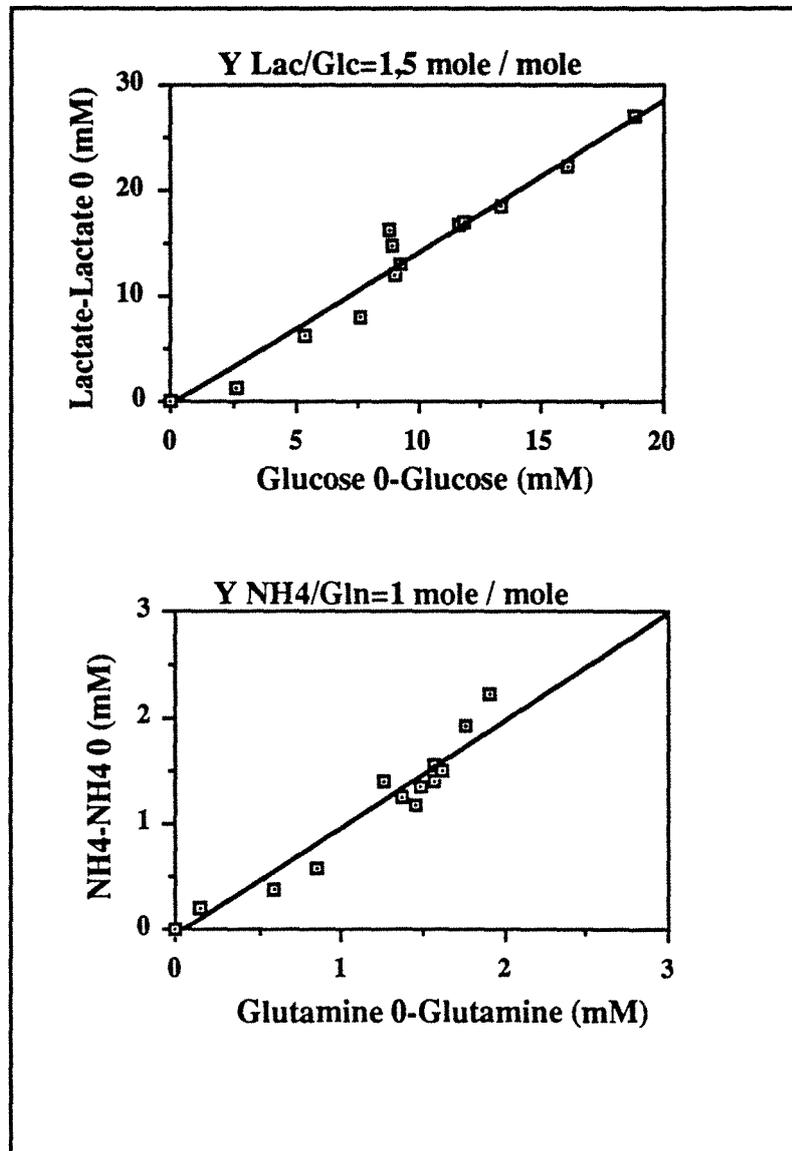


Figure II.24: représentation des rendements de conversion lactate-glucose et glutamine-ions ammonium lors d'une culture en mode semi-continu de cellules CHO-GGT en agrégats; les cinétiques complètes de cette culture sont représentées sur la figure II.23.

sont donc pas corrélés à une limitation de ces deux substrats. La production de lactate et d'ions ammonium (figure II.23 (b) et (c)) reste inférieure à 30 mM pour le premier et inférieure à 3 mM pour le deuxième produit; la production de ces deux métabolites ne peut pas être considérée comme responsable du décès cellulaire, à moins d'une plus grande sensibilité des cellules en agrégats à ces deux toxiques. Les rendements de conversion glutamine-ions ammonium et glucose-lactate (figure II.24 (a) et II.24 (b)) sont respectivement de 1 mole / mole et 1,5 mole / mole

Le dosage de la LDH dans le milieu de culture permet d'évaluer le nombre de cellules mortes (lysées + bleues). La figure II.25 représente l'évolution de la LDH dans le milieu ainsi que le nombre estimé de cellules mortes. Ces résultats montrent une densité maximale de cellules mortes en fin de culture de  $5,5 \cdot 10^5$  cellules / ml avec une accentuation du décès, consécutivement à l'arrêt de l'alimentation. Il n'est pas possible de distinguer le nombre de cellules bleues, du nombre de cellules lysées; en effet, dans le cas du mode semi-continu, la phase de croissance est prolongée jusqu'à 125 h de culture et il ne sera donc pas possible d'estimer le nombre de cellules lysées, comme il l'avait été réalisé lors de l'expérience précédente en mode discontinu. Le calcul des cellules cumulées (bleues + lysées) montrent qu'en fin de culture, la mortalité est très importante; la présence de nombreux débris cellulaires observés lors d'observations microscopiques présument d'une lyse très importante des cellules.

Cependant, il apparaît une augmentation du nombre de cellules (vivantes + bleues) totales pendant 115 heures de culture avec une quantité de GGT cumulée constante de l'ordre de 20 à 30 unités. La quantité de GGT par cellule reste faible, entre 2 et 5 mU /  $10^5$  cellules, n'améliorant pas les performances de la souche par rapport à l'expérience en mode discontinu mais qui permet un maintien de la croissance et de la production de GGT pendant des temps plus longs.

Les vitesses spécifiques de croissance, de consommation de glucose et de glutamine et de production de lactate, d'ions ammonium et de GGT sont représentées sur la figure II.26. Les vitesses spécifiques de croissance et de production de GGT (figure II.26 (a)) sont proches de celles obtenues lors de la culture en mode discontinu. Les courbes des vitesses spécifiques de consommation et de production sont parallèles à la courbe de la vitesse spécifique de croissance; mais contrairement à la culture en mode discontinu, leurs valeurs ne s'annulent pas après 50 heures de culture, indiquant le maintien d'une activité cellulaire pendant la phase d'alimentation.

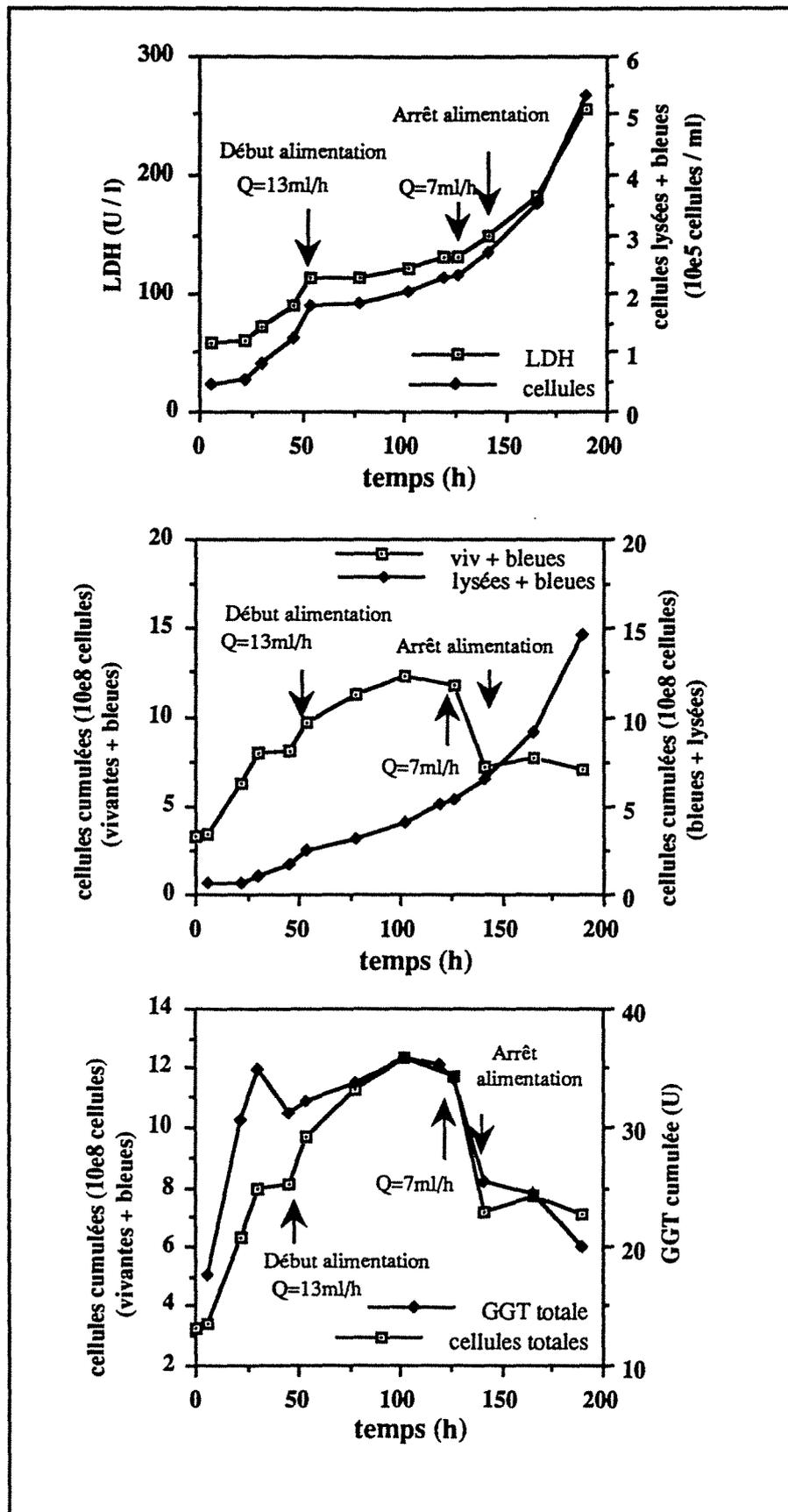


Figure II.25: évolution de l'activité LDH dans le milieu de culture, des concentrations de cellules mortes estimées par le calcul ainsi que des quantités de cellules cumulées obtenues par comptage (vivantes + bleues) et des cellules mortes estimées par le calcul (lysées + bleues) et de GGT.

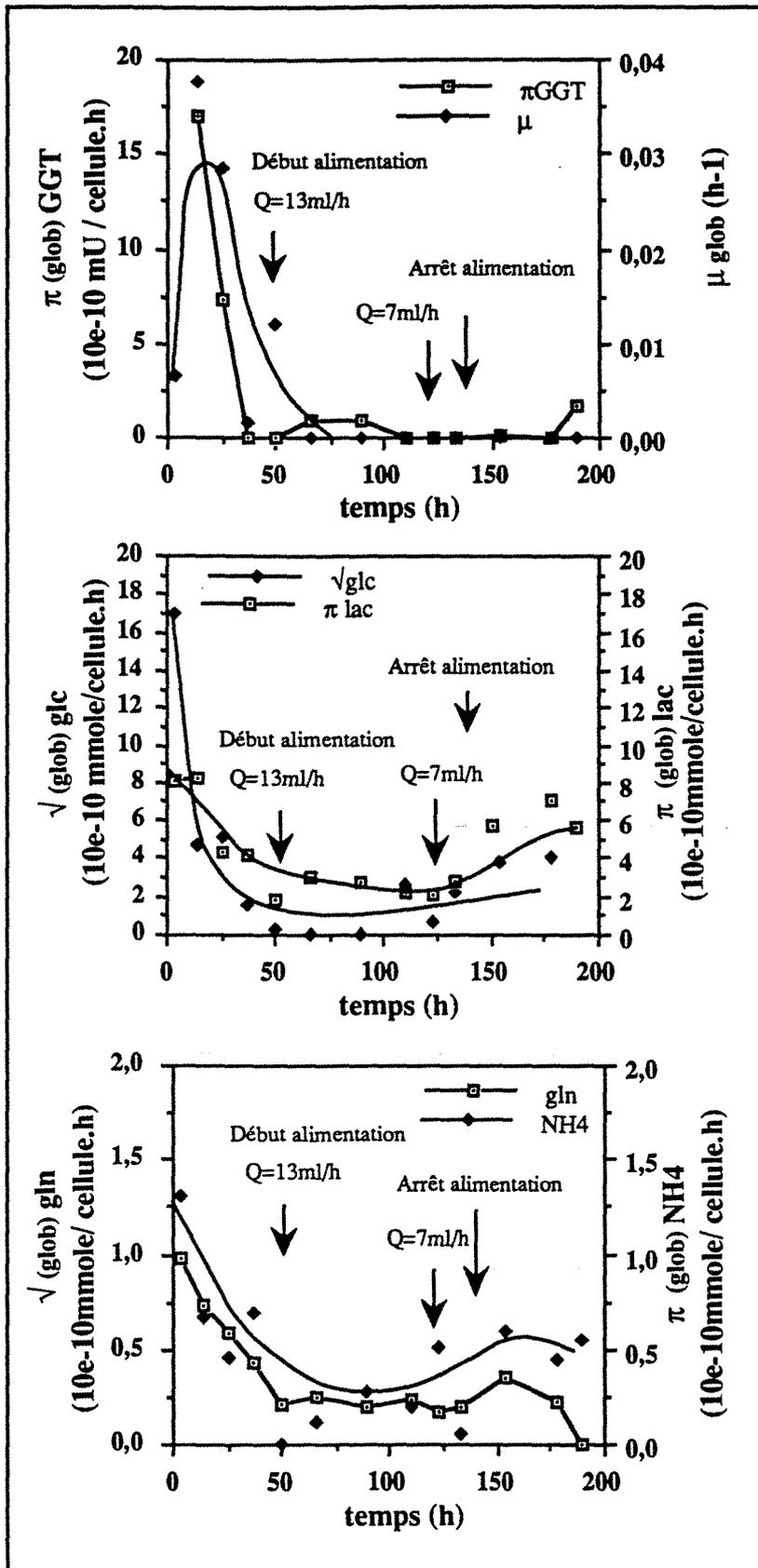


Figure II.26: évolution des différentes vitesses spécifiques globales de croissance, de consommation de glucose et de glutamine et de production de lactate, d'ions ammonium et de GGT lors d'une culture en mode semi-continu de cellules CHO-GGT en agrégats.

### 11.3.4. Conclusions sur le comportement des cellules CHO-GGT en réacteurs discontinu et semi-continu.

#### 11.3.4.1. Comparaison des cultures sur microporteurs ou en agrégats en réacteur discontinu.

A partir des résultats présentés au paragraphe II.3.1 et de l'estimation des cellules vivantes réalisée au paragraphe II.3.2 pour les cellules agrégées, les caractéristiques de croissance et d'expression de GGT rapportées au nombre de cellules vivantes ont pu être établies et peuvent être ainsi comparées aux résultats obtenus pour les cellules sur microporteurs. En effet, nous avons montré que lors de culture discontinu, le nombre de cellules mortes (susceptibles d'intégrer le bleu Trypan) dans les agrégats, était négligeable. Les résultats sont consignés dans le tableau II.E ; les vitesses spécifiques de croissance sont obtenues par la pente de la courbe logarithmique des cellules vivantes en fonction du temps; le taux d'expression de GGT par cellule est, lui, déterminé à 50 h de culture.

	CHO-GGT sur microporteurs	CHO-GGT en agrégats
vitesse spécifique de croissance maximale ( $h^{-1}$ )	0,038	0,025
GGT / cellule vivante (mU / $10^5$ cellules) à 50 h de culture	20	3

Tableau II.E : comparaison des performances de croissance et d'expression de GGT par cellule, des cellules CHO-GGT cultivées sur microporteurs ou en agrégats.

Ces résultats montrent l'obtention d'une vitesse spécifique maximale inférieure pour la culture en agrégats, mais surtout le taux d'expression de GGT par cellule est cinq fois plus faible pour ces cellules cultivées sans support adéquat. Ces résultats confirment ceux obtenus sur les cultures en flacons agités décrits au paragraphe II.2.2. Il a également été vérifié que des différences métaboliques existaient entre cette lignée cultivée sur microporteurs ou en agrégats, notamment dans la conversion de la glutamine en ions ammonium. De plus, le mode discontinu ne semble pas approprié pour l'obtention d'agrégats; la taille de ceux-ci n'ayant pas dépassé les 20 cellules. Cette culture en mode discontinu montre que la faible production de GGT n'est pas liée à un mauvais accès du substrat au site de la GGT lors de son dosage dans les agrégats. De plus, l'étude de la viabilité des agrégats montre que cette faible production n'est pas due à une mauvaise viabilité des agrégats, mais à une diminution de la quantité de GGT exprimée par cellule.

Afin de préciser le comportement des cellules vis à vis de la production de GGT lors de la culture en mode discontinu, nous avons représenté sur la figure II.27, les évolutions de la quantité de GGT par cellule au cours du temps et en fonction de la densité cellulaire, ainsi que la vitesse spécifique de production de GGT en fonction de la concentration cellulaire dans les cultures sur microporteurs ou en agrégats. Ces tracés montrent que, quel que soit le système de culture, la quantité de GGT par cellule augmente après 75 heures de culture, c'est à dire lorsque la vitesse spécifique apparente de croissance est nulle: il semblerait donc qu'il y ait un phénomène d'accumulation de la GGT dans les cellules qui ne sont plus ou faiblement en phase de croissance. Par contre, pendant la phase de croissance, pendant laquelle la densité cellulaire augmente, la quantité de GGT reste stable (pour la culture sur microporteurs) ou diminue légèrement (pour la culture en agrégats). La vitesse spécifique de production de GGT, quant à elle, diminue pendant la phase de croissance puis s'annule pour les deux systèmes de culture. Aucune corrélation n'a pu être établie entre vitesse spécifique de croissance et vitesse spécifique de production de GGT. L'ensemble de ces résultats indiquent que le maximum de production de GGT passe par l'obtention d'une densité cellulaire maximale qui ne correspond pas à la vitesse spécifique de croissance maximale, ni à la vitesse spécifique de production de GGT maximale.

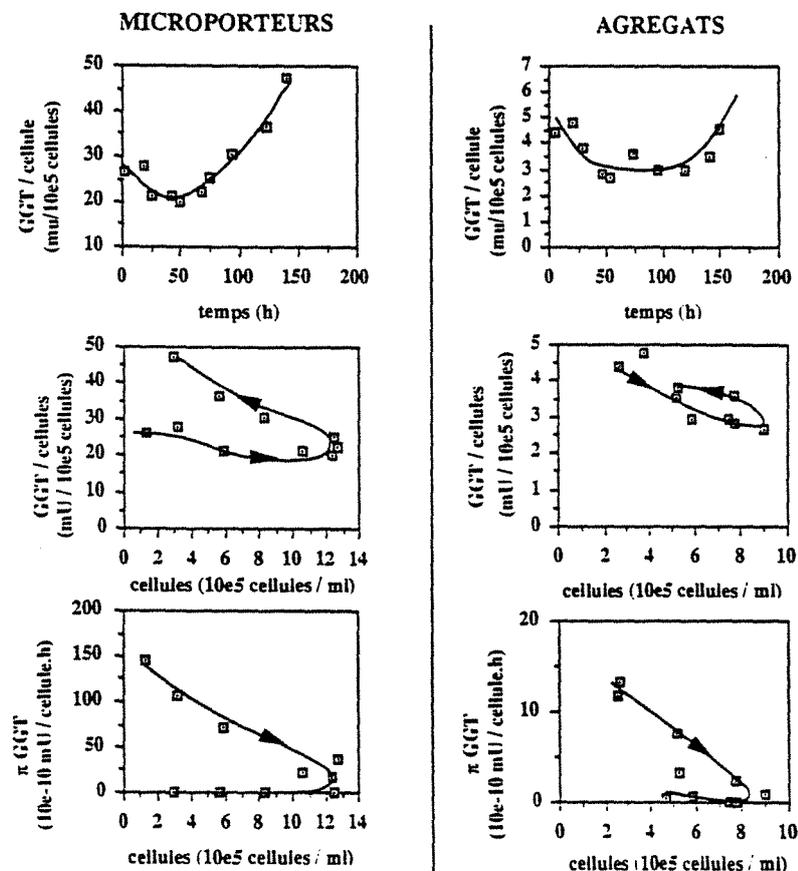


Figure II.27: évolutions de l'expression de GGT par cellule en fonction du temps ou en fonction de la densité cellulaire, ainsi que la vitesse spécifique de production de GGT en fonction de la densité cellulaire lors de culture de cellules CHO-GGT sur microporteurs ou en agrégats.

**11.3.4.2. Comparaisons des cultures en agrégats en réacteur discontinu ou semi-continu ou en flacons agités en mode recharge-récolte.**

Les différents critères de croissance, de production de GGT, de taille d'agrégats et de rendements métaboliques des cellules CHO-GGT, en agrégats, cultivées dans différents modes de culture sont résumés dans le tableau II.F:

	agrégats en réacteur discontinu	agrégats en réacteur semi-continu	agrégats en flacons agités recharge-récolte
taille maximale des agrégats	10 à 20 cellules	> à 50 cellules	plusieurs centaines de cellules
densité cellulaire maximale	$9.10^5$ cellules / ml	$7.10^5$ cellules / ml	$1,4.10^6$ cellules / ml
durée de la phase de croissance	50 h	plus de 100 h	plus de 100 h
$Y_{lac} / glc$	1,2 mole / mole	1,5 mole / mole	1,7 mole / mole
$Y_{NH4} / gln$	1 mole / mole	1 mole / mole	1 mole / mole
concentration de GGT maximale obtenue (mU / ml)	27	28	25

Tableau II.F : comparaison de différents paramètres lors de cultures de cellules agrégées en réacteurs discontinus ou semi-continus, ou en flacons agités en mode recharge-récolte.

La culture des agrégats en mode semi-continu n'a pas permis d'améliorer les performances de la souche par rapport à la culture réalisée en mode discontinu, ou à celle en mode recharge récolte réalisée en flacons agités; par contre elle favorise le maintien de la concentration cellulaire maximale ainsi que la production de GGT, pendant près de 110 heures. La récupération éventuelle des cellules pour la purification de la GGT serait facilitée par un tel mode de culture. Malheureusement la production de GGT par les cellules agrégées est très faible quel que soit le mode de culture utilisé; ce qui dévalorise considérablement ce système de culture en agrégats. On peut également observé que les rendements métaboliques de conversion de la glutamine en ions ammonium ne varient pas quel que soit le mode de culture par contre le rendement métabolique de conversion du lactate en glucose augmente avec la taille des agrégats; ceci s'explique par des problèmes de transfert d'oxygène dans les gros agrégats. La densité cellulaire maximale a été obtenue pour la culture en mode recharge-récolte en flacons agités mais

ce mode de culture ne peut pas être extrapolé à la culture en réacteur car nécessite la récupération des cellules pour changer le milieu de culture.

La culture de cellules agrégées est réalisable mais ces cellules sont relativement fragiles et sensibles à l'accumulation de toxiques ou aux limitations nutritionnelles. L'agrégation des cellules est lente à obtenir à partir de cellules individualisées, mais l'ensemencement de petits agrégats, ainsi que l'ajout d'ions calcium, facilitent l'agrégation et permet d'obtenir de gros agrégats qui permettraient de réaliser des cultures en mode perfusé ou en lit fluidisé. Certains auteurs préconisent l'utilisation de microsphères pour favoriser l'agrégation et obtiennent une croissance en agrégats pour quatre lignées cellulaires support-dépendantes testées (GOETGHEBEUR et HU, 1191). La production de protéine C dans le milieu de culture par une de ces lignées cellulaires ne semble pas affectée par ce système de culture. Malheureusement dans notre cas, la production de la protéine recombinante est modifiée de façon trop importante pour continuer la culture des cellules CHO-GGT en agrégats.



## 11.4. CONCLUSION DU CHAPITRE 11.

L'objectif général de ce chapitre était d'approfondir des connaissances de base sur le comportement morphologique et cinétique des cellules CHO recombinantes dans différents systèmes de culture (microporteurs, agrégats, suspension) et dans différents modes de culture (recharge-récolte, discontinu, semi-continu).

Dans un premier temps, nous avons montré la faisabilité de la culture des cellules CHO en agrégats; suivant le mode de culture employé, la taille des agrégats a varié entre une vingtaine de cellules pour une culture en mode discontinu, une cinquantaine de cellules lors de culture en mode semi-continu et des agrégats de plus de 100 cellules lors de culture en mode recharge-récolte. En parallèle, des cellules ont été adaptées à la culture en cellules individualisées: après deux mois d'adaptation, la vitesse spécifique maximale de croissance s'est stabilisée à 0,02 h<sup>-1</sup> alors qu'elle est de 0,04 h<sup>-1</sup> pour des cultures sur microporteurs et de 0,025 h<sup>-1</sup> pour la culture de cellules agrégées (calculée sur la phase exponentielle de croissance). Quel que soit le système de culture, les caractéristiques de l'enzyme sont identiques et assurent la faisabilité de la production de GGT par ces trois systèmes. Cependant, la quantité de GGT par cellule est diminuée d'un facteur supérieur à 5 lors des cultures de cellules CHO-GGT en agrégats ou en cellules individualisées par rapport à la culture sur microporteurs. Des études complémentaires en réacteur ont alors été envisagées pour comparer le système de culture sur microporteurs avec un système de culture en absence de support: nous avons retenu le système de culture en agrégats qui privilégierait une mise en œuvre de réacteurs perfusés avec possibilité de soutirage des cellules en vue de récupérer l'enzyme membranaire.

La culture comparée de cellules agrégées et sur microporteurs, en réacteur et en mode discontinu, a montré une densité cellulaire maximale légèrement inférieure pour la culture des cellules agrégées. La viabilité des cellules en agrégats a été estimée par dosage de la LDH et nous avons pu évaluer que le nombre de cellules mortes (susceptibles d'intégrer le bleu Trypan) était négligeable, lors de cette culture discontinue, et que la lyse cellulaire était le phénomène prépondérant du décès cellulaire. La vitesse spécifique de croissance maximale des cellules agrégées est de 0,025 h<sup>-1</sup> et de 0,04 h<sup>-1</sup> pour les cellules sur microporteurs. Le métabolisme de base des cellules a été suivi et a montré en particulier une modification du rendement de conversion glutamine-ions ammonium pour les cellules agrégées. La production de GGT est quant à elle, très affectée par l'absence de support adéquat. La production par litre de culture est diminuée d'un facteur 10 pour les cellules agrégées avec environ 30 U / l alors que 300 U / l sont obtenues lors de culture sur microporteurs.

La culture des agrégats en mode recharge-récolte n'améliore pas les performances de la souche, mais permet de maintenir une densité cellulaire maximale pendant près de 75 heures. Ce maintien de la concentration cellulaire couplé au maintien de l'activité GGT paraît intéressant dans l'optique de piloter la culture afin de récupérer les cellules pour en extraire l'enzyme membranaire. La culture en mode semi-continu offre un choix plus large pour l'arrêt de la culture par rapport au mode discontinu où l'activité maximale de GGT n'est maintenue que quelques heures.

L'ensemble de ces résultats indiquent que l'absence de support adéquat pour les cellules CHO interfère de façon importante sur la production de GGT, et malgré les potentialités de la culture en agrégats, les performances de la souche sont trop altérées pour poursuivre la culture dans ces conditions. C'est pourquoi, l'optimisation de la production de GGT sera envisagée dans la dernière partie de ce travail à partir de cellules sur microporteurs.

## CHAPITRE III

## CHAPITRE III

### OPTIMISATION DE LA PRODUCTION EN MASSE DE LA PROTEINE RECOMBINANTE EN VUE DE SON EXTRACTION

<b>III.1. Introduction.....</b>	<b>209</b>
<b>III.2. Influence de l'ajout d'un agent chimique sur la production et les caractéristiques de l'enzyme recombinante.....</b>	<b>211</b>
III.2.1. Effet sur la production de l'enzyme membranaire et sur la croissance des cellules CHO-GGT.....	211
III.2.2. Effet du butyrate de sodium sur l'activité catalytique de la GGT.....	213
III.2.3. Effet du butyrate de sodium sur la structure de la GGT.....	214
III.2.4. Prépurification et caractérisation de la protéine recombinante obtenue après induction par le butyrate de sodium.....	216
III.2.4.1. Etapes de prépurification sur des cellules cultivées sur flacons statiques.....	216
III.2.4.2. Structure de la GGT recombinante par analyse SDS-PAGE.....	218
III.2.4.3. Analyse par isoélectrofocalisation.....	218
III.2.5. Conclusion sur l'influence du butyrate de sodium.....	220
<b>III.3. Production de GGT humaine par culture en masse de cellules CHO-GGT avec induction par le butyrate de sodium.....</b>	<b>221</b>
III.3.1. Introduction.....	221
III.3.2. Culture en réacteur semi-continu de cellules CHO-GGT sur microporteurs.....	222
III.3.2.1. Cinétique de croissance.....	223
III.3.2.2. Etude de la colonisation des microporteurs par analyse d'images.....	226
III.3.2.3. Cinétiques de consommation de nutriments et de production de métabolites.....	229
III.3.2.4. Cinétique de production de GGT.....	231
III.3.3. Conclusion.....	232
<b>III.4. Prépurification de la GGT humaine produite par culture de cellules CHO-GGT sur microporteurs.....</b>	<b>234</b>
III.4.1. Séparation des cellules des microporteurs par filtration.....	234
III.4.2. Sonication des cellules en présence des microporteurs microporteurs.....	235
III.4.3. Solubilisation de la GGT.....	236
III.4.3.1. Solubilisation par la papaïne.....	236
III.4.3.2. Solubilisation par le Triton X-100.....	238
III.4.4. Conclusion.....	238
<b>III.5. Conclusion du chapitre III.....</b>	<b>239</b>

## **CHAPITRE 111**

### **OPTIMISATION DE LA PRODUCTION EN MASSE DE LA PROTEINE RECOMBINANTE EN VUE DE SON EXTRACTION**

#### **111.1. INTRODUCTION**

Les objectifs de ce présent chapitre sont d'une part, d'améliorer les performances de production en masse de la GGT par les cellules CHO-GGT cultivées sur microporteurs en réacteur semi-continu et d'autre part, d'évaluer les implications du système de production sur l'extraction de la protéine membranaire.

Les deux premiers chapitres ont décrit entre autre, l'obtention d'une souche recombinante de cellules CHO exprimant la  $\gamma$  glutamyltransférase humaine, la culture en masse de celle-ci et la comparaison de différents systèmes de culture afin de produire cette enzyme membranaire. Il est apparu que la culture de ces cellules en absence de support engendrait des modifications morphologiques et métaboliques et qu'une perte importante de l'activité enzymatique était alors observée. Nous avons ainsi montré la nécessité d'un support adéquat pour la production de cette enzyme membranaire par ces cellules recombinantes. De plus, la faisabilité de la culture en mode semi-continu a été vérifiée avec une stabilisation des concentrations cellulaires et enzymatiques. C'est pourquoi dans ce chapitre, la production de GGT par ces cellules CHO-GGT sera envisagée uniquement par la culture de ces dernières sur des microporteurs, dans un réacteur semi-continu.

L'amélioration de la production de GGT peut s'effectuer par l'optimisation des conditions de culture en masse et / ou par l'ajout d'agents chimiques tels que le butyrate de sodium (stimulant la production protéique). Une étude préalable permettra d'évaluer les potentialités du butyrate de sodium sur la production de GGT avec des systèmes types flacons de culture. Ces premiers résultats seront alors extrapolés à une culture en bioréacteur dont le but sera de récupérer les cellules au moment opportun pour extraire l'enzyme membranaire d'intérêt. Nous disposerons alors d'un système optimisé de culture pour la production de GGT humaine. L'ensemble de ces objectifs peut être schématisé comme suit:

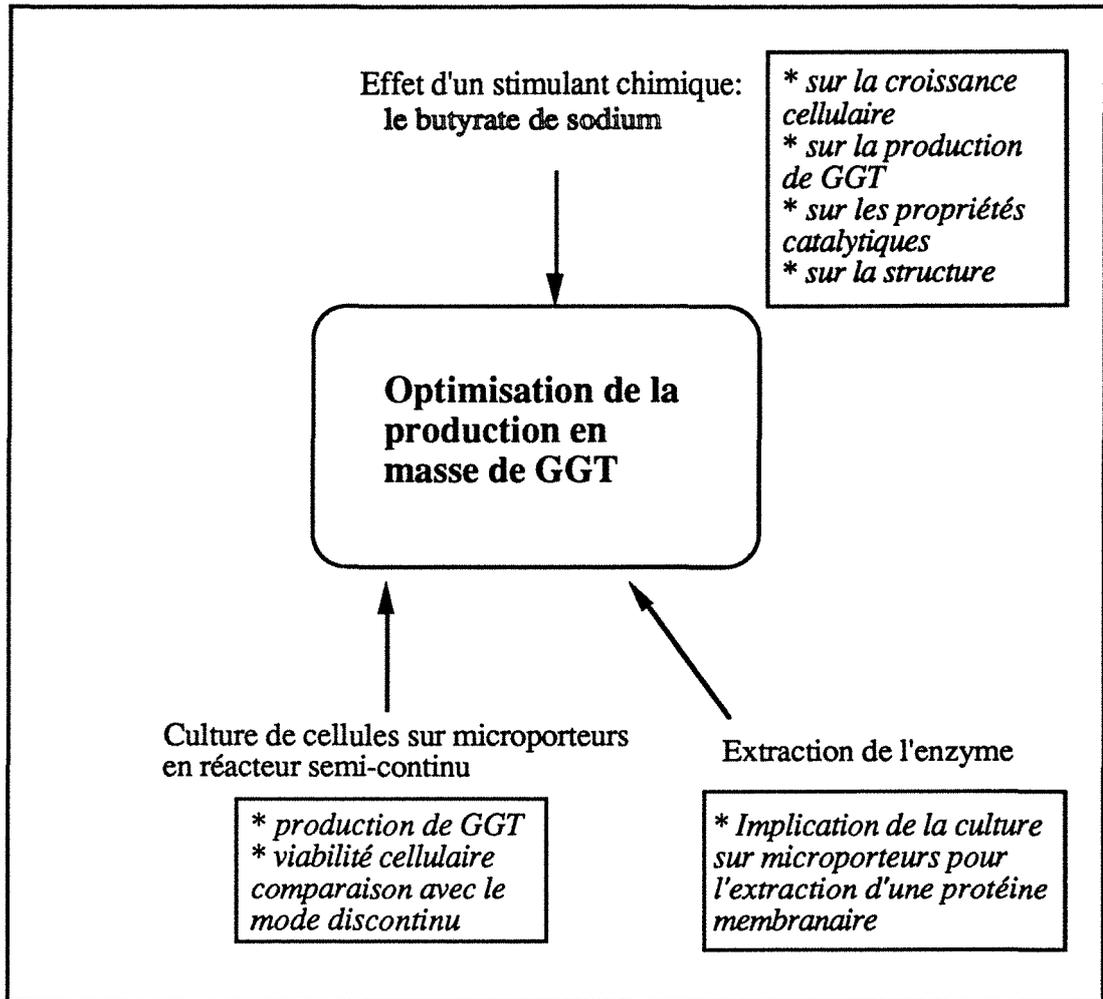


Figure III.1: schéma des objectifs et des étapes abordées pour l'optimisation de la production en masse de GGT

La mise au point des premières étapes d'extraction de la GGT à partir de cultures sur microporteurs des cellules CHO ainsi que la caractérisation de la GGT ont été réalisées en collaboration avec LE BLEVENNEC L. (DEA, 1992).

## **111.2. Influence de l'ajout d'un agent chimique sur la production et les caractéristiques de l'enzyme recombinante.**

Le butyrate de sodium a déjà été étudié pour l'expression de protéines recombinantes par plusieurs auteurs qui rapportent une induction de la production de protéines, simultanément à un arrêt de la croissance cellulaire. Le butyrate de sodium possède certains effets qui affectent toutes les lignées cellulaires, parfois uniquement certaines lignées; l'ensemble de ces effets comprend l'arrêt de la croissance cellulaire, l'induction de protéines, de peptides, d'hormones et d'hémoglobine, le changement de morphologie cellulaire, la réversion de caractéristiques de cellules transformées, l'altération de certains organites intracellulaires (appareil de golgi, noyau). De plus amples détails seront retrouvés dans le chapitre Bibliographie. Dans tous les cas, les effets du butyrate sont réversibles à conditions que son exposition ait été de courte durée (REEVES ET CSERJESI, 1979; KRUH, 1982; BOFFA et al, 1981).

### **111.2.1. Effet sur la production de l'enzyme membranaire et sur la croissance des cellules CHO-GGT**

L'étude que nous présentons ici a pour but d'évaluer les effets du butyrate de sodium sur la croissance des cellules CHO-GGT et sur le taux d'expression de la GGT. Pour cela des flacons de culture ont étéensemencés à raison de  $2 \cdot 10^6$  cellules par boîte de  $75 \text{ cm}^2$  dans du milieu DMEM / Ham F12 + 5% SVF. Les cellules sont cultivées jusqu'à 90% de la confluence puis différentes concentrations de butyrate de sodium sont alors ajoutées dans le milieu de culture. Après 24 h de culture en présence de butyrate, les cellules vivantes sont grattées, comptées et une mesure de l'activité GGT est effectuée. Les résultats sont représentés sur la figure III.2 et correspondent, pour chaque concentration de butyrate de sodium, au comptage et au dosage de GGT de trois flacons de culture distincts.

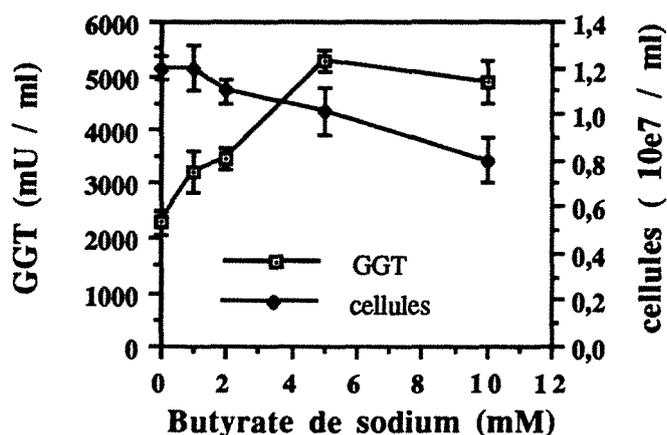


Figure III.2: croissance et production de GGT par les cellules CHO-GGT, en fonction de la concentration de butyrate de sodium additionnée au milieu de culture: expérience réalisée en boîtes de culture. Les résultats représentés correspondent à la moyenne des comptages et des dosages de trois boîtes de culture distinctes.

Il apparaît sur ce graphique une diminution progressive de la concentration de cellules vivantes pour des concentrations croissantes de butyrate de sodium; l'activité GGT est maximale pour 5 mM de butyrate de sodium conformément aux résultats obtenus par d'autres auteurs (PALERMO et al, 1991) qui étudiaient l'expression du tPA par culture de cellules CHO recombinantes. L'activité enzymatique semble être amplifiée d'un facteur 2,75 ( $\pm 0,5$ ) dans les conditions de culture utilisées et avec 5 mM de butyrate de sodium.

Ces résultats ont été vérifiés sur des cellules cultivées sur microporteurs ou en agrégats en flacons agités avec ajout de 5 mM de butyrate de sodium pendant 24 h après 48 h de culture. Les conditions de culture sont identiques à celles utilisées au paragraphe II.2.2., lors de la culture comparée en flacons agités de cellules sur microporteurs ou en agrégats. L'ensemble des résultats obtenus pour le taux d'expression par cellule dans ces différents systèmes de culture avant et après action de 5mM de butyrate de sodium pendant 24 heures est résumé dans le tableau III.A.

Il apparaît que, quel que soit le système de culture utilisé, une induction du taux d'expression de la GGT par cellule est obtenue par ajout de butyrate de sodium (5mM pendant 24 heures); le facteur d'induction varie légèrement suivant le système de culture.

	taux d'expression par cellule de GGT sans action du butyrate de sodium (mU / 10 <sup>5</sup> cellules)	taux d'expression par cellule de GGT après ajout 24 h de butyrate de sodium. (mU / 10 <sup>5</sup> cellules)	Facteur d'induction
culture en flacons statiques	19	52	2,8 ± 0,5
culture en flacons agités sur microporteurs	23	47	2 ± 0,5
culture en flacons agités en agrégats	3	5	1,7 ± 0,5

Tableau III.A: action du butyrate de sodium sur le taux d'expression de GGT de cellules cultivées dans différents systèmes de culture.

### 111.2.2 Effet du butyrate de sodium sur l'activité catalytique de la GGT.

Afin de vérifier l'activité catalytique de la GGT recombinante issue de cellules mises en contact avec du butyrate de sodium, les constantes catalytiques ont été déterminées pour l'enzyme produite par culture de cellules CHO-GGT en présence ou non de butyrate de sodium. Deux bouteilles roulantes ont étéensemencées par des cellules CHO-GGT dans le milieu habituel de culture; après culture de ces cellules jusqu'à 90% de la confluence, 5 mM de butyrate de sodium sont ajoutés dans une des deux bouteilles roulantes; 24 heures plus tard les cellules sont grattées et les protéines sont solubilisées une nuit par 0,5% de triton X100; le surnageant après ultracentrifugation 1 h à 105000g servira à la détermination des constantes catalytiques. Les mesures ont été effectuées à pH 8,25 avec des concentrations finales en substrats variant de 0,4 à 8,3 mM en GluCNA et de 5 à 200 mM en Glygly. Les résultats sont consignés dans le tableau (III.B) suivant

	Km <sup>D</sup>	Km <sup>A</sup>
CHO-GGT sans induction par le butyrate de sodium	0,7±0,10	6,5±0,5
CHO-GGT avec induction avec 5 mM de butyrate	0,71±0,05	6,5±0,8

Tableau III.B: Détermination des constantes catalytiques de la GGT à partir de cellules cultivées en absence ou en présence de butyrate de sodium; expérience réalisée en flacons roulants.

Km<sup>D</sup>: constante catalytique pour le substrat donneur GluCNA

Km<sup>A</sup>: constante catalytique pour le substrat accepteur glycyglycine

Ces résultats montrent des constantes catalytiques proches pour la GGT issue de cellules induites par le butyrate de sodium par rapport à celle issue de cellules non induites. L'induction par le butyrate entraîne donc bien une augmentation de la production de l'enzyme membranaire sans changement des propriétés catalytiques de cette enzyme.

### 11.2.3. Effet du butyrate de sodium sur la structure de la GGT.

De même, nous avons vérifié si le butyrate n'agissait pas sur les propriétés structurales de la protéine recombinante. Une électrophorèse sur SDS-PAGE suivie d'un "Western-blot" a été réalisée avec des cellules cultivées en présence de 5 mM de butyrate de sodium pendant 24 heures ou en absence de butyrate de sodium, à partir de cellules cultivées en flacons roulants. Les protéines ont été solubilisées par du Triton X-100 puis précipitées à l'acétone comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes au paragraphe C.VI.1. L'équivalent de 50 µg de protéines est déposé sur gel SDS-PAGE; après électrophorèse et transfert, les sous-unités de la GGT sont détectées avec un antisérum de lapin anti-GGT de rein humain. Le profil obtenu de la GGT recombinante avec induction ou non par le butyrate de sodium est présenté sur la photo III.1.

Il apparaît une conservation des deux sous unités de la GGT avec clivage protéolytique du précurseur ainsi qu'une augmentation de l'intensité des bandes, indiquant un accroissement de la quantité d'enzyme par mg de protéines lorsque les cellules ont été traitées par du butyrate de sodium. On peut également remarqué des bandes supplémentaires pour la sous-unité lourde correspondant aux cellules soumises à l'incubation avec du butyrate de sodium mais qui sont probablement dues à une quantité importante d'enzyme déposée, révélant ainsi des isoformes qui ne sont pas détectés lorsque des quantités plus faibles d'enzymes sont déposés.

D'après l'ensemble de ces résultats, il apparaît que le butyrate de sodium est un bon candidat pour induire la production de GGT par les cellules CHO-GGT. L'action du butyrate semble intervenir dans l'expression de la GGT recombinante sans affecter l'activité catalytique et sans modifier les propriétés structurales de l'enzyme. Cependant, un compromis doit être obtenu afin de maintenir une viabilité cellulaire suffisante pendant le traitement et permettre une intensification significative de la production. Les études réalisées initialement en flacons statiques indiquaient un doublement de l'activité enzymatique après un traitement des cellules en phase exponentielle de croissance avec 5 mM de butyrate de sodium finale pendant 24 heures; la culture étant alors stoppée. Ces résultats ont été vérifiés sur des cellules cultivées sur microporteurs ou en agrégats en flacons agités avec ajout de 5 mM de butyrate de sodium, pendant 24 heures après 48 heures de culture. L'augmentation de la production de GGT est également améliorée d'un facteur 2 comme pour la culture en flacons statiques.

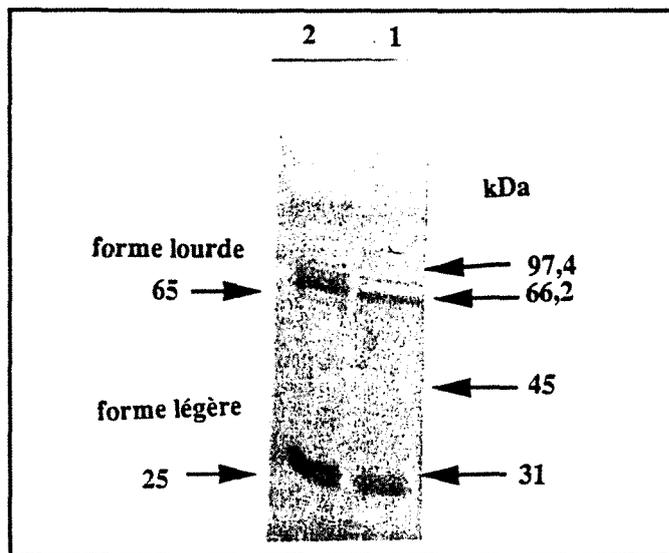


Photo III.1: Profil électrophorétique de la GGT recombinante après induction par le butyrate de sodium.

**piste 1:** protéines solubilisées par le Triton X-100 et précipitées à l'acétone à partir de cellules CHO-GGT, non induites, cultivées en boîtes (20 µg protéines)

**piste 2:** protéines solubilisées par le Triton X-100 et précipitées à l'acétone à partir de cellules CHO-GGT cultivées en boîtes, induites par du butyrate de sodium (5 mM pendant 24 h) (20 µg protéines)

Après électrophorèse et transfert, les sous-unités sont détectées à l'aide d'un antisérum anti-GGT de rein humain.

Donc quel que soit le système de culture choisi pour la production de GGT, un doublement de son activité pourra être obtenu par l'incubation des cellules en phase exponentielle de croissance avec 5 mM de butyrate de sodium pendant 24 heures; les cellules recombinantes pourront être alors recueillies afin de purifier l'enzyme d'intérêt.

#### **III.2.4. Prépurification et caractérisation de la protéine recombinante obtenue après induction par le butyrate de sodium.**

Les caractérisations sommaires réalisées jusqu'à présent dans ce travail ont été effectuées à partir d'extraits cellulaires bruts ou à partir d'échantillons solubilisés par un détergent (triton). C'est pourquoi il a semblé intéressant d'aborder ici les premières étapes de la purification de cette enzyme afin de mieux caractériser la protéine obtenue (PM, point isoélectrique).

Dans un premier temps, nous nous sommes fondés sur les travaux de purification de la GGT humaine exprimée par des cellules V79 (VISVIKIS et al, 1991) cultivées en flacons statiques. Ces auteurs préconisent le traitement des cellules par une enzyme protéolytique spécifique (la papaine) suivi d'une dialyse et d'une chromatographie échangeuse d'anions. Les concentrations de papaine utilisées ont été adaptées aux cellules CHO-GGT recombinantes et sont supérieures à celles utilisées pour l'extraction de la GGT à partir des cellules V79.(0,03 mg / mg de protéines à la place de 0,01 mg / mg). Il apparaît donc que l'accessibilité au site spécifique de coupure de la papaine est différente pour les cellules CHO-GGT, probablement en raison d'une glycosylation différente de la protéine recombinante. Le traitement de solubilisation par la papaine est effectué une deuxième fois et les surnageants obtenus après ultracentrifugation sont additionnés, dialysés et prépurifiés par chromatographie échangeuse d'anions. Les échantillons sont alors concentrés et déposés sur gel SDS-PAGE afin de visualiser l'avancement de la purification; le "Western Blot" permettra de déterminer les masses moléculaires des sous-unités. Cet échantillon prépurifié servira également à la détermination du point isoélectrique de cette enzyme recombinante.

##### **III.2.4.1. Etapes de prépurification sur des cellules cultivées sur flacons statiques.**

Des cellules CHO-GGT cultivées en flacons statiques de 175 cm<sup>2</sup> dans du milieu complet DMEM / HamF12 +5% SVF + 4mM de glutamine ont été soumises à l'action du butyrate de sodium (5mM) pendant 24 heures avant d'être récupérées par grattage. Après lavage avec du PBS, le culot cellulaire obtenu après centrifugation servira à l'extraction de l'enzyme recombinante.

Le schéma de prépurification précis utilisé est décrit sur la figure III.3.

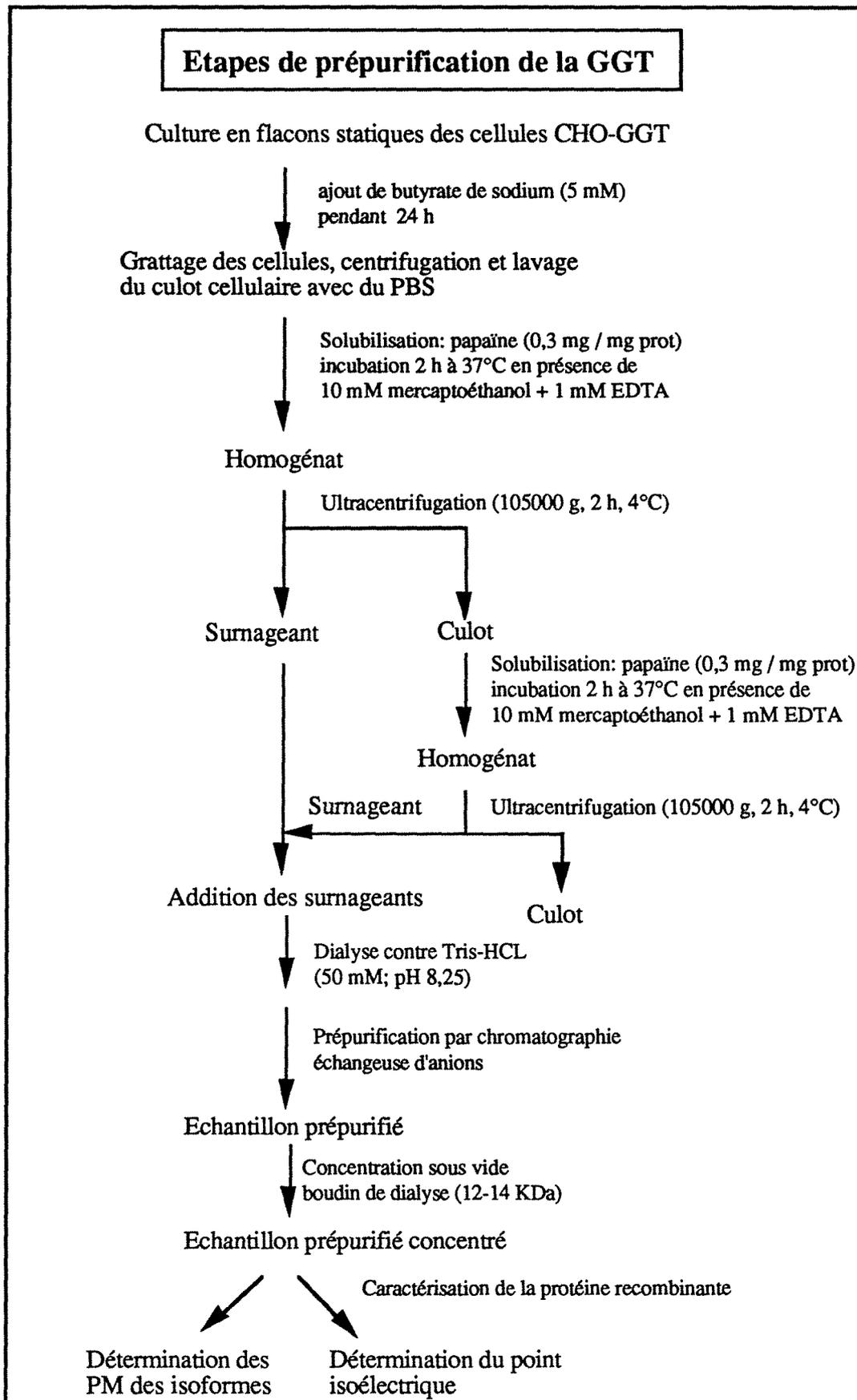


Figure III.3: Schéma des différentes étapes de pré-purification de GGT à partir de cellules CHO-GGT cultivées en flacons statiques et soumises à une induction de butyrate de sodium pendant 24 h.

#### **III.2.4.2. Structure de la GGT recombinante par analyse SDS-PAGE.**

Des échantillons sont conservés à différentes étapes pour suivre l'évolution de la purification par analyse sur gel SDS puis transfert sur nitrocellulose. Un échantillon de cellules grattées (piste 1), un échantillon de surnageant après les deux traitements à la papaine (piste 2) et un échantillon après passage sur la colonne échangeuse d'anions (piste 3) sont déposés sur un gel SDS-PAGE, puis après transfert sur feuille de nitrocellulose, les sous unités de la GGT sont révélées par un antisérum de lapin anti-GGT de rein humain. La photo III.2 montre le profil obtenu après révélation:

La piste 1 révèle plusieurs bandes non spécifiques de la GGT

La piste 2 révèle deux bandes: entre 25 et 30 kDa et entre 65 et 70 kDa, spécifiques des sous-unités légère et lourde de la GGT.

La piste 3 révèle également les deux sous unités spécifiques de la GGT

Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment et montrent l'existence de deux sous unités spécifiques de la GGT, une sous unité de 25 à 30 kDa et une sous unité de 65 à 70 kDa; cette pré-purification a permis d'éliminer les protéines non spécifiques de la GGT qui étaient révélées par l'antisérum de lapin et ne met en évidence que les sous unités de la GGT humaine.

#### **III.2.4.3. Analyse par isoélectrofocalisation.**

Cette étude a pour but d'estimer le point isoélectrique moyen de la GGT recombinante afin le comparer avec d'autres GGT tissulaires. Un échantillon est prépurifié et concentré suivant le protocole décrit sur la figure III.3. Des quantités différentes sont déposées sur le gel d'isoélectrofocalisation ainsi que des marqueurs de pH. La révélation spécifique de la GGT montre 7 isoformes différents avec des pH compris entre 4,4 et 5,95. La moyenne de ces pI est de 5,3. Le nombre important d'isoformes peut être attribué à des variations de structures glycosidiques notamment à la présence d'un nombre variable de résidus d'acides sialiques. Le tableau suivant (tableau III.C) compare les différents pI suivant l'origine tissulaire:

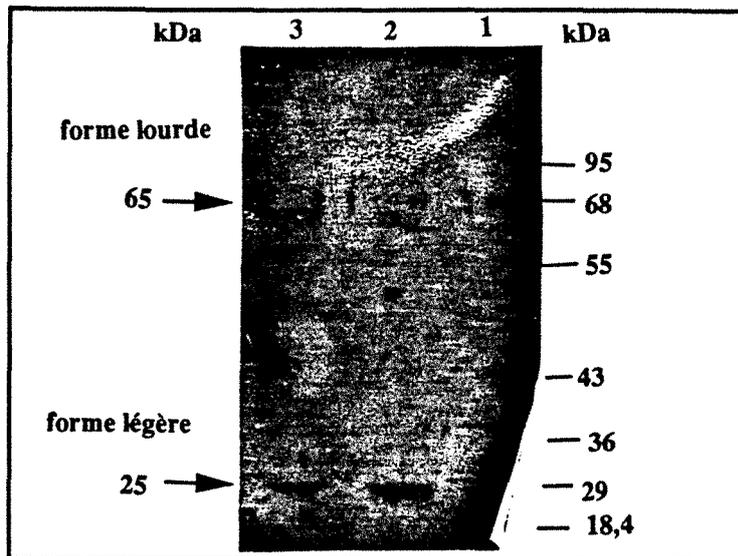


Photo III.2: détermination de la structure de la GGT et mise en évidence des deux sous unités.  
 piste 1: homogénat de cellules CHO-GGT (25 µg de protéines)  
 piste 2: surnageant après deux traitements papaïne comme décrit sur la figure III.3. (10 µg prot)  
 piste 3: surnageant après passage sur colonne échangeuse d'anions. (10 µg de protéines)

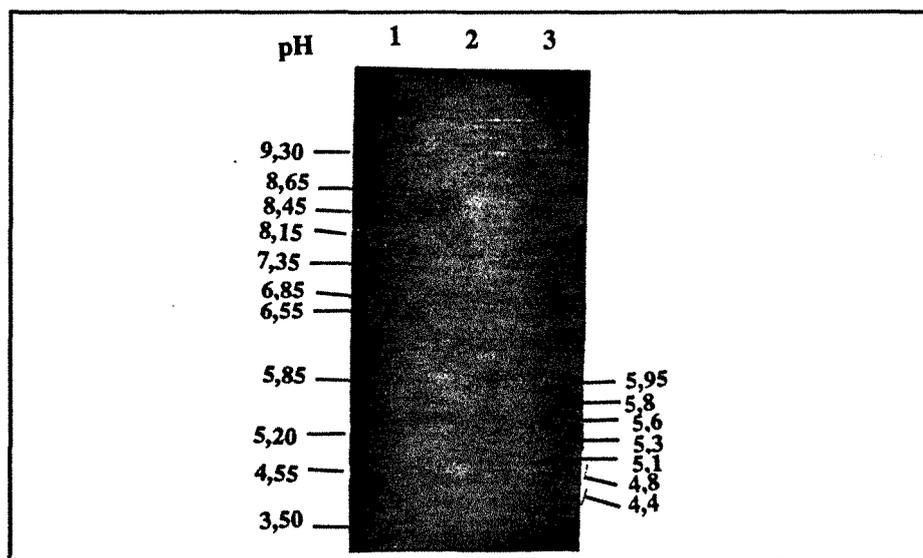


Photo III.3: détermination du point isoélectrique de la GGT recombinante: l'échantillon a été prépurifié suivant le protocole décrit sur la figure III.3.  
 piste 1: dépôt de 25 mU de GGT  
 piste 2: dépôt de 50 mU de GGT  
 piste 3: dépôt de 100 mU de GGT



Origine	pI	Références
Rein humain	5,2	HUSEBY (1981)
Foie humain	4,2	HUSEBY (1981)
Sérum	4,2	HUSEBY (1981)
GGT recombinante cellules V79	4,5	VISVIKIS et al (1991)
GGT recombinante cellules CHO	5,3	ce travail

Tableau (III.C) comparatif de différents points isoélectriques de GGT suivant l'origine de celle ci

Le pI moyen de la GGT issue des cellules CHO recombinantes est proche de celui du rein humain.

#### 11.2.5. Conclusion sur l'influence du butyrate de sodium.

L'ensemble de ces études sur le butyrate de sodium a donc montrer que celui-ci est un bon candidat pour l'induction de la synthèse de GGT; en effet, il améliore la production d'un facteur avoisinant 2, quel que soit le système de culture employé, sans modifier les propriétés structurales et catalytiques de l'enzyme. Les conditions opératoires choisies (induction 24 heures à raison de 5 mM de butyrate de sodium) entraînent une diminution d'environ 20% du nombre de cellules par rapport à un témoin non induit. La mise en œuvre de quelques étapes de pré-purification a permis de vérifier la faisabilité de l'extraction de la GGT recombinante et a permis de concentrer celle-ci, afin de déterminer les propriétés structurales de l'enzyme ainsi que son point isoélectrique moyen.

### **111.3. Production de GGT humaine par culture en masse de cellules CHO-GGT avec induction par le butyrate de sodium**

#### **111.3.1. Introduction.**

L'objectif de cette partie concerne la production de GGT humaine par les cellules CHO-GGT en réacteur avec récupération des cellules au moment adéquat, pour permettre l'extraction ultérieure de l'enzyme recombinante. Plusieurs questions se posent alors pour choisir les conditions optimales de la production de cette protéine membranaire; tout d'abord il faut choisir le système de culture approprié: les résultats obtenus précédemment ont montré que ce système donne des productivités près de 10 fois supérieures par rapport à des systèmes en agrégats ou adaptés à la suspension. Nous avons donc choisi de produire cette enzyme par des cellules cultivées sur microporteurs.

Il se pose ensuite le choix du mode de culture: discontinu, semi-continu ou continu. La culture en mode discontinu a l'avantage d'être simple à mettre en œuvre et permet des cultures de courtes durées, faciles à reproduire et à valider. Dans notre cas, la production d'une protéine membranaire nécessite la récupération des cellules: ce qui implique l'arrêt de la culture lorsque le maximum de productivité de GGT est atteint; comme l'ont montré les résultats des cultures en mode discontinu présentés au chapitre 1 et 2 le maximum de production de GGT coïncide avec le maximum de densité cellulaire et correspond à un temps de culture très bref de quelques heures au delà duquel la concentration cellulaire et la concentration de GGT chutent. C'est pourquoi, il est difficile avec ce type de culture de stopper au moment adéquat l'expérience afin de récupérer les cellules. Le mode semi-continu présente lui cet avantage, tout en conservant la simplicité de mise en œuvre et la faible durée de la culture; l'introduction d'une alimentation en milieu frais permet de retarder les limitations nutritionnelles, de maintenir une croissance cellulaire et donc une production GGT pendant des temps plus longs. L'arrêt de la culture pour la récupération des cellules peut donc intervenir sur un intervalle de temps plus grand. Le mode continu (perfusé) ne sera pas envisagé car il nécessite une longue mise en œuvre avec des temps de culture très longs et obligerait l'utilisation d'un perfusé avec des cellules agitées pour pouvoir les récupérer séquentiellement; la difficulté liée à la récupération de la protéine membranaire privilégie les cultures de courtes durées. C'est pourquoi nous avons choisi de tester la production de GGT, par culture de cellules sur microporteurs, en mode semi-continu, avec induction de la production de l'enzyme membranaire par du butyrate de sodium.

Le mode semi-continu nécessite le choix du mode d'alimentation, qui comme décrit précédemment, peut être réalisé à débit constant ou à débit variable. L'alimentation à débit

constant a l'inconvénient principal d'apporter certains nutriments en quantité excessive en début de culture par rapport aux besoins effectifs des cellules, celles ci étant peu nombreuses en début de culture. L'excès de ces nutriments risque de favoriser la production de métabolites toxiques tels que le lactate ou les ions ammonium. et par conséquent de freiner la croissance cellulaire. Par contre en fin de culture, ces mêmes nutriments risquent d'être limitants par rapport aux besoins des cellules car la concentration cellulaire aura augmentée et le débit d'alimentation sera insuffisant. C'est pourquoi nous avons préféré tester l'alimentation à débit variable, qui permet d'apporter les nutriments en fonction des besoins effectifs des cellules. Le débit d'alimentation sera progressivement augmenté de façon à maintenir constant le taux de dilution D (débit / volume).

L'action du butyrate de sodium testée précédemment, a montré une induction d'un facteur 2 dans la production de l'enzyme membranaire, après une exposition des cellules CHO-GGT à une concentration de 5 mM de butyrate de sodium pendant 24 heures. Le déroulement de l'expérience va consister à piloter la culture afin d'obtenir une bonne croissance cellulaire; lorsque la colonisation des porteurs sera conséquente, une induction par le butyrate de sodium sera réalisée et 24 heures plus tard, la culture sera arrêtée et les cellules sur microporteurs seront récupérées afin d'en extraire la GGT recombinante.

Parallèlement, des échantillons seront prélevés dans le réacteur et permettront de suivre l'évolution de la colonisation des microporteurs au cours de la culture, par analyse d'images. Une corrélation sera établie entre le nombre de cellules obtenu par comptage à l'hémacytomètre et l'estimation de l'aire des microporteurs occupées par les cellules. Le pourcentage de microporteurs colonisés sera également suivi au cours du temps. Cet outil devrait permettre l'obtention d'informations précieuses sur l'état de la colonisation des microporteurs au cours d'une culture de cellules CHO.

### 111.3.2. Culture en réacteur semi-continu de cellules CHO-GGT sur microporteurs.

La culture a été réalisée avec un volume initial de 1,3 l de milieu DMEM / Ham F12 + 5% SVF + 5 mM de glutamine. Les cellules CHO-GGT sontensemencées à raison de  $2.10e5$  cellules / ml, le pH est réglé à 7,4, la  $pO_2$  à 50% de la saturation en air et la vitesse d'agitation est maintenue à 40 rpm. L'alimentation débute après 48 heures de culture, avec du milieu identique à celui de l'ensemencement. La figure III.4 montre l'évolution du volume et du taux de dilution: ces tracés montrent une phase initiale d'environ 50 h, correspondant à une culture en mode discontinu avec  $D = 0$ ; puis l'alimentation débute avec un taux de dilution constant de  $0,01 \text{ h}^{-1}$  correspondant à un débit (Q) de 13 ml / h; ce débit sera réajusté toutes les 10 h environ

pour maintenir ce taux de dilution constant. Le volume initial est de 1300 ml; il sera de 3000 ml en fin de culture.

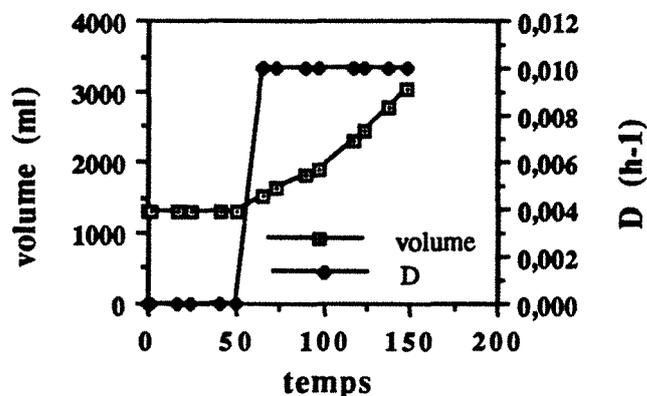


Figure III.4: évolutions du taux de dilution et du volume au cours d'une culture semi-continue des cellules CHO-GGT

### III.3.2.1. Cinétique de croissance.

Les évolutions de la densité cellulaire et de la concentration de GGT sont représentées sur la figure III.5, ainsi que les quantités totales cumulées de cellules et de GGT (Figure III.6). Ces tracés indiquent une phase de croissance pendant les 50 premières heures de culture avec l'obtention d'une concentration cellulaire de  $1.10^6$  cellules / ml. La vitesse spécifique  $\mu$  moyenne calculée sur ces 50 h de culture est de  $0,035 \text{ h}^{-1}$ , proche de celle obtenue lors de la culture en réacteur discontinu décrite au paragraphe II.3.1. Au delà de 50 h, la concentration cellulaire augmente jusqu'à une valeur de  $1,5.10^6$  cellules / ml; cette concentration cellulaire sera maintenue sur une période de 100 h, contrairement à la culture en mode discontinu où la concentration cellulaire maximale n'est obtenue que sur un petit intervalle de temps d'une douzaine d'heures, au delà duquel débute le décès cellulaire. La quantité de cellules cumulées (figure III.6) croît pendant toute la durée de la culture, indiquant que les cellules ont été maintenues en phase de croissance.

Le nombre de cellules mortes, colorées au bleu trypan ainsi que la concentration de LDH dans le milieu de culture (figure III.7) montrent que le décès cellulaire est faible (inférieur à  $1.10^5$  cellules / ml) pendant les 125 premières heures de culture avec une concentration en LDH inférieure à 150 mU / ml. L'ajout du butyrate de sodium pendant 24 h a eu pour conséquence d'augmenter légèrement le nombre de cellules mortes; mais globalement, le nombre de cellules

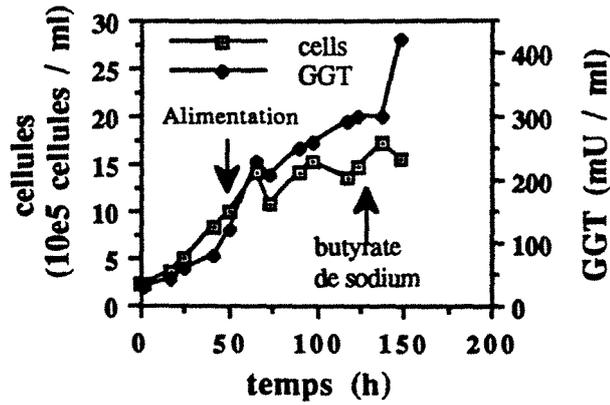


Figure III.5: évolutions de la densité cellulaire et de la concentration de GGT lors de la culture sur microporteurs en mode semi-continu .

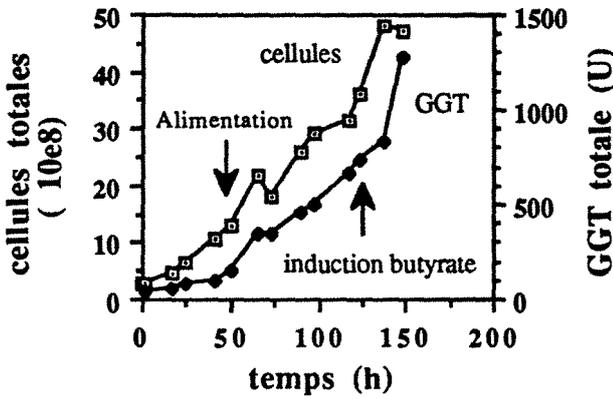


Figure III.6: évolutions des quantités cumulées de cellules et de GGT lors de la culture en mode semi-continu avec induction par le butyrate de sodium.

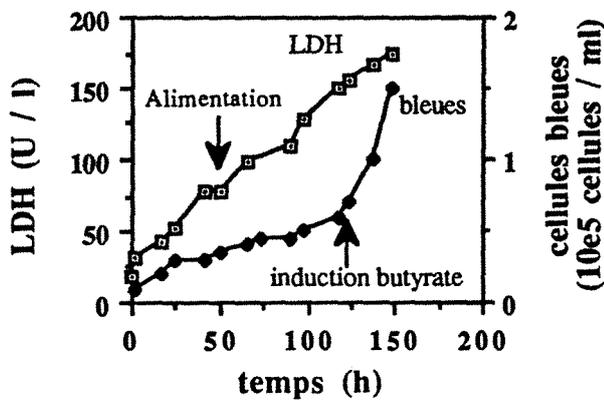


Figure III.7: évolutions au cours du temps de la densité de cellules bleues et de la concentration de LDH dans le milieu de culture

cumulées a continué à augmenter; le prolongement de la culture au delà de 24 h après l'induction, aurait probablement entraîné un décès cellulaire plus conséquent ainsi que l'arrêt de la croissance cellulaire.

La vitesse spécifique  $\mu_{app}$  instantanée calculée entre chaque prélèvement (figure III.8) montre que celle ci est maintenue non nulle (environ 0,02 h<sup>-1</sup>) pendant la phase d'alimentation. La culture en mode semi-continu permet donc de maintenir une vitesse spécifique de croissance à une valeur constante pendant près de 100 heures; lors de culture discontinu, la vitesse spécifique de croissance s'annulait après 50 heures de culture.

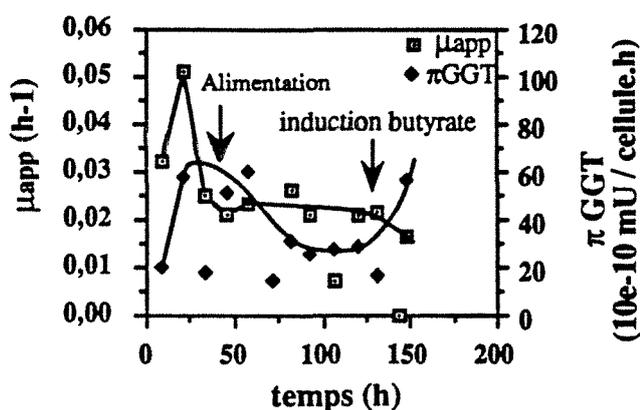


Figure III.8: évolution des vitesses spécifiques de prolifération ( $\mu_{app}$ ) et de production de GGT. Les vitesses spécifiques sont calculées d'après les équations données dans la partie Matériels et méthodes

### III.3.2.2. Etude de la colonisation des microporteurs par analyse d'images.

L'utilisation en routine d'un outil tel que l'analyse d'images permettrait d'automatiser et de simplifier l'évaluation du nombre de cellules sur microporteurs au cours d'une culture et de mieux comprendre le processus de colonisation des cellules sur les microporteurs. Des échantillons ont été prélevés tout au long de la culture en mode semi-continu, décrite précédemment et ont été utilisés pour déterminer la taille des microporteurs, l'aire occupée par les cellules sur les microporteurs, le nombre de microporteurs colonisés et le nombre de cellules, par analyse d'images (PICHON, 1992a). Les cellules sur microporteurs sont colorées par du cristal violet et à chaque prélèvement une cinquantaine de clichés sont réalisés (environ 150 microporteurs) et analysés à l'aide d'un traitement semi automatique dans un environnement VISILOG. Cette étude a été réalisée par PICHON D. dans le cadre de travaux sur l'analyse d'images appliquée à la culture de microorganismes ou de cellules animales.

Les photos III.4 a-d montrent l'évolution de la colonisation des microporteurs par les cellules au cours du temps. Pendant les 24 premières heures de culture, il y a peu de cellules par microporteur et de nombreux microporteurs sont vides (photo III.4a). Après 48 h de culture, (photo III.4.b), les microporteurs sont d'avantages colonisés; après 72 h de culture, (photo III.4.c), il y a des microporteurs totalement recouverts et on note une diminution des microporteurs non colonisés. Après 125 h de culture, on rencontre des agrégats de microporteurs totalement recouverts de cellules; on peut également observer des cellules en suspension indiquant un début de décès cellulaire (photos III.4.d).

L'analyse d'images permet de quantifier ces observations et par exemple il a pu être montré que le pourcentage de microporteurs non colonisés diminuait au long de la culture (figure III.9); ce qui implique apparemment un transfert de cellules CHO d'un microporteur colonisé à un microporteur vide au cours de la culture.

Une corrélation a également pu être établie entre le nombre de cellules estimées par comptage visuel et le pourcentage d'aire occupé par les cellules établi par calcul après analyse d'images (figure III.10). Un coefficient de corrélation de 0,94 a été obtenu et montre que l'estimation de l'aire occupée par les cellules est un bon indicateur de la croissance cellulaire.

D'autres études ont été réalisées notamment sur la colonisation des microporteurs en fonction du diamètre de ceux ci et l'évolution des microporteurs ayant "n" cellules dans le temps. Ces travaux montrent la faisabilité et les potentialités de l'utilisation de l'analyse d'images pour suivre et étudier une culture de cellules animales sur microporteurs (PICHON, 1992b)





Photo III.4.a: cellules sur microporteurs lors d'une culture semi-continu en réacteur (t=24 h) grossissement x 250



Photo III.4.b: cellules sur microporteurs d'une culture semi-continu en réacteur (t=48 h) grossissement x 250.

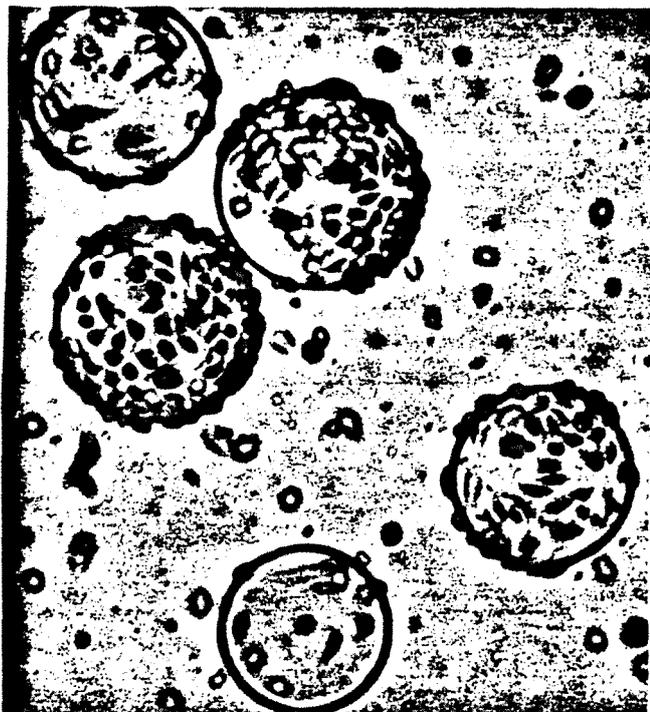


Photo III.4.c: cellules sur microporteurs lors d'une culture semi-continu en réacteur (t=72 h) grossissement x 250

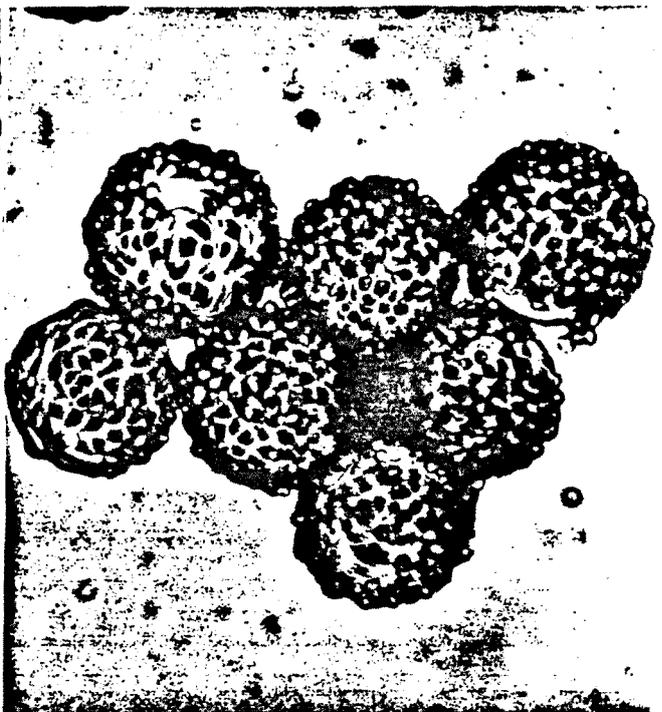


Photo III.4.d: cellules sur microporteurs d'une culture semi-continu en réacteur (t=125 h) grossissement x 250.



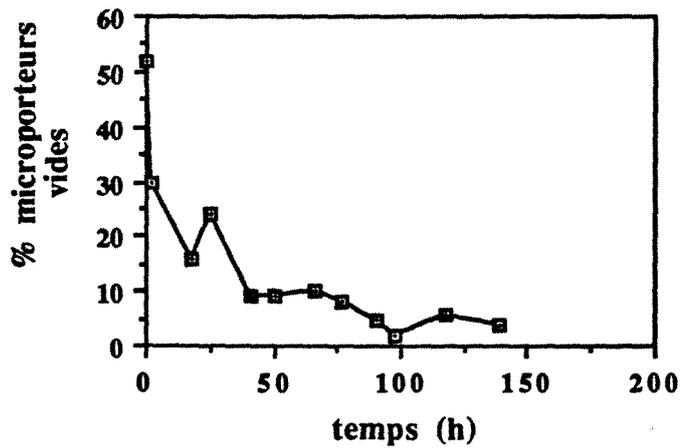


Figure III.9: Evolution des microporteurs vides au cours de la culture; ces résultats ont été obtenus à partir de la culture en mode semi-continu décrite précédemment; la courbe de croissance est représentée sur la figure III.5.

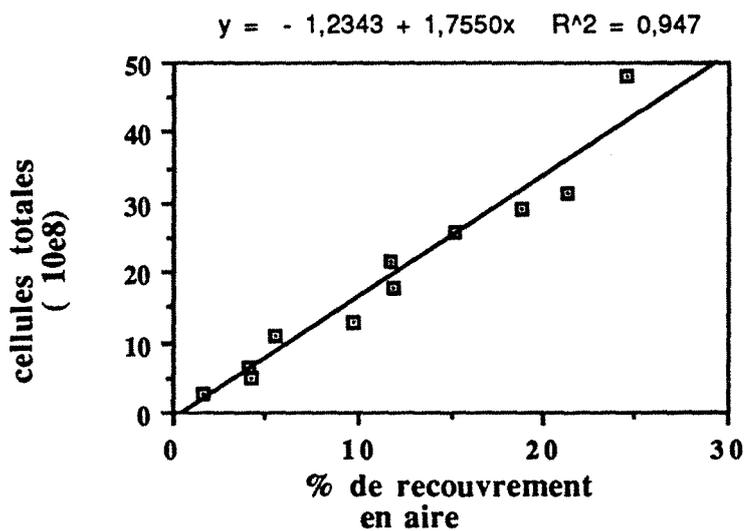


Figure III.10: corrélation entre le pourcentage de recouvrement en aire estimé par analyse d'images et le nombre de cellules obtenus par comptage visuel; cette corrélation a été établie à partir de la culture en mode semi-continu dont les courbes sont présentés sur la figure III.5.

### III.3.2.3. Cinétiques de consommation de nutriments et de production de métabolites.

Les courbes de consommation de glucose, de glutamine et de production de lactate et d'ions ammonium sont présentées sur la figure III.11. Ces tracés montrent qu'après 100 h de culture, le glucose commençait à être limitant, ce qui pourrait expliquer le ralentissement de la croissance cellulaire observé vers 110h de culture; la concentration de glutamine a par contre été maintenue supérieure à 1 mM tout au long de la culture. Les concentrations maximales en fin de culture de lactate (20 mM) et d'ions ammonium (4 mM) sont comparables à celles obtenues lors de culture en mode discontinu et ont dû avoir peu d'effets toxiques sur les cellules. L'ensemble de ces résultats montre que le profil d'alimentation adopté était adéquat pour la croissance des cellules CHO-GGT; cependant, une augmentation de la concentration de glucose dans le milieu d'alimentation aurait été préférable .

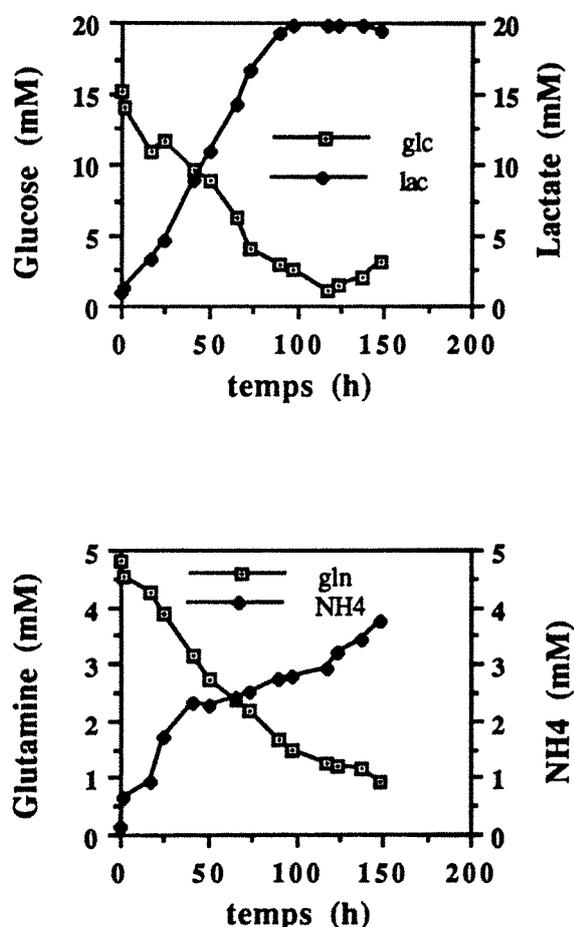


Figure III.11: cinétiques de consommation de substrats (glucose, glutamine) et de production de métabolites (lactate et ions ammonium) de la culture sur microporteurs en mode semi-continu

Les rendements métaboliques obtenus sont comparés dans le tableau III.D à ceux trouvés lors de la culture en mode discontinu présentée au paragraphe II.3.1:

	$Y_{lac/glc}$	$Y_{NH_4/gln}$
réacteur discontinu avec cellules sur microporteurs	<b>1,2 mole / mole</b>	<b>0,6 mole / mole</b>
réacteur semi-continu avec cellules sur microporteurs	<b>1,1 mole / mole</b>	<b>0,6 mole / mole</b>

Tableau III.D: comparaison des rendements métaboliques suivant le mode de culture utilisé.

Il n'apparaît pas de différences significatives entre les rendements métaboliques suivant le mode de culture utilisé.

Les vitesses spécifiques de consommation de glucose, de glutamine et de production de lactate et d'ions ammonium sont présentées sur la figure III.12. On peut remarquer que contrairement à la culture en discontinu, l'ensemble des vitesses spécifiques de production et de consommation ne s'annulent pas durant les 75 premières heures de culture. Ces résultats confirment que la culture en mode semi-continu permet le maintien d'activités métaboliques pendant des temps plus longs que lors de culture discontinu.

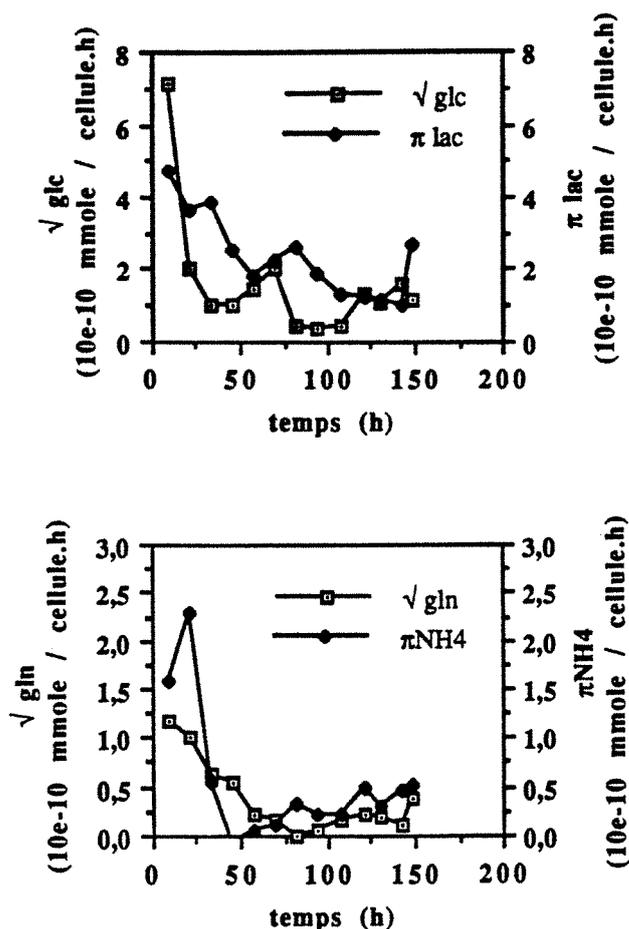


Figure III.12: évolutions des vitesses spécifiques de consommation de glucose ( $\sqrt{\text{glc}}$ ) et de glutamine ( $\sqrt{\text{gln}}$ ) et de production de lactate ( $\pi \text{ lac}$ ) et d'ions ammonium ( $\pi \text{ NH}_4$ ) au cours du temps. Les cinétiques correspondantes sont représentées sur la figure III.11.

#### III.3.2.4. Cinétique de production de GGT

L'évolution de la concentration de GGT au cours du temps, présentée sur la figure III.5, montre une augmentation de cette concentration avec 150 mU / ml après 50 h de culture et près de 300 mU / ml après 125 h de culture; l'ajout du butyrate de sodium permet d'obtenir en 24 h une concentration qui va passer de 300 à 420 mU / ml. Les quantités totales de GGT cumulées dans le bioréacteur au cours du temps (figure III.6) indiquent une production totale de 1300 U au moment de la récupération des cellules. L'action du butyrate de sodium a donc permis de multiplier la concentration de GGT par un facteur de 1,5. La vitesse spécifique de production de GGT (figure III.8) montre que celle ci ne s'annule pas pendant la culture, contrairement à la culture en mode discontinu pour laquelle cette vitesse s'annulait après 100 h de culture; le mode semi-continu permet donc de maintenir une activité de production de GGT sur un intervalle de

temps plus long. Un pulse de butyrate de sodium permet d'augmenter la vitesse spécifique de production sans entraîner un décès cellulaire trop important. Le taux d'expression par cellule (figure III.13) se stabilise vers 20 mU / 10<sup>5</sup> cellules lorsque débute l'alimentation; l'induction par le butyrate de sodium améliore ce taux d'expression avec près de 30 mU / 10<sup>5</sup> cellules.

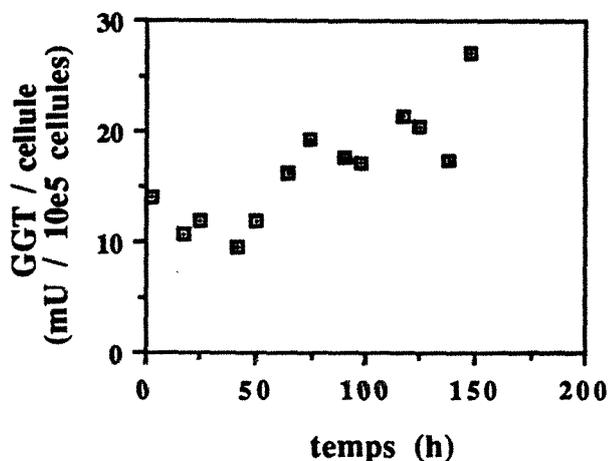


Figure III.13: taux d'expression de GGT par cellule au cours de la culture sur microporteurs en mode semi-continu.

### 111.3.3. Conclusion

Cette expérience en mode semi-continu montre la faisabilité de la production de GGT par des cellules recombinantes cultivées en bioréacteur. La culture en mode semi-continu présente des avantages par rapport à la culture en discontinu qui sont les suivants:

- elle nécessite un inoculum plus faible puisque le volume initial est également plus faible; ce dernier augmentera au cours de la culture;
- elle prolonge la croissance cellulaire pendant plus de 100 heures et permet de mieux piloter la culture en évitant les limitations trop précoces en nutriments;
- elle permet de maintenir les activités métaboliques et notamment la vitesse spécifique de production de GGT pendant l'ensemble de la durée de la culture;
- elle fournit des quantités de GGT plus importante, plus particulièrement après ajout de butyrate de sodium.

Un pulse de butyrate de sodium en fin de phase exponentielle permet d'augmenter la production de GGT d'un facteur 1,5. Cependant, les résultats précédents avaient montré une augmentation de la production d'un facteur 2 après induction par le butyrate pendant la phase

exponentielle de croissance. Le moment adéquat pour l'ajout du butyrate de sodium semble primordial quant à son effet d'induction; l'ajout du butyrate de sodium dans la culture en mode semi-continu a du être réalisé trop tardivement.

#### **11.4. Prépuration de la GGT humaine produite par culture de cellules CHO-GGT sur microporteurs**

Le problème majeur posé pour l'extraction de GGT humaine à partir de culture en masse de cellules CHO-GGT est la récupération des cellules et l'élimination des microporteurs. Différentes stratégies initiales ont été testées: la séparation des cellules des microporteurs par filtration, la sonication des cellules suivie de l'élimination des microporteurs, la solubilisation directe de l'enzyme en présence de microporteurs. Différentes méthodes existent pour l'extraction de l'enzyme:

- utilisation d'enzymes protéolytiques spécifiques comme la papaïne ou la bromélaïne
- utilisation de détergeants comme le triton X100.

Suivant la technique utilisée, l'enzyme libéré diffère; en utilisant un détergeant, c'est l'intégralité de l'enzyme qui sera dégagée de la membrane alors que l'utilisation de protéases permettra d'extraire l'enzyme sans son segment hydrophobe d'ancrage. Il n'y a pas de différence de propriétés catalytiques entre ces deux formes. Le seul inconvénient pour l'utilisation de détergent réside dans le risque d'agrégation de la forme totale de l'enzyme. Nous avons donc testé et comparé ces deux procédures d'extraction.

##### **11.4.1. Séparation des cellules des microporteurs par filtration.**

L'extraction de la GGT humaine nécessite la récupération des cellules avec séparation de celles-ci de leur support. Lors de culture en flacons statiques, les cellules sont grattées et prélevées facilement. La culture des cellules sur microporteurs ne permet pas l'utilisation de la même procédure.

Les échantillons de cellules sur microporteurs sont conservés à - 20°C; il a été observé, lors de la décongélation, un décrochement de plus de 80% des cellules de la surface des microporteurs; c'est pourquoi la filtration de la suspension cellulaire a semblé être une bonne alternative, après décongélation, pour l'élimination des microporteurs avant de débiter les étapes d'extraction de la protéine membranaire. Le diamètre d'une cellule étant de l'ordre de 10 microns et celui d'un microporteur d'une centaine de microns, un filtre métallique de 50

microns non absorbant pour les cellules a semblé adéquat pour séparer les cellules des microporteurs.

Le principe de cette étape est le suivant: après décongélation, une filtration frontale est réalisée à travers une membrane métallique dont les mailles possèdent un diamètre de 50 microns. Les microporteurs, formant un gâteau à la surface de la grille métallique, sont récupérés et lavés dans du tampon PBS puis refiltrés pour éliminer les cellules retenues par les microporteurs. Un dosage de GGT et un comptage de cellules avant et après cette double filtration ont été réalisés; les résultats sont consignés dans le tableau suivant (tableau III.E):

Etapes	Nombre de cellules (10 <sup>6</sup> cellules)	Activité totale (mU)
Avant la double filtration	10	2715
Après la double filtration	3	667

Tableau III.E: séparation des cellules des microporteurs par une double filtration sur membrane métallique de 50 µm; le nombre de cellules est évalué par coloration au cristal violet; le dosage GGT est réalisé par la technique au point final.

Ces valeurs montrent une perte de 70% du nombre de cellules et de 75% de l'activité GGT. Cette perte considérable peut-être attribuée à l'accumulation très rapide des microporteurs à la surface du filtre retenant les cellules. Une filtration tangentielle serait certainement mieux appropriée mais nécessiterait un montage plus complexe et l'utilisation de volume plus conséquent.

#### 11.4.2. Sonication des cellules en présence des microporteurs microporteurs

Après décongélation de l'échantillon contenant cellules et microporteurs, un traitement aux ultra sons est appliqué; les conditions sont les suivantes:

- puissance: 100 W
- 4 traitements de 10 secondes avec 10 secondes d'intervalle entre chaque traitement.

L'observation microscopique des cellules permet de suivre l'éclatement des cellules; l'activité GGT est alors dosée. Après ce traitement, les microporteurs sont décantés et le surnageant contenant les débris cellulaires est récupéré et un dosage GGT est à nouveau effectué.

Les résultats ont montré que la sonication n'affectait pas l'activité de la GGT; par contre, l'activité GGT mesurée sur le surnageant contenant les débris cellulaires est diminuée de moitié par rapport à l'activité totale obtenue après sonication; la sédimentation des microporteurs a donc pour effet d'entraîner des débris cellulaires et résultent en une perte importante de l'activité enzymatique.

Cette première étape de sonication ne sera donc pas retenue; les traitements de solubilisation de la GGT seront effectués directement sur le mélange cellules-microporteurs sans élimination préalable des microporteurs.

### III.4.3. Solubilisation de la GGT

Les protocoles de solubilisation de la GGT testés sur des cellules CHO-GGT cultivées sur microporteurs sont décrits sur la figure III.14.

#### III.4.3.1. Solubilisation par la papaine.

Plusieurs concentrations de papaine ont été testées variant de 0,05 à 0,6 mg / mg de protéines. Les rendements enzymatiques obtenus aux différentes étapes successives sont regroupés dans le tableau (III.F):

papaine (mg/mg)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Homogénat 1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
surageant 1	21%	27%	31%	43%	38%	38%	41%
Culot 1	58%	55%	50%	44%	34%	45%	47%
Homogénat 2	100%	100%	100%	100%	100%	100	100
surageant 2	10%	11%	33%	35%	33%	36%	24%
Culot 2	30%	29%	42%	37%	45%	62%	36%
<b>Rendement final</b>	<b>27%</b>	<b>33%</b>	<b>47,5%</b>	<b>58,5%</b>	<b>50%</b>	<b>54,5%</b>	<b>52,5%</b>

Tableau III.F: les pourcentages d'activité GGT restant après chaque étape de la solubilisation par la papaine; les différentes étapes sont schématisées sur la figure III.14

Ces résultats montrent que pour des concentrations de papaine croissantes de 0,05 à 0,3 mg / mg de protéines, le rendement final d'extraction de la GGT augmente jusqu'à près de 60%; pour des concentrations de papaine supérieures à 0,3 mg / mg de protéine, il n'y a plus aucune amélioration du rendement d'extraction de la GGT. La concentration de papaine de 0,3 mg / mg de protéine semble donc être la concentration optimale pour extraire la GGT recombinante des cellules CHO. Des travaux réalisés sur les cellules V79 recombinantes (THIOUDELLET, 1992) ont montré que deux traitements successifs de papaine à raison de 0,1 mg / mg de protéine permettaient la récupération de 70% de l'activité enzymatique GGT initiale. Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par une accessibilité différente du site de reconnaissance de la papaine entre les deux GGT recombinantes.

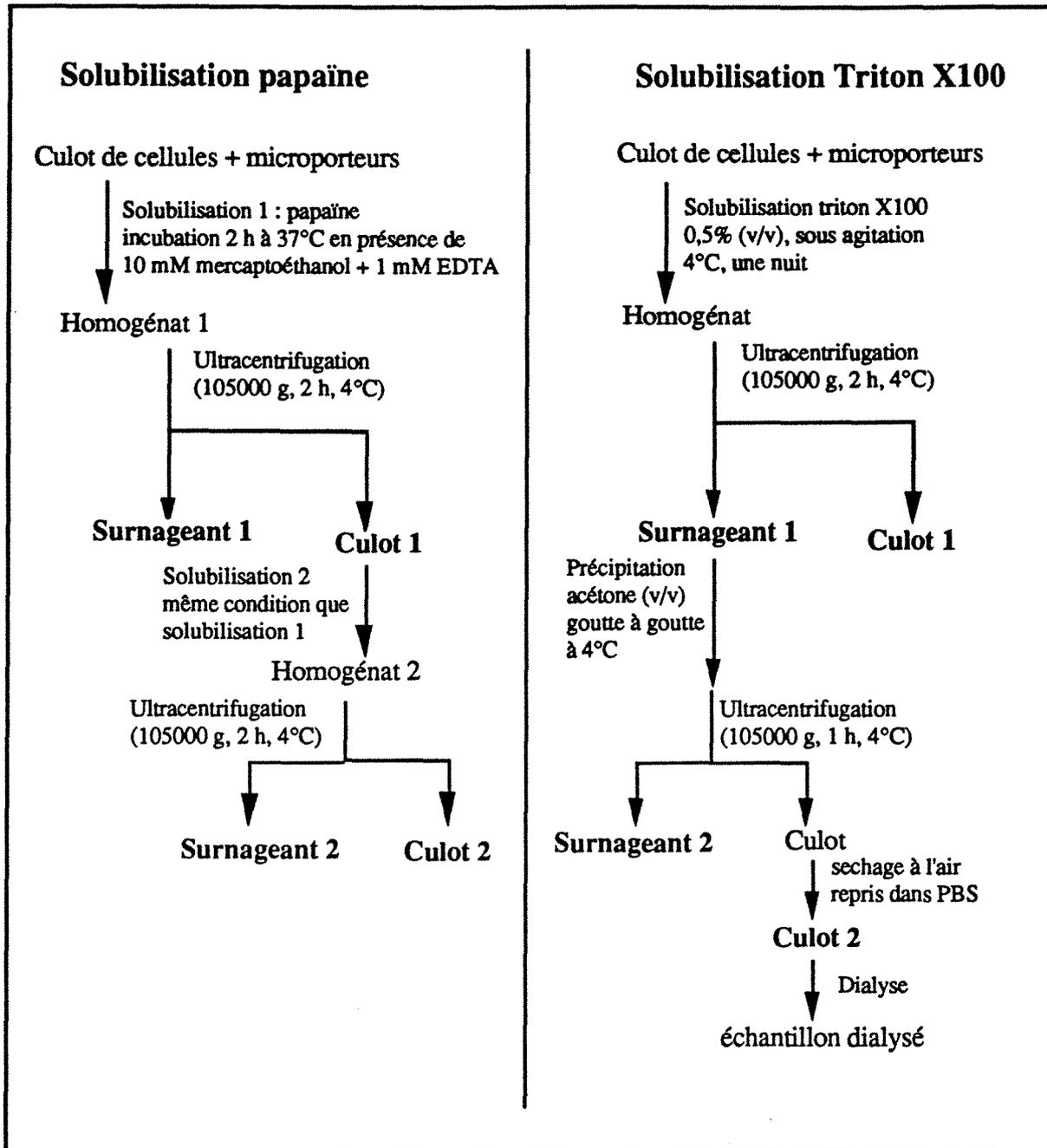


Figure III.14: protocoles de solubilisation par détergent (triton X100) ou par enzymes protéolytiques (papaine)

### III.4.3.2. Solubilisation par le triton X-100

Le protocole utilisé, décrit sur le schéma III.14, est tiré des travaux de purification de la GGT de foie de rat (VISVIKIS, 1989). Les résultats obtenus au niveau de chaque étape sont consignés dans le tableau suivant (tableau III.G).

Fractions	GGT (mU / ml)	Protéines (mg / ml)	volume (ml)	GGT totale (mU)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (mU / mg)	% activité GGT
homogénat 1	485	0,87	16	7760	14	557	100 %
Culot 1	209	0,77	9,2	1923	7,1	271	25 %
surageant 1	404	0,55	10,8	4363	6	735	56 %
Culot 2	467	0,52	4,5	2102	2,3	900	27 %
surageant 2	16	-	14,6	234	-	-	3 %
Dialyse	435	-	4	1740	-	-	22,5 %

Tableau III.G: ces résultats ont été obtenus à partir du protocole décrit sur la figure III.14; le dosage protéique a été réalisé par la méthode de Lowry; le dosage de GGT a été effectué par la technique au point final.

Ces résultats montrent que 56% de l'activité enzymatique est récupérée dans le premier surageant après traitement par le triton X100 ; après précipitation à l'acétone de celui-ci, il n'est retrouvé qu'environ la moitié de l'activité enzymatique; la dialyse ne fait perdre que quelques pourcents de cette activité. L'ensemble de ces étapes a donc fait perdre plus de 75% de l'activité enzymatique initiale. Un deuxième traitement du premier culot (qui conserve 25% de l'activité enzymatique) serait envisageable et pourrait permettre éventuellement de récupérer une partie de cette activité.

La solubilisation de la GGT par ce détergent ne sera pas retenue et l'extraction de la GGT sera effectuée par action de la papaine à raison de 0,3 mg / mg de protéines.

#### 11.4.4. Conclusion.

La production en masse et la purification de protéines recombinantes excrétées dans le milieu de culture ont largement été étudiées dans la littérature; mais la production d'enzyme membranaire a été peu abordée. Les travaux réalisés dans cette partie montrent les difficultés liées à la présence des microporteurs pour la récupération des cellules.

Ainsi, l'ensemble de ces essais montrent que la récupération d'une enzyme membranaire exprimée par des cellules en culture sur microporteurs n'est pas aisée. La filtration ou la sonication des cellules sur microporteurs entraînent une perte d'au moins 50% de l'activité enzymatique initiale et ne paraît pas indiquée pour l'élimination des microporteurs. L'extraction de la GGT à partir des cellules sur microporteurs a donc été envisagée. Un double traitement à la papaine à raison de 0,3 mg / mg de protéine permet l'extraction de près de 60% de l'activité GGT et semble le traitement testé le plus adéquat pour l'extraction de GGT à partir de cellules sur microporteurs.



### 111.5. CONCLUSION DU CHAPITRE 111.

L'objectif de ce dernier chapitre était l'optimisation de la production en masse de GGT. Deux approches différentes ont été réalisées: **la première approche consistait à améliorer le taux d'expression de la GGT.** Pour cela, une induction par le butyrate de sodium a été testée et a apporté une augmentation de la production d'un facteur avoisinant 2; cette induction réalisée pendant 24 h n'entraînant pas un décès cellulaire trop important. La protéine recombinante obtenue après cette induction a été analysée et a montré les mêmes caractéristiques catalytiques que celles de l'enzyme non induite. Une prépurification de l'enzyme recombinante a été par ailleurs réalisée et le point isoélectrique moyen de la GGT recombinante a pu être estimé ainsi que les masses moléculaires des deux sous-unités.

**La deuxième approche visait l'optimisation de la mise en œuvre de la culture en masse en vue de la récupération de l'enzyme membranaire.** La culture des cellules CHO-GGT a été envisagée sur microporteurs en mode semi-continu avec un taux de dilution constant. Une concentration cellulaire de  $1,5 \cdot 10^6$  cellules / ml a été obtenue en 75 heures; cette concentration a été maintenue pendant environ 75 heures, tandis que l'activité GGT augmentait jusqu'à une valeur proche de 300 U /l. Une induction par le butyrate de sodium a permis d'améliorer la production de GGT d'un facteur 1,5 en 24 heures sans engendrer une diminution de la concentration de cellules vivantes. Les cellules ont alors été récupérées avec les microporteurs. Cette expérience aura permis la production totale de 1300 U de GGT avec un nombre de cellules cumulées proche de  $5 \cdot 10^9$  cellules en moins de 175 heures. Le suivi de la culture par analyse d'images montre que les microporteurs vides vont être colonisés progressivement au cours de la culture et que l'estimation de la concentration cellulaire par comptage est directement corrélée à l'aire occupée par les cellules à la surface des microporteurs.

Des essais de séparation de cellules des microporteurs n'ont pas donné de résultats satisfaisants et l'extraction de l'enzyme membranaire a été réalisée à partir des cellules adhérant aux microporteurs. Un traitement approprié à la papaïne permet de récupérer 60% de l'activité GGT initiale; **cette dernière approche montre ainsi, la faisabilité de l'extraction de l'enzyme membranaire à partir de cellules sur microporteurs.**



**CONCLUSION GENERALE  
PERSPECTIVES**



## **CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.**

L'objectif général de ce travail visait l'étude de la culture en réacteur de cellules animales transfectées, productrices d'une enzyme membranaire, afin de mettre en évidence l'influence, d'une part, de la manipulation génétique de la cellule (par comparaison avec la cellule sauvage) et, d'autre part, des conditions de fonctionnement du réacteur (modes d'écoulement: discontinu ou semi continu) ou du système mis en œuvre (culture sur microporteurs, en agrégats, ou en cellules individualisées) sur le comportement des cellules recombinantes lors de cultures en masse. Les critères d'évaluation de ces performances couvrant des aspects quantitatifs (croissance et décès cellulaires, production de l'enzyme membranaire, consommation des substrats) et qualitatifs (stabilité de la souche recombinante, qualité du produit obtenu, extraction du produit...). En dernier lieu, il s'agissait de tester des conditions permettant d'améliorer les performances de production .

Le système cellule-produit retenu pour cette étude était une cellule CHO (Chinese Hamster Ovary), apparaissant actuellement comme très prometteuse au niveau industriel, que nous avons recombinée pour la production de la  $\gamma$ -glutamyltransférase humaine. L'approche originale de cette étude était de considérer le procédé dans son ensemble, en intégrant la phase d'obtention des cellules recombinées, la phase de culture en masse en réacteur tout en abordant la phase d'extraction de l'enzyme membranaire. Cette approche pluridisciplinaire a permis de couvrir deux domaines qui sont souvent développés séparément mais qui sont pourtant étroitement liés pour la production à grande échelle de protéines recombinantes: le génie génétique et le génie des procédés biochimiques.

**Mise au point d'une cellule CHO recombinante pour exprimer une enzyme membranaire humaine.**

La première partie de ce travail a consisté à mettre au point l'ensemble des techniques nécessaires à l'obtention de la souche animale CHO recombinante exprimant la GGT humaine. La technique de transfection choisie a été l'électroporation; cette dernière paraissant attrayante d'un point de vue simplicité, reproductibilité et taux de transfection élevé. Des expériences préliminaires ont été menées afin de posséder une meilleure compréhension des phénomènes de perméabilité des cellules, lors du processus d'électroporation. L'objectif de ces études était d'abord d'identifier les conditions d'électroporation susceptibles de garantir en même temps une bonne capacité proliférative des cellules et une perméabilité suffisante pour l'introduction d'un ADN hétérologue. Un protocole simple, alliant l'utilisation d'un colorant et l'évaluation de la

viabilité après 48 h de culture a permis de répondre à cet objectif. La comparaison entre l'électroporation et la technique utilisant le phosphate de calcium a démontré l'efficacité de l'électroporation avec des taux de transfection, après optimisation, d'environ  $2.10^{-3}$ .

Deux vecteurs d'expression eucaryotique ont alors été cotransfectés par électroporation dans des cellules CHO; le premier des deux vecteurs (PMAM $neo$ ) possède un gène de résistance  $neo$  et a servi à la sélection des cellules CHO recombinantes; le cDNA HepG2 codant pour la  $\gamma$  glutamyltransférase de l'hépatome humain a été cloné dans un deuxième vecteur d'expression (pCDNAI) derrière le promoteur du cytomégalo virus. Après cotransfection dans les cellules sauvages CHO-K1 et sélection adéquate, le clone le plus producteur a été sélectionné (la cellule a été appelée CHO-GGT); la stabilité de la production a alors été vérifiée pendant plus de 15 passages et la GGT recombinante a été analysée et comparée à d'autres GGT d'origine différente. L'enzyme recombinante est apparue sous la forme de deux sous unités (65 à 70 kDa et 25 à 30 kDa) et les constantes d'affinité de l'enzyme pour les substrats donneurs ( $\gamma$  GluCNA) et accepteurs (Glygly) sont proches de celles de la GGT de foie humain. L'ensemble de ces résultats montre l'obtention d'une enzyme active à partir de cellules CHO recombinantes; le taux d'expression est très performant avec une activité spécifique de plus de 2 U / mg de protéines.

La production en masse de ces cellules a alors été envisagée et a permis de répondre, au moins partiellement aux questions suivantes:

**Quelle peut être l'influence de la modification génétique de la cellule sur son comportement métabolique de base, lors de cultures en réacteurs?**

Plusieurs clones producteurs de GGT ont été obtenus dont certains présentaient une morphologie différente et un temps de génération plus long que celui des cellules sauvages. Le clone 21 le plus producteur, sélectionné, montrait une morphologie et un temps de génération en flacons statiques, similaires à la cellule sauvage. Une étude en réacteur discontinu des cellules sauvages CHO-K1 sur microporteurs a permis d'établir les cinétiques de croissance, de production de métabolites et de consommation de substrats (glucose, glutamine et acides aminés), ainsi que les rendements métaboliques de cette souche. La culture de la cellule recombinée, dans les mêmes conditions, n'a pas montré de différences significatives dans le comportement des cellules en réacteur, ni dans leur métabolisme de croissance.

La production de GGT apparaît comme dépendante de la cinétique cellulaire avec une concentration maximale de 240 mU / ml pour une culture en mode discontinu sur microporteurs avec une densité cellulaire voisine de  $9.10^5$  cellules / ml, obtenue en 50 h de culture. Au delà de 60 h de culture, on observe une limitation en glucose et en glutamine responsables de la phase de décès cellulaire. Lors de cette dernière phase, les cellules se décrochent des microporteurs mais la GGT n'est pas relarguée dans le milieu et n'est donc plus récupérable. L'ensemble de ces résultats montre que la transfection du cDNA de la GGT dans les cellules CHO a permis l'obtention d'une lignée CHO recombinante stable, productrice de GGT, ayant les mêmes caractéristiques de métabolisme de base en réacteur discontinu que les cellules sauvages.

### **Quelles sont les influences des conditions de culture en masse sur le comportement des cellules recombinantes et de leur production de GGT?**

En premier lieu, trois systèmes différents ont été mis en œuvre et comparés: il s'agit de la culture sur microporteurs, de la culture en agrégats et de l'adaptation à la culture en suspension. La suppression des microporteurs a été envisagée pour diminuer les coûts de culture et pour faciliter la récupération des cellules en vue de l'extraction de cette enzyme membranaire. Les premiers résultats, à petite échelle en flacons agités, ont montré la faisabilité de la croissance de ces cellules dans ces trois systèmes de culture mais avec des vitesses spécifiques de croissance inférieures de moitié environ pour les cellules cultivées en agrégats ( $\mu_{(max)glob} = 0,02 \text{ h}^{-1}$ ) ou en cellules individualisées par rapport à la culture sur microporteurs ( $\mu_{(max)app} = 0,04 \text{ h}^{-1}$ ).

Une étude sur l'estimation des cellules mortes dans les agrégats à partir du dosage de la LDH dans le milieu de culture a montré une faible mortalité des cellules dans les agrégats et présument donc d'une diminution du temps de génération des cellules agrégées. Le fait le plus marquant est la perte du taux d'expression de GGT par cellule d'un facteur 7 pour les cellules agrégées ou adaptées à la culture en suspension; la présence d'un support adéquat pour ces cellules support-dépendantes semble indispensable pour l'expression de cette enzyme membranaire; ce problème est probablement lié à des mécanismes d'adhérences cellulaires complexes. Les propriétés catalytiques de l'enzyme membranaire obtenue suivant les différents systèmes de culture sont cependant très voisines et confirment la faisabilité de la production de GGT par culture de cellules agrégées ou adaptées à la suspension: le seul facteur limitant reste donc la faible production de cette enzyme dans ces systèmes en absence de support.

Des cultures en réacteurs discontinus des cellules, soit sur microporteurs, soit en agrégats ont confirmé les résultats obtenus en flacons agités et ont montré par ailleurs, une différence de métabolisme entre les cellules cultivées dans ces deux systèmes, notamment le

rendement de conversion glutamine-ions ammonium qui est supérieur pour les cellules agrégées. Les mêmes résultats ont été obtenus pour une culture en mode semi-continu de cellules agrégées et n'a pas permis d'améliorer les performances de production de la GGT. Ce mode de culture semble, cependant prometteur car il permet de maintenir une densité cellulaire maximale pendant plus de 75 h et faciliterait l'arrêt de la culture pour récupérer l'enzyme d'intérêt. Malgré les avantages que représenteraient la culture de cellules CHO en absence de support, les faibles productivités en GGT ont contraint l'utilisation de microporteurs dans l'optique d'une production en masse de GGT.

### **Comment peut-on améliorer les performances de production de GGT par les cellules CHO sur microporteurs, cultivées en réacteur semi-continu?**

L'ajout d'un agent chimique tel que le butyrate de sodium permet d'augmenter la production de GGT sans modifier les constantes d'affinité de l'enzyme pour le substrat donneur (GluCNA) et accepteur (glygly); la conservation des propriétés structurales a également été vérifiée: les deux sous unités ont été mises en évidence par "Western Blot" avec une intensification des bandes, indiquant donc une quantité de GGT plus importante par mg de protéine. Un pulse de butyrate de sodium pendant 24 h durant la phase de croissance permet quel que soit le système de culture (en flacons statiques, en flacons agités sur microporteurs ou en flacons agités en agrégats) de pratiquement doubler le contenu de GGT par cellule.

Un réacteur de 4 l fonctionnant en mode semi continu, alimenté de manière à maintenir un taux de dilution de  $0,01 \text{ h}^{-1}$ , a été mis en œuvre avec des cellules CHO-GGT sur microporteurs afin de récupérer, au moment adéquat, les cellules en vue de l'extraction de l'enzyme recombinante. Un pulse de butyrate de sodium a été réalisé pendant la phase de croissance, la culture ayant été stoppée 24 h après cette stimulation; des essais d'extraction de l'enzyme membranaire ont alors été réalisés: la séparation des cellules des microporteurs entraînent une perte considérable de l'activité enzymatique et la solubilisation de la GGT la plus efficace a été obtenue par deux traitements successifs à la papaïne; ces étapes n'ont permis d'extraire que 60% de l'activité enzymatique et plusieurs étapes de purification seraient encore à réaliser pour obtenir un matériel de référence purifié. L'ensemble de ces expériences montrent que le procédé mis en œuvre doit également tenir compte des difficultés potentielles de la purification de protéines membranaires.

**Quelles sont les perspectives pour acquérir de meilleures connaissances de base?**

L'ensemble de ce travail laisse en suspens un certain nombre de questions qui nécessiteraient des études complémentaires approfondies afin de mieux comprendre des mécanismes cellulaires complexes. Cependant, l'ensemble de ces résultats, obtenus dans une première approche, de façon intégrée, pourrait être approfondi par des études plus focalisées visant à confirmer ou à approfondir, soit des connaissances de base, soit d'amélioration de la performance du système de production.

En premier lieu, il conviendrait d'identifier les facteurs qui déterminent l'expression du gène recombinant dans la cellule CHO; il serait intéressant, par exemple de déterminer la localisation de l'intégration du cDNA-hepG2 dans le génôme hôte puisque cette intégration s'est faite de telle façon que le métabolisme de base de la cellule n'a pas été modifié et que la cellule exprime la GGT avec une activité spécifique importante de 2 U / mg de protéines.

D'autre part, la culture de cellules support-dépendantes en absence de support paraissait prometteuse mais la faible production de GGT par les cellules agrégées pose des interrogations quant aux mécanismes d'adhérence et leur rôle au niveau du métabolisme cellulaire. Ainsi, il serait intéressant de pouvoir expliquer la modification du rendement de conversion glutamine-ions ammonium observée lors de cultures de cellules agrégées. Des expériences complémentaires pourraient également vérifier la sensibilité particulière aux toxiques (lactate, ions ammonium) des cellules agrégées par rapport aux cellules cultivées en présence d'un support adéquat.

Finalement, des cultures en agrégats en mode perfusé avec soutirage séquentiel des cellules, devraient permettre une meilleure compréhension des relations entre croissance et contenu membranaire en GGT en vue d'améliorer les rendements de production.

La purification de la GGT permettrait de réaliser des études sur la glycosylation de cette protéine par les cellules CHO et de comparer les chaînes glycosidiques de la GGT issue des cellules CHO recombinantes à celles de GGT issues d'autres cellules recombinantes telles que V79.

## **Quelles sont les perspectives pour l'amélioration de la production en masse de GGT humaine?**

Il est bien sûr difficile d'évaluer les quantités de GGT nécessaires à l'échelle mondiale: en effet les multiples rôles de la GGT n'ont pas été encore tous élucidés et suivant l'usage envisagé, les quantités d'enzyme purifiée nécessaires varient. L'utilisation de GGT recombinante comme matériel de référence ne nécessiterait pas des quantités importantes de matériel purifié. Par contre, des études biochimiques notamment sur la glycosylation demanderaient des quantités de l'ordre du mg de protéine. L'ensemble des résultats réalisés dans ce travail a permis de montrer les implications de la culture en réacteur et les limites d'un procédé pour la production en masse d'une enzyme membranaire. Dans ce cas particulier, une comparaison peut être faite entre les différents procédés de culture au point de vue de la production de GGT, du volume de milieu nécessaire et des difficultés d'extraction (tableau XIII)

Ce tableau permet de visualiser les avantages et les inconvénients de chaque procédé testé et montre que quelles que soient les conditions de culture (à part la culture en agrégats), la quantité de GGT obtenue par volume de milieu est similaire; cette quantité pouvant être augmentée par ajout de butyrate de sodium.

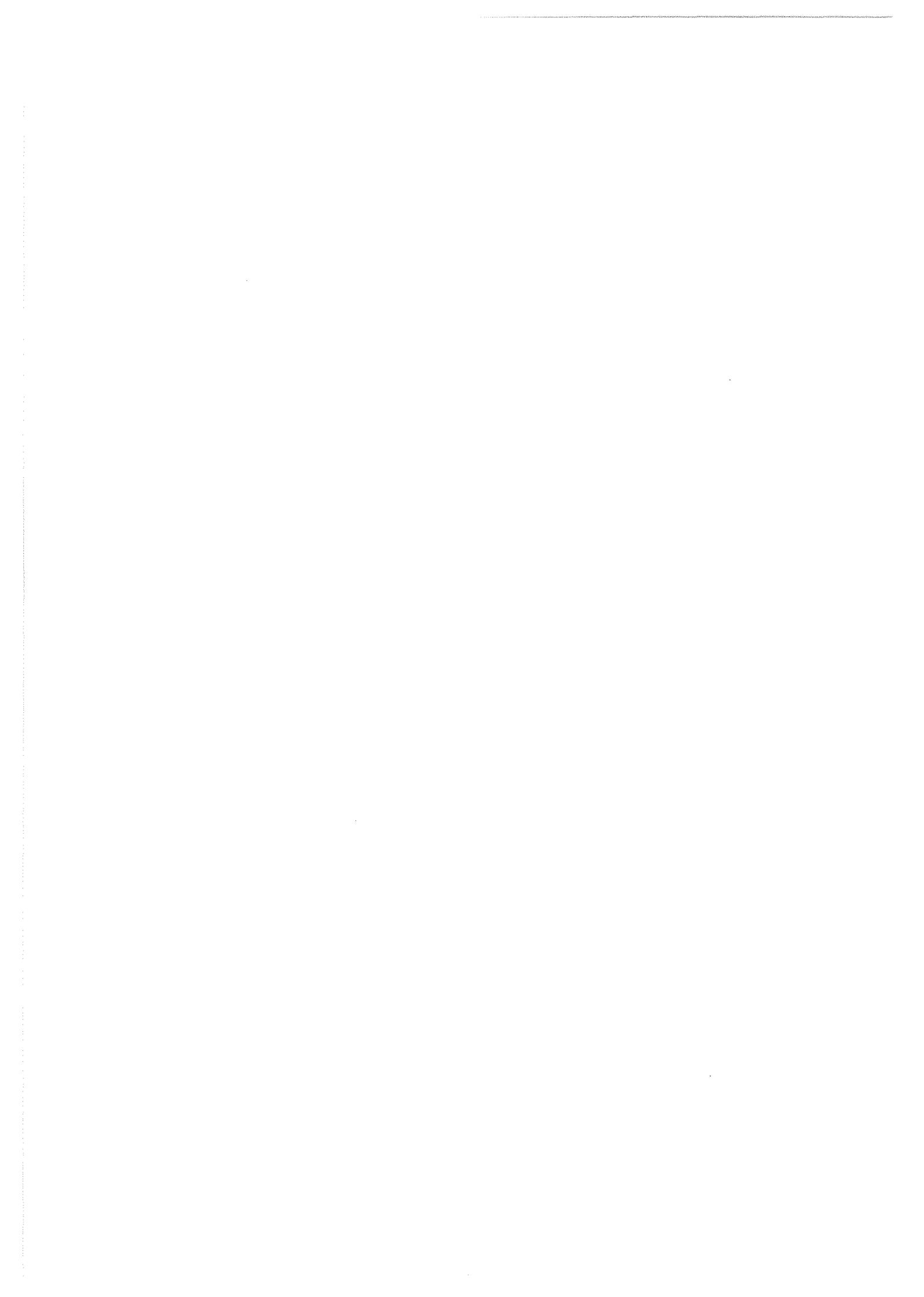
Un lot d'un matériel de référence comme la GGT est constitué de 2000 ampoules de 1 ml avec une concentration de 200 mU / ml de GGT purifié, soit 400 unités. Si on estime que le rendement final en activité après purification dans le meilleur des cas est de 10%, la quantité initiale de GGT doit être de 4000 U. Cette estimation correspondrait donc par exemple à 80 bouteilles roulantes avec induction par le butyrate de sodium (8 litres de milieu de culture) ou 65 bioréacteurs discontinus avec des cellules agrégées (65 l de milieu de culture): dans les deux cas, la récupération des cellules est directe soit par grattage des cellules, soit par centrifugation. L'utilisation d'un procédé avec des cellules sur microporteurs pourrait entraîner une perte de rendement de purification liée à la présence des microporteurs; si on estime que le rendement final en purification sera alors de 5%, 8000 U initiales seront nécessaires: ce qui correspond à environ 6 réacteurs semi continu avec induction par le butyrate de sodium (24 litres de milieu de culture).

L'ensemble de ces considérations montrent qu'il n'est pas aisé de trancher en faveur d'un procédé particulier: les bouteilles roulantes semblent être celui qui est le plus facile à mettre en œuvre et permet une récupération simple des cellules mais ce système n'est pas facilement réalisable pour l'obtention de protéine membranaire à très grande échelle: en effet, il requiert

une main d'œuvre importante pour la récupération des cellules (grattage des bouteilles roulantes). Par contre, la culture en réacteur sur microporteurs peut être extrapolée à grande échelle mais complique l'extraction de l'enzyme membranaire. Le bon compromis entre une bonne productivité, un faible coût de production, la simplicité de mise en œuvre et d'extraction en vue de la purification de la molécule, doit être appréhender en fonction de la protéine recombinante choisie

	cellules cummulées	GGT cumulée (U)	milieu (l)	récupération des cellules
10 bouteilles roulantes	$1.10^9$	250 500 (butyrate de sodium)	1	++
réacteur discontinu sur microporteurs	$1,3.10^9$	300	1	+
réacteur discontinu avec agrégats	$9.10^8$	30	1	++
réacteur semi-continu sur microporteurs	$4,5.10^9$	900 1300 (butyrate de sodium)	3	+

Tableau XIII: comparaison des quantités de cellules et de GGT et de milieu, obtenues suivant le procédé mis en œuvre  
+ souligne la simplicité de récupération des cellules



**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- ABRAHAM, I.; SIVASWAMI, J. ET GOTTESMAN, M. (1982)  
*Transfer of genes to Chinese Hamster Ovary cells by DNA-mediated transformation*  
 SOMAT. CELL GENET. 8, 23-39.
- ANDERSON, M.E.; ALLISON, R.D ET MEISTER, A. (1982)  
*Interconversion of leukotrienes catalyzed by purified  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase: concomitant formation of leukotriene D4 and  $\gamma$ -glutamyl amino acids.*  
 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 79, 1088-1091.
- ANDREASON, G.L. ET EVANS, G.A. (1988)  
*Introduction and expression of DNA molecules in eucaryotic cells by electroporation.*  
 BIOTECHNIQUES 6, 650-660.
- ANGELE, C.; OSTER, T.; VISVIKIS, A.; MICHELS, J.-M.; WELLMAN, M. ET SIEST, G. (1991)  
*Different constructs for the expression of mammalian  $\gamma$ -glutamyltransferase cDNAs in Escherichia coli and in Saccharomyces cerevisiae.*  
 CLIN. CHEM. 37, 662-666.
- AVGERINOS, GC.; DRAPEAU, D.; SOCOLOW, J.; MAO, J.; HSIAO, K; ET BROEZE, R.J. (1990)  
*Spin filter perfusion system for high density cell culture: production of recombinant urinary type plasminogen activator in CHO cells.*  
 BIO/TECHNOLOGY 8, 54-58.
- BACCHETTI, S. ET GRAHAM, F.L. (1977)  
*Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA.*  
 PROC. NATL. ACAD. SCI. 74, 1590-1598.
- BARBET, J.; MACHY, P; LESERMAN, LD. (1981)  
*Monoclonal antibody covalently coupled to liposomes: specific targeting to cells.*  
 J. SUPRAMOLEC. STRUCT. CELL. BIOCHEM 16 243-258
- BARNES, D. ET SATO, G.H. (1980)  
*Methods for growth of cultured cells in serum-free medium.*  
 ANAL. BIOCHEM. 102, 255-270.
- BAROUKI, R.; CHOBERT, M.-N.; FINIDORI, J.; AGGERBECK, M.; NALPAS, B. ET HANOUNE, J. (1983)  
*Ethanol effects in a rat hepatoma cell line: induction of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase.*  
 HEPATOLOGY 3, 323-329.
- BARSOUM, J. (1990)  
*Introduction of stable high-copy-number DNA into Chinese hamster ovary cells by electroporation.*  
 DNA AND CELL BIOL. 9, 293-300.
- BIRNBOIM, H.C. ET DOLY, J. (1979)  
*A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.*  
 NUCLEIC ACIDS RES. 7, 1513-1518.

BLUML, G.; REITER, M. ZACH, N.; GAIDA, T.; SCHMATZ, C.; STRUTZENBERGE, K.; MOHR, T.; RAUSCHERT, B. ET KATINGER, H. (1992)

*Development of a new type of macroporous carrier.*

IN: ANIMAL CELL TECHNOLOGY: DEVELOPMENTS, PROCESSES AND PRODUCTS (SPIER, R.E.; GRIFFITHS, J.B., MACDONALD, C., EDS), BUTTERWORTH-HEINEMANN, 501-504

BOFFA, L.C.; GRUSS, R.J. ET ALLFREY, V.G. (1981)

*Manifold effects of sodium butyrate on nuclear function.*

J. BIOL. CHEM. 256 9612-9621.

BORASTON, R.; MARSHALL, C.; NORMAN, P.; RENNER, G. ET WARNER, J. (1992)

*Elimination of cell aggregation in suspension cultures of Chinese hamster ovary (CHO) cells.*

IN: ANIMAL CELL TECHNOLOGY: DEVELOPMENTS, PROCESSES AND PRODUCTS (SPIER, R.E.; GRIFFITHS, J.B., MACDONALD, C., EDS), BUTTERWORTH-HEINEMANN, 424-426.

BOSHART, M; WEBER, F; JAHN, G; DORSCH-HÄSLER, K; FLECKENSTEIN, B ET SCHAFFNER, W (1985)

*A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus*

CELL 41 521-530

BOUR, J.M.; MAUGRAS, M.; CAPIAUMONT, J.; DOUSSET, B.; STRACZEK, J.; GELOT, M.A. ET NABET, P. (1988).

*Marqueurs biochimiques de la prolifération et de la mort des hybridomes en culture.*

BIO-SCIENCES 7, 35-40.

BOYTON, J. E.; GILLHAM, N. W.; HARRIS, E. H.; HOSLER, J. P.; JOHNSON, A. M.; JONES, A. R.; RANDOLPH-ANDERSON, B. L.; ROBERTSON, D.; KLEIN, T. M.; SHARK, K. B. ET SANFORD, J. C. (1988)

*Chloroplast transformation in Chlamydomonas with high velocity microprojectiles.*

SCIENCE 240 1534-1538.

BRADFORD, M. (1976)

*A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.*

ANAL. BIOCHEM. 72, 248-254.

BURNETTE, W.N. (1981)

*Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.*

ANAL. BIOCHEM 112, 195-203.

BUSBY, S.; KUMAR, A.; JOSEPH, M.; HALFPAP, L.; INSLEY, M.; BERKNER, K.; KURACHI, K. ET WOODBURY, R. (1985)

*Expression of active human factor IX in transfected cells.*

NATURE 316, 271-273.

BUTLER, M.; IMAMURA, T.; THOMAS, J. ET THILLY, W.G. (1983)

*High yields from microcarriers cultures by medium perfusion.*

J. CELL SCI. 61, 351-363.

BUTLER, M.(1985)

*Growth limitation in high cell density microcarrier cultures*

IN: DEVELOP. BIOL. STANDARD., (KARGER, S., BASEL) vol 60, 269-280.

BUTLER, M. (1987a)

*A comparative review of microcarriers available for the growth of anchorage-dependent animal cells.*

IN: ANIMAL CELL BIOTECHNOLOGY , vol 3, (SPIER, R.E. ET GRIFFITHS, J.B., EDS), ACADEMIC PRESS, NEW YORK, 284-303

BUTLER, M.(1987b)

*Growth limitations in microcarriers cultures.*

IN: ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING / BIOTECHNOLOGY, vol 34 (FIECHTER, EDS), 58-82

CAHN, F. (1990)

*Biomaterials aspects of porous microcarriers for animal cell culture*

TIBTECH 8, 131-136.

CANAANI, D. ET BERG, P. (1982)

*Regulated expression of human interferon  $\beta_1$  gene after transduction into cultured mouse and rabbit cells*

PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 79, 5166-5170.

CAPECCHI, M. R. (1980)

*High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells.*

CELL 22 479-488.

CAPRARO, M.A. ET HUGHEY, R.P. (1983)

*Processing of the propeptide form of rat renal  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase.*

FEBS LETT. 157, 139-143.

CHAO, M.V.; BOTHWELL, M.A.; ROSS, A. H.; KOPROWSKI, H.; LANAHAN, A.A.; BUCK, C.R. ET SEHGAL, A. (1986)

*Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor.*

SCIENCE 232, 518-521.

CHASSY, B.M.; MERCENIER, A. ET FLICKINGER, J. (1988)

*Transformation of bacteria by electroporation.*

TIBTECH, 6, 303-309

CHEN, E.; HOWLEY, P.; LEVENSON, A. ET SEEBURG, P. (1982)

*The primary structure and genetic organisation of the bovine papilloma virus type 1 genome.*

NATURE 299 529-534

CHEN, C. ET OKAYAMA, H. (1987)

*High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA.*

MOL. CELL. BIOL. 7 2745-2752.

- CHU, G.; HAYAKAMA, H. ET BERG, P. (1987)  
*Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA*  
 NUCLEIC ACIDS RES. 15, 1311-1326.
- COCKETT, M.I.; BEBBINGTON, C.R. ET YARRANTON, G.T. (1990).  
*High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase gene amplification.*  
 BIO / TECHNOLOGY 8, 662-667.
- COLBERE-GARAPIN, F.S.; CHOUSTERMANN, F. HORODNICEANU, P.; KOURILSKY, P. ET GARAPIN, A.-C. (1979)  
*Cloning of the active thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1 in Escherichia coli K-12.*  
 PROC. NATL. ACAD. SCI. 76, 3755-3772
- COLBERE-GARAPIN, F.; HORODNICEANU, F.; KOURILSKY, P. ET GARAPIN, A.-C. (1981)  
*A new dominant hybrid selective marker for higher eucaryotic cells.*  
 J. MOL. BIOL. 150, 1-14.
- CORDEN, J; WASYLYK, B; BUCHWALDER, A; SASSONE-CORCI, P; KEDINGER, C; ET CHAMBON, P (1980)  
*Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes.*  
 SCIENCE 209 1406-1414
- CURLING, E.M.A.; HAYTER, .M.; BAINES, A.J.; BULL, A.T.; GULL, K.; STRANGE, P.G.; ET JENKINS N. (1990)  
*Recombinant human interferon- $\gamma$ : differences in glycosylation and proteolytic processing lead to heterogeneity in batch culture.*  
 E. CHEM. J. 272 333-337
- CURTHOYS, N.P. ET HUGHEY, R.P. (1979)  
*Characterization and physiological function of rat renal  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase.*  
 ENZYME 24, 383-403.
- DAMERVAL, T. ET SCHOEN, A. (1992)  
*La bioéthique dans l'hémicycle.*  
 BIOFUTUR. MAI 1992
- DANIELL, H.; VIVEKANANDA, J.; NIELSEN, B.L.; YE, G.N.; TEWARI, K.K. ET SANFORD, J.C. (1990)  
*Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplasts vectors*  
 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 87. 88-92
- DOBET, B. (1990)  
*Production de protéines recombinantes: quel système choisir.*  
 BIOFUTUR. JUIN 1990.

DODGE, T.C.; JI, G.Y. ET HU, W-S.(1987)

*Loss of viability in hybridoma cell culture. A kinetic study.*  
ENZ. MICROB. TECHNOL. 9, 607-611.

DOETSCHMN, T.; GREGG, R.G.; MAEDA, N.; HOOPER, M.L.; MELTON, D.W.; THOMPSON, S. ET SMITHIES, O. (1987)

*Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells.*  
NATURE, 330, 576-578.

DORNER, A.J.; WASLEY, L.C. ET KAUFMAN, R.J (1989)

*Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-related proteins in butyrate-treated Chinese hamster ovary cells.*  
J. BIOL. CHEM. 264, 20602-20607.

DUBE, S. FISHER, J.W. ET POWELL, J.S. (1988)

*Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion and biological function.*  
J. BIOL. CHEM. 263, 17516-17521.

EAGLE, H. (1973)

*The effect of environmental pH on the growth of normal and malignant cells.*  
J. CELL. PHYSIOL. 82, 1-8.

FAURE, T.; PAVIRANI, A.; MEULIEN, P.; DE LA SALLE, H.; MIGNOT, G.; VAN DE POL, H.; COURTNEY, M. ET LECOCQ, J.P. (1989)

*Stable expression of coagulation factors VIII and FIX in recombinant Chinese hamster ovary cells.*  
IN: ADVANCES IN ANIMAL CELL BIOLOGY AND TECHNOLOGY FOR BIOPROCESSES (SPIER, R.E.; GRIFFITHS, J.B.; STEPHENNE, J. ET CROOY, P.J.) BUTTERWORTH, 481-487.

FELGNER, P.L.; GADEK, T.R.; HOLM, M.; ROMAN, R. CHAN, H.W.; WENZ, M.; NORTHROP, J.P.; RINGOLD, G.M. ET DANIELSEN, M. (1987)

*Lipofection: a high efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.*  
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 84, 7413-7417.

FIELD, R.; COCKETT, M. ET FROUD, S.J. (1989)

*Glutamine synthetase amplification of TIMP expression in CHO cells.*  
IN: ADVANCES IN ANIMAL CELL BIOLOGY AND TECHNOLOGY FOR BIOPROCESSES (SPIER, R.E.; GRIFFITHS, J.B.; STEPHENNE, J. ET CROOY, P.J.) BUTTERWORTH, 195-197.

FISCHER, A. (1991)

*Quatre familles de molécules responsables de l'adhérence intercellulaire.*  
M./S. 7, 540-542.

FRALEY, R.; SUBRAMINI, S.; BERG, S. ET PAPAHAADJOPOULOS, D. (1980)

*Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells*  
J. BIOL. CHEM. 255 10431-10435.

FRIEDMAN, J.S.; COFER, G.L.; ANDERSON, C.L.; KUSHNER, J.A.; GRAY, P.P.; CHAPMAN, G.E.; STUART, M.G.; LAZARUS, L.; SHNE, J. ET KUSHNER, P.J. (1989)

*High expression in mammalian cells without amplification.*  
BIO / TECHNOLOGY 7, 359-362.

- FROMM, M.; TAYLOR, L.P. ET WALBOT, V. (1985)  
*Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation.*  
 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 82, 5824-5828
- FROMM, M.E.; TAYLOR, L.P. ET WALBOT, V. (1986)  
*Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation.*  
 NATURE, 319, 791-793.
- GANNE, V.; GUERIN, P.; FAURE, T. ET MIGNOT, G. (1990)  
*Increased expression of factor VIII by butyrate in chinese hamster ovary cells.*  
 IN: PRODUCTION OF BIOLOGICALS FROM ANIMAL CELLS IN CULTURE (SPIER, R.E.,  
 GRIFFITHS, J.B. ET MEIGNIER, B. EDS), BUTTERWORTH HEINEMANN, 104-106
- GARDNER, A.R.; GAINER, J.L. ET KIRWAN, D.J. 1990)  
*Effects of stirring and sparging on cultured hybridoma cells.*  
 BIOTECHNOL. BIOENG. 35, 940-947.
- GASSER F.; MULSANT, P.; ET GILLOIS, M. (1985)  
*Long-term multiplication of the chinese hamster ovary (CHO) cell line in a serum-free  
 medium*  
 IN VITRO 21 588-592
- GEAUGEY, V.; PASCAL, F.; ENGASSER, J.M. ET MARC, A. (1990)  
*Influence of the culture oxygenation on the release of LDH by hybridoma cells.*  
 BIOTECHNOL. TECH. 4, 257-262.
- GERVAISE, C. (1989)  
*Cultures d'hybridomes et de cellules Vero productrices d'hGH: études cinétiques, mise  
 au point de réacteurs à membranes organique ou minérale.*  
 THESE DE DOCTORAT INPL.
- GETHING, M. J. ET SAMBROOK, J. (1981)  
*Cell-surface expression of influenza haemagglutinin from a clone DNA copy of the RNA  
 gene*  
 NATURE 293 620
- GLACKEN, M.W.; HUANG, C. ET SINSKEY, A.J. (1989)  
*Mathematical description of hybridoma culture kinetics.III: simulation of fed batch  
 bioreactors.*  
 J. BIOTECHNOL. 10, 39-46.
- GLASSY, M.C.; THARAKAN, J.P. ET CHAU, P.C. (1988)  
*Serum free media in hybridoma culture and MAb production.*  
 BIOTECHNOL. BIOENG. 32, 1015-1028.
- GLUZMAN, Y.(1981)  
*SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants.*  
 CELL 23 175
- GOBSON, G.N. ET VAPNEK, D. (1973)  
*A simple method of preparing large amounts of  $\phi\chi 174$  RF I supercoiled DNA.*  
 BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 299, 516-521.

- GOETGHEBEUR, S. ET HU, W.-S. (1991)  
*Cultivation of anchorage-dependent animal cells in microsphere-induced aggregate culture.*  
 APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL. 34, 735-741.
- GOOCHEE, C.F. ET PASSINI, C.A. (1988)  
*Intracellular proteins produced by mammalian cells in response to environmental stress.*  
 BIOTECHNOL. PROG. 4, 189-201.
- GOOCHEE, C.F. ET MONICA, T. (1990)  
*Environmental effects on protein glycosylation.*  
 BIO / TECHNOLOGY 8, 421-427.
- GOODSPEED, D.C.; DUNN, T.J.; MILLER, C.D. ET PITOT, H.C. (1989)  
*Human  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase cDNA: comparison of hepatoma and kidney mRNA in the human and rat.*  
 GENE 76, 1-9.
- GORMAN, C.M; MOFFAT, L. F. ET HOWARD, B.H. (1982)  
*Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl transferase in mammalian cells.*  
 MOL. CELL. BIOL. 2 1044-1051
- GORMAN, C; PADMANABHAN, R ET HOWARD, B. (1983a)  
*High efficiency DNA-mediated transformation of primate cells.*  
 SCIENCE 221 551-553
- GORMAN, C.M.; HOWARD, B.H. ET REEVES, R. (1983b)  
*Expression of recombinant plasmids in mammalian cells is enhanced by sodium butyrate.*  
 NUCLEIC ACIDS RES. 11, 7631-7648.
- GOTO, M.; AKAI, K.; MURAKAMI, A.; HASHIMOTO, C.; TSUDA, E.; UEDA, M.; KAWANISHI, G.; TAKAHASHI, N.; ISHIMOTO, A.; CHIBA, H. ET SASAKI, R. (1988)  
*Production of recombinant human erythropoietin in mammalian cells: host-cell dependency of the biological activity of the cloned glycoprotein.*  
 BIO / TECHNOLOGY 6, 67-71.
- GRAHAM, F. L. ET VAN DER ERB, A. J. (1973)  
*A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*  
 VIROLOGY 52 456.
- GRIFFITHS, J.B. (1992)  
*Animal cell culture processes- batch or continuous?*  
 J. BIOTECHNOL. 22, 21-30.
- GRINNELL, F.; HAYS, D.G. ET MINTER, D. (1977)  
*Cell adhesion and spreading factor.*  
 EXP. CELL. RES. 110, 175-190.
- GROS, F. (1990)  
 in: L'ingénierie du vivant (Editions Jacob)

- HAMA-INABA, H.; SHIOMI, T. SATO, K.; ITO, A. ET KASAI, M. (1986)  
*Electric pulse-mediated gene transfer in mammalian cells grown in suspension culture.*  
 CELL STRUCTURE AND FUNCTION 11, 191-198.
- HAMILTON, W.G. ET HAM, R.G. (1977)  
*Clonal growth of Chinese hamster cell lines in protein-free media.*  
 IN VITRO 13, 537-547.
- HANDA-CORRIGAN, A. (1991)  
*Bioreactors for mammalian cells.*  
 IN: MAMMALIAN CELL BIOTECHNOLOGY: A PRACTICAL APPROACH (BUTLER, M. EDS),  
 OXFORD UNIVERSITY PRESS, 139-158.
- HAYTER P.M.; CURLING, E.M.A.; BAINES, A.J.; JENKINS, N.; SALMON, I.;  
 STRANGE, P.G.; ET BULL, A.T. (1991)  
*Chinese hamster ovary cell growth and interferon production kinetics in stirred batch culture.*  
 APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL. 34 559-564
- HAYTER P.M.; CURLING, E.M.A.; BAINES, A.J.; JENKINS, N.; SALMON, I.;  
 STRANGE, P.G.; TONG, J.M. ET BULL, A.T. (1992)  
*Glucose-limited chemostat culture of Chinese hamster ovary cells producing recombinant human interferon- $\gamma$ .*  
 BIOTECHNOL. BIOENG. 39, 327-335.
- HEWLETT, G. (1991)  
*Strategies for optimising serum-free media.*  
 CYTOTECHNOLOGY 5, 3-14.
- HIRTENSTEIN, M.; CLARK, J. ET LINDGREN, G. (1980)  
*Microcarriers for animal cell culture: a brief review of theory and practice.*  
 DEVELOP. BIOL. STANDARD. 46, 109-116.
- HU, W.S.; MEIER, J. ET WANG, D.I.C. (1986)  
*Use of surface aerator to improve oxygen transfer in cell culture.*  
 BIOTECHNOL. BIOENG. 26, 122-125.
- HU, W.S ET WANG, D.I.C. (1986)  
*Mammalian cell culture technology: A review from the engineering perspective.*  
 IN: MAMMALIAN CELL TECHNOLOGY, (THILLY, W.G., ED), BUTTERWORTHS, 167-196.
- HUSEBY, N.E. (1977)  
*Purification and some properties of  $\gamma$ -glutamyltransferase from human liver.*  
 BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 483, 46-56.
- HUSEBY, N.E. (1981)  
*Separation and characterization of human  $\gamma$ -glutamyltransferases.*  
 CLIN. CHIM. ACTA 111, 39-45.

- IMAMURA, T.; CRESPI, C.L.; THILLY, G. ET BRUNENGRABER, H. (1982)  
*Fructose as a carbohydrate source yields stable pH and redox parameters in microcarrier cell culture.*  
ANALYTICAL BIOCHEM 124, 353-358.
- JAYME, D.W. (1991)  
*Nutrient optimization for high density biological production applications.*  
CYTOTECHNOLOGY 5, 15-30.
- JIMENEZ, A. ET DAVIES, J. (1980)  
*Expression of a transposable antibiotic resistance element in saccharomyces.*  
NATURE 287, 869-871.
- JOLLY, D.T.; OKAYAMA, H.; BERG, P.; ESTY, A.C.; FILPULA, D.; BOHLEN, P.; JOHNSON, G.G.; SHIVELY, J.E.; HUNKAPILLAR, T. ET FRIEDMANN, T. (1983)  
*Isolation and characterization of a full length expressible cDNA for human hypoxanthine phosphoribosyltransferase*  
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 80, 477-481.
- JOHNSTON, S.A. (1990)  
*Biolistic transformation: microbes to mice.*  
NATURE 346, 776-777
- JORDAN, M.; RENNER, W.; SUCKER, H.; LEIST, C. ET EPPENBERGER, H.M. (1992)  
*Tuning of shear sensitivity of CHO cells and its correlation with the size distribution of cell aggregates.*  
IN: ANIMAL CELL TECHNOLOGY: DEVELOPMENTS, PROCESSES AND PRODUCTS (SPIER, R.E.; GRIFFITHS, J.B., MACDONALD, C., EDS), BUTTERWORTH-HEINEMANN, 418-420.
- KAUFMAN, R.J.; WASLEY, L.C.; SPILIOTES, A.J.; GOSSELS S.D.; LATT, S.A.; LARSEN, G.R.; ET KAY R.M. (1985)  
*Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in Chinese hamster ovary cells.*  
MOL. CELL. BIOL. 5 1750-1759
- FAUFMAN, R.J.; WASLEY, L.C.; FURIE, B.C. ET SHOEMAKER, C.B. (1986)  
*Expression, purification, characterization of recombinant  $\gamma$ -carboxylated Factor IX synthesized in Chinese hamster ovary cells.*  
J. BIOL. CHEM. 261, 9622-9628.
- KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R. ET SANFORD, J. C. (1987)  
*High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells.*  
NATURE 327 70-73.
- KNUTSON, J.C. ET YEE, D. (1987)  
*Electroporation: parameters affecting transfer of DNA into mammalian cells.*  
ANAL. BIOCHEM. 164, 44-52.
- KRUH, J. (1982)  
*Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture.*  
MOL. CELL. BIOL. 42, 65-82.

- KUCHERLAPATI, R. ET SKOULTCHI, A.I., (1984)  
*Introduction of purified genes into mammalian cells.*  
 C.R.C. CRIT. REV. BIOCHEM. 16, 349-379.
- KURATA, S; TSUKAROSHI, M; KASUYA, T. ET IKAWA, Y. (1986)  
*The laser method for efficient introduction of foreign DNA into cultured cells.*  
 EXP. CELL RES 162 372-378.
- KURANO, N.; LEIST, C.; MESI, F. KURANO, S. ET FIECHTER, A. (1990a).  
*Growth behaviour of CHO in a compact loop bioreactor: 1- Effects of physical and chemical environment.*  
 J. BIOTECHNOL. 15, 101-112.
- KURANO, S.; KURANO, N.; LEIST, C. ET FIECHTER, A. (1990b)  
*Utilization and stability of vitamins in serum-containing and serum-free media in CHO cell culture.*  
 CYTOTECHNOLOGY 4, 243-250.
- LAEMMLI, U.K. (1970)  
*Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.*  
 NATURE 227, 680-685.
- LAMBERT, K.J. ET BIRCH, J.R. (1985)  
*Cell growth media.*  
 IN: ANIMAL CELL BIOTECHNOLOGY (SPIER, R.E. ET GRIFFITHS, J.B., EDS), ACADEMIC PRESS, NEW YORK, vol 1, 86-108.
- LAMBERT, H.; PANKOV, R.; GAUTHIER, J. ET HANCOCK, R. (1990)  
*Electroporation-mediated uptake of proteins into mammalian cells.*  
 BIOCHEM. CELL BIOL. 68, 729-734.
- LANGRIDGE, W.H.; LI, J.B. ET SZALAY, A.E. (1987).  
*Uptake of DNA and RNA into cells mediated by electroporation.*  
 METHODS. ENZYMOL. 153, 336-350.
- LAPERCHE, Y.; BULLE, F.; AISSANI, T.; CHOBERT, M.-N.; AGGERBECK, M.; HANOUNE, J. ET GUELLAEN, G. (1986)  
*Molecular cloning and nucleotide sequence of rat kidney  $\gamma$  glutamyl transpeptidase cDNA.*  
 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 83,937-941.
- LE BLEVENNEC, L. (1992)  
*Purification et caractérisation d'une enzyme membranaire, la gamma-glutamyltransférase, produite par culture en masse de cellules CHO recombinantes.*  
 DEA, INPL (NANCY)
- LEIST, C.; MEYER,, H.P. ET FIECHTER, A. (1986)  
*Process control during the suspension culture of a human melanoma cell in a mechanically stirred loop bioreactor.*  
 J. BIOTECHNOL.4, 235-246.

LEONARD, W.J.; DEPPER, J.M.; CRABTREE, G.R.; RUDIKOFF, S.; PUMPHREY, J.; ROBB, R.J.; KRONKE, M.; SVETLIK, P.B.; PEFFER, N.J.; WALDMANN, T.A. ET GREENE, W.C. (1984)

*Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor.*  
NATURE 311, 626-631.

LITTELFIELD, J.W. (1963)

*The inosic acid pyrophosphorylase activity of mouse fibroblasts partially resistant to 8-azaguanine.*  
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 50, 568-576.

LITTMAN, D.R.; THOMAS, P.J.; MADON, P.J.; CHESS, L. ET AXEL, R. (1985)

*The isolation and sequence of the gene encoding T8: a molecule defining functional classes of T lymphocytes.*  
CELL 40, 237-247.

LITWIN, J. (1990)

*The growth of CHO and BHK cells as suspended aggregates in serum-free medium.*  
IN: PRODUCTION OF BIOLOGICALS FROM ANIMAL CELLS IN CULTURE (SPIER, R.E., GRIFFITHS, J.B. ET MEIGNIER, B. EDS), BUTTERWORTH HEINEMANN, 429-433

LITWIN, J. (1992)

*The growth of vero cells as suspended aggregates in serum-free medium.*  
IN: ANIMAL CELL TECHNOLOGY: DEVELOPMENTS, PROCESSES AND PRODUCTS (SPIER, R.E.; GRIFFITHS, J.B., MACDONALD, C., EDS), BUTTERWORTH-HEINEMANN, 414-417

LOOBY, D. ET GRIFFITHS, J.B. (1988)

*Fixed bed porous glass sphere (porosphere) bioreactors for animal cells.*  
CYTOTECNOLOGY 1, 339-346.

LOWY, I.; PELLICER, A.; JACKSON, J.F.; SIM, G.-K.; SILVERSTEIN, S. ET AXEL, R. (1980)

*Isolation of transforming DNA: cloning the hamster aprt gene*  
CELL 22, 817-824.

LOYTER, A; SCANGOS, G .A ET RUDDLE, F. H. (1982)

*Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes.*  
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 79 422-426

LUBINIECKI, A.; ARATHOON, R.; POLASTRI, G.; THOMAS, J.; WIEBE, M.; GARNICK, R.; JONES, A.; VAN REIS, R. ET BUILDER, S. (1989)

*Selected strategies for manufacture and control of recombinant tissue plasminogen activator prepared from cell culture.*  
IN: ADVANCES IN ANIMAL CELL BIOLOGY AND TECHNOLOGY FOR BIOPROCESSES (SPIER, R.E.; GRIFFITHS, J.B.; STEPHENNE, J. ET CROOY, P.J.) BUTTERWORTH, 442-451.

MANIATIS, T; GOODBOURN, S ET FISCHER, JA (1987)

*Regulation of inducible and tissue-specific gene expression.*  
SCIENCE 236 1237

MANSUKHANI, A.; MOSCATELLI, D.; TALARICO, D.; LEVYTSKA, V. ET BASILICO, C. (1990)

*A murine fibroblast growth factor (FGF) receptor expressed in CHO cells is activated by basic FGF and kaposi FGF.*

PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 87, 4378-4382.

MARC, A. ET ENGASSER, J.M. (1988)

*La culture de cellules animales en bioreacteurs.*

IN: LES BIOTECHNOLOGIES (ANNALES DES MINES) 34-40

MAROUDAS, N.G. (1972)

*Anchorage dependence: correlation between amount of growth and diameter of bead, for single cells grown on individual glass beads.*

EXP. CELL RES 74, 337-342.

MATSUDA, Y.; TSUJI, A. ET KATUNUMA, N. (1983)

*Membrane bound  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase: structure, biosynthesis and degradation.*

ADV. ENZYME REGUL. 21, 103-119.

MAURER, H.R. (1986)

*Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture.*

IN: ANIMAL CELL CULTURE. A PRACTICAL APPROACH. (FRESCHNEY, R.I.) IRL PRESS, 13-31.

MC CORMICK, F.; TRAHEY, M.; INNIS, M.; DIECKMANN, B.; ET RINGOLD, G. (1984)

*Inducible expression of amplified human beta interferon genes in CHO cells.*

MOL. CELL. BIOL 4 166-172

MC CUTCHAN, J. H. ET PAGANO, J. S (1968)

*Enhancement of the infectivity of simian virus 40 Deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran.*

J. NATL. CANCER. INST. 41 351-357

MC KINNON, P. ROSS, M.; WELLS, J.R.E.; BALLARD, F.J. ET FRANCIS, G.L. (1991)

*Expression, purification and characterization of secreted recombinant human insulin-like growth factor-I (IGF-I) and the potent variant des (1-3)IGF-I in Chinese hamster ovary cells.*

J. MOL. ENDO. 6, 231-239.

MC KNIGHT, S ET TJIAN, R (1986)

*Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells*

CELL 46 795

MEGE, R.-M. (1991)

*Les molécules d'adhérence cellulaire: molécules morphogénétiques.*

M./S. 7, 544-552.

MEILHOC, E.; MASSON, J.M. ET TEISSIE, J. (1990)

*High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses.*

BIO/TECHNOL. 8, 223-227

- MEISTER, A. (1973)  
*On the enzymology of amino acid transport.*  
SCIENCE 180, 33-39.
- MEISTER, A. (1988)  
*Glutathione metabolism and its selective modification.*  
J. BIOL. CHEM. 263, 17205-17208.
- MENDIAZ, E.; MAMOUNAS, M.; MOFFET, J. ET ENGLERBERG, E. (1986)  
*A defined medium for and the effect of insulin on the growth, amino acid transport, and morphology of Chinese hamster ovary cells, CHO-K1 (CCL 61) and the isolation of "insulin independent" mutants.*  
IN VITRO CELL. DEVELOP. BIOL. 22, 66-74.
- MERTEN, O.-W.; KELLER, H.; van KAN MARTIN, C. ET MOEURS, D. (1992)  
*Release of cellular enzymes for evaluating the dead cell number in bioreactor cultures.*  
IN: ANIMAL CELL TECHNOLOGY: DEVELOPMENTS, PROCESSES AND PRODUCTS (SPIER, R.E.; GRIFFITHS, J.B., MACDONALD, C., EDS), BUTTERWORTH-HEINEMANN, 319-324.
- MESSING, J. (1983)  
*New M13 vectors for cloning.*  
METHODS ENZYMOL. 101, 20-42.
- METZLER, D.E. (1977)  
*The metabolism of nitrogen-containing compounds.*  
IN: BIOCHEMISTRY, THE CHEMICAL REACTIONS OF LIVING CELLS. (ACADEMIC PRESS) NEW YORK, 805-889.
- MICHEL, M.L.; SOBCZAK, E.; MALPIECE, Y.; TIOLLAIS, P.; ET STREECK, R.E. (1985)  
*Expression of amplified hepatitis B surface antigen genes in Chinese hamster ovary cells;*  
BIO/TECHNOL. 3 561-566
- MICHEL, M.R.; ELGIZOLI, M.; KOBLET, H. ET KEMPF, C. (1988)  
*Diffusion loading conditions determine recovery of protein synthesis in electroporated P3X63Ag8 cells .*  
EXPERIENTIA 44, 199-203.
- MIGNOT, G.; FAURE, T.; GANNE, V.; ARBEILLE, B.; PAVIRANI, A.; ET ROMET-LEMONNE, J.L. (1990)  
*Production of recombinant Von Willebrand factor by CHO cells cultured in macroporous microcarriers*  
CYTOTECHNOLOGY 4 163-171
- MILLER, W.M.; WILKE, C.R. ET BLANCH, H.W. (1987)  
*Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture.*  
J. CELL. PHYSIOL. 132, 524-530.

- MILLER, W.M.; WILKE, C.R. ET BLANCH, H.W. (1988)  
*Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step change in continuous culture.*  
 BIOPROCESS ENG. 3, 113-122.
- MINAMOTO, Y; OGAWA, K. ABE, H.; IOCHI, Y. ET MITZUGI, K.(1991)  
*Development of a serum-free and heat -sterilizable medium and continuous high-density cell culture.*  
 CYTOTECNOLOGY 5, 35-51
- MIR, L.M.; BANOUN, H. ET PAOLETTI, C. (1988)  
*Introduction of definite amounts of non-permeant molecules into living cells after electroporation: direct access to the cytosol.*  
 EXP. CELL. RES. 175, 15-25.
- MISHOE, H; BRADY, J. N.; RADONOVICH, M ET SALZMAN, N. P (1984)  
*Simian virus 40 guanine-cytosine-rich sequences function as independent transcriptional control elements in vitro.*  
 MOL. CELL. BIOL. 4 2911-2920
- MOREIRA, J.L.; ALVES, P.M.; AUNINS, J.C. ET CARRONDO, M.T.J. (1992)  
*Aggregate suspension cultures of BHK cells.*  
 IN: ANIMAL CELL TECHNOLOGY: DEVELOPMENTS, PROCESSES AND PRODUCTS (SPIER, R.E.; GRIFFITHS, J.B., MACDONALD, C., EDS), BUTTERWORTH-HEINEMANN,411-413.
- MOSSMAN, T. (1983)  
*Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.*  
 J. IMMUNOL. METH. 65, 55-63.
- MULLIGAN, R.C. ET BERG, P. (1981)  
*Selection for animal cells that express the Escherichia coli gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyl transferase.*  
 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 78, 2072-2076.
- MURATA, M.; ETO, Y. ET SHIBAI, H. (1988)  
*Large-scale production of erythroid differentiation factor (EDF) by gene-engineered Chinese hamster ovary (CHO) cells in suspension culture.*  
 J. FERMENT. TECHNOL. 66, 501-507.
- NEUMANN, E.; SCHAEFER-RIDDER, M.; WANG, Y ET HOFSCHEIDER, P.H. (1982)  
*Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields.*  
 EMBO. J. 7, 841-845.
- NICOLAS, J.F. ET RUBENSTEIN, J.L.R. (1988)  
*Retroviral vectors.*  
 IN: VECTORS: A SURVEY OF MOLECULAR CLONING VECTORS AND THEIR USES (BIOTECHNOLOGY SERIES), 493-513.
- NIELSEN, L.K.; SMYTH, G.K. ET GREENFIELD, P.F. (1991)  
*Hemocytometer cell count distributions: implications of non-poisson behavior.*  
 BIOTECHNOL. PROG. 7, 560-563.

- NIKOLAI, T. ET HU, W.-S. (1992)  
*Cultivation of mammalian cells on macroporous microcarriers.*  
 ENZYME MICROB. TECHNOL. 14, 203-208.
- NILSSON, K.; BIRNBAUM, S.; ET MOSBACH, K. (1988)  
*Microcarrier culture of recombinant Chinese hamster ovary cells for production of human immune interferon and human tissue-type plasminogen activator*  
 APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL. 27 366-371
- OLD, R.W. ET PRIMROSE, S.B. (1985)  
*Introducing genes into mammalian cells in culture.*  
 IN: PRINCIPLE OF GENE MANIPULATION, 23-55.
- PALERMO, D.P.; DEGROAF, K.R.; MAROTTI, K.R.; REHBERG, E. ET POST, L.E. (1991)  
*Production of analytical quantities of recombinant proteins in Chinese hamster ovary using sodium butyrate to elevate gene expression.*  
 J. BIOTECHNOL. 19 35-48.
- PARKER, B. ET STARK, G (1979)  
*Regulation of simian virus 40 transcription: sensitive analysis of the RNA species present early in infections by virus or viral DNA.*  
 J. VIROL. 31 360-369
- PASSINI, C.A. ET GOOCHEE, C.F (1989)  
*Response of a mouse hybridoma cell line to heat shock, agitation and sparging.*  
 BIOTECHNOL. PROG. 5, 175-188.
- PETITCLERC, C.; SCHIELE, F.; BAGREL, D.; MAHASSEN, A. ET SIEST, G. (1980)  
*Kinetic properties of  $\gamma$ -glutamyltransferase from human liver.*  
 CLIN. CHEM. 26, 1688-1693.
- PICHON, D.; VIVIER, H. ET PONS, M.N. (1992a)  
*Quantitative image analysis in bioengineering processes.*  
 ACTA. STEREOLOG. (A PARAITRE)
- PICHON, D.; VIVIER, H. ET PONS, M.N. (1992b)  
*Growth monitoring of mammalian cells on microcarriers by image analysis.*  
 I.C.C.A.F.T 5, IFAC, BIO 2: PROC IN 5<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTER APPLICATION IN FERMENTATION TECHNOLOGY.
- POTTER, H.; WEIR, L. ET LEDER, P., (1984)  
*Enhancer-dependant expression of human  $\kappa$  immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation.*  
 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 81, 7161-7165.
- PORTNER, R.; MATSUMURA, M.; HATAE, T.; MURAAMI, K.; ET KATAOKA, H. (1991)  
*Perfusion-microcarrier cultivation of rCHO-cells in serum-free medium for production of human renin*  
 BIOPROC. ENG. 7 63-69

- PROPST, C.L.; VON WEDEL, R.J. ET LUBINIECKI, A.S. (1989)  
*Using mammalian cells to produce products.*  
 in FERMENTATION PROCESS DEVELOPMENT OF INDUSTRIAL ORGANISMS (O. NEWAY, J., EDS)
- PROUDFOOT, N. J. ET WHITELOW, E. (1988)  
*Termination and 3' end processing of eucaryotic RNA.*  
 in TRANSCRIPTION AND SPLICING (HAMES, B. D ET GLOVER D. M, Eds) IRL Press, Oxford, p 97.
- PUCK, T.T.; CIETURAS, D. ET ROBINSON, A. (1958)  
*Genetics of somatic mammalian cells. III: log-term cultivation of euploid cells from human and animal subject.*  
 J. EXP. M. 108, 945-956.
- RACHER, A.J.; LOOBY, D. ET GRIFFITHS, J.B. (1990)  
*Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability.*  
 CYTOTECHNOLOGY 3, 301-307.
- RAJPERT-DE-MEYTS, E.; HEISTERKAMP, N. ET GROFFEN, J. (1988)  
*Cloning and nucleotide sequence of human  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase.*  
 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 85, 8840-8844.
- RASSOULZADEGAN, M.; BINETRUY, B. ET CUZIN, F. (1982)  
*High efficiency of gene transfer after fusion between bacteria and eukaryotic cells.*  
 NATURE 295 257-259.
- REEVES, R. ET CSERJESI, P. (1979)  
*Sodium butyrate induces new gene expression in friend erythroleukemic cells.*  
 J. BIOL. CHEM. 254, 4283-4290.
- REEVES, R.; GORMAN, C.M. ET HOWARD, B. (1985)  
*Minichromosome assembly of non-integrated plasmid DNA transfected into mammalian cells.*  
 NUCL. ACIDS. RES. 13 3599-3615.
- REITER, M.; HOHENWARTER, O.; GAIDA, T.; ZACH, N.; SCHMATZ, C.; BLUML, G.; WEIGANG, F.; NILSSON, K. ET KATINGER, H. (1990)  
*The use of macroporous gelatin carriers for the cultivation of mammalian cells in fluidised bed reactors.*  
 CYTOTECHNOLOGY 3, 271-277.
- REITER, M.; BLUML, G.; GAIDA, T.; ZACH, N.; UNTERLUGGAUER, F.; DOBLHOFF-DIER, O.; NOE, M.; PLAIL, R.; HUSS, S. ET KATINGER, H. (1991)  
*Modular integrated fluidized bed reactor technology.*  
 BIO / TECHNOLOGY 9, 1100-1102.
- REITER, M.; BLUML, G.; GAIDA, T.; ZACH, N.; SCHMATZ, C.; BORTH, N.; HOHENWARTER, O. ET KATINGER, H. (1992)  
*High density aggregate culture of recombinant CHO cells in fluidized bed reactors.*  
 IN: ANIMAL CELL TECHNOLOGY: DEVELOPMENTS, PROCESSES ANT PRODUCTS (SPIER, R.E.; GRIFFITHS, J.B., MACDONALD, C., EDS), BUTTERWORTH-HEINEMANN, 421-423

- REITZER, L.J.; WICE, B.M. ET KENNEL, D. (1979)  
*Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells.*  
 J. BIOL. CHEM. 254, 2669-2676.
- REUVENY, S.; VELEZ, D.; MACMILLAN, J.D. ET MILLER, L. (1986)  
*Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors.*  
 J. IMMUNOL. METHODS 18, 53-59.
- RHODES, P.M. (1989)  
*Recombinant antibodies from CHO cells.*  
 IN: ADVANCES IN ANIMAL CELL BIOLOGY AND TECHNOLOGY FOR BIOPROCESSES (SPIER, R.E.; GRIFFITHS, J.B.; STEPHENNE, J. ET CROOY, P.J.) BUTTERWORTH, 472-474..
- RIDGWAY, A.A.G. (1988)  
*Mammalian expression vectors.*  
 N: VECTORS: A SURVEY OF MOLECULAR CLONING VECTORS AND THEIR USES (BIOTECHNOLOGY SERIES), 467-492.
- ROBERT DE SAINT VINCENT, B.; DELBRUCK, S.; ECKHART, W.; MEINKOTH, J.; VITTO, L. ET WAHL, G. (1981)  
*The cloning and reintroduction into animal cells of a functional CAD gene, a dominant amplifiable genetic marker.*  
 CELL 27, 267-275.
- ROSALKI et al, 1975  
*Gamma-glutamyl transpeptidase.*  
 ADV. CLIN. CHEM. 17, 53-107
- RUIZ, J.C.ET WAHL, G.M. (1986)  
*Escherichia coli aspartate transcarbamylase: a novel marker for studies of gene amplification and expression in mammalian cells.*  
 MOL. CELL. BIOL. 6, 3050-3059
- SANFORD, J. C. (1988)  
*The biolistic process.*  
 TRENDS BIOTECHNOL 6 299-302
- SASAKI, K.; MIZUSAWA, H.; ISHIDATE, M. ET TANAKA, N. (1991)  
*Gene transfer into mammalian cells by rapid freezing.*  
 IN VITRO CELL. DEV. BIOL. 27 86-88.
- SASSONE-CORCI, P ET BORELLI, E (1986)  
*Transcriptional regulation by trans-acting-factors*  
 TRENDS GENET. 2 215
- SCHAFFNER, W. (1980)  
*Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells.*  
 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 77 2163-2167.

SCHIELE, F.; MULLER, J.; COLINET, E. ET SIEST, G. (1987)

*Production and certification of an enzyme reference material for  $\gamma$ -glutamyltransferase (CRM 319). Part I: preparation and characterization.*

CLIN. CHEM. 33, 1971-1977.

SCHLAEGER, E.J. ET SCHUMPP, B. (1989)

*Studies on mammalian cell growth in suspension culture.*

IN: ADVANCES IN ANIMAL CELL BIOLOGY AND TECHNOLOGY FOR BIOPROCESSES (SPIER, R.E.; GRIFFITHS, J.B.; STEPHENNE, J. ET CROOY, P.J.) BUTTERWORTH, 386-396.

SCHMID, G.; ZILG, H.; EBERHARD, U. ET JOHANNSEN, R. (1991)

*Effect of free fatty acids and phospholipids on growth of and product formation by recombinant baby hamster kidney (rBHK) and Chinese hamster ovary (CHO) cells in culture.*

J. BIOTECHNOL. 17, 155-167.

SCHMIDT, G. ET JOHANNSEN, R. (1990)

*Metabolic quotients for recombinant CHO and BHK cell lines producing human antithrombin III.*

BIOTECHNOL. LET. 12, 317-322.

SHAW, L.M.; LONDON, J.W. ET PETERSON, L.E. (1978)

*Isolation of  $\gamma$ -glutamyltransferase from human liver, and comparison with the enzyme from human kidney.*

CLIN. CHEM. 24, 905-915.

SHERBET, G.V. (1978)

IN: THE BIOPHYSICAL CHARACTERISATION OF THE CELL SURFACE (ACADEMIC PRESS), 151-198.

SIEST, G.; RATANASAVANH, D.; GALTEAU, M.-M.; HOUSSIER, M.; ANTOINE, B. ET BATT, A.-M. (1982)

*Gamma-glutamyltransferase as direct and indirect index of induction of drug-metabolizing enzymes.*

in GAMMA-GLUTAMYLTRANSFERASES: ADVANCES IN BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, 3rd series (SIEST G. and HEUSGHM C., Eds), PAIS, MASSON, 73-79.

SIEST, G.; HERBETH, B. ET SCHIELE, F. (1983)

*Valeurs de références et variations biologiques de la gamma-glutamyltransférase.*

BULL. SOC. FR. ALCOOL. 173, 19-26.

SMILEY, A.L.; HU, W.S. ET WANG, D.I.C. (1989)

*Production of human interferon by recombinant mammalian cells cultivated on microcarriers.*

BIOTECHNOL. BIOENG. 33, 1182-1190.

SNELL, K.; NATSUMEDA, Y. ET WEBER, G. (1987)

*The modulation of serine metabolism in hepatoma 3924A during different phases of cellular proliferation in culture.*

BIOCHEM. J. 245, 609-612.

- SOMPAYRAC, L. M. ET DANNA, K. J. (1981)  
*Efficient infection of monkey cells with DNA of simian virus 40*  
 PROC. NATL. ACAD. SCI USA 78 7575-7578.
- SONODA, H.; MORI, H.; KIKUTANI, H.; NISHITANI, Y.; HIRONO, M.; TANIGUCHI, T.; WATANABE, S. (1988)  
*Establishment of human interleukin-4 producing Chinese hamster ovary cells.*  
 J BIOTECHNOL 9 61-70
- SOUTHERN, P.J. ET BERG, P. (1982)  
*Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under the control of the SV40 early region promoter.*  
 J. MOLEC. APPL. GENET 1, 327-341.
- SPECTOR, A.A. (1972)  
*Fatty acid, glyceride and phospholipid metabolism.*  
 IN: GROWTH, NUTRITION AND METABOLISM OF CELLS IN CULTURE (ROTHBLAT, G.H. ET CRISTOFALO, V.J., EDS) ACADEMIC PRESS NEW YORK, vol 1, 257-296
- STOLE, E. ET MEISTER, A. (1991)  
*Interaction of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase with glutathione involves specific arginine and lysine residues of the heavy subunit.*  
 J. BIOL. CHEM. 266, 17850-17857.
- STOPPER, H.; ZIMMERMANN, U.; ET WECKER, E. (1985)  
*High yield of DNA-transfer into mouse L-cells by electroporation.*  
 BIOSCIENCES 40, 929-932.
- STOW, N. D. ET WILKIE, N. M. (1976)  
*An improved technique for obtaining enhanced infectivity with herpes simplex virus type I DNA.*  
 J. GEN. VIROL. 33 447-458.
- SUBRAMINI, S.; MULLIGAN, R. ET BERG, P. (1981)  
*Expression of the mouse dihydrofolate complementary deoxyribonucleic acid in simian virus 40 vectors.*  
 MOL. CELL. BIOL. 1, 854-864.
- SUGDEN, B.; MARSH, K. ET YATES, J. (1985)  
*A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphocytes transformed by Epstein-Barr virus.*  
 MOL. CELL. BIOL. 5, 410-414.
- SUGIMOTO, S.; LIND, W. ET WAGNER, R. (1992)  
*Activation of a specific proteolytic activity in suspension cultures of recombinant adherent cells.*  
 IN: ANIMAL CELL TECHNOLOGY: DEVELOPMENTS, PROCESSES AND PRODUCTS (SPIER, R.E.; GRIFFITHS, J.B., MACDONALD, C., EDS), BUTTERWORTH-HEINEMANN, 447-451

SUZUKI, T.; TORIYAMA, M.; KAWAMOTO, Y.; YOKOGAWA, Y. ET KAWAMURA, S. (1991)

*The adhesiveness and growth of anchorage-dependent animal cells on biocompatible ceramic culture carriers.*

J. FERM. BIOENG. 72, 450-456.

TATE, S.S. ET GALBRAITH, R.A. (1987)

*A human hepatoma cell line expresses a single-chain form of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase.*

J. BIOL. CHEM. 262, 11404-11406.

TATE, S.S. ET MEISTER, A. (1974)

*Interaction of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase with amino acids, dipeptides and derivatives and analogs of glutathione.*

J. BIOL. CHEM 249, 7593-7602.

TATE, S.S. ET MEISTER, A. (1977)

*Affinity labeling of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase and location of the  $\gamma$ -glutamyl binding site on the light subunit.*

PRO. NATL. ACAD. SCI. USA 74, 931-935

TATE, S.S. ET MEISTER, A. (1981)

*$\gamma$ -glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects.*

MOLEC. CELL. BIOCHEM. 39, 357-368

TATE, S.S. ET ROSS, M.E. (1977)

*Human kidney  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase . Catalytic properties, subunit structure, and localization of the  $\gamma$ -glutamyl binding site on the light subunit.*

J. BIOL. CHEM 252, 6792-6798

TATSUKA, M.; ORITA, S.; YAGI, T. ET KANUNAGA, T. (1988)

*An improved method of electroporation for introducing biologically active foreign genes into cultured mammalian cells.*

EXP. CELL RES. 178, 154-162.

TEISSIE, J.; ROLS, M.P.; ZERBIB, D. ET AMALRIC, F. (1987)

*Electroperméabilisation réversible de fibroblastes poussant sur support: utilisation pour leur transformation.*

REVUE DE L'INSTITUT PASTEUR DE LYON 20, 273-281.

THIOUDELLET, C. (1992)

*Production et caractérisation de  $\gamma$ -glutamyltransférase humaine recombinante. Application possible à la préparation d'un matériel enzymatique de référence.*

THESE DU CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS (NANCY).

THOMAS, J.N. (1990)

*Mammalian cell physiology*

IN: LARGE-SCALE MAMMALIAN CELL CULTURE TECHNOLOGY (LUBINIECKI, A.S., EDS), 93-207.

- TOLBERT, W.R.; HITT, M.M. ET FEDER, J. (1980)  
*Cell aggregate suspension culture for large-scale production of biomolecules.*  
 IN VITRO 16, 486-490.
- TONEGUZZO, F. ET KEATING, A. (1986)  
*Stable expression of selectable genes introduced into human hematopoietic stem cells by electric field-mediated DNA transfer.*  
 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 83, 3496-3499.
- TONEGUZZO, F.; KEATING, A.; GLYNN, S. ET MC DONALD, K., (1988)  
*Electric field-mediated gene transfer: characterization of DNA transfer and patterns of integration in lymphoid cells.*  
 NUCL. ACIDS. RES, 16, 5515-5532.
- TOPP, W.C. (1981)  
*Normal rat cell lines deficient in nuclear thymidine kinase.*  
 VIROLOGY 113, 408-420.
- TUR-KASPA, R.; TEICHER, L.; LEVINE, B.J.; SKOULTCHI, A.I. ET SHAFRITZ, D.A. (1986)  
*Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes.*  
 MOL. CELL. BIOL., 6, 716-718.
- URLAUB, G. ET CHASIN, L.A. (1980)  
*Isolation of chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity.*  
 PRO. NATL. ACAD. SCI. USA 77, 4216-4220.
- VERNON, OI; MORRISON, S.L; HERZNBERG, L.A. ET BERG, P. (1983)  
*Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells.*  
 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 80, 825-829.
- VISVIKIS, A.; SAR, F.; GOERGEN, J.L.; BAGREL, D.; THIOUDELLET C.; WELLMAN, M.; MARC, A.; ENGASSER, J.M. ET SIEST, G. (1989)  
*Preparation of human gamma-glutamyltransferase (GGT) as reference material: I. Characterization of GGT from the human hepatoma cell line HepG2.*  
 in: BIOLOGIE PROSPECTIVE. COMPTE RENDU DU 7ème COLLOQUE DE PONT-A-MOUSSON (GALTEAU, M.M., SIEST, G ET HENNY, J., Eds), PARIS, 65-68.
- VISVIKIS, A.; GOERGEN, J.L.; OSTER, T.; BAGREL, D. WELLMAN, M. ET SIEST, G. (1990)  
*Gamma-glutamyltransferase from human hepatoma cell lines: purification and cell culture of HepG2 on microcarriers.*  
 CLIN. CHIM. ACTA 191, 221-232.
- VISVIKIS, A.; THIOUDELLET, C.; OSTER, T.; FOURNEL-GIGLEUX, S WELLMAN, M. ET SIEST, G. (1991)  
*High level expression of enzymatically active mature human  $\gamma$ -glutamyltransferase in transgenic V79 Chinese hamster cells.*  
 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 88, 7361-7365.

- WAGNER, A. (1990)  
*Production de PUK par des cellules humaines tumorales cultivées en réacteurs discontinus et perfusés: cinétiques, physiologie et modélisation.*  
 THESE DE DOCTORAT INPL.
- WAGNER, A.; MARC, A. ET ENGASSER, J.M. (1992)  
*The use of lactate dehydrogenase (LDH) release kinetics for the evaluation of death and growth of mammalian cells in perfusion reactors.*  
 BIOTECHNOL. BIOENG. 39, 320-326.
- WAGNER, R. ET LEHMAN, J. (1988)  
*The growth and productivity of recombinant animal cells in a bubble free aeration system.*  
 TIBTECH 6, 101-104.
- WAHL, G.M.; DE SAINT VINCENT, B.R.; ET DE ROSE, M.L.(1984)  
*Effect of chromosomal position on amplification of transfected genes in animal cells.*  
 NATURE, 307, 516-521.
- WASYLYK, B; WASYLYK, C; MATTHES, H; WINTZERITH, M ET CHAMBON, P (1983)  
*Transcription from the SV40 early-early and late-early overlapping promoters in the absence of DNA replication*  
 EMBO J. 2 1605-1611
- WEIDLE, U.H.; BUCKEL, P. ET WIENBERG, J. (1988)  
*Amplified expression constructs for human tissue-type plasminogen activator in chinese hamster ovary cells: instability in the absence of selective pressure.*  
 GENE 66, 193-203.
- WEYMOUTH, L.A ET BARSOUM, J. (1986)  
*Genetic Engineering in mammalian cells*  
 in MAMMALIAN CELL TECHNOLOGY (WILLIAM, G THILLY, Eds) Butterworths, p 9-62
- WIGLER, M.;SWEET, R.; SIM, G-K.; WOLD, B.;PELLICER, A.; LACY, E.; MANIATIS, T.; SILVERSTEIN, S ET AXEL, R. (1979)  
*Transformation of mammalian cells with genes from prokaryotes and eucaryotes.*  
 CELL 16, 777-785.
- WIGLER, M.; SILVERSTEIN, S; LEE, L.-S.; PELLICER, A.; CHENG, Y.-C. ET AXEL, R. (1977)  
*Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells.*  
 CELL 11, 223-232.
- WIGLER, M.; PERUCHO, M.; KURTZ, D.; DANA, S. PELLICER, A.; AXEL, R. ET SILVERSTEIN, S. (1980)  
*Transformation of mammalian cells with an amplifiable dominant acting gene.*  
 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 77, 3567-3570.
- WILLIAMS, R.S.; JOHNSTON, S.A.; RIEDY, M.; DEVIT, J.; MC ELLIGOTT, S.G.; ET SANFORD, J.C. (1991)  
*Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles.*  
 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 88. 2726-2730.

- WONG, T.K.; ET NEUMANN, E. (1982)  
*Electric field mediated gene transfer.*  
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN 107, 584-587.
- YAMAMOTO, F.; FURUSAWA, M.; FURUSAWA, I. ET OBINATA, M. (1982)  
*The 'Pricking' method.*  
EXP CELL RES 142 79-84.
- YAMASHITA, K. HITOI, A. MATSUDA, Y.; MIURA, T.; KATUNUMA, N. ET KOBATA, A. (1986)  
*Structures of sugar chains of human kidney  $\gamma$ glutamyl transpeptidase.*  
J. BIOCHEM. 99, 55-62.
- YOUNG, M.W. ET DEAN, R.C. (1987).  
*Optimization of mammalian-cell bioreactors.*  
BIO / TECHNOLOGY 5, 835-837.
- ZELENIN, A.V.; TITOMIROV, A.V. ET KOLESNIKOV, V.A. (1989)  
*Genetic transformation of mouse cultured cells with the help of high-velocity mechanical DNA injection.*  
FEBS LETT. 244, 65-67.
- ZERBIB, D.; AMALRIC, F. ET TEISSIE, J. (1985)  
Electric field mediated transformation: isolation and characterization of a tk+ subclone.  
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COM. 129, 611-618
- ZETTLMEISSL, G; RAGG, H.; ET KARGES, H.E. (1987)  
*Expression of biologically active human antithrombin III in Chinese hamster ovary cells.*  
BIO/TECHNOL. 5 720-725
- ZIMMERMAN, U.; PILWAT, G.; ET RIEMANN, F. (1974)  
*Dielectric breakdown of cell membranes*  
BIOPHYS. J. 14, 881-899
- ZIMMERMANN, U. ET VIENKEN, J. (1982)  
*Electric field-induced cell-to-cell fusion.*  
J. MEMBRANE BIOL., 67, 165-182.



**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE  
LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur SIEST, Professeur, Centre du Médicament Nancy,  
Monsieur MERTEN, Institut Pasteur Paris.**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Mademoiselle CHEVALOT Isabelle**

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

**"Production d'une protéine membranaire humaine par culture en réacteur de cellules animales CHO recombinantes : obtention de la lignée CHO recombinante et études cinétiques en réacteurs discontinus et semi-continus"**

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

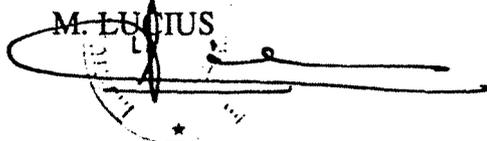
**Spécialité : "GENIE DES PROCÉDES"**

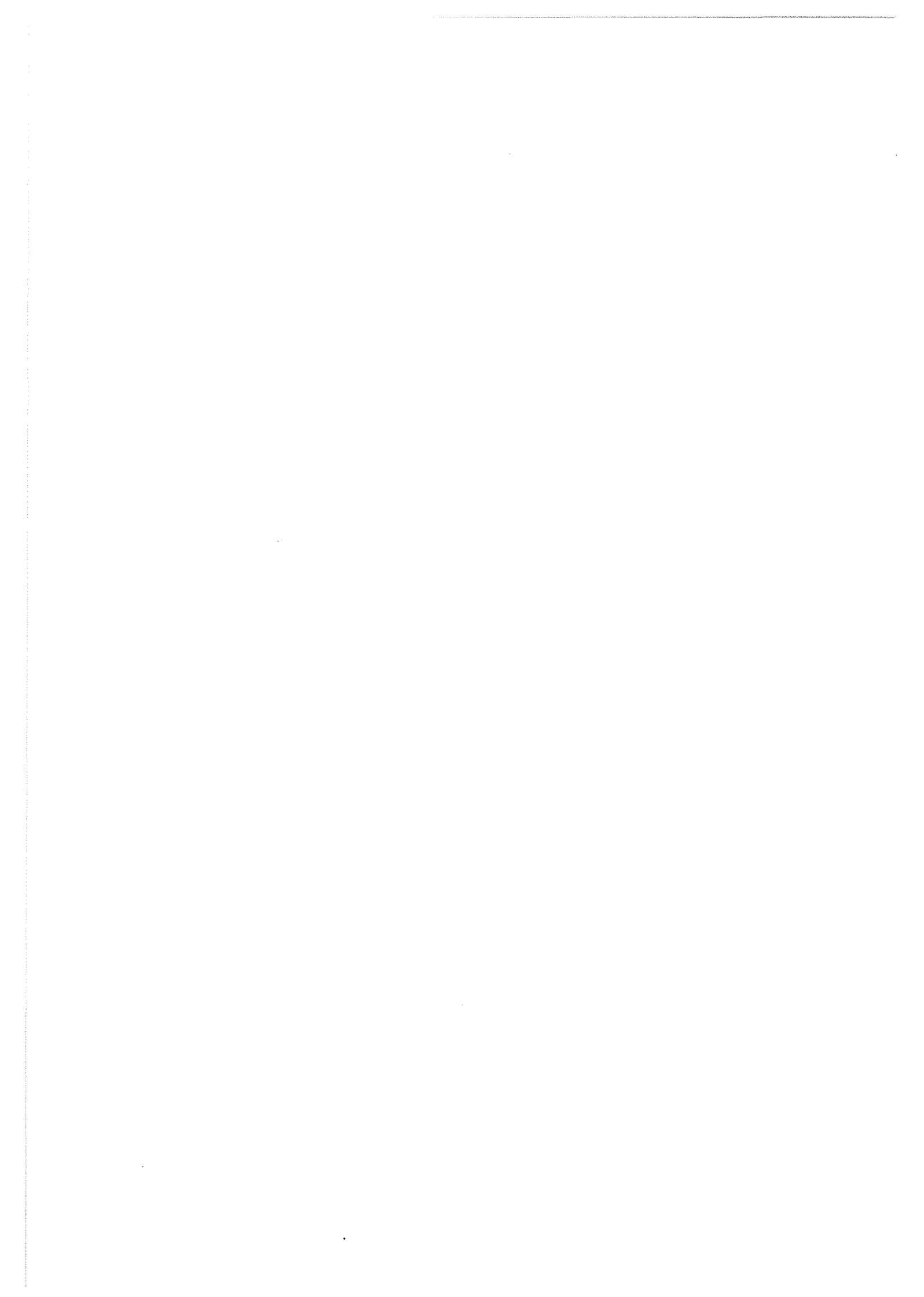


Fait à Vandœuvre le, 1<sup>o</sup> Décembre 1992

Le Président de l'I.N.P.L.,

**M. LUCIUS**





L'objectif général de ce travail est l'étude de la production d'une enzyme membranaire humaine à intérêt clinique (la gamma glutamyltransférase: GGT) par cultures en réacteurs de cellules animales CHO (Chinese Hamster Ovary) recombinantes. La première partie concerne l'obtention de la cellule CHO recombinante. Pour cela, la mise au point d'une technique de transfection par électroporation a été réalisée, puis la stabilité de la production de GGT par ces cellules recombinantes a été vérifiée pendant 18 passages. Les caractéristiques structurales et catalytiques de l'enzyme recombinante ont été déterminées et montrent l'obtention d'une enzyme active avec un taux d'expression très performant de 2 U / mg de protéines. Les cinétiques de cultures en réacteur discontinu des cellules r-CHO n'ont pas montré de différences significatives dans leur comportement de prolifération, ni dans leur métabolisme de base par rapport aux cellules sauvages. La seconde partie traite de l'influence de l'adhérence cellulaire sur le comportement des cellules r-CHO en réacteur. Trois systèmes de culture ont été mis en œuvre: sur microporteurs, en agrégats ou en cellules individualisées. Il a été observé une vitesse spécifique de croissance deux fois plus élevée pour les cellules cultivées sur microporteurs; de plus, les cellules perdent leur capacité de synthèse de l'enzyme (d'un facteur 7) dès qu'elles se trouvent en absence de support. Enfin, la mise en œuvre de réacteur semi-continu a permis de maintenir des concentrations cellulaires maximales pendant une période plus longue. En troisième partie, l'optimisation de la production de GGT a été envisagée, notamment par ajout d'un agent chimique inducteur. L'addition de butyrate de sodium dans une culture en réacteur semi-continu avec des cellules r-CHO sur microporteurs a permis de stimuler la production d'un facteur 1,5. L'extraction de l'enzyme membranaire est également présentée.

The aim of this work is to study the production of a human membrane enzyme (Gamma-glutamyltransferase (GGT)) widely used in clinical chemistry, by culture of recombinant Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. The first part of this report deals with the preparation of the recombinant CHO cell line. Among different gene transfer method, we have chosen and optimized the electroporation of the CHO cells. The stability of the GGT synthesis has been tested during 18 successive passages. Structural and catalytic features of the recombinant enzyme shows that this enzyme is active with a high level of expression (2 U / mg of protein). We have realized some comparative kinetic studies between wild and recombinant CHO cells in batch culture. It was found that morphology, metabolism and proliferation rate are near the same for the two cell lines. In the second part, we have studied the influence of cellular adhesion and operating conditions on the recombinant CHO cells behaviour. Three types of culture for these support-dependent cells have been compared : microcarriers, aggregates and suspension cells. The specific growth rate is two times higher for cells on microcarriers and a decrease in GGT production (factor 7) is observed in non-adherent states. The use of a fedbatch reactor allows a better stabilization of the maximum cell density and GGT concentration as compared to batch culture technique. In the third part, an optimization of the GGT production by cells on microcarriers has been carried out in a fed batch bioreactor using an induction of the GGT synthesis by butyrate. The enzyme extraction has also been considered.