Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contrôle de qualité des cellules CHO utilisées pour la bio-production: apport de l'électrophorèse en deux dimensions

Pierson, Sandrine

Award date:
1993

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2026

291193

FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES

CONTROLE DE QUALITE DES CELLULES CHO UTILISEES POUR LA BIO-PRODUCTION : APPORT DE L'ELECTROPHORESE EN DEUX DIMENSIONS.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

Sandrine
PIERSON

LISTE DES ABBREVIATIONS

APS	Persulfate d'ammonium
BRP	Bacteriocin Release Protein
CHO	Chinese Hamster Ovary
DHFR	Dihydrofolate reductase
ECL	Enhanced Chemiluminescence
IEF	Isoélectrofocalisation
KD	Kilo dalton
LBr	Tampon de lyse
MM	Masse moléculaire
PI	Point isoélectrique
PM	Poids moléculaire
PVDF	Difluorure polyvinylidène
SAB	Albumine sérique bovine
SB	Sérum bovin
SDS	Dodécyl-Sulfate de sodium
TBS-T	TBS + Tween 20 0,1%
TCA	Acide trichloroacétique
TNF	Tumor Necrosis Factor

CULT I PERF jour 5 (6 spots)	**CULT I PERF jour 20 (14 spots)**	**CULT II PERF jour 7 (9 spots)**	**CULT II PERF jour 20 (8 spots)**	**CULT BATCH jour 3 (9 spots)**
PI 4,92 % 1,5	PI 4,95 % 0,4	PI 4,99 % 2,1		
PI 4,97 % 3,2	PI 4,99 % 0,3	PI 5,02 % 0,6	PI 4,98 % 0,2	
PI 5,00 % 0,8	PI 5,04 % 13,0	PI 5,10 % 8,3	PI 5,07 % 0,1	PI 5,09 % 0,2
PI 5,09 % 0,7	PI 5,10 % 16,6	PI 5,16 % 1,4		PI 5,14 % 0,1
	PI 5,12 % 0,2			
	PI 5,22 % 0,3			
PI 5,52 % 90,4	PI 5,50 % 46,8	PI 5,53 % 79,6	PI 5,51 % 54,9	PI 5,51 % 58,0
	PI 5,57 % 7,8		PI 5,56 % 0,4	PI 5,59 % 3,9
	PI 5,61 % 2,0	PI 5,61 % 3,1		PI 5,64 % 8,2
PI 5,66 % 3,3	PI 5,64 % 7,7	PI 5,68 % 3,7	PI 5,67 % 0,5	
	PI 5,70 % 1,7			PI 5,70 % 9,8
PI 5,74 % 0,1	PI 5,73 % 0,7		PI 5,72 % 10,2	PI 5,76 % 7,5
	PI 5,77 % 2,0	PI 5,80 % 0,8	PI 5,79 % 32,4	PI 5,79 % 6,6
	PI 5,82 % 0,5	PI 5,84 % 0,4	PI 5,85 % 1,3	PI 5,83 % 5,7

Table III-2 : Tableau reprenant les différents points isoélectriques ainsi que leur abondance relative (%) des différentes isoformes présentes dans chaque échantillon.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/72.44.20

Contrôle de qualité des cellules CHO utilisées pour la bio-production : apport de l'électrophorèse en deux dimensions.

PIERSON Sandrine

Résumé

Dans ce mémoire, nous avons analysé la production d'une protéine complexe produite par les cellules CHO et nous avons tenté de mettre en évidence des différences dans la sécrétion des polypeptides et protéines dans des conditions de cultures différentes (culture en perfusion, culture en batch) et à des temps de culture variables.

La combinaison gel d'électrophorèse bidimensionnelle / western blotting a permis de mettre en évidence trois types d'hétérogénéité au niveau de la protéine virale étudiée : hétérogénéité de poids moléculaire, hétérogénéité de point isoélectrique, hétérogénéité de réactivité vis-à-vis de l'anticorps.

Nous avons également pu observer des variations qualitatives et quantitatives dans la distribution des isoformes de la protéine virale : d'un système de culture à un autre, au cours du vieillissement d'un bioréacteur, d'un bioréacteur à l'autre lorsque le même système de culture est appliqué.

Enfin, cette technique a permis de détecter différentes formes anormales de la protéine virale.

La technique s'avère effectivement performante pour déceler des variations de bio-production et ce particulièrement dans le cas des protéines diversement glycosylées. Malgré sa lourdeur et l'investissement financier requis, elle pourrait donc assurer le monitoring fin de bioréacteurs, moyennant certaines améliorations.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)
Décembre 1993
Promoteur : M. Raes
Promoteur : L. Fabry

Au terme de ce travail, je tiens à remercier Mr. Remacle pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir orientée dans mon mémoire par ses idées stimulantes.

Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent à Martine Raes pour m'avoir soutenue tout au long de ce mémoire.

Merci également à Luc Fabry de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie Edouard pour son caractère toujours égal, sa constante disponibilité, mais surtout pour m'avoir enseigné les mystères de l'électrophorèse bidimensionnelle.

Grand merci à Nathalie, Eric, Maggi, Patsy, Olivier, Isabelle et Barbara qui m'ont encouragée et aidée jusqu'au bout.

Je remercie Marc Dieu dont les connaissances en informatique m'ont été d'une grande aide.

Je tiens aussi à remercier Andrée Houbion pour m'avoir appris les secrets de la culture cellulaire.

Merci à tous les membres du laboratoire pour leur gaieté, leur enthousiasme et leur écoute.

Enfin, une pensée plus particulière pour ma maman et mon frère Christophe qui se sont investis dans la dactylographie ainsi que pour leur soutien moral quotidien.

TABLE DES MATIERES

Avant-propos 1

INTRODUCTION

1. PRODUCTION DE PRODUITS RECOMBINANTS A INTERET PHARMACEUTIQUE ET/OU THERAPEUTIQUE 3

1.1. LES VECTEURS D'EXPRESSION 4
1.1.1. Les bactéries 4
1.1.2. Les levures 7
1.1.3. Les cellules de mammifères 8
1.1.4. Les cellules d'insectes 10

1.2. CULTURE DE CELLULES DE MAMMIFERES DESTINEES A LA BIO-PRODUCTION 11
1.2.1. Développement de milieux sans sérum 12
1.2.2. Cellules adhérentes ou non adhérentes 14

1.3. PURIFICATION ET CONTRÔLE DE QUALITE DES PRODUITS RECOMBINANTS 17
1.3.1. Purification des produits recombinants 17
1.3.2. Contrôle de qualité des produits recombinants 19

2. PRESENTATION DU SYSTEME DE BIO-PRODUCTION PROPOSE PAR SKB 20

3. L'ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE, UNE TECHNIQUE PROMETTEUSE 23

3.1. APPLICATIONS CLINIQUES 23

3.2. APPLICATIONS DANS LA RECHERCHE FONDAMENTALE. 26

4. OBJECTIF DU TRAVAIL 29

MATERIEL ET METHODE

1 . CULTURE DES CELLULES CHO 30

1.1. SOUCHE DE CELLULES CHO 30

1.2. MATERIELS 30

1.3. METHODE 31
1.3.1. CHO non recombinantes 31
1.3.2. CHO recombinantes 32

2. DOSAGE DES PROTEINES SELON LA METHODE DE BRADFORD 34

2.1. PRINCIPE 34

2.2. MATERIELS 34

2.3. METHODE 35

3. ELECTROPHORESE A DEUX DIMENSIONS 36

3.1. PRINCIPE 36
3.1.1. Intérêts de l'électrophorèse bidimensionnelle 36
3.1.2. La préparation des échantillons 36

3.2. MATERIELS 40
3.2.1. Solutions pour la première dimension 40
3.2.2 Solutions pour la seconde dimension 43

3.3. METHODE 45
3.3.1. Première dimension 45
3.3.2. Deuxième dimension 47

4. COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE 50

4.1. MATERIELS 50

4.2. METHODE 50

5. COLORATION A L'ARGENT 51

5.1. PRINCIPE 51

5.2. MATERIELS 51

5.3. METHODE 54

6. WESTERN BLOTTING 55

6.1. PRINCIPE 55

6.2. MATERIELS 55

6.3. METHODE 58
6.3.1. Transfert 58
6.3.2. Traitement et révélation 59

7. ANALYSE DES GELS A L'AIDE DU LOGICIEL BIOIMAGE 61

7.1. ACQUISITION DU GEL 61

7.2. DETERMINATION DES TACHES ET QUANTIFICATION 61

7.3. COMPARAISON DES GELS 62

RESULTATS

1. DESCRIPTION DES DIFFERENTS ECHANTILLONS 63

1.1. CULTURE EN ADHERENCE 64

1.2. CULTURE EN SUSPENSION 64
1.2.1. Echantillons de spinner 64
1.2.2. Echantillons de bioréacteur 65
1.2.3. Protéine purifiée 66

2. CONCENTRATION DU SURNAGEANT 68

2.1. PROTOCOLE DE PRÉPARATION DE SURNAGEANTS DE CULTURE POUR GELS 2D (MILLIPORE) 68

2.2. PRECIPITATION AU TCA ET FILTRATION SUR CENTRIPREP 10 73

2.3. PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM 76

2.4. CONCENTRATION A L'AIDE DE SEPHADEX 76

3. GELS A DEUX DIMENSIONS ET WESTERN BLOTTING 78

3.1 GRADIENT DE PH 78
3.1.1. Composition des gels 78
3.1.2. Propriétés des gels 79
3.1.3. Gels d'électrophorèse à deux dimensions 80
3.1.4. Western blotting 81
3.1.4. Colorations 82

4. RESULTATS 83

4.1. PROTEINE PRODUITE ET PURIFIEE A PARTIR DU MILIEU SANS SERUM 83
4.1.1. Gels à deux dimensions 83
4.1.2. Western blottings 83
4.1.3. Superposition gel bidimensionnel/Western Blotting 84

4.2. CULTURE I EN PERFUSION AU JOUR 5 ET AU JOUR 20 84
4.2.1. Gels à deux dimensions 84
4.2.2. Western blottings 85
4.2.3. Superposition gel bidimensionnel/Western blotting 87

4.3. CULTURE II EN PERFUSION AU JOUR 7 ET AU JOUR 20 87
4.3.1. Gels à deux dimensions 87
4.3.2. Western blottings 88

4.3.3. Superposition gel bidimensionnel/Western blotting 89

4.4. COMPARAISON DES CULTURES I ET II EN PERFUSION AU JOUR 20 90
4.4.1. Gels à deux dimensions 90
4.4.2. Western blottings 90

4.5. CULTURE EN BATCH AU JOUR 3 91
4.5.1. Gels à deux dimensions 91
4.5.2. Western blottings 92
4.5.3. Superposition gel bidimensionnel/Western blotting 93

4.6. PROTEINE PRODUITE ET PURIFIEE A PARTIR DU MILIEU SANS SERUM (DEGRADEE OU NON) 93
4.6.1. Gels à deux dimensions 93
4.6.2. Western blotting 94
4.6.3. Superposition gel bidimensionnel / blotting 95

CONCLUSION 96

LISTE DES ABBREVIATIONS

APS	Persulfate d'ammonium
BRP	Bacteriocin Release Protein
CHO	Chinese Hamster Ovary
DHFR	Dihydrofolate reductase
ECL	Enhanced Chemiluminescence
IEF	Isoélectrofocalisation
KD	Kilo dalton
LBr	Tampon de lyse
MM	Masse moléculaire
PI	Point isoélectrique
PM	Poids moléculaire
PVDF	Difluorure polyvinylidène
SAB	Albumine sérique bovine
SB	Sérum bovin
SDS	Dodécyl-Sulfate de sodium
TBS-T	TBS + Tween 20 0,1%
TCA	Acide trichloroacétique
TNF	Tumor Necrosis Factor

Avant-propos

Le système de séparation et d'analyse des protéines en gels à deux dimensions constitue un outil d'analyse des protéines cellulaires extrêmement performant car il permet de visualiser et de quantifier plusieurs centaines de protéines sur une seule analyse. De plus, il peut donner des indications précieuses sur les caractéristiques physico-chimiques des protéines tant du point de vue de son hétérogénéité que de sa charge et de sa masse, qui sont les deux paramètres mis en jeu pour la séparation dans les deux dimensions. Cette technique a été développée pour des applications de recherche au laboratoire de biochimie cellulaire des facultés de Namur.

D'autre part, la production de vaccins basée sur l'expression de protéines recombinantes dans des cellules en culture est en plein développement. La firme Smith Kline Beecham Biologicals a été une des premières à lancer la production du vaccin de l'hépatite B produit sur cultures de cellules. Elle développe actuellement d'autres productions de protéines virales en utilisant des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) comme système de production.

Le laboratoire de technologie de culture cellulaire de la firme Smith Kline Beecham Biologicals est chargé d'installer les meilleures conditions de culture de ces cellules afin d'obtenir une production importante et reproductible de l'antigène et en évitant toute dégradation. Le laboratoire était confronté à la production d'un antigène constitué d'une protéine particulièrement hétérogène. La question qui nous était posée était de pouvoir analyser l'hétérogénéité de cette protéine et d'examiner ses caractéristiques physico-chimiques en utilisant l'analyse en gels en deux dimensions. L'intérêt pour le laboratoire industriel étant de pouvoir relier ces analyses avec les conditions de culture ayant servi à l'obtention de ces protéines et de là à pouvoir standardiser celles-ci en prévision d'une production industrielle. Le travail fut donc d'examiner comment les techniques d'analyse basées sur la séparation des protéines en deux dimensions pourraient aider un laboratoire industriel de fermentation et quelles pourraient être les perspectives d'une telle approche pour suivre la qualité de la production par la suite.

Le contexte de ce travail effectué en collaboration avec l'industrie sur un processus industriel en développement explique que certains renseignements concernant la nature de cet antigène et les conditions exactes de culture n'ont pas été présentées dans ce travail.

INTRODUCTION

1. PRODUCTION DE PRODUITS RECOMBINANTS A INTERET PHARMACEUTIQUE ET/OU THERAPEUTIQUE

La production d'une protéine recombinante passe par une série d'étapes :

- Par génie génétique, il est possible d'obtenir des cellules pouvant produire la protéine souhaitée.

- Un travail de mise au point et de développement va permettre l'élaboration d'un système de culture adapté à la production à grande échelle.

- Une fois, la protéine recombinante synthétisée, elle devra subir une phase de purification.

- Un contrôle de qualité sur le produit purifié final sera alors effectué.

1.1. LES VECTEURS D'EXPRESSION

Autrefois, la seule manière d'obtenir une molécule d'intérêt commercial ou fondamental était de l'extraire directement de sa source naturelle ou de la synthétiser chimiquement.

Actuellement, nombreuses de ces molécules sont produites à l'échelle industrielle par génie génétique. L'expression de gènes étrangers par une cellule procaryote ou eucaryote trouve son application aussi bien dans l'industrie pharmaceutique (médicaments, vaccins) qu'en agriculture (amélioration des plantes, résistance aux maladies, aux insectes ...). La bactérie a été le premier système employé.

1.1.1. Les bactéries

La bactérie *E. coli* semblait être un organisme de choix pour la production d'hormones telles la somatomédine, l'insuline humaine et l'hormone de croissance humaine. En effet, cette bactérie dont la génétique est très bien connue, peut produire une quantité significative de ces protéines. Par exemple, le TNF et le lysozyme, sont deux produits recombinants obtenus chez *E. coli* et déjà commercialisés. Toutefois, une bactérie est incapable d'effectuer correctement les modifications post-traductionnelles nécessaires pour générer des protéines plus complexes, telles qu'elles se déroulent dans les cellules eucaryotes.

En particulier, l'incapacité de la bactérie à former des ponts disulfures pose un premier problème. Cependant ceci peut être résolu dans certains cas en réalisant le repliement de la protéine *in vitro* (Arathoon et Birch, 1985)

En outre, les bactéries ne peuvent effectuer la glycosylation. Il peut en résulter une perte de fonction ou encore des propriétés antigéniques différentes de la protéine recombinante, ce qui limite fortement les applications thérapeutiques de certaines protéines recombinantes.

Il semble également que la production de protéines recombinantes soit limitée dans *E. coli* par la formation d'agrégats cytoplasmiques ou

corps d'inclusion. Ceux-ci sont produits suite à une surexpression des protéines procaryotiques ou eucaryotiques. Ces protéines rendues inactives et insolubles s'accumulent dans le cytoplasme de la bactérie et les agrégats peuvent atteindre la taille d'une cellule bactérienne. Les protéines peuvent être resolubilisées par des solutions dénaturantes telle que l'urée 6M, mais cela constitue une étape difficile voir impossible à réaliser pour la plupart d'entre elles. La manière la plus facile de minimiser la formation de ces corps d'inclusion est de réduire la température de croissance de la bactérie à 30°C. La production de corps d'inclusion n'est pas directement corrélable avec le taux de production et la taille de la protéine (Schein, 1989). Kane et Hartley (1988) ont également montré qu'il n'existait pas de relation entre la formation des corps d'inclusion et

- le promoteur utilisé pour réguler l'expression
- la formation de ponts disulfures : en effet certaines protéines ne contenant pas de ponts disulfures sont présentes dans le précipité.
- la masse moléculaire
- le niveau d'expression

Il y a cependant quelques avantages commerciaux évidents à la formation de ces agrégats, particulièrement pour les produits de faible coût. Tout d'abord, l'élimination d'étapes de purification permettrait un gain considérable de temps et d'argent ainsi qu'une diminution des pertes du produit nécessaire à son élaboration. Ensuite, il semble évident que les protéases ne dégradent pas les protéines présentes sous forme d'agrégat. Ceci présente un avantage puisque la stabilité et l'accumulation du produit sont plus élevées et les pertes dues à l'altération protéolytique sont significativement réduites. Par exemple, l'insuline et la transcriptase inverse du virus HIV ont tendance à former ces agrégats cytoplasmiques et sont donc moins sujets à la dégradation protéolytique.

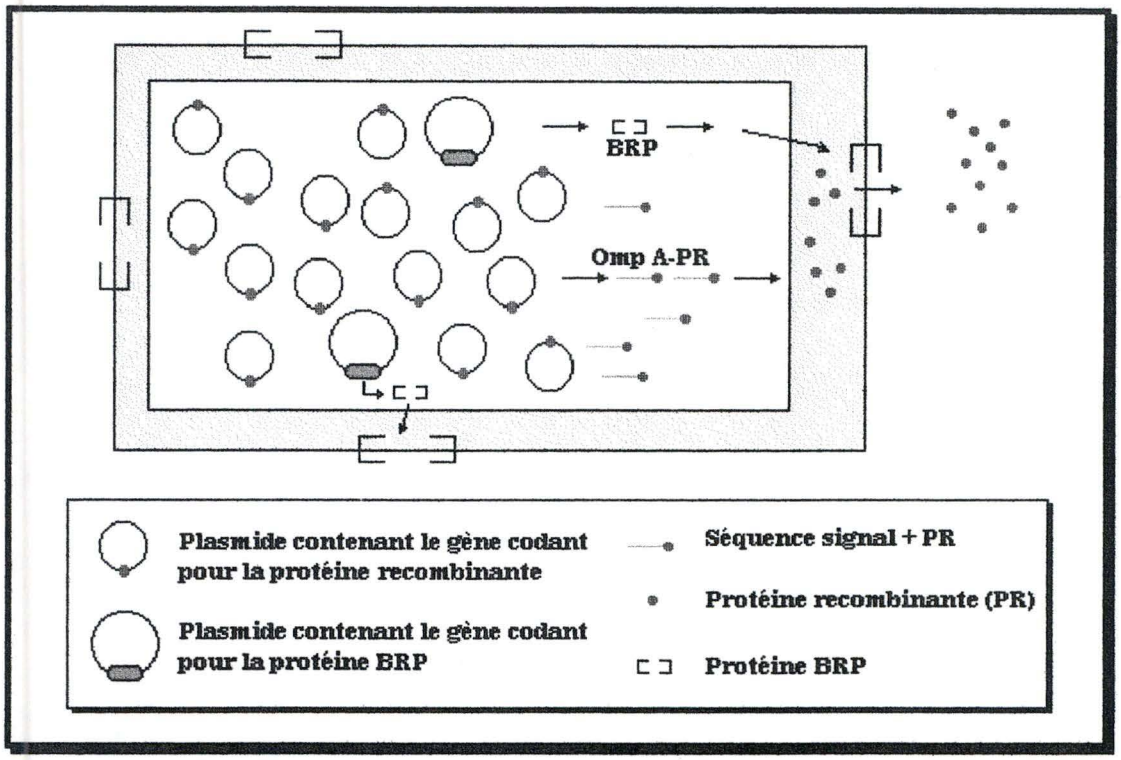


Figure I–1 : Système bicomposé qui permet à *E. coli* d'effectuer la sécrétion d'une protéine recombinante (D'après Bialy, 1989)

La bactérie gram-négative *E. coli* présente en outre souvent des difficultés en ce qui concerne la sécrétion de la protéine recombinante. En effet, la destination finale des protéines produites par les organismes gram-négatifs est habituellement le périplasme puisque celui-ci est bordé par une membrane externe sélectivement perméable. Par contre, les organismes gram-positifs qui ne présentent pas de membrane externe n'éprouvent aucune difficulté à sécréter des protéines recombinantes dans le milieu extérieur (Nielsen et Lampen, 1983). Pour solutionner le problème d'*E. coli*, il est possible de la manipuler afin qu'elle sécrète efficacement des protéines dans le milieu de culture. C'est un système bicomposé qui a permis à *E. coli* d'effectuer cette sécrétion. Un premier plasmide exprime la protéine BRP (Bacteriocin Release Protein). Celle-ci va activer la phospholipase de la membrane extérieure, ce qui va perméabiliser les membranes internes et externes de la bactérie. Un deuxième plasmide contient le gène d'intérêt fusionné à un peptide signal (Omp A) qui va permettre à la protéine recombinante de pénétrer dans le périplasme, puis d'être sécrétée vu que la membrane externe est maintenant perméabilisée de manière non sélective (voir figure I.1).

Un système de sécrétion de ce type offre un nombre d'avantages potentiels à la surproduction de protéines étrangères. En effet, le processus de purification devient plus simple. De plus, les protéines qui tendent à former des corps d'inclusion (agrégats cytoplasmiques) peuvent être libérées de la cellule avant qu'elles ne s'accumulent sous forme de précipité (Bialy, 1989).

Un autre système bactérien fréquemment utilisé pour la bioproduction est celui de *Bacillus subtilis*. Grâce à sa capacité de sécréter des protéines directement dans le milieu de culture, *Bacillus subtilis* constitue un vecteur d'expression efficace. Habituellement, les protéines recombinantes sécrétées maintiennent une forme biologiquement active et le processus de purification est grandement simplifié. Cependant deux restrictions majeures limitent l'application de *Bacillus subtilis* en tant que micro-organisme producteur :

- Tout d'abord, *Bacillus subtilis* produit et sécrète de grandes quantités de protéases extra cellulaires, lesquelles dégradent les protéines sécrétées. Six protéases ont été identifiées chez

Advantages

High growth rate: doubling time approx. 20 min (*see* Section 2.3.8)

Reliable, simple and cheap growth medium

High specific productivity of selected peptides/proteins

Disadvantages

Deficient post-translational modification:
- Proteolytic cleavage
- Subunit association
- Glycosylation
- Acylation

Products intracellularly located: extraction from cell lysate

Endotoxins produced: may result in product contamination

Table I–1 : Avantages et désavantages d'utiliser les bactéries pour produire des protéines recombinantes.

Bacillus subtilis. La construction d'une souche déficiente en cinq protéases a toutefois permis d'éliminer 99% de l'activité protéolytique extra cellulaire (Wu et al, 1991).

- Ensuite, l'absence de vecteurs inductibles bien régulés limite l'application à grande échelle du système *Bacillus subtilis.* Pour résoudre ce problème, quelques vecteurs inductibles ont été développés, par exemple, grâce à la région régulatrice d'un gène inductible par le sucrose chez *B. subtilis* (voir par exemple, Edelman et al, 1988).

- Enfin, le problème des modifications post-traductionnelles reste toujours d'application comme pour *E. coli.*

D'autres modèles cellulaires eucaryotiques ont donc été développés pour pallier en premier lieu les inconvénients liés aux procaryotes, résumés à la table I.1. Parmi ceux-ci, citons la levure qui est devenue l'un des plus importants micro-organismes produits à l'échelle industrielle.

1.1.2. Les levures

Comme pour les bactéries, la culture des levures est relativement simple. La plus connue est *Saccharomyces cerevisiae* (la levure de boulanger). La simplicité relative de son matériel génétique et son absence de pathogénicité en font un organisme idéal pour l'expression des protéines à visée thérapeutique. En effet, les préparations issues d'*E. Coli* peuvent contenir des pyrogènes, et les systèmes mammifères présente le risque potentiel de contenir des oncogènes ou des ADN viraux qui peuvent se révéler pathogènes.

Toutefois *Saccharomyces cerevisiae* présente également certains inconvénients pour une production à grande échelle de protéines étrangères car elle ne possède pas de promoteur à la fois fort et étroitement régulable. De plus, si elle est bien capable d'effectuer des glycosylations post-traductionnelles, elle produit souvent des protéines hyperglycosylées (pour une revue, voir Morelle, 1993). Ceci risque

d'affecter la reproductibilité de la production (Ratner, 1989) et pose toujours le problème des modifications des propriétés antigéniques. Il semble également que *Saccharomyces cerevisiae* n'atteigne que difficilement de hautes densités cellulaires. On cherche donc maintenant à développer d'autres systèmes possédant de meilleures caractéristiques commerciales. C'est notamment le cas de *Pichia pastoris*. En effet cette levure présente de nombreux avantages :

- l'expression de son matériel génétique est efficace, étroitement régulée et peut donc être exploitée facilement.
- Elle sécrète des protéines en quantités importantes.
- Elle peut croître en haute densité sans réduction de productivité.
- Elle peut pousser sur des substrats bon marché tel le méthanol (pour une revue, voir Morelle, 1993)

De nombreux vaccins tels que celui contre l'hépatite B sont produits à l'échelle commerciale à partir de la levure. Mais les levures sont également utilisées au stade de recherche pour tenter d'élaborer des vaccins contre la malaria, maladie pour laquelle il n'existe toujours pas de vaccin.

Nous l'avons vu, la levure est un organisme de choix pour la production des protéines eucaryotiques, mais la sécrétion n'est pas toujours parfaite et surtout, une glycosylation différente rend problématique la production de glycoprotéines à visée thérapeutique. Aussi a-t-on essayé d'avoir recours aux systèmes plus complexes que sont les cellules de mammifères, malgré les difficultés inhérentes à cette complexité.

1.1.3. Les cellules de mammifères

Les cellules d'eucaryotes supérieurs ne sont malheureusement pas aussi faciles à cultiver et à maîtriser que la levure ou la bactérie et leur

Viral Vaccines	Human and veterinary
Antibodies	Monoclonal antibodies
Interferons	Fibroblast and lymphoblastoid
Enzymes	e.g. Fibrinolytic
Whole cells	Cells and organelles
Insecticides	Insect viruses
Immunoregulators	e.g. Interleukins
Hormones	e.g. Insulin
Growth Factors	e.g. Platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), nerve growth factor (NGF)

Table I–2 : Différents produits qu'il est possible d'obtenir à partir des cultures de cellules animales (D'après Griffiths, 1985).

emploi est en général beaucoup plus onéreux, du fait d'exigences très particulières dans les milieux et les conditions de culture. Cependant les cellules de mammifères sont déjà utilisées pour produire une série de produits différents, comme résumé dans la table 1.2.

Parmi les différentes lignées de cellules de mammifères disponibles, les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) ont été particulièrement utilisées pour l'expression de gènes étrangers et ceci aussi bien dans la recherche que pour les applications industrielles. Les gènes, ayant une importance médicale récemment exprimés dans les cellules CHO sont par exemple les gènes codant pour le facteur VIII, le plasminogène, l'antigène CD4 et l'interféron. Les cellules CHO présentent de nombreux avantages :

- Elles sont capables d'effectuer la glycosylation
- Elles sont versatiles : leur croissance peut s'effectuer aussi bien en adhérence, qu'en suspension, ou sur billes microporteuses ("microcarriers")
- Elles montrent un faible taux de transformation spontanée
- Les produits recombinants synthétisés par les cellules CHO sont très semblables aux protéines natives (Tilkins et al, 1992)
- Les gènes transfectés dans ces cellules sont généralement exprimés de façon stable
- Leur transformants sont facilement obtenus. Ceci est dû au fait qu'ils forment un très grand nombre de colonies (Hata et al, 1992)
- Elles ont en principe, un potentiel prolifératif indéfini, contrairement aux souches classiques de fibroblastes humains tels que les MRC-5.

PRODUCT*	EXPRESSION SYSTEM
Immunomodulators	
Interferon-alpha	E. coli, yeast
Interferon-beta	Mouse cells, CHO, mammalian cells
Interferon-gamma	E. coli, yeast, CHO, mammalian cells
IL-1	E. coli, yeast, surface adherent cells
IL-2	E. coli, yeast, surface adherent cells, P. pastoris
IL-3	E. coli, yeast, CHO
IL-6	E. coli
TNF	E. coli, yeast, P. pastoris
TNF-beta	E. coli
Growth Factors	
G-CSF	E. coli, yeast, CHO
M-CSF	E. coli, yeast, CHO
GM-CSF	E. coli, yeast, CHO
Fibroblast growth factor	E. coli, yeast
TGF-alpha	E. coli, yeast
TGF-beta	Yeast
Epidermal growth factor	E. coli, yeast, animal cells
Platelet-derived growth factor	E. coli, yeast, surface adherent cells
Connective tissue activator peptide	E. coli
Angiogenin	E. coli,
differentiation-inducing factor	Surface adherent cells
Fibronectin	Yeast
EPO	Surface adherent cells, CHO
Hormones	
Insulin-like growth factor 1	E. coli, yeast, P. pastoris
Insulin-like growth factor 2	E. coli, yeast
Human growth hormone	E. coli, yeast, CHO, surface adherent cells, transgenic mice
hGH releasing factor	E. coli, yeast
Somatostatin	E. coli
Calcitonin	E. coli, yeast
Human chorionic gonadotrophin	Yeast, murine cells
Luteinizing hormone	Murine cells
Relaxin	E. coli
Insulin	E. coli, yeast
Proinsulin	E. coli, yeast

PRODUCT	EXPRESSION SYSTEM
Hormones (cont'd)	
Beta-endorphin	E. coli
Blood proteins	
Human serum albumin	E. coli, yeast, potato, tomato, P. pastoris, H. polymorpha, K. lactis
Hemaglobin	E. coli, yeast, transgenic mice and pigs
Antithrombin III	CHO
Factor VII	BHK, yeast
Factor VIII	Surface adherent cells, CHO, S. pombe
Factor IX	BHK, transgenic sheep
Factor XIII	E. coli, yeast
von Willebrand factor	Surface adherent cells
t-PA	E. coli, yeast, CHO, transgenic mice
Urokinase	Surface adherent cells
Prourokinase	E. coli, surface adherent cells
Streptokinase	P. pastoris
Hirudin	Yeast, H. polymorpha
Protein C	Surface adherent cells
Thrombomodulin	Mammalian cells
Alpha-1-antitrypsin	E. coli, yeast, transgenic sheep
Apolipoprotein A-I	E. coli
Apolipoprotein A-IV	E. coli
Apolipoprotein E	E. coli
Atrial natriuretic factor	E. coli
Platelet factor 4	E. coli
Inhibitors	
Mullerian inhibitingsubstance	CHO
Elastase inhibitor	E. coli
Lipocortin	E. coli
Enzymes	
Lysozyme	E. coli, yeast
SOD	E. coli, yeast, surface adherent cells, P. pastoris
Renin	E. coli, CHO
Gastric lipase protein	Yeast
Vaccines	
Hepatitis B	CHO, yeast, P. pastoris, H. polymorpha
Whooping cough	E. coli
Malaria	Yeast

COMPANIES DEVELOPING PRODUCT EXPRESSION SYSTEMS. Interferon-alpha: Hoffmann-la Roche, Schering-Plough, Takeda. Amgen,Biogen, Genentech, Cheil Sugar, Collaborative Research, Enzo, Interpharm, Inter-Yeda, Kabi,Antibioticos, Behringwerke, Bionative, Bristol- Myers, Chiron, Ciba, Green Cross, Hayashibara,Hilleshog, Hoechst, Sclavo, Sidus, Wellcome,BioBras, BioSidus; **Interferon-beta:** Chiron/Triton, Kyowa Hakko, Toray, Bioferon, Biogen, Cheil Sugar, Inter-Yeda; **Interferon-gamma:** Biogen, Amgen, Bioferon, Genentech, Interferon Sciences, Kyowa Hakko, Meija Seika, Shionogi, Suntory, Takeda, Transgene, Behringwerke, BioSidus, Cheil Sugar, Green Cross, Inter-Yeda, Kanegafuchi Chemical, Sclavo, Viragen; **IL-1:** Syntex/Immunex, Dainippon, Repligen, SKB, Cistron; **IL-2:** Chiron, Amgen, Biogen, Immunex, Ortho, Takeda, Ajinomoto, Antibioticos, DuPont, Genentech, Genzyme, Roussel-UCLAF, Transgene, Viragene, Roche; **IL-3:** Hoechst-Roussel, Biogen, DNAX, Immunex, Schering-Plough, Genetics Institute; **IL-6:** Ajinomoto, Allelix, Genetics Institute, Ares-Serono; **TNF:** Asahi, Biogen, Cetus, Dainippon, Genentech, Mochida, Phillips Petroleum, Wedley, Celltech, Chiron, Mizuno, Nihon Seiyaku, Sclavo, Yamanouchi; **TNF-beta:** Genentech, Kanegafuchi Chemical; **G-CSF:** Amgen/ Kirin/Roche, Chugai, Biogen, Immunex, Kyowa Hakko; **M-CSF:** Chiron, Genetics Institute, Morinaga Milk, Biogen, Immunex; **GM-CSF:** GI/Sandoz/ Schering-Plough, Immunex/Hoechst, Immunex/Roche, Amgen/Kirin, Behringwerke, Biogen, Integrated Genetics, SKB, Toray, Zymogenetics; **Fibroblast Growth Factor:** CelBio/Kaken, Synergen/Zyma, Amgen, California Biotechnology, Creative Biomolecules, Takeda, Zymogenetics; **TGF-alpha:** Collagen, Bristol-Myers, Ace Pharamceuticals, Genentech, Toa Nenryo Kogyo, Zymogenetics; **TGF-beta:** Biogen/BASF/Suntory, Chiron/ Cutter, Genentech/ Mitsubishi/Boehringer Ingleheim, Zymogenetics; **Collagen Epidermal Growth Factor:** Earth Pharmaceutical, Wakunaga, Amgen, Chiron, Ethicon; **Platelet-Derived Growth Factor:** Amgen, Chiron, Creative Biomolecules, Epoulon, Roche, Zymogenetics; **Connective Tissue Activator Peptide:** Chiron, Creative Biomolecules; **Angiogenin:** Hoechst, Monsanto, Synergen; **Differentiation-Inducing Factor:** Asahi Chemical; **Fibronectin:** Delta Biotechnology; **EPO:** Amgen/Kirin, Ortho, Behringwerke, Chugai, Genetics Institute, Integrated Genetics, Biogen, CaliforniaBiotechnology, Codon, Hoechst; **Insulin-like Growth Factor 1:** Chiron/Ciba, Genentech, Amgen, Biogen, Biotechnology, Creative Biomolecules, Fujisawa, Kabigen; **Insulin-like Growth Factor 2:** Chiron, Eli Lilly, Epoulon; **Human Growth Hormone:** Celltech/Serono, Eli Lilly, Genentech, Novo Nordisk/Yamanouchi/CL Pharma/Wellcome, Biotechnology General, Kabi Vitrum, California Biotechnology, DuPont, Sanofi, Sumitomo, CheilSugar, Elf Aquitaine, Ferring, Hoechst, Roche, Mitsui Toatsu, Tosoh, ABI Biotechnology; **hGH Releasing Factor:** Chiron, Hoechst, Molecular Genetics, Unigene; **Somatostatin:** Sanofi, Schering-Plough, Ares-Serono, Merck, Sandoz; **Calcitonin:** Amgen, Celltech, Chiron, Ciba, Genentech, Menarini, Sankyo, Takara Shuzo, Unigene, Suntory; **Human chorionic gonadotrophin:** Integrated Genetics, Monsanto; **Luteinizing hormone:** Integrated Genetics; **Relaxin:** Genentech/Mitsubishi/Boehringer Ingelheim; **Insulin:** Eli Lilly, Novo Nordisk, Hoechst, Zymogenetics, BioBras, Cheil Sugar, Chiron, Collaborative Research, Genentech; **Proinsulin:** Eli Lilly, Chiron, Genentech; **Beta-endorphin:** Endorphin Inc.; **Human serum albumin:** Chiron, Cheil Sugar, Delta, Genentech, Upjohn,Mitsubishi Kasei, Toa Nenyro Kogyo, Green Cross; **Hemaglobin:** Delta, Somatogen, DNX; **Antithrombin III:** Behringwerke; **Factor VII:** Zymogenetics, Novo; **Factor VIII:** Genetics Institute/Baxter, ABI Biotechnology, CDC Life, Chiron, Genentech, Gist-brocades, Green Cross, Integrated Genetics, Kabigen, Novo Nordisk, Rorer, Teijin, Transgene, Biogen; **Factor IX:** Celltech, Chiron, Genentech, Pharmaceutical Proteins, Transgene, Zymogenetics; **Factor XIII:** Behringwerke, Zymogenetics; **von Willebrand Factor:** Genetics Institute Factor; **t-PA:** Genentech/Mitsubishi/Boehringer Ingleheim, GI/Wellcome/Sumitomo, Biogen, Integrated Genetics, Kyowa Hakko, Mitsui Toatsu, SKB, BioPool, Celltech, Cheil Sugar, Chiron, Ciba, Creative, Daiichi, Eli Lilly, Green Cross, Invitron, Kavitrum, Menarini, Toyobo, Upjohn, Kabigen; **Urokinase:** Abbott, Green Cross; **Prourokinase**: Genentech, Gruenenthal; **Streptokinase:** Phillips Petroleum; **Hirudin:** Ciba, Hoechst, Gen biotec, Plantorgan, Sotragene, Rhein Biotech; **Protein C:** Behringwerke/Hoechst Japan, Eli Lilly, Integrated Genetics, Zymogenetics; **Thrombomodulin:**Asahi Chemical; **Alpha-1-Antitrypsin:** Zymogenetics, Chiron, Collaborative, Cooper Labs, Genentech, Pharmaceutical Proteins, SKB, Transgene; **Apolipoprotein A-I:** Mitsubishi Chemical; **Apolipoprotein A-IV:** Bio-technology General; **Apolipoprotein E:** Bio-technology General, Mitsubishi Chemical; **Atrial Natriuretic Factor:** California Biotechnology, Merck & Co., Monsanto, Suntory, Asahi Chemical, Bayer, BioMega, Ciba, Merrell Dow, SKB, Upjohn; **Platelet Factor 4:** Repligen; **Mullerian Inhibiting Substance:** Biogen; **Elastase Inhibitor:** Ciba, Plantorgan; **Lipocortin:** Biogen, Sclavo; **Lysozyme:** Takeda; **SOD:** Bio-technology General, Chiron/Gruenenthal, Enzo, Carlbiotech, Ajinomoto, Allelix/DDI, Nippon Kayaku, Suntory, Syn-Tek, Toyo Jozo, Toyo Soda, Ube Kosan; **Renin:** California Biotechnology, Upjohn; **Gastric Lipase Protein:** Celltech; **Hepatitis B:** Merck/Chiron/Banyu/Shionogi, SKB/Biogen, Wyeth-Ayerst, Amgen/Ortho, Connaught, Genentech/Mitsubishi; **Whooping Cough:** Amgen; **Malaria:** Chiron/Biocine, Roche, SKB/Walter Reed, Behringwerke.

Table I–3 : Liste d'une série de produits recombinants avec leurs vecteurs d'expression correspondants (D'après Hodgson, 1993).

Outre les cellules de mammifères, signalons qu' il existe un autre système très performant utilisé pour la production de protéines, il s'agit des cellules d'insectes.

1.1.4. Les cellules d'insectes

Un autre système qui devient populaire dans les secteurs académiques et industriels est le système *baculovirus* - cellule d'insecte. Le *baculovirus* peut infecter une trentaine d'espèces de lépidoptères dont la plus utilisée *Spodoptera frugipera*. Différents vaccins peuvent être produits par le système *baculovirus* - cellule d'insecte, parmi ceux-ci on retrouve au stade expérimental le vaccin gp 160 HIV, le vaccin P24 HIV et le vaccin contre la malaria. L'utilisation des cellules d'insectes présente l'avantage d'une production en un cours laps de temps, de protéines complexes qui requièrent une glycosylation ou d'autres modifications post-traductionnelles pour acquérir leur activité biologique. Certains auteurs (Hodgson, 1993) donnent leur préférence aux cellules d'insectes, car celles-ci produiraient plus et plus rapidement que les cellules de mammifères. Par contre d'autres scientifiques (pour une revue, voir Morelle, 1993) pensent que les cellules de mammifères restent supérieures car la glycosylation s'effectuerait moins bien dans les cellules d'insectes. Le système baculovirus-cellule d'insecte n'a donc pas encore véritablement percé au niveau commercial.

Dès lors, dans la suite de cette introduction, nous nous limiterons aux cellules de mammifères, sachant que nous avons exclusivement travaillé sur les cellules CHO.

En guise de résumé, la table I.3 reprend une liste récente des systèmes d'expression utilisés pour la production au stade expérimental ou commercial de différentes protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique. La liste montre clairement que l'utilisation de *E. coli*, des levures et des cellules CHO prédomine. Elle illustre également la grande diversité des produits recombinants ainsi que le très grand nombre de compagnies impliquées dans leur bioproduction. Signalons également la bioproduction de produits recombinants dans les animaux transgéniques.

Amino acid	BHK 21 clone 13		LS		MRC-5	
	Y[a]	Percentage utilisation	Y	Percentage utilisation	Y	Percentage utilisation
L-Arginine	17.1	38	8.7	42	7.5	21
L-Cystine	81.2	100	20.0	80	5.6	74.5
L-Glutamine	5.4	97	0.72	98	0.9	73.0
L-Histidine	—	—	52.6	25	102.5	4.0
L-Isoleucine	18.1	62	10.2	65	4.0	33.0
L-Leucine	7.6	33	10.1	67	4.6	36.0
L-Lysine	21.7	17	13.0	60	6.2	26.0
L-Methionine	32.5	33	52.6	57	19.6	33.0
L-Phenylalanine	130.0	5	30.4	39	155.0	6.0
L-Threonine	38.2	22	26.4	33	6.3	35.0
L-Tryptophan	108.3	17	91.0	48	58.6	23.5
L-Tyrosine	20.3	45	71.5	17	17.3	13.0
L-Valine	20.3	24	17.0	50	5.9	30.0
	Arathoon and Telling (*1*)		Griffiths and Pirt (*45*)		Lambert and Pirt (*70*)	

[a] Grams dry weight of biomass per gram of amino acid utilised.

Table I–4 : Table reprenant les différents acides aminés, leur pourcentage d'utilisation ainsi que leur action sur la croissance des cellules (D'après Lambert et Birch, 1985).

Vitamin	Cell type[a]	Y[b]
Biotin	Mouse LS	2.0×10^5
	MRC-5	2.5×10^3
Folic acid	Mouse LS	2.4×10^5
	MRC-5	7.7×10^2
Nicotinamide	Mouse LS	4.8×10^2
	MRC-5	7.2×10^2
Pantothenic acid	Mouse LS	6.0×10^3
	MRC-5	1.4×10^3
Pyridoxine	Mouse LS	4.36×10^2
	MRC-5	3.7×10^2
Riboflavin	Mouse LS	2.0×10^4
Thiamine	Mouse LS	3.2×10^4
	MRC-5	1.3×10^3
Inositol	Mouse LS	1.56×10^2
	MRC-5	1.3×10^2
Choline	Mouse LS	0.7×10^2
	MRC-5	1.2×10^2

[a] From Blaker and Pirt (*18*), Blaker (*16*) for LS cells, Lambert and Pirt (*70*) for MRC-5 cells.

[b] Grams dry weight of biomass per gram of vitamin utilised.

Table I–5 : Table reprenant les différentes vitamines; leur pourcentage d'utilisation ainsi que leur action sur la croissance cellulaire (D'après Lambert et Birch, 1989).

1.2. CULTURE DE CELLULES DE MAMMIFERES DESTINEES A LA BIO-PRODUCTION

La culture cellulaire n'est pas une nouvelle technique. Elle date du début de ce siècle, et est restée longtemps une technique très empirique.

La culture cellulaire s'effectuait dans des milieux très divers, qui étaient d'abord enrichis par de hautes concentrations de différentes substances biologiques comme des extraits de viande ou encore des hydrolysats de tissus. Ces premiers milieux ne permettaient qu'une très faible croissance et ne pouvaient garantir la viabilité cellulaire que durant un temps limité. Les milieux de culture furent ensuite enrichis en sérum. Celui-ci, en général d'origine bovine, était utilisé pour maintenir les cellules hématopoiétiques en culture. Bien vite, on réalisa qu'il fournissait un excellent support pour d'autres types cellulaires (Bjare, 1992). Enfin, signalons que l'une des premières applications à grande échelle de la culture cellulaire, était la production de virus. Cette production de virus servait ensuite à la production de vaccins, tel celui de la poliomyélite. (1950)

Dans les années 1950-1960, les premières études pour définir les exigences plus particulières des cellules furent réalisées et n'ont fait que se développer depuis. Les tables I.4 et I.5 illustrent par exemple l'influence de la composition des milieux en acides aminés et en vitamines sur le rendement de la croissance cellulaire pour différentes lignées de cellules. On voit également que les exigences pour un acide aminé ou une vitamine donnés, varient considérablement selon les lignées. Le sérum est resté cependant pendant longtemps un additif indispensable pour assurer la croissance cellulaire, malgré sa composition mal définie.

Le développement de la culture de masse des cellules de mammifères dans le but de produire commercialement des protéines intéressantes du point de vue thérapeutique et diagnostic fut favorisé par l'avènement du génie génétique, ainsi que par la mise en évidence des avantages de l'utilisation des cellules de mammifères comme vecteur d'expression, comme nous l'avons exposé plus haut.

A ce point, il devint indispensable de revoir le problème des conditions de culture. L'objectif devient réaliser le meilleur compromis entre une bonne croissance cellulaire et les coûts de production acceptables, que ceux-ci soient liés à la phase de culture des cellules ou à la phase de purification du produit recombinant.

Nous n'observons ici que les deux aspects plus particuliers auxquels nous nous sommes intéressés dans notre mémoire :

- Le développement de milieux de culture sans sérum;
- Le mode de culture : les cultures adhérentes ou non-adhérentes.

1.2.1. Développement de milieux sans sérum

La présence de sérum dans le milieu de culture pose de nombreux problèmes :

- Le sérum est une mixture complexe d'une grande variété de constituants et plusieurs de ces composants ne sont que peu ou pas caractérisés.

- On observe une non reproductibilité des expériences réalisées. Cette non reproductibilité est due à une variation dans la composition des différents lots de sérum.

- La qualité du sérum peut être altérée par la présence accidentelle et parfois excessivement difficile à déceler de prions, virus ou mycoplasmes. La maladie des vaches folles dans le Royaume-Uni affectant précisément les bovins, source majeure de sérum, constitue un bel exemple de contamination possible.

- Le prix du sérum est très élevé, il peut représenter jusqu'à 10% du prix du produit final. En plus il subit de nombreuses fluctuations.

- La disponibilité du sérum pose également problème, ce qui aboutit parfois à de véritables trafics de sérum.

- La présence de sérum dans le milieu de culture va également avoir pour conséquence, une augmentation du prix du processus de purification (Down Stream Processing) (Hiller et al, 1991, Jayme, 1990, Tilkins et al, 1992), puisqu'il faut éliminer tous les composants du sérum dans le produit final, outre les autres contaminants.

- La contamination de produits pharmaceutiques par d'infimes quantités de composants du sérum peut en affecter sérieusement la qualité. C'est pourquoi des règlements internationaux régissant la production des vaccins limitent la quantité de constituants du sérum présents dans le produit final pour ce qui est des vaccins injectables. Et ceci pour éviter entre autres, de provoquer d'éventuelles réactions allergiques (Bjare, 1992)

Pour faire face à ces problèmes, des milieux sans sérum, faiblement concentrés en protéines ont été développés durant ces dernières années. Ces milieux doivent idéalement permettre d'amplifier le taux de production de la protéine recombinante, la croissance cellulaire et la densité cellulaire (Tilkins et al, 1992).

Etant donné que la fonction principale du sérum est de fournir différentes hormones, facteurs de croissance, qui vont stimuler la croissance cellulaire ainsi que d'autres facteurs telle la transferrine, la majorité des milieux sans sérum contiennent de l'insuline qui a pour but de réguler l'utilisation du glucose et de la transferrine, molécule indispensable au transport du fer. Les milieux sans sérum peuvent également contenir de l'albumine et de la fibronectine, deux protéines possédant de nombreuses fonctions telles que :

- Créer une matrice qui va permettre l'attachement des cellules

- Transporter des lipides et des facteurs de croissance

Table 2. Factors Stimulatory for Cell Lines in Serum-Free Media

Hormones	Concentration	Responsive Cell Lines
Insulin	0,1-10 µg/ml	All Lines
Glucagon	0,05-5 µg/ml	HC3-4S, HLE222, (MDCK)
Follicle Stimulating Hormone	0,05-0,5 µg/ml	M2R, TM4
Growth Hormone	0,05-0,5 µg/ml	TM4
Somatomedin C or MSA *	1-100 ng/ml	GH_3, TM4, (SV-3T3)
Epidermal Growth Factor	1-100 ng/ml	Hela, MCF-7, TM4, HC3-4S, HLE222, BHK, (MDCK)
Fibroblast Growth factor	1-10 ng/ml	GH_3, Hela, C8, ZR-75-1, BHK, (MDCK)
Nerve Growth factor	1-10 ng/ml	M2R
Parathyroid Hormone	1-10 ng/ml	GH_3
Thyrotropin Releasing hormone	1-10 ng/ml	GH_3
Luteinizing Hormone Releasing Hormone	1-10 ng/ml	M2R
Prostaglandin $F_{2\alpha}$	1-100 ng/ml	MCF-7
Prostaglandin E_2	1-100 ng/ml	MDCK
Triiodothyronine	1-100 pM	GH_3, MDCK, ZR-75-1, HC3-4S, HLE222
Hydrocortisone	10-100 nM	Hela, MDCK, ZR-75-1, RF-1, HC3-4S, L6
Progesterone	1-100 nM	B10-4, (M2R)
Testosterone	1-10 nM	M2R
Estradiol	1-10 nM	ZR-75-1, (MCF-7)
Binding Proteins		
Transferrin	0,5-100 µg/ml	All Lines except L6
Fatty -Acid-Free Albumin *	0,5-2 mg/ml	SV-3T3, C8
Attachment factors Cold-insoluble Globulin	0,5-5 µg/ml	B10-4, MCF-7, RF-1, F9, HLE222, BHK, SV-3T3
Serum Spreading Factor	0,5-5 µg/ml	MCF-7, C6, (SV-3T3), (RF-1), (F9), (Hela)
Fetuin	1 mg/ml	L6

Concentrations given are the effective range for most of the cell lines listed. For any particular cell type, the original references given in Table 1 should be consulted for the optiman concentrations. Some of the lines also exhibit requirements for specific nutritional supplements or substrate notifications not listed in Table 2. Parentheses denote cell lines which are reported to respond to the indicated factor in serum-free medium under some set of conditions, but for which the factor is not included in the preferred serum-free medium formulation.
Multiplication Stimulating Activity (Dulak and Ternin, 1973).
* Added with 3-5 µg/ml linoleic acid.

Table I–6 : Facteurs de stimulation présents dans le milieu sans sérum.

- Absorber les composés toxiques

- Fournir une protection contre les forces de cisaillement générées dans le bioréacteur

Les milieux sans sérum sont aussi enrichis en divers sels minéraux, acides aminés L, lipides, carbohydrates, vitamines et facteurs de croissance. La table I.6 reprend la liste des principaux facteurs reconnus pour stimuler la croissance cellulaire et dont l'addition au milieu de culture permet de supprimer le sérum dans ces milieux. On constate encore une fois que les exigences particulières varient selon les lignées cellulaires.

Malgré l'ajout de molécules coûteuses et de suppléments lipoprotéiques, les milieux sans sérum restent meilleur marché que les milieux additionnés en sérum.

En effet, des quantités de sérum élevées sont utilisées alors que l'élaboration du milieu sans sérum ne requiert que d'infimes quantités de suppléments (Bjare, 1992). Mais l'ajout de protéines au milieu de culture pose le problème de leur source et de leur pureté, en particulier lorsqu'il s'agit de protéines extraites à partir de produits biologiques. Dans ce cas, comme pour le sérum il existe toujours un risque de contamination non souhaitée par des virus, prions, ...

Après avoir évoqué le problème des milieux de culture, nous évoquerons une question importante dans la réalisation et l'extension à grande échelle (souvent appelée "scaling up") des bioréacteurs à cellules de mammifères : ' faut-il cultiver les cellules en adhérence ou non ' ?

1.2.2. Cellules adhérentes ou non adhérentes

Il existe plusieurs types de cellules de mammifères. Certaines croissent strictement en adhérence. C'est le cas des fibroblastes humains (MRC5) ou de la lignée cellulaire de singe Vero, laquelle est capable de divisions infinies. D'autres, telles que les hybridomes, les myélomes, les cellules de reins de bébés hamsters (Baby Hamster Kidney), croissent exclusivement en suspension. D'autres encore, acceptent les deux

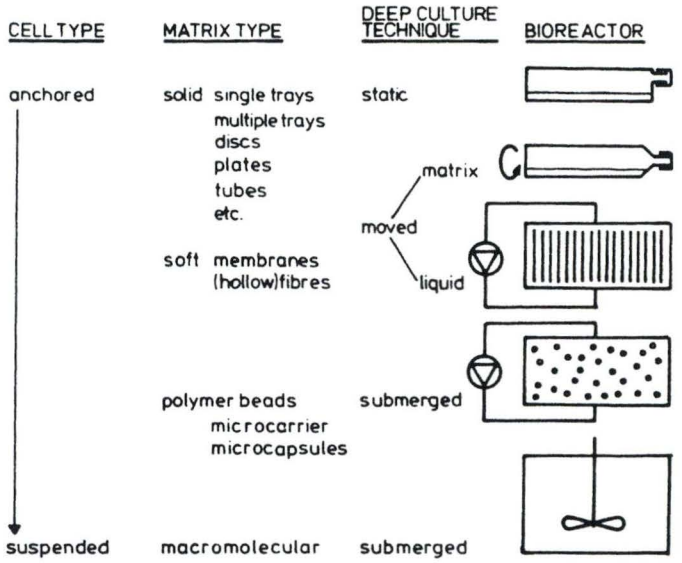


Fig. 2. Techniques used for deep culture of animal cells.

Figure I–2 : Différentes techniques utilisées pour la culture de cellules animales (D'après Katinger et Scheirer, 1989).

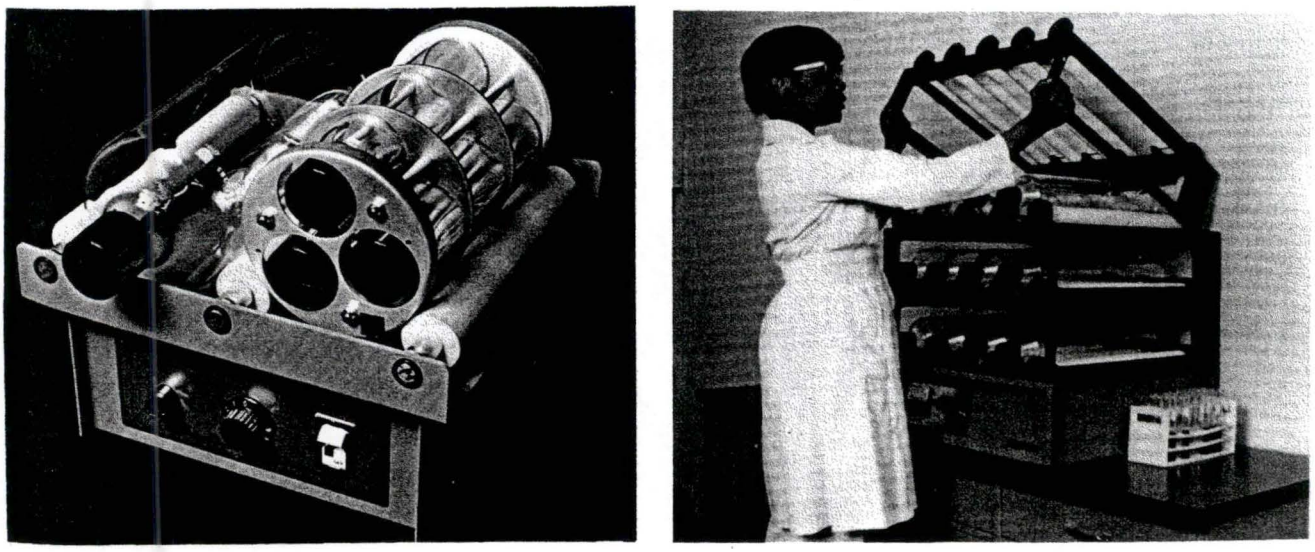


Figure I–3 : Roller bottles sur leur support (D'après Freshney, 1987):

systèmes. Citons les cellules ovariennes de hamsters chinois (CHO), sur lesquelles porte précisément notre travail.

Pour réaliser la culture en adhérence plusieurs systèmes sont disponibles comme schématisé dans la figure I.2 :

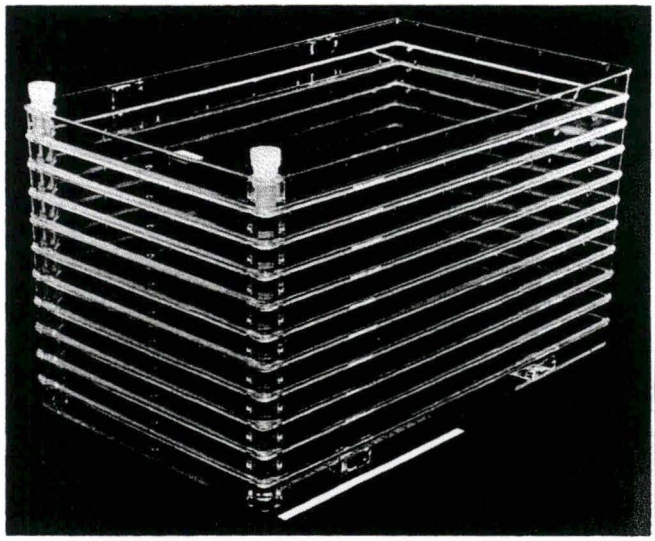
- Le *Flask* est une boîte de culture permettant l'adhérence des cellules. Il offre une surface de culture d'un maximum de 600 cm^2. Ce qui rend la production à grande échelle difficile à réaliser car l'augmentation des surface de culture en utilisant ce système passe par l'utilisation de plusieurs récipients ce qui entraîne des manipulations lourdes. Ces inconvénients conduisent une diminution croissante de son utilisation.

- Les *Roller Bottles* (Voir figure I.3) sont des flacons de forme cylindrique en permanente rotation. Ils permettent d'augmenter la surface de culture de façon considérable et sont ou ont été utilisés pour de nombreuses applications telles que la production des vaccins contre la rougeole, les oreillons, la rage etc..

- Les systèmes *multitrays* (Voir figure I.4) sont utilisés pour les cultures stationnaires de grande capacité. Ils sont constitués d'un empilement de plateaux dont le nombre est variable. Leur avantage est de rendre facile l'augmentation de la production, leur inconvénient est une certaine fragilité. Les principales applications sont la production du vaccin contre la poliomyélite et de l'interféron.

La culture en suspension des cellules de mammifères utilise les mêmes systèmes que ceux développés antérieurement pour la culture des virus. Cependant, certains changements en ce qui concerne le système d'agitation et le design du fermenteur ont dû être apportés entre autres à cause des plus grandes taille et fragilité des cellules de mammifères.

Le principal avantage des technologies en suspension est la grande facilité avec laquelle le scaling-up (ou extension à grande échelle) est réalisé. En effet, la culture en suspension génère - théoriquement du



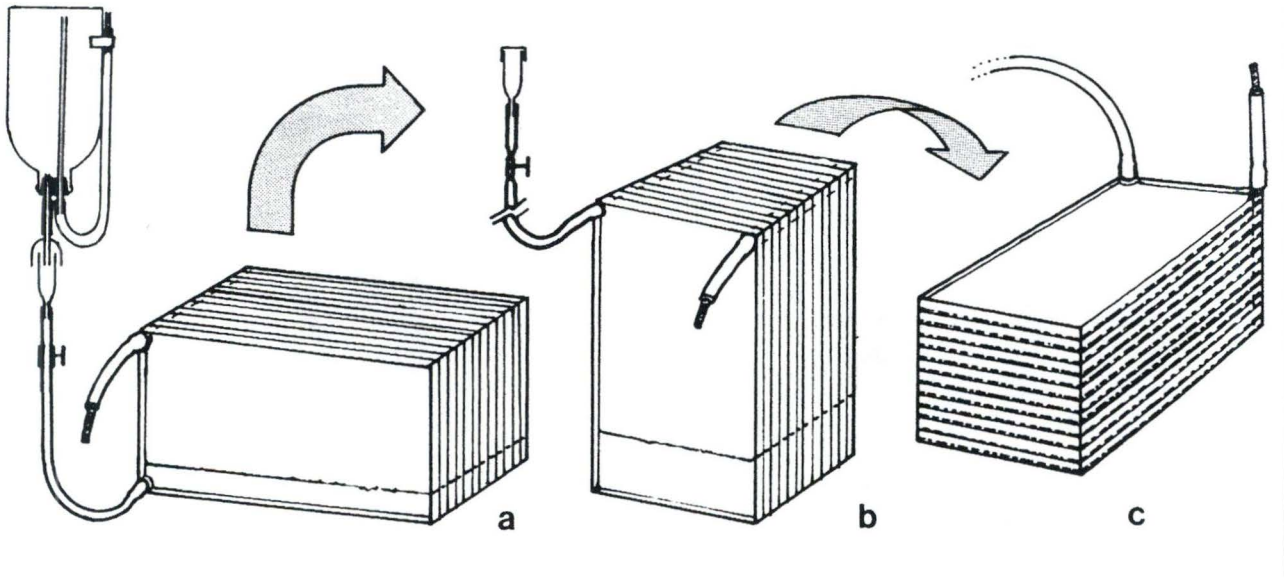
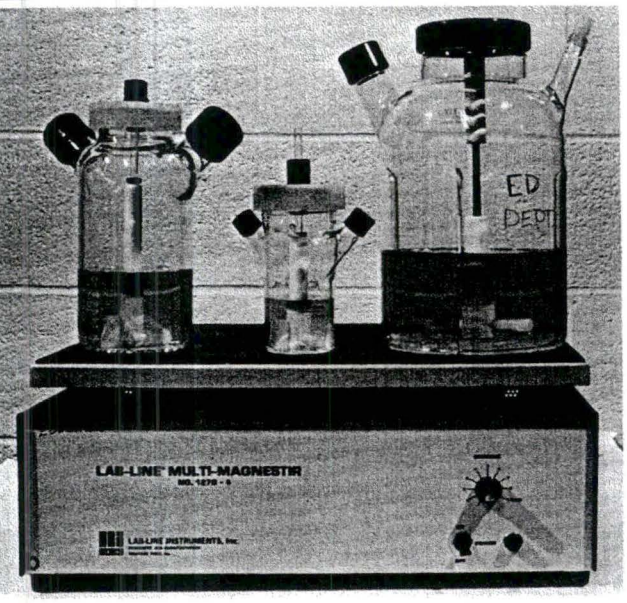


Figure I–4 : Multitrays et leur remplissage (D'après Freshney, 1987).



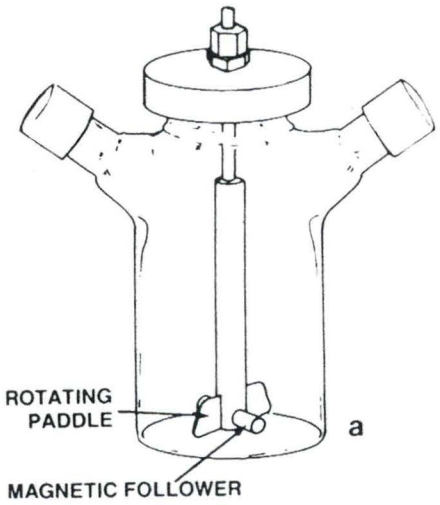


Figure I–5 : Spinner (D'après Freshney, 1987).

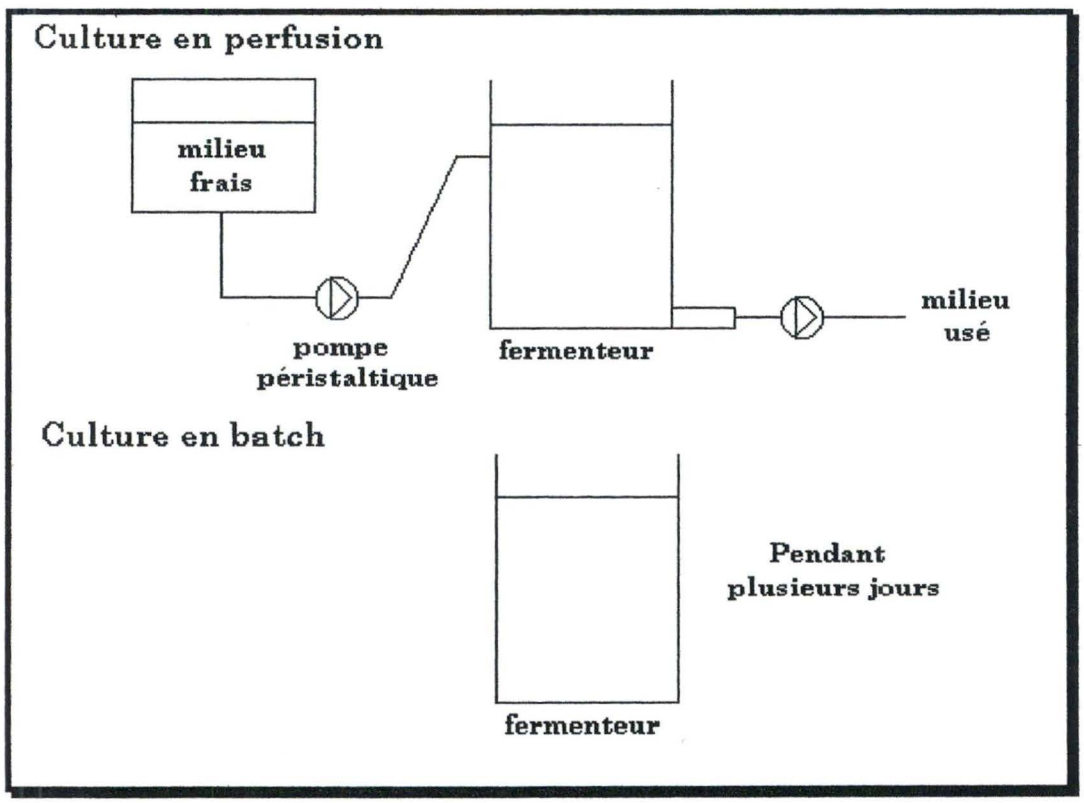


Figure I–6 : Schéma illustrant le principe de la culture en batch et en perfusion

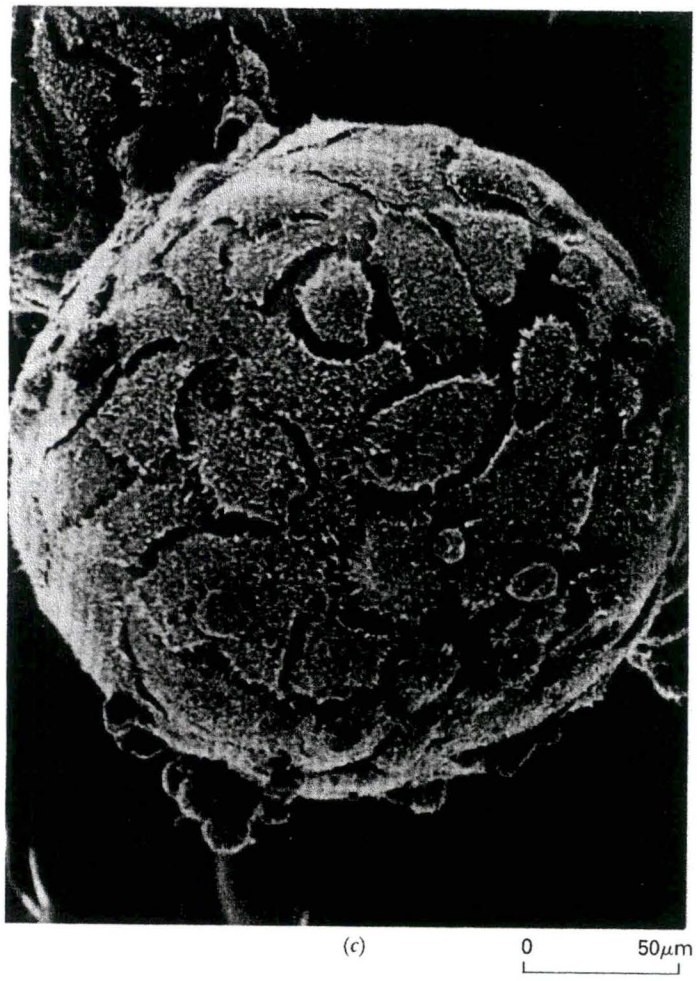


Figure I–7 : Micrographie obtenue en microscopie électronique à balayage des cellules KB (carcinome humain) fixées à la surface d'un microcarrier à surface de verre (D'après Freskney, 1987).

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

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

Table I–7 : Caractéristiques des microcarriers (D'après Butler, 1988).

moins - un environnement homogène avec des caractéristiques physiques (température, pH) et chimiques (concentrations en vitamines, lipides, et acides aminés) contrôlées, ce qui rend possible cette extension.

Nous décrirons succinctement les différents systèmes en suspension que nous avons utilisés dans le cadre de ce mémoire :

- A petite échelle, le spinner (Voir figure I.5) est un récipient d'une capacité maximale de 250 ml comportant un système d'agitation permettant aux cellules de se maintenir en suspension.

- A grande échelle, les cellules CHO étaient en suspension selon les deux modes de fonctionnement suivants :

  - La culture en perfusion (Voir figure I.6) avec le système "spin-filter" qui s'effectue dans un fermenteur de plus ou moins grande capacité. La présence d'un filtre (spin-filter) permet le remplacement du milieu usagé tout en maintenant les cellules dans le fermenteur.

  - La culture en batch (Voir figure I.6) qui s'effectue sans renouvellement du milieu pendant un temps déterminé. Il s'ensuit un appauvrissement du milieu en éléments nutritifs ainsi qu'une accumulation de différents métabolites de dégradation.

Citons encore un système intermédiaire entre la culture en adhérence et la culture en suspension que nous n'avons pas utilisé dans ce mémoire, le système de microcarriers (Voir figure I.7) : les cellules croissent attachées à la surface de billes dont la composition et le diamètre peuvent varier comme indiqué dans la table I.7. Ces billes sont mises en suspension grâce à un système d'agitation particulier (une hélice marine) adapté à la taille des billes. L'inconvénient majeur de ce système est le coût important des billes.

PRÉCIPITATION	Insolubilité de certaines protéines sous l'action de produits chimiques déterminés	**Concentration** **Séparation par groupes de protéines**
ULTRAFILTRATION	Différence de masse moléculaire de composants d'un mélange	**Séparation de macro-molécules & micro-molécule** **Concentration** **Dessalage**
ÉLECTROPHORÈSE	Différence de mobilité (charge et/ou éventuellement, masse moléculaire) des composants du mélange soumis à un champ électrique	**Séparation analytique par groupe de protéine** **Détermination de masses moléculaires et de pI** **Concentration dans certains cas**
CHROMATOGRAPHIE	Différence de masse moléculaire Différence de charge nette Différence de degré d'hydrophobicité Différence de densité de charge Possibilité de former des complexes spécifiques Activité biologique Point isoélectrique	**Séparation par famille de protéines** **Dessalage** **Concentration** **Séparations bio-spécifiques** **Détermination de masses moléculaires**

Table I–8 : Principales techniques séparatives appliquées aux protéines (D'après Boschetti, 1987)

1.3. PURIFICATION ET CONTRÔLE DE QUALITE DES PRODUITS RECOMBINANTS

1.3.1. Purification des produits recombinants

De manière générale, la purification de protéines provenant de la biosynthèse cellulaire peut être effectuée par la mise en oeuvre de diverses techniques séparatives complémentaires généralement utilisées en combinaison. Les plus importantes sont la précipitation, l'ultrafiltration et la chromatographie liquide. Les principales techniques séparatives appliquées aux protéines sont résumées dans la table I.8. Signalons que l'électrophorèse mentionnée dans cette table a pour but principal de vérifier la pureté d'un échantillon.

Une protéine recombinante sécrétée dans le milieu de culture pourra donc être isolée selon deux approches :

- Par une procédure à plusieurs étapes utilisant toute une série de techniques séparatives, y compris la chromatographie.

- Par une procédure en une étape essentielle en utilisant la chromatographie d'affinité par la possibilité de former un complexe biospécifique avec le support.

Pour purifier une protéine, on doit tenir compte de différents paramètres :

- La nature de la protéine à séparer et ses propriétés intrinsèques (poids moléculaire, propriétés de surface, stabilité, solubilité, point isoélectrique, charge, ...).

- Le degré de contamination de la protéine à séparer (concentration relative par rapport aux protéines à éliminer).

- La concentration de la protéine dans le milieu ainsi que le pH et la force ionique de ce dernier (pour une revue, voir Boschetti, 1987).

Pour réussir le scaling-up c'est-à-dire la purification sur de grands volumes à traiter, l'extrapolation doit être en principe linéaire. En ce qui concerne les procédures de précipitation, cette extrapolation n'est pas évidente. Par contre l'extrapolation pour la chromatographie est linéaire si certaines conditions sont remplies :

- Le produit prépurifié doit avoir des caractéristiques semblables quel que soit le volume à traiter.

- Les caractéristiques des gels et des colonnes doivent être adaptées : en effet, le procédé doit être mis au point de façon à ce qu'il soit applicable à l'échelle industrielle. Par exemple, un gel fin permet une plus grande résolution mais n'est pas applicable à l'échelle industrielle. C'est pourquoi, les industries utilisent des colonnes en "stack" (en morceaux). Celles-ci peuvent être empilées pour augmenter la résolution.

- L'entretien des gels est une chose indispensable pour éviter les pertes de rendements

1.3.2. Contrôle de qualité des produits recombinants

Les contrôles de qualité varient beaucoup selon le type de produit et selon l'utilisation finale de celui-ci. Les tests devraient être réalisés à chaque stade de la purification et ceci pour se renseigner sur l'efficacité des différentes étapes . Le degré de pureté d'une protéine peut être évalué par une électrophorèse. L'hétérogénéité moléculaire peut être mise en évidence par isoélectrofocalisation et par des études cinétiques de l'activité biologique. Certains produits requièrent également la détermination de la séquence en acides aminés ainsi que celle des profils de glycosylation. L'activité spécifique (activité totale rapportée à la masse de protéines) renseigne sur le degré de pureté obtenu. Doit également être déterminée, la concentration des différents contaminants : protéases, acides nucléiques, pyrogènes, contaminants microbiens, ... (Butler, 1991)

Certains organismes ont pour rôle de contrôler la qualités de ces produits. C'est le cas de la FDA (Food and Drug Administration) qui est un organisme américain qui accepte ou non les produits à usage humains (alimentaire, thérapeutique). Il contrôle notamment tous les dossiers concernant la production des vaccins et ce, à tous les niveaux de la production (qualité de la souche de cellules recombinantes, qualité du milieu, du produit final, mode de production, ...).Un organisme de ce type existe dans la CEE.

2. PRESENTATION DU SYSTEME DE BIO-PRODUCTION PROPOSE PAR SKB

Smith Kline Beecham Biological utilise comme système de production les cellules ovariennes de hamster chinois ou cellules CHO. La protéine recombinante produite par ces cellules est un protéine virale et ce dans le but de fabriquer un vaccin anti-viral. En voici quelques caractéristiques

- Son poids isoélectrique (PI) est situé entre 4,9 et 5,8.
- Son poids moléculaire réel est de 33 kD. En électrophorèse il se situe entre 44 et 45 kD.
- Il se présente sous différentes formes glycosylées (entre 8 et 10).

Des anticorps monoclonaux de lapin dirigés contre cet protéine virale et produits chez Smith Kline Beecham Biological ont été mis à notre disposition pour les blottings.

Des contrôles doivent être effectués pour s'assurer de la qualité de la protéine virale. Différents tests de routine sont réalisés en premier lieu au stade de culture cellulaire, sur le milieu de culture afin de vérifier si la production de la protéine recombinante se déroule dans de bonnes conditions :

- Prise de pH : pour être optimal celui-ci doit se situer aux alentours de 7. Par exemple, un pH supérieur à 7,4 peut résulter de la présence de soude caustique résiduelle utilisée pour le nettoyage des spinners dans lesquels sont cultivées les cellules.
- Test de viabilité : en général, le pourcentage de viabilité cellulaire est de 90% en ce qui concerne la culture en suspension. Ce pourcentage augmente encore en phase stationnaire. La suppression du stress dû au système d'agitation a pour effet de réduire la mortalité cellulaire.

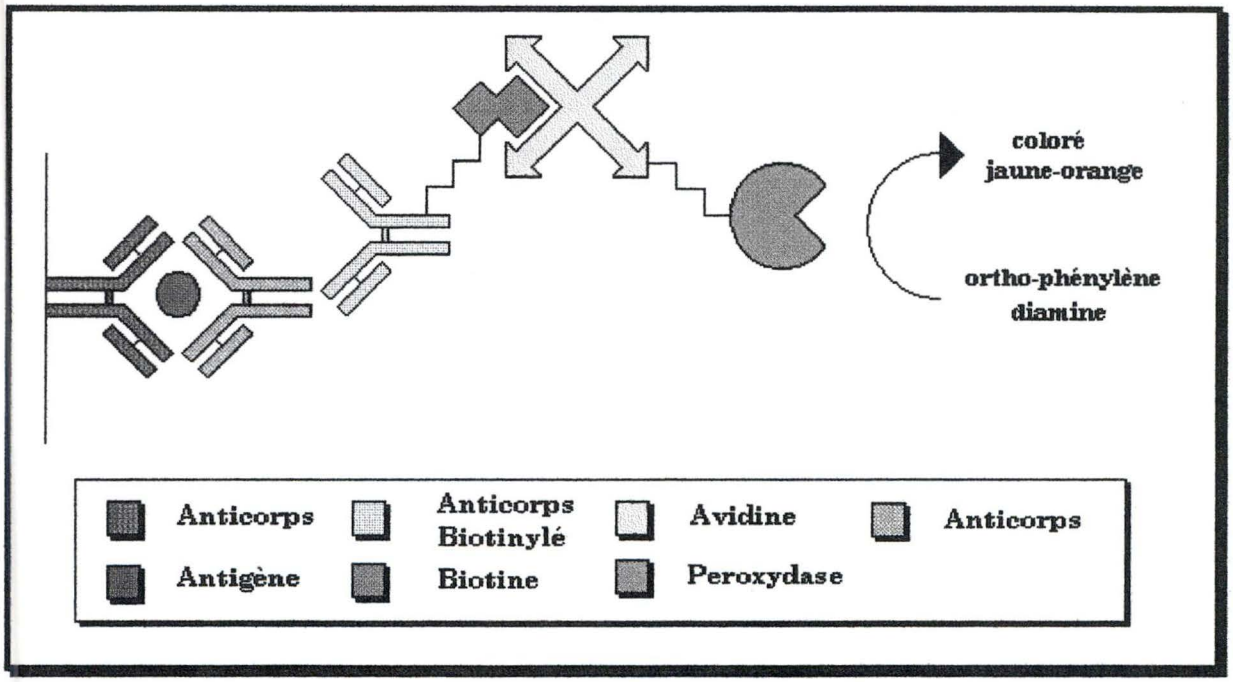


Figure I–8 : Principe du test ELISA utilisé pour doser l'antigène viral.

- Dosage de la concentration en glucose et en lactate.

  Par exemple, l'adaptation d'une lignée cellulaire cultivée sur support à la culture en suspension peut se traduire par une diminution du taux de consommation du glucose, une diminution du taux de production du lactate ainsi que par l'augmentation de la viabilité cellulaire (Hiller et al, 1991)

Quant au contrôle direct de la protéine recombinante, le seul test réalisé préalablement à l'étape de purification est un test ELISA classique. Celui-ci a pour but de déterminer le taux de production de la protéine virale, directement dans le milieu de culture.

Le test est réalisé dans des plaques multipuits comme indiqué dans la figure I.8 :

- Fixation sur la matrice de la portion Fc de l'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la protéine virale
- Ajout de la protéine antigénique à différentes dilutions
- Ajout des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la protéine virale
- Ajout d'anticorps biotinylés anti-souris
- Ajout de l'avidine marquée à la peroxydase
- Révélation de la peroxydase

Le test ELISA permet d'avoir une idée du rendement de production de l'antigène par les cellules CHO, ce qui constitue une première information indispensable pour évaluer le rendement du système cellulaire utilisé.

Mais ce contrôle est insuffisant car il ne permet pas la détection d'éventuelles modifications de la protéine recombinante. De plus, on n'a aucune idée des autres polypeptides et protéines libérés dans le milieu par les cellules CHO. Pour avoir une idée plus globale du métabolisme des cellules CHO dans diverses conditions de culture, la technique des gels

bidimensionnels appliquée à des échantillons de milieux de culture semblait donc une alternative intéressante. En outre, Harant et al (1992), ont proposé la technique d'électrophorèse bidimensionnelle pour contrôler au cours du temps la qualité et l'uniformité des systèmes de production utilisant des cellules animales. Les cellules de mélanome humain non recombinantes et les cellules CHO recombinantes sont les deux types cellulaires utilisés par cet auteur pour contrôler la stabilité de la lignée cellulaire au cours d'une culture à long terme (14 mois). La comparaison entre les différentes distributions de protéines sécrétées à différents stades de la culture met en évidence une variation de distributions significative après une période de 14 mois de culture.

Cette technique pourrait donc nous être utile non seulement pour observer des variations dans la sécrétion de la protéine mais également pour vérifier la stabilité de la protéine recombinante. En effet, la sensibilité de l'électrophorèse bidimensionnelle en fait une technique de choix pour la détection de différences mineures survenant dans la synthèse protéique. Rappelons que l'antigène se présente sous différentes formes glycosylées qui sont détectables par l'électrophorèse bidimensionnelle.

Mais l'électrophorèse bidimensionnelle permet également de mieux évaluer des variations éventuelles dans la production de la protéine virale, relativement aux autres protéines et polypeptides sécrétés et donc d'avoir une meilleure idée du métabolisme global des cellules. Nous pourrons donc comparer de manière plus fine le métabolisme des cellules CHO lorsqu'elles sont cultivées dans diverses conditions de culture (culture en perfusion, culture en batch), et à différents moments de la culture.

Vu l'importance de l'électrophorèse bidimensionnelle dans ce travail, nous introduirons donc rapidement cette technique et donnerons un bref aperçu de ses applications. Ce chapitre permettra d'illustrer les potentialités de la technique, mais il montrera également que cette technique a surtout été appliquée sur des fluides biologiques et des lysats cellulaires, plutôt que sur des surnageants.

3. L'ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE, UNE TECHNIQUE PROMETTEUSE

Depuis sa mise au point, l'électrophorèse a subi une évolution considérable. Beaucoup de modifications, telles que la focalisation isoélectrique, l'électrophorèse en présence de dodécylsulfate, ont permis le développement de l'électrophorèse bidimensionnelle (voir matériels et méthodes point 3.1).

3.1. APPLICATIONS CLINIQUES

Cette technique peut constituer un outil d'analyse performant dans les laboratoires cliniques. En effet, celle qui est utilisée dans la recherche et le développement, permettra peut-être demain d'effectuer des tests de routine. Ces analyses gagneront en spécificité et en sensibilité.

L'électrophorèse bidimensionnelle peut analyser et cartographier des mélanges très complexes de protéines trouvées dans les fluides du corps humain, les cellules sanguines (érythrocytes, lymphocytes, plaquettes, ...) et les tissus. De nombreux exemples sont disponibles :

- Scheele (1980) a énormément publié sur la séparation des polypeptides contenus dans le fluide pancréatique par les gels 2 en dimensions, et a pu soigneusement cartographier la majorité des enzymes exocrines.

- Jones et al (1981) ont analysé 48 spécimens de fluides amniotiques par la technique de l'électrophorèse bidimensionnelle. La majorité des protéines présentes sont des protéines du sérum bien qu'il existe plusieurs protéines spécifiques du fluide amniotique.

- Un rapport (Giometti et Anderson, 1980) sur l'analyse de gels bidimensionnels de la salive humaine dénombre 100 protéines, la plupart des protéines présentes sont des amylases.

Cette technique permet également de détecter des anomalies dans certaines protéines telles que celles observées dans différents cas de myélomes.

Dans un futur lointain, on peut penser que les gels bidimensionnels permettront de définir un index de protéines pour chaque type cellulaire, pour chaque fluide du corps humain dans des conditions non pathogènes. Celui-ci pourra être utilisé comme standard et comparé au pattern protéique d'une personne atteinte par la maladie en question; il pourra donc faciliter le diagnostic d'une maladie, par la mise en évidence de modifications qualitatives (apparition de nouveaux spots ou disparition de spots) et quantitatives (modifications dans les abondances relatives de certains spots). Il y a de nombreux cas cliniques dans lesquels la concentration des différentes protéines du sérum est en effet altérée. Par exemple, l'inflammation provoque une rapide augmentation des réactifs de la phase aiguë (composants du complément, plasminogène,...) (Whicher, 1981). Des dommages tissulaires provoquent le relargage de protéines tissulaires dans le sang. Autre exemple, une augmentation de la concentration en créatine phosphokinase dans le sérum révèle un traumatisme musculaire ou un infarctus du myocarde (Giometti et al 1979). Le cancer cause aussi des changements dans la distribution des polypeptides sur gels bidimensionnels réalisés à partir du sérum, mais ces changements sont non spécifiques et principalement restreints à la région des immunoglobulines. Par exemple, Tracy et al (1982) et Thorsrud et al (1982) ont comparé la muqueuse d'un colon normal avec celle d'un adénocarcinome du colon. Seules de très petites différences existent entre le tissu normal et la tumeur : cinq protéines différentes sur 1000 sont présentes au niveau du tissu atteint. De nombreux changements quantitatifs sont également observés. De même, des gels bidimensionnels réalisés sur l'urine peuvent mettre en évidence une maladie rénale. Par exemple, cette technique a permis de déterminer l'abondance des protéines sériques de hauts et bas poids moléculaires présentes dans l'urine. Lors d'un rejet de greffe, ces abondances relatives se modifient de façon remarquable. Nombreuses sont les maladies, qui pourraient donc être diagnostiquées par l'électrophorèse bidimensionnelle combinée avec d'autres méthodes plus traditionnelles.

De plus l'électrophorèse bidimensionnelle constitue un outil de choix pour contrôler la qualité des antigènes et immunoglobulines utilisés dans les tests immunologiques de routine.

L'électrophorèse bidimensionnelle présente également de nombreuses applications dans la recherche fondamentale que nous allons examiner brièvement.

3.2. APPLICATIONS DANS LA RECHERCHE FONDAMENTALE.

Les applications sont les suivantes :

- Cette technique permet la vérification de la pureté d'un échantillon.

- Grâce à cette technique, il est possible d'étudier la variabilité génétique : en effet, elle permet de détecter deux formes alléliques qui diffèrent par exemple par le remplacement d'un seul acide aminé au niveau de la protéine codée correspondante.

- Elle permet de suivre des variations d'expression en fonction de différents facteurs :

    - métabolisme
    - développement
    - différenciation
    - traitements (drogues, stress, hormones)

- L'électrophorèse bidimensionnelle peut également fournir d'autres informations sur les polypeptides : elle permet de distinguer les protéines accumulées (révélées par coloration non spécifique), des protéines néosynthétisées (révélées par autoradiographie). Ces comparaisons donnent des indications sur les différentes voies de contrôle de l'expression de ces protéines.

- Les modifications post-traductionnelles qui affectent le PI et/ou la masse moléculaire des polypeptides (glycosylation, phosphorylation, protéolyse, ...) peuvent également être étudiées. Par exemple, les phosphoprotéines sont mises en évidence par marquage des protéines au ^{32}P.

- L'électrophorèse bidimensionnelle réalisée sur différentes fractions cellulaires permet de déterminer le compartiment cellulaire où les protéines sont localisées.

Protein[a]	Location[b] pH 5–7	Location[b] Nonequilibrium	Alpha-numeric designation[c]	Basis for identification[d]
132. Ribosome release factor	13 × 57	88 × 51	H21.6	C
	—	88 × 52	H21.7	C
133. Ribulokinase (EC 2.7.1.16)[e]	79 × 107	—	D55.0	CP
134. L-Ribulosephosphate 4-epimerase (EC 5.1.3.4)[e]	53 × 77	—	G28.1	CP
135. RNA nucleotidyltransferase (RNA polymerase) (EC 2.7.7.6)				
α-subunit	98 × 92	—	B40.7	CG
β-subunit	85 × 128	112 × 118	D157.0	CG
β′-subunit	—	95 × 118	I160.0	CG
136. Seryl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.11)	75 × 102	—	E48.8	C
137. Single-stranded DNA binding protein (*ssb* gene product)	63 × 48	93 × 44	F18.8	C
138. Succinate dehydrogenase (fumarate reductase) (EC 1.3.99.1)[e]				
I	—	92 × 104	G63.2	CP
II	—	83 × 61	H24.7	CP
139. Succinyl-CoA synthetase (ADP-forming) (EC 6.2.1.5)				
α-subunit	25 × 78	—	H28.0	CP
β-subunit	77 × 93	—	E39.8	CP
140. Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)				
iron protein	70 × 54	—	F21.3	C
manganese protein	—	79 × 56	I21.3	C
141. Tetrahydrofolate dehydrogenase (dihydrofolate reductase) (EC 1.5.1.3)	100 × 52	—	B20.0	C
142. Tetrahydropteroyltriglutamate methyltransferase (EC 2.1.1.14)[f]	59 × 121	—	F88.0	GP
143. Thioredoxin	109 × 22	105 × 17	B12.0	C
144. Thioredoxin reductase (NADPH) (EC 1.6.4.5)	79 × 81	—	D31.5	C
145. Threonine dehydratase (biosynthetic) (EC 4.2.1.16)	63 × 106	—	F50.1	CM
146. Threonyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.3)	55 × 116	—	G65.0	C
147. Topoisomerase II′, subunit ν	67 × 100	—	F44.6	C
148. Transcription termination factor rho	—	79 × 94	I48.8	G
149. tRNA (Uracil-5)-methyltransferase (EC 2.1.1.35)	58 × 93	—	G39.6	C

Table I–9 : Fragment de catalogue de *E. coli* : chaque spot protéique est localisé par ses coordonées (abscisse x ordonnée) et ceci sur un gel de gradient 5-7 et sur un gel NEPHGE (non equilibrum pH gradient electrophoresis) (Bravo et Celis, 1984).

- Dans le cas où l'on étudie une protéine particulière, les techniques immunologiques permettent son identification, après transfert du gel sur une membrane.

- Elle permet l'élaboration de catalogues moléculaires quantitatifs regroupant les données quantitatives de toutes les protéines structurales et des enzymes caractéristiques d'une cellule donnée. Un tel catalogue a été réalisé chez *E. coli* et sert de référence pour toutes les études ultérieures réalisées sur cette bactérie. Le même travail a été effectué pour les cellules Hela. Un total de 1357 polypeptides (956 acides et 411 basiques) ont été ainsi séparés par la technique l'électrophorèse bidimensionnelle et repris dans ce catalogue (Bravo et Celis, 1984). Depuis ces catalogues continuent à s'enrichir. La table I.9 constitue un fragment du catalogue d'*E. Coli*, pour chaque spot, elle reprend l'abscisse et l'ordonnée de celui-ci dans un gel bidimensionnel.

- Elle permet de distinguer les différents morphotypes de fibroblastes humains au cours de leur vieillissement in vitro. Des changements dans la synthèse protéique entre morphotypes ont pu être mis en évidence par cette technique (Collin, 1992). Les protéines synthétisées lors d'irradiations successives des cellules aux UV sont semblables à celles obtenues lors d'un vieillissement spontané (Rodemann et al, 1989). Ces résultats ont été proposés comme argument en faveur d'une accélération du vieillissement sous l'effet de certains stress.

- Bien que certaines protéines soient facilement identifiées dans les patterns électrophorétiques de lysats cellulaires (actines, tubulines, ...) ou de certains fluides biologiques (albumine dans le sérum), l'électrophorèse bidimensionnelle n'est toutefois pas une technique d'identification des polypeptides. A cette fin, d'autres techniques sont utilisées et font suite à l'électrophorèse bidimensionnelle :

    - Comme indiqué plus haut, les techniques immunologiques, après transfert du gel sur une membrane permettent l'identification d'un antigène particulier..

- Le séquençage de la partie N-terminale d'un polypeptide extrait d'une tache du gel permet éventuellement d'identifier la protéine par comparaison avec les séquences disponibles dans les bases de données. La synthèse d'oligonucléotides codant pour ces séquences permettront de cribler une banque d'ADN.

- L'analyse de la composition en acides aminés du polypeptide peut également mener à cette identification par comparaison avec la composition des protéines dans des banques de données.

- Cependant ces techniques, surtout la première, nécessitent en général des quantités de protéines bien supérieures à celles que l'on récupère couramment à partir d'une seule tache dans des conditions de résolution maximale : plusieurs dizaines de spots identiques extraits de plusieurs gels d'électrophorèse bidimensionnelle volontairement surchargés en protéines sont bien souvent nécessaires pour arriver à obtenir une quantité de protéines suffisante pour réaliser un microséquençage (Damerval et al, 1993). Il faut également que le spot soit bien séparé des protéines voisines.

4. OBJECTIF DU TRAVAIL

L'objectif de ce mémoire est d'analyser la production d'un antigène complexe produit par les cellules CHO et de tenter de mettre en évidence des différences dans la sécrétion des polypeptides et protéines dans le milieu, dans des conditions de cultures différentes (culture en perfusion, culture en batch) et à des temps de culture différents.

Par protéines sécrétées, nous entendons les protéines naturellement sécrétées par la cellule, mais aussi la protéine virale produit dans le but de fabriquer un vaccin antiviral.

Pour distinguer la protéine virale des autres protéines, l'électrophorèse bidimensionnelle sera couplée à la méthode de Western Blotting. En effet après transfert des protéines contenues dans le gel sur une membrane, des techniques immunologiques permettent son identification sur le gel bidimensionnel.

La combinaison de ces deux méthodes va permettre la mise en évidence de trois types d'hétérogénéité au niveau de la protéine virale :

- hétérogénéité de poids moléculaire
- hétérogénéité de point isoélectrique
- hétérogénéité de réactivité vis à vis de l'anticorps

Mais, l'électrophorèse bidimensionnelle permettra aussi de mettre en évidence des variations éventuelles dans la production de la protéine virale, relativement aux autres protéines et polypeptides sécrétés. Ceci nous permettra de mieux cerner le métabolisme global des cellules.

MATERIELS ET METHODES

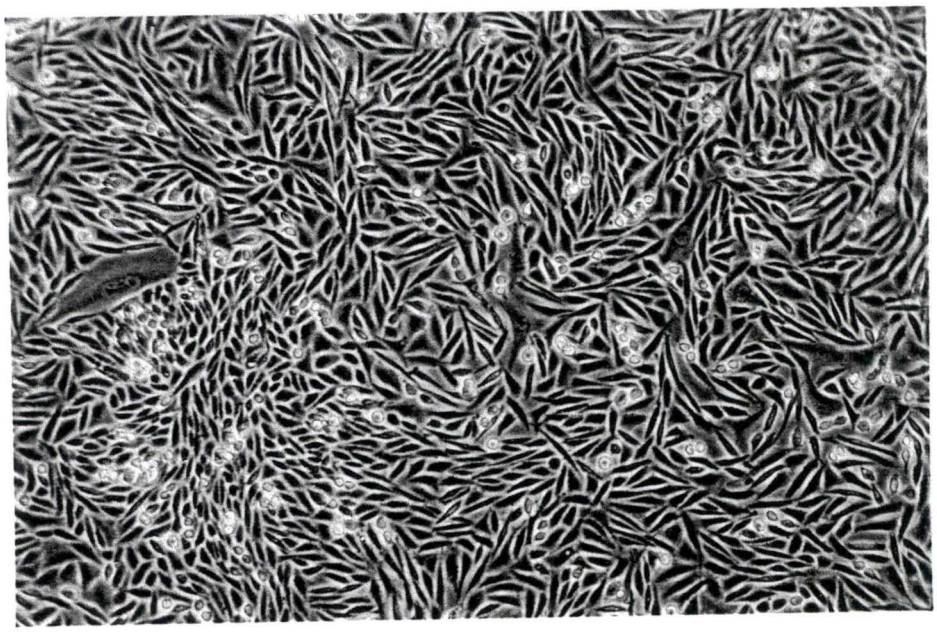


Figure II–1 : Cellules CHO non recombinantes cultivées en adhérence (Passage 67) 24 heures après repiquage dans milieu α-MEM + 7,5% SB
(Grossissement : 144 X)

1 . CULTURE DES CELLULES CHO

1.1. SOUCHE DE CELLULES CHO

Nous avons utilisé 2 souches de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) dérivées après modification génétique des souches parentales CHO-DHFR (également utilisée, voir figure II-1) et CHO-K1. Ces cellules nous ont été fournies par Smith Kline Beecham Biologicals (Rixensart, Belgique). Le clone de cellules recombinantes CHO-DHFR a été isolé de la manière suivante (Voir figure II.2) : les cellules CHO non recombinantes sont déficientes en enzyme dihydrofolate reductase (DHFR). Les cellules recombinantes sont obtenues après transfection des cellules non recombinantes grâce à un vecteur contenant les gènes codant pour la protéine virale et pour l'enzyme DHFR. Par conséquent, les cellules ayant incorporé le vecteur (souches recombinantes) et possédant l'activité DHFR pourront pousser sur un milieu déficient en thymine et en hypoxanthine. Un autre clone cellulaire produisant la même protéine virale a été obtenu après transfection de cellules CHO-K1 avec un autre plasmide.

1.2. MATERIELS

La trypsine + EDTA, le DMEM F12 008, le DMEM F12 base,l' α-MEM,le milieu Iscove modifié nous sont fournis par Smith Kline Beecham Biologicals.

- Trypsine + EDTA

- DMEM F12 base : milieu utilisé pour la culture en adhérence des cellules recombinantes du clone CHO-DHFR (Gibco, Royaume Uni).

- DMEM F12 base + 7,5 % SB : milieu DMEM F12 base additionné de 7,5 % de sérum de veau foetal (Gibco, Royaume Uni).

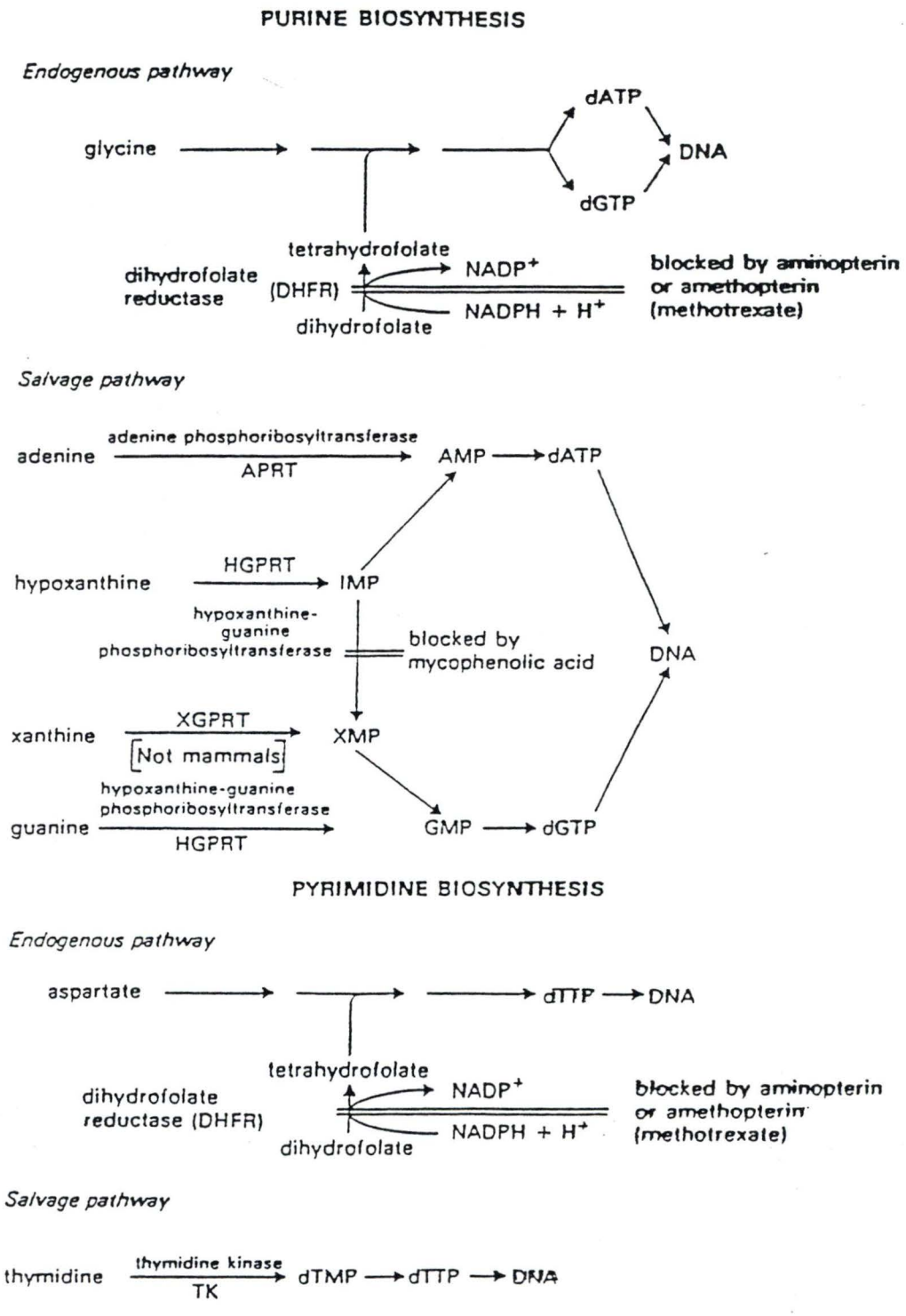


Figure II–2 : Biosynthèse des nucléotides.
Les cellules CHO non recombinantes, déficientes en dihydrofolate reductase (DHFR) ne pourront pousser que si thymine et hypoxanthine sont ajoutées au milieu.

- DMEM F12 008 : milieu F12 modifié chez Smith Kline Beecham Biologicals utilisé pour la culture en adhérence des cellules recombinantes du clone CHO-K1.
- DMEM F12 008 + 7,5 % SB : milieu DMEM F12 008 additionné de 7,5 % de sérum de veau foetal (JRH, Lenexa, Kansas).

- α-MEM : milieu utilisé pour la culture en adhérence des cellules CHO non recombinantes (Gibco, Royaume Uni).

- α-MEM + 1 % SB : milieu α-MEM additionné de 1 % de sérum de veau foetal.

- Milieu Iscove modifié : Des produits de substitution (facteurs de croissances et autres) ont été ajoutés chez Smith Kline Beecham Biologicals au milieu pour permettre la croissance des cellules CHO recombinantes. Le milieu Iscove est aussi bien un milieu de croissance qu'un milieu de production.

1.3. METHODE

1.3.1. CHO non recombinantes

Culture de cellules en adhérence

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture de 175 cm^2 (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, Californie). Lorsque les cellules arrivent à confluence, ce qui représente une densité de plus ou moins $1.9.10^5$ cellules par cm^2, on les repique en 8 après les avoir resuspendues dans de l'α-MEM + SB, le surnageant est réparti entre 8 boîtes de culture. Le repiquage se fait en moyenne 2 fois par semaine. Les cellules sont rincées 2 fois avec 15 ml de milieu de rinçage, afin d'éliminer toutes traces de sérum (celui-ci contenant des inhibiteurs de protéases). Ensuite, on ajoute 4 ml de trypsine + EDTA qu'on laisse agir pendant 5 à 6 minutes tout en surveillant le détachement des cellules au microscope à contraste de phase. On agite légèrement la boîte pour détacher les cellules puis on ajoute 20 ml de milieu α-MEM + 1 % SB. Puis, on resuspend les cellules avec une pipette Pasteur afin de rompre les agrégats et de bien rincer le

support sur lequel étaient attachées les cellules. On porte au volume adéquat selon le repiquage de façon à obtenir 60 ml de milieu par boîte de 175 cm^2. Le bouchon des boîtes est mis en position VENT (position ventilation). Les boîtes sont mises dans une étuve à 37°C et à 5 % en CO_2.

1.3.2. CHO recombinantes

Culture de cellules en adhérence

Repiquage

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture de 175 cm^2. Lorsque les cellules CHO recombinantes sont à confluence, elles sont repiquées à une densité semblable à celle des cellules CHO non recombinantes. Les cellules sont rincées avec 40 ml de trypsine + EDTA. On agite légèrement afin de détacher les cellules. On ajoute 17 ml de milieu DMEM-F12 008 + 7,5 % SB quand il s'agit du clone CHO-K1 et DMEM F12 base en ce qui concerne le clone CHO-DHFR. On resuspend les cellules afin de rompre les agrégats et de détacher les cellules de leur support. Dix ml sont alors transférés dans chacune des 2 boîtes de culture de 175 cm^2 dans lesquelles on a préalablement ajouté 40 ml de DMEM F12 + 7,5 % SB. Le bouchon est mis en position VENT pour les cellules du clone CHO-K1 et fermé pour les cellules du clone CHO-DHFR. Les boîtes sont mises dans une étuve à 37°C et à 5 % en CO_2.

Mise en production

Quand les cellules CHO arrivent à confluence, on remplace le DMEM F12 + 7,5 % SB par du milieu Iscove modifié. Puis toutes les 24 heures, on récolte le milieu contenant la protéine d'intérêt (pour éviter la dégradation de celle-ci par les protéases) et on rajoute 50 ml de milieu Iscove (afin de réapprovisionner les cellules en éléments nutritifs).

Culture de cellules en suspension

Passage d'un spinner

Les cellules (CHO-DHFR) sont cultivées dans des spinners de 250 ml. On réalise des cultures en stationnaire c'est-à-dire que tous les 2 jours, on ramène la quantité de cellules à une densité fixe qui est de 1.10^6 cellules par ml soit au total 150.10^6 cellules par spinner. A cette fin, on prélève 1 ml de la suspension cellulaire sur lequel on réalise un test de viabilité au trypan bleu (il colore en bleu le noyau des cellules mortes) puis un comptage de cellules à l'aide d'une chambre de Neubauer (Vel, Belgique). Le comptage terminé, on recueille 150.10^6 cellules que l'on centrifuge 10 minutes à 600 rpm (J-21 Beckman). Le culot est ensuite resuspendu dans 150 ml de milieu Iscove modifié.

Mise en production

Pour la mise en production, on réalise des cultures en stationnaire suivant la méthode décrite ci-dessus. Cependant, on ramène tous les jours la quantité de cellules à une densité de 2.10^6 cellules par ml soit 300.10^6 cellules au total.

2. DOSAGE DES PROTEINES SELON LA METHODE DE BRADFORD

2.1. PRINCIPE

Le réactif de Bradford (kit Bio-Rad contenant le bleu de Coomassie G250) présente une absorption maximale à 465 nm. En présence de protéines et en milieu acide, cette absorption maximale est déplacée à 595 nm après cinq minutes d'incubation. La formation du complexe s'observe par le changement de coloration du réactif qui, de brun orangé, devient bleu. Les interactions entre les groupes aminés de la chaîne protéique et le réactif sont responsables de ce changement.

Avantages de la méthode de Bradford :

- Elle est facile à utiliser : elle requiert seulement un réactif.
- Elle est rapide.
- Le dosage Bio-Rad n'entre pas en interférence avec la plupart des molécules qui limitent l'application des autres méthodes de dosage. Notamment, il n'interagit pas avec les ampholytes, le dithiothréitol, le mercaptoéthanol, le SDS, l'urée,...

2.2. MATERIELS

Le réactif de Bradford provient de la firme Bio-Rad (Richmond, USA). Le standard utilisé est la sérum albumine bovine Bio-Rad à la concentration finale de 1,33 mg par ml.

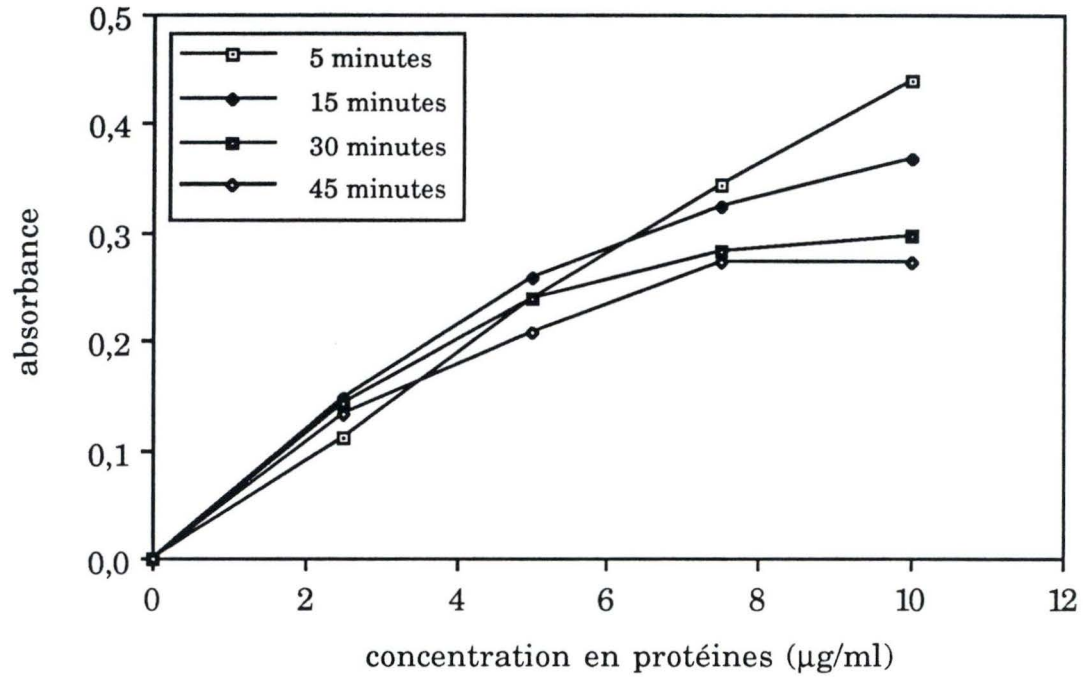


Figure II–3 : Courbe d'étalonnage par la méthode de Bradford exprimant la densité optique obtenue en fonction de la concentration en protéines en µg/ml et ceci après différents temps d'incubation.

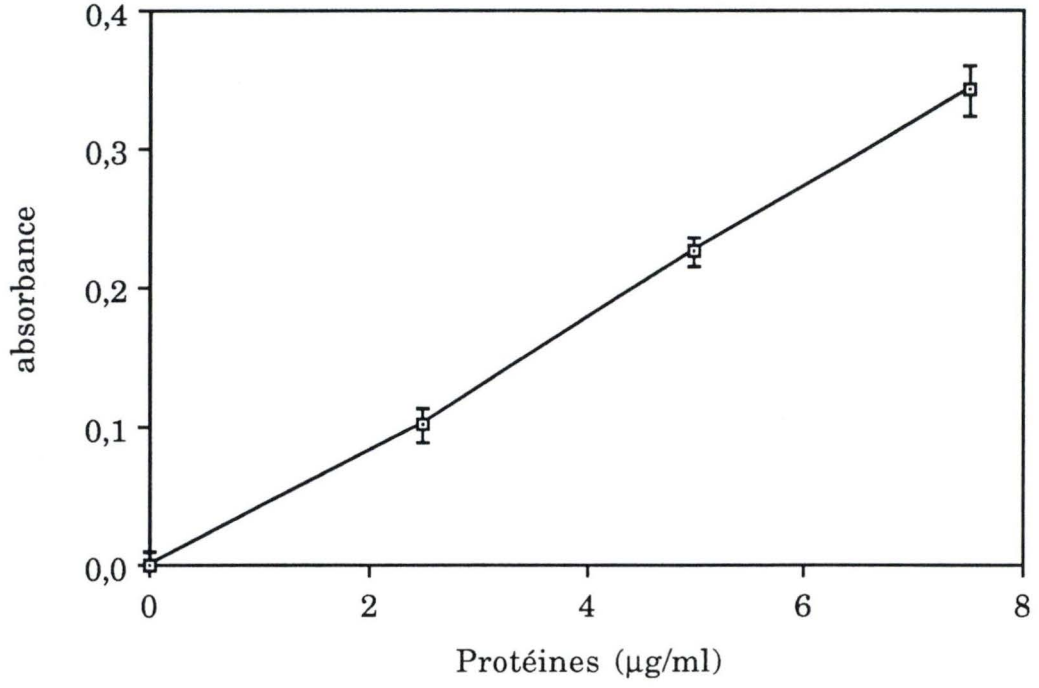


Figure II–4: Droite d'étalonnage exprimant la densité optique obtenue en fonction de la concentration en protéines en µg/ ml après 5 minutes d'incubation. Chaque point correspond ä la moyenne de 3 déterminations plus ou moins un écart-type.

2.3. METHODE

On a utilisé la procédure de microdosage c'est-à-dire un dosage pour des concentrations protéiques inférieures à 25 μg /ml.

- Mettre 0,8 ml de standard ou d'échantillon dans les tubes. Utiliser 0,8 ml de tampon d'échantillon comme blanc.
- Ajouter 0,2 ml de réactif de Bradford.
- Mélanger les tubes.
- Après cinq minutes d'incubation, lire l'absorbance à 595 nm.

Nous avons expérimenté plusieurs temps d'incubation et ceci afin de déterminer celui qui exprime de façon linéaire la variation de la concentration en protéines en fonction de l'absorbance. Nous avons donc retenu un temps d'incubation de 5 minutes (voir Figure II-3).

Les valeurs d'absorbance données par les standards nous permettent d'établir une droite d'étalonnage, exprimant la densité optique en fonction de la concentration en protéines (μg/ml) après 5 minutes d'incubation. Les valeurs d'absorbance obtenues pour les différents échantillons peuvent alors être transformées en μg/ml grâce à cette droite d'étalonnage (Voir figure II.4)

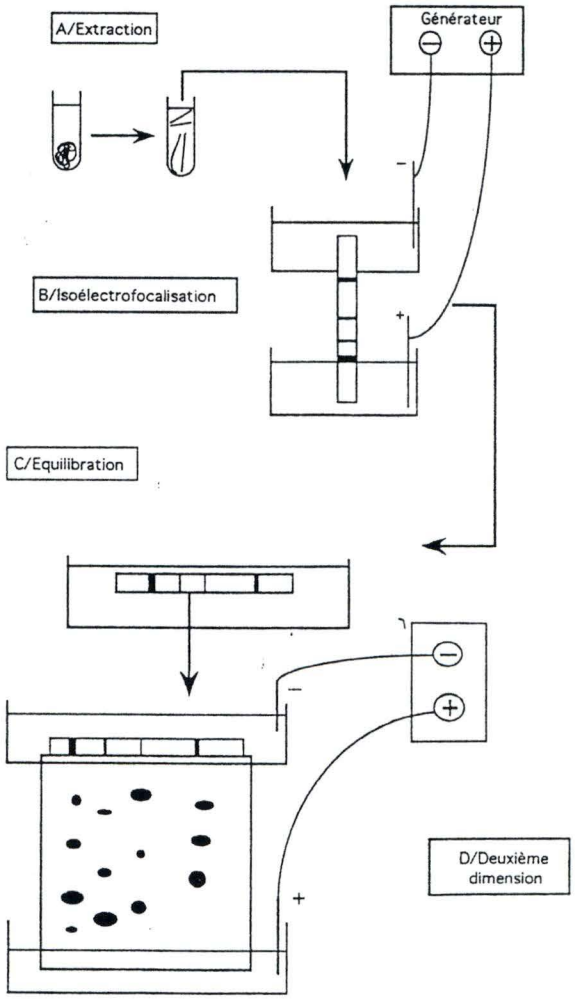


Figure II–5 : Schématisation des différentes étapes de l'électrophorèse bidimensionnelle.
A : dénaturation des protéines
B : Isoélectrofocalisation
C : Equilibration
D : Deuxième dimension
(D'après Durand, 1993)

3. ELECTROPHORESE A DEUX DIMENSIONS

3.1. PRINCIPE

L'électrophorèse bidimensionnelle est une combinaison de deux électrophorèses (Pour revue, voir Damerval et al, 1993) (Voir figure II.5). La première, une isoélectrofocalisation, fait migrer les polypeptides en fonction de leur point isoélectrique (PI). La seconde, réalisée en présence de dodécyl-sulfate de sodium (SDS), en fonction de sa masse moléculaire (MM).

3.1.1. Intérêts de l'électrophorèse bidimensionnelle

La lecture d'un gel d'électrophorèse en deux dimensions donne des renseignements sur les propriétés physico-chimiques des polypeptides, visualisés sous forme de tâches : le PI est lu en abscisse et la MM en ordonnée. Elle peut également donner des informations sur l'abondance relative du polypeptide, fonction de l'intensité du spot si l'on dispose d'un système adéquat d'analyse quantitative des gels. Nous disposons du système Bioimage (voir paragraphe 7). L'intérêt principal de l'électrophorèse bidimensionnelle est de recueillir ces différentes informations pour un grand nombre de protéines à la fois. Grâce à sa haute résolution, plus de mille constituants d'un mélange de polypeptides peuvent être individualisés sur un grand gel d'électrophorèse. En fait la résolution est fonction de la taille du gel. Nous avons réalisé des grands gels de 20 cm sur 18 mais aussi des minigels (9 cm sur 7) pour la mise au point de la méthode.

3.1.2. La préparation des échantillons

Le but est d'obtenir des polypeptides en solution, prêts à pénétrer dans le gel d'isoélectrofocalisation. Les protéines doivent être dénaturées. Les structures quaternaires sont dissociées afin de séparer les constituants des oligomères; les structures tertiaires et secondaires doivent être minimisées. On doit également rechercher une solubilité maximale des polypeptides, pour favoriser leur entrée dans le gel. Si la méthode d'extraction a comporté une étape de précipitation, les protéines doivent

être resolubilisées dans la solution de dépôt en focalisation. C'est à ce stade que les structures quaternaires, tertiaires, et secondaires sont éliminées.

Composition de la solution de dépôt en focalisation ou tampon de lyse

- L'urée à haute molarité élimine les liaisons faibles (liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes).
- Le dithiotréitol rompt les ponts disulfures.
- Le Nonidet P-40 aide à la solubilisation des protéines.
- Les ampholytes qui stabilisent le gradient de pH piègent aussi les ions isocyanates, produits de dégradation de l'urée. On évite ainsi une carbamylation des polypeptides de l'échantillon qui déplacerait les spots du côté acide.

Les échantillons peuvent être gardés plusieurs mois à -70°C dans le tampon de lyse sans que cela n'affecte la résolution y compris quand les échantillons ont été décongelés et recongelés à plusieurs reprises.

La réalisation des gels

La focalisation

Le critère de cette électrophorèse est la charge de la protéine (son PI), et l'effet de tamis moléculaire de la matrice d'acrylamide doit être minimisé par des concentrations très faibles (3 à 5%). A mesure que les polypeptides migrent dans le gradient de pH sous l'influence de leur charge, celle-ci diminue. Ils finissent par s'arrêter à un pH qui correspond à leur PI. Le gradient de pH peut être généré par des ampholytes. C'est seulement lors de l'application d'une différence de potentiel qu'ils vont se répartir dans le gel et générer le gradient de pH.

Choix de la gamme de pH : Seuls les polypeptides dont le PI se trouve à l'intérieur de la gamme de pH utilisée trouveront une position stable dans le gel. Lors de l'emploi d'une gamme de pH très large, il arrive souvent que la plupart des polypeptides se concentrent dans une seule région du gel : une grande partie reste inexploitée et la résolution est mauvaise dans la partie utile. Pour optimiser la séparation il est nécessaire d'élargir une partie du gradient et ceci aux dépens de protéines de pH extrêmes. La majorité des polypeptides se trouve dans l'intervalle de pH 5 à 8.

Le cas des protéines basiques est particulier dans les gradients en ampholytes : en raison de la dérive cathodique (phénomène d'aplatissement du gradient du côté basique), elles sont souvent mal résolues. Une technique souvent utilisée pour remédier à ce problème est la NEPHGE (non equilibrium pH gradient electrophoresis) : les protéines sont déposées du côté acide (les électrodes et les électrolytes sont inversés et l'électrophorèse n'est pas menée jusqu'à l'équilibre. Cette technique est évidemment moins reproductible que l'IEF.

La capacité de chargement : Si une trop grande quantité de protéines est appliquée sur le gel, la taille des spots augmente, ce qui réduit la distance entre les spots voisins et donc une perte considérable de résolution (Celis et Bravo, 1984). De plus un composé majeur peut provoquer le déplacement d'un composé mineur voisin de celui-ci.

Dépôt de l'échantillon à l'anode ou à la cathode : L'échantillon est le plus souvent déposé du côté basique car la plupart des polypeptides sont mieux solubilisés à pH basique et pénètrent donc mieux dans le gel.

Voltage et durée de l'électrophorèse : Il est possible d'effectuer un pré-run (une migration 'à vide') à faible voltage avant de déposer l'extrait. Ceci permet d'éliminer le persulfate d'ammonium en excès. Les protéines migrant d'autant moins vite qu'elles sont proches de leur PI, on doit augmenter le voltage durant les dernières heures de l'électrophorèse.

Solubilité des protéines dans le gel : Les protéines peuvent avoir tendance à précipiter dans le gel: en effet, plus elles s'approchent de leur PI, moins elles sont solubles. Ceci peut avoir pour conséquence la formation de traînées en focalisation ou en deuxième dimension : les protéines précipitées sont retenues par le gel de première dimension et relâchées au fur et à mesure de la migration, au lieu d'en sortir toutes simultanément. Pour lutter contre ce phénomène, on peut augmenter la concentration des ampholytes, connus pour augmenter la solubilité des protéines.

L'équilibration

Après migration, les gels d'IEF sont placés dans un tampon d'équilibration qui permet de complexer les protéines avec le SDS et d'éliminer divers constituants du gel initial (urée, ampholytes, Nonidet NP-40). Il est préférable de limiter la durée de l'équilibration, car une certaine quantité de protéines est nécessairement perdue au cours de cette étape. Les gels de première dimension peuvent être conservés à - 70°C dans le tampon d'équilibration.

La deuxième dimension

La deuxième dimension est une électrophorèse en présence de SDS : fixé aux polypeptides, il leur confère une forte charge négative, devant laquelle leurs charges natives sont négligeables. La séparation est fondée sur le ralentissement des polypeptides en fonction de leur PM par la maille de la matrice de polyacrylamide : les polypeptides les plus petits iront plus vite que les plus gros.

Le gel de deuxième dimension peut comporter un gel de concentration superposé au gel de séparation. La fonction de ce gel est de regrouper les protéines sur une ligne de très faible épaisseur, avant l'entrée dans le gel de séparation.

3.2. MATERIELS

L'urée, l'acrylamide, la bisacrylamide et le temed proviennent de la firme BRL (Gaithersburg, USA); le nonidet P40 et le dithiothréitol de la firme Sigma Chemical (Saint-Louis, USA); le servalyte 7-9, 5-7, 2-4, 3-10 et 4-6 de la firme Serva (Heidelberg, Allemagne); Le β-mercaptoéthanol de la firme Fluka (Buchs, Suisse); l'acide orthophosphorique 85 %, le NaOH, le glycérol 87 %, le SDS, le Tris et la glycine de la firme Merck (Darmstadt, Allemagne); le bleu de bromophénol de la firme Janssen Chimica (Beerse, Belgique); le persulfate d'ammonium (APS), le biolyte 3-10 et l'agarose de la firme Bio-Rad (Richmond, USA).

3.2.1. Solutions pour la première dimension

Les solutions marquées par le signe* sont à garder à 4°C, celles marquées par le signe ** à -20°C.

Tampon de lyse (LBr) **

(aliquots de 1 ou 2 ml)

Réactifs	Quantités prélevées	Concentration finale
urée	22,8 g	9,5 M
nonidet P 40	0,8 g	2 % w/v
servalyte 40% pH7-9	2,0 ml	2 %
dithiothréitol	616,0 mg	0,1 M
H_2O	20,4 ml	

Acrylamide IEF (D) *

Réactifs	Quantités prélevées	Concentration finale
acrylamide bisacrylamide H_2O	5,676 g 0,324 g porter à 20 ml	28,38 % 1,62 %

Ensuite, ajouter du Mixed Bed (AG 501-X 8 Bio Rad) et conservé à 4°C

Stock NP 40 (E) *

Réactifs	Quantités prélevées	Concentration finale
nonidet P 40 H_2O	2,0 g porter à 20 ml	10 % w/v

Solution de recouvrement du gel (H) **

(aliquots de 500 µl)

Réactifs	Quantités prélevées	Concentration finale
urée H_2O	4,8 g porter à 10 ml	8 M

Solution de recouvrement de l'échantillon (KBr) **

(aliquots de 200 µl)

Réactifs	**Quantités prélevées**	**Concentration finale**
urée	0,96 g	6,4 M
servalyte 40 % pH 7-9	50,0 µl	0,8 %
nonidet P 40	100,0 mg	2,5 % w/v
ß mercaptoéthanol	100,0 µl	3,8 %
H_2O	1,4 ml	

Anolyte

Réactifs	**Quantités prélevées**	**Concentration finale**
acide orthophosphorique 85 %	1,36 ml	0,01 M
H_2O dégazée	porter à 2 l	

A faire extemporanément

Catholyte

Réactifs	**Quantités prélevées**	**Concentration finale**
NaOH 1N	24 ml	0,04 M
H_2O dégazée	porter à 604 ml	

A faire extemporanément

3.2.2. Solutions pour la seconde dimension

Tampon d'échantillon SDS (O) *

Réactifs	Quantités prélevées	Concentration finale
glycérol 87 %	50,0 g	0,94 M
ß mercaptoéthanol	25,0 ml	5 %
SDS	10,0 g	0,07 M
Tris	3,780 g	0,06 M
H_2O	porter à 500 ml	

Ajuster à pH 6,8 par HCl 25 % (7,7 N)

Acrylamide NS *

Réactifs	Quantité prélevées	Concentration finale
acrylamide	292,0 g	29,2 %
bisacrylamide	8,0 g	0,8 %
H_2O	porter à 1 l	

Tampon LS *

Réactifs	Quantité prélevées	Concentration finale
Tris	181,7 g	1,5 M
H_2O	porter à 1 l	

Ajuster à pH 8,8 par HCl 6 N

Solution d'agarose (P) *

Réactifs	Quantités prélevées	Concentration finale
agarose	1,0 g	1 %
bleu de bromophénol	2,0 mg	0,002 %
tampon O	100 ml	

Porter à 80°C pour faire fondre l'agarose

Solution LS/4 SDS *

Réactifs	Quantités prélevées	Concentration finale
solution LS	100 ml	
H_2O	300 ml	
SDS	0,4 g	0,1 %

Tampon de migration*

Réactifs	Quantités prélevées	Concentration finale
Tris	6,06 g	0,3 %
glycine	28,83 g	1,44 %
SDS	2,0 g	0,1 %
H_2O	1,970 l	

3.3. METHODE

Nous nous sommes inspirés de la méthode mise au point par O'Farrel (1975) et modifiée par Lecoq (non publiée).

3.3.1. Première dimension

Lavage des tubes

Les tubes sont lavés dans du détergent Bio-Rad (20 ml/litre) pendant la nuit à la température ordinaire ou une heure à 60°C. Ils sont ensuite traités par de l'HCl 0,1 N à ébullition pendant une heure. Après rinçage à l'acétone puis à l'eau bidistillée ils sont séchés à l'air chaud.

Polymérisation de la première dimension

Les tubes sont fermés à l'extrémité opposée au trait par du parafilm

Solution

Pour 12 gels soit 170 ml par gel

Réactifs	**Quantité prélevées**	**Concentration finale**
urée	3,7 g	49,1 %
acrylamide (D)	0,9 ml	3,4 %
NP 40 (E)	1,35 ml	1,8 %
H_2O	0,9 ml	12,0 %

Afin de dissoudre l'urée, porter la solution à 37°C.
Traitement au Mixed Bed pendant 30 minutes.
Filtrer afin d'enlever la résine.

Après filtration, ajouter les solutions suivantes : Pour le gradient 4-7

servalyte 2-4	160 µl	0,85 %
servalyte 4-6	160 µl	0,85 %
servalyte 5-7	160 µl	0,85 %
servalyte 3-10	80 µl	0,43 %
biolyte 3-10	80 µl	0,43 %

Dégazer la solution pendant 2 minutes, puis ajouter:

Réactifs	**Quantités prélevées**	**Concentration finale**
APS 2 %	39,5 µl	0,01 %
temed	4,0 µl	0,07 %

Chaque tube est rempli jusqu'au trait (13 cm). Les gels sont surmontés de la solution H. La polymérisation a lieu environ après 60 minutes. On attend 30 minutes de plus puis on remplace la solution H par 20 µl de tampon de lyse. On attend une heure au moins avant de lancer la pré-focalisation.

Préfocalisation

Les tubes sont débarrassés du parafilm et le liquide au dessus du gel est enlevé. Ensuite les tubes sont placés dans la cuve d'électrophorèse (Bio-Rad, modèle175, tube cell). Le réservoir inférieur est rempli par l'anolyte. A la surface de chaque gel on dépose 20 µl de tampon de lyse. Chaque tube est ensuite complété avec du NaOH. Le réservoir supérieur est alors rempli avec le catholyte.

Voltage : 200V pendant 15 minutes
300V pendant 30 minutes
400V pendant 30 minutes
500V pendant 30 minutes

Focalisation isoélectrique

Le liquide au sommet des gels est aspiré et le sommet du gel est séché avec des languettes de papier Whatman. Les échantillons sont déposés puis recouverts par 10 µl de solution KBr. Les tubes ainsi que la cuve sont remplis par du catholyte frais.

Voltage	500V	pendant la nuit (16 heures minimum)
	600V	pendant 15 minutes
	700V	pendant 15 minutes
	800V	pendant 15 minutes
	900V	pendant 15 minutes
	1000V	pendant 30 minutes

Equilibration de la première dimension en vue de la seconde dimension

Les gels de première dimension sont démoulés et déposés dans des boîtes de pétri qui contiennent de la solution O. L'équilibration se fait en agitant le gel 30 minutes dans cette solution. Ils sont alors congelés à -70°C. Un des gels peut être utilisé pour déterminer le gradient de pH.

3.3.2. Deuxième dimension

Polymérisation du gel SDS

Gel de séparation : gel à 10 % d'acrylamide

Réactifs	**Quantités prélevées (pour 1 gel)**
Tris 1,5 M pH 8,8; SDS 0,4 %	13,2 ml
acrylamide 30 %,bisacrylamide 0,8 %	21,12 ml
H_2O	22,5 ml

Dégazer 5 minutes, puis ajouter les solutions suivantes :

Réactifs	**Quantités prélevées (pour 1 gel)**
temed	53 µl
APS 1%	2,64 ml

Couler le gel entre deux grandes plaques de verre jusqu'à 1,5 cm en dessous du biseau. Ensuite, recouvrir la partie supérieure des gels d'isobutanol saturé en eau. Les gels polymérisent après 30 minutes. On attend 30 minutes supplémentaires. L'isobutanol est alors enlevé et les gels sont rincés par de l'eau distillée, puis ils sont recouverts par la solution LS/4 SDS. Ils peuvent être conservés 15 jours en chambre froide. Le LS/4 SDS est ôté en renversant la cuve puis séché à l'aide de papier Whatman.

Gel de concentration

Réactifs	**Quantités prélevées (pour 1 gel)**
Tris 0,5 M pH 6,8; SDS 0,4 %	3,75 ml
acrylamide 30 %,bisacrylamide 0,8%	1,5 ml
H_2O	8,25 ml

Dégazer 5 minutes, puis ajouter les solutions suivantes :

Réactifs	**Quantités prélevées (pour 1 gel)**
temed	15 µl
APS 1%	1,5 ml

L'excès de LS/4SDS est ôté par renversement de la cuve. Les dernières gouttes sont éliminées en absorbant le liquide avec un morceau de papier Whatman. Le gel est coulé. Puis, on incorpore au milieu du gel un petit peigne ayant le même diamètre que les premières dimensions. Le gel polymérise après environ 30 minutes.

Dépôt de la première dimension sur la seconde dimension

Les gels de première dimension sont dégelés et le tampon O est éliminé. Ces gels sont déposés sur la seconde dimension et recouverts de plus ou moins 0,5 cm d'agarose. Celui-ci doit être préalablement placé dans un bain marie à 80°C. Le tout est déposé dans la cuve d'électrophorèse (Bio-Rad, Protean II, Multi-cell) où l'on a préalablement placé le tampon d'électrophorèse (tampon de migration). Ensuite, la cuve supérieure est remplie avec le même tampon. On règle le système de refroidissement sur 13°C. Le courant est fixé de manière à ce qu'il y ait 50 mA par gel. On laisse migrer 4 heures environ et on arrête l'électrophorèse quand le bleu de bromophénol atteint le bas des gels. L'électrophorèse terminée, on démonte les plaques et les gels sont placés dans la solution adéquate pour réaliser une coloration à l'argent

4. COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE

4.1. MATERIELS

Le TCA, l'éthanol et l'acide acétique proviennent de la firme Merck (Darmstadt, Allemagne); le méthanol et le Bleu de Coomassie de la firme Janssen Chimica(Beerse, Belgique).

Fixateur
TCA 12 %

Solution de Bleu de Coomassie

Réactifs	**Concentration finale**
méthanol	45,4 %
H_2O	45,4 %
acide acétique glacial	9,2 %
Bleu de Coomassie	0,25 %

Solution de décoloration

Réactifs	**Concentration finale**
éthanol	30 %
acide acétique	10 %
H_2O	60 %

4.2. METHODE

- Le gel est mis sous agitation dans 200 ml de fixateur pendant 30 minutes.

- Le gel est mis sous agitation dans 200 ml de la solution de Bleu de Coomassie pendant une heure.

- Le gel est décoloré pendant 3 à 5 heures dans la solution de décoloration.

5. COLORATION A L'ARGENT.

Nous nous sommes inspirés de la méthode de Merril et de Goldman (1984) . Nous l'avons légèrement modifiée afin d'en augmenter la résolution.

5.1. PRINCIPE

La fixation du gel dans du méthanol et de l'acide acétique empêche la perte de protéines. Une seconde fixation au glutaraldehyde augmente la sensibilité de la coloration à l'argent. Le gel est ensuite lavé avec une solution contenant du méthanol et de l'acide acétique. Ceci a pour but de lui rendre sa taille initiale et d'éviter l'excès d'ions. Puis, le gel est placé dans une solution de dichromate de potassium contenant de l'acide nitrique. Le dichromate active les protéines, ce qui leur permet de se lier aux cations d'argent fournis par la solution de nitrate d'argent. Le gel est ensuite développé grâce à une solution contenant du carbonate de sodium et du formaldehyde. Durant cette étape, un précipité de sels d'argent se forme rapidement. Pour éviter que le précipité ne s'adsorbe à la surface du gel, cette solution doit au moins être changée 2 fois. Le carbonate de sodium maintient la solution alcaline, ce qui permet au formaldehyde de réduire l'argent ionique en argent métallique et en plus neutralise l'acide formique formé à partir du formaldehyde. Après la révélation, le développement de l'image est arrêté avec une solution contenant de l'acide acétique (Celis et Bravo, 1984).

5.2. MATERIELS

Le méthanol provient de la firme Janssen Chimica (Beerse, Belgique); l'acide acétique glacial, l'éthanol absolu, le dichromate de potassium, l'acide nitrique 65%, le nitrate d'argent, le glycérol, et le carbonate de sodium de la firme Merck (Darmstadt, Allemagne); le glutaraldehyde de la firme Fluka (Buchs, Suisse); et le formaldehyde de la firme Belgaco (Overijse, Belgique).

Les solutions marquées par le signe* doivent être faites le jour même, les autres peuvent être faites la veille.

Fixateur I

Réactifs	Concentration finale
méthanol	43,9 %
acide acétique glacial	14,0 %

Fixateur II

Réactifs	Concentration finale
glutaraldéhyde	20,0 %

Lavage

Réactifs	Concentration finale
éthanol absolu	8,0 %
acide acétique glacial	5,3 %

Oxydant *

Réactifs	Concentration finale
dichromate de potassium	3,4 mM
acide nitrique	3,2 mM

Nitrate d'argent *

Réactifs	concentration finale
nitrate d'argent	12,0 mM

Développeur

Réactifs	Concentration finale
carbonate de Na formaldehyde	0,28 M 0,02 %

Arrêt

Réactifs	Concentration finale
acide acétique glacial glycérol	3,7 % 1,0 %

5.3. METHODE

Le gel est incubé dans 200 ml de fixateur I pendant la nuit. Le lendemain on agite le gel pendant environ 30 minutes.

- Le gel est mis sous agitation dans 200 ml de fixateur II pendant 30 minutes.

- Le gel est lavé quatre fois dans 300 ml de solution de lavage pendant 10 minutes.

- Le gel est mis sous agitation dans 200 ml de solution d'oxydation pendant 15 minutes.

- Le gel est mis sous agitation dans 200 ml de solution de nitrate d'argent pendant 20 minutes.

- Le gel est rincé 1 minute dans 500 ml d'H_2O .

- Le gel est mis sous agitation dans du développeur :

  - La première fois dans 400 ml pour une durée de 1 minute
  - La seconde fois dans 300 ml pour une durée de 1 minute
  - La troisième fois dans 300 ml pour une durée maximale de 15 minutes. Il est nécessaire d'arrêter dès que le background jaunit.

- Le gel est mis dans 200 ml de solution d'arrêt pendant 5 minutes. Ensuite agiter ce gel de temps à autre. Un temps plus long ne semble pas être défavorable.

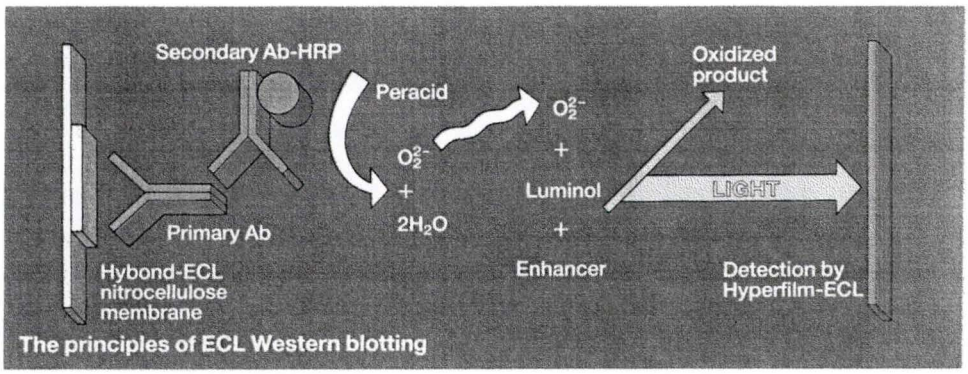


Figure II–6 : Principes du Western blotting ECL (Enhanced ChemiLuminescence)

6. WESTERN BLOTTING

6.1. PRINCIPE

L'objectif de cette technique est de faciliter la détection d'une protéine particulière dans un extrait brut séparée préalablement par une technique d'électrophorèse. Elle consiste au transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF (difluorure polyvinylidène) par l'application d'une différence de potentiel entre deux électrodes situées de part et d'autre du gel et de la membrane. La membrane est ensuite prétraitée afin d'éliminer les sites de fixation aspécifique et elle est ainsi prête pour la révélation de la protéine recherchée (Voir figure II.6). Le plus souvent, on a recourt à une détection indirecte : une fois que le premier anticorps dirigé contre la protéine est fixé, la révélation se fait grâce à un second anticorps qui reconnaît le premier. Le second anticorps est couplé à la peroxydase qui va catalyser la réaction de décomposition de l'H_2O_2 en H_2O et O_2^-. La protéine est alors révélée par chemoluminescence en présence de luminol. Celui-ci est oxydé et va monter dans un état excité et qui peut retourner à son état fondamental en émettant de la lumière (Pour revue, voir Durand, 1988).

6.2. MATERIELS

Tous les sels ainsi que l'acide trichloroacétique, le rouge Ponceau et la glycine proviennent de la firme Merck (Darmstadt,. Allemagne); le méthanol de la firme Janssen Chimica (Beerse, Belgique); le merthiolate et le tween 20 de la firme Sigma Chemical (Saint-Louis, USA); le lait en poudre de la firme Gloria (Vevey, Suisse);et les membranes de nitrocellulose de la firme Bio-Rad (Richmond, USA).

Solution de coloration (Rouge Ponceau)

Réactifs	**Concentration finale**
Rouge Ponceau TCA	0,2 % 3,0 %

PBS 10x (Stock)

Réactifs	Concentration finale
NaCl	1,37 M
KCl	0,03 M
Na_2HPO_4 . $1H_2O$	0,12 M
KH_2PO_4	0,015 M

Porter à pH 7,4
A garder à température ordinaire

TBS 10x (Stock)

Réactifs	Concentration finale
Tris	0,2 M
NaCl	1,37 M

Porter à pH 7,6
A garder à température ordinaire

TBS + Tween 20 0,1% (TBS -T)

Réactifs	Concentration finale
TBS 10x	10 %
Tween 20	0,1 %

A garder à 4°C

Solution de transfert

Réactifs	Concentration finale
Tris base	0,025 M
glycine	0,192 M
méthanol	20 %

Porter à pH 8,3
Cette solution peut être utilisée 2 fois

Merthiolate 1% (Stock)
(Aliquots de 1 ml)
A garder à - 20°C

Blotto 5%

Réactifs	Concentration finale
Lait en poudre	5%
Merthiolate	0,001%

Révélateur

Nous avons utilisé le système d'analyse de western blotting ECL (Enhanced Chemiluminescence) commercialisé par la firme Amersham (Amersham, Angleterre).

Le kit contient 2 types de solutions : agent de détection 1 et 2. Ces agents de détection contiennent de l'H_2O_2, du luminol et un enhancer.

Anticorps

L'anticorps de souris contre l'protéine virale provient de chez Smith Kline Beecham Biologicals (Rixensart, Belgique).

L'anticorps de lapin anti-anticorps de souris couplé à la peroxydase nous est fourni par la firme Amersham (Amersham, Angleterre).

6.3. METHODE

6.3.1. Transfert

- Lorsque les échantillons migrent, couper une membrane de nitrocellulose de 23,5 X 16 cm.

- Marquer le haut du filtre par une encoche dans la membrane.

- Equilibrer la membrane dans du tampon de transfert pendant 30 minutes et le gel pendant 10 minutes.

- Enlever le gel concentrateur (stacking gel).

- Préparer le système sandwich. Réaliser l'assemblage dans le tampon de transfert. Assembler les différentes pièces dans l'ordre suivant :

  Support de plastique
  Tampon 'Scotch Brite' (éponge)
  2 feuilles de papier Whatman
  Membrane de nitrocellulose
  Gel séparateur
  2 feuilles de papier Whatman
  Tampon 'Scotch Brite'
  Support de plastique

- Empêcher les bulles d'air.

- Resserrer fortement le système sandwich et déposer le dans l'appareil LKB 2005 Transfor Electroblotting .

- Rajouter le tampon de transfert.

- Mettre le pôle négatif du côté du gel.

- Faire le transfert en réfrigérant à 4°C.

- Voltage : Pour 3 gels, appliquer 40 V pendant toutes la nuit. Le lendemain matin, mettre à 60 V pendant 30 minutes.

6.3.2. Traitement et révélation

- Quand le transfert est terminé, sortir le filtre du système sandwich et rincer la membrane avec de l'eau distillée.

- Colorer la membrane au rouge Ponceau pendant 5 minutes sous agitation.

- Décolorer 2 à 3x avec de l'eau distillée pour repérer les standards. Marquer ensuite les standards au crayon.

- Décolorer la membrane 10 minutes avec du PBS 1x.

- Mettre la membrane dans un sac de plastique.

- Saturer la membrane de nitrocellulose avec du Blotto 5% : utiliser 30 ml par membrane.

- La membrane sera insérée entre 2 plaques de verre. Incuber une heure à 37° sous agitation.

- Laver la membrane 1 fois 15 minutes dans du TBS-T + 0,1% de lait puis 2 fois 5 minutes dans du TBS-T + 0,1% de lait . Ces lavages se réalisent à température ordinaire

- Remettre la membrane dans un sac plastique et ajouter le premier anticorps dilué 1/5000 dans du TBS-T sans lait : utiliser 30 ml par membrane.

- Incuber 2h30 à 37°C sous agitation.

- Laver la membrane avec du TBS-T + 0,1% de lait 3 fois 15 minutes à 37°C.

- Ajouter le deuxième anticorps anti-anticorps de souris lié à la peroxydase dilué 1/5000 dans du TBS-T.

- Incuber 1 heure à température de la pièce.

- Laver la membrane avec du TBS-T + 0,1% de lait une fois 15 minutes puis 4 fois 5 minutes. Ces lavages sont réalisés à température ordinaire.

- Révéler pendant une minute. Le révélateur se compose d'un volume d'agent de détection 1 pour un volume d'agent de détection 2. Utiliser 20 ml de révélateur par membrane

- Exposer le film d'autoradiographie dans une cassette pendant un temps relativement court suivant la concentration en anticorps.

Figure II–7 : Photo illustrant un gel à deux dimensions avant analyse par le logiciel Bioimage.

Figure II–8 : Photo illustrant un gel à deux dimensions après la localisation des taches par le logiciel Bioimage. Le sommet de chaque tache est indiqué par une croix.

7. ANALYSE DES GELS A L'AIDE DU LOGICIEL BIOIMAGE

L'analyse des gels à deux dimensions (voir Figure II-7) se fait grâce au logiciel Bioimage de chez Millipore.

La première étape consiste en une acquisition de l'image des gels grâce à une caméra haute résolution et à sa digitalisation. Le fichier comportant l'image du gel est alors soumis au module de détection des spots et de quantification. Enfin, les taches homologues sur différents gels peuvent être appariées et le module de comparaison du logiciel fournira une superposition des gels.

7.1. ACQUISITION DU GEL

La première étape du traitement d'un gel d'électrophorèse bidimensionnel consiste à digitaliser l'image du gel c'est-à-dire à transformer cette image continue en une information discrète qui sera compréhensible par l'ordinateur. L'image digitalisée sera donc formée d'un ensemble bidimensionnel de points, ou pixels (1024 sur 1024), chacun prenant une valeur correspondant à la quantité de gris de la zone définie par le pixel. La taille d'un pixel définira le degré de résolution de l'image. Plus cette taille sera petite, plus la précision obtenue sera importante; mais l'image digitalisée occupera d'autant plus d'espace informatique. Le second paramètre important de la digitalisation est la résolution en niveaux de gris. Le digitaliseur va transformer le degré de gris des pixels en valeur numérique. Chaque pixel contient 256 niveaux de gris possibles et occupe un espace de 8 bits. Pour transformer les niveaux de gris en densité optique, nous utilisons une échelle de calibration qui va de 0,05 à 3 d'absorbance.

7.2. DETERMINATION DES TACHES ET QUANTIFICATION

Pour déterminer la présence d'une tâche, chaque pixel est comparé à ses voisins suivant les paramètres définis au préalable par l'utilisateur. La localisation des taches est réalisée par la recherche des sommets d'intensité des pixels (voir Figure II-8)

Figure II–9 : Photo illustrant un gel à deux dimensions après quantification des taches par le logiciel Bioimage.

La tache est ensuite divisée en 36 triangles et son intensité sera représentée par son volume qui tient compte du niveau de gris de chacun des pixels, calculé sur l'image (voir Figure II-9). On obtient ainsi l'IOD (intégration de la densité optique) . L'analyse du gel est terminée. Plusieurs gels sont ainsi traités

7.3. COMPARAISON DES GELS

La comparaison de deux gels est réalisée en collaboration avec l'utilisateur qui apparie plusieurs taches bien identifiées sur les deux gels (voir Figure II-10). Ensuite, le logiciel par un système de triangulation (à l'intérieur de chaque triangle, l'ordinateur va comparer chaque tâche par rapport à ses plus proches voisins), calcule les transformations mathématiques corrigeant les déformations du gel (voir Figure II-11). Le résultat est une superposition des deux gels à l'écran. Une fois la comparaison terminée, le logiciel normalise un gel par rapport à l'autre et on passe dans le module de traitement des résultats. Dans le cas d'une série de plusieurs gels à comparer entre eux, on détermine un gel de référence auquel chaque autre gel sera comparé suivant des critères fixés par l'utilisateur.

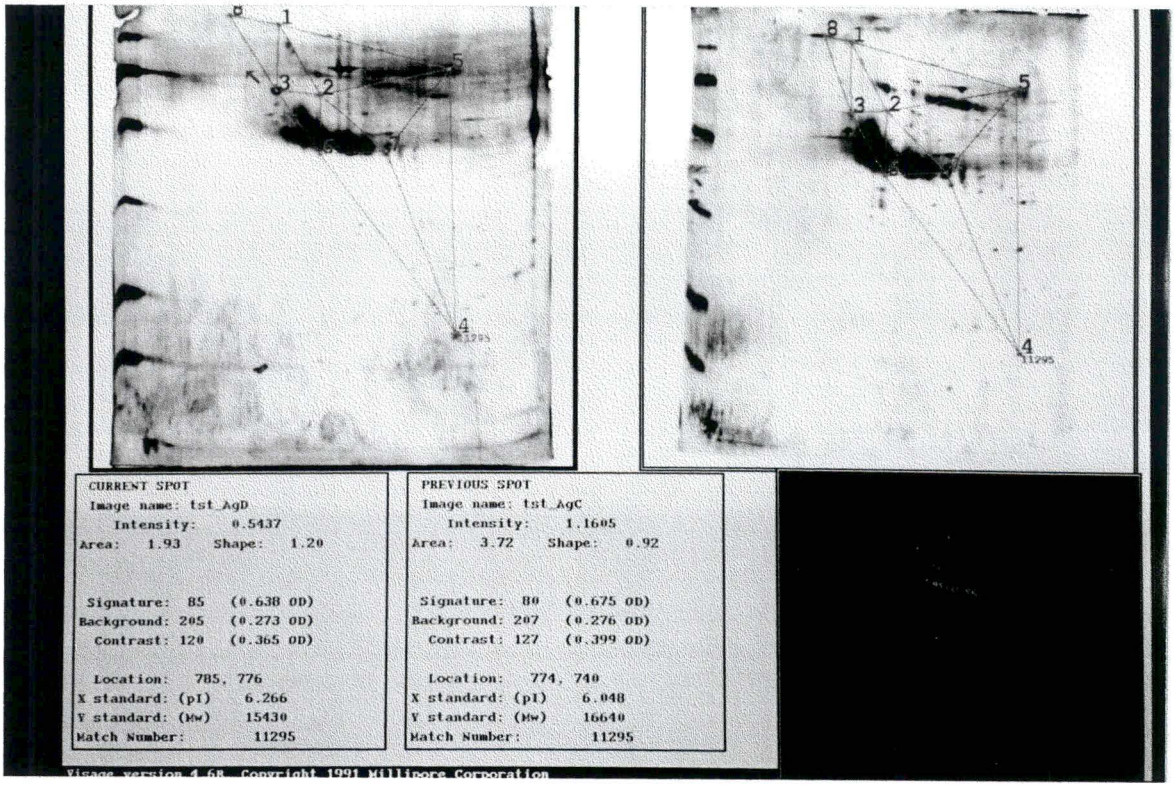


Figure II–10 : Photo illustrant le système de triangulation. Celui-ci permet la superposition de deux gels à l'écran.

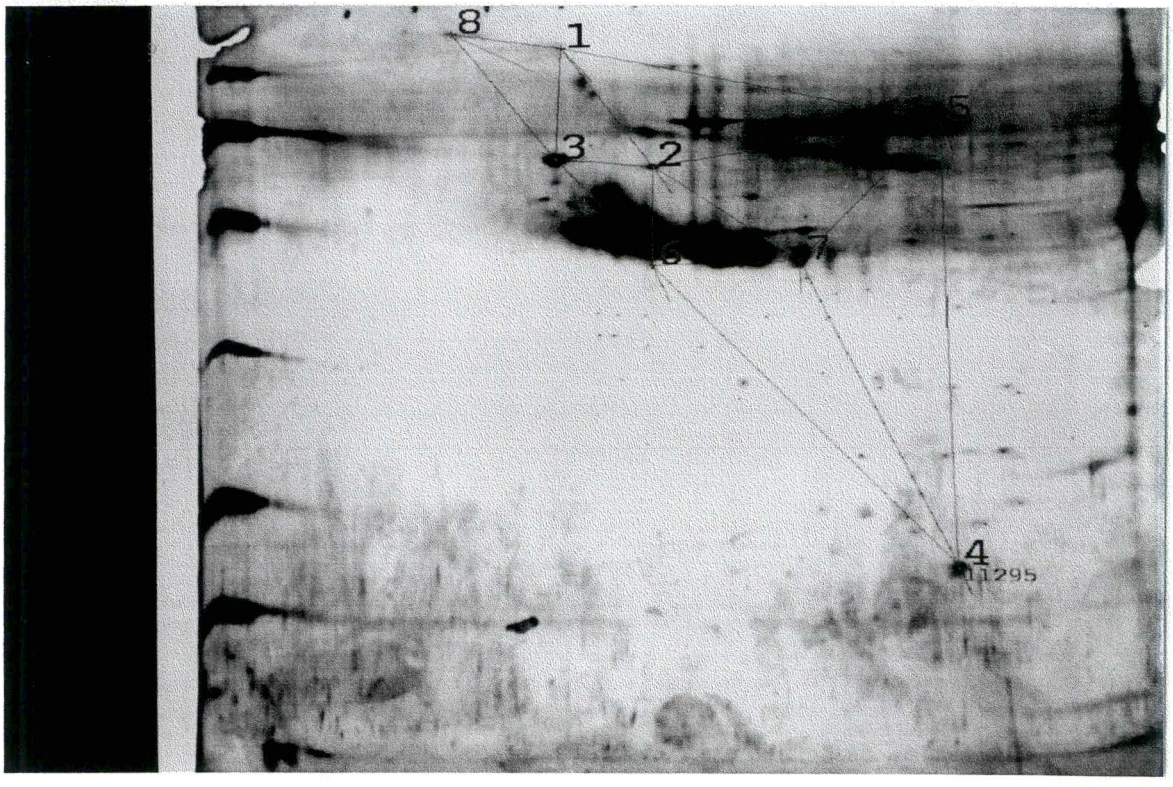


Figure II–11 : Système de triangulation

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. DESCRIPTION DES DIFFERENTS ECHANTILLONS

Au cours de ce travail, nous avons analysé divers surnageants de cellules CHO produisant une protéine virale par la méthode d'électrophorèse bidimensionnelle couplée au Western blotting et ce afin de mettre en évidence des différences dans les sécrétions protéiques en fonction des conditions de culture. Dans un premier temps, nous décrirons les échantillons recueillis. Nous distinguerons :

- les échantillons de culture en adhérence.

- les échantillons de culture en suspension : rappelons que les systèmes en suspension utilisés, sont, à petite échelle le spinner et à grande échelle le bioréacteur où la culture cellulaire a été réalisée selon deux modes de fonctionnement : en batch ou en perfusion.

- les échantillons de la protéine purifiée dans différentes conditions

Nous avons recueilli les échantillons de culture en adhérence ainsi que ceux de culture en spinner lors d'un stage de trois semaines effectué chez Smith Kline Beecham Biologicals. Quant aux échantillons de bioréacteurs et ceux de la protéine purifiée, ils nous ont été fournis directement par la firme.

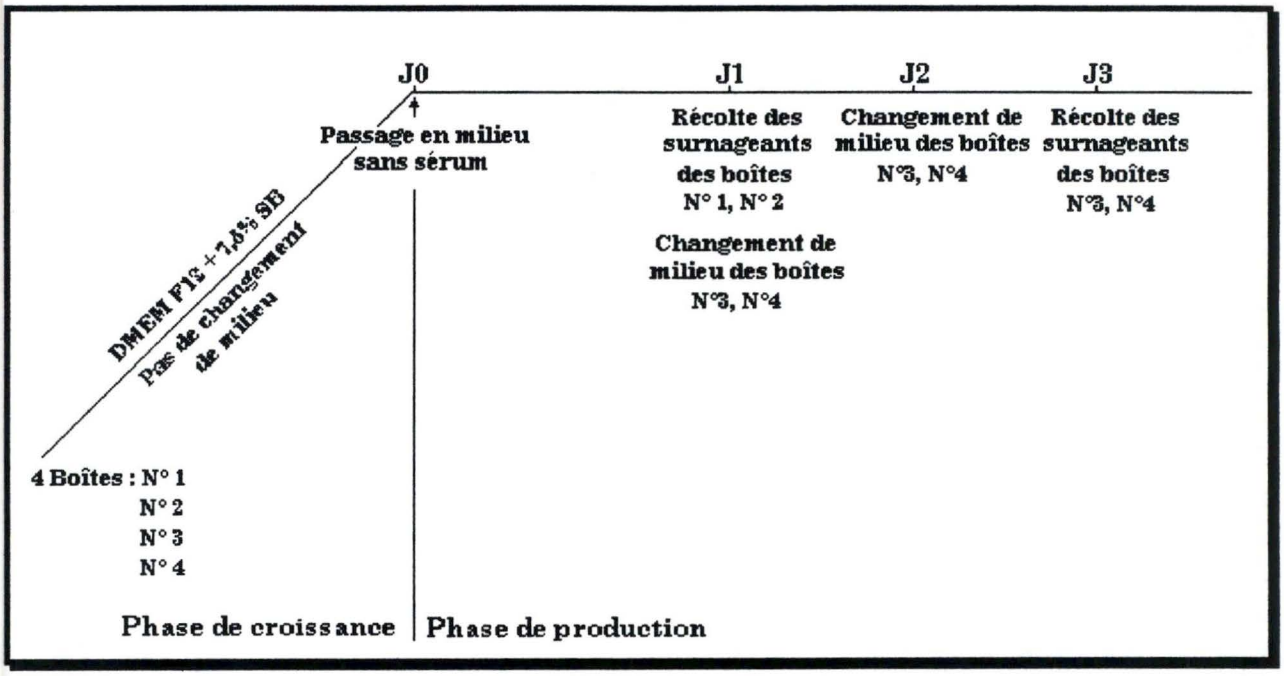


Figure III–1 : Schéma illustrant la manière dont les échantillons de culture en adhérence ont été générés.

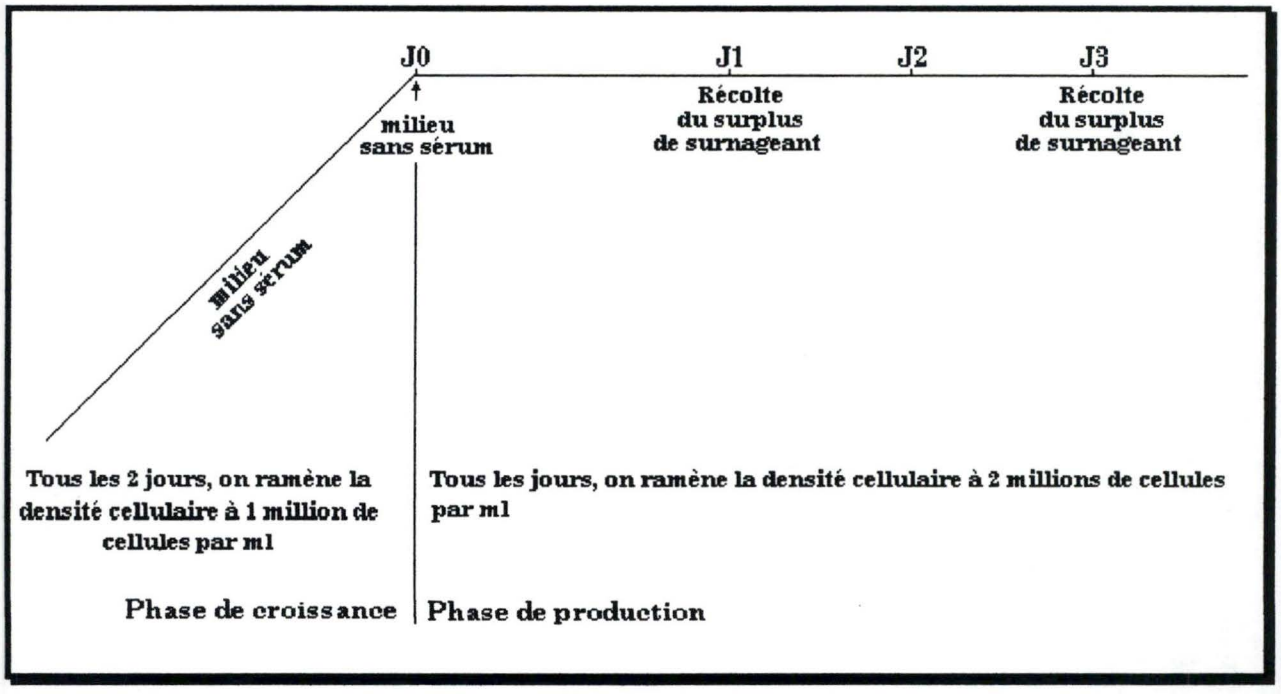


Figure III–2 : Schéma illustrant la manière dont les échantillons de spinner ont été générés.

1.1. CULTURE EN ADHERENCE

Les cellules CHO recombinantes sont cultivées dans 50 ml de milieu DMEM F12 en présence de 7,5% de sérum bovin, ce qui améliore l'attachement des cellules à leur support ainsi que leur croissance. Celles-ci sont repiquées dans des boîtes de culture de 175 cm^2 (voir matériels et méthodes paragraphe 1.3.2.) et ce jusqu'à obtenir quatre boîtes de cellules à confluence. La figure III-1 illustre la manière dont les surnageants ont été récoltés. Arrivées à confluence, les cellules entrent dans la phase de production (jour 0) : le milieu DMEM F12 supplémenté par 7,5% de sérum bovin est remplacé par le milieu sans sérum afin d'éviter que l'albumine bovine n'interfère avec les protéines sécrétées par les cellules lors de leur détection sur gel bidimensionnel. Au jour 1, les surnageants de deux boîtes de culture sont récoltés, centrifugés à 600 rpm (J-21 Beckman) et conservés à -20°C. Quant aux deux boîtes restantes, on renouvelle le milieu au jour 1 et au jour 2. Ce n'est qu'au jour 3 que les surnageants de ces deux dernières boîtes sont recueillis. La même démarche a été suivie pour chaque clone de cellules recombinantes.

1.2. CULTURE EN SUSPENSION

1.2.1. Echantillons de spinner

Les cellules sont cultivées dans 150 ml de milieu Iscove modifié (milieu sans sérum), celui-ci favorise aussi bien la phase de croissance que la phase de production. Lors de la phase de croissance, les cellules CHO sont remises tous les deux jours à une densité cellulaire de 1 . 10^6 cellules par ml, alors que lors de la phase de production, on ramène tous les jours la quantité de cellules à une densité de 2 . 10^6 par ml (voir matériels et méthodes paragraphe 1.3.2). Quand on passe en phase de production (J0), il est dès lors possible de récolter le surplus de surnageant cellulaire, celui-ci n'étant pas utilisé pour inoculer un nouveau spinner. La récolte s'est faite au jour 1 et au jour 3 (voir figure III-2).

1.2.2. Echantillons de bioréacteur

Dans les bioréacteurs, la culture cellulaire peut être réalisée selon deux modes de fonctionnement :

- la culture en perfusion
- la culture en batch

- Echantillons de culture en perfusion

  Dans ce type de culture, le milieu est constamment renouvelé (voir figure I.6 de l'introduction).

  Nous avons réalisé deux cultures de ce type : pour chacune d'entre elles, 250 ml de surnageant ont été prélevés en début et en fin de culture. Pour la culture I, ils ont été prélevés au cinquième jour et au vingtième, tandis que pour la culture II, ils ont été prélevés au septième jour et au vingtième.

- Echantillon de culture en batch

  Pendant toute la durée de la culture, il n'y a pas de renouvellement du milieu de culture (Voir figure I.6 de l'introduction). Pour ce type de culture un seul échantillon a été prélevé, et ce au troisième jour.

Pour chacun des échantillons de bioréacteur, nous disposons de différentes données :

- la densité cellulaire
- la viabilité cellulaire
- le dosage par ELISA de la protéine recombinante
- l'état d'avancement de la culture

Types de culture	Densité cellulaire (cellules/ ml)	Viabilité (%)	Elisa (µg/ml)	Etat d'avan-cement de la culture
Culture I en perfusion j5	$6,00 . 10^6$	96,8	21,2	Début
Culture I en perfusion j20	$4,84 . 10^6$	92,8	13,0	Fin
Culture II en perfusion j7	$5,75 . 10^6$	93,6	9,34	Début
Culture II en perfusion j20	$9,00 . 10^6$	87,0	17,8	Fin
Culture en batch j3	$5,26 . 10^6$	94,2	27,2	Fin

1.2.3. Protéine purifiée

Différents échantillons de protéine purifiée nous ont été fournis :

- la protéine produite et purifiée à partir du milieu Iscove sans sérum
- la protéine produite et purifiée à partir du milieu DMEM F12 avec sérum
- la protéine ayant subi une dégradation pendant six jours à 37° C. Celle-ci a également été produite à partir du milieu avec sérum.

Tous ces échantillons de protéines purifiées ont été resuspendus dans du tampon PBS.

La table suivante reprend les concentrations ainsi que les volumes des différents échantillons.

Echantillons	**Conc. en protéines (µg/ml)**	**Volume disponible (ml)**
Protéine purifiée à partir du milieu sans sérum	241	7,2
Protéine purifiée à partir du milieu avec sérum	392	3,0
Protéine dégradée purifiée à partir du milieu avec sérum	702	3,0

2. CONCENTRATION DU SURNAGEANT

La méthode des gels à 2 dimensions est utilisée afin d'analyser les protéines sécrétées par des cellules CHO recombinantes. Si l'analyse par gels à deux dimensions a déjà été appliquée sur des lysats de cellules au laboratoire, elle n'avait pas encore été utilisée pour étudier des protéines sécrétées, relarguées dans le milieu de culture. On estime en général que les protéines sécrétées représentent plus ou moins 10 % des protéines cellulaires. Le milieu ne contenant que peu de protéines produites par les cellules, il a fallu effectuer une concentration préalable. Pour tenter de concentrer les protéines sécrétées, plusieurs méthodes ont été expérimentées.

Nos premiers essais ont été réalisés sur 10 ml de milieu α-MEM, milieu utilisé pour la culture de cellules CHO DHFR$^-$ non recombinantes. Nous nous sommes d'abord basés sur un protocole proposé par Millipore qui consiste en une précipitation à l'acétone.

2.1. PROTOCOLE DE PRÉPARATION DE SURNAGEANTS DE CULTURE POUR GELS 2D (MILLIPORE)

Tampon d'échantillon 1 (SB1)

Réactifs	**Concentration finale**
SDS	0,3%
DTT	200 mM
Tris HCl	28 mM
Tris base	22 mM

Tampon d'échantillon 2 (SB2)

Réactif	**Concentration finale**
Tris base	24 mM
Tris HCl	476 mM
$MgCl_2$	50 mM
DNAse I	1 mg/ml
RNAse A	0,25 mg/ml

Tampon d'échantillon 3 (SB3)

Réactif	**Concentration finale**
Urée	9,9M
Triton X-100	4%
Servalyte 40% pH7-9	2,2%
DTT	100 mM

+ Acétone

Traitement des surnageants de culture

1. Prendre le surnageant contenant les protéines sécrétées.

2. Précipiter les protéines avec 4 volumes d'acétone froid pour un volume de surnageant.

3. Incuber 20 minutes dans la glace sous agitation lente.

4. Centrifuger 10 minutes à 12.000 rpm (J-21, Beckman).

5. Eliminer l'acétone et solubiliser le culot dans un volume de tampon d'échantillon SB 1 en essayant d'obtenir une concentration en protéines qui est de plus ou moins 4-5 mg/ml. Après la solubilisation du culot dans SB1, faire bouillir 5 minutes à 100°C.

Remarque : Si les protéines sécrétées sont trop diluées, il faut recommencer la précipitation et la resolubilisation du culot dans SB1 avant de bouillir.

6. Mettre 5 minutes dans la glace.

7. Ajouter 1/10 de volume de tampon d'échantillon (SB2) contenant la DNASE et la RNASE pour éliminer les acides nucléiques.

8. Incuber 8 minutes dans la glace avec SB2.

9. Précipiter les protéines avec 4 volumes d'acétone froid puis faire les étapes 2-4.

10. Resolubiliser le culot dans 1 volume de SB1 + 4 volumes de SB3 de façon à obtenir plus ou moins 4-5 mg/ml d'une solution qui doit être claire en principe. On dépose 20 µl de cette solution pour l'analyse bidimensionnelle sur gel.

Mais nous nous sommes heurtés à une première difficulté. L'ajout d'acétone à l'α-MEM provoque l'apparition d'un précipité blanc parasite qui se maintient tout au long des étapes de précipitation-resolubilisation et dont l'importance semblait sans rapport avec la concentration en protéines dans l'échantillon final. La technique de précipitation fonctionnant généralement mieux sur de petits volumes, nous avons décidé de réaliser une filtration préalable. Cette filtration permettrait à la fois une concentration et un dessalage de l'échantillon. Nos essais ont de nouveau été réalisés sur 10 ml de milieu α-MEM. Deux types de filtres de même " cut off " (10.000) ont été essayés : le Centricon 10 et le Centripep 10. Les résultats sont repris dans le tableau ci-dessous.

Système de filtration utilisé	**Quantité totale de protéines au départ (µg)**	**Rendement de la filtration (%)**	**Rendement de la précipitation (%)**
Centricon 10	3320	46	36,6
Centriprep 10	3320	70	49,7

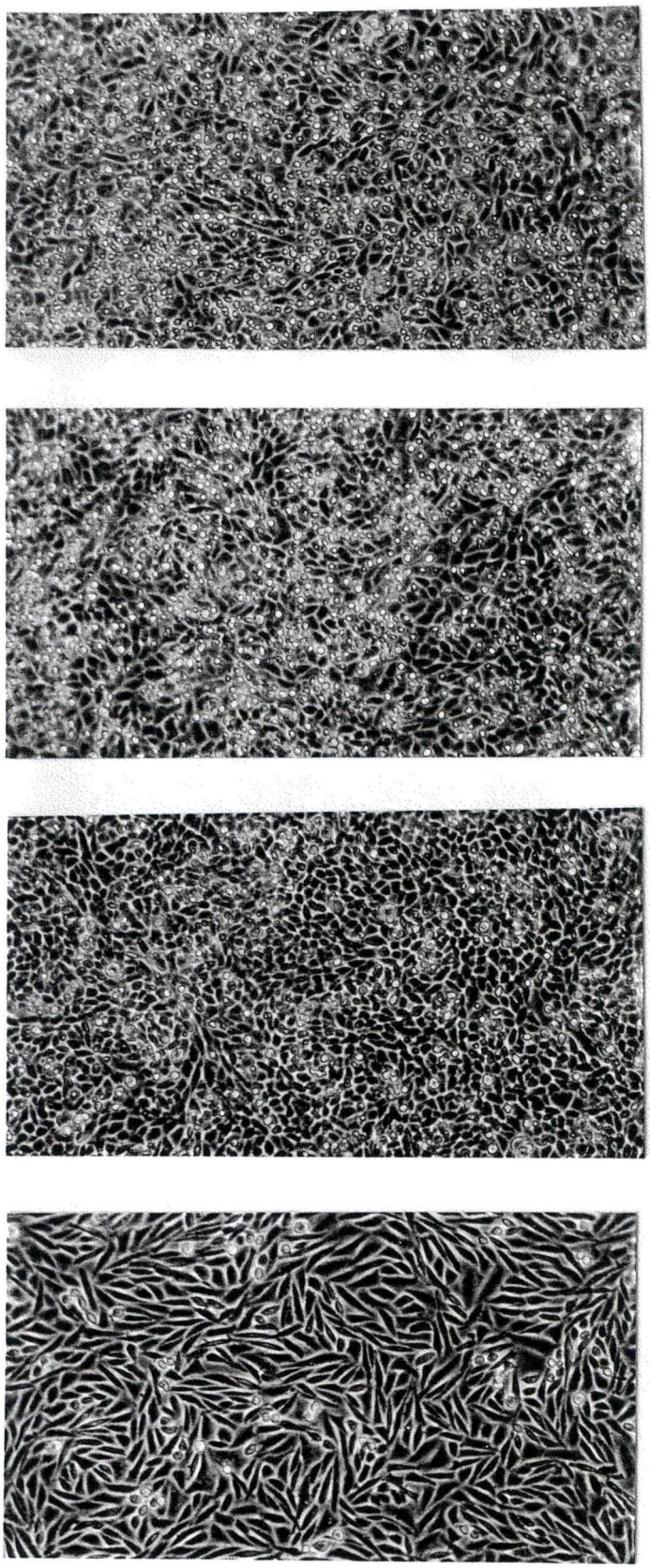


Figure III–3 : Influence du sérum sur la morphologie des cellules CHO non-recombinantes (passage 67) cultivées en adhérence dans le milieu α-MEM. Les cellules ont été cultivées quatre jour dans de l'α-MEM, puis 24 heures dans les différents milieux (A, B, C,D).
A : en l'absence de sérum
B : en présence d'hydrolysat de lactalbumine 0,2 % (sans sérum)
C : en présence de sérum 1 %
D : en présence de sérum 7,5 % (24 heures après repiquage) utilisé pour la croissance en conditions d'adhérence (contrôle).

Vu le rendement relativement faible obtenu lors d'une filtration sur Centricon 10, nous avons retenu la filtration sur Centriprep 10.

Nous avons alors testé la filtration sur Centripep 10 suivie d'une précipitation à l'acétone sur les surnageants de culture en utilisant différents milieux. Nous avons utilisé de l'α-MEM en absence de sérum, en présence de sérum de veau foetal à 1 % et en présence d'un hydrolysat de lactalbumine (HLA, Gibco) 0,2 %, ce dernier étant souvent utilisé comme substitut de sérum pour des temps limités en culture. En effet, des concentrations plus élevées en sérum entraînent une surabondance, en particulier de l'albumine sérique bovine (SAB) ,ce qui risque de perturber la distribution bidimensionnelle des protéines sécrétées par les cellules. Si les caractéristiques migrationnelles de la SAB sont bien connue, sa surabondance risque néanmoins de masquer certaines des protéines sécrétées par les cellules.

Milieux	**Rendement après filtration (%)**	**Rendement après précipitation (%)**	**Concentration finale (µg/ml)**
α-MEM+0%SB	96	59,5	6000
α-MEM+1%SB	67	49,6	13.600
α-MEM+HLA0,2%	85	61,2	6580

Ces expériences ont été réalisées sur des cellules CHO non recombinantes au passage 68

En appliquant le protocole Millipore avec une étape préalable de filtration sur le milieu α-MEM, nous avons constaté la disparition du précipité blanc " parasite ". Nous obtenons des échantillons finaux clairs, dont la concentration dépasse les 6 mg par ml. Signalons qu'en présence de sérum 1 %, les protéines sériques semblent contribuer pour plus de la moitié des protéines dans l'échantillon final.

Signalons également que nous avons cultivé les cellules CHO non recombinantes dans ces différents milieux pendant 24 heures (Figure III-3). On voit clairement que les cellules CHO après ce laps de temps ont un aspect très variable : en l'absence de sérum et en présence de HLA, elles s'arrondissent considérablement (Figures III-3 A et III-3 B); en présence de 1 % de sérum, le nombre de cellules qui s'arrondissent est moindre (figure III-3 C). A titre de comparaison, la figure III-3 D montre les

cellules cultivées dans l'α-MEM en présence de sérum à 7,5 % (de nombreuses mitoses sont visibles). Ces observations indiquent bien l'importance du sérum pour la culture de ces cellules.

Cependant, lors de la production de protéines recombinantes, la présence du sérum dans le milieu de culture représente un obstacle pour la purification de la protéine recombinante sécrétée, en particulier lorsque la concentration de cette dernière est très faible. C'est pourquoi, des bio-industries comme Smith Kline Beecham Biologicals recherchent des produits de substitution au sérum. Ils testent à l'heure actuelle comme milieu de culture, un milieu synthétique Iscove modifié. Nous avons donc fait des essais sur des surnageants de culture Iscove, en adaptant le protocole mis au point sur le milieu α-MEM. Lors de la précipitation à l'acétone, il se forme cette fois un précipité brun de nature inconnue qui fait coprécipiter les protéines et qui ne se redissout pas dans le milieu utilisé pour redissoudre les protéines en vue des électrophorèses.

Nous avons recommencé la même expérience, afin de vérifier si ce phénomène était répétitif, ce qui nous fût confirmé. Nous avons donc dû abandonner la précipitation à l'acétone.

Nous avons alors essayé de concentrer les surnageants Iscove modifiés par filtration sur Centriprep10 ou par précipitation au TCA, deux techniques de concentration fréquemment mentionnées dans la littérature pour la préparation d'échantillons par électrophorèse bidimensionnelle, et ce après une étape préalable de concentration sur Amicon.

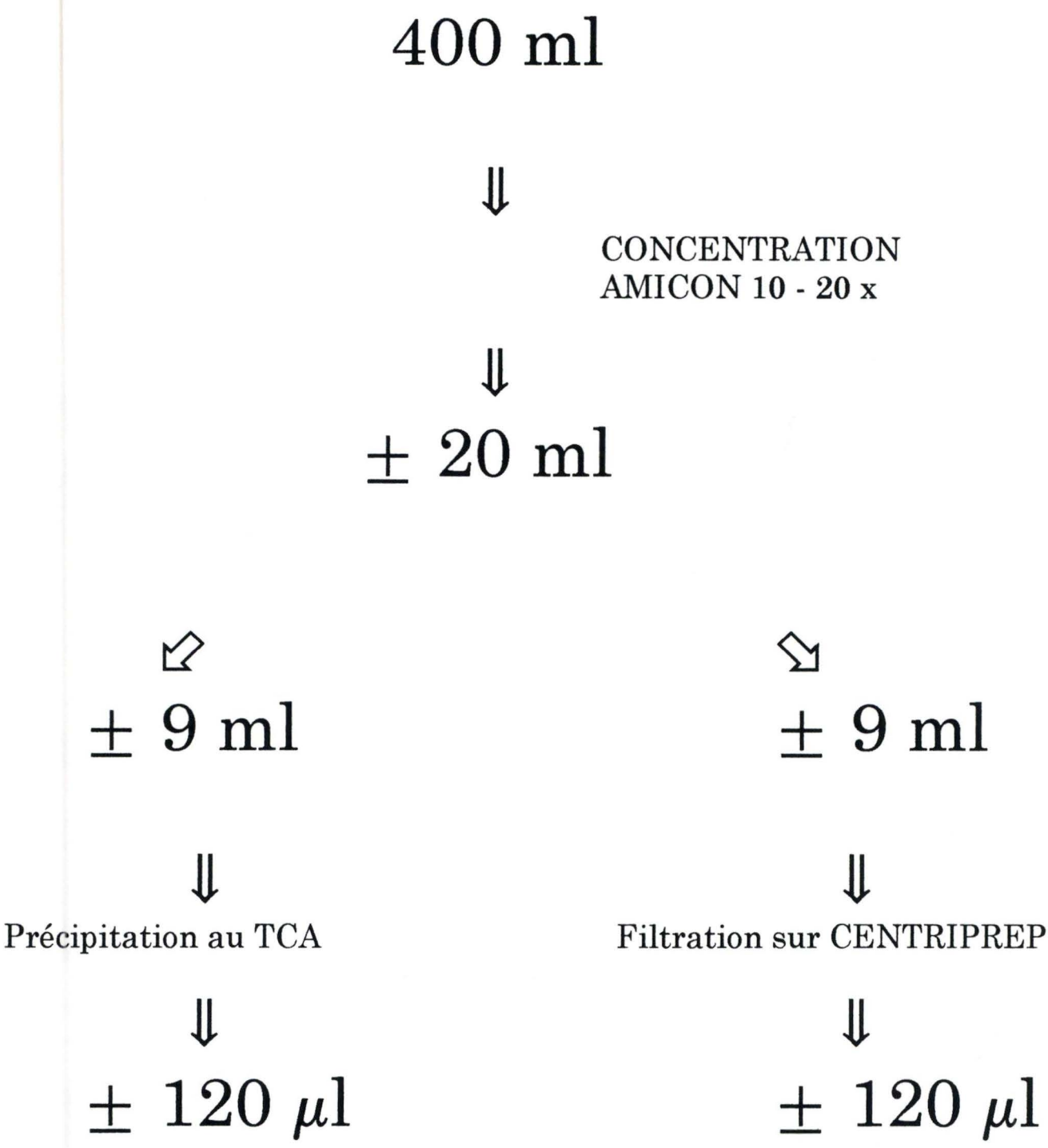


Figure III-4 : Schéma illustrant les deux procédures de concentration testées sur 400 ml de surnageant de culture Iscove sans sérum.

2.2. PRECIPITATION AU TCA ET FILTRATION SUR CENTRIPREP 10

Nos essais ont été réalisés sur 400 ml de surnageant Iscove modifié. Les 400 ml ont tout d'abord été concentrés 20 fois sur Amicon 10. Une moitié du concentrat (plus ou moins 9 ml) a été filtrée sur Centriprep, l'autre a été précipitée au TCA (Figure III-4). Le protocole de précipitation au TCA était le suivant :

1. Ajouter du TCA 60% de façon à obtenir une concentration finale de 20%.
2. Centrifuger à 12.000 rpm (J-21 Beckman) pendant 10 minutes.
3. Resuspendre le culot dans de l'éthanol 95%.
4. Centrifuger à 12.000 rpm pendant 10 minutes.
5. Répéter les étapes 3 et 4.
6. Eliminer le surnageant.
7. Resuspendre le culot dans du tampon de lyse (voir paragraphe 1.3.2 de matériels et méthodes).

Les résultats sont repris dans les tables ci-dessous.

Surnageant de départ		**Après filtration sur Amicon**		**Après précipitation au TCA**	
Conc. en prot. (µg/ml)	Quantité totale en prot. (µg)	Conc. en prot. (µg/ml)	Quantité totale en prot. (µg)	Conc. en prot. (µg/ml)	Quantité totale en prot. (µg)
99,5	19900	831	7479	10247	5123

Surnageant de départ		**Après filtration sur Amicon**		**Après filtration sur Centriprep**	
Conc. en prot. (µg/ml)	Quantité totale en prot. (µg)	Conc. en prot. (µg/ml)	Quantité totale en prot. (µg)	Conc. en prot. (µg/ml)	Quantité totale en prot. (µg)
99,5	19900	831	7479	3786	4543

La concentration en protéines obtenue après précipitation au TCA étant suffisante et supérieure à celle obtenue après filtration sur Centriprep, nous avons retenu ce type de concentration. Signalons également, dans ces conditions, l'absence de tout précipité brun.

Nous avons donc réalisé la précipitation au TCA sur tous les échantillons (100 ml) de culture en adhérence et en spinner : la table ci-dessous reprend la concentration en protéines ainsi que la quantité totale de la protéine recombinante au cours des différentes étapes de concentration.

Echantillons	**Surnageant de départ**		**Après filtration sur Amicon**		**Après précipitation au TCA**	
	Conc. en prot. (µg/ml)	Quantité totale en prot. (µg)	Conc. en prot. (µg/ml)	Quantité totale en prot. (µg)	Conc. en prot. (µg/ml)	Quantité totale en prot. (µg)
Susp-j1 *	36,12	3178	686,3	2951	11465	573
Susp-j3 *	28,52	2396	406,8	1505	4240	212
Adh-Cl1-j1 #	33,65	3096	501,9	2007	3362	168
Adh-Cl1-j3 #	30,23	2690	545,6	1527	2995	150
Adh-Cl2-j1 #	36,12	3251	403,0	1733	7500	375
Adh-Cl2-j3 #	46,20	3465	557,0	1671	2155	108

* : susp : culture en spinner aux jours 1 et 3

: adh : culture en adhérence; Cl 1 (CHO-DHFR) et Cl 2 (CHO-K1) : clones recombinants 1 et 2 aux jours 1 et 3

Nous pouvons voir que la concentration en protéines après précipitation au TCA varie beaucoup d'un échantillon à l'autre. C'est lors de cette dernière étape, que nous observons le plus grand pourcentage de perte. En effet, environ 80% de perte totale est constaté pour les échantillons.

Cependant, malgré ce rendement, c'est une technique très efficace pour concentrer les surnageants et obtenir une concentration en protéines élevée dans la solution finale. C'est pourquoi, nous avons également réalisé la précipitation au TCA sur les échantillons de bioréacteurs (250 ml). Le volume à concentrer étant doublé, nous espérions atteindre une concentration protéique de 10 mg/ml. Mais les résultats n'ont pas

rencontré nos espérances car la redissolution du culot protéique dans le tampon de lyse n'a pas été complète. Le problème de redissolution pouvait provenir de la présence de sels qui coprécipiteraient. Pour résoudre ce problème, nous avons d'abord dialysé le surnageant contre 10 volumes d'eau bidistillée. Mais cette dialyse s'est avérée peu efficace, car après précipitation au TCA, le culot était toujours présent. Nous avons donc essayé de doser les protéines sur ce culot en le resuspendant dans du tampon de lyse contenant 4% de nonidet P40, à la place de 2%. Nous avons obtenu une meilleure redissolution, mais sans parvenir à redissoudre totalement le culot.

La table ci-dessous reprend la concentration en protéines ainsi que la quantité totale de protéines et ceci au cours des différentes étapes de concentration.

Echantillons	**Surnageant de départ**		**Après filtration sur Amicon**		**Après précipitation au TCA**	
	Conc. en prot. (μg/ml)	Quantité totale en prot. (μg)	Conc. en prot. (μg/ml)	Quantité totale en prot. (μg)	Conc. en prot. (μg/ml)	Quantité totale en prot. (μg)
Perf.-I-j5 *	140,0	35000	2185	16606	6124	1225
Perf-I-j20 *	82,7	20685	1213	11159	11275	2255
Perf-II-j7 *	117,0	29260	2073	23114	2370	474
Perf-II-j20 *	174,0	43505	2262	12667	5161	1032
Batch-j3 #	166,0	41510	2994	30538	6200	1860

* : Perf I ou II : culture I ou II en perfusion aux jours 5 et 20 (voir paragraphe 1.2.2 des résultats)

: Batch : culture en batch au jour 3 (voir paragraphe 1.2.2 des résultats)

De nouveau, le rendement de la dernière étape ne dépasse pas les 20 %.

Dans le but d'augmenter le rendement, nous avons encore essayé une autre méthode de précipitation classique, la précipitation au sulfate d'ammonium.

2.3. PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM

- Ajouter du sulfate d'ammonium 100% de façon à obtenir une concentration finale de 70%. Le pH était porté à 7,4.

- Centrifuger 10 minutes à 12000 rpm (J-21 Beckman):

- Dialyser 48 heures contre du tampon phosphate 10 mM pH 7,4.

- Filtrer sur Amicon 10 jusqu'à obtenir plus ou moins 1 ml de solution.

Lors de la dialyse, un précipité blanc relativement abondant s'est formé. Une centrifugation à 12000 rpm (J-21, Beckman) pour éliminer ce précipité a malheureusement montré que les protéines avaient disparu de la solution et avaient donc aussi coprécipité lors de la dialyse. Cette méthode fut donc abandonnée.

2.4. CONCENTRATION A L'AIDE DE SEPHADEX

Enfin, nous avons essayé une dernière méthode de concentration que nous avons appliquée aux échantillons de protéine recombinante purifiée (voir paragraphe 1.2.3 de résultats). Les échantillons de protéine purifiée doivent au même titre que les surnageants de culture être concentrés. En effet, leur concentration en protéines est insuffisante. De plus, les protéines purifiées à partir de milieu sans sérum et de milieu avec sérum (dégradées ou non) ont été resuspendues dans du PBS. Les sels contenus dans celui-ci perturberaient la migration des protéines en première dimension. Afin d'augmenter le rendement de la concentration, nous avons procédé comme suit :

- Les différents échantillons de protéine purifiée sont dialysés contre de l'eau bidistillée.

- La membrane de dialyse est enroulée dans du Sephadex (G100). Le tout est conservé dans une feuille de plastic à 4° C pendant deux jours durant lesquels la totalité de l'eau bidistillée sera absorbée par le Sephadex.

Echantillons	Avant concentration		Après concentration				
			Première récupération A		Deuxième récupération B		Total A + B
	Conc. en prot. (µg/ml)	Quantité totale de prot. (µg)	Conc. en prot. (µg/ml)	Quantité totale de prot. (µg)	Conc. en prot. (µg/ml)	Quantité totale de prot. (µg)	Quantité totale de prot. (µg)
Protéine purifiée à partir du milieu sans sérum	241	1735	15903	557	3343	413	970
Protéine purifiée à partir du milieu avec sérum	392	1176	3478	191	1549	70	216
Protéine dégradée purifiée à partir du milieu avec sérum	702	2106	12341	321	5765	202	553

Table III-1 : Tableau récapitulatif reprenant la concentration ainsi que la quantité totale de protéines avant et après concentration par la méthode membrane de dialyse - Séphadex:

- La membrane de dialyse est débarrassée du Sephadex.

- 100 à 200 µl de tampon de lyse (cette quantité varie selon la longueur de la membrane de dialyse) sont déposés à l'intérieur de celle-ci pour solubiliser les protéines (première récupération). Cette opération est répétée une seconde fois, de manière à récupérer une quantité maximale de protéines (seconde récupération).

La table III-1 reprend la concentration en protéines ainsi que la quantité totale de protéines avant et après concentration.

Ce rendement est supérieur à celui observé lors d'une précipitation au TCA, mais pourrait encore être amélioré si nous disposions d'un moyen plus efficace de récupération du tampon dans le sac à dialyse. C'est donc cette méthode que nous préconisons pour traiter et les surnageants de culture et les échantillons de protéine recombinante purifiée, au stade actuel de notre travail.

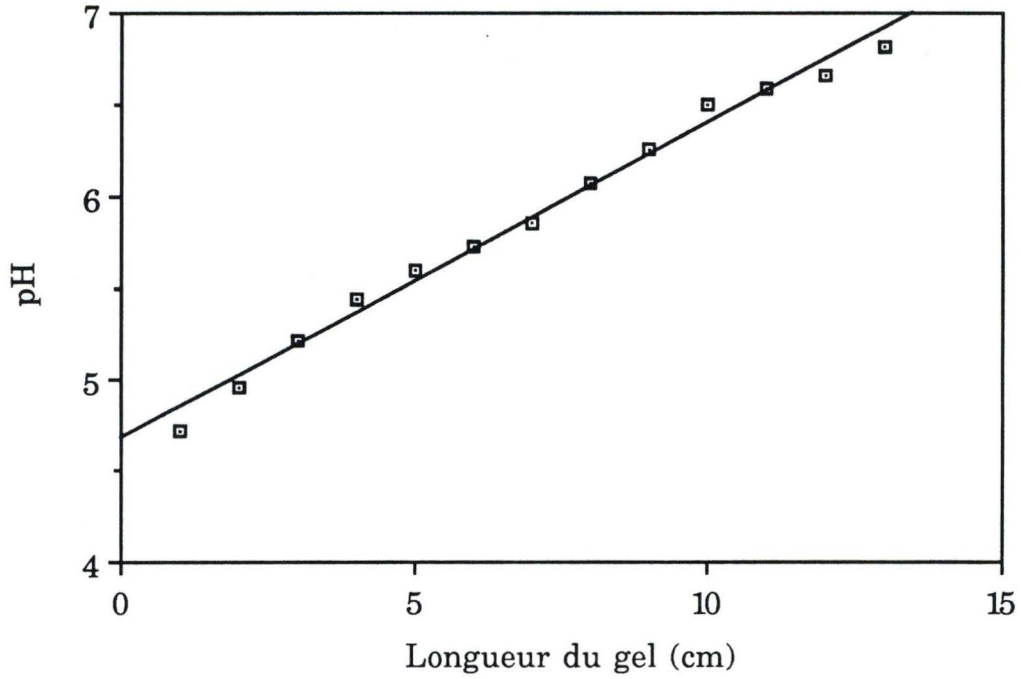


Figure III–5 : Gradient 5-7 : droite exprimant le pH en fonction de la longueur du gel en cm.

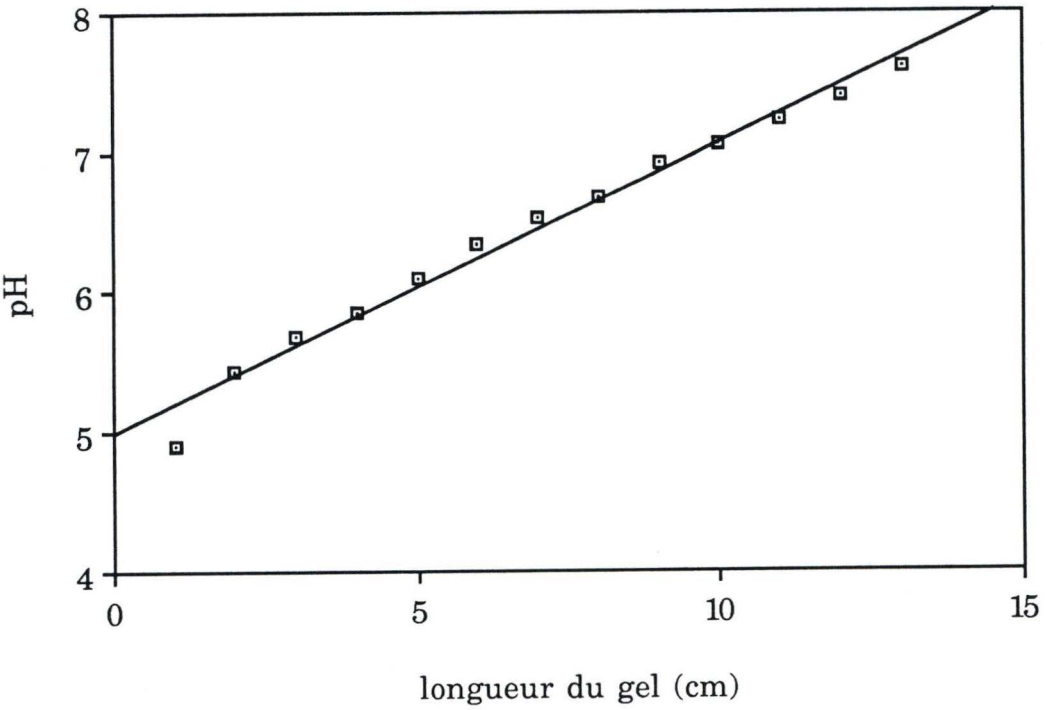


Figure III–6 : Gradient 4-8 : droite exprimant le pH en fonction de la longueur du gel en cm.

3. GELS A DEUX DIMENSIONS ET WESTERN BLOTTING

Différentes mises au point ont été réalisées avant d'effectuer les gels bidimensionnels ainsi que les Western blottings sur les échantillons définitifs.

3.1 GRADIENT DE PH

Lors de l'application de la technique d'électrophorèse bidimensionnelle à des lysats cellulaires, le gradient de pH le plus couramment utilisé est le gradient 5-7 (voir figure III-5). Mais celui-ci ne convient pas pour suivre la production de la protéine recombinante, le point isoélectrique (PI) de celle-ci se situant entre 4 et 4,5. Nous avons donc tenté de générer différents gradients de pH, parmi ceux-ci les gradients 3-10, 4-8, 3-6 et 4-7.

3.1.1. Composition des gels

Gradient 3-10

Ampholytes	Concentration (%)
Serva 2-4	9,1
Serva 9-11	9,1
Serva 3-10	40,9
Biolyte 3-10	40,9

Gradient 4-8 (voir figure III-6)

Ampholytes	Concentration (%)
Serva 2-4	11,1
Serva 7-9	22,2
Serva 5-7	44,4
Serva 3-10	11,1
Biolyte 3-10	11,1

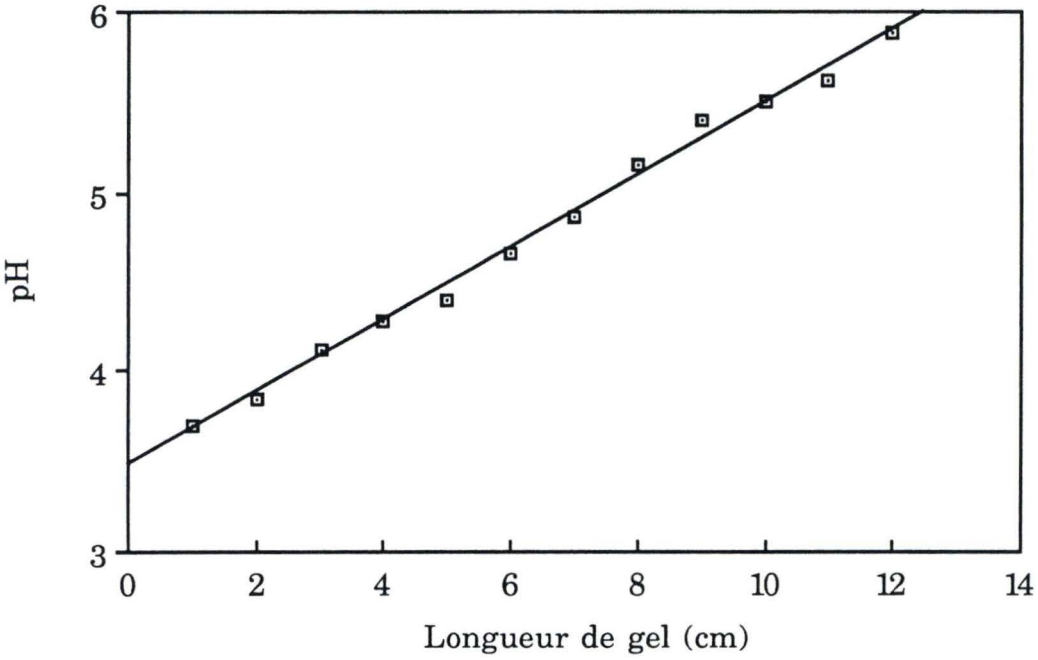


Figure III–7 : Gradient 3-6 : droite exprimant le pH en fonction de la longueur du gel en cm.

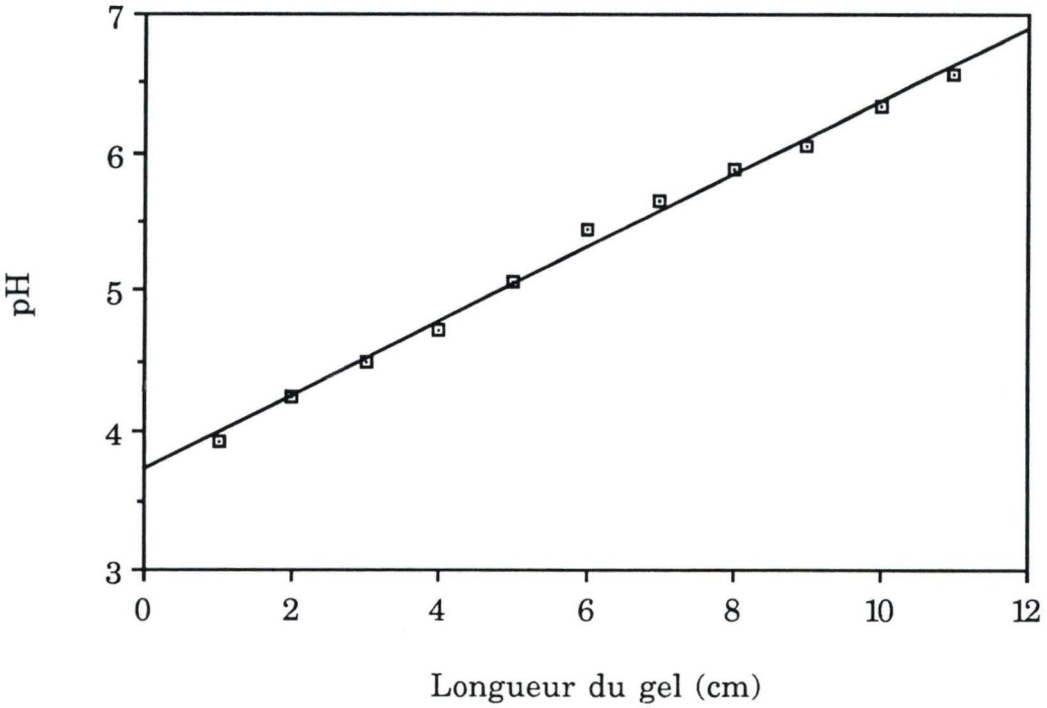


Figure III–8 : Gradient 4-7 : droite exprimant le pH en fonction de la longueur du gel en cm.

Gradient 3-6 (voir figure III-7)

Ampholytes	**Concentration (%)**
Serva 2-4	57,2
Serva 4-6	28,5
Serva 5-7	14,3

Gradient 4-7 (voir figure III-8)

Ampholytes	**Concentration (%)**
Serva 2-4	25,0
Serva 4-6	25,0
Serva 5-7	25,0
Serva 3-10	12,5
Biolyte 3-10	12,5

3.1.2. Propriétés des gels

Le **gradient 3-10** ne polymérise pas bien. En effet, les ampholytes 9-11 présentent dans certains cas la propriété d'empêcher la polymérisation. Pour contourner ce problème, différents essais ont été entrepris :

- Elimination du Temed : nous n'améliorons toujours pas la polymérisation.

- Augmentation de la concentration en persulfate d'ammonium : on constate une faible amélioration de la polymérisation. Mais un apport supplémentaire en persulfate d'ammonium conduirait à une diminution considérable de la résolution.

Le **gradient 4-8** ne couvrant pas la zone de pH espéré n'a pas été retenu.

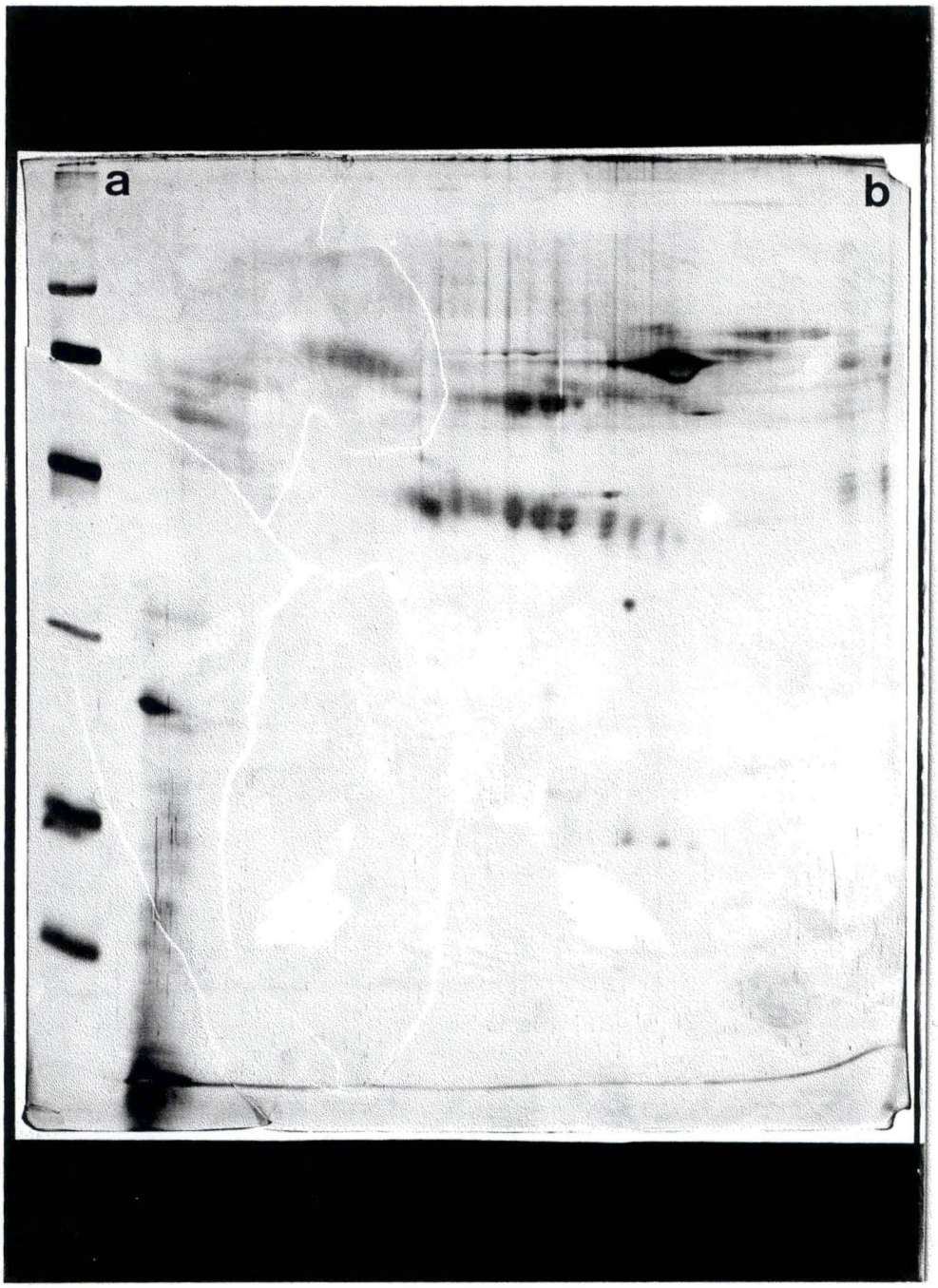


Figure III–9 : Gel d'électrophorèse en deux dimensions réalisé sur l'échantillon de culture en adhérence (clone CHO-DHFR) au jour 1 (150 μg de protéines déposées). Les protéines sont mises en évidence par une coloration à l'argent. Les étalons de poids moléculaires sont représentés à gauche. Il s'agit de haut en bas de :

- 97.400 daltons
- 66.200 daltons
- 45.000 daltons
- 31.000 daltons
- 21.500 daltons
- 14.400 daltons

Etant donné que le point isoélectrique de la protéine se situe entre 4 et 4,5, le **gradient 3-6** paraissait convenir. Cependant, nous avons observé fréquemment un démoulage des gels lors de l'isoélectrofocalisation, qui pourrait être dû à une polymérisaion plus importante des gels, entraînant une certaine rétraction.

C'est le **gradient 4-7** permettant de visualiser un plus grand éventail de protéines sécrétées qui a donc été retenu.

3.1.3. Gels d'électrophorèse à deux dimensions.

Habituellement, les quantités de protéines déposées sur un gel destiné à la coloration à l'argent, avoisinent les 150 à 200 µg. Pour vérifier si ces quantités étaient bien applicables aux surnageants cellulaires Iscove modifiés, 150 µg de protéines ont été déposés. La figure III-9 illustre la photographie d'un gel réalisé dans ces conditions : la protéine virale recombinante est bien visible, elle se situe à un poids moléculaire de 45000 et présente plusieurs formes glycosylées (chacune d'entre elles se différencie des autres par son point isoélectrique). La résolution du gel étant satisfaisante, nous déposerons 150 µg sur tous les gels destinés à être colorés à l'argent.

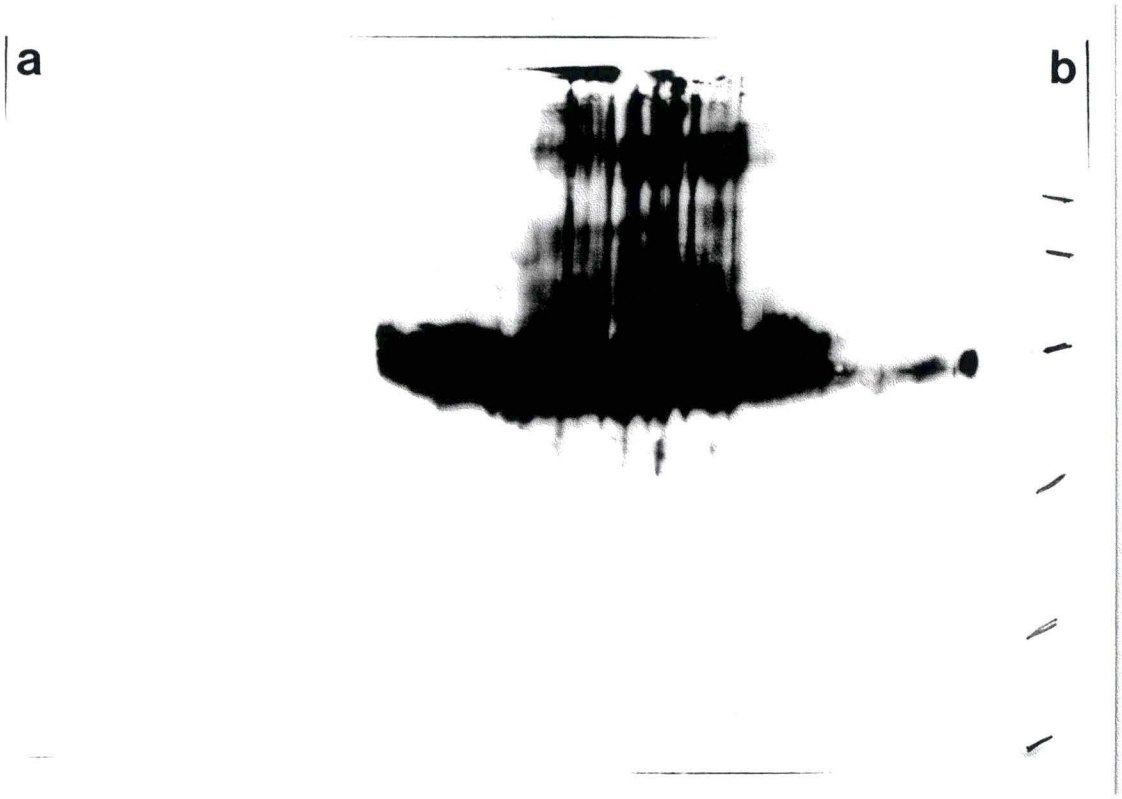


Figure III–10 : Western blotting (10 secondes d'exposition) réalisé sur l'échantillon de culture en adhérence (clone CHO-DHFR) au jour 1 (150 μg de protéines déposés).

Figure III–11 : Western blotting (10 secondes d'exposition) réalisé sur l'échantillon de culture en adhérence (clone CHO-K1) au jour 1 (60 μg de protéines déposés).

3.1.4. Western blotting

Le western blotting n'ayant jamais été réalisé au laboratoire sur des gels à deux dimensions, quelques mises au point semblaient indispensables avant de commencer à traiter les échantillons définitifs. Notamment, la quantité de protéines à déposer doit être déterminée. Pour cela, différentes quantités de protéines ont été déposées : 150 µg (figure III-10), 67 µg (figure III-11), 10 µg (figure III-12), 5 µg (figure III-13)et, 0,5 µg (figure III-14).

Ne disposant que de très petits volumes d'échantillons, ce test n'a pu être effectué à partir du même échantillon (voir légendes des différentes figures). Sur les différents Western blots, nous pouvons voir que la protéine recombinante virale est reconnue spécifiquement par les anticorps dirigés contre celui-ci. La protéine se situe à un poids moléculaire de plus ou moins 45000 et se présente sous différents isoformes, ce qui a déjà été observé sur le gel d'électrophorèse bidimensionnelle coloré à l'argent.

Les quantités de protéines déposées sur les gels reprises dans les figures suivantes : III-10, III-11 et III-12 sont trop importantes : ceci est notamment confirmé par la présence de "traînées de migration" sur les blottings III-10 et III-11 (la concentration la plus élevée correspond à la quantité de protéines déposée sur le gel coloré à l'argent). Par contre, les Western blots des figures III-13 et III-14 nous apportent des informations complémentaires :

- Le blot III-13 (5 µg de protéines) montre bien les isoformes présentes, qu'elles soient mineures ou majeures.

- Le blot III-14 permet de voir les différentes isoformes majoritaires. Pour suivre une culture au cours du temps, ou encore des variations dans la sécrétion de la protéine recombinante virale d'un type de culture à l'autre, nous déposerons dorénavant 5 µg de protéines par gel.

Figure III–12 : Western blotting (5 secondes d'exposition) réalisé sur l'échantillon de culture en spinner au jour 3 (10 μg de protéines déposés).

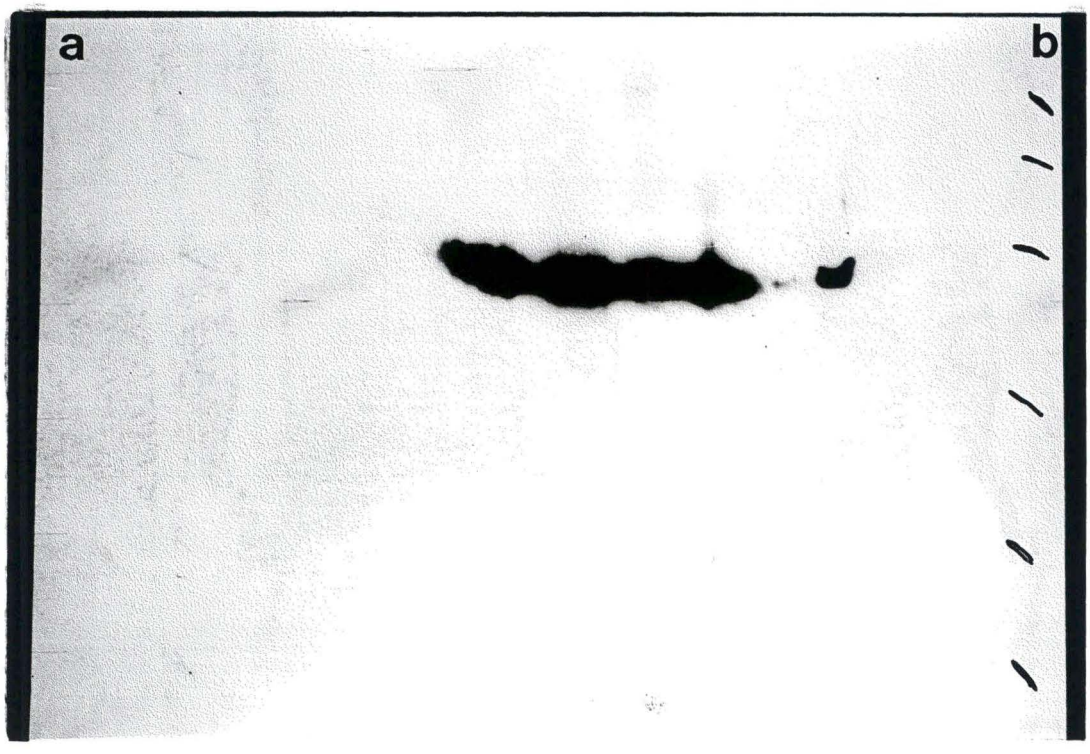


Figure III–13 : Western blotting (5 secondes d'exposition) réalisé sur l'échantillon de culture en spinner au jour 3 (5 μg de protéines déposés).

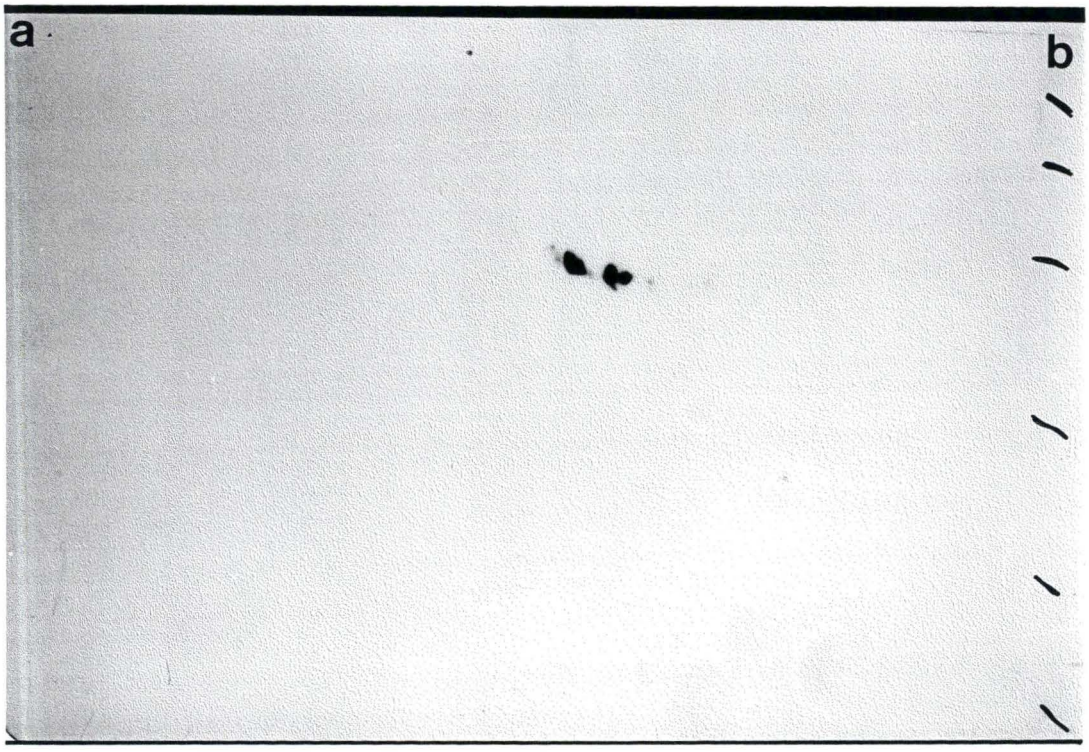


Figure III–14 : Western blotting (30 secondes d'exposition) réalisé sur l'échantillon de culture en adhérence (clone CHO-DHFR) au jour 3 (0,5 μg de protéines déposés).

3.1.4. Colorations

Tous les gels réalisés ont été colorés au bleu de Coomassie et à l'argent. Le bleu de Coomassie présente l'avantage de sensibiliser le gel préalablement à la coloration à l'argent. Ceci permet d'augmenter le nombre de taches détectées et la sensibilité de la coloration à l'argent.

Figure III–15 : Gel d'électrophorèse à deux dimensions réalisé sur l'échantillon de protéine purifiée à partir du milieu sans sérum (70 μg de protéine déposés).
A : coloration au Bleu de Coomassie
B : coloration à l'argent
La zone de pH s'étend de 4 à 7 (a: acide, b: basique)
Les étalons de protéines s'étalent de 97.400 à 14.400 daltons ↖ tache majeure

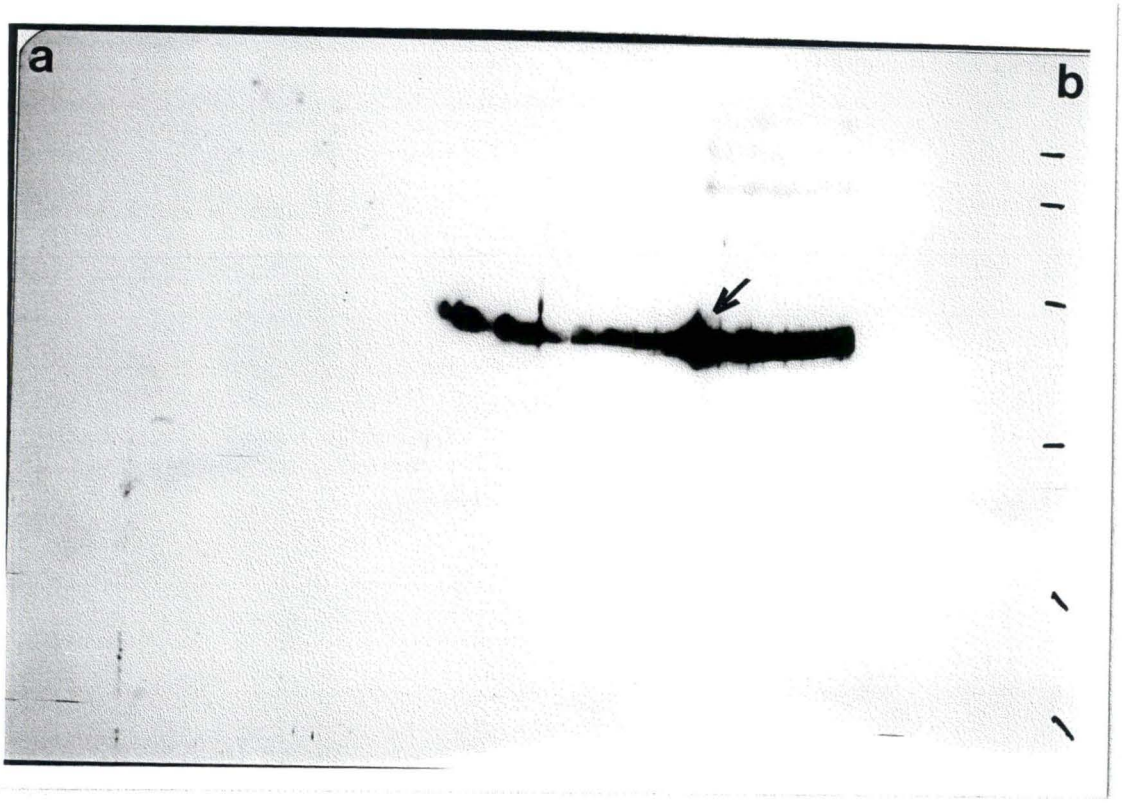


Figure III–16 : Western blotting (30 secondes d'exposition) réalisé sur l'échantillon de protéine purifiée à partir du milieu sans sérum (0,5 μg de protéine déposés)

a : acide, b: basique

↖ tache majeure

4. RESULTATS

Après les différentes mises au point mentionnées dans le chapitre précédent, des gels d'électrophorèse à deux dimensions ainsi que des westerns blots peuvent maintenant être réalisés sur les différents échantillons de bioréacteurs et de protéine purifiée (voir chapitre I des résultats). Dans un premier temps, nous observerons le gel à deux dimensions ainsi que le blotting effectué sur la protéine produite et purifiée à partir du milieu sans sérum; ceux-ci serviront de standards. Puis, suivront les analyses de tous les gels et blottings des échantillons de bioréacteurs. Enfin, nous terminerons avec les échantillons de protéine produite et purifiée à partir du milieu additionné de sérum (dégradée ou non).

4.1. PROTEINE PRODUITE ET PURIFIEE A PARTIR DU MILIEU SANS SERUM.

4.1.1. Gels à deux dimensions.

La protéine virale (voir figure III-15) se situe à un PM moyen de 40279 et se présente sous 17 spots différents. Nous pouvons également observer une hétérogénéité de poids moléculaires: celle-ci est bien visible du côté basique; en effet, nous pouvons distinguer trois spots de poids moléculaires très voisins. Au fur et à mesure que nous nous déplaçons vers les pH acides, les taches d'intensité plus importante fusionnent.

4.1.2. Western blottings.

La protéine virale (voir figure III-16) se situe à un PM moyen de 39711, ce qui est confirmé par les gels à deux dimensions. Les différentes isoformes sont difficiles à discriminer à l'oeil, cependant l'analyse par le logiciel Bioimage (voir figure III-17) révèle la présence de 18 isoformes (sans tenir compte des PI des protéines agrégées) dont les PI varient de 4,96 à 5,83. Le spot majeur de 5,01 de PI, représente 24,2% de la quantité totale de la protéine virale. Les spots de PM supérieur ou égal à 54350 sont des agrégats de protéines virales et de fragments issus de celle-ci.

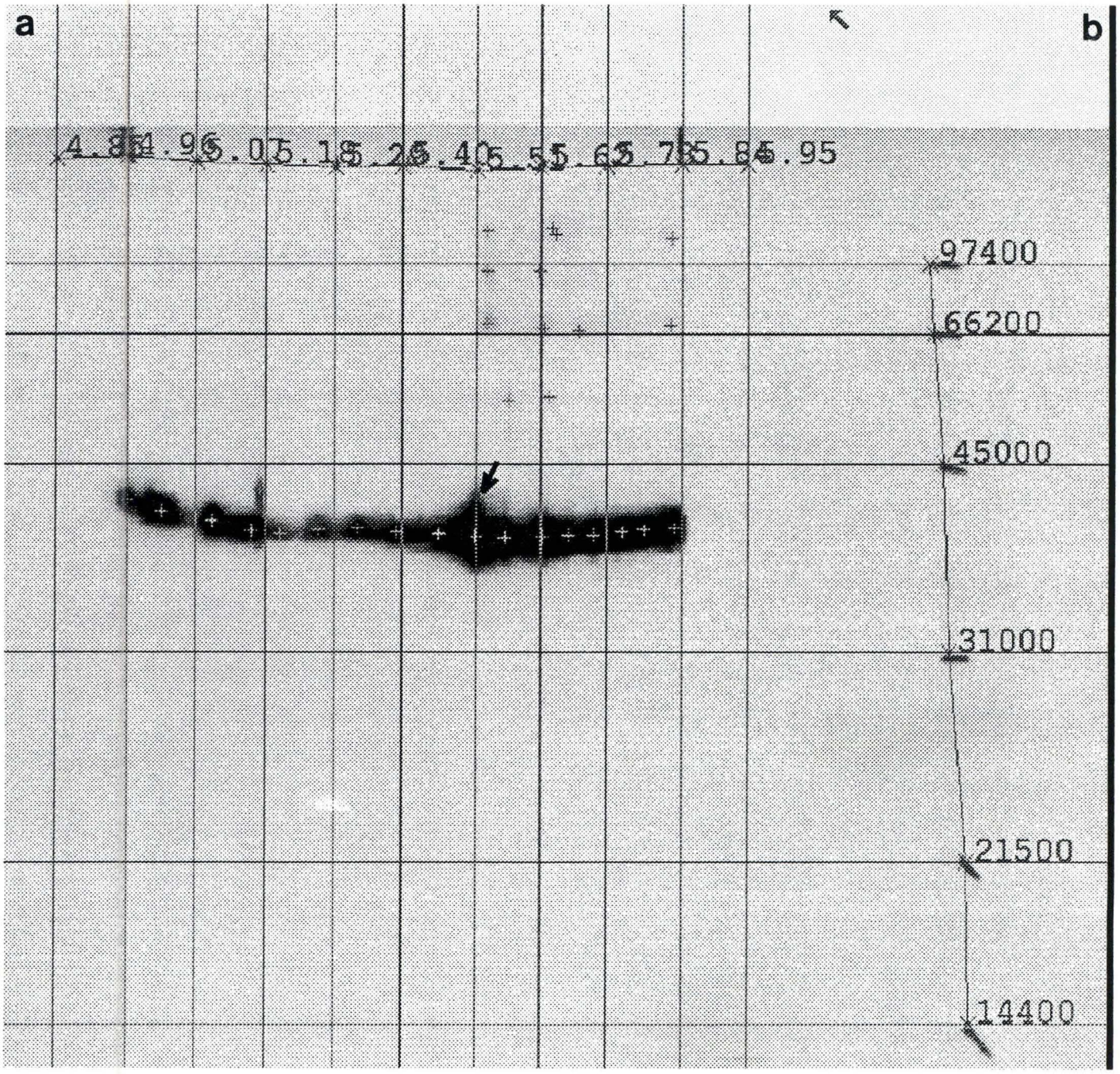


Figure III–17 : Western blotting réalisé sur l'échantillon de protéine purifiée à partir du milieu sans sérum, quantifié par le logiciel Bioimage.

a : acide, b: basique

↖ tache majeure

4.1.3. Superposition gel bidimensionnel/Western Blotting

Le blotting est beaucoup plus sensible que la coloration à l'argent, en effet, il permet la détection de 30 spots alors que le gel bidimentionnel n'en présente que 17. Les formes agrégées ne sont visibles que sur le blotting.

4.2. CULTURE I EN PERFUSION AU JOUR 5 ET AU JOUR 20.

4.2.1. Gels à deux dimensions.

Culture I en perfusion au jour 5.

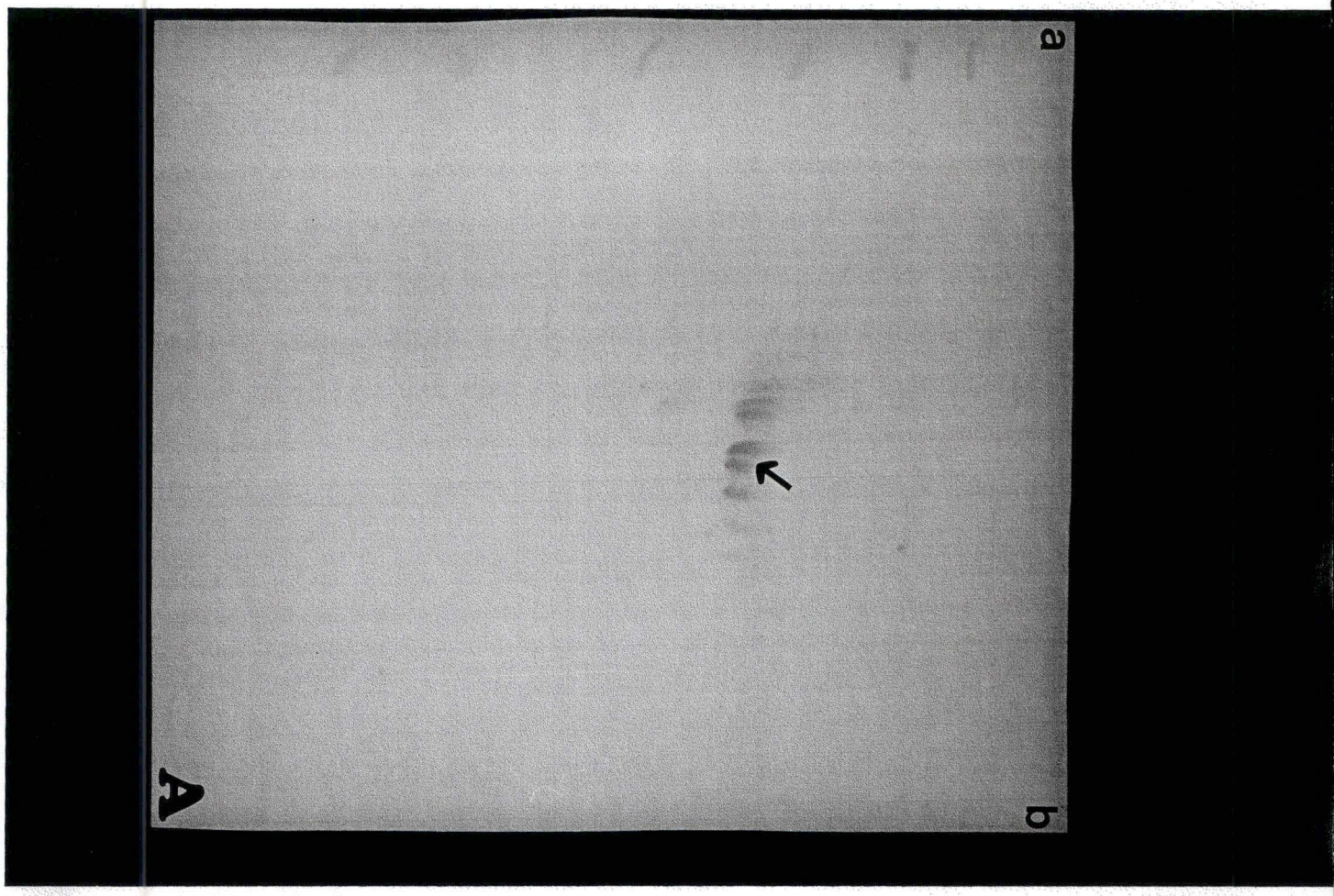
La protéine virale (voir figure III-18) se situe plus ou moins à un PM de 45000 et se présente sous différentes isoforme: leur nombre sera déterminé lors de l'analyse du blotting. Ce qui a été décrit concernant l'hétérogénéité de PM lors de l'analyse du standard est également applicable à cet échantillon. Nous pouvons aussi visualiser les différentes protéines sécrétées. Le nombre total de protéines détectées, la protéine virale y compris, s'élève à 129.

Culture I en perfusion au jour 20.

La protéine virale (voir figure III-19) se situe plus ou moins à un PM de 45000 et se présente sous différentes isoformes (pour leur nombre, voir les blottings). L'hétérogénéité de PM est toujours présente. Le nombre total de protéines s'élève à 116.

Comparaison culture I jour 5/culture I jour 20.

L'analyse par le logiciel Bioimage a permis de dénombrer 59 spots communs aux deux gels.



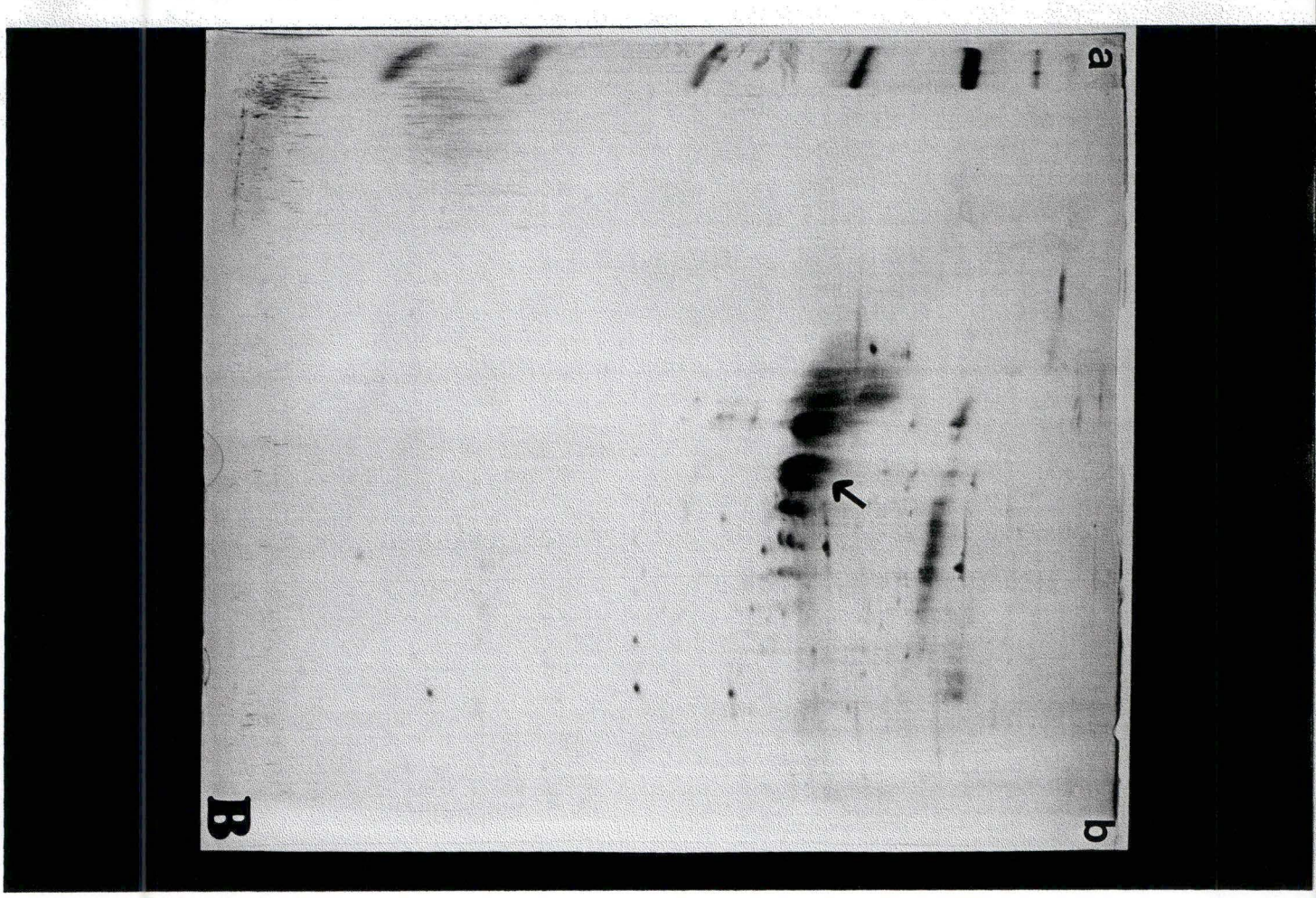


Figure III–18 : Gel d'électrophorèse à deux dimensions réalisé sur l'échantillon de culture I en perfusion au jour 5 (150 μg de protéines déposés).
A : coloration au Bleu de Coomassie
B : coloration à l'argent
a : acide, b: basique
↖ tache majeure

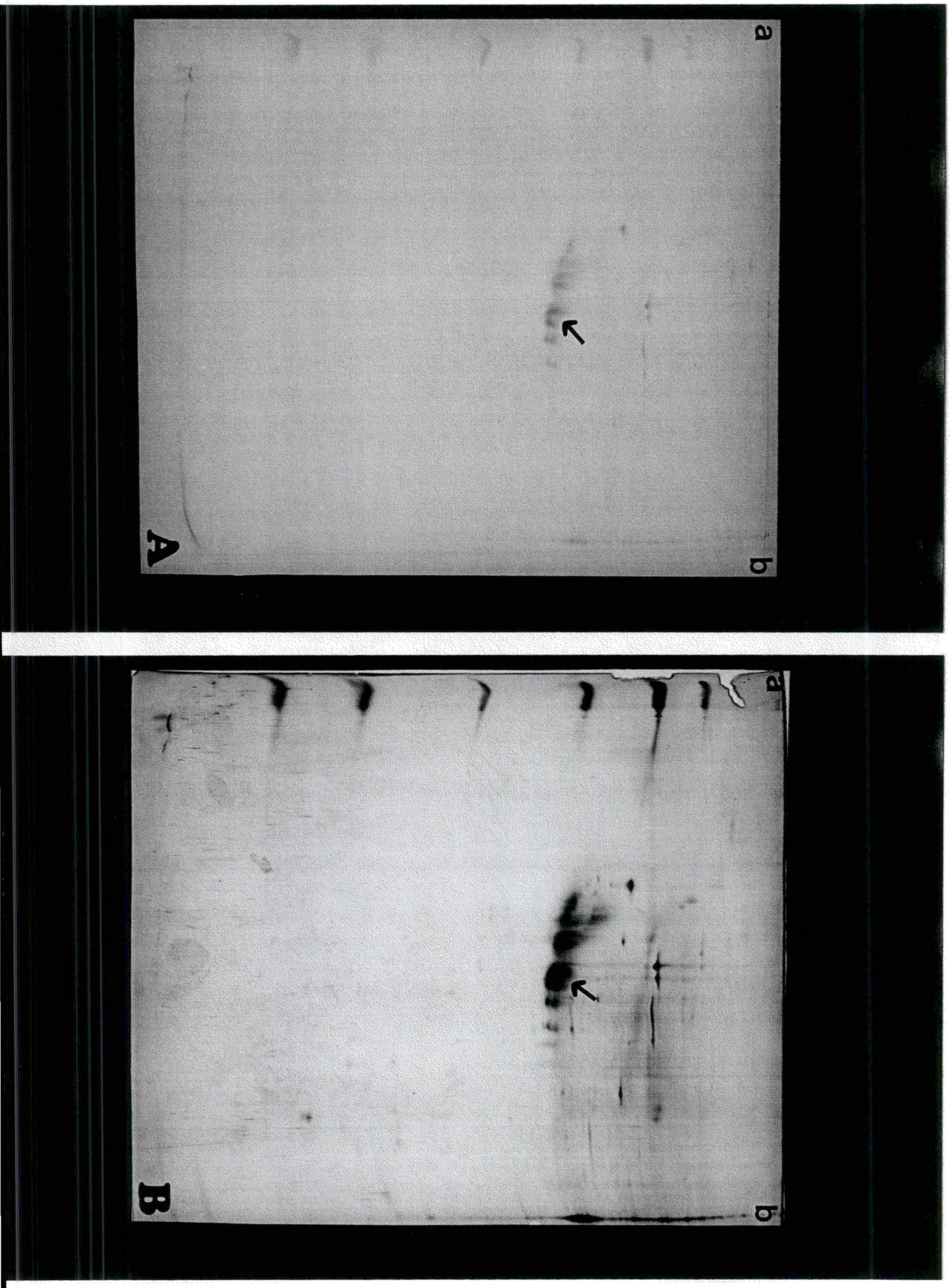


Figure III–19 : Gel d'électrophorèse à deux dimensions réalisé sur l'échantillon de culture I en perfusion au jour 20 (150 μg de protéines déposés).

A : coloration au Bleu de Coomassie
B : coloration à l'argent

a : acide, b: basique
↖ tache majeure

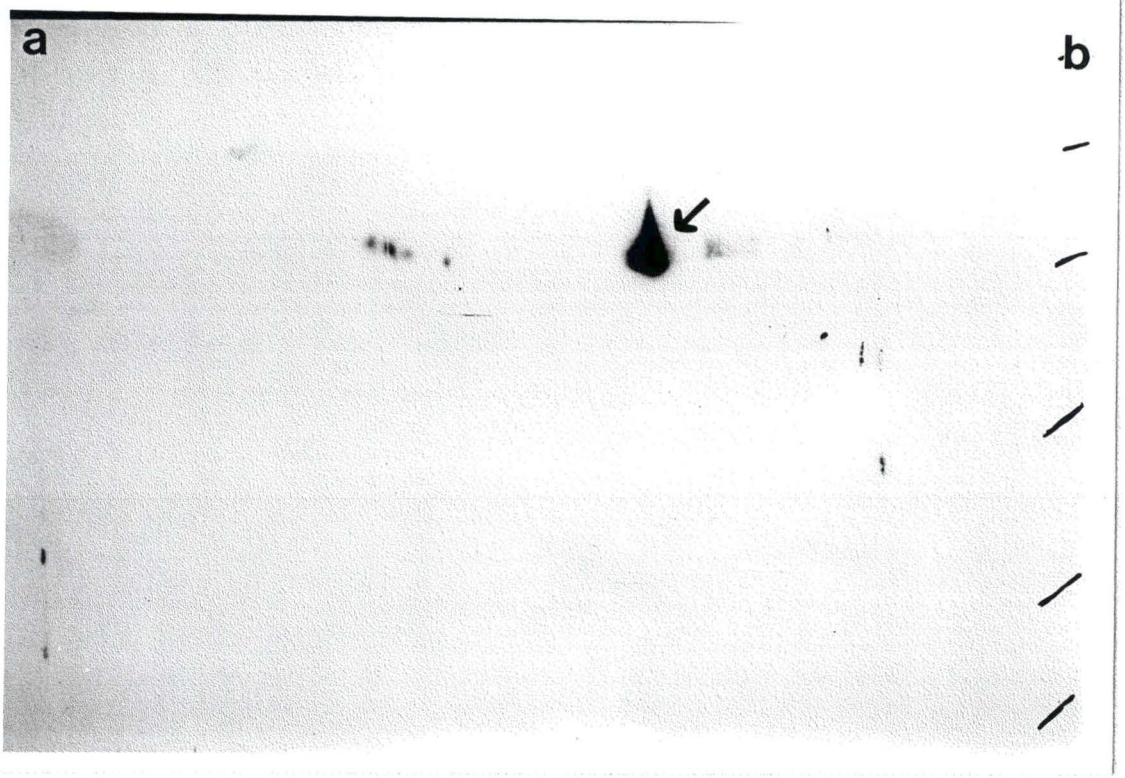


Figure III–20 : Western blotting (30 secondes d'exposition) réalisé sur l'échantillon de culture I en perfusion au jour 5 (0,5 μg de protéines déposés).
a : acide, b: basique
↖ tache majeure

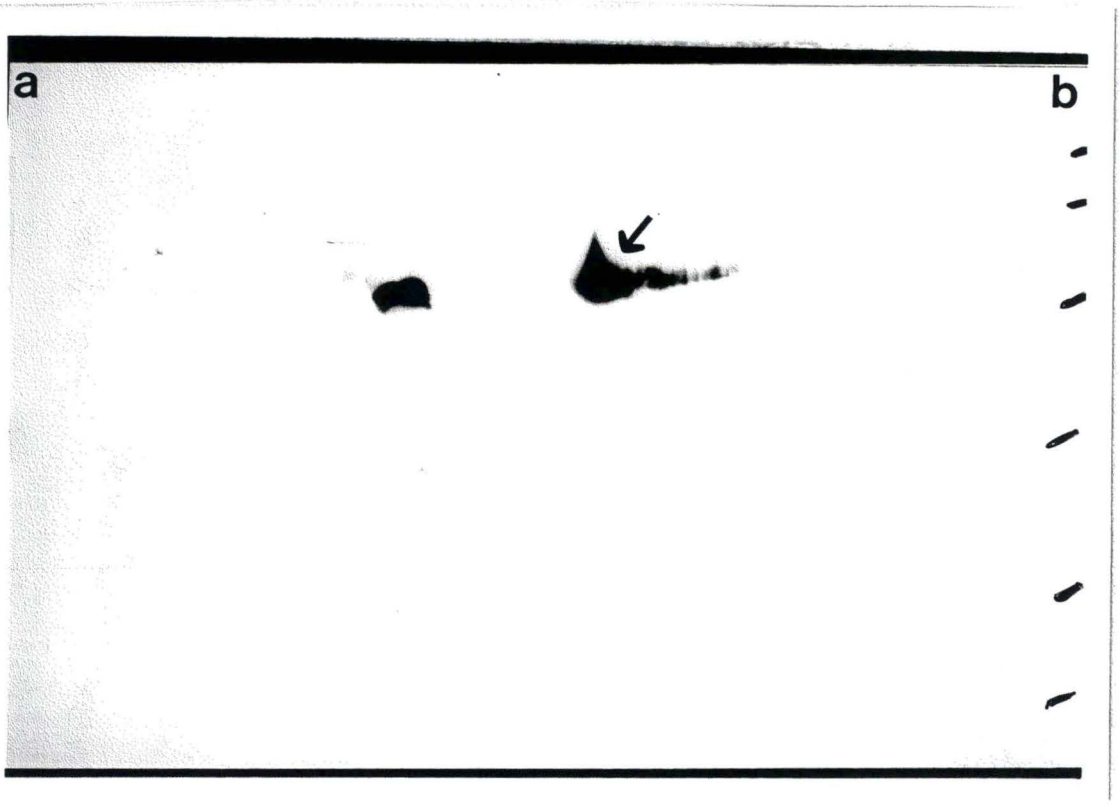


Figure III–21 : Western blotting (30 secondes d'exposition) réalisé sur l'échantillon de culture I en perfusion au jour 20 (0,5 μg de protéines déposés)
a : acide, b: basique
↖ tache majeure

4.2.2. Western blottings

Culture I en perfusion au jour 5.

La protéine antigénique (voir figures III-20, III-22, table III 2) se situe à un PM moyen de 45521. Nous pouvons observer 7 spots de protéine virale sur ces gels; ceux-ci se différencient par leur point isoélectrique qui varie de 4,92 à 5,74.

Le spot majeur de 5,52 de PI, représente 90,4% de la quantité totale de protéine virale. On dénombre également 4 spots de PI acide (allant de 4,92 à 5,09) à gauche de la tache majeure. Ceux-ci constituent à eux quatre 6,2% de la quantité totale de la protéine virale. On peut également observer deux spots de PI moins acide (allant de 5,66 à 5,74) à droite de la tache majeure, les deux représentant 3,4% de la quantité totale de la protéine.

Culture I en perfusion au jour 20

La protéine antigénique (voir figures III-21, III-23, table III 2) se situe à un PM moyen de 46902. Nous pouvons observer 14 spots de protéine virale; ceux-ci se différencient par leur point isoélectrique qui varie de 4,95 à 5,82.

Le spot majeur de 5,50 de PI, représente 46,8% de la quantité totale de la protéine virale. On dénombre également 6 spots de PI acide (allant de 4,95 à 5,22) à gauche de la tache majeure. Ceux-ci constituent 30,8% de la quantité totale de la protéine virale. On peut également observer 7 spots de PI moins acide (allant de 5,57 à 5,82) à droite de la tache majeure. Ceux-ci représentent 22,4% de la quantité totale de la protéine virale.

Signalons la présence d'un spot de 5,13 de PI, ayant un PM inférieur à la moyenne : 28000. Il semble indiquer la présence dans cet échantillon d'une protéine scindée.

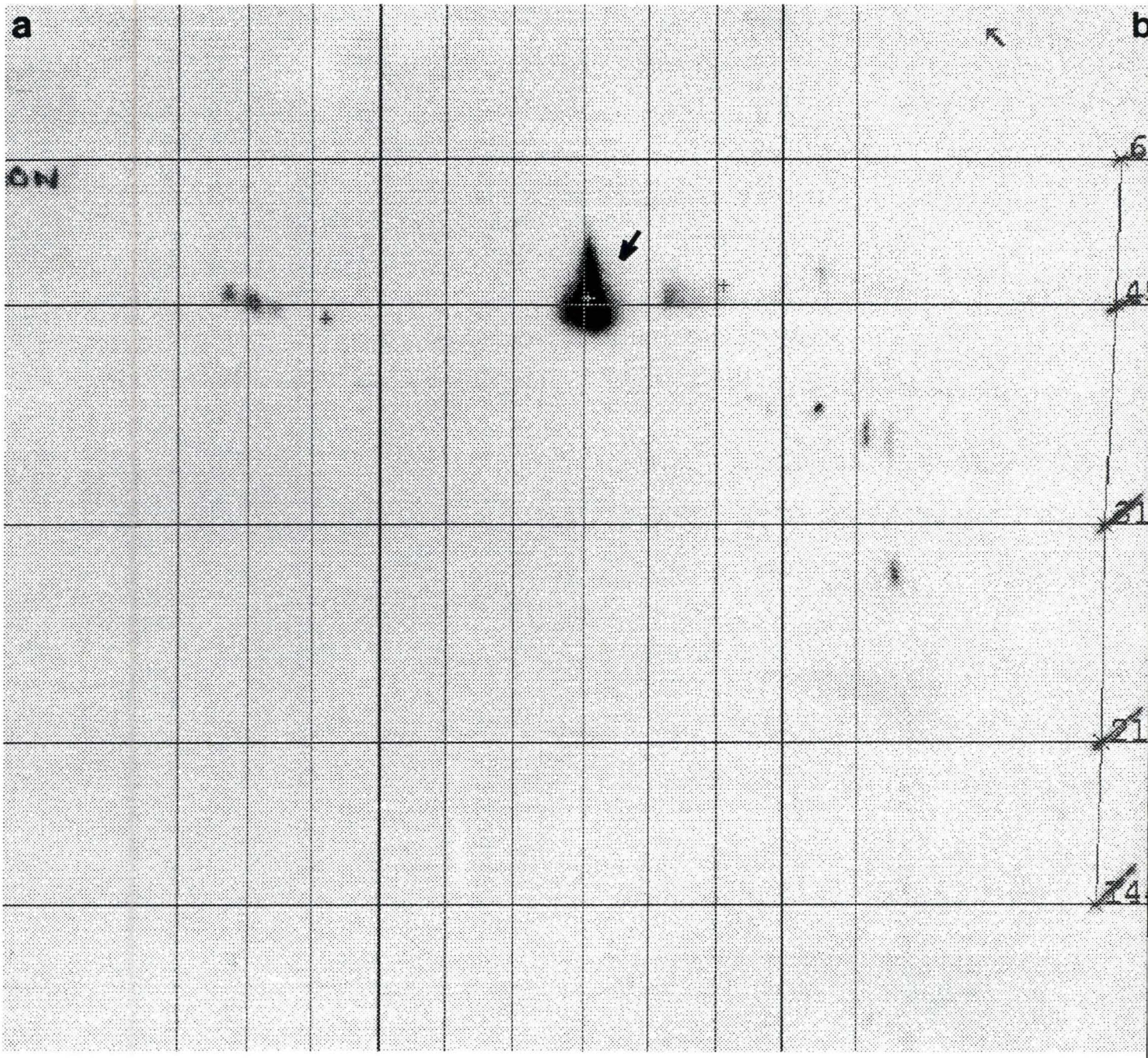


Figure III–22 : Western blotting réalisé sur l'échantillon de culture I en perfusion au jour 5, quantifié par le logiciel Bioimage.
a : acide, b: basique
↖ tache majeure

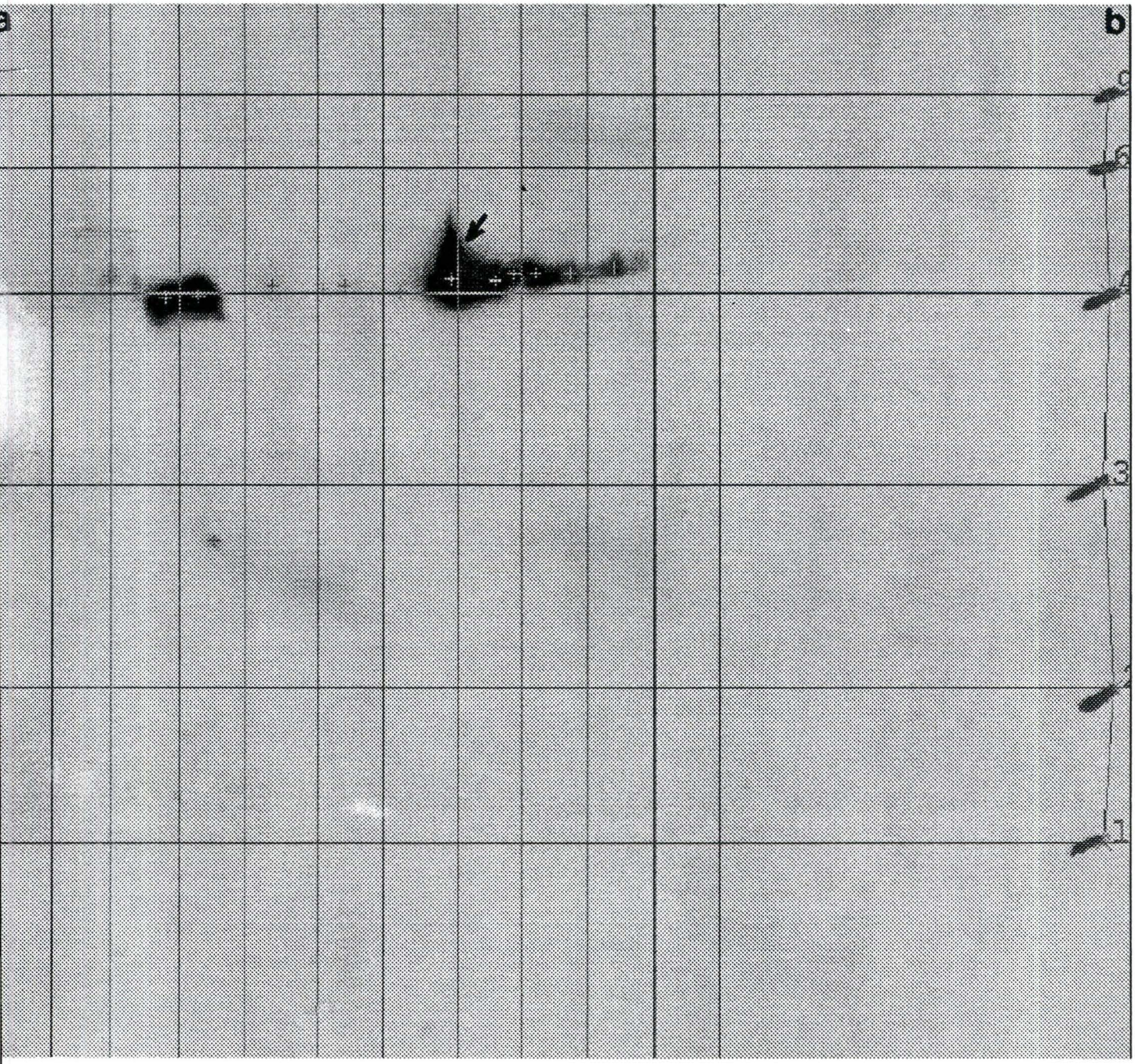


Figure III–23 : Western blotting réalisé sur l'échantillon de culture I en perfusion au jour 20, quantifié par le logiciel Bioimage.
a : acide, b: basique
↖ tache majeure

CULT I PERF jour 5 (6 spots)	**CULT I PERF jour 20 (14 spots)**	**CULT II PERF jour 7 (9 spots)**	**CULT II PERF jour 20 (8 spots)**	**CULT BATCH jour 3 (9 spots)**
PI 4,92 % 1,5	PI 4,95 % 0,4	PI 4,99 % 2,1		
PI 4,97 % 3,2	PI 4,99 % 0,3	PI 5,02 % 0,6	PI 4,98 % 0,2	
PI 5,00 % 0,8	PI 5,04 % 13,0	PI 5,10 % 8,3	PI 5,07 % 0,1	PI 5,09 % 0,2
PI 5,09 % 0,7	PI 5,10 % 16,6	PI 5,16 % 1,4		PI 5,14 % 0,1
	PI 5,12 % 0,2			
	PI 5,22 % 0,3			
PI 5,52 % 90,4	PI 5,50 % 46,8	PI 5,53 % 79,6	PI 5,51 % 54,9	PI 5,51 % 58,0
	PI 5,57 % 7,8		PI 5,56 % 0,4	PI 5,59 % 3,9
	PI 5,61 % 2,0	PI 5,61 % 3,1		PI 5,64 % 8,2
PI 5,66 % 3,3	PI 5,64 % 7,7	PI 5,68 % 3,7	PI 5,67 % 0,5	
	PI 5,70 % 1,7			PI 5,70 % 9,8
PI 5,74 % 0,1	PI 5,73 % 0,7		PI 5,72 % 10,2	PI 5,76 % 7,5
	PI 5,77 % 2,0	PI 5,80 % 0,8	PI 5,79 % 32,4	PI 5,79 % 6,6
	PI 5,82 % 0,5	PI 5,84 % 0,4	PI 5,85 % 1,3	PI 5,83 % 5,7

Table III-2 : Tableau reprenant les différents points isoélectriques ainsi que leur abondance relative (%) des différentes isoformes présentes dans chaque échantillon.

Comparaison culture I jour 5/culture I jour 20

La comparaison des blottings ne peut être effectuée qu'à partir des intensités relatives (en %) par rapport à la somme des intensités des différents spots. En effet, la quantité de protéines sécrétées varie d'un échantillon à l'autre, nous ne pouvons sans test ELISA préalable au dépôt de l'échantillon, connaître la quantité exacte de protéine virale contenue dans l'échantillon.

Le spot majeur (voir figures III-20 et III-21, table III-2) se localise au même endroit au jour 5 et au jour 20. En effet, les poids moléculaires sont semblables ainsi que le point isoélectrique qui se situe à 5,5. Mais ce spot est relativement plus abondant au jour 5 : il représente 90,4 % de la quantité totale de la protéine au jour 5 contre 46,8 % au jour 20.

Le nombre d'isoformes augmentent quand on passe du jour 5 au jour 20. A gauche de la tache majeure, quatre isoformes sur six sont présentes au jour 5. Parmi celles-ci, deux sont plus abondantes au jour 5, les deux autres sont plus abondantes au jour 20. Deux isoformes sont propres au jour 20.

A droite de la tache majeure, on dénombre 7 isoformes au jour 20 et 2 au jour 5. Les 2 isoformes du jour 5 se retrouvent au jour 20. La tache de point isoélectrique 5,66 double en intensité relative quand on passe au jour 20. La tache de point isoélectrique 5,74 voit son intensité relative multipliée par 7 quand on passe au jour 20.

Signalons également l'apparition au jour 20 d'une tache de 28000 de poids moléculaire et de 5,12 de point isoélectrique, visiblement obtenue par la dégradation de la tache de point isoélectrique identique et de 44750 de poids moléculaire.

4.2.3. Superposition gel bidimensionnel/Western blotting

Culture I en perfusion au jour 5 (voir Figures III-18 et III-20)

Le spot majeur de point isoélectrique de 5,5 (indiqué par une flèche sur le gel bidimensionnel ainsi que sur le blotting) est spécifiquement reconnu par l'anticorps. Les spots de points isoélectriques acides, directement situés à gauche de la tache majeure sur le gel ne réagissent pas avec les anticorps. D'autre part, 4 spots situés plus du côté acide sont détectés sur le blotting mais pas sur le gel coloré à l'argent, ce qui s'explique par une plus grande sensibilité du blotting. Les spots de points isoélectriques moins acides à droite de la tache majeure réagissent avec l'anticorps.

Culture I en perfusion au jour 20 (voir Figure III-19, III-21)

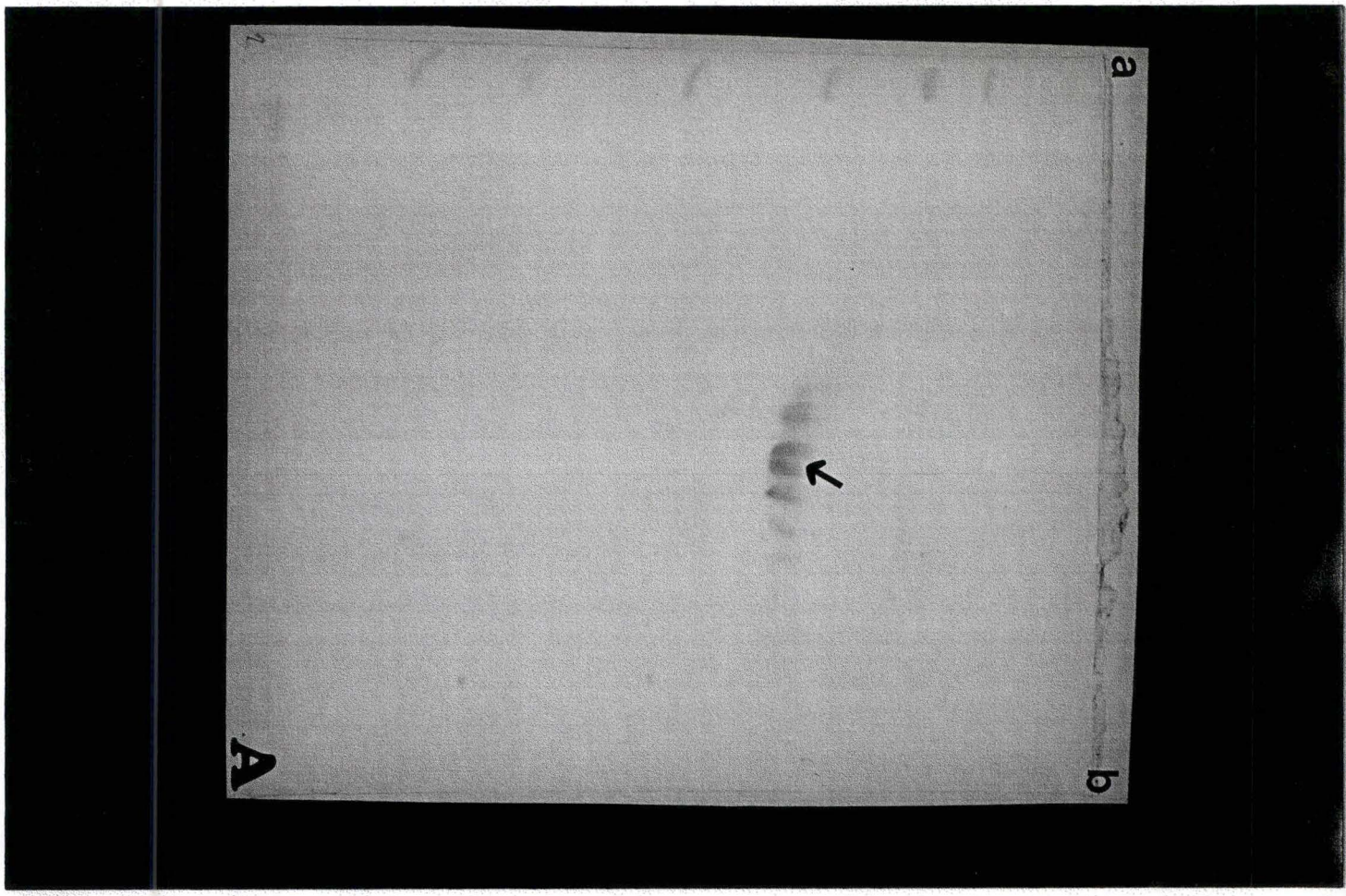
Le spot majeur de point isoélectrique 5,5 est spécifiquement reconnu par l'anticorps. A nouveau, les spots de points isoélectriques un peu plus acides ne réagissent pas avec les anticorps. Par contre, les 4 spots très acides sont seulement détectés sur le blotting : deux d'entre eux présentent une réactivité importante vis-à-vis de l'anticorps. Les protéines à droite de la tache majeure sont reconnues normalement par l'anticorps.

4.3. CULTURE II EN PERFUSION AU JOUR 7 ET AU JOUR 20.

4.3.1. Gels à deux dimensions

Culture II en perfusion au jour 7.

La protéine virale (voir figure III-24) se situe plus ou moins à un poids moléculaire de 45000 et se présente sous différentes isoformes (pour leur nombre voir blotting). Ce qui a été décrit concernant l'hétérogénéité de poids moléculaire est toujours d'application. Le nombre total de protéines détectées s'élève à 98.



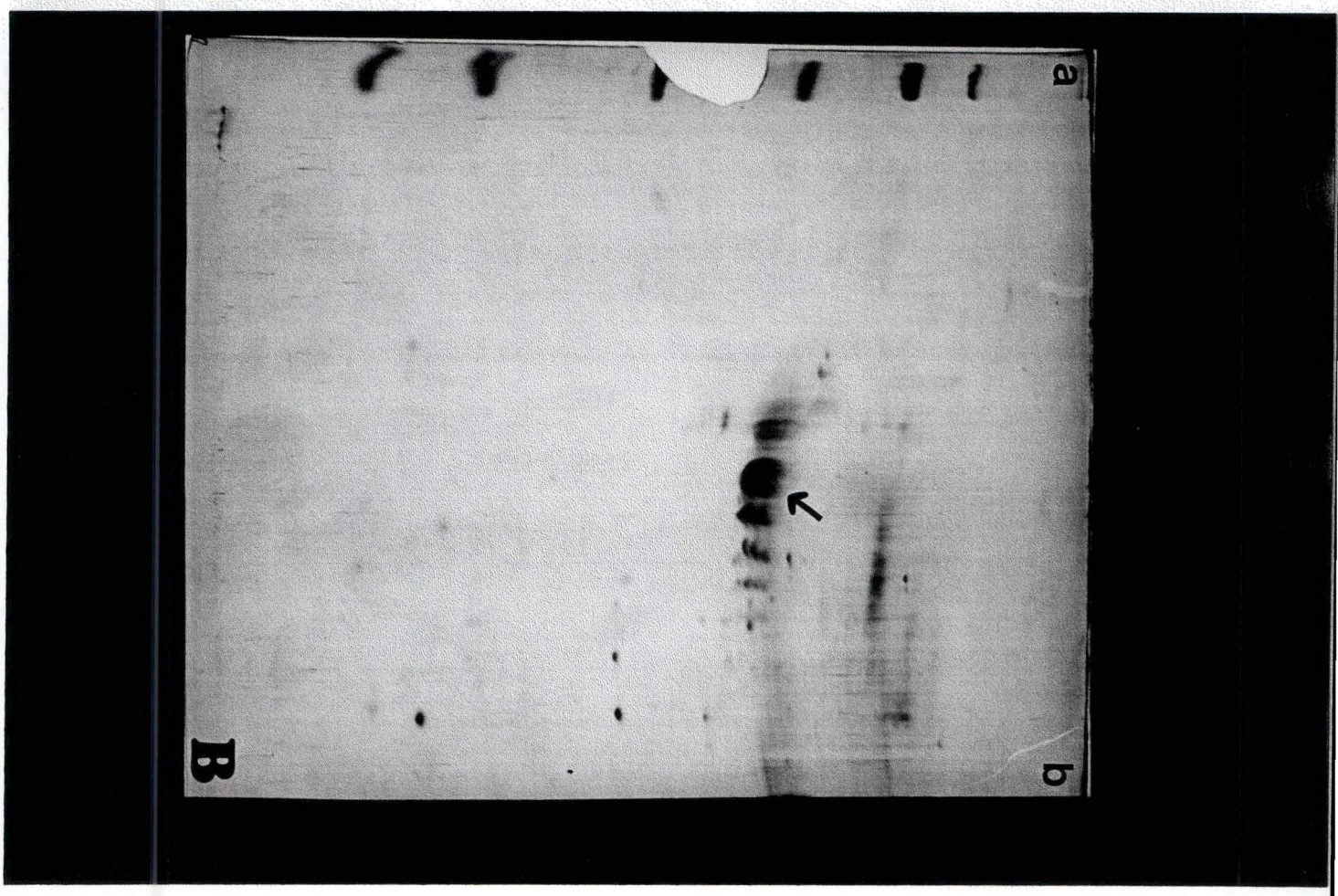
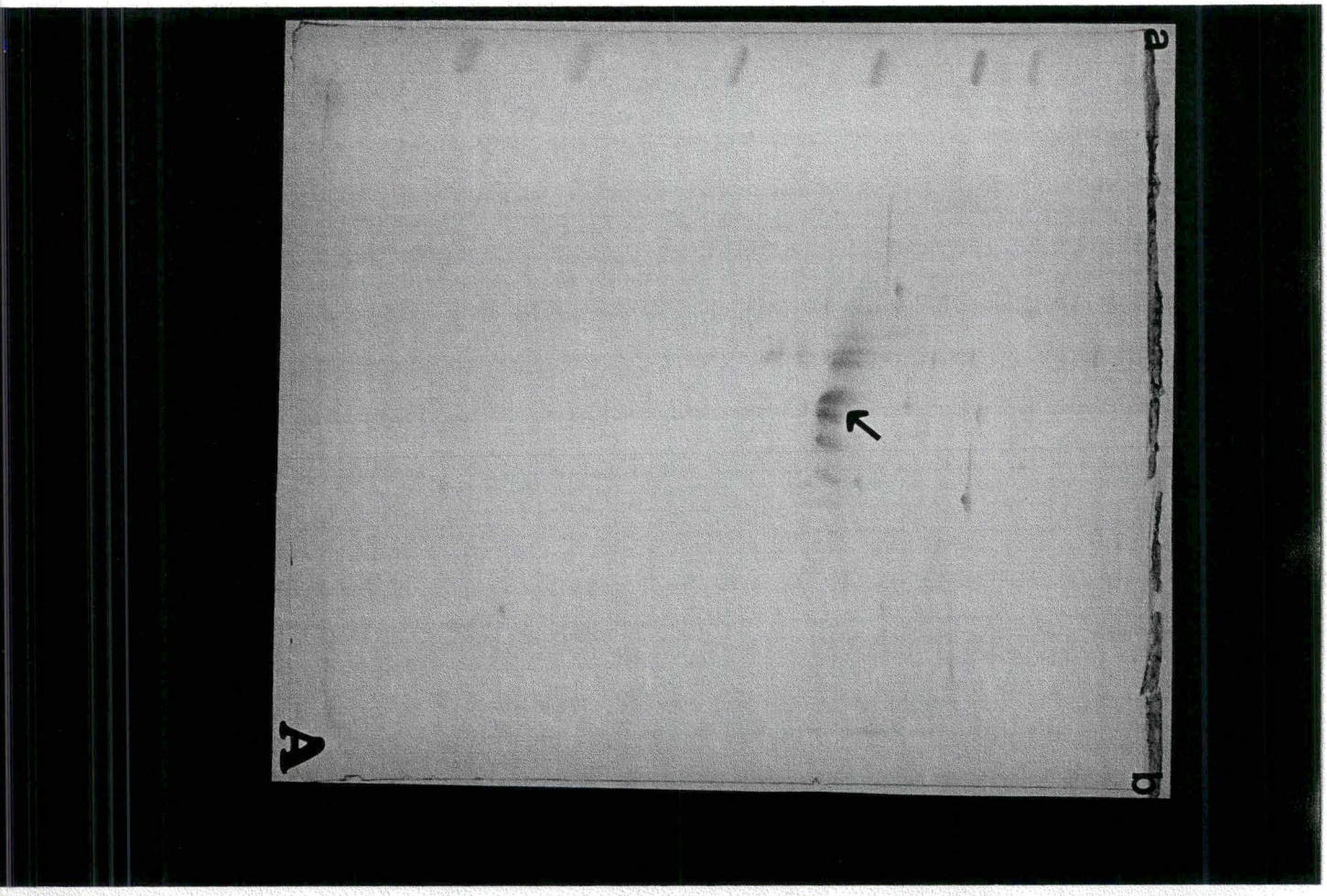


Figure III–24 : Gel d'électrophorèse à deux dimensions réalisé sur l'échantillon de culture II en perfusion au jour 7 (95 μg de protéines déposés).
A : coloration au Bleu de Coomassie — a : acide, b: basique
B : coloration à l'argent — ↖ tache majeure



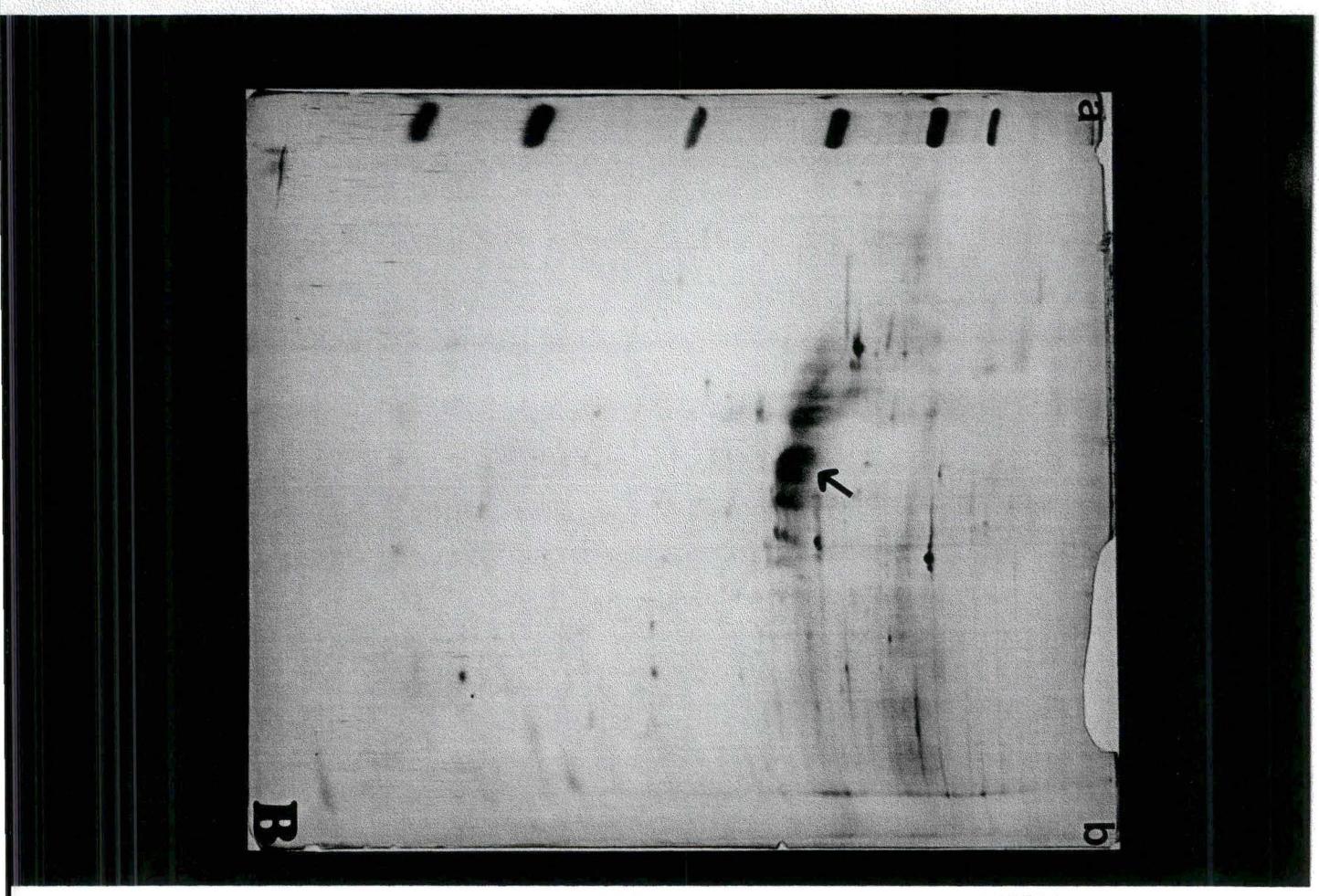


Figure III–25 : Gel d'électrophorèse à deux dimensions réalisé sur l'échantillon de culture II en perfusion au jour 20 (150 μg de protéines déposés).
A : coloration au Bleu de Coomassie
B : coloration à l'argent
a : acide, b: basique
↖ tache majeure

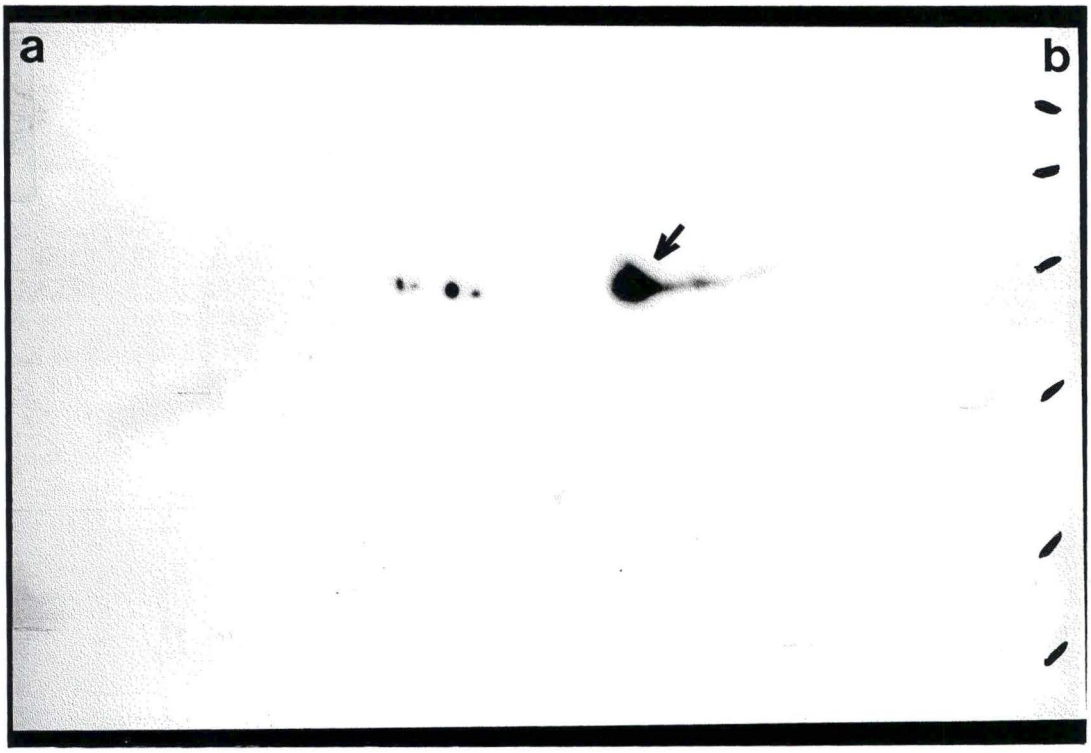


Figure III–26 : Western blotting (30 secondes d'exposition) réalisé sur l'échantillon de culture II en perfusion au jour 7 (0,5 μg de protéines déposés).
a : acide, b: basique
↖ tache majeure

Figure III–27 : Western blotting (30 secondes d'exposition) réalisé sur l'échantillon de culture II en perfusion au jour 20 (0,5 μg de protéines déposés).
a : acide, b: basique
↖ tache majeure

Culture II en perfusion au jour 20.

La protéine virale (voir figure III-25) se situe plus ou moins à un poids moléculaire de 45000 et se présente sous différentes isoformes. L'hétérogénéité de poids moléculaire est toujours présente. Le nombre total de protéines détectées s'élève à 107.

Comparaison culture II jour 7/culture II jour 20.

L'analyse par le logiciel Bioimage a permis de dénombrer 49 spots communs aux deux gels.

4.3.2. Western blottings

Culture II en perfusion au jour 7

La protéine antigénique (voir figures III-26 et III-28, table III-2) se situe à un poids moléculaire moyen de 42666. Nous pouvons observer 9 spots de protéine virale; ceux-ci se différencient par leur point isoélectrique qui varie de 4,99 à 5,84.

Le spot majeur de 5,53 de point isoélectrique, représente 79,6% de la quantité totale de la protéine virale. On dénombre également 4 spots de point isoélectrique acide (allant de 4,99 à 5,16) à gauche de la tache majeure. Ceux-ci constituent 12,4 % de la quantité totale de la protéine virale. On peut également observer 4 spots de point isoélectrique moins acide (allant de 5,61 à 5,84). Ceux-ci représentent 8,0 % de la quantité totale de la protéine virale.

Culture II en perfusion au jour 20

La protéine antigénique (voir figure III-27 et III-29, table III-2) se situe à un poids moléculaire moyen de 44194. Nous pouvons observer 8 spots de protéine virale; ceux-ci se différencient par leur point isoélectrique qui varie de 4,98 à 5,85.

Le spot majeur de 5,51 représente 54,9 % de la quantité totale de la protéine virale.

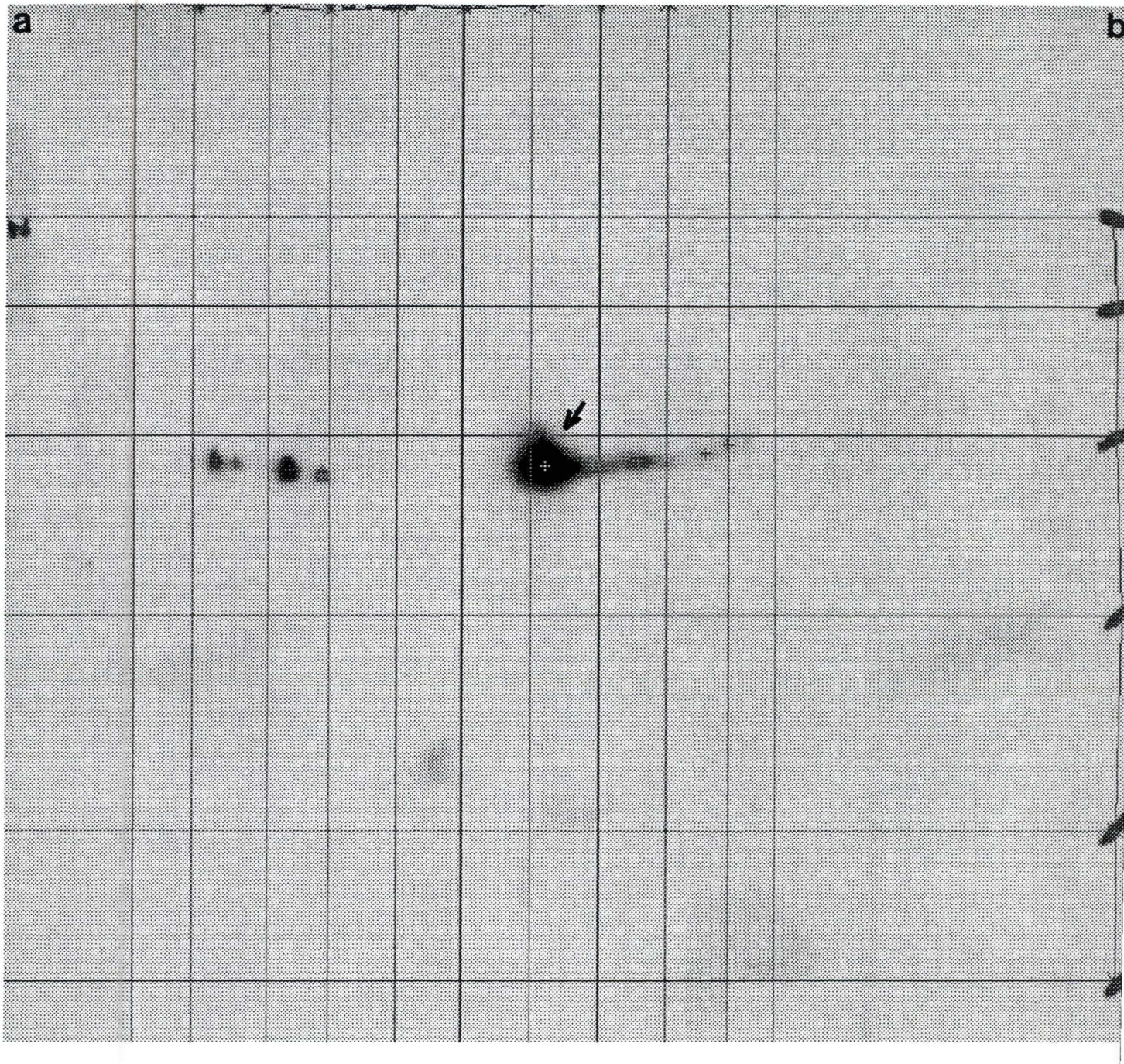


Figure III–28 : Western blotting réalisé sur l'échantillon de culture II en perfusion au jour 7, quantifié par le logiciel Bioimage.
a : acide, b: basique
↖ tache majeure

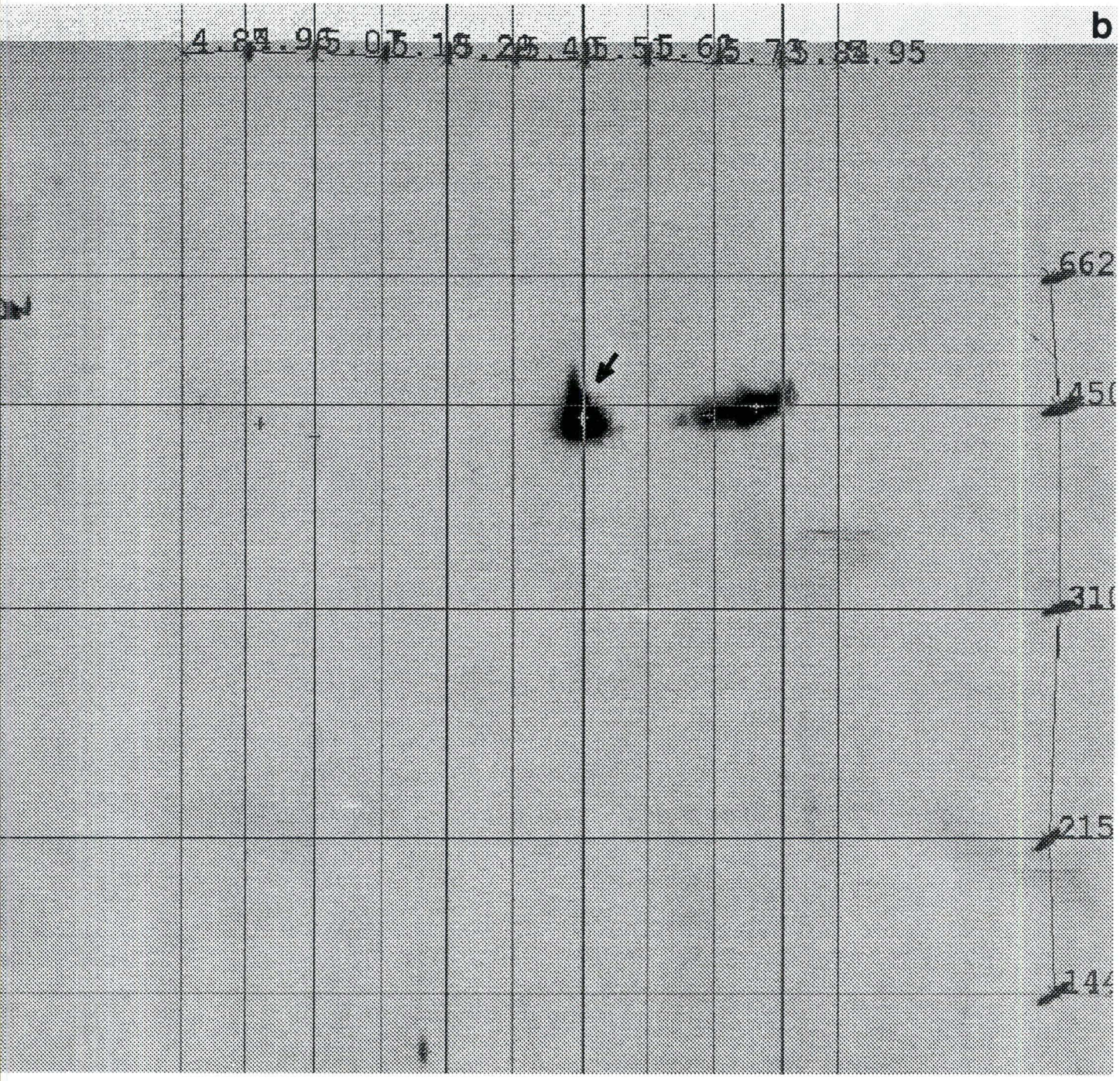


Figure III–29 : Western blotting réalisé sur l'échantillon de culture II en perfusion au jour 20 , quantifié par le logiciel Bioimage.
a : acide, b: basique
↖ tache majeure

On dénombre également 2 spots de point isoélectrique acide (allant de 4,88 à 5,07) à gauche de la tache majeure. Ceux-ci constituent 0,3 % de la quantité totale de la protéine virale. On peut également observer 5 spots de point isoélectrique acide (allant de 5,56 à 5,85) à droite de la protéine majeure. Ceux-ci représentent 44,8 % de la quantité totale de la protéine virale.

Signalons également la présence d'un spot à un poids moléculaire inférieur à 14400. Il semble indiquer la présence dans cet échantillon d'une protéine scindée.

Comparaison culture II jour 7/culture II jour 20

La quantité de protéines déposée au jour 7 étant insuffisante (95 µg au lieu de 150 µg), rend la comparaison difficile.

4.3.3. Superposition gel bidimensionnel/Western blotting

Culture II jour 7. (voir Figures III-24, III-26)

Les observations réalisées pour cet échantillon sont semblables à celles de l'échantillon culture I jour 5 (voir paragraphe 4.2.3.). On observe notamment la présence de taches très visibles dans la zone acide : PI 4,99 à 5,16.

Culture II jour 20. (voir Figures III-25, III-27)

Le spot majeur de point isoélectrique de 5,5 est spécifiquement reconnu par l'anticorps. Les spots de points isoélectriques acides, directement situés à gauche de la tache majeure ne réagissent pas avec les anticorps. Les spots de points isoélectriques moins acides semblent réagir normalement avec l'anticorps.

4.4. COMPARAISON DES CULTURES I ET II EN PERFUSION AU JOUR 20.

4.4.1. Gels à deux dimensions.

Comparaison culture I en perfusion jour 20/ culture II en perfusion jour 20. (voir Figures III-21, III-25)

L'analyse par le logiciel Bioimage a permis de dénombrer 50 spots communs aux deux gels.

4.4.2. Western blottings.

Comparaison culture I en perfusion jour 20/ culture II en perfusion. (voir table III-2)

Le PI du spot majeur est toujours le même : 5,5. Par contre le PM est plus élevé dans la culture I : 47000 contre 44000. C'est en fin de culture que l'abondance relative de la tache majeure est la plus faible : 46,8 % pour la culture I contre 54,9 % pour la culture II.

Du côté acide du spot majeur, on a 6 isoformes pour la culture I et seulement 2 pour la culture II. Deux isoformes sont communes aux deux cultures : celle de 4,98 de PI est légèrement plus faible dans la culture II; celle de 5,04 de PI est 100 fois plus abondante dans la culture I.

Du côté basique du spot majeur, on a 7 isoformes pour la culture II contre 5 pour la culture I. Les 5 spots de la culture I se retrouvent dans la culture II. Leur abondance relative varie cependant d'une culture à l'autre.

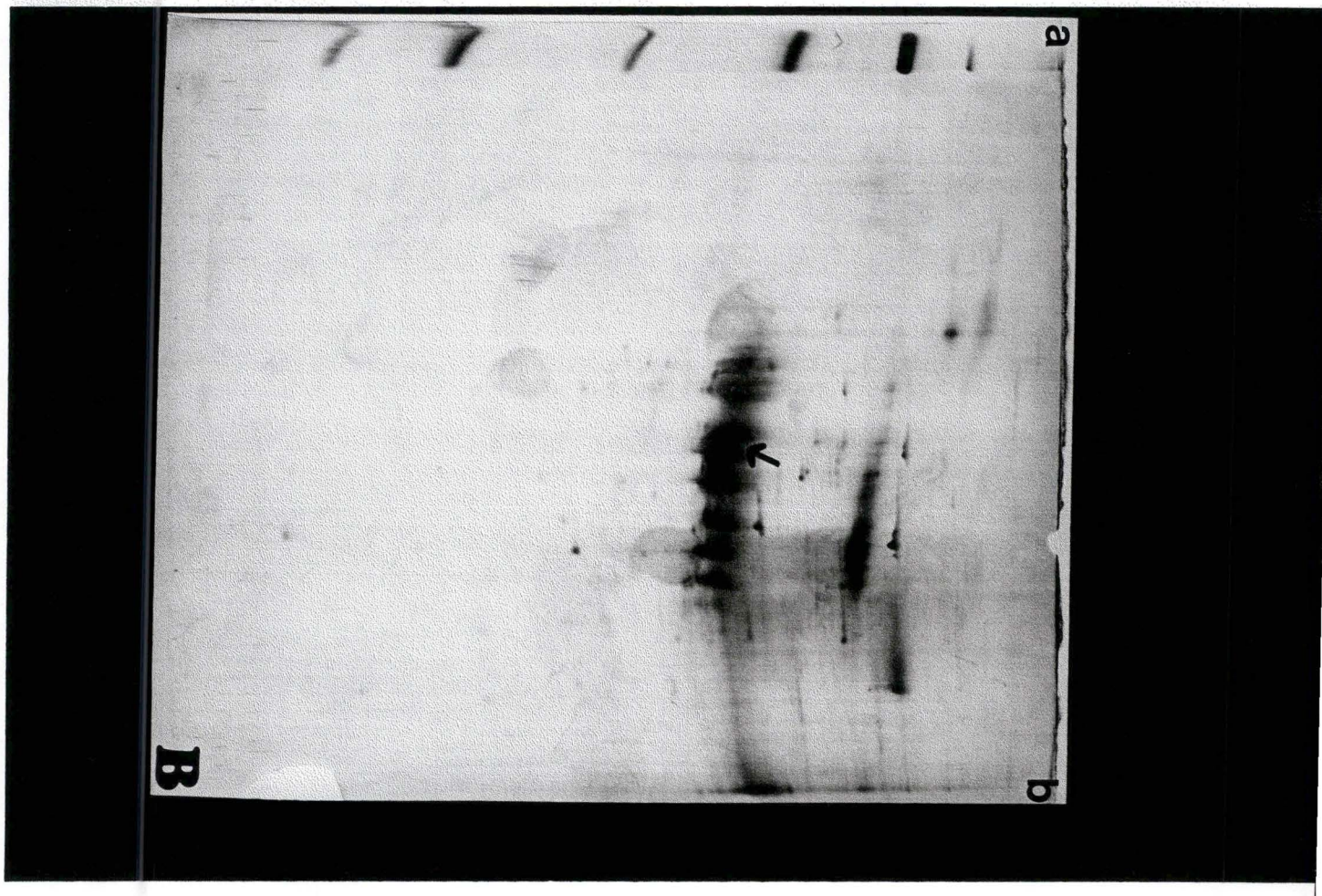


Figure III–30 : Gel d'électrophorèse à deux dimensions réalisé sur l'échantillon d'une culture en batch au jour 3 (150 μg de protéines déposés).
A : coloration au Bleu de Coomassie
B : coloration à l'argent
a : acide, b: basique
↖ tache majeure

4.5. CULTURE EN BATCH AU JOUR 3.

4.5.1. Gels à deux dimensions

Culture en batch au jour 3.

La protéine virale (voir figure III-30) se situe à un poids moléculaire légèrement inférieur à 45000 et se présente sous différents isoformes. L'hétérogénéité de poids moléculaire est toujours d'application. Le nombre total de protéines sécrétées s'élève à 110.

L'analyse par le logiciel Bioimage a permis de dénombrer 34 spots communs aux gels réalisés sur la culture en batch au jour 3 et sur la culture I en perfusion au jour 20.

Figure III–31 : Western blotting (30 secondes d'exposition) réalisé sur l'échantillon d'une culture en batch au jour 3 (0,5 μg de protéines déposés).
a : acide, b: basique
↖ tache majeure

4.5.2. Western blottings

Culture en batch jour 3

La protéine antigénique (voir figure III-31 et III-32,table III-2) se situe à un poids moléculaire moyen de 42000. Nous pouvons observer 9 spots de protéine virale; ceux-ci se différencient par leur point isoélectrique qui varie de 5,09 à 5,83.

Le spot majeur de 5,51 de point isoélectrique représente 58,0 % de la quantité totale de la protéine virale.

On dénombre également 2 spots très faibles de point isoélectrique acide (allant de 5,09 à 5,14) à gauche de la tache majeure. Ceux-ci constituent 0,3 % de la quantité totale de la protéine virale. On peut également observer 6 spots de point isoélectrique moins acide (allant de 5,59 à 5,83) à droite de la tache majeure. Ceux-ci représentent 41,7 % de la quantité totale de la protéine virale.

Comparaison culture en batch/culture en perfusion. (table III-2)

Le poids moléculaire du spot majeur est proche de celui observé dans la culture II en perfusion au jour 7 (42000). Le point isoélectrique est toujours de 5,5. L'abondance relative du spot majeur est de 58,0 %, assez proche de ce que nous observons en fin de culture en perfusion.

A gauche de la tache majeure, on peut voir deux isoformes (point isoélectrique 5,09 et 5,14) que l'on retrouve pratiquement toujours au niveau d'une culture en perfusion (le spot de 5,14 de point isoélectrique n'apparaît pas dans la culture II au jour 20).

A droite de la tache majeure, on peut voir 9 isoformes que l'on retrouve toujours sur l'un au l'autre blotting réalisé sur les échantillons de culture en perfusion.

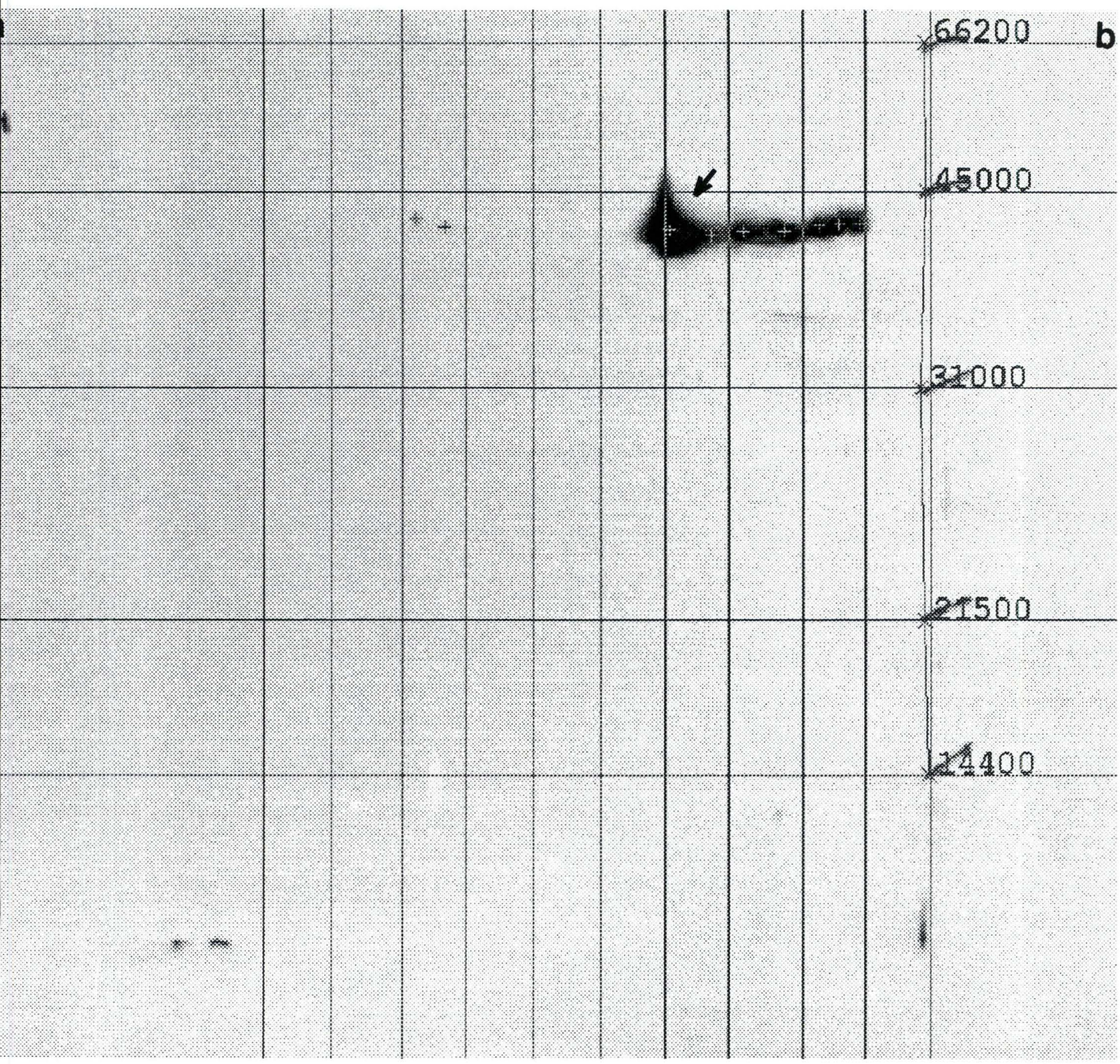


Figure III–32 : Western blotting réalisé sur l'échantillon d'une culture en batch au jour 3, quantifié par le logiciel Bioimage.

a : acide, b: basique

↖ tache majeure

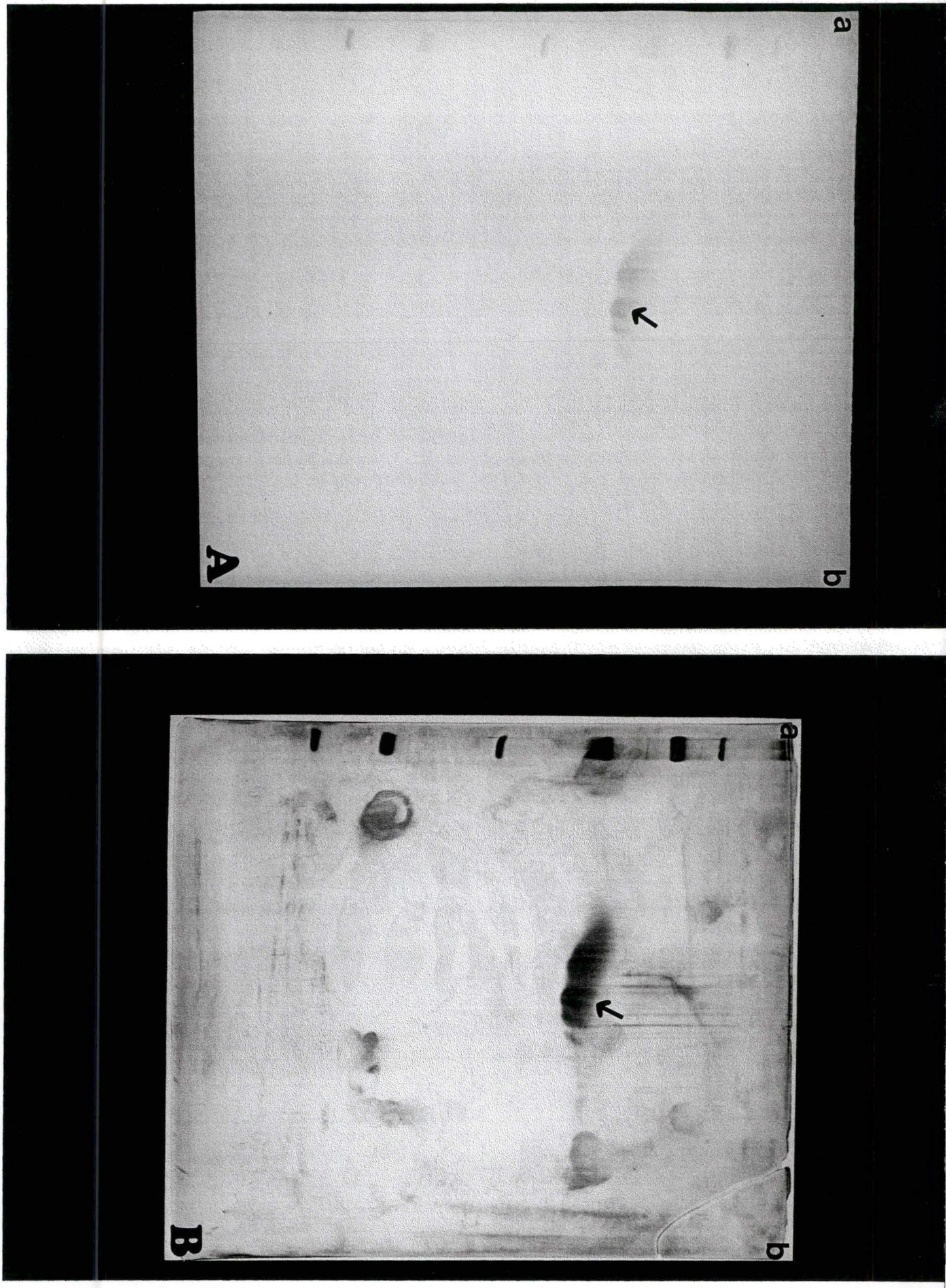


Figure III–33 : Gel d'électrophorèse à deux dimensions réalisé sur l'échantillon de protéine purifiée à partir du milieu complémenté en sérum bovin (70 μg de protéine déposés).

A : coloration au Bleu de Coomassie — a : acide, b: basique

B : coloration à l'argent — ↖ tache majeure

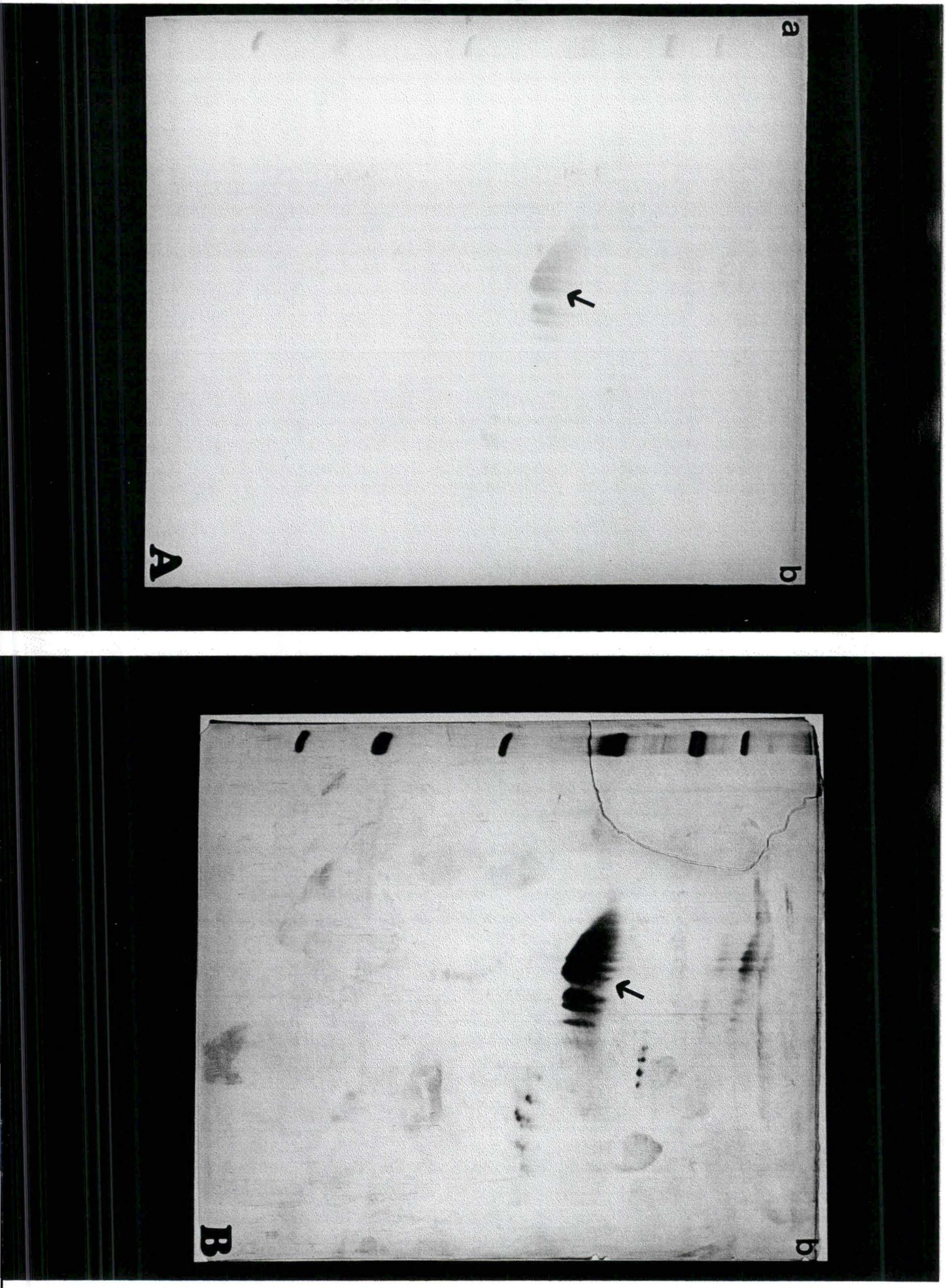


Figure III–34 : Gel d'électrophorèse à deux dimensions réalisé sur l'échantillon de protéine purifiée à partir du milieu complémenté en sérum bovin (70 μg de protéine déposés). Celle-ci a subi une dégradation durant 6 jours à 37° C.

A : coloration au Bleu de Coomassie — a : acide, b: basique

B : coloration à l'argent — ↖ tache majeure

4.5.3. Superposition gel bidimensionnel/Western blotting

Culture en batch jour 3 (voir Figure III-30, III-31)

A nouveau, le spot majeur de point isoélectrique 5,5 est préférentiellement reconnu par l'anticorps. Les spots de points isoélectriques légèrement plus acides au niveau du gel ne réagissent pas avec les anticorps. Par ailleurs, 2 spots situés à gauche de la tache majeure sont détectés sur le blotting mais pas sur le gel coloré à l'argent. Les spots de points isoélectriques moins acides réagissent bien.

4.6. PROTEINE PRODUITE ET PURIFIEE A PARTIR DU MILIEU SANS SERUM (DEGRADEE OU NON).

4.6.1. Gels à deux dimensions.

Protéine produite et purifiée à partir du milieu sans sérum.

La protéine virale (voir Figure 33) se situe à un PM moyen de 40816 et se présente sous différents spots (15). Ce qui a été décrit concernant l'hétérogénéité de PM est applicable.

Protéine dégradée produite et purifiée à partir du milieu sans sérum.

La protéine virale (voir Figure 34) sous forme non dégradée se situe à un PM moyen de 39519 (identique à celui observé pour la protéine produite et purifiée à partir du milieu sans sérum bovin. On dénombre 79 spots de protéine virale. Parmi ceux-ci, on peut distinguer :

- dix formes agrégées de la protéine dont les PM sont supérieurs ou égaux à 48850.
- les formes intactes de la protéine dont les PM se situent entre 36960 et 43130.
- les formes dégradées de la protéine dont les PM sont inférieurs ou égaux à 34390.

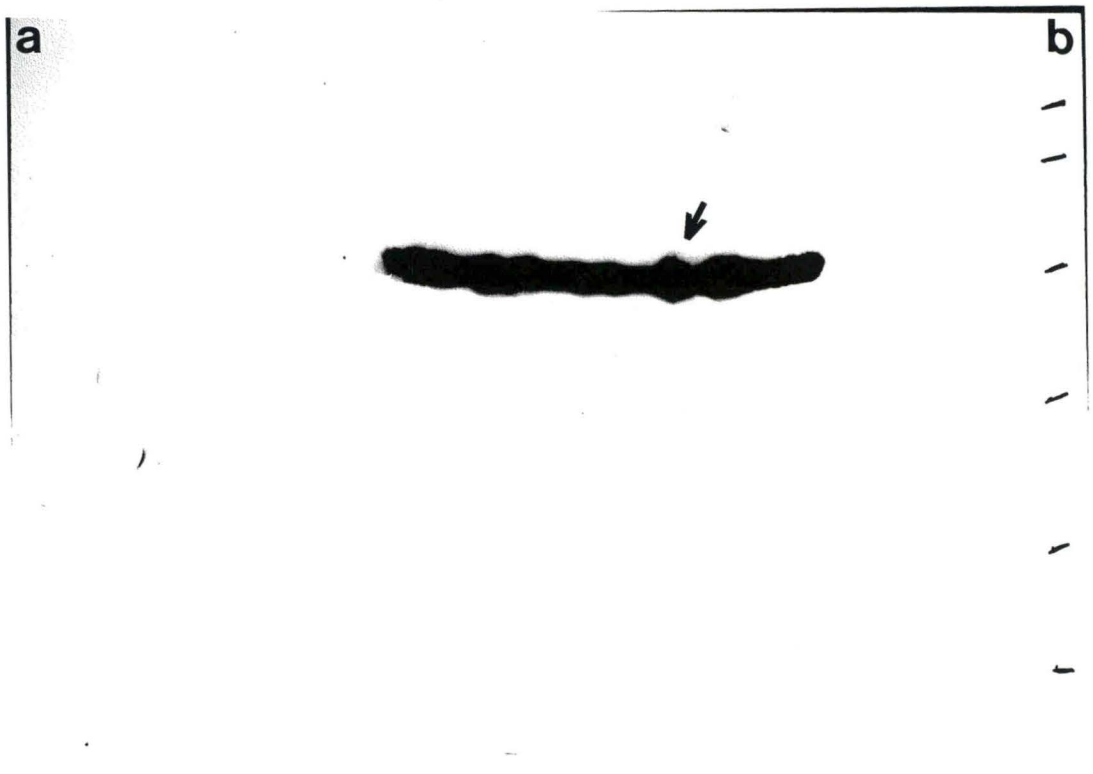


Figure III–35 : Western blotting (30 secondes d'exposition) réalisé sur l'échantillon de protéine purifiée à partir du milieu complémenté en sérum bovin (0,5 μg de protéine déposés).
a : acide, b: basique
↖ tache majeure

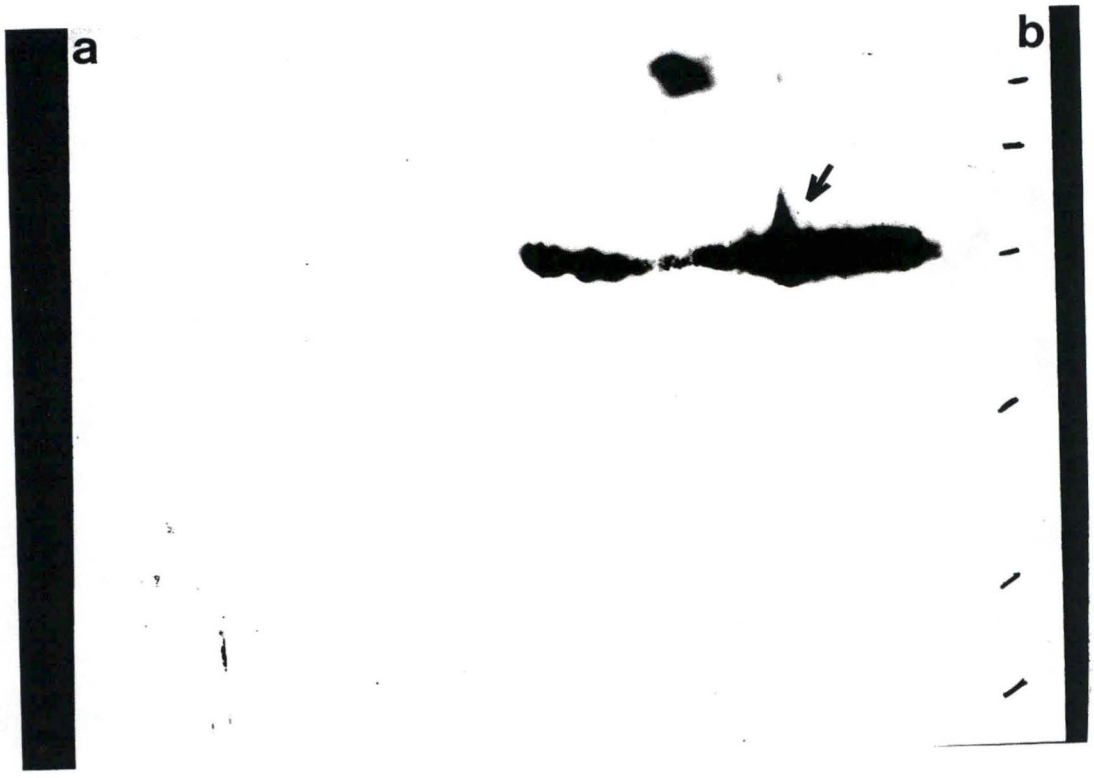


Figure III–36 : Western blotting (30 secondes d'exposition) réalisé sur l'échantillon de protéine purifiée à partir du milieu complémenté en sérum bovin (0,5 μg de protéine déposés). Celle-ci a subi une dégradation durant 6 jours à 37°C.
a : acide, b: basique
↖ tache majeure

4.6.2. Western blotting

Protéine purifiée à partir du milieu sérum bovin

La protéine antigénique (voir Figures III-35, III-37) se situe à un PM moyen de 45189. Son PI varie de 4,90 à 5,82. Le PI de la tache majeure se situe toujours à 5,5. Comme pour la protéine purifiée à partir du milieu sans sérum, nous observons 9 spots de PM plus élevés (agrégats).

Protéine dégradée et purifiée à partir du milieu sérum bovin.

La comparaison entre blottings tache par tache telle que celle réalisée pour les échantillons de bioréacteurs n'a pas été possible. La quantité de protéine virale étant trop élevée (0,5 µg de protéine pure).

La protéine antigénique (voir Figures III-36, III-38) se situe à un PM moyen de 45189. Son PI varie de 4,9 à 5,9. Le PI de la tache majeure est toujours de 5,5. On peut voir un gros spot à un PM supérieur à 97400 représentant 9,5 % de la quantité totale de la protéine virale ainsi que de petits spots de PM supérieurs à 68930. Ceux-ci sont probablement des agrégats de la protéine virale. Deux spots de PM beaucoup plus faible (15340 et 14620) proviennent probablement d'une dégradation protéique.

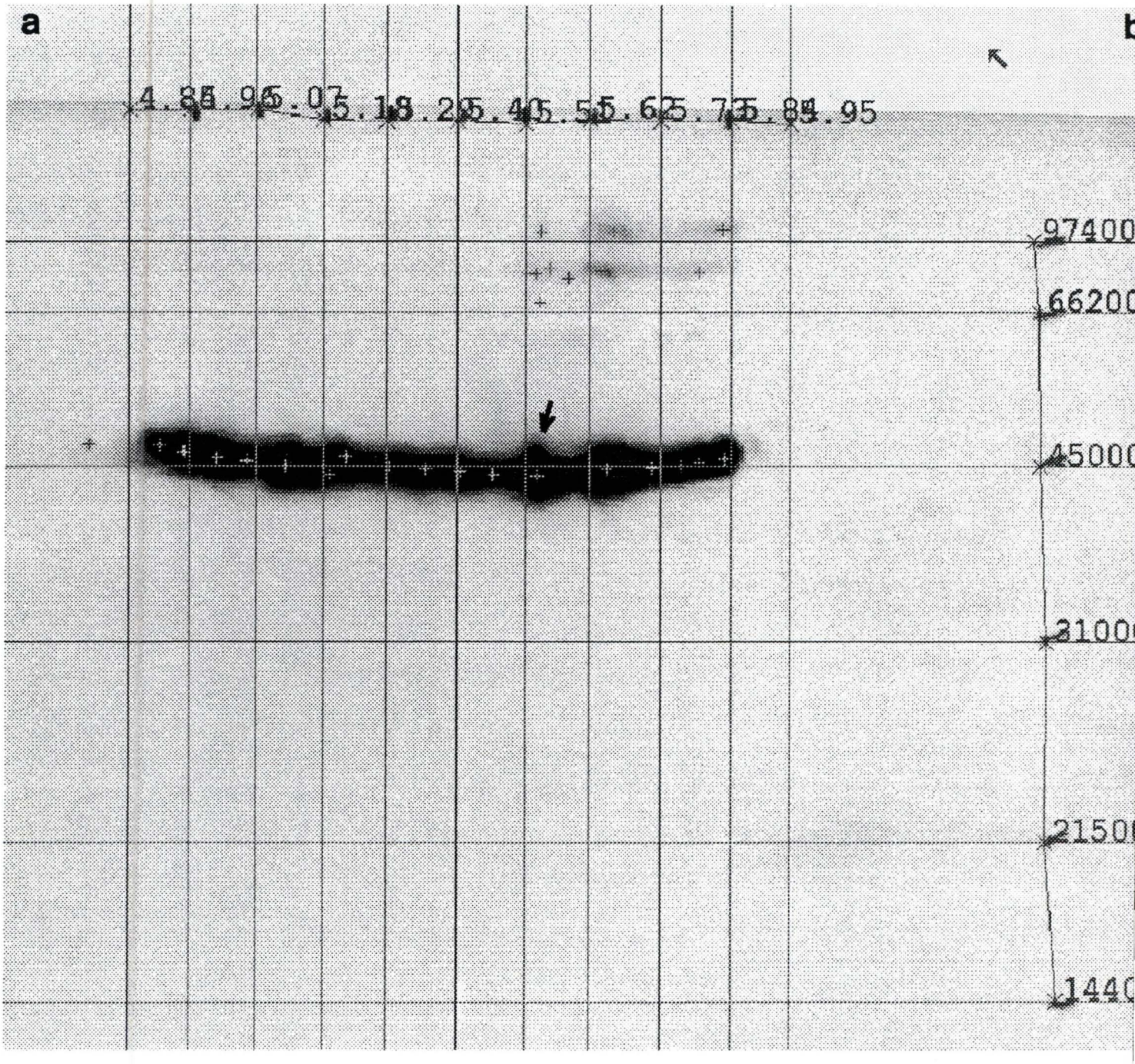


Figure III–37 : Western blotting réalisé sur l'échantillon de protéine purifiée à partir du milieu complémenté en sérum boyin, quantifié par le logiciel Bioimage.
a : acide, b: basique
↖ tache majeure

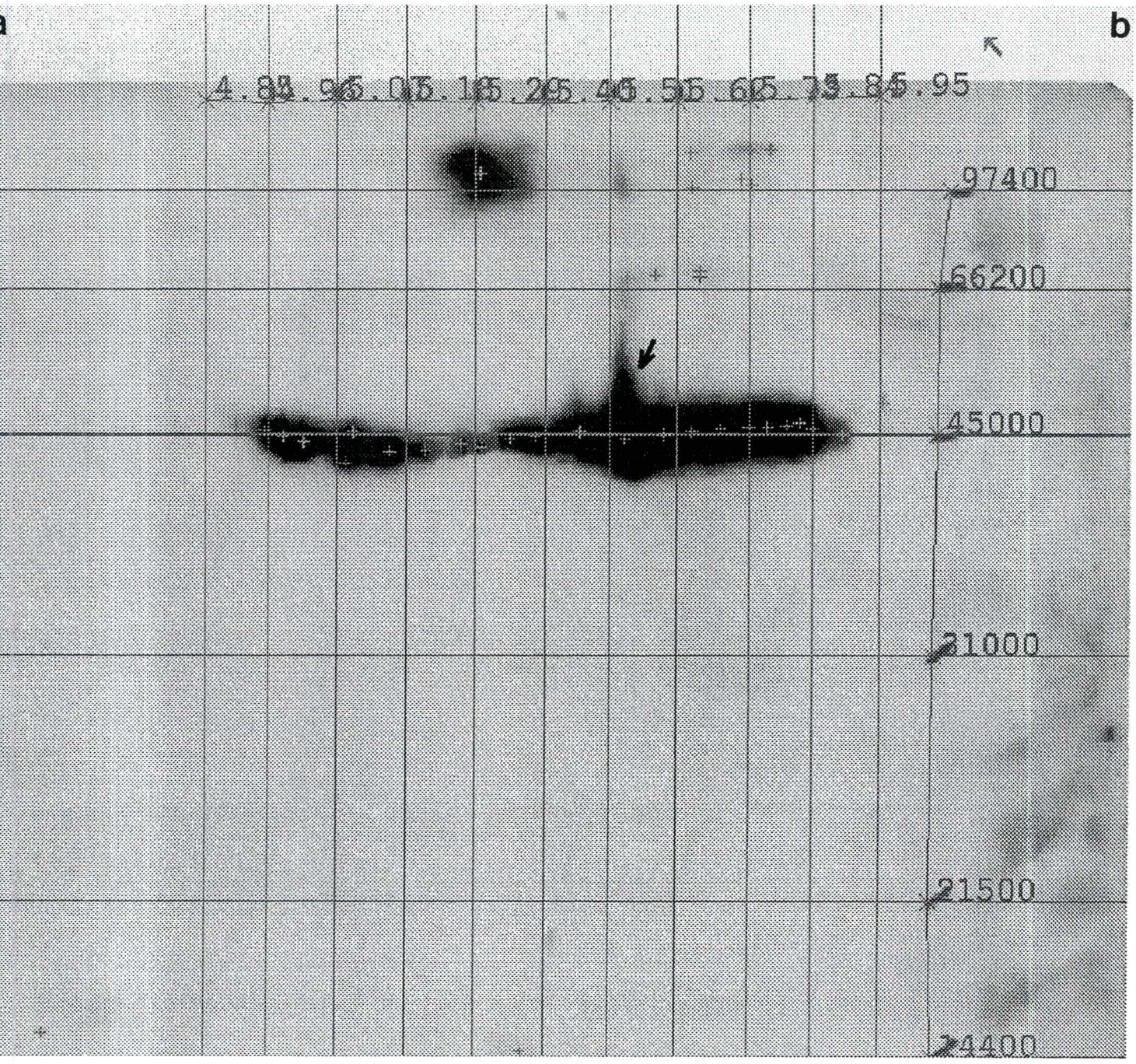


Figure III–38 : Western blotting réalisé sur l'échantillon de protéine purifiée à partir du milieu complémenté en sérum bovin, quantifié par le logiciel Bioimage. Celle-ci a subi une dégradation durant 6 jours à 37°C.

a : acide, b: basique

↖ tache majeure

4.6.3. Superposition gel bidimensionnel / blotting

Protéine produite et purifiée à partir du milieu sans sérum (voir Figures III-33, III-35)

Vingt-sept spots sont détectés par le blotting pour seulement 15 pour le gel coloré à l'argent. Les formes agrégées ne sont pas visibles sur le blotting.

Protéine dégradée, produite et purifiée à partir du milieu sans sérum. (voir Figures III-34, III-36)

Plus de taches sont détectées sur le gel bidimensionnel (79) que sur le blotting (39). En effet, on observe une non-réactivité des anticorps vis-à-vis de toutes les formes dégradées et de certaines formes agrégées de la protéine.

CONCLUSIONS

Dans ce travail, nous avons utilisé la technique des gels bidimensionnels pour suivre la bio-production d'une protéine virale par les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO recombinantes) cultivées en dans différentes conditions de culture et au cours du temps.

Des échantillons de milieux de culture de bio-réacteurs ont donc été prélevés. Leur analyse par gels bidimensionnels exige une concentration préalable. A ce stade, nous avons rencontré plusieurs problèmes et plus particulièrement, l'apparition de différents précipités indésirables et des pertes de matériel protéinique au cours des étapes de concentration. Différentes méthodes de concentration ont été essayées et il s'avère que les protocoles de concentration doivent être adaptés aux milieux de culture utilisés. Dans les cultures utilisant le milieu Iscove sans sérum, la filtration sur Amicon 10 suivie d'une précipitation au TCA nous a permis d'obtenir une concentration adéquate des échantillons, même si elle s'accompagne toujours d'une perte non négligeable de matériel. Cette étape de concentration pourrait donc probablement être encore améliorée.

Nous avons ensuite réalisé des gels bidimensionnels et des blottings sur tous les échantillons de culture en perfusion, en batch ainsi que sur les échantillons de protéines purifiées. Leur analyse a permis de mettre en évidence **3 types d'hétérogénéité au niveau de la protéine virale étudiée** :

- hétérogénéité de poids moléculaire
- hétérogénéité de point isoélectrique
- hétérogénéité de réactivité vis-à-vis de l'anticorps : Par hétérogénéité vis-à-vis de l'anticorps, nous entendons que toutes les isoformes ne sont pas reconnues aussi efficacement par celui-ci. En effet, les différentes isoformes détectées sur le gel bidimensionnel ne se retrouvent pas forcément au niveau du blotting surtout lorsque la concentration de la protéine est faible. L'anticorps reconnaissant le côté carboxyterminal et non les acides sialiques, il est possible que certaines protéines ayant des épitopes plus exposés, réagissent mieux avec l'anticorps.

Nous avons également pu observer **des variations qualitatives et quantitatives dans la distribution des isoformes de la protéine virale** :

- d'un système de culture à l'autre (culture en batch ou en perfusion).

- au cours du vieillissement du bioréacteur (par exemple, entre le cinquième jour et le vingtième de la culture I en perfusion).

- d'un bioréacteur à l'autre lorsque le même système de culture est appliqué (par exemple, entre la culture I en perfusion et la culture II en perfusion au vingtième jour).

Enfin, la combinaison électrophorèse bidimensionnelle / western blotting a **permis de détecter différentes formes anormales de la protéine virale**. Parmi celles-ci, on trouve soit des agrégats et notamment des dimères de PM plus élevés, soit des fragments protéiniques de PM plus réduits. Les anticorps fournis par Smith Kline Beecham Biologicals reconnaissent donc non seulement diverses isoformes de la protéine virale mais également un certain nombre de formes agrégées ou fragmentées de celle-ci.

La technique d'analyse des gels bidimensionnels couplée au blotting permet donc bien de mettre en évidence de manière fine des différences dans la bio-production de bioréacteurs. Elle montre également que pour des bioréacteurs de même type, utilisant les mêmes paramètres de culture, la bio-production de la protéine virale montre des variations et au cours du temps et d'une expérience de production à l'autre. Pour l'instant,l'interprètation de ces variations reste impossible. Elle s'avère donc bien malgré sa lourdeur et l'investissement financier considérable qu'elle requière, une technique de pointe pour assurer le monitoring " fin "d'un bioréacteur.

La technique d'analyse sur gel que nous avons utilisée se révèle également particulièrement performante lorsque la protéine recombinante montre diverses formes glycosylées comme la protéine virale que nous

avons utilisée. L'équipe de purification de Smith Kline Beecham Biologicals nous a soumis quelques renseignements concernant la protéine virale qui permettent d'éclaircir les résultats de ce travail :

- Par traitement de la protéine à la neuraminidase, il ont pu déterminer le point isoélectrique théorique de la protéine sans acides sialique, celui-ci est de 5,7. Toutes les isoformes présentant un point isoélectrique inférieur à 5,7 sont des protéines qui portent à leur surface un ou des acides sialiques. Sur tous les blottings, une isoforme de 5,7 de point isoélectrique a effectivement été observée. La présence d'isoformes dont le point isoélectrique est compris entre 4,9 et 5,7 s'explique donc par la présence sur la protéine d'acides sialiques en quantités plus ou moins importantes.

- Dans les cultures réalisées en présence de sérum, les constituants de ce dernier semblent protéger les acides sialiques contre l'action de la neuraminidase. Ceci aurait pour effet d'augmenter les isoformes acides. Cependant, dans cette expérience, une trop grande quantité de protéine purifiée ayant été déposée, nous n'avons pas pu tirer de conclusions quantitatives.

Perspectives

La combinaison électrophorèse bidimensionnelle / western blotting semble être une technique de choix qui permettra à moyen terme de faire un suivi (monitoring) des protéines recombinantes produites par des cellules de mammifères cultivées en bioréacteurs. Certaines modifications permettraient d'encore affiner la technique :

- La réalisation d'un test ELISA sur l'échantillon final permettrait de déposer une quantité constante de protéine virale sur les gels bidimensionnels et donc d'obtenir des quantités plus constantes sur les blottings, ce qui devrait permettre une analyse plus quantitative de ces derniers.

- Deux blottings à des concentrations différentes en protéines (0,5 μg et 5 μg) pourraient être réalisés, ceux-ci nous apportant des informations complémentaires. En effet, le premier permettra de voir des modifications dans les isoformes majoritaires, tandis que le deuxième pourra mettre en évidence les diverses isoformes minoritaires même lorsqu'elles sont présentes en quantités très faibles.

En conclusion, notre travail consistait à mettre au point les différentes étapes nécessaires pour analyser les surnageants de culture de cellules par la technique des gels bidimensionnels couplée au western blotting et ce dans le but de suivre la bioproduction d'une protéine recombinante virale. La technique utilisée s'avère effectivement très performante pour déceler des variations de bio-production et ce particulièrement dans le cas des protéines diversement glycosylées. Malgré sa lourdeur et l'investissement financier requis, elle pourrait donc un jour assurer le monitoring fin de bioréacteurs, moyennant certaines améliorations. Pour que la technique devienne un jour une technique de monitoring en routine, le passage des grands gels aux mini-gels semble une étape obligée qui simplifiera et accélérera considérablement le travail d'analyse et en réduira également le coût.

BIBLIOGRAPHIE

ARATHOON W. R. & BIRCH J. R. (1985)
Large scale cell culture in biotechnology
Science, 232, 1390-1395

BIALY H. (1989)
Success in engineering E. Coli secretion
Biotechnology, 7, 209

BJARE U. (1992)
Serum-free cell culture
Pharmac. Ther., 53, 355-374

BOSCHETTI E. (1987)
Chromatographie liquide : le passage obligé pour purifier des protéines produites par culture de cellules animales.
Le technoscope de Biofutur, 14, 3-12

BUTLER M. (1988)
A comparative review of microcarriers available for the growth of anchorage dependent animal cells.
In : "Animal cell biotechnology" vol. 3, Eds. Spier R.E. & Griffiths J.B., Academic Press, pp 283-303

BUTLER M. (1991)
Mammalian Cell biotechnology. A practical approach.
Oxford University Press, pp 200

BUTLER M. (1991)
Product quality control: pp 200
In : "Mammalian Cell Biotechnology - A Practical Approach", (Ed. Butler M.), Oxford University Press.

CELIS J. E. & BRAVO R. (1984)

Two-dimensional gel electrophoresis : a guide for the beginner. pp 3-36
Detection of polypeptides in two-dimensional gels, using silver staining. pp 96-98
Clinical applications of two-dimensional gel electrophoresis. pp 194-235
The protein catalog of Escherichia Coli. pp 417-475
In : "Two-dimensional Gel Electrophoresis of Proteins", (Eds. Celis J. E. & Bravo R.), Academic Press, London.

COLLIN F. (1992)

Utilisation de la technique des gels d'électrophorèse en deux dimensions pour confirmer l'effet d'accélération du vieillissement in vitro induit par les stress.
Mémoire de Licence, FUNDP, Namur

DAMERVAL C., de VIENNE D., ZIVY M., TARROUX P. & VINCENS P. (1993)

Electrophorèse bidimensionnelle des protéines
Le technoscope de Biofutur, 123, 3-18

DURAND B. (1988)

Le transfert des protéines ou Western Blot.
Le technoscope de Biofutur, 19, 3-17

EDELMAN A., JOLIFF G., KLIER A. & RAPOPORT G. (1988)

A sysem for the inductible secretion of proteins from Bacillus Subtilis during logarithmic growth.
FEMS Microbiol. Lett., 52, 117-120

FRESHNEY R. I. (1987)

Specialized techniques.
In : "Culture of animal cells. A manual of basic technique." (Ed. Alan R.) Liss, Inc., New-York (2nd edition), pp 312-317

GIOMETTI C. S. & ANDERSON N. G. (1980)
Two-dimensional electrophoresis of human saliva.
Electrophoresis, 79, 395-404

GIOMETTI C. S., ANDERSON N. G. & ANDERSON N. L. (1979)
Muscle protein analysis. High-resolution two-dimensional electrophoresis of sceletal muscle proteins for analysis of small biopsy samples.
Clin. Chem., 25, 1877-1884

GRIFFITHS J.B. (1985)
Cell products : an overview.
In : "Animal cell biotechnology" vol. 2, Eds. Spier R.E. & Griffiths J.B., Academic Press, pp 3-12

HARANT H., WIMMER K., WENISCH E., STRUTZENBERGER K., REITER M., BLUML G., GAIDA T., SCHMATZ C. & KATINGER H. (1992)
Two-dimensional electrophoresis as a tool for control of quality and consistency in production systems using animal cells
Cytotechnology, 8, 119-127

HATA J., TAMCRA T., YOKOSHIMA S., JAMASHITA S., KABERO S., MATSUMOTO K. & ONODERA K. (1992)
Chemically defined medium for the production of biologically active substances of CHO cells.
Cytotechnology, 10, 9-14

HILLER G. W., AESCHLIMANN A. D., CLARK D. S. & BLANCH H. W. (1991)
A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in continuous suspension culture on serum-free medium.
Biotechnology and Bioengeneering, 38, 733-741

HODGSON J. (1993)
Expression systems : a user's guide.
Bio-Technology, 11, 887-891

JAYME D.W. (1990)
Alternatives to fetal bovine serum for mammalian cell culture

JONES M. I., SPRAGG S. P. & WEBB T. (1981)
Detection of proteins in human amniotic fluid using two-dimensional gel electrophoresis.
Biol. Neonate, 39, 171-177

KANE J. F. & HARTLEY D. L. (1988)
Formation of recombinant protein inclusion bodies in E. Coli.
Tibtech., 6, 95-101

KATINGER H. & SCHEIRER W. (1989)
Mass cultivation and production of animal cells.
In : "Animal cell biotechnology" vol. 1, Eds. Spier R.E. & Griffiths J.B., Academic Press, pp 167-193

LAMBERT K. J. & BIRSCH J. R. (1989)
Cell growth media.
In : "Animal cell biotechnology" vol. 1, Eds Spier R.E. & Griffiths J.B., Academic Press, pp 85-122

MERRIL C. R. & GOLDMAN D. (1984).
Detection of polypeptides in two dimensional gels using silver staining.
In : "Two-dimensional Gel Electrophoresis of proteins", (Eds. Celis J. E. & Bravo R.), Academic press, London, pp 93-109

MORELLE C. (1993)
Expression de protéines hétérologues
Le technoscope de Biofutur, 125, 1-15

NIELSEN J.B.K. & LAMPEN O.J. (1983)
Engeneering for bacterial secretion.
ASM News, 49, 318-320

O'FARELL P. H. (1975)
High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.
J. Biol. Chem., 250, 4007-4021

RATNER M. (1989)
Protein expression in yeast.
Bio-Technology, 7, 1129-1133

RODEMANN P.H., BAYREUTHER K., FRANCZ P.I., DITTMAN K. & ALBIEZ M. (1989)
Selective enrichment and biochemical characterisation of seven human skin fibroblasts cell types *in vitro*
Exp. Cell Res., 180, 84-93

SCHEELE G.A. (1980)
Biosynthesis, segregation and secretion of exportable proteins by the exocrine pancreas.
Am. J. Physiol., 238, G467-G477

SCHEIN C. H. (1989)
Production of soluble recombinant proteins in bacteria.
Bio-Technology, 7, 1141-1143

THORSRUD A. K., VATN M. H. & JELLUM E. (1982)
Two-dimensional electrophoresis patterns of proteins of normal mucosa, polyps and carcinomas of the large intestine.
Clin. Chem., 28, 884-889

TILKINS M. L., JUDD D. A., WEISS S. A. & GORFIEN S. F. (1992)
Serum-Free Culture of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells.
Gibco BRL, Focus 14, n° 3, 95-98

TRACY R. P., WOLD L. E., CURRIE R. M. & YOUNG D. S. (1982)
Patterns of normal colon mucosa adrenocarcinoma compared by two-dimensional gel electrophoresis.
Clin. Chem., 28, 915-919

WHICHER J. T. (1981)
Inflammation : the role of the acute phase proteins.
Diagn. Med., **VOLUME**, 52-69

WU X., LEE W., TRAN L. & WONG S. (1991)
Engeneering a *Bacillus Subtilis* expression-secretion system with strain deficient in six extracellular proteases
J. Bacteriol., 173, 4952-4958