

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Utilisation de la papaine comme alternative à la trypsine en culture de cellules

Huet, Anne-Catherine

Award date:
1997

[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.

Faculté des Sciences
F.U.N.D.P.
Université de Namur
Sart Tilman

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

Faculté des Sciences

**UTILISATION DE LA PAPAÏNE COMME ALTERNATIVE A LA TRYPSINE
EN CULTURE DE CELLULES**

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

Anne-Catherine HUET

Juin 1997

Utilisation de la papaïne comme alternative à la trypsine en culture de cellules

HUET Anne-Catherine

Résumé

Si la plupart des vaccins de nouvelle génération sont produits à partir de (glyco)protéines recombinantes, il en reste quelques-uns qui sont toujours préparés à partir de particules virales isolées après infection de culture de cellules humaines tels les fibroblastes MRC-5. Depuis longtemps, le sérum bovin est un facteur essentiel pour ces cellules; il y joue d'ailleurs un double rôle. Sa présence est nécessaire à la survie et à la prolifération des cellules et d'autre part, l'alpha2-macroglobuline contenue dans le sérum est capable d'inhiber la trypsine, servant à détacher les cellules lors des repiquages successifs. Cependant, la Communauté Européenne veut interdire tout produit d'origine animale lors de l'élaboration de produits injectables à l'homme. C'est pourquoi, l'élimination du sérum des cultures cellulaires devient un objectif prioritaire. Dans ce travail, nous avons essayé de développer une alternative possible au couple trypsine/alpha2-macroglobuline sérique, utilisé classiquement pour détacher les cellules. Notre choix s'est porté sur la papaïne, d'origine végétale, pour détacher les cellules et sur la leupeptine et antipapaine pour inhiber l'enzyme. Nous avons tenté d'établir un premier protocole de papainisation et celui-ci a fait l'objet d'une évaluation préliminaire. Si ce protocole permet bien de détacher les cellules apparemment sans problème, nous constatons néanmoins un effet négatif à long terme sur le comportement prolifératif des cellules.

Ca commence avec un **M** dans la musique,
Ca Etincelle comme une étoile dans la nuit,
C'est Riche comme une journée ensoleillée,
C'est Confiant comme le premier vol d'un oisillon,
Et ça se termine avec un **I** comme dans **MERCI**.

Merci à Monsieur Remacle de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et d'avoir su s'inquiéter de l'avancée du travail.

Merci tout particulièrement à Martine Raes qui, malgré son horaire surchargé, a toujours su trouver le temps de me donner des explications ou de m'aiguiller dans les moments plus délicats. Sa rigueur scientifique et ses conseils m'ont été d'une grande aide.

Merci beaucoup à Martine qui, jusqu'au bout a su m'épauler et me conseiller à chaque étape du travail. Merci aussi d'avoir accepté de prendre le rôle de Barbara, que je remercie par la même occasion.

Merci à François pour sa gentillesse et pour m'avoir fait découvrir le monde mystérieux des cultures cellulaires. Je remercie également Noëlle pour sa bonne humeur et pour son aide précieuse en microscopie électronique.

Merci à Patsy (et sa légende), Mumu (et son musée), Maggi (et ses coups de vent) et Aurore avec qui j'ai partagé le même bureau.

Merci à Isa G., Michet, Isa A., Anne, Andrée, Berthe, Catherine, Nat, Edouard, et tous les autres membres du laboratoire qui étaient toujours prêts à rendre service ou répondre aux questions.

Merci à Aurore, David, Jehan, Jean-Ba, Laurence et Maryse de s'être soutenu mutuellement et pour les moments de détente passés ensemble.

Merci à mes parents, Magali, Sandra et Cécile qui pendant ces années d'étude ont su me soutenir et m'encourager avec patience.

Merci à Olivier pour son indispensable soutien moral et pour la confiance qu'il m'a accordée.

Merci à Pascal pour son aide dactylographique et son amitié.

Merci enfin à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

ADN :	Acide Desoxyribonucléique
AMC :	7-Amino-4 Méthylcoumarin
APMSF :	4-Amidinophenylmethanesulphonyl Fluoride
ARN :	Acide Ribonucléique
BrdU :	Bromodéoxyuridine
cGMP :	cyclic Guanosine Monophosphate
CHO :	Chinese Hamster Ovary
CO :	Couvre-objet
CPM :	Coups Par Minute
DFP :	Diisopropylphosphofluoridate
DMF :	Diméthylformamide
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DO :	Densité Optique
DTT :	Dithiothréitol
E. coli :	Escherichia coli
EDTA :	Ethylenediaminetetraacetic Acid
HBSS :	Hanks Buffer Saline Solution
IC50 :	Inhibition Concentration of 50 %
Ig :	Immunoglobuline
MEC :	Matrice Extracellulaire
MRC-5 :	Medical Research College
PBS :	Phosphate Buffer Solution
PMSF :	Phenylmethylsulphonyl Fluoride
QVVA :	Glutamine-Valine-Valine-Alanine
RGD :	Arginine-Glycine-Acide aspartique
RPM :	Rotations Per Minute
SBTI :	Soybean Trypsin Inhibitor
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
TCA :	Trichloroacetic Acid
TH :	Tetrahedral intermediate
TLCK :	Tosyl-Lysine Chlorométhyl Cétone

TS : Transition State

Z-Arg-AMC : Benzyloxycarbonyl-Arginine-7-Amino-4-Méthylcoumarin

Table des matières

INTRODUCTION

Avant-propos	1
1. Les milieux de culture cellulaire, avec ou sans sérum	3
1.1. Les milieux avec sérum	3
1.1.1. Composition	3
1.1.2. Inconvénients liés au sérum	5
1.2. Milieux synthétiques sans sérum ou milieux définis	7
2. Les fibroblastes de poumon humain MRC-5	8
2.1. L'importance de l'adhérence cellulaire	9
2.2. Le détachement cellulaire : la trypsine et ses inhibiteurs	11
3. La papaïne	14
3.1. Biosynthèse et maturation	15
3.2. Mécanisme catalytique général	15
3.3. Caractéristiques et structure	17
3.4. Le site actif et ses principaux acides aminés impliqués dans le mécanisme catalytique	17
4. Inhibition de la papaïne	19
4.1. Les principaux inhibiteurs de la papaïne	19
4.2. Leupeptine et antipapaïne	20
4.2.1. Les leupeptines ($C_{20}H_{38}N_6O_4$)	21
4.2.2. L'antipapaïne ($C_{27}H_{44}N_{10}O_6$)	22
5. Objectifs du travail	23

MATERIELS ET METHODES

1. Culture de cellules	24
1.1. Cellules	24
1.1.1. Repiquage des cellules à la trypsine	24
1.1.1.1. Matériels	24
1.1.1.2. Méthode	25
1.1.2. Repiquage des cellules à la papaine	25
1.1.2.1. Matériels	25
1.1.2.2. Méthode	26
1.1.3. Congélation et décongélation	27
1.1.3.1. Matériels	27
1.1.3.2. Méthodes	27
A. Congélation	27
B. Décongélation	28
2. Tests de cytotoxicité	28
2.1. Test au bromure d'éthidium et acridine orange	28
2.1.1. Matériels	29
2.1.2. Méthodes	30
2.1.2.1. Coloration in situ	30
2.1.2.2. Coloration de cellules en suspension	30
2.2. Test au MTT	31
2.2.1. Matériels	31
2.2.2. Méthode	32
3. Tests de prolifération	33
3.1. Dosage de protéines (au Folin)	33
3.1.1. Matériels	33
3.1.2. Méthode	34
3.2. Estimation de l'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN	35
3.2.1. Matériels	35
3.2.2. Méthode "in situ"	35

3.3. Incorporation de Bromodéoxyuridine	36
3.3.1. Matériels	37
3.3.2. Méthode	38
3.4. Clonage	39
3.4.1. Culture de cellules	39
3.4.2. Coloration au bleu de Coomassie	39
3.4.2.1. Matériels	39
3.4.2.2. Méthodes	40
A. Fixation	40
B. Coloration	40
4. Préparation des cellules pour la microscopie électronique	41
4.1. Matériels	41
4.2. Méthode	41
5. Dosage de l'activité de la papaïne	42
5.1. Matériels	42
5.2. Méthodes	43
5.2.1. Droite d'étalonnage de l'AMC	43
5.2.2. Dosage de la papaïne	44

RESULTATS

1. Mise au point du dosage de la papaïne	46
1.1. Choix du tampon	46
1.2. Dosage de la papaïne	46
1.2.1. Droite d'étalonnage en AMC	47
1.2.2. Dosage de l'activité enzymatique	48
1.2.2.1. Papaïne fraîche	48
1.2.2.2. Effet du stockage à froid	48
2. Essais préliminaires de papaïnisation avec inhibition par le sérum	49
2.1. Mise au point des conditions de papaïnisation	50

2.1.1. Concentrations testées en papaïne	50
2.1.2. Avec ou sans EDTA	52
2.2. Cytotoxicité de la papaïne	52
2.2.1. Evaluation de la cytotoxicité immédiate de la papaïne par la méthode au bromure d'éthidium et acridine orange	52
2.2.2. Evaluation de la cytotoxicité 24 heures et 48 heures après la papainisation	53
2.2.2.1. Quantification des cellules par dosage des protéines	53
2.2.2.2. Observation des cellules MRC-5 au microscope électronique à transmission	54
3. Utilisation des inhibiteurs leupeptine et antipainé	56
3.1. Effets inhibiteurs sur la papaïne purifiée	56
3.1.1. Le complexe papaïne-leupeptine	56
3.1.2. Le complexe papaïne-antipainé	57
3.2. Cytotoxicité sur les cellules	57
3.2.1. Vérification par la méthode au bromure d'éthidium et acridine orange	57
3.2.2. Vérification par la méthode au MTT	58
3.3. Utilisation après papainisation des cellules	59
4. Papaïne/leupeptine ou antipainé, comme alternative à la trypsine/α_2-macroglobuline. Evaluation à court et à moyen terme	61
4.1. Incorporation de la thymidine tritiée	61
4.2. Confirmation par incorporation de BrdU	63
4.3. Effet de la papaïne à plus long terme : le clonage	63
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	65

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Avant-propos

La plupart des vaccins administrés à l'homme sont confectionnés à partir d'antigènes recombinants exprimés en levure ou en cellules CHO (chinese hamster ovary). Cependant, cette approche n'est pas réalisable pour tous les vaccins. Ainsi pour la polio, la varicelle ou l'hépatite A, on utilise l'approche traditionnelle de production virale à partir de cultures cellulaires.

Par exemple, chez SmithKline Beecham (Rixensart), ce sont les fibroblastes de poumon humain MRC-5 qui assurent la multiplication de ces virus. Jusqu'à présent, ces cultures sont réalisées en présence de sérum bovin, facteur intervenant à deux niveaux. D'une part, il constitue un élément essentiel à la survie et à la prolifération des cellules et d'autre part, il intervient lors des repiquages en inhibant la trypsine, enzyme classiquement utilisée pour détacher les cellules de leur support.

Mais les récentes épidémies d'encéphalite spongiforme bovine et la possibilité de sa transmission à l'homme, ainsi que la présence éventuelle de prions, rendent suspect tous les produits d'origine bovine, surtout dans l'élaboration de produits injectables à l'homme. Ceci renforce la nécessité de rechercher des alternatives à l'utilisation de sérum d'origine animale dans la production de ces préparations vaccinales.

Ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'un projet qui sera financé par la Région Wallonne, visant à supprimer le sérum des cultures de cellules MRC-5 destinées à la production de particules virales à usage vaccinal.

La première partie de ce projet qui consiste à mettre au point des milieux sans sérum ne sera pas étudiée dans ce travail pour des raisons de temps.

C'est donc la seconde partie qui attirera tout particulièrement notre attention durant le mémoire. En effet, il est important de pouvoir trouver des alternatives à l'utilisation de la trypsine et du sérum contenant l' α_2 -macroglobuline pour l'inhiber. Nous proposons de remplacer cette protéase par une autre enzyme d'origine végétale, la papaïne. Après avoir analysé les principaux couples protéases-inhibiteurs, notre choix s'est porté au système

papaïne-leupeptine ou papaïne-antipain.

En combinant ces deux approches, nous espérons à plus long terme pouvoir éliminer le sérum des cultures de cellules MRC-5 en phase de prolifération et en phase de production virale, en vérifiant bien évidemment que dans ces conditions la production virale ne soit ni quantitativement ni qualitativement altérée.

1. Les milieux de culture cellulaire, avec ou sans sérum

1.1. Les milieux avec sérum

1.1.1. Composition

Les cultures de cellules animales et humaines sont généralement réalisées dans des milieux synthétiques en présence de sérum, facteur essentiel pour assurer la survie et la prolifération des cellules. Il contient en effet de nombreux constituants dont des facteurs de croissance. Le sérum intervient également lors des repiquages cellulaires : en effet, la trypsine est utilisée pour digérer la matrice extracellulaire et dissocier les cellules du substrat et entre elles, mais cette protéase doit ensuite être inhibée. Le sérum est utilisé dans ce but car il contient de nombreux inhibiteurs de protéases tels que l' α_2 -macroglobuline.

La composition des milieux synthétiques, dans lesquels les cellules sont cultivées est très variable selon les milieux. Le tableau I.1. montre la composition de quelques milieux, couramment utilisés pour la culture des fibroblastes. La présence d'un certain nombre d'éléments essentiels reste toutefois constante. Parmi ceux-ci, les constituants minéraux sont indispensables et notamment sept ions dont le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium, le phosphate, le carbonate et le chlore. Ils jouent un rôle dans le maintien de la pression osmotique, mais ils interviennent également de manière très importante dans les transports membranaires (canaux et pompes) et le métabolisme en général. De même, le Na^+ et le K^+ , le Ca^{++} et le Mg^{++} ont un rôle fondamental dans le maintien des potentiels membranaires. Ca^{++} et Mg^{++} sont aussi cofacteurs de nombreuses réactions enzymatiques et interviennent dans l'attachement et l'étalement des cellules à leur support de culture. Enfin, on ne peut ignorer le rôle de second messager du Ca^{++} (couplé à la calmoduline) lors de la transmission du signal extracellulaire, déclenché par la fixation d'une série de messagers chimiques, dont plusieurs hormones à leur récepteur.

Les substances énergétiques constituent un autre élément essentiel des milieux synthétiques. Une des molécules les plus fondamentales, est le glucose qui participe aux différentes biosynthèses des cellules en culture. Il est parfois substitué par d'autres "oses" tels que le galactose, le mannose ou le fructose. D'autres substances énergétiques comme les

Component	Eagle's MEM mg/l	Dulbecco's modification mg/l	Ham's F12 mg/l	CMRL 1066 mg/l	RPMI 1640 mg/l	199 mg/l	L15 mg/l	Fischer's mg/l	Waymouth's MB 752/1 mg/l
Amino acids									
L-alanine	—	—	8.90	25.0	—	25.0	225	—	—
L-arginine (free base)	—	—	—	—	200	—	500	—	—
L-arginine · HCl	126	84.0	211	70.0	—	70.0	—	15.0	75.0
L-asparagine	—	—	—	—	50.0	—	—	—	—
L-asparagine · H ₂ O	—	—	15.0	—	—	—	260	11.4	—
L-aspartic acid	—	—	13.3	30.0	20.0	30.0	—	—	60.0
L-cysteine (free base)	—	—	—	—	—	—	120	—	61.0
L-cystine	24	48.0	—	20.0	50.0	—	—	—	15.0
L-cystine, 2Na	—	—	—	—	—	23.7	—	23.7	—
L-cysteine · HCl · H ₂ O	—	—	35.1	260	—	0.0987	—	—	—
L-glutamic acid	—	—	14.7	75.0	20.0	66.8	—	—	150
L-glutamine	292	584	146	100	300	100	300	200	350
Glycine	—	30.0	7.50	50.0	10.0	50.0	200	—	50.0
L-histidine (free base)	—	—	—	—	15.0	—	250	—	128
L-histidine HCl · H ₂ O	42.0	42.0	21.0	20.0	—	21.9	—	81.1	—
L-hydroxy-proline	—	—	—	10.0	20.0	10.0	—	—	—
L-isoleucine	52.0	105	3.94	20.0	50.0	20.0	125	75.0	25.0
L-leucine	52.0	105	13.1	60.0	50.0	60.0	125	30.0	50.0
L-lysine HCl	73.1	146	36.5	70.0	40.0	70.0	93	50.0	240
L-methionine	15.0	30.0	4.48	15.0	15.0	15.0	75.0	100	50.0
L-phenylalanine	33.0	66.0	4.96	25.0	15.0	25.0	125	67.0	50.0
L-proline	—	—	34.5	40.0	20.0	40.0	—	—	50.0
L-serine	—	42.0	10.5	25.0	30.0	25.0	200	15.0	—
L-threonine	48.0	95.0	11.9	30.0	20.0	30.0	300	40.0	75.0
L-tryptophan	10.0	16.0	2.04	10.0	5.00	10.0	20.0	10.0	40.0
L-tyrosine	36.0	72.0	5.40	40.0	20.0	—	—	—	40.0
L-tyrosine 2Na	—	—	—	—	—	49.7	373	74.6	—
L-valine	47.0	94.0	11.7	25.0	20.0	25.0	100	70.0	65.0
Vitamins									
L-ascorbic acid	—	—	—	50.0	—	0.050	—	—	17.5
Biotin	—	—	0.0073	0.010	0.200	0.010	—	0.010	0.02
D-Ca pantothenate	1.00	4.00	0.480	0.010	0.250	0.010	1.00	0.500	1.00
Calciferol	—	—	—	—	—	0.100	—	—	—
Choline chloride	1.00	4.00	14.0	0.500	3.00	0.500	1.00	1.50	250
Folic acid	1.00	4.00	1.30	0.010	1.00	0.010	1.00	10.0	0.40
i-inositol	2.00	7.20	18.0	0.050	35.0	0.050	2.00	1.50	1.00
Nicotinamide	1.00	4.00	0.04	0.025	1.00	0.025	1.00	0.50	1.00
Pyridoxal HCl	1.00	4.00	0.062	0.025	—	0.025	—	0.50	—
Riboflavin	0.10	0.40	0.038	0.010	0.20	0.010	—	0.50	1.00
Thiamin HCl	1.00	4.00	0.34	0.010	1.00	0.010	—	1.00	10.0
Vitamin B ₁₂	—	—	1.36	—	0.005	—	—	—	0.20
Pyridoxine HCl	—	—	0.062	0.025	1.00	0.025	—	—	1.00
Cholesterol	—	—	—	0.200	—	—	—	—	—
Para-aminobenzoic acid	—	—	—	0.050	1.00	0.050	—	—	—
Nicotinic acid	—	—	—	—	—	0.025	—	—	—
Menaphthone sodium bisulphite 3H ₂ O	—	—	—	—	—	0.019	—	—	—
Di-α tocopherol PO ₄ · 2Na	—	—	—	—	—	0.01	—	—	—
Vitamin A acetate	—	—	—	—	—	0.115	—	—	—
Riboflavin PO ₄ , 2Na	—	—	—	—	—	—	0.10	—	—
Thiamin mono PO ₄ , 2H ₂ O	—	—	—	—	—	—	1.00	—	—
Inorganic salts									
CaCl ₂ (anhyd.)	200	200	—	200	—	—	—	—	—
CaCl ₂ · 2H ₂ O	—	—	44.0	—	—	186.00	186	91.0	120
Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	—	0.10	—	—	—	0.10	—	—	—
KCl	400	400	224	400	400	400	400	400	150

Tableau I.1. : Constituants des milieux de culture classiquement utilisés
(d'après Freshney, 1987)

Component	Eagle's MEM mg/l	Dulbecco's modification mg/l	Ham's F12 mg/l	CMRL 1066 mg/l	RPMI 1640 mg/l	199 mg/l	L15 mg/l	Fischer's mg/l	Waymouth's MB 752/1 mg/l
KH ₂ PO ₄	—	—	—	—	—	60.0	60.0	—	80.0
MgCl ₂ ·6H ₂ O	—	—	122	—	—	—	—	—	240
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200	200	—	200	100	200	400	121	200
NaCl	6,800	6,400	7,599	6,799	6,000	8,000	8,000	8,000	6,000
NaHCO ₃	2,200	3,700	1,176	2,200	2,200	350	—	1,125	2,240
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	140	125	—	140	—	—	—	78.0	—
Na ₂ HPO ₄ (anhyd.)	—	—	—	—	—	47.5	190	60.0	—
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	—	—	268	—	1,512	—	—	—	566
CuSO ₄ ·5H ₂ O	—	—	0.00249	—	—	—	—	—	—
FeSO ₄ ·7H ₂ O	—	—	0.834	—	—	—	—	—	—
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	—	—	0.863	—	—	—	—	—	—
CaNO ₃ ·4H ₂ O	—	—	—	—	100	—	—	—	—
Other components									
D-glucose	1,000	4,500	1,802	1,000	2,000	1,000	—	1,000	5,000
D-galactose	—	—	—	—	—	—	9,000	—	—
Lipoic acid	—	—	0.21	—	—	—	—	—	—
Phenol red	10.0	15.0	12.0	20.0	5.00	17.0	10.0	5.00	10.0
Sodium pyruvate	—	110	110	—	—	—	550	—	—
Hypoxanthine	—	—	4.10	—	—	0.30	—	—	—
Linoleic acid	—	0.084	—	—	—	—	—	—	25.0
Putrescine 2HCl	—	—	0.161	—	—	—	—	—	—
Thymidine	—	—	0.73	10.0	—	—	—	—	—
Cocarcboxylase	—	—	—	1.00	—	—	—	—	—
Coenzyme A	—	—	—	2.50	—	—	—	—	—
Deoxyadenosine	—	—	—	10.0	—	—	—	—	—
Deoxycytidine HCl	—	—	—	10.0	—	—	—	—	—
Deoxyguanosine	—	—	—	10.0	—	—	—	—	—
Diphosphopyridine nucleotide·4H ₂ O	—	—	—	7.00	—	—	—	—	—
Ethanol for solubilizing lipid components	—	—	—	16.0	—	—	—	—	—
Flavine adenine dinucleotide	—	—	—	1.00	—	—	—	—	—
Glutathione (reduced)	—	—	—	10.0	1.00	0.05	—	—	15.0
5-methyl-deoxycytidine	—	—	—	0.10	—	—	—	—	—
Sodium acetate·3H ₂ O	—	—	—	83.0	—	—	—	—	—
Sodium glucuronate ·H ₂ O	—	—	—	4.20	—	—	—	—	—
Triphosphopyridine nucleotide	—	—	—	1.00	—	—	—	—	—
Tween 80	—	—	—	5.00	—	5.00	—	—	—
Uridine triphosphate ·4H ₂ O	—	—	—	1.00	—	—	—	—	—
Adenine SO ₄	—	—	—	—	—	10.0	—	—	—
5'AMP	—	—	—	—	—	0.20	—	—	—
ATP·2Na	—	—	—	—	—	10.0	—	—	—
Cholesterol	—	—	—	—	—	0.20	—	—	—
2-Deoxyribose	—	—	—	—	—	0.50	—	—	—
Guanine HCl	—	—	—	—	—	0.30	—	—	—
D-ribose	—	—	—	—	—	0.50	—	—	—
Na acetate	—	—	—	—	—	36.7	—	—	—
Thymine	—	—	—	—	—	0.30	—	—	—
Uracil	—	—	—	—	—	0.30	—	—	—
Xanthine	—	—	—	—	—	0.30	—	—	—
CO ₂ (gas phase)	5%	10%	5% (pH 7.0) 2% (pH 7.4)	5%	5%	Ambient	Ambient	5% (pH 7.0) 2% (pH 7.4)	5%

acides cétoniques, l'acide α -cétoglutarique ou le pyruvate sont des éléments constitutifs des milieux synthétiques enrichis. Ces intermédiaires métaboliques peuvent être également synthétisés par certains types cellulaires à partir de l'apport exogène en glutamine. C'est le cas pour les fibroblastes humains MRC-5.

Le troisième type d'éléments essentiels concerne les acides aminés dont Eagle (1955) a montré qu'en plus de la glutamine, douze étaient indispensables : les huit acides aminés essentiels (His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Trp, Val), plus deux autres : la tyrosine et l'arginine dont la biosynthèse ne s'effectue pas in vitro. En outre, les exigences en acides aminés varient avec chaque type cellulaire et selon qu'on souhaite maintenir les cellules en vie ou en phase de prolifération active. De plus, il ne faut pas perdre de vue que les acides aminés interviennent dans la synthèse des protéines structurales et dans la régulation des systèmes enzymatiques, dans la régulation des synthèses d'ARN et d'ADN, et donc dans le maintien du cycle cellulaire.

Les besoins en vitamines sont également variables selon les types cellulaires. Eagle (1955) en cite huit indispensables aux cellules : choline, acide folique, pyridoxal, riboflavine, thiamine, inositol, acide nicotinique et acide pantothénique. La vitamine C est contenue dans certains milieux et y joue un rôle dans le maintien du potentiel d'oxydoréduction.

Enfin, signalons la présence éventuelle de produits divers comme par exemple les hormones ou les lipides apportés généralement par le sérum, les antioxydants tels que le glutathion ou l'acide lipoïque.

Mises en culture en présence d'un milieu synthétique tel que décrit ci-dessus, la plupart des cellules ne sont aptes qu'à la survie. Le déclenchement de la division cellulaire n'est possible qu'en présence d'un certain nombre de facteurs mitogènes, le plus souvent fournis par le sérum. Le pourcentage de sérum requis, varie d'un type cellulaire à l'autre allant de 2 à 20 %. On peut utiliser des sérums d'origine humaine ou animale (généralement bovine ou équine), d'individus plus ou moins jeunes, sachant que l'effet cyostimulant global du sérum est inversement proportionnel à l'âge du donneur. Le plus fréquemment utilisé reste néanmoins le sérum de veau foetal (Froger et Adolphe, 1988).

Factor	Concentration
Specific growth factors: EGF, PDGF, IGF, FGF, IL-1, IL-6, insulin	1–100 ng/ml
Trace elements	
Iron	1–10 μ M
Zinc	0.1–1 μ M
Selenium	0.01 μ M
(also Co, Cu, I, Mn, Mo, Cr, Ni, V, As, Si, F, Sn)	
Lipids	
Cholesterol	c. 10 μ M
Linoleic acid	0.01–0.1 μ M
Steroids	
Polyamines	
Putrescine	0.01–1 μ M
Ornithine	0.01–1 μ M
Spermidine	0.01–1 μ M
Attachment factors	
Fibronectin	1–10 μ g/ml
Laminin	–
Fetuin	–
Mechanical protection	
Albumin	–
Buffering capacity	
Albumin	–
Neutralization of toxic factors	
Albumin	–
Transport of metals	
Transferrin/ Fe^{3+}	2–4 mg/ml
Ceruloplasmin/ Cu^{2+}	–
Protease inhibitors	
α_1 antitrypsin	1.5–2.5 mg/ml
α_2 macroglobulin	0.7–2.0 mg/ml

Tableau I.2. : Facteurs nutritionnels et protecteurs pouvant être fournis par le sérum (d'après Cartwright et Shah, 1994)

Le sérum est un mélange de composition extrêmement complexe (tableau I.2.) qui contient, entre autres, un grand nombre de substances libérées par différents types cellulaires de l'organisme donneur : l'albumine est produite par les hépatocytes, les immunoglobulines par les lymphocytes B, On a aussi pu isoler des molécules sériques intervenant sur l'adhérence et l'étalement de cellules à leur support, la morphologie cellulaire, la capacité proliférative, l'efficacité de clonage et la différenciation. Parmi ces molécules, se trouvent des ions à l'état de trace, des vitamines, des hormones, des facteurs de croissance, de la fibronectine, de la laminine, des électrolytes, des substances azotées non protéiniques, des lipides, des hydrates de carbone, des protéines de liaisons, des enzymes, des substances inhibitrices (α_2 -macroglobuline) et d'autres composés non définis. En tout, le sérum peut contenir plus de 1000 composés différents qui ont un effet synergique cytoestimulant sur la croissance globale des cellules en culture.

Malgré son coût, le sérum de foetus bovin reste le plus fréquemment utilisé, principalement à cause des nombreux facteurs de croissance qu'il contient et de sa faible concentration en gamma-globulines. En effet, la présence excessive d'anticorps peut éventuellement perturber le fonctionnement cellulaire et le processus de bioproduction. Les anticorps présents dans le sérum peuvent résulter soit d'une infection naturelle, soit d'une vaccination de l'animal donneur.

La quantité de gamma-globulines présente dans le sérum du veau nouveau-né est assez élevée, suite à l'ingestion de colostrum immédiatement après la naissance. Ce sérum n'est donc pas couramment utilisé. Le sérum de cheval convient pour certaines lignées cellulaires humaines. Quant au sérum humain, son efficacité ne semble pas meilleure que le sérum foetal bovin et son coût est très élevé (Cartwright et Shah, 1994).

1.1.2. Inconvénients liés au sérum

Toutefois, la présence de sérum peut être un facteur limitant. En effet :

- les sérums d'animaux peuvent être contaminés par des virus, des bactéries ou des mycoplasmes, qui ne sont pas toujours faciles à détecter et qui perturbent le métabolisme des cellules en culture (tableau I.3.); plus récemment, s'est posé le risque de contamination

Acholeplasma laidlawii
Mycoplasma arginini
Mycoplasma hyorhinis
Agent de la rhinotrachéite bovine infectieuse
Virus de la diarrhée des bovins
Parainfluenza virus 3
Entérovirus bovin
Virus bovin syncitial
Bactériophages
Bactéries (nombreuses espèces)
Levures
Champignons

Tableau I.3. : Microorganismes les plus susceptibles de contaminer le sérum bovin
(d'après Cartwright et Shah, 1994)

- par les prions;
- les sérums n'ont pas tous la même qualité, car les concentrations en hormones et facteurs de croissance, sont variables selon les lots à l'intérieur d'une même race de donneurs, ce qui fait varier le pouvoir pro-prolifératif du sérum;
 - le sérum semble parfois jouer un rôle dans la dédifférenciation cellulaire, lors de la culture à long terme;
 - au vu de la variété des composés du sérum et parfois même de leur rôle inconnu, les réponses physiologiques des cellules sont moins bien contrôlées et plus difficiles à interpréter, surtout si l'on s'intéresse aux effets d'une molécule exogène que l'on ajoute au milieu. En effet, on ne peut exclure des interférences (positives ou négatives) par le sérum (Jayme et Gruber, 1994);
 - sa présence dans les cultures complique les étapes de purification des protéines recombinantes, principalement à cause de l'abondance de l'albumine sérique. A une concentration de 10 %, le sérum apporte environ 4 à 8 mg de protéines par ml au milieu alors que les protéines recombinantes sont présentes dans le surnageant de culture à une concentration d'une dizaine de μg par ml. Ce problème s'est également posé dans le cas d'anticorps monoclonaux sécrétés par les hybridomes, à cause de la présence, en grande quantité, de gamma-globulines dérivées du sérum (Cartwright et Shah, 1994);
 - c'est un produit coûteux, surtout depuis les épidémies d'encéphalite spongiforme bovine, qui ont limité les sources d'approvisionnement fiables.

Ces diverses raisons justifient la mise au point d'alternatives pour remplacer le sérum. En effet, les cellules à potentiel prolifératif limité, telles que les fibroblastes de poumon humain MRC-5 (medical research college) sont utilisées depuis plusieurs années par la firme SmithKline Beecham (Rixensart), afin de permettre la production virale, destinée à la confection de vaccins tels que celui de la polio, de la varicelle ou de l'hépatite A. Après avoir infecté les MRC-5 avec des virus particuliers, les cultures cellulaires sont réalisées en présence de sérum afin d'obtenir une biomasse suffisante et de garantir une production virale optimale. Ces particules virales sont ensuite purifiées et traitées pour obtenir finalement des doses vaccinales, injectables chez l'homme. Or la Communauté Européenne veut, d'ici l'an 2000, interdire tous les produits d'origine animale dans l'élaboration de produits directement injectable chez l'homme. Il reste dès lors deux problèmes majeurs, puisque l'utilisation de sérum semble indispensable en phase de croissance pour le maintien de la culture et pour

*Hormones et facteurs de croissance**

Insuline	0,1 – 10 µg/ml
Hydrocortisone	3 – 30 ng/ml
Progestérone	3 – 30 ng/ml
Œstradiol	3 – 370 ng/ml
Hormone de croissance	50 – 500 ng/ml
Somatomédine	1 – 50 ng/ml
Hormone parathyroïde	1 ng/ml
EGF	1 – 100 ng/ml
FGF	1 – 100 ng/ml
NGF	1 – 10 ng/ml
PDGF	1 – 10 ng/ml
<i>Protéines de transport</i>	
Transferrine	0,5 – 100 µg/ml
Albumine sérique bovine	1 mg/ml
<i>Facteurs d'attachement</i>	
Fibronectine	2 – 10 µg/ml
Poly-L-lysine	0,1 mg/ml
<i>Facteurs nutritifs divers de bas PM</i>	
Sélénium	5 ng/ml
Putrescine	10 ng/ml
Acide ascorbique	10 µg/ml

Tableau I.4. : Principaux additifs contenus dans les milieux définis
(d'après Froger et Adolphe, 1988)

inhiber la trypsine lors des repiquages successifs, ainsi qu'en phase de production après l'infection des cultures. Il existe évidemment d'autres inhibiteurs de protéases pour la trypsine qui pourraient remplacer la fonction inhibitrice du sérum : c'est le cas du SBTI (soybean trypsin inhibitor) déjà été utilisé à cet effet (Davis, 1994 et Freshney, 1987). Mais la trypsine classiquement utilisée en culture de cellules est elle-même d'origine animale; on l'extrait effectivement à partir de pancréas bovins ou porcins.

En bref, l'utilisation du sérum n'est plus recommandée. D'abord, son prix peut représenter jusqu'à 10 % du prix du produit final. D'autre part, il existe des variabilités entre les lots; cette variabilité est bien souvent une cause de non reproductibilité des expériences réalisées. Enfin, la qualité du sérum peut être altérée par la présence d'agents pathogènes. Ce dernier problème est d'autant plus brûlant dans le contexte actuel, étant donné les incertitudes sur les mécanismes moléculaires de transmission et d'infection de l'encéphalite spongiforme bovine en particulier. On constate donc que l'approvisionnement en sérum "fiable" devient de plus en plus critique. La tendance est par conséquent de préconiser l'élimination du sérum et son remplacement par des milieux de culture définis, dans les bioréacteurs destinés à l'élaboration de vaccins ou de glycoprotéines recombinantes à usage thérapeutique pour l'homme (Davis, 1994).

1.2. Milieux synthétiques sans sérum ou milieux définis

Plusieurs firmes spécialisées dans la manufacture des milieux pour culture de cellules, ont commencé à proposer des milieux enrichis qui permettent de diminuer, voire d'éliminer totalement le sérum.

Le tableau I.4. ci-joint regroupe les principaux facteurs additionnés au milieu synthétique de base, soit des hormones, des facteurs de croissance, des protéines de transport, des facteurs d'attachement et des facteurs divers comme des polyamines, des minéraux,... Ces différents additifs permettent d'assurer, du moins en partie, les fonctions essentielles du sérum, de promouvoir la prolifération cellulaire mais aussi de limiter l'apoptose qui pourrait affecter une fraction des cellules cultivées en bioréacteurs. En effet, les cellules sont en permanence sujettes à des stress tels que les variations de pH, les forces de cisaillement, la

Cell line	Source	Basal medium	Supplements	Substratum modification	Reference
GH3	rat pituitary carcinoma	F12	INS, TRF, T3, TRH, SOM, FGF	none	8
HeLa	human cervical carcinoma	F12	INS, TRF, FGF, EGF, HC, TEL	none	9
PCC.4az a-1	mouse embryonal carcinoma	F12	INS, TRF, 2-ME, FET	none	10
M2R	mouse melanoma	DMEM/F12	INS, TRF, TES, FSH, NGF, LRH	none	11
TM4	mouse testes	DMEM/F12	INS, TRF, FSH, SOM, GH, RA	none	12
RF-1	rat ovarian follicle	DMEM/F12	INS, TRF, HC	fibronectin	13
M1	mouse myeloid leukaemia	F12	INS, TRF, TEL	none	14
B104	rat neuroblastoma	DMEM/F12	INS, TRF, PRG, PUT, SEL	fibronectin, polylysine	15
C62 BD	rat glioma	DMEM/F12	INS, TRF, T3, HC, PGE, SEL	none	16
MCF-7	human mammary carcinoma	DMEM/F12	INS, TRF, EGF, PGF	fibronectin	17
BHK-21	hamster kidney	DMEM/F12	INS, TRF, EGF, FGF, BSA	fibronectin	18
3T6	mouse embryo fibroblasts	DMEM/Waymouth	INS, FeSO ₄ , EGF	none	19
116NS-19	mouse hybridoma	MEM or RPMI 1640	INS, TRF	none	20
HL60	human promyelocytic leukaemia	DMEM/F12	INS, TRF, SEL	none	21
MPC-11	mouse plasmacytoma	DMEM/F12	TRF, LH, SEL, LRH, PGE, EGF, T3, GLU, NGF, PGF	none	22
Flow 2000	human embryo fibroblasts	MCDB 108	INS, EGF, DEX	polylysine	23
WI 38	human embryo fibroblasts	MCDB 104	INS, TRF, EGF, DEX, PDG	none	24
K562	human erythroleukaemia	RPMI 1640	TRF, SEL, BSA	none	25
U-251	human glioma	DMEM	TRF, FGF, HC, SEL, BIO	fibronectin	26
MGNCl-H69	human small cell lung carcinoma	RPMI 1640	INS, TRF, SEL, HC, OES	none	27
LA-N-1	human neuroblastoma	DMEM/F12	INS, TRF, PRG, PUT, SEL	polylysine	28
MDCK	dog renal epithelium	DMEM/F12	INS, TRF, T3, HC, PGE, SEL	none	29

Abbreviations: BIO, biotin; BSA, bovine serum albumin; DEX, dexamethasone; EGF, epidermal growth factor; FET, fetuin; FGF, fibroblast growth factor; FSH, follicle-stimulating hormone; GH, growth hormone; GLU, glucagon; HC, hydrocortisone; HDL, high density lipoprotein; INS, insulin; LDL, low density lipoprotein; LH, luteinizing hormone; LRH, luteinizing hormone releasing hormone; NGF, nerve growth factor; OES, oestradiol; PDG, platelet-derived growth factor; PGE, prostaglandin E₁; PGF, prostaglandin F_{2a}; PRG, progesterone; PTH, parathyroid hormone; PUT, putrescine; RA, retinoic acid; SEL, selenium; SOM, somatomedin C; T3, triiodothyronine; TEL, trace elements; TES, testosterone; TRF, transferrin; TRH, thyrotropin releasing hormone; 2-ME, 2-mercaptoethanol.

Tableau I.5. : Formulations de milieux définis pour certains types cellulaires (d'après Cartwright et Shah, 1994)

Serum-free medium supplier	Cell types				
	Hybridomas	CHO	Insect cells	Lymphoid cells	General purpose
Bio-Whittaker	Ultradoma (30) Ultradoma PF (0)	Ultra-CHO (<300)	Insect Xpress (0)	Ex-Vivo range (1000-2000)	UltraCulture (3000)
Boehringer Mannheim	Nutridoma range (40-1000)	-	-	-	-
Gibco	Hybridoma SFM (730) Hybridoma PHFM (0)	CHO-SFM (400)	SF900	AIM V	-
Hyclone Laboratories	CCM-1 (210)	CCM5 (<400)	CCM3 (0)	-	-
ICN Flow	Biorich 2	-	-	Biorich 2	-
JRH Biosciences (Sera-Lab)	Ex-cell 300 (11) Ex-cell 309 (10)	Ex-cell 301 (100)	Ex-cell 401 (0)	Aprotain-1 (0)	-
Sigma	QBSF 52 (45) QBSF 55 (65)	-	SF insect medium (0)	-	QBSF 56 (430)
TCS Biologicals Ltd	SoftCell-doma LP (30) SoftCell-doma NP (0)	SoftCell-CHO (300)	SoftCell-insecta (0)	-	SoftCell-Universal (3000)
Ventrex	HL-1 (<50)	-	-	-	-

Protein content in µg/ml is indicated in brackets where known.

Tableau I.6. : Liste de milieux sans sérum couramment disponibles dans le commerce (d'après Cartwright et Shah, 1994)

variation dans le milieu en éléments nutritifs, l'accumulation de déchets et les difficultés dans l'apport en oxygène. L'utilisation de facteurs de croissance dans le milieu de culture, permet dans ces conditions de stress, d'améliorer la survie cellulaire (Collins et al., 1994 et Cotter et Al-Rubeai, 1995).

Un des rôles importants des milieux définis est de favoriser le maintien des fonctions différenciées. La mise au point de tels milieux permet donc non seulement des conditions expérimentales rigoureuses, mais apporte aussi une meilleure connaissance des besoins hormonaux et nutritionnels nécessaires à la division et à la différenciation (Froger et Adolphe, 1988).

Deux approches ont été développées. Soit on part des milieux classiques (cfr. tableau I.1.), auxquels on ajoute une série de facteurs supplémentaires, supposés reproduire les effets du sérum (tableau I.5.), tels que l'insuline, la transferrine ou des oligo-éléments (principalement le sélénium). Soit les firmes commercialisent des milieux dont la composition exacte n'est pas connue (tableau I.6.). Quelle que soit l'approche, ces milieux définis s'appliquent principalement à des lignées de cellules immortelles, capables de se diviser indéfiniment, telles que les hybridomes ou les cellules CHO. Mais comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, les cellules étudiées dans ce travail sont mortelles, à potentiel prolifératif limité (Davis, 1994).

2. Les fibroblastes de poumon humain MRC-5

Les cellules sur lesquelles nous allons nous focaliser tout au long de ce mémoire sont les fibroblastes de poumon foetal MRC-5, caractérisés par Jacobs (1966). Il s'agit d'une lignée comparable aux fibroblastes WI-38, caractérisés par Hayflick et Moorhead (1961). Pour rappel, ce sont les fibroblastes de poumon humain qui ont fait l'objet d'études sur le vieillissement, il y a quelques années.

Comme les fibroblastes WI-38, les cellules MRC-5 sont des fibroblastes, non transformés, cultivés en adhérence et qui forment des monocouches cellulaires, jusqu'à confluence. Les cellules sont alors repiquées, c'est-à-dire, classiquement détachées

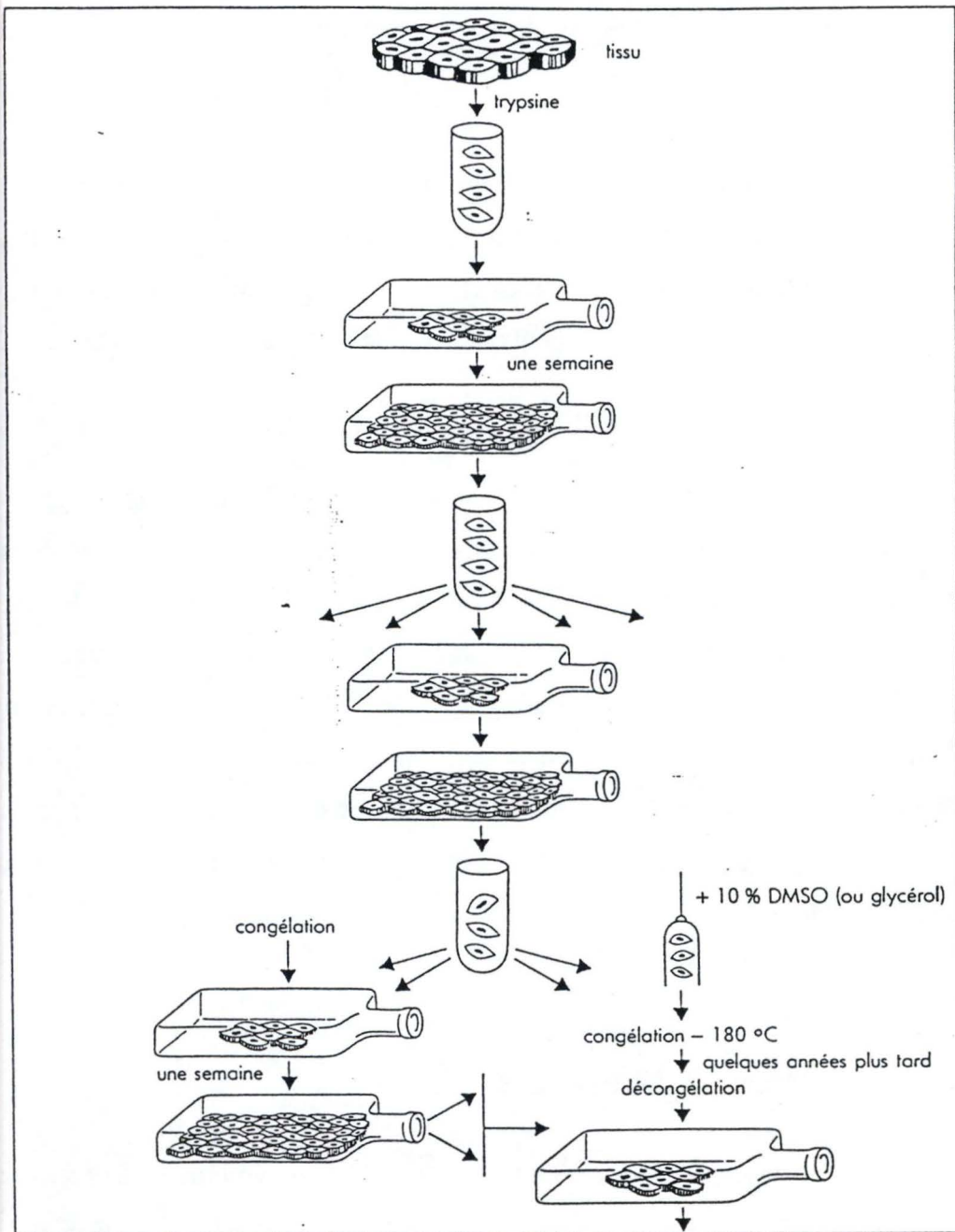


Figure I.1. : Représentation schématique du repiquage cellulaire
 (d'après Remacle et al., 1982)

enzymatiquement par la trypsine et la suspension cellulaire ainsi obtenue répartie entre deux (repiquage 1:2) ou quatre (repiquage 1:4) nouveaux flacons de culture (figure I.1.). Les cellules s'attachent, prolifèrent et reforment une monocouche de cellules confluentes. On peut ainsi repiquer les cellules un certain nombre de fois, puis la croissance cellulaire ralentit, pour devenir négligeable. Les cellules survivent un certain temps dans un état non-prolifératif, mais finissent par mourir (figure I.2.) (Freshney, 1987).

En présence d'un sérum de bonne qualité, on peut réaliser jusqu'à 60 doublements de la population cellulaire. Empiriquement, on sait que ces lignées à vie limitée sont plus exigeantes en ce qui concerne le milieu de culture, que les lignées immortelles telles que les fibroblastes CHO (chinese hamster ovary) ou les hybridomes. Comparativement aux fibroblastes WI-38, les cellules MRC-5 sont reconnues pour se diviser plus rapidement et semblent moins sensibles aux facteurs environnementaux. Comme les WI-38, elles sont susceptibles d'être infectées par un grand nombre de virus (tableau I.7.). Elles conviennent donc bien à la production de particules virales, destinées à la production de vaccins (Hayflick et Moorhead, 1961).

Etant donné que pour obtenir une biomasse suffisante, il faut alternativement laisser croître les cellules en adhérence pour qu'elles prolifèrent et les détacher, nous allons rapidement passer en revue les aspects essentiels liés à ces deux processus.

2.1. L'importance de l'adhérence cellulaire

La nature du support sur lequel on cultive les cellules est très importante puisqu'il a été prouvé que la biosynthèse des cellules est fortement dépendante des propriétés de surface du support sur lequel les cellules adhèrent (Tamada et Ikada, 1994). Au début, le verre était très employé; actuellement, les matières plastiques spécialement traitées ont pris le dessus. Le polystyrène est le matériau le plus fréquemment utilisé, après avoir subi des traitements physiques pour améliorer ses qualités. Il est en effet généralement admis que lorsque l'on traite un matériau tel le polystyrène pour augmenter son caractère hydrophile, on observe une nette amélioration de la prolifération cellulaire sur ce matériau. La clarté optique du polystyrène est également excellente, ce qui lui offre un atout majeur. Il ne résiste pas par

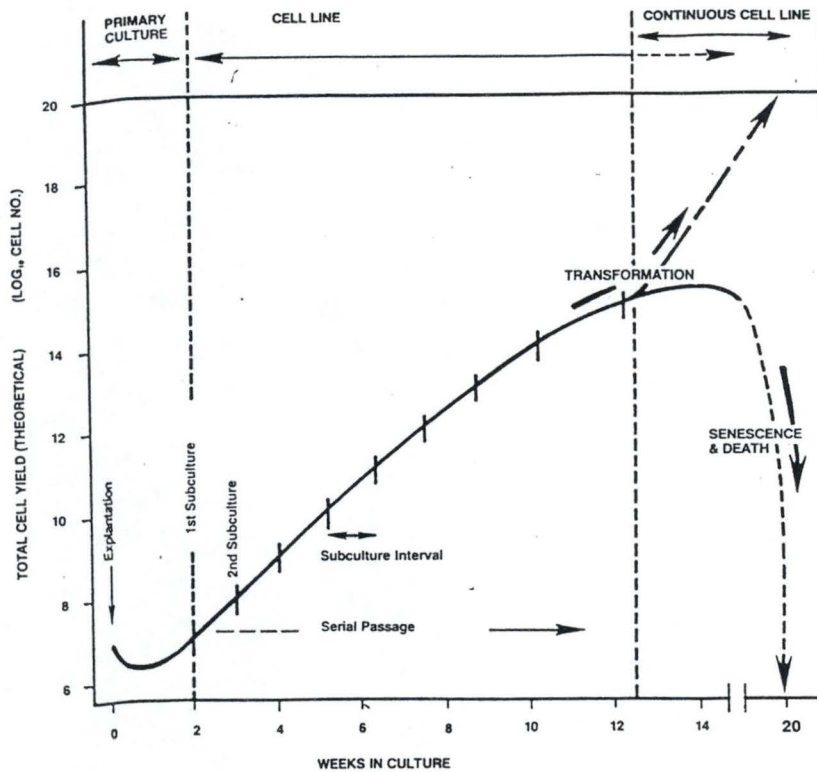


Figure I.2. : Evolution d'une lignée cellulaire
(d'après Freshney, 1987)

Cell strain	Virus	Cytopathogenic effect
	Measles	+
	COE	-
	Adenovirus Type 2	+
	Adenovirus Type 12	+
	Coxsackie A 9 ^a	+
	Coxsackie A 13	+
	ECHO 9	+
	Reovirus Type 1 ^a	+
	Poliovirus Koprowski-Chat Type 1 (attenuated)	+
	Poliovirus Strain TN Type 2 (attenuated)	+
WI-1 (Passages 20-35)	Poliovirus Koprowski-Fox Type 3 (attenuated)	+
	Poliovirus Type 1 (Mahoney)	+
	ECHO 21	+
	Varicella ^b	+
	Rabies Strain CVS	+ (see text)
	Mengo	+
	Endomyocarditis virus (EMC)	+
	Herpes simplex	+
	Vaccinia	+
	Yellow Fever, Strain 17D	+
	Influenza Type A, Strain jap	+
	Influenza Type B, Strain lee	+
	Influenza Type C, Strain colindale	-
	Coxsackie B 1	-
	Coxsackie A 1	-
	Western Equine Encephalitis	-
	Polyoma	-
	ECHO 11 ^a	+
	ECHO 20 ^a	+
	ECHO 22 ^a	+
	ECHO 28 ^a	+
	Respiratory Syncytial (Strain Long) ^a	+
	HE virus (Pett. strain) ^a	+
WI-10 (Passages 17-25)	Salisbury strain H.G.P. ^a	+
	Salisbury strain F.E.B. ^a	+
	Parainfluenza 1 ^{a, c}	-
	Parainfluenza 2 ^{a, c}	-
	Parainfluenza 3 ^{a, c}	+

Tableau I.7. : Virus susceptibles d'infecter des souches de cellules diploïdes humaines
(d'après Hayflick et Moorhead, 1961)

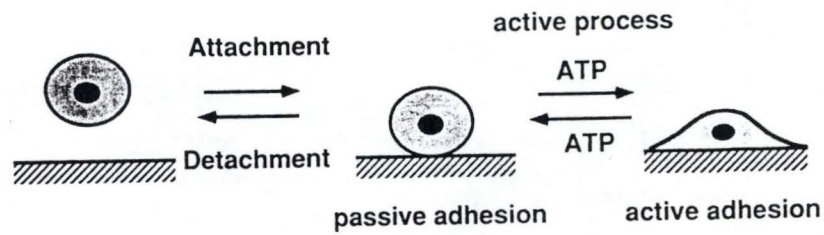


Figure I.3. : Mécanisme d'adhésion cellulaire
(d'après Okano et al., 1994)

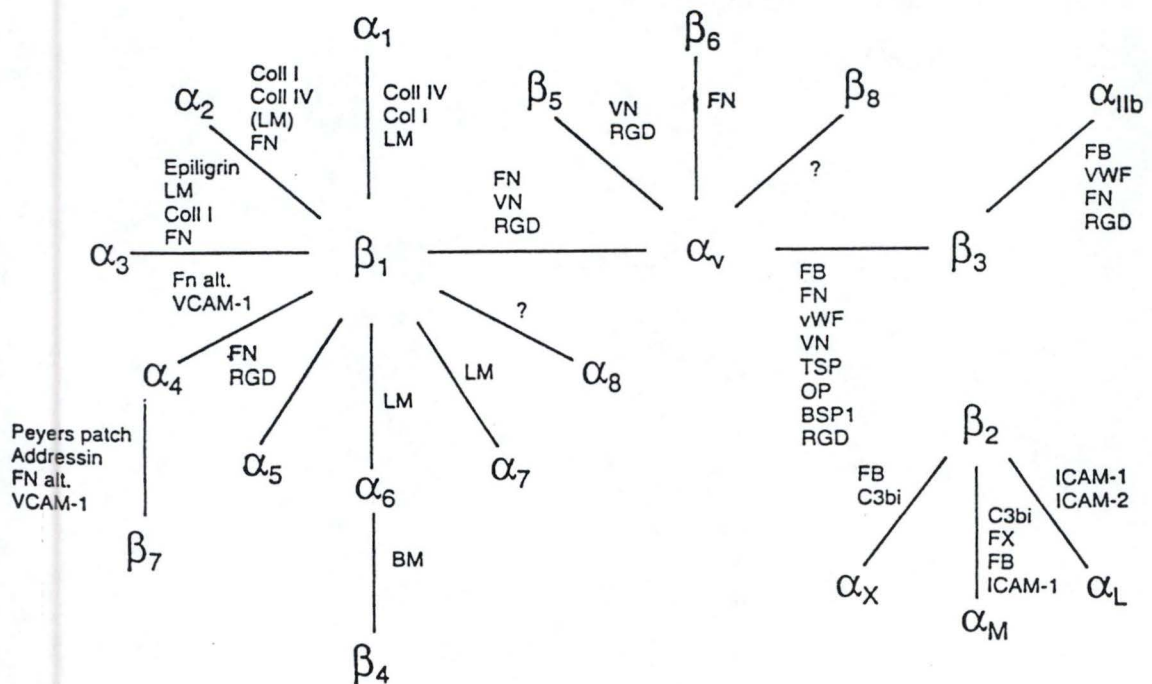


Figure I.4. : Représentation schématique des associations entre les sous-unités α et β identifiées dans les intégrines, avec leurs ligands et l'intervention éventuelle du motif RGD dans l'interaction intégrine-ligand. Les ligands faisant partie de la MEC sont : FN pour fibronectine; Coll pour collagène; LM pour laminine; TSP pour thrombospondine
(d'après Ruoslahti et al., 1994)

contre aux solvants organiques. La surface des récipients en matière plastique peut en outre être recouverte par du collagène, de la fibronectine, de la gélatine ou des produits synthétiques reproduisant les effets de ces protéines de la matrice extracellulaire (Adolphe, 1988 et Mc Ateer, 1994).

L'adhésion cellulaire sur une surface peut être arbitrairement classée en un processus mécanique de deux étapes : la première est contrôlée par la combinaison complexe d'interactions physico-chimiques comprenant les forces électrostatiques de Coulomb et les forces de Van der Waals entre la membrane cellulaire et le biomatériau. Cette étape se caractérise par une adhésion passive et non spécifique; la seconde étape par contre est considérée comme adhésion active à cause des processus métaboliques cellulaires qu'elle fait intervenir (figure I.3.) (Okano et al., 1994).

De récentes études ont établi que les cellules de mammifères interagissent avec les protéines de la matrice extracellulaire via des récepteurs à la surface de la cellule. Parmi ces récepteurs, les mieux connus appartiennent à la famille des intégrines. Celles-ci sont des hétérodimères composés d'une chaîne α et une autre β , qui interagissent avec les molécules de la MEC (matrice extracellulaire) par l'intermédiaire de petites séquences d'acides aminés. La séquence la plus commune est le peptide ubiquiste Arg-Gly-Asp (RGD) que l'on peut retrouver dans de nombreuses protéines de la MEC (figures I.4. et I.5.) (Rezania et al., 1996). Comme nous l'avons déjà indiqué, il est possible de déposer par simple adsorption du collagène, de la fibronectine, du fibrinogène ou même des motifs linéaires RGD sur des matériaux polymériques (Ito et al., 1992). En outre, des travaux menés actuellement dans le laboratoire, ont abouti à synthétiser et caractériser un peptide RGD cyclique actif, qui peut être facilement greffé chimiquement via un bras d'ancrage sur le polystyrène (figure I.6.) (Delforge et al., 1996).

En ce qui concerne les fibroblastes de type MRC-5 ou WI-38, ces cellules adhèrent au substrat en polystyrène principalement par voie passive et intégrine non-dépendante. Par contre, pour des types cellulaires plus différenciés, le traitement préalable du polystyrène avec des composants de la MEC (fibronectine, collagène, gélatine, laminine,...) peut s'avérer indispensable pour permettre l'adhérence et la prolifération cellulaire, mais aussi pour maintenir plus longtemps en culture l'état de différenciation. On appelle ces facteurs,

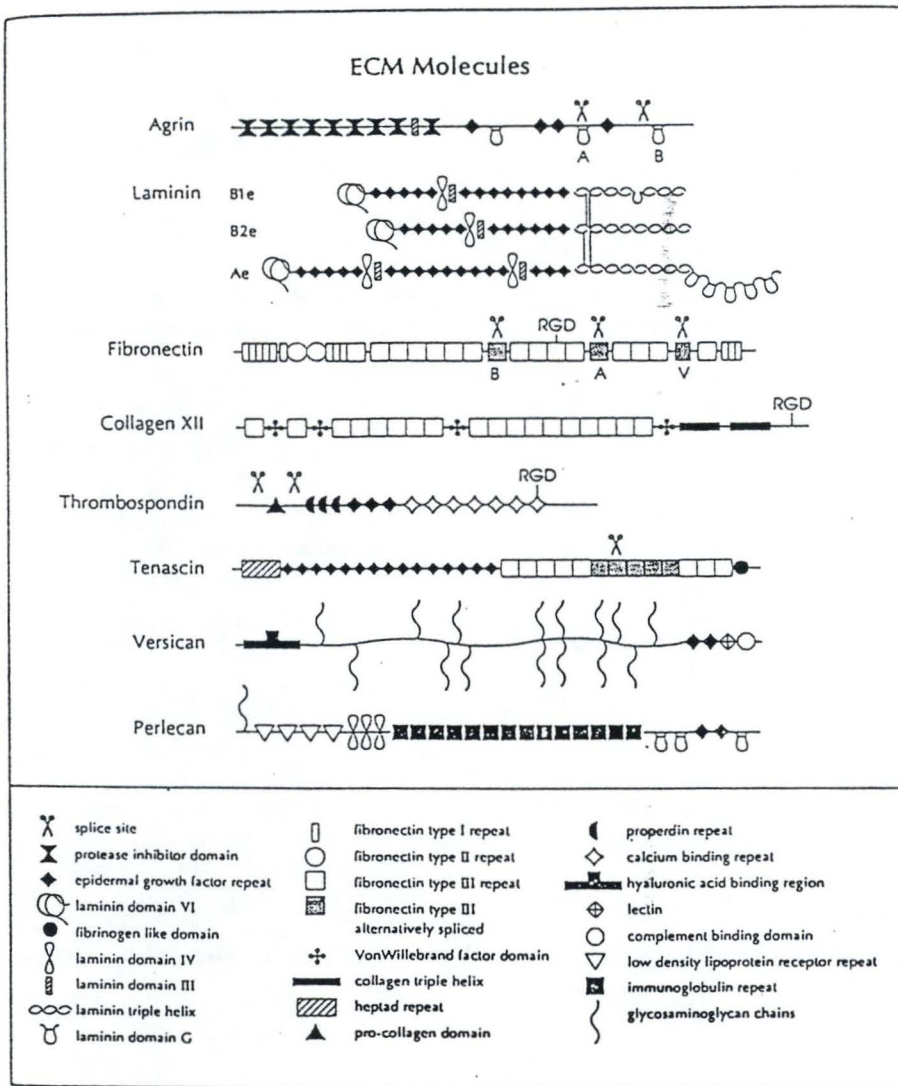
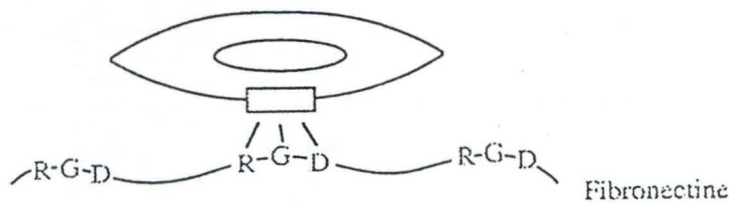


Figure I.5. : Protéines de la MEC possédant la séquence RGD et capables d'interagir avec les intégrines cellulaires (d'après Venstrom et Reichardt, 1993)

Cellule adhérente sur de la fibronectine sans peptide en solution



Peptide greffé sur un support

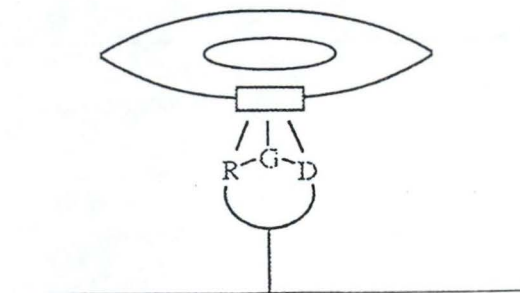


Figure I.6. : Greffage des peptides RGD immobilisés sur un support, en vue de reproduire les effets pro-adhésifs de la fibronectine

1. Shake-off	Mitotic or other loosely adherent cells
2. Trypsin* in PBS (0.01–0.5% as required, usually 0.25%, 5–15 min)	Most continuous cell lines
3. Prewash with PBS or CMF, then 0.25% trypsin* in PBS or saline-citrate	Some strongly adherent continuous cell lines and many cell lines at early passage stages
4. Prewash with mM EDTA in PBS or CMF then 0.25% trypsin* in citrate	Some strongly adherent early passage cell lines
5. Prewash with 1 mM EDTA, then EDTA 2nd rinse, and leave on, 1 ml/5 cm	Epithelial cells, although some may be sensitive to EDTA
6. EDTA prewash, then 0.25% trypsin* with 1 mM EDTA	Strongly adherent cells, particularly epithelial and some tumor cells (note: EDTA can be toxic to some cells)
7. 1 mM EDTA prewash, then 0.25% trypsin* and collagenase*, 200 units/ml PBS or saline-citrate or EDTA/PBS	Thick cultures, multilayers, particularly collagen-producing dense cultures
8. Scraping	All cultures, but may cause mechanical damage and usually will not give a single cell suspension
9. Add dispase (0.1–1.0 mg/ml) or pronase (0.1–1.0 mg/ml) to medium and incubate till cells detach	Will dislodge most cells, but requires centrifugation step to remove enzyme not inactivated by serum. May be harmful to some cells

Tableau I.8. : Gradation dans les processus de détachement cellulaire selon le type de cellules (d'après Freshney, 1987)

Composants	Concentration
Trypsine	2,5 g/l
KCl	0,4 g/l
NaHCO ₃	2,2 g/l
Glucose	1,0 g/l
NaCl	6,8 g/l
Rouge de phénol	0,0005 g/l

Tableau I.9. : Composition du tampon de trypsine 1:250, classiquement utilisé en culture de cellules

facteurs d'attachement dans le sens où ils promeuvent l'adhérence cellulaire sur les substrats conventionnels que sont le polystyrène ou le verre (Davis, 1994).

2.2. Le détachement cellulaire : la trypsine et ses inhibiteurs

Lorsque les fibroblastes ont atteint la confluence, c'est-à-dire que l'inhibition de contact les empêche de proliférer d'avantage, on peut procéder à un repiquage ou passage. Les cellules adhèrent au substrat principalement via les glycoprotéines et les collagènes qu'elles synthétisent et sécrètent elles-mêmes. De plus, certains types cellulaires, en particulier, les cellules épithéliales, requièrent des ions bivalents (Ca^{++} , Mg^{++} , ...) pour assurer le maintien de monocouches adhérentes. Pour détacher les cellules confluentes et les dissocier en suspension, on aura donc recours à des protéases, en association éventuellement avec des chélateurs, principalement l'EDTA. La protéase la plus fréquemment utilisée est la trypsine, mais il arrive qu'on recourt à la pronase pour des cellules plus "récalcitrantes". Comme le montre le tableau I.8., on voit que le protocole de détachement cellulaire varie en fonction du type cellulaire.

En ce qui concerne les fibroblastes humains tels que les cellules MRC-5, un traitement à la trypsine suffit. Il s'agit de trypsine 0,25 % (ou 1:250) dans le tampon décrit au tableau I.9.. La trypsine 1:250 a une activité telle que 1 g de trypsine digère 250 g de caséine dans des conditions standardisées. Elle comporte également des activités correspondant à de la chymotrypsine et de l'élastase. Si l'on utilise des préparations pures de trypsine, on constate que l'efficacité pour détacher les cellules diminue.

Rappelons également que la trypsine est une sérine protéase, avec un poids moléculaire de 23.500 Da. et un pH optimal se situant à 8,0; elle ne requiert ni la présence d'ions spécifiques, ni de cofacteurs. La trypsine catalyse la réaction de clivage de la liaison a.a.1-a.a.2 du côté carboxylique, où a.a.2 est un résidu indifférent et a.a.1 un résidu basique : Lys ou Arg. Les liens amides et esters de ces mêmes amino-acides sont également clivés. La trypsine est très proche de la chymotrypsine et de l'élastase, bien que ces deux enzymes préfèrent respectivement les noyaux aromatiques et les chaînes latérales non polaires (figure I.7.). Les trois enzymes présentent une poche hydrophobe dont la configuration explique la

Protein-cleaving enzymes

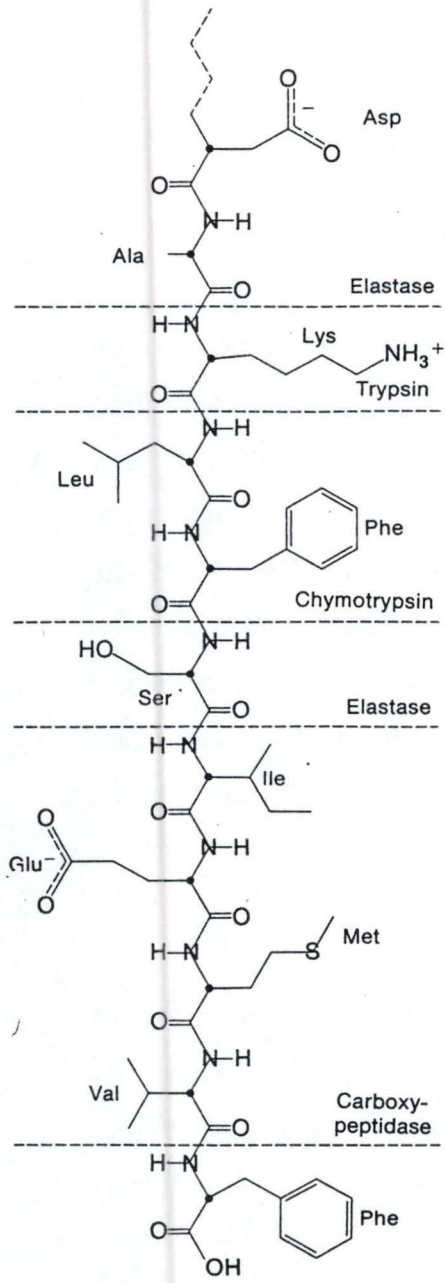


Figure I.7. : Substrats clivés par la trypsine, l'élastase et la chymotrypsine (d'après Zubay, 1983)

Specificity pockets of trypsin, chymotrypsin, and elastase

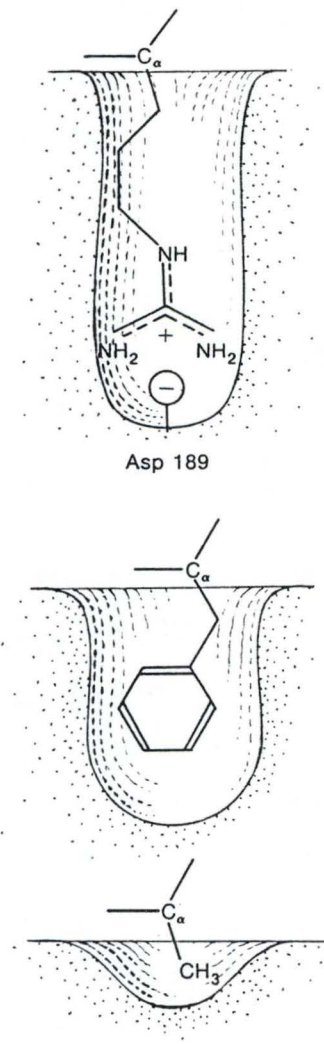


Figure I.8. : La forme des poches hydrophobes détermine la spécificité de la trypsine, de l'élastase et de la chymotrypsine (d'après Zubay, 1983)

spécificité vis-à-vis du substrat (figure I.8.). A la base du site de fixation de la trypsine, on trouve un résidu aspartate, qui lui permet de fixer les chaînes latérales à charge positive (Lys et Arg) des substrats (Rawn, 1990 et Zubay, 1983).

Lorsque les cellules se retrouvent en suspension, suite à l'action de la trypsine, l'enzyme est classiquement inhibée par l' α_2 -macroglobuline, protéine présente dans le sérum. L' α_2 -macroglobuline est considérée comme l'inhibiteur protéasique universel. Effectivement, elle ne fait aucune discrimination parmi les classes de protéinases, contrairement à d'autres inhibiteurs protéasiques strictement spécifiques à une classe. C'est une protéine de 725 kDa. contenant quatre chaînes polypeptidiques identiques reliées par des liens disulfures, qui "emprisonne" véritablement les protéases, de telle sorte que celles-ci, essentiellement par encombrement stérique ne peuvent plus réagir ni avec leurs substrats protéiniques, ni avec d'autres inhibiteurs protéiniques, ni avec des anticorps spécifiques. Cet emprisonnement de la protéase par l' α_2 -macroglobuline, s'accompagne d'un changement conformationnel de cette dernière, qui favorise la capture du complexe par les cellules phagocytaires et donc son élimination de la circulation sanguine (Barrett, 1981). La liaison ainsi créée, entre l' α_2 -macroglobuline et la protéinase, est irréversible. L'enzyme complexée garde cependant une activité catalytique vis-à-vis de petits substrats (peptides,...) (Salvesen et Nagase, 1989).

La trypsine est également inhibée par d'autres inhibiteurs de protéases (Salvesen et Nagase, 1989). Certains de ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques des sérine protéases. C'est le cas :

- des peptides aldéhydiques, tels que la leupeptine ou l'antipaïne, qui comportent des fonctions aldéhydes à la place du carboxylate en α . Ce sont des inhibiteurs réversibles, peu toxiques dont nous reparlerons dans la suite de ce travail;
- des peptides chlorométhyl cétones, tels que le TLCK (tosyl-lysine chlorométhyl cétone). Il s'agit d'inhibiteurs irréversibles, très toxiques, étant donné leur pouvoir alkylant et leur interaction avec le glutathion intracellulaire.

D'autres inhibiteurs sont spécifiques de la classe des sérine protéases (Salvesen et Nagase, 1989) :

- les organophosphates, tels que le DFP (diisopropylphosphofluoridate) dont l'action est irréversible. C'est un composé toxique à cause de son effet inhibiteur sur l'acétylcholine

Tableau I.10. : Tableau non exhaustif reprenant quelques protéases couramment utilisées, avec leurs propriétés essentielles et leurs inhibiteurs correspondants

Protéases	Caractéristiques	Inhibiteurs
- Aminopeptidase M (origine porcine)	Métalloprotéase hydrolysant complètement tous les peptides et protéines portant un groupe α -amino libre.	Leucinthiol, 2,2'-bipyridine, 1,10-phenanthroline.
- Chymotrypsine (origine bovine)	Sérine protéase et endopeptidase hydrolysant les liens peptidiques en C-terminal de Tyr, Phe et Trp.	Aprotinine, DFP, PMSF, TPCK, α_2 -macroglobuline, α_1 -antitrypsine, SBTI, chymostatine.
- Papaïne (origine végétale)	Cystéine protéase et endopeptidase hydrolysant les protéines, peptides, amides et esters des acides aminés et peptides.	Acide iodoacétique, iodoacétamide, leupeptine, α_2 -macroglobuline, E-64, PMSF, antipapaine.
- Pepsine (origine porcine)	Aspartique protéase et endopeptidase ayant une spécificité assez étroite; clivant les liens de Phe, Met, Leu ou Trp.	Pepstatine, 4-bromophénacyl bromide.
- Subtilisine (origine bactérienne)	Sérine protéase et endopeptidase non spécifique hydrolysant les liens peptides et esters, travaillant à pH alcalin.	DFP, PMSF, α_2 -macroglobuline.
- Trypsine (origine bovine)	Sérine protéase et endopeptidase hydrolysant les protéines et peptides du côté carboxylique des acides aminés Arg et Lys.	DFP, TLCK, PMSF, leupeptine, SBTI, aprotinine, α_2 -macroglobuline, α_1 -antitrypsine, AMSF, antipapaine.

- estérase. De plus, son instabilité en solutions aqueuses limite son utilisation comme inhibiteur;
- les fluorures de sulfonyl, tels que le PMSF (fluorure de phénylméthylsulphonyl) qui est un inhibiteur irréversible, peu spécifique, capable de réagir réversiblement avec certaines cystéine protéases. Un autre exemple de fluorure de sulfonyl peut être cité : l'APMSF (fluorure de 4-amidinophénylméthanesulphonyl) (Salvesen et Nagase, 1989);
 - les inhibiteurs protéiniques, tels que l'aprotinine (généralement extraite de poumon bovin), le SBTI (soybean trypsin inhibitor),... qui forment des complexes stables avec les sérine protéases, bien que la liaison soit réversible. Notons que le SBTI a déjà été utilisé en culture de cellules, cultivées en l'absence de sérum et donc en l'absence d' α_2 -macroglobuline (Freshney, 1987 et Davis, 1994).

Dans ce travail, nous avons voulu non seulement éviter l' α_2 -macroglobuline (provenant de sérum bovin), mais aussi la trypsine (d'origine porcine). Ayant passé en revue les principaux couples protéases-inhibiteurs (tableau I.10.), notre choix s'est d'abord porté sur la papaïne comme protéase et sur la leupeptine et l'antipainé, comme inhibiteurs. La papaïne à l'avantage d'être d'origine végétale; en outre, elle est inhibée également par l' α_2 -macroglobuline, ce qui signifie que nous pourrions dans un premier temps l'inhiber avec du sérum, puis dans un second temps avec la leupeptine et l'antipainé.

La papaïne a d'ailleurs déjà été utilisée en culture cellulaire, très spécifiquement pour la dissociation enzymatique des neurones de la rétine. Effectivement, cette méthode permet d'isoler, soit des photorécepteurs rétiniens (Lam, 1972; Bader et al., 1978; Shen et al., 1995), soit des neurones bipolaires rétiniens (Tachibana et Kaneko, 1987). Les cellules ainsi isolées sont bien individualisées et identifiables morphologiquement; elles semblent également fonctionnelles, puisqu'elles répondent à des stimuli physiques (telle la lumière) ou chimiques (tel que l'acide gamma-aminobutyrique). Par ailleurs, les cellules ainsi isolées peuvent également être utilisées pour déterminer la biosynthèse de neurotransmetteurs (Lam, 1972). Shen (1995) a cependant démontré que la papaïne réduisait l'activité des canaux ioniques en réduisant la densité des canaux cGMP activés : le courant total passant à travers la membrane des bâtonnets rétiniens isolés, est en effet réduit de 20 % par rapport aux contrôles. Néanmoins, même si l'enzyme diminue le nombre de canaux actifs; les canaux restants semblent fonctionner normalement. D'autres travaux prouvent cependant que le traitement

à la papaïne n'endommage pas tous les types de canaux ou récepteurs.

3. La papaïne

La papaïne (EC 3.4.22.2) est une cystéine protéase, à large spectre, d'origine végétale, que l'on peut facilement extraire du latex de la papaye, fruit de *Carica papaya*. C'est une enzyme qui est remarquable par ses larges applications industrielles dont 75 % en brasserie où l'enzyme fait l'objet de tentatives d'immobilisation sur des supports de type cellulose, 10 % dans les industries de viande, 5 % dans la fabrication d'hydrolysats de poissons et de têtes de poulets, 2 % dans l'industrie pharmaceutique,... . Les préparations brutes sont fabriquées à partir du latex séché des papayes, celui-ci est stocké à froid, puis après agitation, dilution, centrifugation, filtration sur plaques stérilisantes afin d'éliminer toutes impuretés. On obtient des produits purifiés de l'enzyme, le précipité séché ou remis en solution sert de base aux préparations commerciales. Les solutions sont stabilisées en milieu réducteur pour protéger le groupement -SH figurant dans le site actif de l'enzyme (Durand, 1982 et Cuvellier, 1993). Elle a donc fait l'objet de très nombreux travaux et est souvent considérée comme l'archétype des cystéine protéases, enzymes protéolytiques caractérisées par la présence d'une cystéine dans le site actif, dont la fonction -SH est capitale pour l'activité enzymatique et on parle souvent de la superfamille de type papaïne.

Sur la base des séquences primaires disponibles dans les banques de données en 1995, pour 130 cystéine protéases (dont 96 séquences complètes de protéases matures, 21 séquences partielles), Berti et Storer (1995) ont essayé de préciser les relations phylogénétiques entre ces différentes cystéine protéases. Ils proposent trois groupes :

- le groupe des cystéine protéases de type papaïne, incluant les cathepsines B, C, H, L et S;
- le groupe des calpaïnes, cystéine protéases Ca^{++} -dépendantes;
- le groupe de type bléomycine hydrolases.

La superfamille de papaïne semble s'être développée très tôt durant l'évolution des eucaryotes et pourrait même prédire la divergence entre procaryotes et eucaryotes (Berti et Storer, 1995).

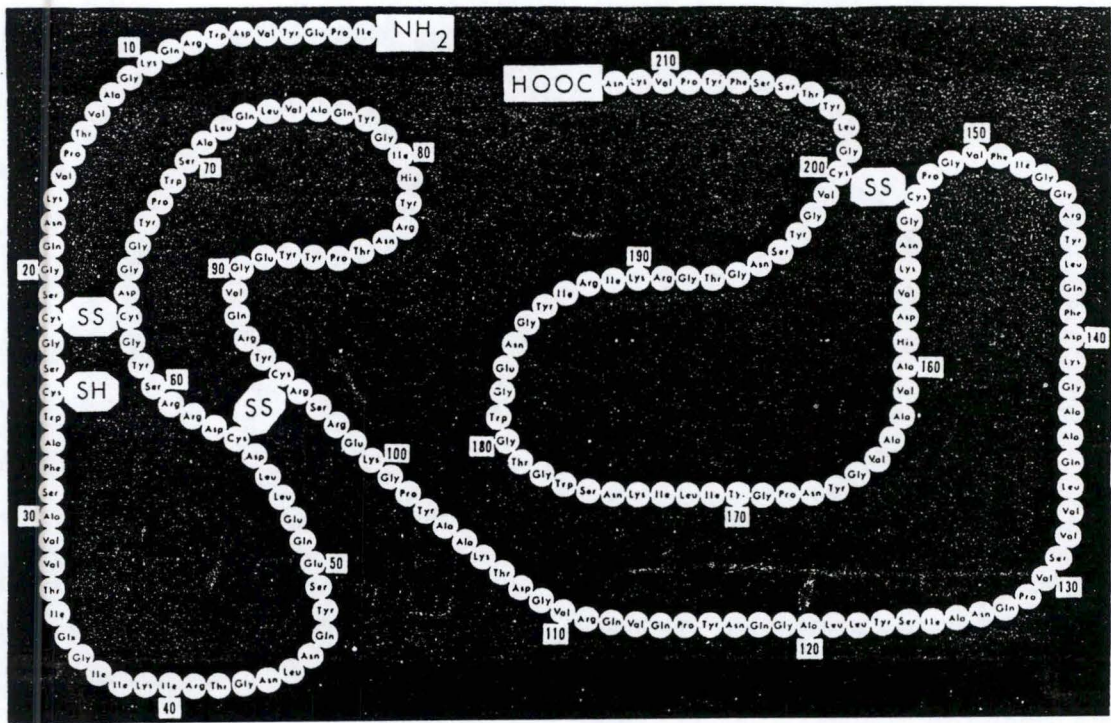


Figure I.9. : Chaîne polypeptidique dépliée de la papaïne mature avec ses 212 acides aminés (d'après Arnon, 1970)

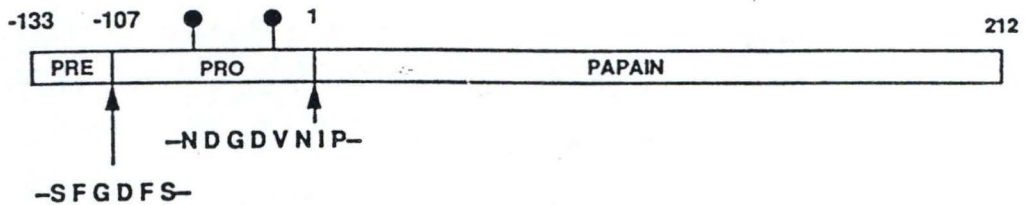


Figure I.10. : Représentation schématique des trois régions fonctionnelles du précurseur de la papaïne (d'après Vernet et al., 1990)

	Sequence	
Caricaïn	MDFSIVGYSQDDLTSTERLIQLFNSWMLNHNKIFYENVDEKLYRFEIFKDN	50
PPIV	MDFSIVGYSQDDLTSTERLIQLFNSWMLKHKNYKNVDEKLYRFEIFKDN	50
Papain	MDFSIVGYSQNDLTSTERLIQLFESWMLKHNKIYKNIDEKIYRFEIFKDN	50
Caricaïn	LNKYIDETNKKNNSYWLGLNEFADLSNDEFNEKYVGLIDA--TIEQSYDE	98
PPIV	LKYIDERNKMINGYWLGLNEFSDLNDEFKEKYVGLPED--YTNQPYDE	98
Papain	LKYIDETNKKNNSYWLGLNVFADMSNDEFKEKYTGSIGNYTTTELSY-E	99
Caricaïn	EFINEDTVN	107
PPIV	EFVNEDIVD	107
Papain	EVLNDGDVN	108

Figure I.11. : Les séquences des régions pro pour la caricaïne, la protéinase IV de la papaye et la papaïne (d'après Taylor et al., 1995)

3.1. Biosynthèse et maturation

La papaïne mature est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 212 acides aminés, réticulée par quatre ponts disulfures, avec un poids moléculaire de 23,406 kDa. (figure I.9.). Mais comme la plupart des protéases, la papaïne est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif, de type pré-pro-enzyme, avec une extension amino-terminale de 133 acides aminés, ce qui confère au précurseur un poids moléculaire de 39 kDa. (figure I.10.). La région pré (26 acides aminés) est une séquence signal permettant la translocation cotraductionnelle dans le réticulum endoplasmique et est clivée avant que la synthèse de la chaîne polypeptidique ne soit achevée.

La région pro (107 acides aminés) joue un rôle à la fois dans le repliement correct de l'enzyme et dans l'inhibition de l'activité enzymatique du précurseur. La séquence de la région pro est donnée dans la figure I.11., respectivement pour la caricaïne, la protéinase IV de la papaye et la papaïne, trois cystéine protéases majeures de la papaye (Vernet et al., 1990, 1991 et 1993; Taylor et al., 1995). Taylor et al. (1995) ont également montré que la région pro, recombinante de 107 acides aminés, exprimée chez *E. coli* était capable d'inhiber non seulement la papaïne mature, mais aussi la chymopapaïne, la protéinase IV de la papaye et la caricaïne toutes présentes dans le latex de la papaye.

Les mécanismes moléculaires responsables de la maturation des précurseurs, restent largement méconnus chez le papayer. Mais l'abondance des cystéine protéases dans le latex permet sans doute d'assurer cette maturation. Il faut dire que jusqu'à présent, la plupart des travaux qui se sont intéressés au précurseur de la papaïne et à sa maturation, ont été réalisés sur le précurseur exprimé en cellules d'insectes infectés avec des baculovirus recombinants (Vernet et al., 1990 et 1991), en levure (Vernet et al., 1993) ou chez *E. coli* (Taylor et al., 1995).

3.2. Mécanisme catalytique général

Les cystéine protéases de la famille de la papaïne, catalysent l'hydrolyse des liens :
- peptidiques

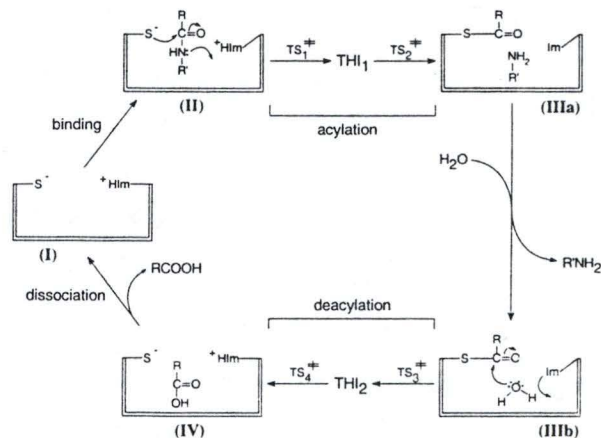


Figure I.12. : Mécanisme catalytique par lequel la papaïne hydrolyse le substrat (d'après Storer et Ménard, 1994)

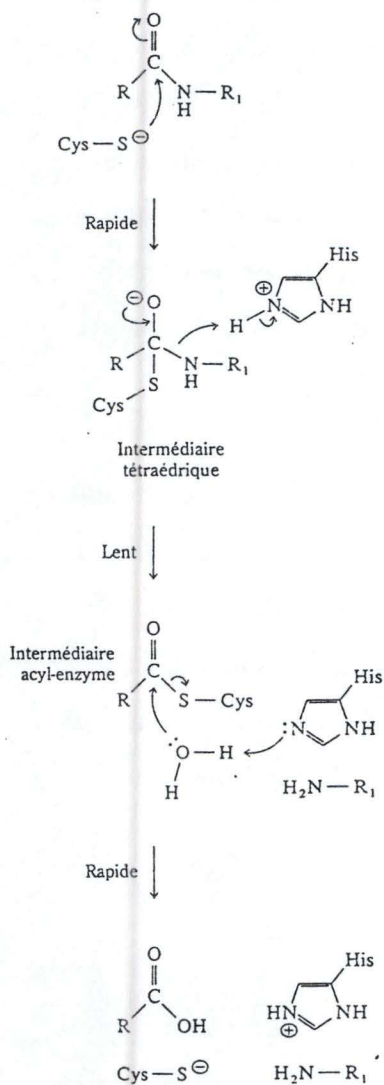


Figure I.13. : Réaction catalysée par la papaïne et qui passe par un intermédiaire, l'acyl-enzyme (d'après Rawn, 1990)

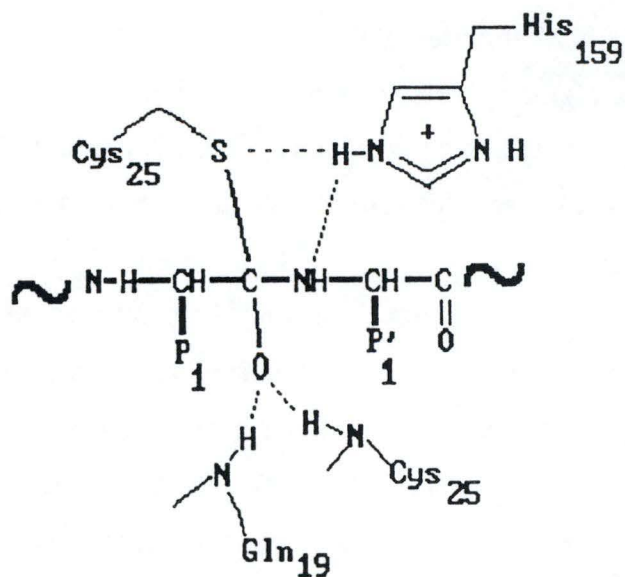


Figure I.14. : Représentation du trou oxyanionique, créé entre l'enzyme et le substrat pour une meilleure stabilité de l'intermédiaire TH1, mentionné dans les figures I.12. et I.13. (d'après Dunn, 1989)

- amides
- esters
- thiol esters
- thiono esters.

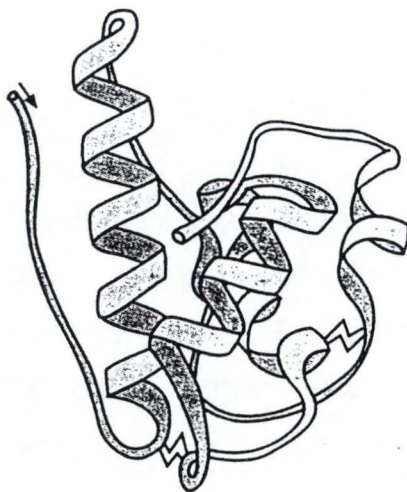
Cette hydrolyse passe par la formation d'un intermédiaire covalent, l'acyl-enzyme, résultant de l'attaque nucléophile par le groupe -SH au site actif de la cystéine, sur le C d'un carbonyle flanquant le lien amide ou ester du substrat à cliver.

Le mécanisme d'hydrolyse implique une série d'étapes schématisées aux figures I.12. et I.13., dans le cas d'un substrat amide. La première étape correspond à l'association par des liens non covalents de l'enzyme libre (I) et du substrat pour former le complexe Michaëlis (II). Cette étape est suivie par l'acylation de l'enzyme (III a) avec formation et libération d'un premier produit, l'amine $R'NH_2$. Durant l'étape suivante de déacylation, l'acyl-enzyme (III b) réagit avec une molécule d'eau et forme ainsi le second produit. La libération de ce produit permet la régénération de l'enzyme libre. Plusieurs intermédiaires et/ou états transitoires semblent exister tout au long de ce processus; en effet, l'acylation et la déacylation impliqueraient la formation d'intermédiaires tétrahédriques transitoires (TH1 et TH2). De plus, quatre états transitoires (TS1, TS2, TS3 et TS4) séparent le complexe Michaëlis, l'acyl-enzyme et le complexe enzyme-produit des deux intermédiaires tétrahédriques (Storer et Ménard, 1994 et Rawn, 1990).

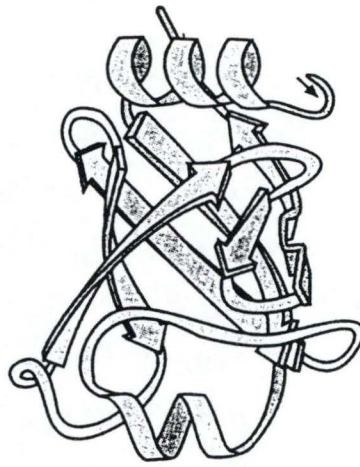
On a pu démontrer que certains états transitoires instables de l'enzyme étaient stabilisés, grâce à une région particulière de l'enzyme, appelée le trou oxyanionique (figure I.14.). Le mécanisme décrit lors de la formation du complexe Michaëlis implique effectivement deux groupes -NH, provenant des résidus Gln-19 et Cys-25 de l'enzyme. Le trou oxyanionique se définit par la formation de liaisons hydrogènes créées entre un oxygène du carbonyle du substrat, chargé négativement et les deux groupes -NH cités ci-dessus. Le trou oxyanionique en stabilisant l'intermédiaire tétrahédrique 1 (TH1), augmente la vitesse de la réaction (Dunn, 1989).



Figure I.15. : Structure moléculaire en trois dimensions de la papaïne
(d'après Pickersgill, 1992)



Papain domain 1



Papain domain 2

Figure I.16. : La papaïne est formée de deux domaines délimitant une poche dans laquelle le substrat vient se loger
(d'après Zubay, 1993)

3.3. Caractéristiques et structure

Dérivée du latex du fruit vert du papayer et donc disponible en grande abondance, la papaïne a été la première cystéine protéase à être cristallisée par Balls en 1937 (pour l'historique voir Cuvellier, 1993). Sa structure moléculaire est donc bien connue, depuis longtemps (figure I.15.) et il existe même des données cristallographiques sur les complexes enzyme-substrat ou enzyme-inhibiteur (Matsumoto et al., 1994).

La papaïne est constituée d'une chaîne polypeptidique qui se replie pour former deux domaines distincts (1 et 2) (figure I.16.). Ces deux domaines délimitent une poche plutôt hydrophobe, où vient se loger le substrat. Cette poche est illustrée à la figure I.17., selon diverses orientations. Sans entrer dans les détails, on constate :

- la présence d'acides aminés disposés en paires, qui se font face et qui appartiennent aux deux domaines;
- la présence d'un certain nombre de résidus plutôt hydrophobes (Val en position 13, 32, 164 et Ala en position 162). Ceux-ci joueraient un rôle important dans la spécificité vis-à-vis des substrats. On remarque aussi la présence de résidus plus polaires (Ser en position 29, 31, Thr en position 14 et Lys en position 174);
- la présence à l'entrée de la poche des deux acides aminés essentiels au niveau du site actif, la Cys-25 et l'His-159, logés à l'interface de la poche respectivement sur les deux domaines opposés de l'enzyme (Zubay, 1993).

3.4. Le site actif et ses principaux acides aminés impliqués dans le mécanisme catalytique

Comme déjà signalé le mécanisme catalytique repose sur l'attaque nucléophile du substrat par la fonction -SH de la cystéine 25. Il semble maintenant bien établi que cette attaque n'est possible que si l'enzyme présente la paire ionique thiolate - imidazolium, comme indiqué à la figure I.18..

C'est pour cette raison que la réaction catalysée par la papaïne, présente un profil en cloche avec un optimum à pH 6,2, lorsqu'on suit la vitesse de la réaction en fonction du pH

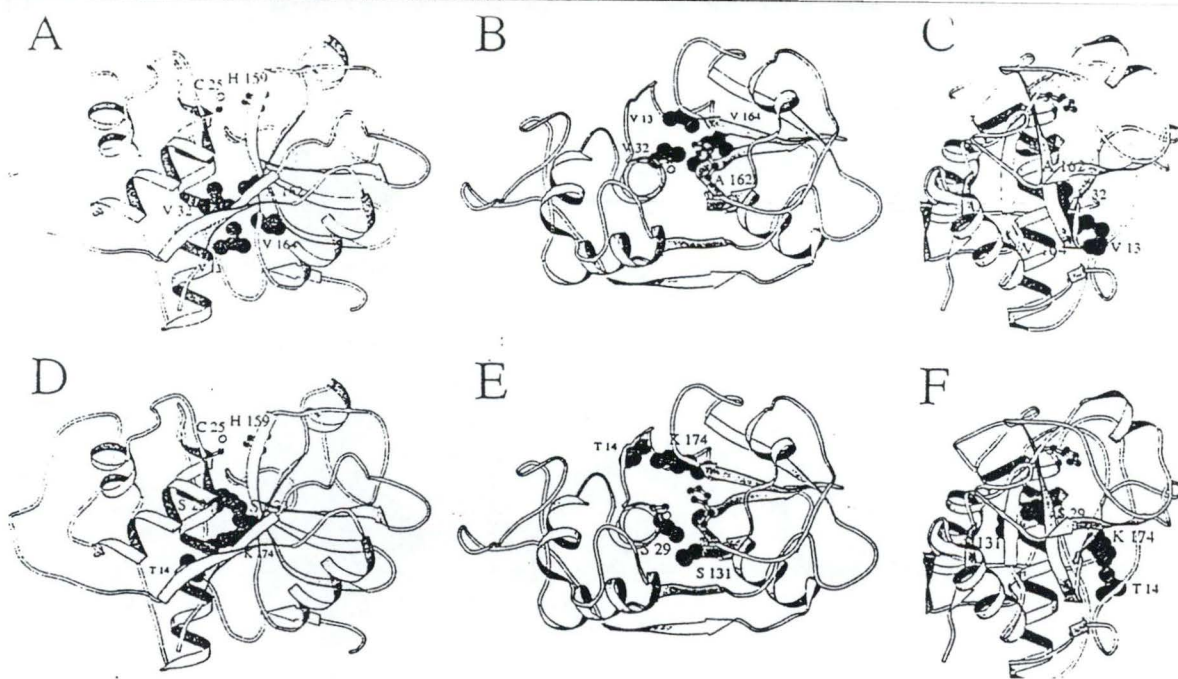


Figure I.17. : La poche située à l'interface des deux domaines de la papaïne, à l'intérieur de laquelle se place le substrat
(d'après Altschuh et al., 1994)

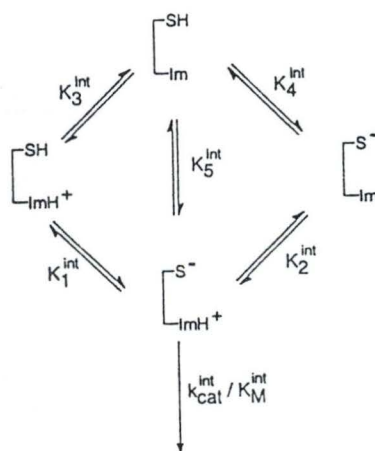


Figure I.18. : Représentation schématique du mécanisme d'ionisation des résidus Cys-25 et His-159, aboutissant à la paire ionique thiolate-imidazolium
(d'après Storer et Ménard, 1994)

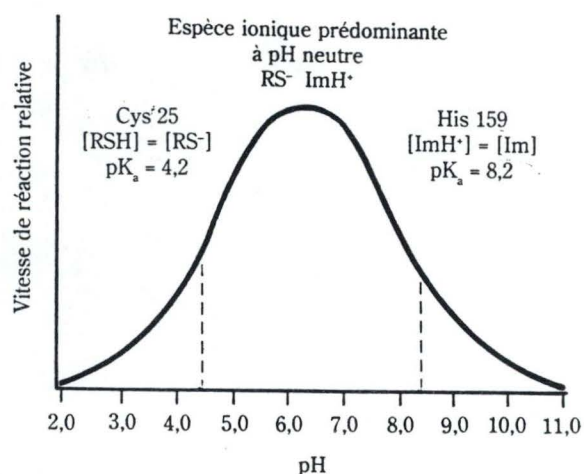


Figure I.19. : Relation entre le pH et la vitesse, pour la réaction catalysée par la papaïne
(d'après Rawn, 1990)

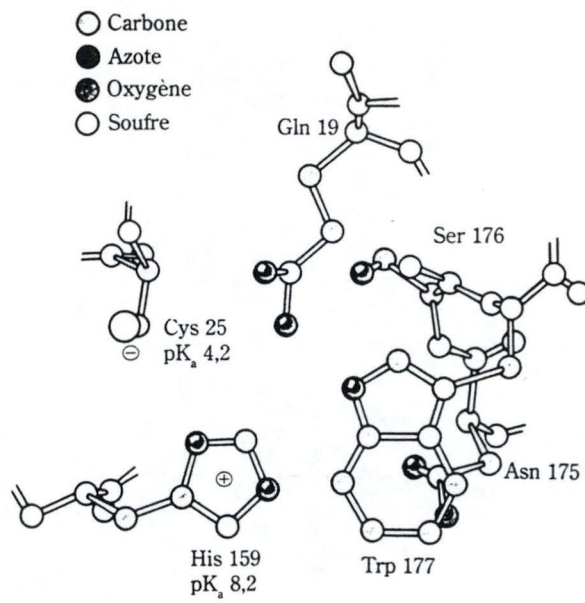


Figure I.20. : Résidus d'acides aminés, de la papaine participant directement au mécanisme catalytique
 (d'après Rawn, 1990)

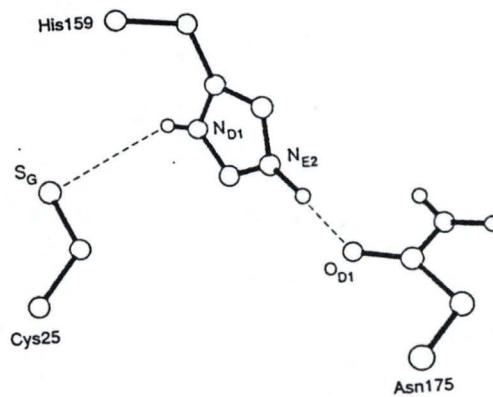


Figure I.21. : Triade catalytique entre trois acides aminés (His-159, Cys-25 et Asn-175) du site actif
 (d'après Vernet et al., 1993)

(figure I.19.). Le segment de la courbe situé à gauche du maximum correspond à l'ionisation du résidu cystéine 25, avec un PK_a de 4,2, alors que le côté basique, avec un PK_a de 8,2, reflète l'ionisation de His-159. L'équilibre entre chaînes latérales ionisées et protonées des deux résidus du site actif peut s'écrire : $\text{Cys-SH} + \text{Im} \rightleftharpoons \text{Cys-S}^- + \text{Im H}^+$ où Im et Im H⁺ sont, respectivement les groupes imidazole et imidazolium de l'histidine 159, et Cys-SH et Cys-S⁻, respectivement les groupes thiol et thiolate de la cystéine 25. Le PK_a de la chaîne latérale de l'histidine, normalement de 6,0 est déplacé à 8,2 dans le cas de la papaine. La charge positive de l'ion imidazolium est stabilisée par les électrons π de la chaîne latérale du tryptophane 177, voisin de l'histidine 159, au site actif de l'enzyme (figure I.20.). D'autre part, la charge négative de l'anion thiolate est aussi stabilisée, par attraction électrostatique, vers l'ion imidazolium. Il s'ensuit que le PK_a de la chaîne latérale de Cys-25 est déplacé de sa valeur habituelle de 8,3 à la valeur de 4,2 (Rawn, 1990).

On sait, à présent, que l'état de stabilité lors de l'ionisation de la paire ionique thiolate-imidazolium est fortement influencé par la distance séparant les deux résidus. Par conséquent, un petit changement conformationnel du site actif peut modifier les deux valeurs de PK_a (4,2 et 8,2) (Altschuh et al., 1994).

La fente du site actif dont la profondeur est estimée à 10 Å, semble présenter une structure plus ouverte à pH intermédiaire (entre 4,2 et 8). Les agents dénaturants tels que l'urée ou l'hydrochlorure de guanidine ont eux aussi un effet sur l'ouverture de la fente qui se referme légèrement en leur présence. Même si l'urée a une meilleure efficacité comparée à l'hydrochlorure de guanidine; ces deux substances, lorsqu'elles sont conjuguées, sont capables d'inactiver complètement la papaine à haute concentration (Butterfield et Lee, 1994).

La proximité au niveau du site actif d'un résidu conservé asparagine suggère également sa participation active au mécanisme catalytique. L'oxygène du groupe amide de l'Asn-175 se lie à l'azote de l'His-159 créant ainsi une triade Cys-His-Asn (figure I.21.). Le rôle de l'Asn-175 pourrait être d'orienter l'His-159 dans des positions optimales, puisque celui-ci peut se déplacer par rotation. On accorde à l'Asn-175 un rôle supplémentaire de stabilisateur pour la paire ionique thiolate-imidazolium (Storer et Ménard, 1994). Plus récemment cependant Vernet et al. (1993) ont démontré, par mutagénèse dirigée, que ce résidu n'était pas indispensable au bon fonctionnement de la triade catalytique. Il a donc été

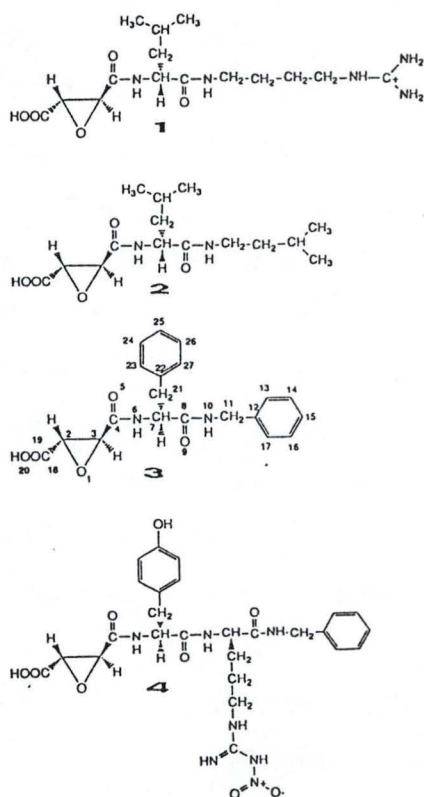


Figure I.22. : Structures chimiques de l'inhibiteur E-64 (1) et de ses analogues (2, 3 et 4) (d'après Matsumoto et al., 1994)

Type of interaction	Atom of inhibitor	Residue of papain	3	4
Hydrogen bond	O5	N(Gly-66)	2.8 9	2.6 9
	O19	N ^{δ1} (His-159)	2.8 4	-
	O20	N(Cys-25)	3.4 7	-
	O20	N ^{ε2} (Gln-19)	2.6 3	-
	O32	O ^γ H(Ser-205)	-	2.9 1
Electrostatic short contact				
Covalent bond	N6	O(Asp-158)	3.6 9	3.6 2
	C2	S ^γ (Cys-25)	1.8 0	1.8 3

Tableau I.11. : Les interactions significatives des analogues de E-64 avec la papaine. Les inhibiteurs 3 et 4 sont représentés dans la figure I.22.

(d'après Matsumoto et al., 1994)

proposé que la géométrie du site actif soit dominée non pas par la conformation impliquant la triade Cys-25, His-159 et Asn-175 mais plutôt par celle formée avec Cys-25, His-159 et Asp-158, mais les expériences de mutagenèse dirigée suggèrent que ce dernier acide aminé ne possède lui aussi qu'une faible implication lors de l'activité catalytique. Il n'est donc pas exclu que les deux triades, ensemble, participent à la catalyse (Wang et al., 1993).

A l'intérieur de la fente du site actif, le résidu Trp-177 a également tendance à se lier à l'His-159 protonée. De même, la chaîne latérale de la Gln-19 et le groupe amide de la Cys-25 participent activement à la catalyse (Storer et Ménard, 1994). On voit donc que des résidus éloignés du site actif, mais situés à l'interface des deux domaines peuvent venir moduler le mécanisme catalytique de l'enzyme (Altschuh et al., 1994).

4. Inhibition de la papaïne

4.1. Les principaux inhibiteurs de la papaïne

Comme déjà signalé pour la trypsine, il faut distinguer les inhibiteurs non spécifiques, tels que l' α_2 -macroglobuline, déjà décrite précédemment, les peptides aldéhydiques et les peptides chlorométhyl cétones d'une part et les inhibiteurs spécifiques de la classe des cystéine protéases, d'autre part. Les inhibiteurs spécifiques se rassemblent principalement en trois catégories :

- les diazométhanes peptidiques représentant un groupe de dérivés oligopeptidiques dans lesquels le OH en carboxy terminal est remplacé par la fonction diazométhyle CH-N=N. Ces inhibiteurs irréversibles sont très spécifiques des cystéine protéases (Salvesen et Nagase, 1989);
- les époxydes peptidiques, dont le prototype est le E-64 [*N*-(*L*-3-*trans*-carboxyoxiran-2-carbonyl)-*L*-leucyl]-amido (4-guanidino) butane. Le E-64 ainsi que plusieurs analogues sont représentés à la figure I.22.. Le mécanisme d'inhibition de ces molécules est assez mal connu mais il semblerait qu'en alkylant le site actif des cystéine protéases, le groupe époxyde (en *trans*) en soit le premier responsable (tableau I.11.). Ce sont des molécules peu toxiques et tout à fait spécifiques des cystéine protéases. De plus, ces époxydes peptidiques ne sont réactionnels qu'avec les thiols du site actif des protéinases. De ce fait,

il s'agit d'excellents inhibiteurs irréversibles en présence d'agents réducteurs, utilisés pour activer les cystéine protéases, ce qui leur confère un avantage supplémentaire (Salvesen et Nagase, 1989 et Matsumoto et al., 1994);

- les cystatines, inhibiteurs protéiniques réversibles des cystéine protéases. Les membres de la superfamille des cystatines sont répartis en trois familles : les cystatines de type 1 (cystatines A et B,...) ne comprenant aucun lien disulfure ni de groupe carbohydrate; les cystatines de type 2 (cystatines de poulet, cystatines humaines C et S,...) contenant deux boucles formées par des liens disulfures au niveau du carboxy terminal; les cystatines de type 3 (quininogènes,...) composées de trois segments à l'image de celui du type 2. Malgré la réversibilité de ces inhibiteurs, l'affinité pour la papaïne est tellement forte, qu'il est parfois difficile de démontrer le fait que les cystatines soient des inhibiteurs compétitifs pour les enzymes (Barrett, 1987). Des études de mutagenèse dirigée, ont permis de préciser les portions de cystatine interagissant avec la papaïne et d'autres cystéine protéases. Cette même équipe de chercheurs est parvenue à obtenir des formes mutées de cystatine de poulet qui n'exerçaient leurs effets inhibiteurs que de manière temporaire. Le caractère temporaire de cette inhibition serait lié à des distorsions dans les cystatines mutées; ces distorsions favoriseraient la formation d'un lien covalent entre la cystéine du site actif de la papaïne et le lien peptidique Gly-9 et Ala-10 des cystatines, lien qui serait finalement clivé, comme pour les substrats protéiniques de l'enzyme (Auerswald et al., 1995).

Etant donné la présence d'une cystéine dans le site actif, les cystéine protéases sont également inhibées par des agents alkylant les groupes -SH, mais cette réaction n'est pas propre aux cystéine protéases. Signalons deux de ces agents : l'iodoacétamide et l'acide iodoacétique. Parmi les différents inhibiteurs mentionnés ci-dessus, nous nous focaliserons sur les peptides aldéhydiques utilisés dans ce travail : la leupeptine et l'antipaïne.

4.2. Leupeptine et antipaïne

La leupeptine et l'antipaïne sont des peptides aldéhydiques, d'origine microbienne capables d'inhiber les sérine et cystéine protéases. En général, les actinomycètes vivent enfouis dans le sol et digèrent l'azote organique dont ils ont besoin pour leur croissance, via des protéases et d'autres enzymes. Lorsque les enzymes protéolytiques ne sont plus

Inhibitors	Streptomyces species
Leupeptins	<i>S. roseus</i> , <i>S. roseochromogenes</i> <i>S. lavendulae</i> , <i>S. albireticuli</i> , <i>S. thioluteus</i> , <i>S. chartreusis</i> , and more than 11 other species of actinomycetes
Chymostatin	<i>S. hygroscopicus</i> , <i>S. lavendulae</i> etc.
Pepstatin	<i>S. testaceus</i> , <i>S. argenteolus</i> etc.
Antipain	<i>S. mauvecolor</i> , <i>A. violascens</i> , <i>S. michiganensis</i> <i>S. yokosukanensis</i>

Tableau I.12. : Inhibiteurs des enzymes protéolytiques et leurs sources microbiennes
(d'après Wingender, 1974)

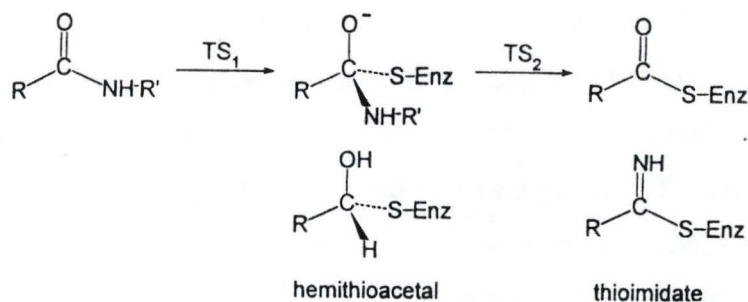


Figure I.23. : Comparaison des géométries de l'hémithioacétal et du thioimidate avec les intermédiaires de la réaction catalytique du substrat par la papaïne
(d'après Dufour et al., 1995)

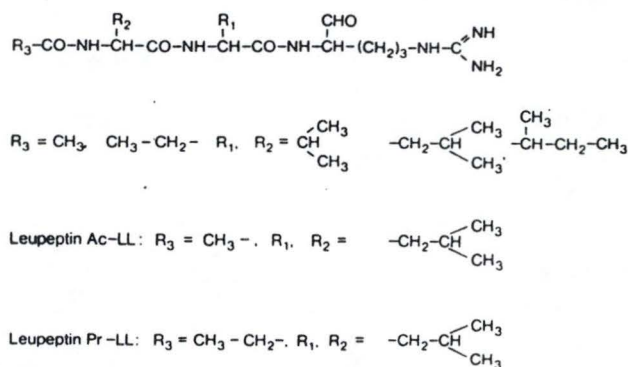


Figure I.24. : Structure de la leupeptine, composée d'un mélange de la leupeptine Ac-LL et de la leupeptine Pr-LL
(d'après Wingender, 1974)

nécessaires à l'organisme, leur inhibition doit se déclencher. C'est pourquoi des peptides aldéhydiques, dont la leupeptine et l'antipain, apparaissent naturellement en tant qu'inhibiteurs chez ces microorganismes (tableau I.12.).

Les peptides aldéhydiques forment des hémithioacétals avec le résidu cystéine du site actif des cystéine protéases. En fait, les intermédiaires covalents intervenant dans ce processus miment les états transitoires tétrahédriques décrits dans le mécanisme catalytique des cystéine protéases. On observe également une inhibition réversible avec les peptides nitriles, formant quant à eux des thioimidates. Cependant, la structure du complexe formé avec un peptide nitrile ressemble plus à l'intermédiaire acyl-enzyme qu'à l'état de transition tétrahédrique (figure I.23.) (Dufour et al., 1995 et Hanzlik et al., 1990). Les peptides aldéhydiques les mieux caractérisés, sont l'antipain et la leupeptine.

4.2.1. Les leupeptines (C₂₀ H₃₈ N₆ O₄)

Les leupeptines sont des inhibiteurs réversibles des sérine et cystéine protéases, parmi elles : trypsine, plasmine, kallikréine, papaïne, cathepsine B et protéinase K. Elles correspondent généralement à un mélange de deux composés majeurs : la leupeptine Ac-LL (acétyl-L-leucyl-L-leucyl-DL-argininal), et la leupeptine Pr-LL (propionyl-L-leucyl-L-leucyl-DL-argininal) dans un rapport 1:3 (figure I.24.) (Wingender, 1974). En solution aqueuse, la leupeptine existe en équilibre entre trois espèces (figure I.25.) : l'hémiaminal cyclique (III), l'aldéhyde libre (I) et l'aldéhyde hydratée (II). Seul l'aldéhyde libre est capable d'inhiber l'activité protéasique et la forme hydratée n'est présente qu'à l'état de trace (Umezawa, 1976).

Cet inhibiteur se lie, de façon réversible, à la papaïne et la réaction se passe en deux étapes : $E + I \rightleftharpoons EI \rightleftharpoons EI'$. L'inhibiteur I se lie de façon non covalente au site actif de l'enzyme E et forme le complexe Michaëlis EI. Dans la seconde étape, la cystéine Cys-25 du site actif de la protéase, attaque l'atome carbone du groupe aldéhyde, de la leupeptine liée, pour former une structure hémithioacétal EI'.

Le tableau I.13. et la figure I.26. précisent les interactions entre leupeptine et papaïne,

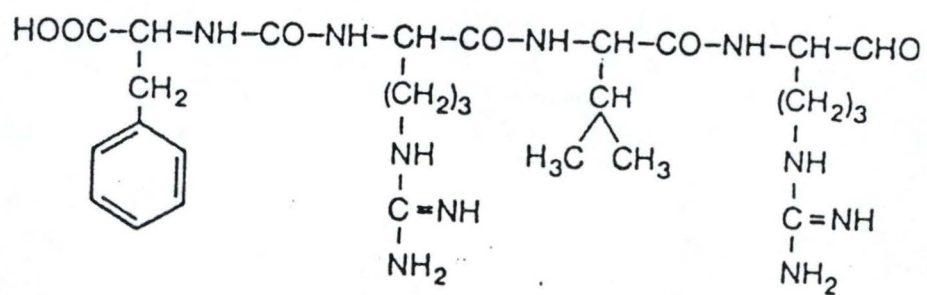


Figure I.27. : Structure chimique de l'antipainé
 (d'après Wingender, 1974)

à l'échelle atomique et moléculaire. En comparant la structure de l'enzyme complexée à la leupeptine et la structure de la papaïne native, on s'aperçoit que l'inhibiteur n'induit que de faibles changements dans la conformation du site actif (Schröder et al., 1992).

Signalons que, administrée oralement, la leupeptine montre des effets anti-inflammatoires (Wingender, 1974) et qu'elle est également utilisée afin d'étudier le rôle des protéases dans l'invasion et le pouvoir métastasant des cellules tumorales (Schröder et al., 1992).

4.2.2. L'antipainé (C₂₇ H₄₄ N₁₀ O₆)

L'antipainé est également un inhibiteur réversible pour les cystéine protéinases mais aussi pour les sérine protéases. Sa séquence [*(S)*-1-carboxy-2 phényléthyl]-carbamoyl-Arg-Val-Arginal, est illustrée dans la figure I.27.. Le poids moléculaire de l'antipainé se situe à 604,7 Da.. En comparaison avec la leupeptine, cet inhibiteur paraît plus spécifique à la papaïne et à la trypsine; il inhibe aussi fortement les cathepsines B et A.

Le groupe aldéhyde présent dans l'antipainé constitue un élément absolument nécessaire pour l'inhibition de la papaïne, principalement à cause de sa similarité avec la portion acyl des substrats. Le lien existant entre la papaïne et le groupe aldéhyde de l'antipainé se construit de façon non covalente avec des ponts hydrogènes (Wingender, 1974).

5. Objectifs du travail

Comme exposé dans l'introduction, il existe à l'heure actuelle des fortes pressions, au niveau de l'Administration Européenne, pour éliminer à moyen terme, toute trace de sérum bovin ou de produits dérivés des bovins, des milieux de cultures cellulaires animales ou humaines, destinées à la bioproduction de produits (recombinants ou non), à usage vaccinal ou thérapeutique chez l'homme.

Rappelons que le sérum intervient à deux niveaux :

- primo, dans la composition des milieux de cultures, comme additif le plus fréquemment utilisé pour assurer une multiplication cellulaire et la production d'une biomasse suffisante;
- secundo, lors des étapes de détachement des cellules adhérentes, puisqu'il contient l' α_2 -macroglobuline, inhibiteur protéasique universel, pour inhiber la trypsine.

Dans ce mémoire, pour une question de temps, nous n'avons abordé que le deuxième aspect. L'objectif de ce mémoire est donc de proposer et d'évaluer un autre système enzyme-inhibiteur, comme alternative à la trypsine- α_2 -macroglobuline sérique. Pour une série de raisons explicitées dans l'introduction, notre choix s'est porté sur le couple papaïne-leupeptine ou antipainé.

Nous avons d'abord mis au point le dosage de la papaïne, pour pouvoir quantifier les activités de l'enzyme nécessaires pour détacher les cellules et pour préciser les concentrations en inhibiteurs requises pour inhiber l'enzyme. Les différentes molécules ont été évaluées, en ce qui concerne leurs effets cytotoxiques à court terme.

Un protocole de papainisation a été mis au point et il a été évalué sur le potentiel prolifératif à court et à moyen terme. Enfin, nous avons voulu estimer les effets cumulatifs de plusieurs papainisations successives.

Comme nous le verrons dans la discussion générale, les premiers résultats sont encourageants, mais le protocole doit être optimisé, car nous obtenons des effets cytotoxiques à long terme.

MATERIELS

ET

METHODES

1. Culture de cellules

1.1. Cellules

Comme déjà signalé, les cellules MRC-5 utilisées dans toutes nos expériences sont des fibroblastes de poumon foetal humain; elles ont été fournies gracieusement par T. Kirkwood de l'université de Manchester. Elles présentent un potentiel prolifératif limité de plus ou moins 50-60 passages en culture et la concentration minimale en sérum tolérée par ces cellules est de l'ordre de 1 %.

1.1.1. Repiquage des cellules à la trypsine

1.1.1.1. Matériels

- Trypsine : solution stérile de trypsine à 0,25 % dans un tampon composé de 0,4 g/l KCl; 2,2 g/l NaHCO₃; 6,8 g/l NaCl; 1 g/l glucose; 0,0005 g/l rouge de phénol (Gibco, Grande-Bretagne).
- Milieu de culture Dulbecco + glutamine + 10 % sérum : milieu Dulbecco (Gibco, Grande-Bretagne) préparé à raison de 3,7 g/l de NaHCO₃ (Merck, Darmstadt, Allemagne) auquel on a ajouté 10 % de sérum de veau foetal (Gibco, Grande-Bretagne) et 1 % de glutamine (Gibco, Grande-Bretagne).
- Milieu de rinçage : milieu de culture Dulbecco, sans sérum ni glutamine.
- Bleu de Trypan (Sigma Chemical, St Louis, USA).
- Boîtes de culture T75 (Corning, 75 cm², New-York, USA).

Remarque : les milieux de culture et de rinçage sont conservés à 4°C. La trypsine et le sérum sont stockés à - 20°C. Tous ces milieux doivent être préchauffés dans l'étuve à 37°C avant leur utilisation.

1.1.1.2. Méthode

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm². Lorsqu'elles arrivent à confluence, c'est-à-dire à une densité moyenne de 60.000 cellules/cm², on les repique en 2 ou en 4. Les cellules sont rincées avec 10 ml de milieu de rinçage afin d'éliminer toute trace de sérum, puis incubées dans 2 ml de trypsine durant deux minutes à température ambiante. Lorsque les cellules commencent à s'arrondir, la trypsine est décantée et la boîte est placée à 37°C durant 10 minutes pour accélérer la réaction. Quand les cellules se sont détachées, on y ajoute 10 ml de Dulbecco + glutamine + sérum, ce dernier sert à inhiber la trypsine, puisqu'il contient de l' α_2 -macroglobuline. Le milieu est agité avec une pipette Pasteur afin de rompre les agrégats cellulaires et d'obtenir une suspension cellulaire homogène.

A ce stade, un comptage peut être réalisé en prélevant 100 μ l de la suspension cellulaire et en y ajoutant 100 μ l de colorant vital tel que le bleu de Trypan. Le tout est déposé dans une chambre de Neubauer (Vel, Belgique). Seules les cellules mortes apparaissent bleutées.

La suspension cellulaire est alors rétablie à raison de 30.000 cellules/cm² dans du milieu de culture, pour un repiquage en deux. On ajuste enfin le pH du milieu en ajoutant un mélange gazeux contenant 8 % de CO₂ et 92 % d'air. Les boîtes sont placées dans une étuve à 37°C contenant 8 % de CO₂.

1.1.2. Repiquage des cellules à la papaïne

1.1.2.1. Matériels

- Milieu de culture et de rinçage : voir point 1.1.1.1.
- Papaïne : papaïne en poudre (P-4762 Sigma Chemical, St Louis, USA).

- Tampon pour la papaïne : pour un litre (10 x concentré) (=PBS/Dulbecco)
 - 2 g de KCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 2 g de KH_2PO_4 (anhydre) (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 80 g de NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 11,5 g de Na_2HPO_4 (anhydre) (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 10 g de D-glucose (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 0,36 g d'acide pyruvique (Sigma Chemical, St Louis, USA)

mettre à pH 7,2.

- Leupeptine (Sigma Chemical, St Louis, USA) : aliquotée en fractions de 10 mg/ml d'eau et congelée à -20°C .
- Antipain (Boehringer Mannheim, Allemagne) : aliquotée en fractions de 1 mg/ml d'eau et congelée à -20°C .
- Boîtes de culture T75 (Corning, New-York, USA).
- Tubes stériles en plastique (Sterilin, Staffordshire, Grande-Bretagne).
- Seringues de 5 et 10 ml (Terumo, Leuven, Belgique).
- Filtres (Minisart NML, $0,2\ \mu\text{m}$, Sartorius, Goettingen, Allemagne).

1.1.2.2. Méthode

On prépare une solution stock de 0,5 % de papaïne diluée dans l'eau (sinon elle précipite). A partir de ce stock, on dilue l'enzyme dans le tampon PBS/Dulbecco pour papaïne, décrit ci-dessus, pour obtenir une concentration finale de 0,005%. On prépare également la solution des inhibiteurs, à une concentration finale de $5\ \mu\text{l/ml}$. Pour ce faire, on utilise le même tampon PBS/Dulbecco qu'on a pris soin de diluer 10 fois.

Après avoir préchauffé les milieux et filtré les solutions non stériles, on rince les

cellules avec 10 ml de milieu de rinçage. Ensuite, elles sont incubées deux minutes avec 2 ml de papaïne 0,005 %. La papaïne est décantée après ce court laps de temps et la boîte est mise à 37 °C durant 18 minutes. Afin d'inhiber l'action de la papaïne, 2 ml de leupeptine ou d'antipainé (5 µg/ml) sont ajoutés. Les agrégats sont rompus par agitation avec une pipette Pasteur. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 1.000 rpm pendant 10 minutes (centrifugeuse Hettich Universal, Tuttlingen, Allemagne). Le complexe protéase-inhibiteur est ainsi éliminé. Le culot est resuspendu dans 10 ml de milieu Dulbecco + glutamine + sérum à raison de 30.000 cellules/cm² pour un repiquage en deux. La boîte est placée dans une étuve à 37 °C contenant 8 % de CO₂.

1.1.3. Congélation et décongélation

1.1.3.1. Matériels

- Milieu de rinçage, trypsine, Dulbecco + 10 % sérum + glutamine : voir point 1.1.1.1.
- Dulbecco + DMSO 20 % : Diméthylsulfoxyde (Janssen Chimica, Beerse, Belgique) dilué à une concentration de 20 % dans du Dulbecco. Le DMSO est utilisé comme agent cryoprotecteur lors de la congélation des cellules.
- Dulbecco + sérum 40 % (Gibco, Grande-Bretagne).
- Ethanol (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Ampoules de congélation (Nunc, Danemark).

1.1.3.2. Méthodes

A. Congélation

Les cellules sont rincées, trypsinisées, recueillies dans 8 ml de Dulbecco + sérum +

glutamine puis centrifugées à 1.000 rpm durant 10 minutes.

Le culot est resuspendu dans 0,4 ml de Dulbecco + sérum 40 %. Cette suspension est transférée dans une ampoule à laquelle on aura préalablement ajouté 0,4 ml de Dulbecco + DMSO 20 %. L'ampoule est alors placée dans un tube (50 ml), lui-même plongé dans un pot contenant de l'éthanol. Le tout est conservé au congélateur à -70°C durant une nuit. Cette technique permet une congélation progressive et évite la formation de cristaux à l'intérieur des cellules.

Une fois congelée, l'ampoule est transférée dans l'azote liquide à -196°C pour un stockage à plus long terme.

B. Décongélation

L'ampoule contenant les cellules est retirée de l'azote liquide et plongée immédiatement dans un bain à 37°C . Une fois décongelées, les cellules sont directement centrifugées pendant 10 minutes à 1.000 rpm. Le surnageant est éliminé tandis que le culot est resuspendu dans du Dulbecco + sérum + glutamine avant d'être transféré dans une boîte de culture contenant 19 ml de ce même milieu.

Le lendemain, il est nécessaire de changer le milieu afin d'éliminer toute trace de DMSO, toxique pour les cellules.

2. Tests de cytotoxicité

2.1. Test au bromure d'éthidium et acridine orange

La première étape de notre travail a consisté à vérifier que la papaine et les molécules inhibitrices n'étaient pas cytotoxiques, suivant la méthode au bromure d'éthidium et acridine orange (colorants fluorescents nucléaires) (Parks et al., 1979). L'acridine orange pénètre dans les cellules vivantes et colore leur noyau en vert fluorescent. Par contre, le bromure

d'éthidium ne traverse pas la membrane des cellules vivantes, mais colore en orange le noyau des cellules mortes. Ce test peut s'effectuer sur une suspension cellulaire ou sur des cellules adhérentes.

2.1.1. Matériels

- Milieu de culture : Dulbecco + sérum + glutamine : voir point 1.1.1.1.
- Tampon PBS/Dulbecco pour papaïne : voir point 1.1.2.1. (mais dilué 10 fois).
- PBS/Dulbecco + calcium : pour une solution d'un litre 10 fois concentrée, en plus des produits décrits en 1.1.2.1.; on ajoute 1,33 g de chlorure de calcium dihydraté (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- PBS : tampon phosphate, 10 mM contenant 0,9 % de NaCl et à pH 7,4.
- Solution de coloration : 50 mg de bromure d'éthidium (Sigma Chemical, St Louis, USA) et 15 mg d'acridine orange (Sigma Chemical, St Louis, USA) sont dissous dans 1 ml d'éthanol à 95 % et 49 ml d'eau. Cette solution est fractionnée en aliquots de 1 ml et stockée à - 20°C. On l'utilise diluée 100 fois dans du PBS : elle se conserve alors un mois à 4°C à l'abri de la lumière.
- Boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Falcon, New Jersey, USA).
- Lames porte-objet et lamelles couvre-objet.
- Microscope à fluorescence (Dialux 22, Leitz).

2.1.2. Méthodes

2.1.2.1. Coloration in situ

Les cellules sont repiquées à la trypsine comme décrit au point 1.1.1. dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre à raison de 150.000 cellules par boîte. Le lendemain, le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées deux fois avec du tampon pour papaïne, additionné de calcium (dilué 10 fois). Ce dernier est indispensable pour que les cellules restent attachées.

Durant 30 minutes, 2 ml de milieu PBS/Dulbecco + calcium (1 fois concentré) contenant la molécule dont nous voulons connaître la cytotoxicité (leupeptine et antipaïne) recouvrent les cellules. Les boîtes contrôles ne reçoivent que du milieu seul.

Après ce temps d'incubation, le milieu est décanté, et les cellules rincées avec le tampon PBS. Celui-ci est presque totalement décanté et, deux gouttes de la solution de coloration sont déposées dans la boîte de Pétri, qui est alors immédiatement observée au microscope à fluorescence. On réalise un comptage différentiel des cellules vertes et oranges sur un total d'environ 500 cellules réparties sur l'ensemble de la boîte de Pétri.

2.1.2.2. Coloration de cellules en suspension

Pour les cellules traitées à la papaïne, étant donné qu'elles se détachent, on applique la même méthode mais sur la suspension cellulaire.

Une goutte de la suspension cellulaire, venant d'être papainisée, est prélevée et déposée sur une lame porte-objet. Ensuite, au même endroit, une goutte de la solution de coloration est ajoutée. Le tout est recouvert d'une lamelle couvre-objet et observé immédiatement au microscope à fluorescence. Le comptage différentiel s'effectue également sur plus ou moins 500 cellules.

Les résultats sont exprimés comme suit :

$$\% \text{ de survie} = \frac{\text{Nombre de cellules vertes}}{\text{Nombre de cellules vertes} + \text{nombre de cellules oranges}} \times 100$$

2.2. Test au MTT

Afin de confirmer la non cytotoxicité des deux inhibiteurs et de vérifier l'état métabolique des cellules traitées à la papaïne 24 heures après le repiquage, on a utilisé une deuxième méthode colorimétrique, dite au MTT, décrite par Mosmann (1983) et modifiée selon Hansen (1989).

2.2.1. Matériels

- PBS/Dulbecco + calcium : voir point 2.1.1., mais dilué 10 fois.
- PBS : voir point 2.1.1.
- Dulbecco + 10 % sérum + glutamine : voir point 1.1.1.
- Solution à 2,5 mg/ml de MTT dans PBS : MTT (Merck, Darmstadt, Allemagne) [bromure de 3,(4,5-diméthylthiazol-2-yl)2,5-diphényl-tétrazolium]. La solution se conserve un mois à 4 °C.
- Solution pour ajuster le pH : pour 100 ml; 2,5 ml acide acétique 80 % (Merck, Darmstadt, Allemagne) + 250 µl HCl 1 N (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Solution de lyse SDS-DMF : solution 30 % de SDS (Merck, Darmstadt, Allemagne) dans de l'eau. Chauffer cette solution à 37 °C ainsi que du N,N-diméthylformamide (DMF) (Janssen Chimica, Beerse, Belgique). Ajouter un volume de DMF pour deux volumes de SDS-H₂O. Après dissolution complète, mettre à pH 4,7 en ajoutant la solution préparée à cet effet.

2.2.2. Méthode

Le MTT (jaune) se transforme en cristaux de formazan bleus sous l'action de la succinate deshydrogénase, active uniquement dans les mitochondries fonctionnelles et donc dans les cellules vivantes. Les protéines du sérum, les débris cellulaires n'ont pas d'influence; il ne faut donc plus rincer les puits comme pour d'autres tests. Le réactif de lyse libère les cristaux formés à l'intérieur des cellules; la lecture se fait à 570 nm dans un lecteur de plaques (Biorad). On prend 650 nm comme longueur d'onde de référence.

On repique à la trypsine des cellules dans une plaque de 96 puits, à raison de 10.000 cellules/puits; 24 heures après, les cellules sont attachées, on décante l'ancien milieu et on y ajoute 100 μ l de solution d'inhibiteur par cupule. Les deux inhibiteurs ont été dilués auparavant à différentes concentrations dans le PBS/Dulbecco + calcium et chaque rangée de huit puits est consacrée à une seule de ces concentrations. Les puits contrôles contiennent le milieu seul tandis que les blancs sont remplis avec du PBS, sans cellule. Après avoir laissé agir 30 minutes l'inhibiteur sur les cellules, on rince avec 100 μ l de PBS/Dulbecco + calcium. Juste avant d'ajouter 50 μ l de la solution de MTT, on remplit les puits avec 100 μ l de milieu de culture. On laisse incuber les cellules pendant 4 heures à 37°C; puis on décante délicatement et on ajoute 100 μ l de réactif de lyse SDS-DMF (conservé à 37°C, pour éviter les précipitations). Il vaut mieux attendre toute une nuit à 37°C pour que la dissolution des cristaux de formazan soit parfaite, ce qui rend les résultats plus homogènes.

Dans le but de vérifier l'état métabolique des cellules papainisées 24 heures après le repiquage décrit au point 1.1.2., on a également utilisé cette méthode avec cependant une variante : on ajoute directement les 50 μ l de la solution de MTT dans les cupules contenant le milieu de culture déposé la veille. Signalons cependant une difficulté liée à cette méthode. Pour avoir des comparaisons fiables, il est impératif de déposer exactement le même nombre de cellules, qu'elles soient trypsinisées ou papainisées, dans chacune des rangées de puits, ce qui pratiquement n'est pas toujours le cas. C'est pourquoi, on a également quantifier les cellules adhérentes 7 heures et 24 heures après le traitement enzymatique (trypsine ou papaïne).

3. Tests de prolifération

3.1. Dosage de protéines (au Folin)

Les protéines du tapis cellulaire seront dosées par la méthode de Lowry et al. (1951). Elles sont dénaturées par le NaOH et exposent de cette façon leurs groupements aux réactifs. Les ions cuivriques de la solution alcaline utilisée pour le dosage forment un complexe bleu avec les liaisons peptidiques, tandis que le complexe phosphomolybdique-phosphotungstique du réactif de Folin est réduit par les résidus tyrosine et tryptophane des protéines. L'intensité de la coloration bleue est mesurée à 660 nm au spectrophotomètre et est proportionnelle à la quantité de protéines présentes.

3.1.1. Matériels

- Solution d'étalon protéine (albumine de sérum bovin) à 200 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma Chemical, St Louis, USA).
- NaOH 0,5 N et NaOH 1 N (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Mixture alcaline (solution A) à préparer juste avant l'emploi :
 - 100 ml de Na_2CO_3 2 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 1 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 1 ml de $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 2 % (tartrate) (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Réactif de Folin à diluer deux fois (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- HBSS : pour un litre :
 - 8 g de NaCl
 - 1 g de D-glucose
 - 0,4 g de KCl
 - 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 - 0,1 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
 - 0,76 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

- 0,06 g de KH_2PO_4

mettre à pH 7,2 et ajouter le CaCl_2 1 mM final au dernier moment.

3.1.2. Méthode

Les cellules sont repiquées, soit à la trypsine soit à la papaïne (voir point 1.1.1. et 1.1.2.) et déposées stérilement à raison de 60.000 cellules/puits dans des rangées différentes d'une plaque de 24 puits. Après 7 heures dans l'étuve à 37°C contenant 8 % de CO_2 , les cellules ont eu le temps de s'attacher. La quantité de protéines récoltées à ce moment sera notre point de départ (100 %). Un deuxième dosage est effectué 24 heures après le repiquage, il est alors possible de le mettre en rapport avec celui réalisé la veille.

La méthode proprement dite commence par deux rinçages des cellules avec du HBSS en prenant soin de décanter doucement afin de ne pas détacher les cellules. Les protéines sont dénaturées en ajoutant 0,5 ml de NaOH 0,5 N pendant 30 minutes. Parallèlement, on prépare le blanc et l'étalon :

- blanc : 0,1 ml d'eau + 0,1 ml de NaOH 1 N pendant 30 minutes
- étalon : 0,1 ml d'étalon + 0,1 ml de NaOH 1 N pendant 30 minutes.

Les protéines cellulaires sont resuspendues et deux fractions de 0,2 ml sont récoltées. Ces fractions peuvent soit être utilisées directement, soit être congelées à -20°C pour un dosage ultérieur. Le dosage débute en ajoutant aux différents tubes 1 ml de mixture alcaline. Celle-ci réagit pendant 5 à 15 minutes, les tubes sont vortexés directement. Ensuite, 0,1 ml de réactif de Folin sont ajoutés toutes les 30 secondes et les tubes sont vortexés immédiatement après. La densité optique (D.O.) à 660 nm est lue au spectrophotomètre à la 30ème minute, puis de 30 en 30 secondes en respectant l'ordre des tubes.

La concentration en protéines se calcule comme suit :

$$\text{concentration en } \mu\text{g/ml} = 200 \times \frac{(\text{D.O. échantillon} - \text{D.O. blanc})}{(\text{D.O. étalon} - \text{D.O. blanc})}$$

3.2. Estimation de l'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN

Une autre manière d'estimer la capacité proliférative des cellules, est de suivre leur capacité à incorporer de la thymidine tritiée. Notre contrôle sera comme toujours des cellules trypsinisées que l'on compare à des cellules papainisées, avec inhibition par la leupeptine ou l'antipaïne. Une première estimation de l'incorporation de la thymidine radioactive se réalise la première fois que l'on trypsinise ou papainise les cellules. Ensuite, on continue ces deux cultures en parallèle en repiquant à chaque fois que les cellules arrivent à confluence. Au quatrième repiquage, on refait le test de la radioactivité. On parvient ainsi à déterminer les effets cumulatifs de quatre papainisations sur la capacité proliférative des cellules par rapport aux cellules trypsinisées.

3.2.1. Matériels

- [³H]-TH : [Méthyl-³H]-thymidine (NET-027X, NEN Products, Dreiech, Allemagne) : concentration = 1,0 mCi/ml. On réalise une solution stock de 100 µl de thymidine tritiée diluée dans 400 µl de Dulbecco + 10 % sérum + glutamine.
- Méthanol absolu (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- TCA : acide trichloracétique (Cl₃-COOH, Analyticals, Farmitalia Carlo Erba, Milan, Italie).
- Aqualuma (Lumac, Landgraaf, Pays-Bas).

3.2.2. Méthode "in situ" (d'après Klagsbrun et al., 1977)

On commence par repiquer les cellules dans deux plaques de 24 puits différentes à raison de 50.000 cellules/puits dans 1 ml de milieu; chaque plaque contiendra deux rangées de cellules trypsinisées et deux rangées de cellules papainisées. Il est nécessaire de conserver une des deux plaques pour le dosage de protéines; à cause des problèmes de comptage

spécifiés plus haut.

Le lendemain du repiquage, lorsque les cellules se sont attachées, on peut procéder à l'incubation en présence de thymidine tritiée. Sous la hotte, on ajoute 5 μ l du stock de thymidine radioactive par puits et on mélange doucement. Les puits contrôles ne reçoivent évidemment pas de thymidine tritiée.

Après 24 heures d'incubation, les puits sont décantés et rincés deux fois avec du PBS, ce afin d'enlever la thymidine tritiée qui n'aurait pas été incorporée par les cellules. La fixation des cellules est réalisée avec 1 ml de méthanol pendant trente minutes. Après avoir rincé les cupules à l'eau distillée (deux fois 2 ml par puits), on ajoute du TCA 5 % (2 ml par puits). On effectue enfin un dernier rinçage de chaque puits à l'eau distillée (deux fois 2 ml).

Chacun de ces rinçages doit être réalisé le plus délicatement possible afin de ne pas détacher les cellules. Chaque étape est contrôlée au microscope à contraste de phase. Bien que l'aspect des cellules ait changé suite aux différentes étapes de fixation et rinçage, on constate que les cellules restent parfaitement attachées à leur substrat, tout au long de la méthode, d'où le nom de méthode "in situ".

On récupère les cellules de la façon suivante : on ajoute 250 μ l de NaOH 0,5 N, on attend une minute et on neutralise en ajoutant 250 μ l de HCl 0,5 N. Puis, on agite le milieu avant de prélever le lysat cellulaire de chaque puits et de le déposer dans une fiole avec 5 ml d'Aqualuma. Ensuite, on réalise un comptage du nombre de coups par minute pendant trois minutes grâce à un compteur à scintillation β . On rapporte ces valeurs à celles obtenues pour le dosage de protéines et on obtient ainsi leur nombre de coups par minute (c.p.m.) par μ g de protéines, correspondant à la thymidine tritiée incorporée en phase S du cycle cellulaire.

3.3. Incorporation de Bromodéoxyuridine

La méthode d'incorporation à la thymidine tritiée peut être complétée par une méthode immuno-cytochimique, permettant de visualiser les cellules entrant en phase S du cycle cellulaire. La molécule de bromodéoxyuridine (BrdU) pénètre à l'intérieur des cellules et est

incorporée dans l'ADN en réplication. Ce nucléotide sera reconnu par un anticorps primaire anti-BrdU, lui-même reconnu par un anticorps secondaire, couplé à une molécule fluorescente. On pourra, dès lors, observer au microscope à fluorescence les cellules ayant incorporé de la BrdU. En incubant les cellules pendant des temps différents avec la BrdU, on peut connaître précisément le pourcentage de cellules l'ayant incorporée.

3.3.1. Matériels

- PBS : tampon phosphate 10 mM, NaCl 0,9 % et pH 7,4.
- Tween 20/PBS : le Tween 20 (Merck, Darmstadt, Allemagne) est utilisé à 0,5 % (V/V) dans le PBS.
- BrdU : solution stock de 1 mM dans le PBS (Sigma Chemical, St Louis, USA).
- Acétone (Janssen Chimica, Beerse, Belgique).
- HCl 3 M : préparé à partir d'HCl fumant 12 M (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Anticorps monoclonaux anti-BrdU (Amersham International, UK), dilués 30 fois dans le Tween 20/PBS.
- Anticorps anti-IgG de souris, couplés au Texas-Red (Amersham International, UK), dilués 50 fois dans le Tween 20/PBS.
- Hoechst 33258 : stock de 200 $\mu\text{g/ml}$ qu'on dilue 200 fois dans du tampon phosphate 0,1 M; NaCl 2 M; pH 7,5.
- Solution pour le montage : PBS/glycérol (1:9) à pH 9.
- Lames porte-objet et lamelles couvre-objet (Vel, Belgique).

- Boîtes de Pétri en verre de 35 mm et 15 cm de diamètre.
- Microscope à fluorescence (Dialux 22, Leitz).

3.3.2. Méthode

Les cellules sont repiquées selon les deux méthodes enzymatiques, c'est-à-dire trypsinisées ou papainisées, et ensuite cultivées sur couvre-objet (C.O.) de plastique stérile.

Le lendemain, on incube avec la BrdU ajoutée au milieu pour obtenir une concentration finale de 10 μ M. Après des temps d'incubation déterminés (5 h et 25 h); les cellules sur C.O. sont lavées trois fois dans le PBS à 4 °C et placées dans des boîtes de Pétri en verre avant d'être immergées dans l'acétone pendant cinq minutes. Cette étape permet de fixer et de perméabiliser les cellules, puis les C.O. sont séchés à l'air. On les place alors 30 minutes dans l'HCl 3 M à température ambiante. Ensuite, les C.O. sont lavés trois fois dans le PBS (2 minutes) et placés dans le tween 20/PBS. Dans une grande boîte de Pétri humide, une goutte de 40 μ l de l'anticorps primaire (dilué 30 fois) est déposée sur un parafilm bien plat. Les C.O. sont alors déposés délicatement sur cette goutte, les cellules orientées vers le bas. L'incubation dure pendant une heure à 37 °C. Il s'ensuit trois lavages avec le tween 20/PBS. L'anticorps secondaire (dilué 50 fois) peut alors être appliqué selon la même méthode. L'incubation se déroule cependant à température ambiante, à l'abri de la lumière pendant une heure. Les C.O. sont lavés d'abord avec le tween 20/PBS puis avec le PBS seul.

La coloration totale des noyaux se réalise dans le Hoechst dilué 200 fois, à température ambiante et ce pour une durée de 5 minutes. Après avoir rincé les C.O. avec de l'eau distillée, on peut effectuer le montage sur lame porte-objet.

La totalité des cellules colorées peut être observée grâce à un filtre à fluorescéine pour révéler les noyaux colorés au Hoechst, tandis que les quelques cellules ayant incorporé la BrdU sont observées avec un filtre à rhodamine.

3.4. Clonage

Cette méthode nous permet d'avoir une idée du potentiel prolifératif cellulaire, mais à plus long terme. Pour chaque expérience de clonage, un nombre restreint de cellules (500 cellules) est déposé dans une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre; chacune d'elles a donc la possibilité de s'attacher et éventuellement de se diviser. Les cellules sont incubées pendant dix jours et les cellules qui se sont divisées, ont donné lieu à un clone. La deuxième étape consiste à fixer puis colorer les cellules, pour estimer le nombre de clones et leur taille.

3.4.1. Culture de cellules

Au départ, une boîte T75 est repiquée à la trypsine (voir point 1.1.1.) et une autre, à la papaïne (voir point 1.1.2.). Un comptage décrit au point 1.1.1. est effectué à ce niveau, afin d'estimer le nombre de cellules présentes dans chacune des boîtes. Diverses dilutions sont alors réalisées pour arriver au nombre requis de cellules (500). Avant de déposer la goutte de la suspension cellulaire, les boîtes de Pétri sont remplies de 2 ml de milieu de culture, habituellement utilisé. Cette précaution est prise pour faciliter la dispersion des cellules et pour éviter qu'elles ne s'attachent toutes au même endroit. Avant de placer les boîtes de Pétri dans l'étuve à 37 °C contenant 8 % de CO₂, on tâche d'homogénéiser au mieux la répartition cellulaire par une légère agitation à la main. Les cellules sont régulièrement observées au microscope optique et le dixième jour, elles subissent la fixation et la coloration.

3.4.2. Coloration au bleu de Coomassie

3.4.2.1. Matériels

- PBS : tampon phosphate 10 mM contenant du NaCl 0,9 % et à pH 7,4.
- Paraformaldéhyde : paraformaldéhyde 3,7 % (Merck, Darmstadt, Allemagne) dans le tampon PBS. Il est conseillé de faire bouillir la solution afin d'obtenir une parfaite dissolution.

- Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).

- Bleu de Coomassie 0,1 % : 0,05 g de bleu de Coomassie (Janssen Chimica, Beerse, Belgique) dilué dans 4,7 ml d'acide acétique (Merck, Darmstadt, Allemagne) et auquel on ajoute 22,7 ml d'éthanol absolu ainsi que 22,7 ml d'eau distillée.

3.4.2.2. Méthodes

A. Fixation

Après avoir décanté délicatement les boîtes de Pétri, on les rince deux fois avec 2 ml de PBS. On recouvre ensuite les cellules avec 2 ml de paraformaldéhyde 3,7 %/PBS durant 10 minutes. Lorsque le temps s'est écoulé, les boîtes sont décantées et recouvertes avec 2 ml d'éthanol 70 % pendant 10 minutes. On décante au maximum l'éthanol et les boîtes sont mises à sécher à 37 °C.

B. Coloration

Le colorant est filtré sur papier Whatman (filtres Whatman GF/C, 2,5 cm; Grande-Bretagne) avant son utilisation. On colore les cellules grâce à 1 ml de bleu de Coomassie pendant 35 secondes. Puis elles sont rincées deux fois à l'eau distillée. Les plaques de Pétri sont mises à sécher, puis examinées au microscope à fonds clair (Dialux 22, Leitz), pour évaluer le nombre et la taille des clones pour chaque plaque de Pétri. On détermine le nombre de cellules par clone pour une quarantaine de clones; puis on calcule le nombre de divisions y correspondant. On compte le nombre de clones ayant subi le même nombre de divisions. Les résultats obtenus sont exprimés sur un graphe représentant la proportion des clones (en %) en fonction de la taille des clones exprimée en nombre de divisions.

4. Préparation des cellules pour la microscopie électronique

4.1. Matériels

- Tampon cacodylate 0,1 M; pH 7,4 (Sigma Chemical, St Louis, USA).
- Glutaraldéhyde 2,5 % dans le tampon cacodylate 0,1 M; pH 7,4 (Fluka, Italie).
- Tétroxyde d'osmium 0,5 % dans le tampon cacodylate 0,1 M; pH 7,4 (Sigma Chemical, St Louis, USA).
- Ethanol 70° (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Ethanol 90° (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Ethanol absolu (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Epon pur; pour 100 ml :
 - 59,01 g d'Epon (TAAB, Berks)
 - 25 g de DDSA (TAAB, Berks)
 - 34,24 g de MNA (TAAB, Berks)
 - 1,5 g d'accélérateur (N-Benzuldiméthylamine) (Fluka, Italie).

4.2. Méthode

Les cellules sont décantées puis rincées au tampon cacodylate 0,1 M; pH 7,4 dans la glace. Elles sont ensuite fixées 1 h 30 à 4° C, par de la glutaraldéhyde à 2,5 % dans du tampon cacodylate 0,1 M; pH 7,4. Cette fixation est suivie de trois rinçages (1 min. à 4° C) dans le tampon cacodylate, puis les cellules sont postfixées en présence de téroxyde d'osmium à 0,5 % pendant 1 heure, toujours dans la glace. Trois nouveaux rinçages avec le tampon cacodylate sont alors effectués avant la déshydratation dans des solutions à concentration croissante en éthanol, à raison de 3 répétitions de 1 à 2 min. pour les deux plus faibles concentrations (4° C). L'alcool absolu peut être déposé à température ambiante, en

répétant trois fois 10 min. la manipulation. Les cellules sont décantées puis rincées avec l'Epon pur durant 30 min. à 37°C. Celui-ci est évacuée et les boîtes sont alors remplies avec de l'Epon et mises à l'étuve pendant 3 jours à 60°C, pour l'enrobage définitif.

Après polymérisation des échantillons, ceux-ci sont préparés pour l'observation au microscope électronique à transmission. Les coupes ultrafines, de 400 à 500 Å, sont réalisées sur un ultramicrotome LKB NOVA, puis contrastées avec de l'acétate d'uranyle à 1 % en solution alcoolique et une solution de Reynolds, à base de citrate de plomb. Les grilles sont ensuite observées et photographiées au microscope MBLE Philips EM301.

5. Dosage de l'activité de la papaïne

On a choisi une méthode qui fait intervenir un substrat au départ non fluorescent, susceptible d'être clivé par la papaïne et qui dès lors, libère une molécule fluorescente que l'on quantifie au spectrofluorimètre.

5.1. Matériels

- Tampon A :

- KH_2PO_4 88 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - Na_2HPO_4 12 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - DTT (dithiothréitol) (Sigma Chemical, St Louis, USA)
 - EDTA 2 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- mettre à pH 6,00.

- Acide iodoacétique : acide iodoacétique 3 mM (Sigma Chemical, St Louis, USA) pour stopper la réaction.

- Substrat : Z-Arg-AMC . HCl (Benzyloxycarbonyl-L-arginine-7-amino-4-méthylcoumarin) (Bachem Feinchemikalien A.G., Suisse).

- Préparer une solution stock 11,25 mM dans du DMF (Janssen Chimica, Beerse,

Belgique). Stocker à 4 °C après avoir aliquoté en fractions de 200 μ l.

- Préparer fraîchement la solution substrat du dosage en diluant 50 fois la solution stock dans le tampon A.

- Tampon PBS/Dulbecco pour papaïne : voir point 1.1.2.1.

- Solution stock de papaïne : papaïne 0,5 % diluée dans l'eau (P-4762 Sigma Chemical, St Louis, USA).

- Etalon : AMC ou 7-amino-4-méthylcoumarin (Bachem Feinchemikalien A.G., Suisse).
 - Préparer une solution stock 9 mM dans du DMF.
 - Préparer fraîchement la solution étalon en diluant 150 fois le stock dans un mélange composé de :
 - 1 V de tampon PBS/Dulbecco, dilué 10 fois
 - 4 V de tampon A
 - 10 V d'acide iodoacétique 3 mM.

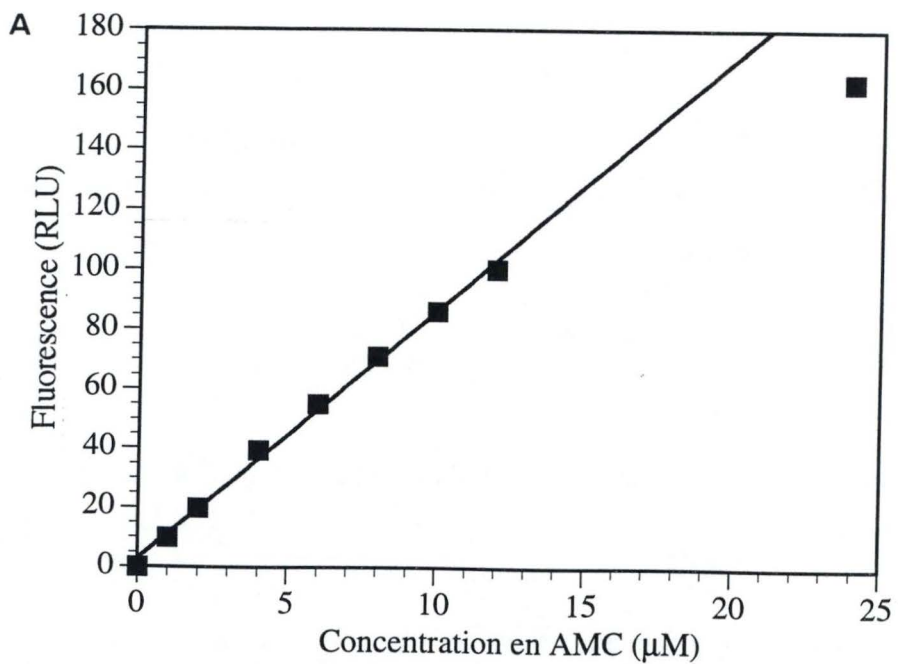
On obtient ainsi une solution 60 μ M en AMC de laquelle on part pour réaliser la droite d'étalonnage.

5.2. Méthodes

5.2.1. Droite d'étalonnage de l'AMC

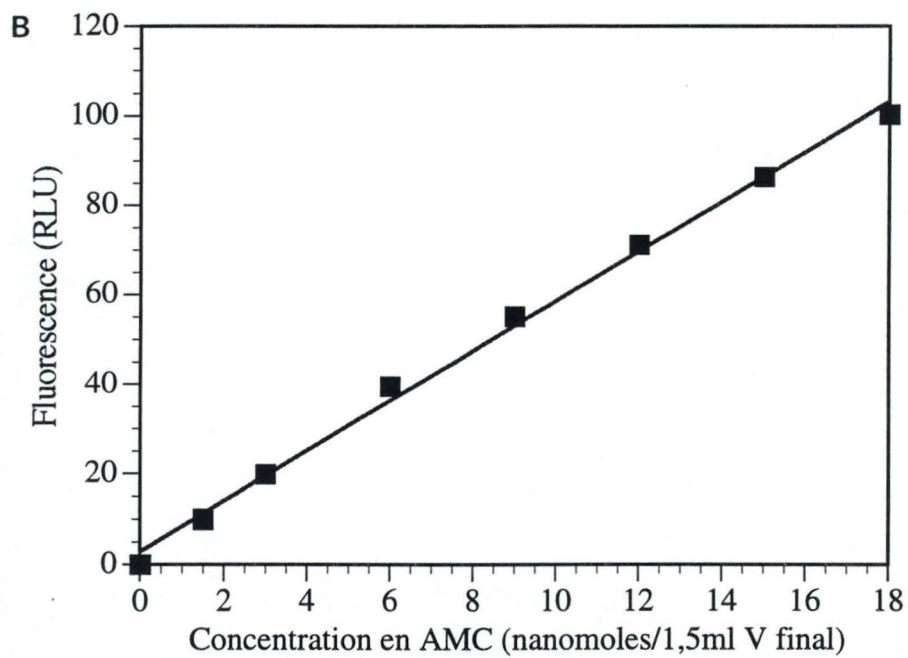
On pèse 1,577 mg d'AMC et on les dilue dans 1 ml de DMF pour arriver à la solution stock de 9 mM. On prépare juste avant l'emploi une solution de 60 μ M, en partant de la solution stock et en la diluant 150 fois dans le mélange décrit ci-dessus. Les différentes concentrations testées (0 μ M; 0,25 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M; 3 μ M; 6 μ M; 12 μ M; 24 μ M) sont réalisées en triple; on y arrive en prenant la solution de 60 μ M et en la diluant dans le mélange. On lit ensuite au spectrofluorimètre (SFM 25) (Kontron A.G., Zürich, Suisse) avec

- longueur d'onde d'excitation = 350 nm
- longueur d'onde d'émission = 440 nm



$$f(x) = 8,358886E+0 * x + 2,833489E+0$$

$$R^2 = 9,962293E-1$$



$$f(x) = 5,572591E+0 * x + 2,833489E+0$$

$$R^2 = 9,962293E-1$$

Figure II.1. : Droite d'étalonnage de l'AMC : a) en μM
 b) en nmoles/1,5 ml

- sensibilité = 220 V

Calculs :

- les concentrations en μM de l'étalon AMC sont converties en nanomoles dans 1,5 ml de volume final;
- la droite d'étalonnage de la fluorescence en fonction des concentrations en AMC est établie, avec une équation correspondante : $y = ax + b$ où y représente la fluorescence relative de l'étalon moins la fluorescence relative des blancs, et x représente les concentrations de l'étalon (en nmoles/1,5 ml). Cette formule servira pour la suite des calculs (figure II.1.).

5.2.2. Dosage de la papaïne

Tout d'abord, on prépare soit les différentes concentrations en papaïne, soit de la papaïne en présence de différentes concentrations en inhibiteurs, avec une concentration fixe en enzyme (0,00025 %). Ensuite de 30 en 30 sec, on place dans des tubes de polystyrène contenant 400 μl de solution substrat, 100 μl d'échantillon (soit papaïne seule, soit papaïne + inhibiteur). Le blanc est réalisé de la même manière, mais en mettant 100 μl de tampon pour papaïne, dilué 10 fois.

On incube immédiatement les tubes pendant 3 heures dans un bain à 30°C. Après exactement 3 heures, on arrête la réaction en ajoutant dans chaque tube 1 ml d'acide iodoacétique 3 mM. Les lectures se font au fluorimètre (SFM 25) (Kontron A.G., Zürich, Suisse) avec

- longueur d'onde d'excitation = 350 nm

- longueur d'onde d'émission = 440 nm

- sensibilité = 220 V

Calculs :

- 1 mU de papaïne = quantité d'enzyme dégradant une nanomole de substrat par minute à 30°C.
- A partir de la droite d'étalonnage $y = ax + b$, décrite au point précédent, on peut estimer la quantité d'AMC clivée pour chaque échantillon de papaïne à doser, à partir du substrat et donc calculer l'activité enzymatique selon la formule suivante :

$$\text{Activité enzymatique (mU/ml)} = \frac{(\text{FR} - \text{bl}) - b}{a} \times \text{dilution enzyme} \times \frac{1}{180} \times \frac{1}{1,5}$$

avec : FR = fluorescence relative obtenue pour l'échantillon à doser

bl = fluorescence relative correspondant au blanc

a = pente de la droite d'étalonnage

b = ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage

dilution enzyme = 15 fois (100 μ l d'enzyme dans un volume final de 1,5 ml)

180 = 180 minutes ou trois heures d'incubation.

RESULTATS

Composants	Concentration (10 fois)
KCl	2 g/l
KH ₂ PO ₄	2 g/l
NaCl	80 g/l
Na ₂ HPO ₄	11,5 g/l
Glucose	10 g/l
Acide pyruvique	0,36 g/l
	pH 7,2

Tableau III.1. : Composition du tampon PBS/Dulbecco (10 fois concentré), utilisé pour dissoudre le stock de papaïne (0,5% dans l'eau distillée)

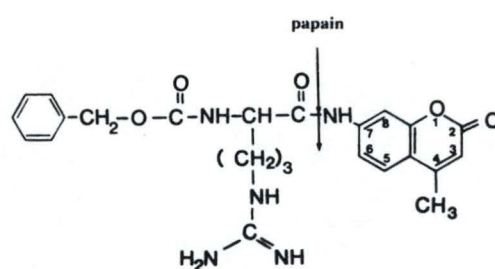


Figure III.1. : Le lien amide entre le benzyloxycarbonyl-L-arginine et 7-amino-4-méthylcoumarin est hydrolysé par la papaïne (d'après Hsieh, 1984)

1. Mise au point du dosage de la papaïne

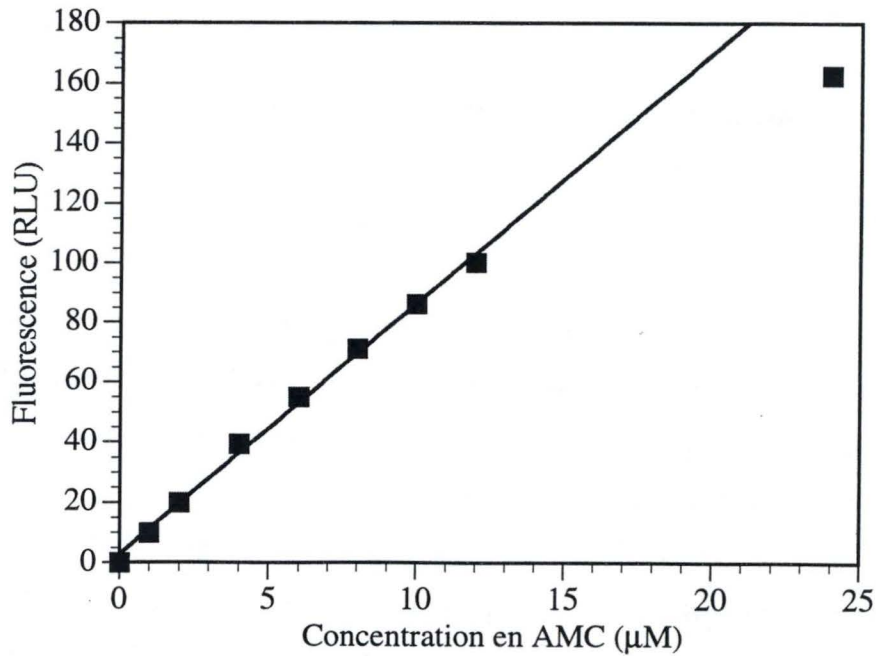
1.1. Choix du tampon

La première difficulté qu'on a rencontrée et à laquelle on ne s'attendait pas, était la dissolution de la papaïne. En plus, dans notre cas, le problème posé était particulièrement complexe puisqu'il s'agissait de trouver un milieu de dissolution, convenant à la fois aux cellules, à la papaïne et au dosage de son activité.

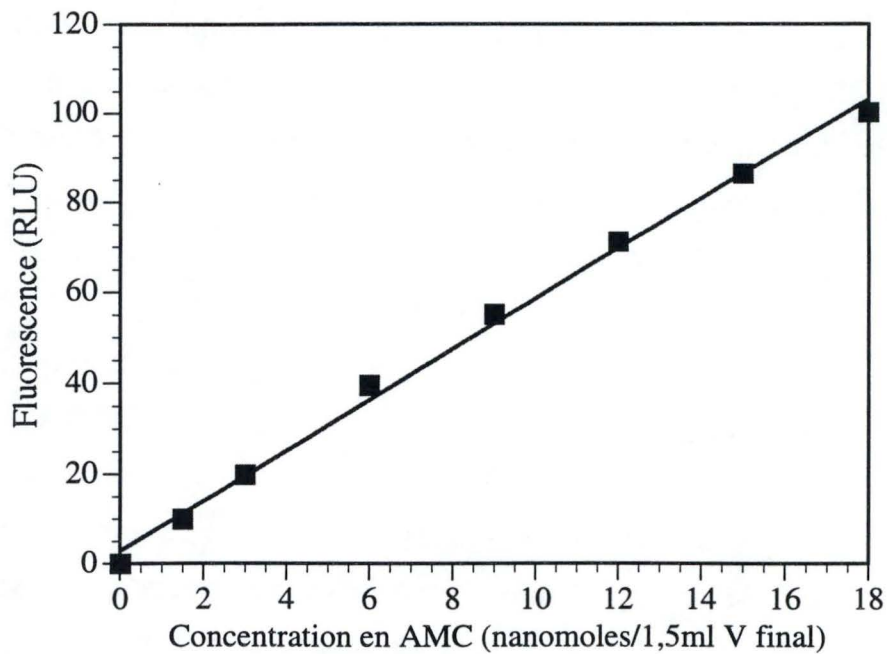
Les premiers essais de dissolution de l'enzyme se sont faits dans du milieu de culture sans sérum, dans du PBS, dans le tampon utilisé pour la trypsine (tableau I.9.); on a obtenu à chaque fois une précipitation. Finalement, on est arrivé à la conclusion que pour obtenir une dissolution parfaite, il fallait partir d'un stock 0,5 % de papaïne dans de l'eau distillée. Après avoir essayé plusieurs tampons classiquement utilisés en biologie cellulaire, notre choix définitif s'est porté sur le tampon décrit au point 1.1.2.1. des matériels et méthodes et repris (10 fois concentré) dans le tableau III.1.. Mais comme signalé précédemment, il est impératif de dissoudre préalablement la papaïne dans l'eau (0,5%) avant l'utilisation du tampon PBS/Dulbecco pour effectuer les dilutions requises. En procédant de la sorte, on est parvenu à éviter les problèmes de précipitation. Comme on le verra, ce tampon convient aussi bien pour les expériences en culture cellulaire, que pour le dosage biochimique ou encore pour la dilution des inhibiteurs.

1.2. Dosage de la papaïne

Avant de tester la papaïne sur les cultures de cellules, on a voulu avoir une idée plus précise de l'activité de la papaïne. Pour ce faire, un dosage biochimique basé sur un substrat au départ non fluorescent, a été mis au point; le substrat non fluorescent est clivé par la papaïne à un endroit précis et libère ainsi une molécule fluorescente : l'AMC (7-amino-4-méthylcoumarin) (figure III.1.). Grâce au spectrofluorimètre, il est possible d'évaluer la quantité d'AMC libérée à partir du substrat et donc de mesurer l'activité de la papaïne présente dans l'échantillon, grâce à une droite d'étalonnage préalablement établie. Cette méthode est comparable à celle utilisée au laboratoire pour le dosage de la cathepsine B

a

$$f(x) = 8,358886E+0*x + 2,833489E+0$$
$$R^2 = 9,962293E-1$$

b

$$f(x) = 5,572591E+0*x + 2,833489E+0$$
$$R^2 = 9,962293E-1$$

Figure III.2. : Droite d'étalonnage de l'AMC. En A, la fluorescence (RLU) est exprimée en fonction de la concentration finale de l'AMC dans la cuvette (en μM). En B, on a exprimé la concentration en nmoles/volume réactionnel. Chaque point correspond à la moyenne de trois mesures plus ou moins un écart-type

(Lecomte et al., 1994). Plusieurs substrats de départ sont proposés pour la papaïne (D-QVVA-AMC, L-QVVA-AMC, GlcA-L-QVVA-AMC,...) (Serveau et al., 1994). Notre choix s'est porté sur le plus simple de tous : Z-Arg-AMC (benzyloxycarbonyl-L-arginine-7-amino-4-méthylcoumarin). A cause de son insolubilité dans l'eau, le substrat est initialement dissous dans le DMF.

La première étape dans la mise au point du dosage de la papaïne a donc consisté à établir une droite d'étalonnage pour le produit réactionnel, l'AMC.

1.2.1. Droite d'étalonnage en AMC

Différentes concentrations en AMC (de 0 à 18 nmoles/volume réactionnel de 1,5 ml) ont été préparées et la fluorescence mesurée dans les conditions décrites au point 6.2.1. des matériels et méthodes.

La figure III.2. représente la droite d'étalonnage obtenue. La figure nous informe sur la fluorescence en fonction des concentrations en AMC exprimées en μM (A) et en nanomoles dans 1,5 ml de volume réactionnel final (B).

L'équation de la droite obtenue après régression linéaire (figure III.2.B.), va nous permettre de connaître l'activité enzymatique (en mU/ml) dans une préparation de papaïne à partir de la fluorescence relative correspondant à l'échantillon. Les calculs détaillés pour y parvenir sont précisés dans les matériels et méthodes au point 6.2.2..

Signalons que chaque concentration en AMC a été réalisée en triple, mais que les valeurs obtenues pour les écart-types sont trop faibles pour être visualisées sur les graphes. Le dosage de l'AMC est donc très reproductible.

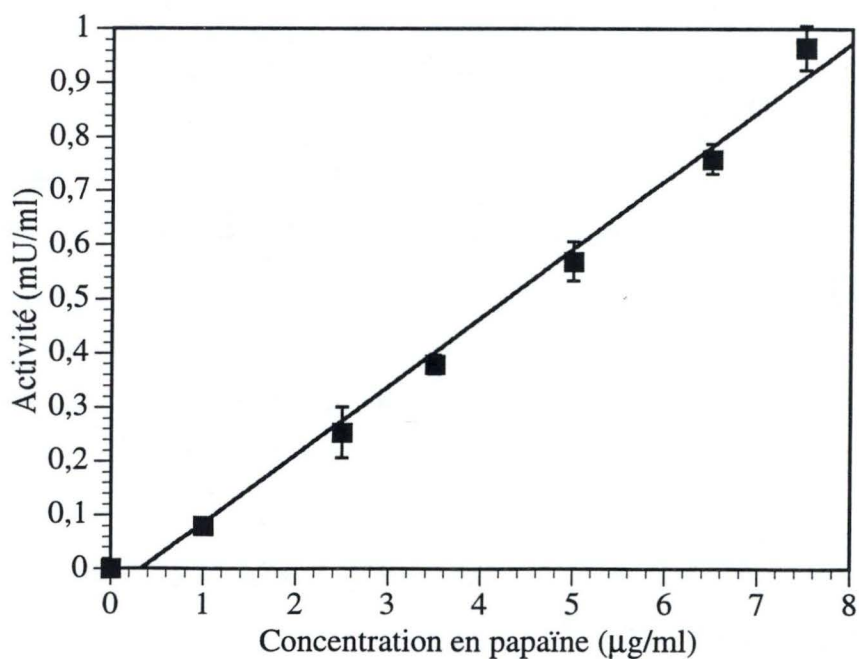


Figure III.3. : Activité de la papaïne en fonction de la concentration de l'enzyme

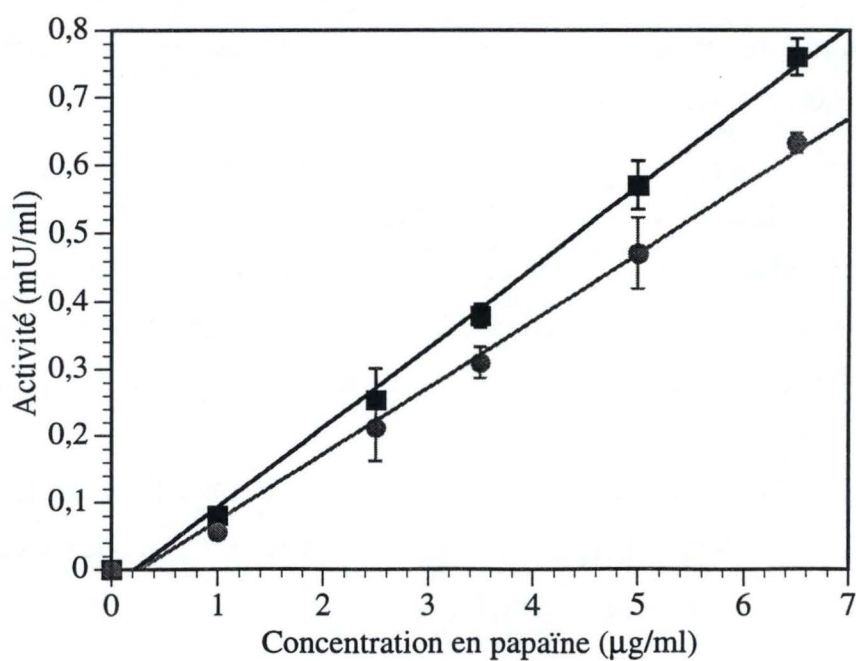


Figure III.4. : Activité de la papaïne en fonction de la concentration de l'enzyme, pour de la papaïne fraîche (■) et congelée à - 20°C (●) dans de l'eau

1.2.2. Dosage de l'activité enzymatique

1.2.2.1. Papaine fraîche

Après avoir établi la courbe d'étalonnage en AMC, on a voulu doser la papaine. Pour ce faire, différentes concentrations de papaine (de 0 à 7,5 $\mu\text{g/ml}$) ont été mises en présence du substrat Z-Arg-AMC. L'AMC obtenu par clivage est alors déterminé par fluorimétrie comme décrit au point 6.2.2. des matériels et méthodes.

Comme indiqué à la figure III.3., l'activité exprimée en mU/ml, augmente bien de manière linéaire en fonction de la concentration en papaine. On observe que 1 μg de papaine correspond à un peu moins de 0,1 mU en activité enzymatique.

1.2.2.2. Effet du stockage à froid

Dans la méthode traditionnelle de repiquage à la trypsine, il est courant de congeler celle-ci à -20°C dans son tampon. On décongèle la trypsine lors de chaque utilisation et le reste de trypsine est de nouveau remplacé au congélateur à la fin de la manipulation. Un tube de trypsine peut ainsi subir jusqu'à cinq cycles de congélation-décongélation.

On a donc voulu savoir si la papaine résistait à un tel traitement. Il est possible grâce au dosage biochimique, de vérifier si il y a eu ou non perte d'activité de la protéase lors de la congélation. Pour ce faire, on réalise une solution stock de 0,5 % de papaine diluée dans l'eau et on la congèle à -20°C . En partant du stock décongelé, on utilise le tampon PBS/Dulbecco pour arriver aux différentes concentrations à tester (1 $\mu\text{g/ml}$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$; 3,5 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 6,5 $\mu\text{g/ml}$). La lecture se fait au spectrofluorimètre, les résultats sont calculés en mU/ml et mis sur le même graphe que pour la papaine fraîche (figure III.4.). On constate effectivement une légère perte d'activité de la papaine lorsque celle-ci a été préalablement congelée. Cette perte d'activité correspond à plus ou moins 12,6 % de l'activité initiale. Il serait intéressant de vérifier si cette perte d'activité enzymatique s'accroît après plusieurs décongélation successives.

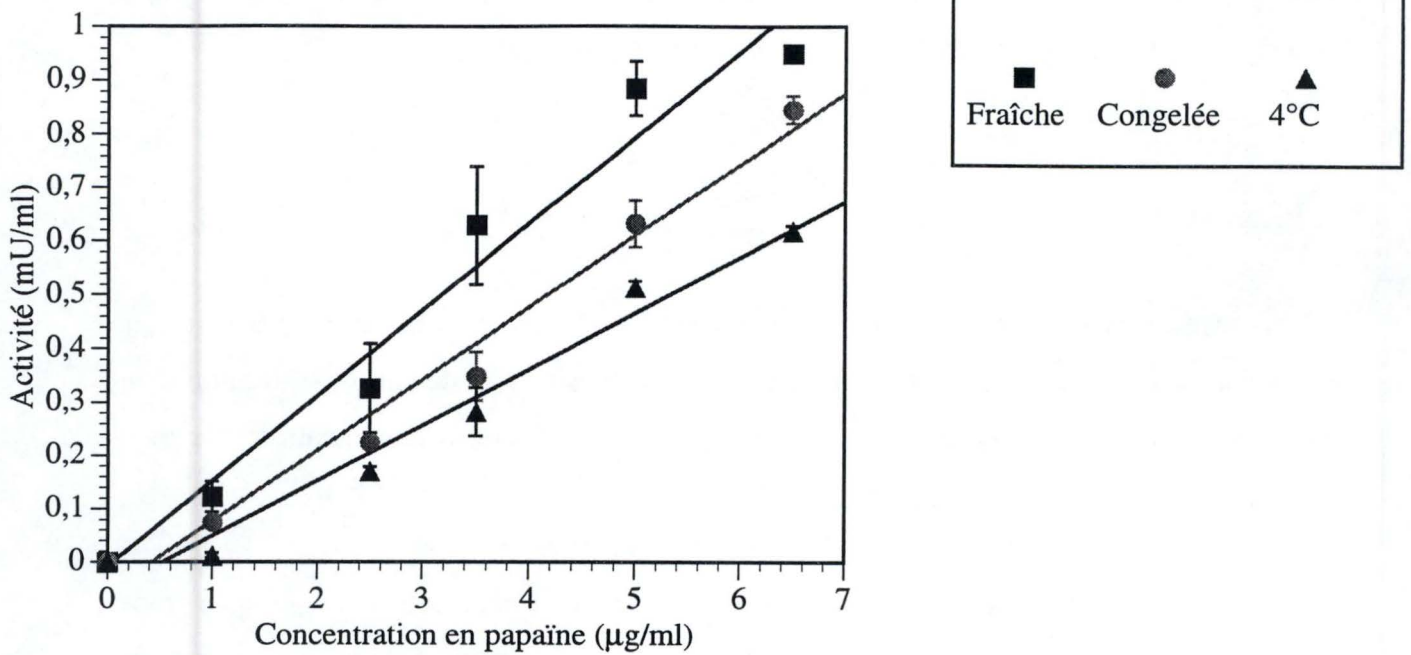


Figure III.5. : Effets comparatifs d'un stockage pendant 24 heures à -20°C (●) et à 4°C (▲) sur l'activité enzymatique de diverses concentrations en papaïne, dissoute dans le PBS/Dulbecco. Des échantillons de papaïne fraîche ont également été dosés (■)

Dans l'expérience signalée ci-dessus, la papaïne était congelée dans l'eau. On a répété l'expérience, en congelant la papaïne non plus dans l'eau comme précédemment, mais dans le tampon PBS/Dulbecco prévu spécialement pour la dilution de l'enzyme. On a également voulu vérifier l'effet d'un stockage à 4 °C.

On réalise en parallèle trois séries de 6 concentrations + 1 blanc : on pèse la papaïne pour arriver à 0,5 % dans l'eau. Ce stock servira de point de départ aux trois séries à la fois; grâce au tampon pour papaïne, on dilue le stock venant d'être préparé, pour arriver aux concentrations voulues (1 µg/ml; 2,5 µg/ml; 3,5 µg/ml; 5 µg/ml; 6,5 µg/ml) identiques pour les trois tests. La première série d'échantillons peut être testée directement (100 µl d'échantillon dans 400 µl de substrat, attendre trois heures à 30 °C puis stopper avec 1 ml d'acide iodoacétique 3 mM et lire au spectrofluorimètre) et correspond à la courbe de la papaïne fraîche. La deuxième série des différentes concentrations est placée au congélateur à - 20 °C, tandis que la troisième est rangée au réfrigérateur à 4 °C, pendant 24 heures.

Le lendemain, on sort les deux séries d'échantillons à tester du congélateur et du réfrigérateur et on attend qu'elles soient revenues à la température ambiante afin d'optimiser l'activité enzymatique. La suite de l'expérience se déroule exactement de la même manière que pour la série préparée fraîchement. Ayant été préparées et testées de façon tout à fait identique, les trois séries d'échantillons peuvent être comparées l'une par rapport à l'autre (figure III.5.). On constate que c'est lorsque la papaïne est maintenue à 4 °C qu'elle s'inactive le plus. Cette perte d'activité se marque nettement moins pour la série d'échantillons placée à - 20 °C. Si on compare la perte d'activité enregistrée pour la papaïne congelée dans le tampon PBS/Dulbecco (figure III.5.), à celle enregistrée pour l'enzyme congelée dans l'eau (figure III.4.), il ne semble pas y avoir de différence significative.

2. Essais préliminaires de papaïnisation avec inhibition par le sérum

Ayant mis au point les dosages biochimiques de l'enzyme, on a voulu voir si la papaïne était bien capable de détacher les cellules.

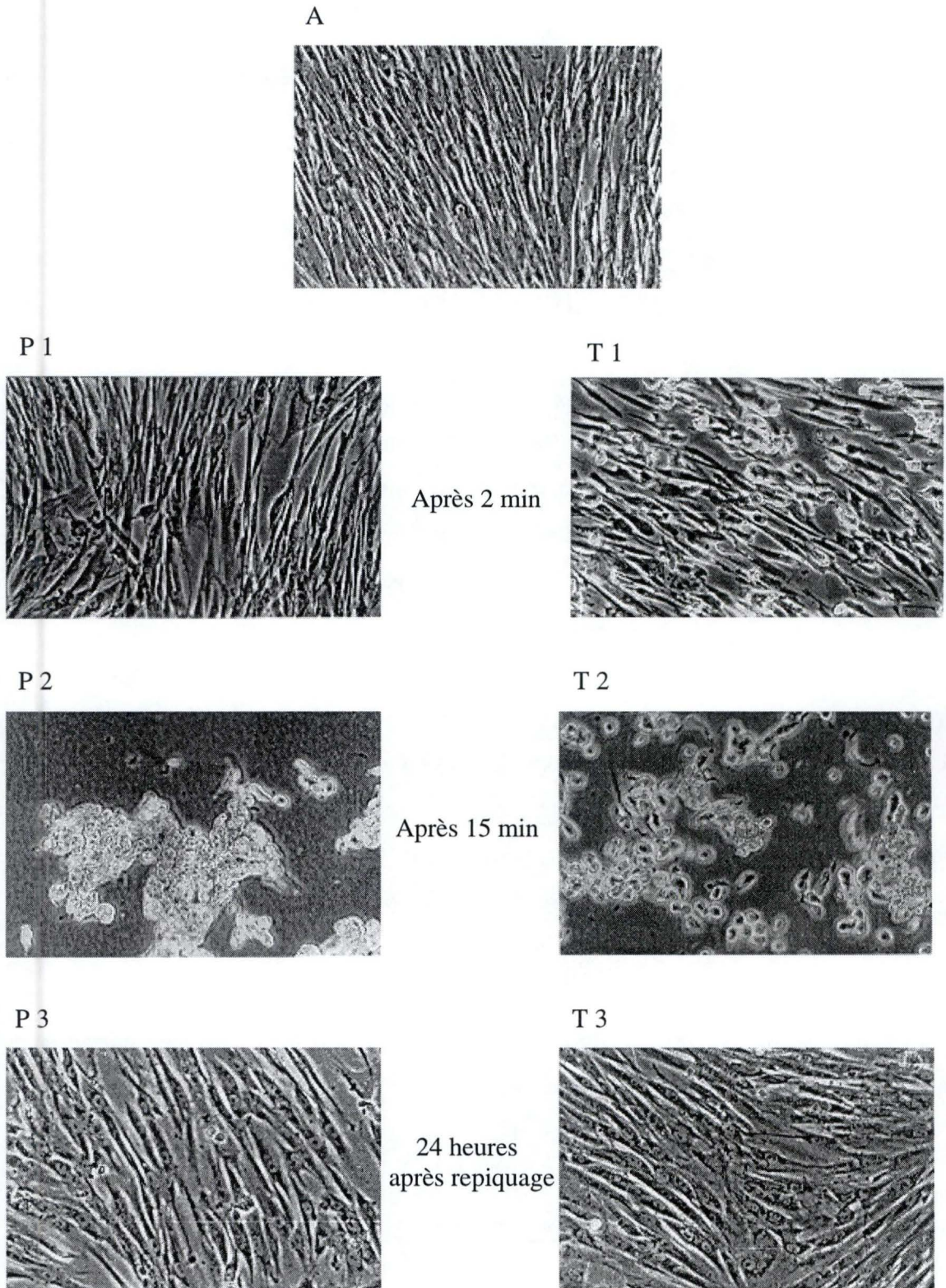


Figure III.6. : Morphologie des cellules en microscopie photonique à contraste de phase, avant le repiquage (A), en cours de papainisation avec de la papaïne à 0,0625 % (P) et en cours de trypsinisation classique (T), après 2 minutes (P1 et T1), 15 minutes (P2 et T2) de traitement enzymatique, et 24 heures après le repiquage (P3 et T3) (x 160)

2.1. Mise au point des conditions de papaïnisation

La méthode de repiquage traditionnelle avec la trypsine est instaurée depuis pas mal d'années maintenant. Son mode d'utilisation ne soulève donc plus beaucoup de questions : la concentration en trypsine à utiliser est standardisée et le temps qu'elle prend pour détacher les cellules adapté de manière empirique à chaque lignée cellulaire. Disposant de très peu de données sur la papaïne, on a donc commencé par réaliser plusieurs essais afin de définir les conditions de repiquage à la papaïne. Pour ce faire, on n'a fait intervenir aucun facteur supplémentaire par rapport aux cellules trypsinisées mis à part la "nouvelle" protéase. Cela signifie que dans ces premières expériences, on a continué à utiliser le sérum contenant l' α_2 -macroglobuline, pour inhiber la papaïne.

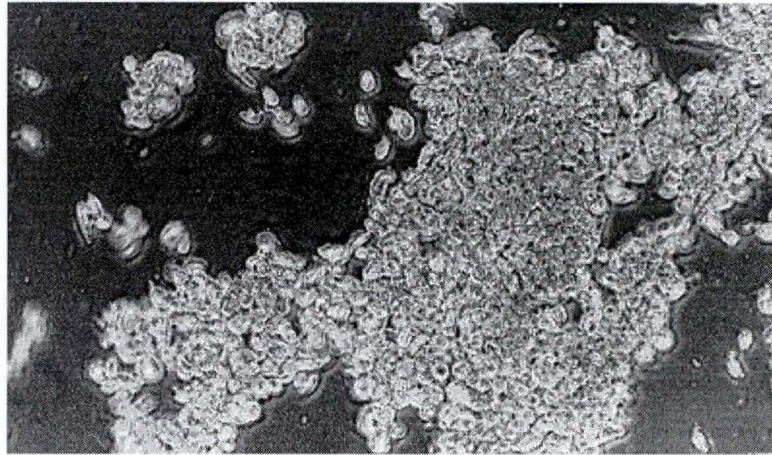
2.1.1. Concentrations testées en papaïne

La papaïne a été testée à diverses concentrations, les dilutions étant réalisées à partir d'un stock de 0,5 % en enzyme diluée dans l'eau, auquel on ajoute le tampon PBS/Dulbecco (10 fois concentré) dilué 10 fois dans le volume final. La première concentration testée est celle de 0,0625 % : après avoir vidé le milieu de culture d'une boîte de cellules MRC-5 confluentes, on les rince dans du milieu sans sérum avant d'ajouter 2 ml de cette concentration en papaïne qu'on laisse agir pendant deux minutes. Puis on décante presque toute la solution avant de placer la boîte durant 13 minutes dans l'étuve à 37 °C. L'enzyme est ensuite inhibée avec 10 ml de milieu de culture, enrichi en sérum 10 %. Les concentrations suivantes ont également été testées : 0,03125 %; 0,0156 %; 0,004 %; 0,002 %; et 0,001 %; cependant, pour ces concentrations plus faibles, on a constaté qu'il fallait laisser agir la papaïne plus longtemps (20 minutes) pour pouvoir détacher les cellules.

On a rapidement constaté que la papaïne détachait bien les cellules MRC-5, mais avec des différences par rapport à la trypsine. Comme illustré dans la figure III.6., on a suivi au microscope à contraste de phase les cellules en cours de papaïnisation (P1, P2 et P3), avec de la papaïne à 0,0625 %. On a fait de même pour des cellules trypsinisées selon la méthode classique (T1, T2 et T3). La première photo (A) montre l'aspect de cellules confluentes (MRC-5) juste avant leur repiquage. Les cellules incubées avec de la trypsine présentent déjà

A

Après 15 min



B

24 heures après repiquage



Figure III.7. : Morphologie des cellules en microscopie photonique à contraste de phase, en cours de papainisation avec de la papaïne à 0,03125 % après 15 minutes (A) de traitement enzymatique et 24 heures après le repiquage (B) (x 160)

au bout de deux minutes, un changement de forme : elles commencent à se rétracter et certaines s'arrondissent (T1). Ce changement n'est cependant pas observé pour les cellules papainisées qui gardent leur forme initiale (P1). Lorsque la boîte contenant les cellules papainisées est sortie de l'étuve après 15 minutes, elle est de nouveau observée au microscope. On constate que ces cellules se détachent par paquets (P2), contrairement aux fibroblastes trypsinisés qui se libèrent du support de façon beaucoup plus individuelle (T2). 24 heures après le repiquage, les cellules papainisées à 0,0625 % se sont attachées au nouveau support aussi bien que les cellules trypsinisées (P3 et T3).

Dans un deuxième temps, on a essayé des concentrations plus faibles en papaine. Pour la papaine à 0,03125 %, le temps d'incubation de la boîte, à l'étuve à 37 °C a dû être allongé pour permettre le détachement des cellules. Sinon, elles se regroupent comme décrit précédemment en paquets plus conséquents (figure III.7.). On peut faire les mêmes constatations pour les cellules papainisées à 0,0156 %. Celles-ci se réattachent après 24 heures de manière équivalente aux cellules traitées à la trypsine pour un repiquage en quatre (résultats non montrés). Pour la papaine à 0,004 %, il reste des fibroblastes MRC-5 toujours adhérents après l'action de la papaine, on parvient cependant à les détacher après agitation à la pipette Pasteur du milieu de culture (résultats non montrés). Enfin, les deux concentrations plus faibles testées (0,002 % et 0,001 %) ne parviennent plus à détacher l'entièreté des cellules confluentes, qui restent en grande majorité attachées au support (figure III.8. A et B), même après agitation à la pipette Pasteur (figure III.8. C et D). On décide donc d'abandonner ces deux dernières concentrations non satisfaisantes.

Pour la suite du travail, on a donc choisi de travailler à une concentration en papaine intermédiaire, pour laquelle on observe un bon détachement cellulaire après 20 minutes, soit la papaine 0,005 %.

Remarquons que la concentration choisie en papaine (0,005 %) est 50 fois inférieure à celle habituellement utilisée en trypsine (0,25 %) lors d'un repiquage classique.

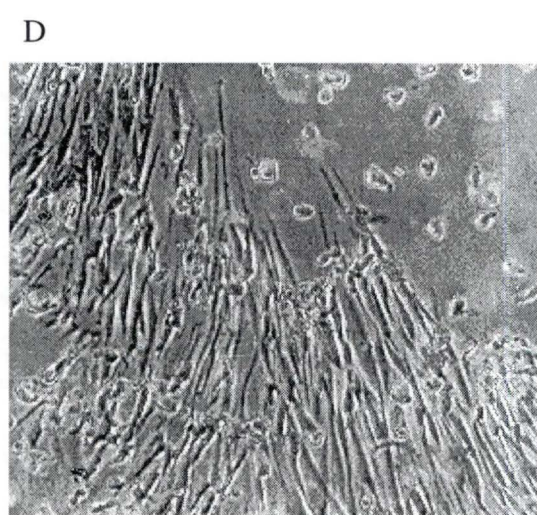
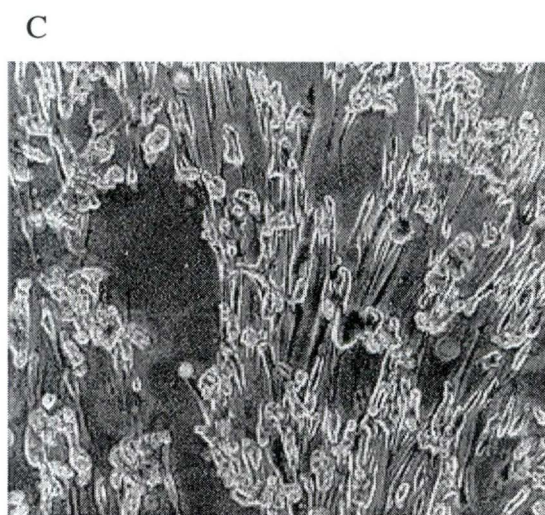
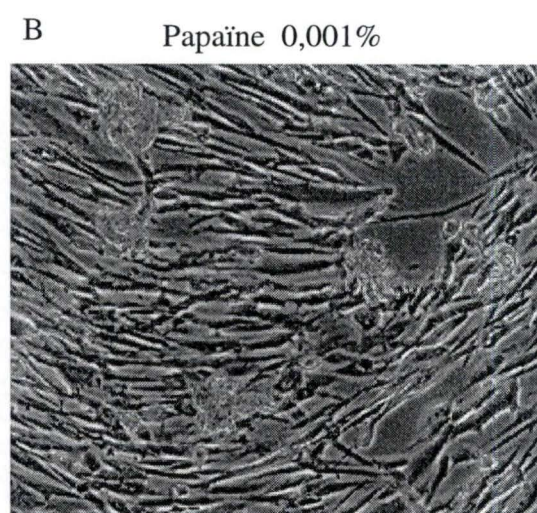
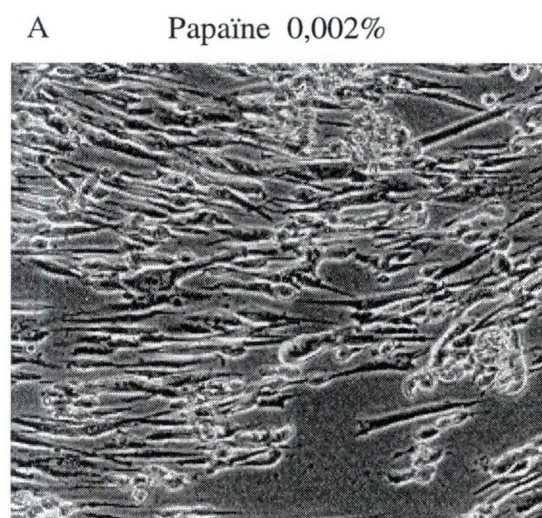


Figure III.8. : Morphologie des cellules en microscopie photonique à contraste de phase, après 20 minutes de papainisation avec de la papaine à 0,002 % (A) et 0,001 % (B). Après récolte des cellules détachées, les cellules restées adhérentes ont été photographiées pour les deux traitements (C et D) (x 160)

2.1.2. Avec ou sans EDTA

La molécule d'EDTA sert de chélateur aux ions calcium et permet de faciliter le détachement cellulaire, puisque ces ions sont reconnus pour intervenir dans l'attachement des cellules au substrat et entre elles. C'est un additif classique rajouté à la trypsine, pour les cellules plus récalcitrantes à se détacher (voir au point 2.2. de l'introduction). C'est donc naturellement qu'on a pensé à utiliser l'EDTA de concert avec la papaïne, entre autres pour diminuer éventuellement les concentrations en papaïne. Différentes concentrations en papaïne ont été testées en présence d'EDTA 0,5 mM : 0,03125 %; 0,0156 % et 0,004 %. Le détachement se passe aussi bien qu'au point précédent mais l'avantage se situe au niveau du temps d'incubation qui est raccourci de 10 minutes. Cependant, en suivant les cellules 24 et 48 heures après le repiquage, les résultats sont un peu décevants : observés au microscope, les fibroblastes semblent moins bien proliférer. D'un autre côté, comme on le verra au paragraphe suivant, le test de cytotoxicité réalisé sur les cellules papaïnisées en présence d'EDTA ne montre aucune différence par rapport à celles papaïnisées sans trace d'EDTA ou celles repiquées à la trypsine (graphes au point 2.2.3.). Cette observation paraît donc en contradiction avec le ralentissement prolifératif constaté au microscope pour des cellules cultivées dans des boîtes de culture de 25 cm². On a décidé de ne pas utiliser de l'EDTA dans les préparations de papaïne, puisque de toute façon, on n'observait pas une amélioration spectaculaire du détachement cellulaire.

2.2. Cytotoxicité de la papaïne

Si la papaïne détache bien les cellules, il nous a semblé évident de devoir vérifier la cytotoxicité éventuelle de l'enzyme. On a d'abord voulu évaluer la cytotoxicité à court terme. Pour ce faire, on a fait appel à plusieurs méthodes complémentaires.

2.2.1. Evaluation de la cytotoxicité immédiate de la papaïne par la méthode au bromure d'éthidium et acridine orange

Le premier test de cytotoxicité effectué est celui au bromure d'éthidium/acridine

orange décrit au point 2.1. des matériels et méthodes. Ce test est réalisé sur une goutte de la suspension cellulaire venant d'être papaïnisée, à laquelle on a ajouté une goutte de la solution des deux colorants. Au microscope à fluorescence, on peut différencier les cellules vivantes colorées en vert ayant incorporé l'acridine orange, des cellules mortes laissant entrer le bromure d'éthidium qui colore les noyaux en orange. Trois des concentrations les plus élevées en papaïne ont été examinées : 0,0625 %; 0,03125 % et 0,0156 %. Pour les trois concentrations en papaïne, on constate que la proportion de cellules vertes dépasse très largement celle des cellules oranges. On évalue ainsi à environ 98 % le nombre de cellules vivantes, quelle que soit la concentration en papaïne utilisée lors du repiquage. Ces résultats suggèrent donc que la papaïne aux concentrations testées, n'entraîne pas une cytotoxicité à court terme, décelable au niveau de la suspension des cellules papaïnisées.

2.2.2. Evaluation de la cytotoxicité 24 heures et 48 heures après la papaïnisation

On a également voulu vérifier que la papaïne n'affectait pas le comportement cellulaire, après le repiquage lorsque les cellules ont eu le temps d'adhérer, soit 24 ou 48 heures après le repiquage. On a dans un premier temps essayé la méthode dite au MTT, basée sur la capacité des mitochondries à transformer le MTT en cristaux de formazan bleus. Mais on a rencontré une difficulté pratique : si à partir d'une suspension cellulaire donnée, il est possible de repiquer des quantités de cellules par micropuits reproductibles, c'est beaucoup moins évident à partir de deux suspensions cellulaires différentes, ce qui est fatalement le cas lorsqu'on veut comparer les cellules trypsinisées et papaïnisées. Une interprétation de nos données s'est donc avérée délicate et on a abandonné cette méthode. On s'est donc tourné d'une part vers une méthode de quantification des cellules par dosage de protéines et d'autre part vers une analyse plus qualitative de la morphologie des cellules en microscopie électronique à transmission.

2.2.2.1. Quantification des cellules par dosage des protéines

Sachant qu'après 7 heures, les fibroblastes MRC-5 ont eu le temps de s'attacher, on procède à un premier dosage de protéines qui sert de référence (= 100 %). Ensuite, on dose

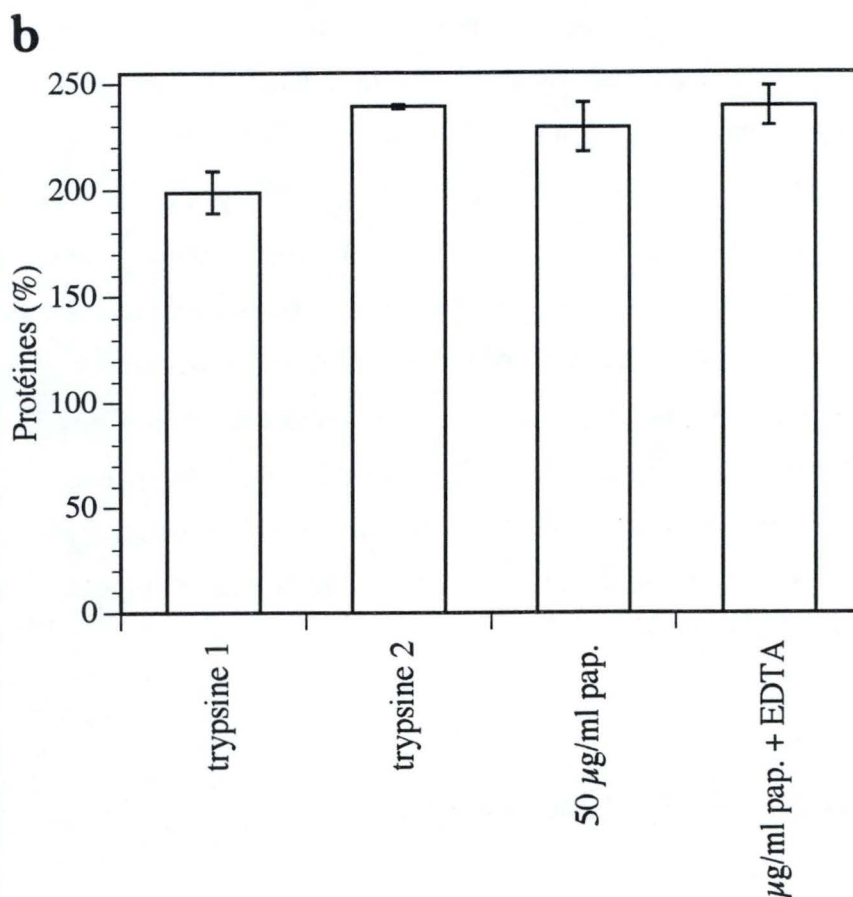
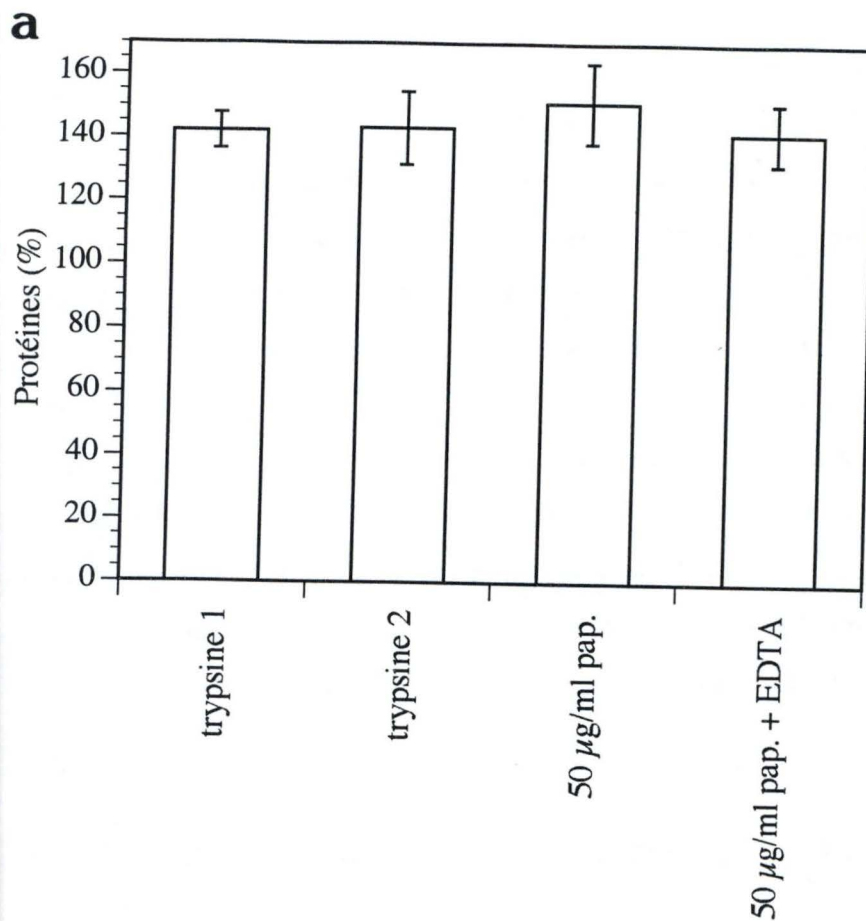


Figure III.9. : Quantification des protéines cellulaires 24 heures (A) et 48 heures (B) après le repiquage, pour des cellules ayant été soit trypsinisées (trypsine 1 et 2), soit papaïnisées en présence ou non d'EDTA. Les protéines ont été exprimées en pourcent par rapport aux protéines dosées 7 heures après le repiquage, portées arbitrairement à 100 %. Chaque colonne correspond à la moyenne de 4 puis \pm 1 écart-type

les protéines 24 et 48 heures après le repiquage, et on les rapporte à la référence. Il est ainsi possible de suivre la croissance à court terme des cellules papaïnisées et de la comparer à celle des cellules repiquées à la trypsine. C'est donc une manière indirecte de détecter une cytotoxicité retardée de la papaïne.

En pratique, trois plaques de 24 puits sont nécessaires à cette expérience. Chacune se compose de deux rangées de cellules trypsinisées servant de contrôle, d'une rangée de cellules repiquées à la papaïne et d'une dernière rangée réservée aux cellules papaïnisées en présence d'EDTA. Ces dernières sont centrifugées à 1.000 rpm pendant 10 minutes afin d'éliminer le chélateur. La première plaque est dosée après être restée 7 heures à l'étuve à 37°C contenant 8 % de CO₂. Le dosage de protéines au Folin consiste à faire éclater les membranes cellulaires avec du NaOH, on récolte ainsi toutes les protéines dénaturées qui réagissent avec la mixture alcaline et le réactif de Folin. La seconde et troisième plaques sont utilisées pour un dosage de protéines, respectivement 24 et 48 heures après le repiquage.

Les protéines dosées après 7 heures correspondent à 100 %. Par la suite, on ramène en pourcent la quantité de protéines (en µg/ml) évaluées 24 et 48 heures après le repiquage (figure III.9.) Il ressort des deux graphes ci-joints la conclusion suivante : quelle que soit la technique de repiquage utilisée, la quantité de protéines cellulaires est équivalente pour un temps donné. Après 24 heures, les protéines cellulaires ont augmenté (± 144 %) par rapport au temps 7 heures (figure III.9. A). Après 48 heures, la quantité de protéines a plus que doublé (± 227 %) (figure III.9. B). Cela signifie que les fibroblastes de poumon humain prolifèrent autant, qu'ils soient trypsinisés ou papaïnisés une fois (avec ou sans EDTA) : la papaïne n'apparaît donc pas toxique aux cellules MRC-5 dans ces conditions.

2.2.2.2. Observation des cellules MRC-5 au microscope électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission a l'avantage de nous apporter des informations qualitatives plus précises sur l'état des organelles, du noyau, des membranes, du cytosol, ... des cellules ayant subi un repiquage à la papaïne à 0,004 % et 0,03125 %. On les a comparées avec des cellules repiquées selon la méthode classique. Les cellules sont préparées pour la microscopie électronique 24 et 48 heures après leur repiquage. Par analyses

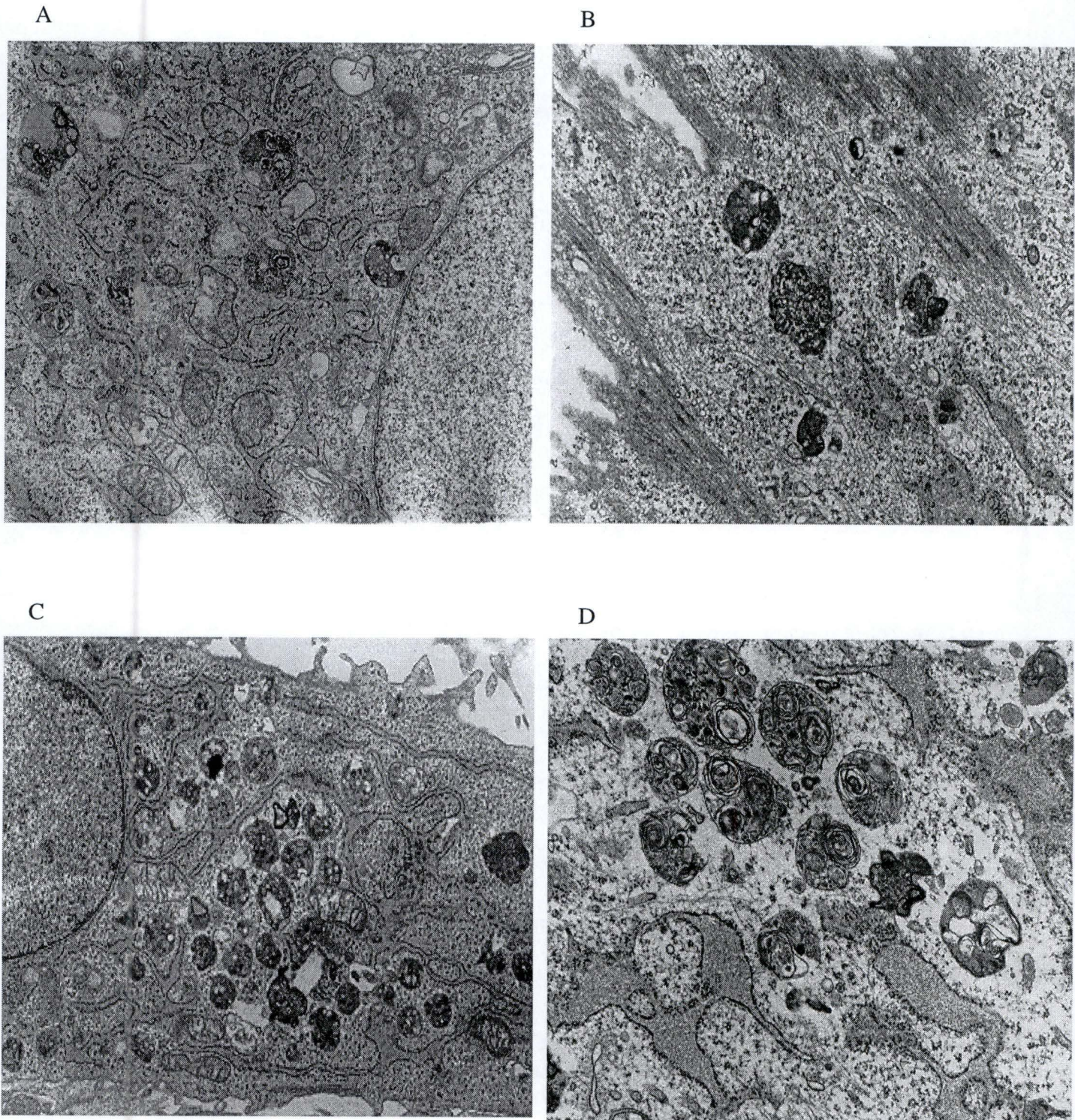


Figure III.10. : Ultrastructure de fibroblastes MRC-5. A : cellule papainisée une fois à 0,03125 % est fixée 24 heures après le repiquage. B, C et D : cellules papainisées à 0,004 % et fixées 48 heures après le repiquage (x 24.255 pour A; x 19.800 pour B et C; x 22.300 pour D)

comparées d'une série de coupes ultrafines, plusieurs constatations peuvent être faites.

De manière générale, l'état des cellules trypsinisées ou papainisées paraît semblable et conforme à la morphologie typique des fibroblastes en culture. Diverses observations nous renseignent sur le bon fonctionnement cellulaire et notamment un réticulum endoplasmique rugueux très développé avec des citernes dilatées, des ribosomes en rosette, un noyau rempli de chromatine fine entourée d'une double membrane intacte, des appareils de golgi, une matrice riche et homogène, des lysosomes fonctionnels, un cytosquelette bien établi avec des filaments intermédiaires, des filaments d'actine et microtubules,... (figure III.10. A et B). On note également la dilatation du réticulum endoplasmique rugueux et l'expression de l'activité biosynthétique élevée des fibroblastes en culture, ceux-ci synthétisant activement les différents constituants de la matrice extracellulaire et en particulier du collagène de type I et la fibronectine.

Signalons cependant l'abondance de structures de type vacuole d'autophagie, capables de fusionner avec des lysosomes. La figure III.10. C nous montre la présence de ces vacuoles d'autophagie contenant des résidus de digestion, ces vacuoles étant observées de manière équivalente chez les cellules trypsinisées et celles traitées à la papaine. Vues au grossissement supérieur (figure III.10. D), on constate que les vacuoles d'autophagie développent des enroulements myéliniques. Bien que leur abondance à l'intérieur de la cellule suggère l'existence d'une certaine souffrance cellulaire, elle ne semble pas altérer le fonctionnement des fibroblastes MRC-5. Signalons également que ces observations ont été faites sur des fibroblastes au passage 37, c'est-à-dire amorçant les premiers signes de "vieillesse cellulaire" en culture.

En résumé, on n'a pas mis en évidence d'effets négatifs apparents de la papaine sur les fibroblastes de poumon humain. On est donc passé à l'étape suivante, celle qui consiste à remplacer le sérum (contenant l' α_2 -macroglobuline) dont on se servait jusqu'ici pour inhiber l'action de l'enzyme, par les inhibiteurs définis et plus précisément la leupeptine et l'antipaine.

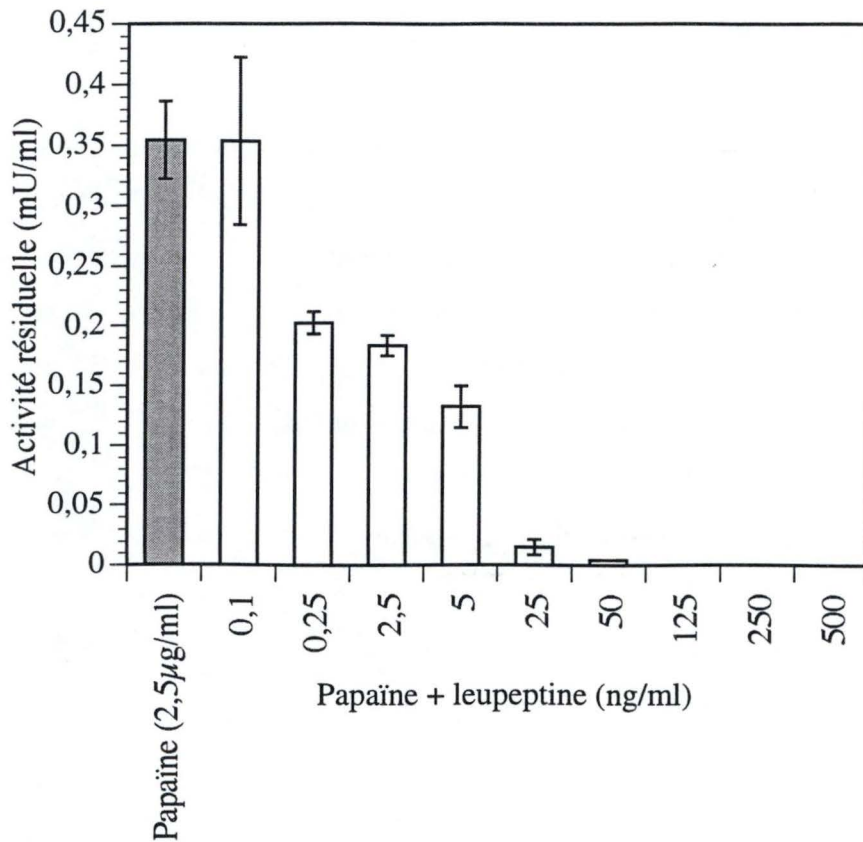


Figure III.11. : Effet inhibiteur de la leupeptine pour une solution de papaine à 2,5 μg/ml. L'activité résiduelle est exprimée en fonction de concentrations croissantes en leupeptine. L'enzyme et l'inhibiteur sont incubés pendant trois heures avant d'arrêter la réaction, comme décrit dans les matériels et méthodes

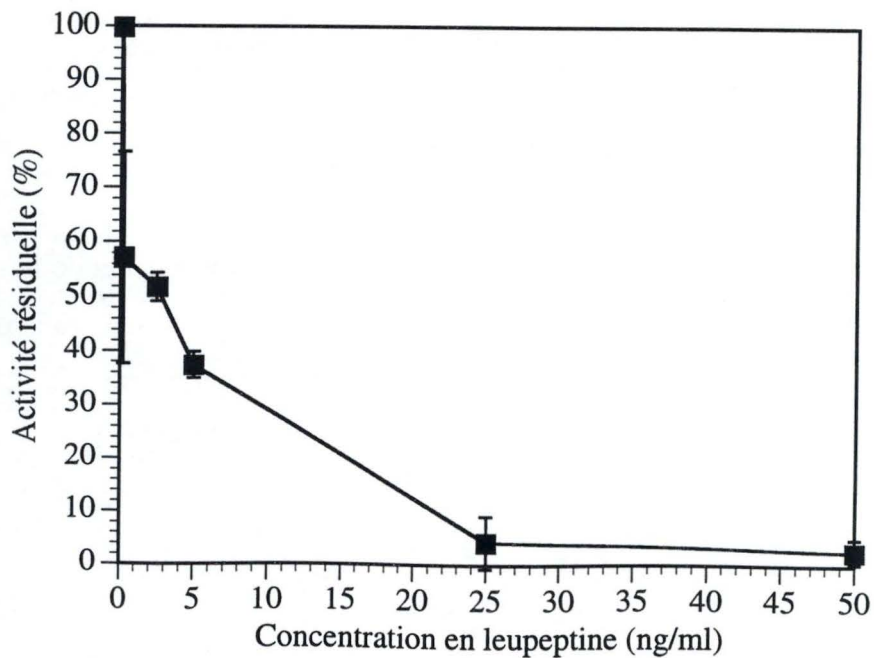


Figure III.12. : Activité résiduelle de la papaine, exprimée en pourcent. 100 % correspond à la papaine 0,25 μg/ml incubée en l'absence de leupeptine

3. Utilisation des inhibiteurs leupeptine et antipaïne

Avant de tester le complexe enzyme-inhibiteur en culture cellulaire, on a d'abord voulu préciser par dosage biochimique les concentrations précises en leupeptine ou en antipaïne, capables d'inhiber totalement la papaïne. Précisons que toutes les dilutions des inhibiteurs sont réalisées dans le même tampon que celui utilisé pour la papaïne, en l'occurrence le tampon PBS/Dulbecco. Les fibroblastes MRC-5 ne subiront donc aucun changement d'environnement lorsque les peptides aldéhydiques seront ajoutés pour inactiver la papaïne.

3.1. Effets inhibiteurs sur la papaïne purifiée

3.1.1. Le complexe papaïne-leupeptine

Pour déterminer l'effet inhibiteur de la leupeptine, on a procédé comme suit. Une concentration fixe en papaïne de 0,0005 % est préparée comme on le fait depuis le début. On a choisi la concentration de 0,0005 % (ou 5 $\mu\text{g/ml}$), car celle-ci se trouve dans la zone de linéarité du dosage biochimique (figure III.3.). De ce tube, on prélève 200 μl qu'on ajoute aux 200 μl d'une solution en inhibiteur, et ce pour chacune des différentes concentrations en leupeptine : on obtient ainsi une concentration finale en enzyme de 0,00025 % et chaque solution d'inhibiteurs est automatiquement diluée deux fois. Finalement, on arrive aux différentes concentrations définies en leupeptine : 0,1 ng/ml; 0,25 ng/ml; 2,5 ng/ml; 5 ng/ml; 25 ng/ml; 50 ng/ml; 125 ng/ml; 250 ng/ml et enfin 500 ng/ml. Un contrôle sans leupeptine est également réalisé et remarquons que tous les tests sont réalisés en triple.

Les résultats obtenus sont représentés à la figure III.11.. A la plus faible concentration, on n'observe pas d'inhibition, mais au fur et à mesure que les concentrations en leupeptine augmentent, on assiste à une belle inhibition progressive qui devient totale à partir de 125 ng/ml en inhibiteur.

Dans la figure III.12., on a exprimé les activités résiduelles en pourcent, ce qui nous

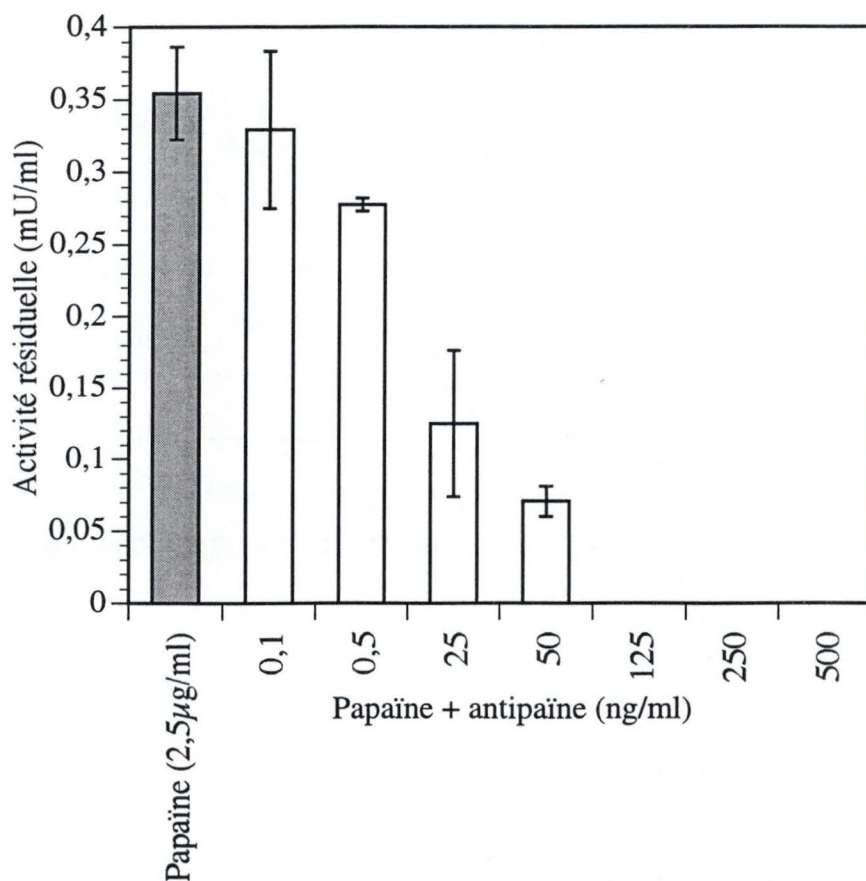


Figure III.13. : Effet inhibiteur de l'antipaine pour une solution de papaine à 2,5 µg/ml. L'activité résiduelle est exprimée en fonction de concentrations croissantes en antipaine.

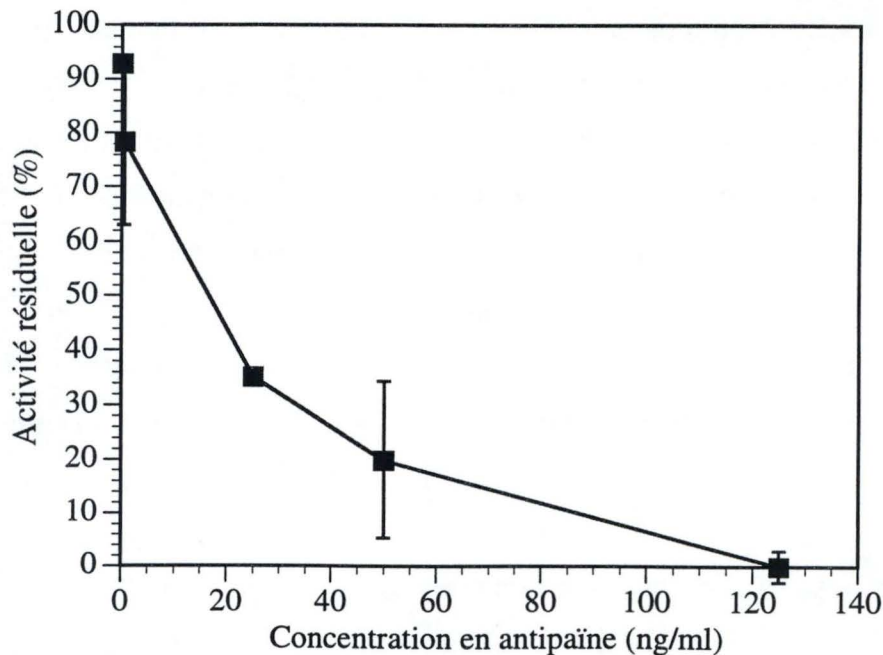


Figure III.14. : Activité résiduelle de la papaine, exprimée en pourcent. 100 % correspond à la papaine 0,25 µg/ml incubée en l'absence d'antipaine

permet d'estimer l'IC50 de l'inhibiteur utilisé, qui correspond à la concentration en leupeptine pour laquelle 50 % de l'enzyme est inhibée, soit plus ou moins à 2,5 ng/ml. C'est une valeur plus basse que celle spécifiée en littérature, de l'ordre de 0,05 $\mu\text{g/ml}$.

3.1.2. Le complexe papaïne-antipain

Un autre inhibiteur plus spécifique a été choisi pour former un complexe avec la papaïne, c'est l'antipain. L'expérience réalisée avec ce dernier, se déroule typiquement de la même manière qu'avec le premier inhibiteur. La concentration fixée en papaïne de 0,00025 % reste identique.

Le graphe de la figure III.13. nous indique que la concentration de 0,1 ng/ml en inhibiteur est trop faible pour inhiber l'enzyme. Par contre, l'activité enzymatique diminue bien en fonction de l'augmentation croissante en antipain. C'est à partir de 125 ng/ml d'antipain qu'on peut observer une inhibition à 100 %.

Il est également possible de déterminer l'IC50 dans le cas de cet inhibiteur, grâce au graphe de la figure III.14.. Après avoir converti l'activité résiduelle en pourcentage, on peut estimer que 16 ng/ml d'antipain parviennent à inhiber l'enzyme à 50 %. La littérature nous donne une valeur plus élevée de 0,27 $\mu\text{g/ml}$.

3.2. Cytotoxicité sur les cellules

Comme c'était le cas pour la papaïne, il nous a semblé naturel de vérifier la toxicité à court terme de la leupeptine et de l'antipain sur les cellules.

3.2.1. Vérification par la méthode au bromure d'éthidium et acridine orange

Contrairement au test de cytotoxicité de la papaïne, appliqué sur la suspension cellulaire, une coloration avec les deux colorants fluorescents est possible pour des cellules adhérentes dans le cas des inhibiteurs. On prépare la veille 7 boîtes de Pétri de 35 mm de

diamètre, dans lesquelles se trouvent 150.000 cellules par boîte, repiquées avec la méthode classique. Le lendemain, on commence l'expérience en réalisant les six concentrations en leupeptine (20 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$ et 0,1 $\mu\text{g/ml}$) et les quatre en antipainé (1 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$ et 20 $\mu\text{g/ml}$) diluées dans le tampon PBS/Dulbecco additionné de calcium (voir description au point 2.1.1. des matériels et méthodes). Ces concentrations sont supérieures à celles utilisées pour les courbes d'inhibition (figure III.11.), puisqu'on utilise 20 fois plus de papainé pour détacher les cellules. On réalise également un contrôle composé du tampon PBS/Dulbecco + calcium en l'absence d'inhibiteur. La méthode est la suivante: on décante la boîte de Pétri, on la rince deux fois au PBS/Dulbecco + calcium puis on incube les cellules avec la solution contenant l'inhibiteur durant 30 minutes à 37°C. Un dernier rinçage au PBS est effectué avant de déposer deux gouttes de la solution de coloration et enfin une observation au microscope à fluorescence est réalisable. Un balayage général de la coupe nous permet d'estimer la proportion de cellules vivantes (vertes) se situant aux environs de 98 % pour le contrôle, les quatre concentrations en antipainé et les trois premières concentrations en leupeptine (0,1 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$ et 1 $\mu\text{g/ml}$), de 96,5 % pour 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$ en leupeptine et de 94 % pour la plus forte concentration en leupeptine (20 $\mu\text{g/ml}$). La leupeptine et l'antipainé semble donc très peu toxiques, on a voulu confirmer ces données en utilisant le test métabolique au MTT.

3.2.2 Vérification par la méthode au MTT

Les problèmes de comptage rencontrés auparavant avec cette méthode ne se posent plus puisqu'un seul mode de repiquage est utilisé, avec une seule suspension cellulaire. On parvient par conséquent à déposer plus ou moins la même densité cellulaire dans chaque puits (10.000 cellules par puits).

Une plaque de 96 puits destinée au test de cytotoxicité de l'antipainé est remplie par 8 rangées de cellules trypsinisées, qui correspondront le lendemain aux 7 concentrations différentes en inhibiteur + une rangée contrôle. Une seconde plaque similaire, est réservée au test de cytotoxicité de la leupeptine. Lorsque les fibroblastes se sont attachés au fond des puits 24 heures plus tard, on prépare les différentes concentrations en inhibiteurs : 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$ et 20 $\mu\text{g/ml}$ pour la leupeptine tandis que pour

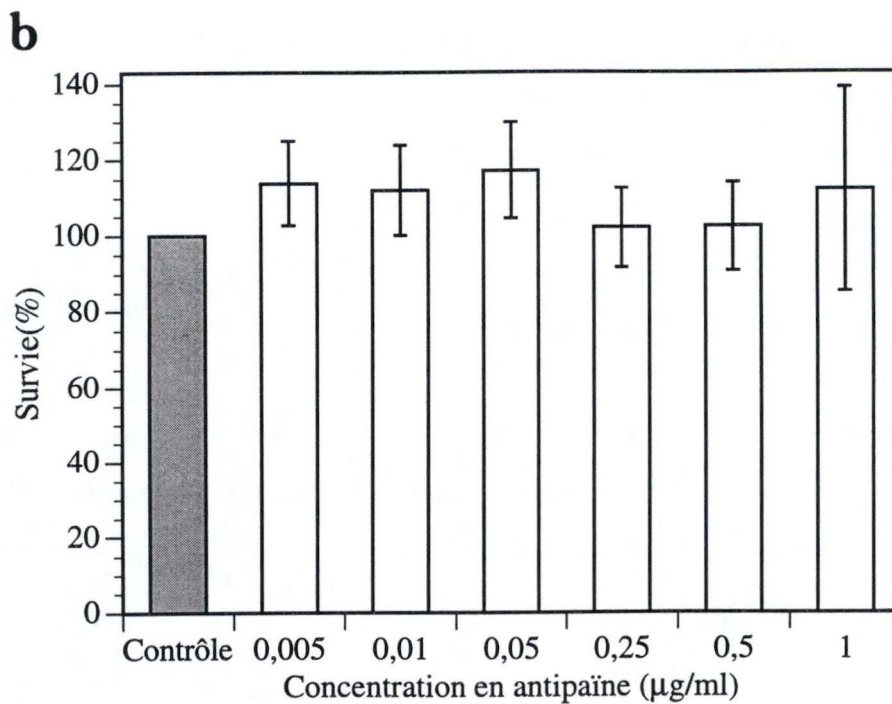
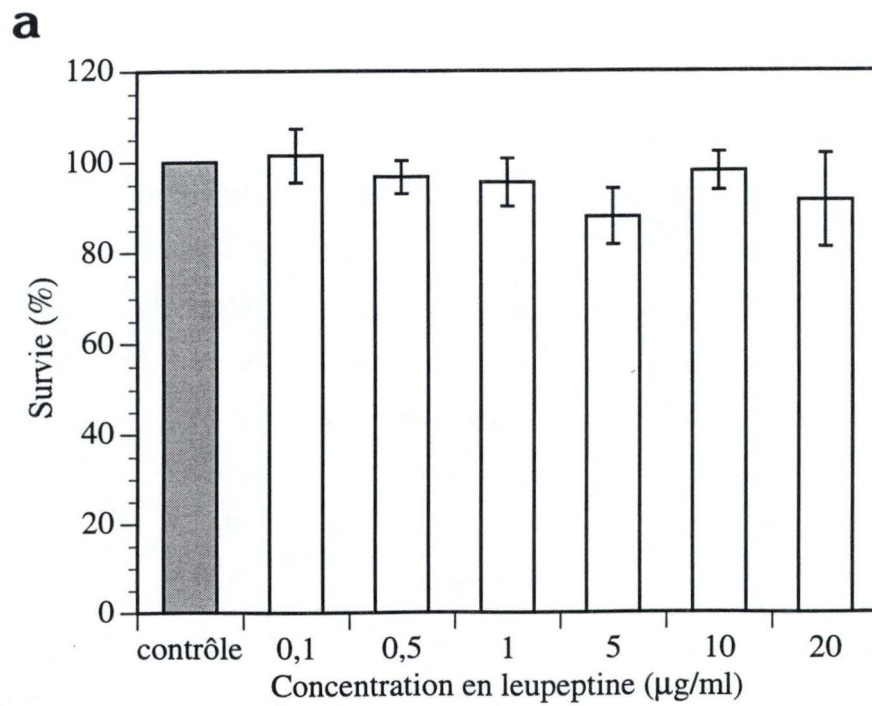


Figure III.15. : Cytotoxicité de la leupeptine (A) et de l'antipain (B) sur les cellules MRC-5, après une incubation pendant 30 minutes, évaluée par la méthode au MTT (voir point 2.2. des matériels et méthodes). Les résultats sont exprimés en % de survie, les valeurs obtenues pour les cellules non traitées ayant été portées à 100 %. Chaque colonne correspond à la moyenne de 8 puits \pm 1 écart-type

l'antipain, on teste 0,005 $\mu\text{g/ml}$; 0,01 $\mu\text{g/ml}$; 0,05 $\mu\text{g/ml}$; 0,25 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$ et 1 $\mu\text{g/ml}$. Ces concentrations avaient été choisies en fonction des données de la littérature sur les deux inhibiteurs. On décante ensuite l'ancien milieu de culture dans lequel les cellules ont été incubées à 37°C pendant une journée et on le remplace par 100 μl /puits des différentes concentrations en inhibiteurs. Les puits contrôles sont remplis avec du tampon PBS/Dulbecco additionné de calcium sans trace d'inhibiteur alors qu'on ajoute du tampon PBS dans les puits réservés aux blancs. On laisse agir les différentes solutions durant 30 minutes puis après rinçage, on laisse incuber la solution de MTT pendant 4 heures. Le réactif de lyse cellulaire agit toute une nuit avant de pouvoir lire les puits à 570 nm dans un lecteur de plaques.

Les graphes de la figure III.15. nous donne les résultats obtenus par cette méthode : on a fixé la moyenne des puits contrôles à 100 %. Les résultats ont été exprimés en pourcent de survie par rapport au contrôle (en %). Les deux graphes ne montrent pas de cytotoxicité de la part ni de l'antipain ni de la leupeptine, puisqu'aucun de ces deux inhibiteurs ne semblent influencer l'état métabolique des cellules, même aux plus fortes concentrations. Ces résultats sont également en accord avec les résultats obtenus avec la méthode au bromure d'éthidium/acridine orange.

3.3. Utilisation après papaïnisation des cellules

Grâce aux dosages biochimiques réalisés au point 3.1., on possède toutes les informations requises pour évaluer la quantité d'inhibiteurs nécessaire pour inactiver totalement la concentration en papaïne, utilisée lors des repiquages cellulaires (0,005 %). On sait qu'à partir de 125 ng/ml, les deux inhibiteurs inhibent complètement la papaïne à une concentration de 0,00025 %; on préfère par mesure de sécurité, prendre une valeur un peu supérieure : fixons-la à 250 ng/ml. Mais étant donné que la quantité d'enzyme nécessaire pour détacher les cellules de leur support est de 0,005 %, soit 20 fois plus concentrée, on a également choisi des concentrations en antipain ou en leupeptine 20 fois supérieures c'est-à-dire 5 $\mu\text{g/ml}$. Et ce, afin de garder le même rapport de molarités entre l'enzyme et les inhibiteurs. On sait également que la survie des cellules est supérieure à 95 % après 30 min d'incubation des cellules avec les inhibiteurs à cette concentration.

Une expérience est conçue de telle façon à suivre en détails ces nouveaux changements dans le processus de repiquage. La solution à 0,005 % de papaïne se prépare identiquement comme les autres fois. Les solutions contenant l'enzyme, la leupeptine ou l'antipapaïne sont filtrées et préchauffées à 37°C. On peut alors rincer et papainiser les cellules comme d'habitude puis après les 20 minutes d'incubation, elles sont inhibées soit par 2 ml d'antipapaïne, soit par 2 ml de leupeptine. On attend une à deux minute(s) que les complexes enzyme-inhibiteur se forment et on agite ensuite à la pipette Pasteur afin de rompre les agrégats cellulaires. Une centrifugation à 1.000 rpm pendant 10 minutes est conseillée afin d'éliminer les complexes formés qui risqueraient d'influencer le métabolisme cellulaire. On récupère le culot de centrifugation, on y ajoute 10 ml de milieu de culture, réparti dans deux flacons de culture. On réalise ainsi un repiquage en deux. Le surnageant quant à lui est soigneusement conservé, il servira pour deux tests supplémentaires. Le premier consiste à déposer une partie du surnageant sur une boîte intacte de cellules MRC-5, il reste au contact de celles-ci durant 20 minutes puis l'état des fibroblastes est observé au microscope : les cellules ne présentent aucun changement de forme et restent parfaitement attachées. Il reste donc peu ou pas de papaïne active. Le second test consiste à doser la papaïne éventuellement active, par dosage biochimique dans le surnageant. Après avoir dilué 20 fois la papaïne utilisée lors du repiquage, on en prélève 100 µl qui sont ajoutés aux 400 µl de substrat; on peut ainsi vérifier son activité enzymatique, celle-ci est semblable à la valeur obtenue pour une concentration de 0,00025% en papaïne, lors des précédents dosages. On prélève également 100 µl provenant du surnageant récolté après la centrifugation de la suspension cellulaire traitée à la papaïne et l'antipapaïne; ainsi que 100 µl du surnageant comprenant les complexes papaïne-leupeptine. Ces 100 µl sont additionnés au substrat non fluorescent Z-Arg-AMC, il s'ensuit une incubation de trois heures puis on arrête la réaction avec de l'acide iodoacétique. On n'a détecté aucune activité de la papaïne, ce qui suggère que l'enzyme est complètement inhibée. Cette expérience soutient ce qui a été observé avec les cellules lors du premier test. On en conclut que cette nouvelle méthode de repiquage semble fonctionner après un repiquage en culture cellulaire; une observation des cellules au microscope le confirme. Il reste néanmoins à voir si plusieurs repiquages successifs ne vont pas altérer par effet cumulatif le comportement cellulaire.

4. Papaïne/leupeptine ou antipapaïne, comme alternative à la trypsine/ alpha 2-macroglobuline. Evaluation à court et à moyen terme

Grâce aux expériences précédentes, on a pu constater que les cellules supportent manifestement bien un premier repiquage à la papaïne. Mais qu'en est-il lorsque les cellules sont papaïnisées plusieurs fois? Pour essayer de répondre à cette question, on a décidé de repiquer à la papaïne quatre fois d'affilée les cellules MRC-5, ce qui était réalisable dans le cadre du mémoire. La papaïne a été inhibée chaque fois avec la leupeptine. Puis on a évalué le potentiel prolifératif des cellules, en le comparant à celui des cellules trypsinisées. Ce potentiel prolifératif a été estimé par les méthodes d'incorporation à la thymidine tritiée et au BrdU, ce qui donne une idée de la capacité des cellules à entrer en phase S du cycle cellulaire après le repiquage. D'autre part, on a également réalisé des expériences de clonage, qui donnent une idée du potentiel prolifératif à plus long terme.

4.1. Incorporation de la thymidine tritiée

Le principe consiste à incuber les cellules en présence de thymidine radioactive, qui sera incorporée dans l'ADN, lors de sa réplication, les facteurs impliqués dans ce processus ne faisant aucune différence avec la thymidine non tritiée. La quantité de thymidine tritiée est donc proportionnelle à la capacité des cellules à entrer en phase S du cycle cellulaire, pour un temps donné.

Pour l'expérience proprement dite, une estimation de l'incorporation de la thymidine tritiée s'effectue la première fois pour des fibroblastes papaïnisés une seule fois. Ensuite, lorsque les cellules arrivent à confluence, on les repique par les méthodes respectives et au quatrième passage, on procède à un nouveau test d'incorporation de thymidine (détails de la méthode au point 3.3.2. dans les matériels et méthodes).

Pratiquement, les cellules sont repiquées et on les laisse adhérer pendant 24 heures. On ajoute alors la thymidine tritiée pendant 24 heures. Pour standardiser les résultats et pouvoir les comparer, on rapporte la radioactivité (en C.P.M.) incorporée par μg de protéines, des puits ayant été réservés pour le dosage de protéines à 24 heures.

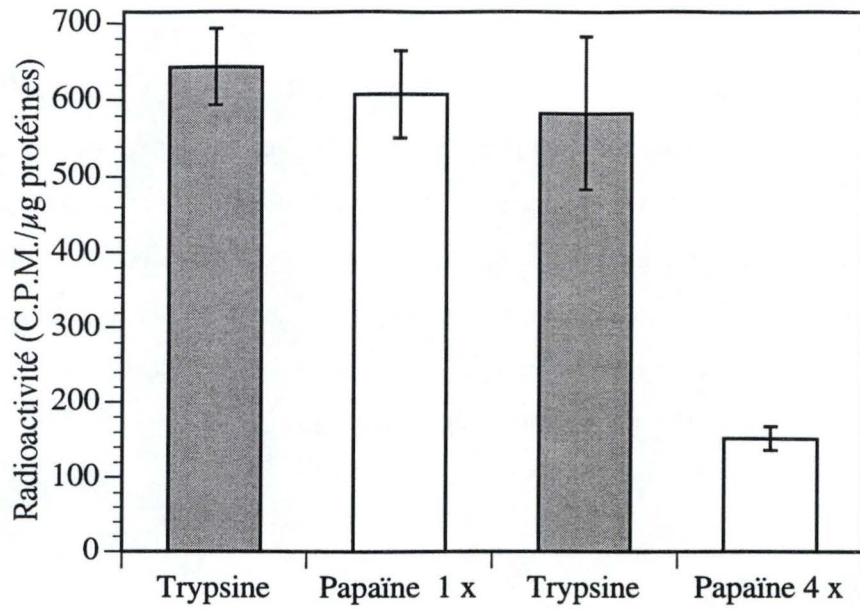


Figure III.16. : Effet d'1 ou 4 repiquages à la papaïne sur le potentiel prolifératif des cellules, mesuré par incorporation à la thymidine tritiée. Les résultats sont exprimés en C.P.M./μg de protéines, les protéines ayant été dosées 24 heures après le repiquage, c'est-à-dire au moment où l'on ajoute la thymidine. Chaque colonne correspond à 4 puits \pm 1 écart-type

Les résultats obtenus sont renseignés à la figure III.16.. Ils montrent que les cellules papainisées une seule fois, se comportent comme les cellules trypsinisées, puisque la radioactivité incorporée est respectivement de 607 C.P.M./ μ g de protéines pour les cellules papainisées et de 642 C.P.M./ μ g de protéines, pour les cellules trypsinisées. Par contre, après quatre repiquages successifs à la papaïne, le potentiel prolifératif des fibroblastes a significativement chuté puisque l'incorporation à la thymidine tritiée présente des valeurs nettement plus faibles : 582 C.P.M./ μ g de protéines pour les cellules trypsinisées, et seulement 151 C.P.M./ μ g de protéines pour les cellules papainisées quatre fois. Celles-ci voient donc leur capacité à entrer dans le cycle cellulaire réduite, en comparaison avec les cellules traitées avec la trypsine, pendant un même laps de temps.

Les dosages protéiques faits 24 et 48 heures après le repiquage, confirment ces données. Pour les cellules trypsinisées, les protéines augmentent d'un facteur 2,03 entre 24 et 48 heures; pour les cellules papainisées (4 fois), ce facteur est de l'ordre de 1,47 (résultats non montrés).

Il est également possible de constater cette diminution du potentiel prolifératif provenant des cellules papainisées quatre fois en suivant, par une simple observation journalière des cellules au microscope. Le second repiquage avec les deux méthodes en comparaison, est réalisé le même jour (2 jours après le premier); par conséquent, la capacité proliférative des cellules trypsinisées ou papainisées est encore équivalente jusqu'ici. Deux jours plus tard, on assiste au troisième passage des cellules trypsinisées. En ce qui concerne les fibroblastes MRC-5 repiqués à la papaïne, leur état de confluence est seulement atteint quatre jours après le second passage; on effectue donc le troisième repiquage à ce moment-là. Le dernier repiquage des cellules traitées avec la méthode classique se déroule comme d'habitude deux jours après le précédent. Ce n'est pas le cas des fibroblastes papainisés pour lesquels il faut attendre quatre jours après le troisième passage, avant qu'ils n'atteignent la confluence et ainsi les repiquer pour la quatrième fois.

En conclusion, les cellules ayant subi plusieurs repiquages successifs à la papaïne prennent le double de temps pour se diviser. On a voulu confirmer ces résultats en utilisant une méthode d'incorporation, qui permet de visualiser individuellement les cellules entrant en phase S du cycle cellulaire. Plutôt que de choisir l'autoradiographie avec la thymidine

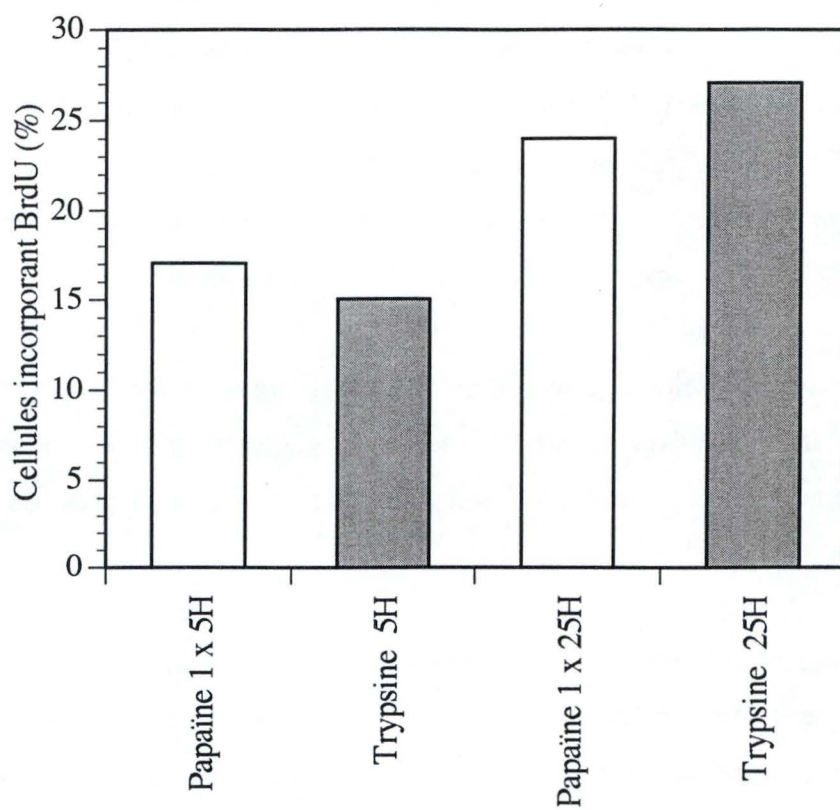


Figure III.17. : Pourcentage de cellules papainisées ou trypsinisées ayant incorporé la BrdU pendant 5 ou 25 heures d'incubation. Les cellules papainisées ne l'ont été qu'une seule fois, comme pour le premier volet de la figure précédente

tritiée, on a opté pour une méthode immuno-cytochimique plus rapide.

4.2. Confirmation par incorporation de BrdU

Dans cette méthode immuno-cytochimique, les cellules incorporent la BrdU, qui est alors révélée via des anticorps fluorescents. On pourra donc évaluer et comparer leur nombre selon qu'il s'agit du repiquage traditionnel ou celui à la papaïne. Cette méthode n'a été utilisée que pour les cellules papainisées une fois.

Après avoir repiqué une première fois suivant les deux méthodes les cellules MRC-5 sur des couvre-objet, on dépose 24 heures plus tard une quantité de BrdU correspondant à une concentration finale de $10 \mu\text{M}$. Les temps d'incubation en présence du nucléotide sont de 5 et 25 heures, et après le temps écoulé, on suit la méthode décrite au point 3.3.2. des matériels et méthodes. Vus au microscope à fluorescence avec le filtre à rhodamine, les noyaux des cellules ayant incorporé la BrdU présentent en périphérie des points plus brillants correspondant au Texas-Red des anticorps secondaires. On établit la proportion de ces noyaux par rapport à un nombre total de 100 cellules. On obtient ainsi un pourcentage de fibroblastes incorporant la BrdU, qu'on peut mettre sur graphe (figure III.17.). Sur ce dernier, on constate un pourcentage de cellules ayant incorporé la BrdU, aux alentours de 16 % après 5 heures d'incubation, tandis qu'il se situe aux environs de 25 % après 25 heures d'incubation. Les valeurs citées plus haut correspondent approximativement les cellules trypsinisées et celles traitées à la papaïne. La capacité proliférative est donc comparable dans les deux cas, et ce après un premier repiquage. Le temps ne nous a cependant pas permis de réitérer cette expérience avec des cellules papainisées quatre fois en suivant.

4.3. Effet de la papaïne à plus long terme : le clonage

Le clonage permet de donner une idée du potentiel prolifératif cellulaire, mais à plus long terme, par une expérience étalée sur une période raisonnable. Au bout de 10 jours, des cellules repiquées à très faible densité, parviennent à former un clone autour d'elles, dont la taille nous indique le nombre de divisions subies par la cellule-mère initiale. Plusieurs essais

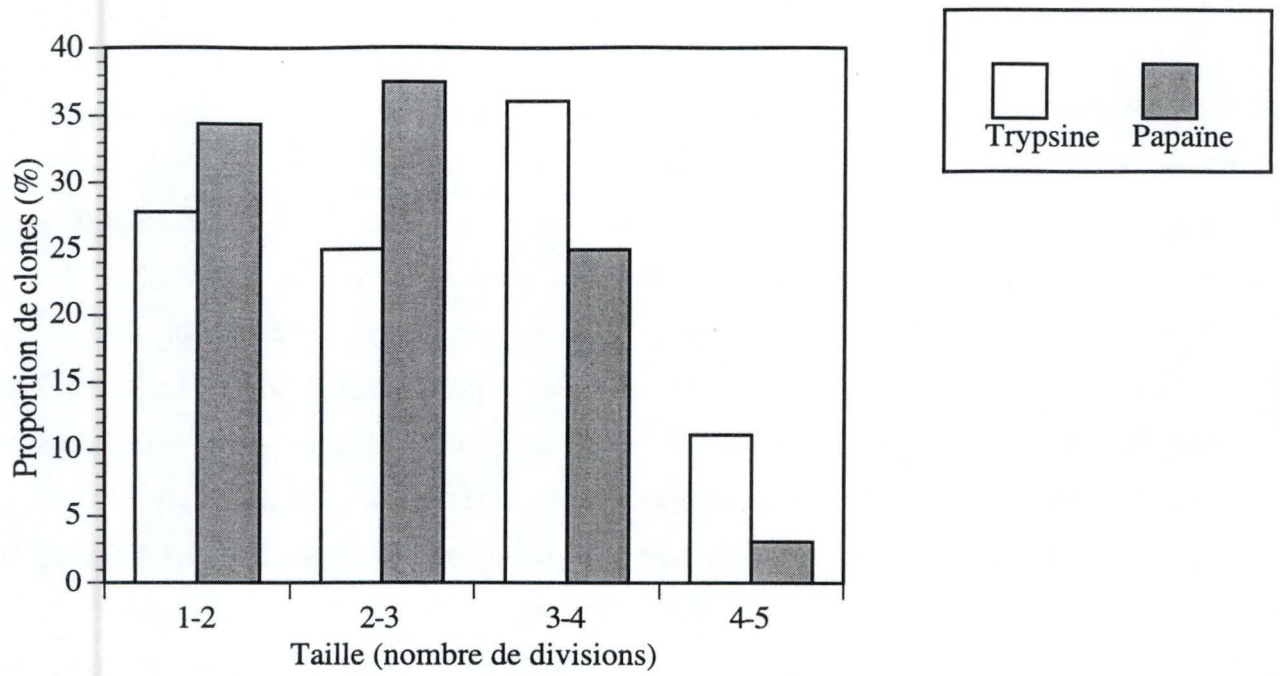


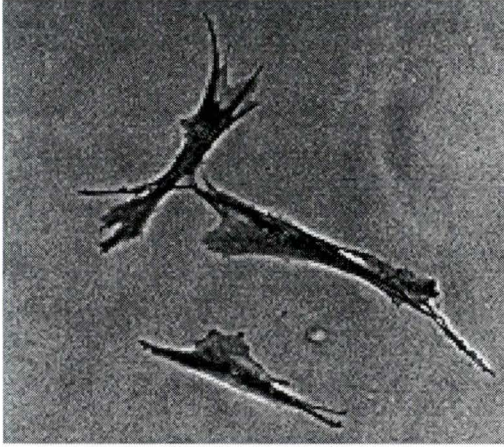
Figure III.18. : Distribution des clones en fonction de leur taille exprimée en nombre de divisions subies

de densité cellulaire par boîte de Pétri (35 mm de diamètre) ont été testés avant d'arriver à choisir celle qui convient le mieux. De ces trois densités cellulaires, 2.000, 1.000 et 500 cellules par boîte de Pétri, c'est la dernière qui est choisie car on y repère le plus facilement les clones. Après une dizaine de jours, on fixe et colore les fibroblastes papainisés une première fois ou trypsinisés qui ont eu l'occasion de se diviser. Ensuite, une observation au microscope permet de compter le nombre de cellules par clone. Ces résultats sont transformés comme décrit au point 3.4.2.2. des matériels et méthodes avant d'obtenir les graphes de la figure III.18..

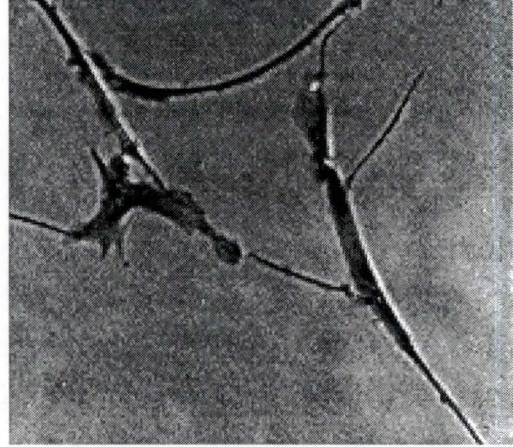
Comme le montre cette figure, on voit que les cellules trypsinisées ont manifesté un meilleur comportement prolifératif par rapport aux cellules papainisées (avec inhibition à la leupeptine) : en effet, pour les cellules trypsinisées, les clones les plus fréquents correspondent à 3-4 divisions (36 %), ce qui signifie entre 8 et 16 cellules; 11 % des clones correspondent même à 4-5 divisions, soit entre 16 et 32 cellules. Par contre pour les cellules papainisées une seule fois, ces clones de grande taille, représentent respectivement 25 % (au lieu de 36 %) et 3 % (au lieu de 11 %). Ce sont donc les clones de plus petite taille qui sont les plus fréquents : 37 % avec 2-3 divisions et 34 % avec seulement 1 ou 2 divisions.

La morphologie de quelques clones est illustrée à la figure III.19.. Cela nous permet également de comparer avec plus de précisions les cellules soit trypsinisées, soit papainisées: elles se ressemblent sur beaucoup de points (taille, forme,...) à l'exception des extrémités plus allongées chez les cellules papainisées.

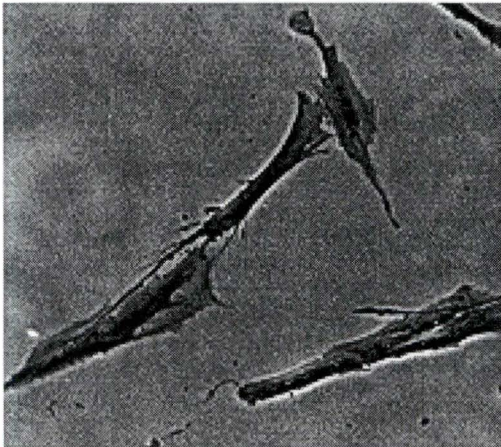
A Cellules trypsinisées



C Cellules papainisées



B



D

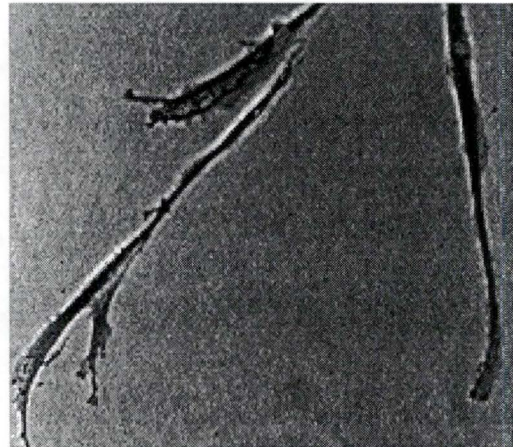


Figure III.19. : Micrographies illustrant l'aspect de clone obtenu pour des cellules trypsinisées (A, B) et papainisées (C, D) (x 320)

CONCLUSIONS

ET

PERSPECTIVES

Dans ce travail, on a essayé de remplacer le couple papaïne/ α_2 -macroglobuline sérique par la papaïne/leupeptine ou antipapaïne, pour les raisons mentionnées dans l'introduction. On a montré que la papaïne à 0,005 % parvient bien à détacher les cellules MRC-5, même si l'observation morphologique des cellules en cours de détachement, suggère des différences par rapport à la trypsine. Dans un premier temps la papaïne a été inhibée par le sérum, puis on a essayé les inhibiteurs leupeptine et antipapaïne.

Les inhibiteurs ont été évalués par dosage biochimique. Pour ce faire, un dosage par spectrofluorimétrie de la papaïne a été mis au point, d'abord pour la papaïne purifiée seule, puis en présence des inhibiteurs. On a ainsi pu déterminer les quantités d'inhibiteur qu'il fallait utiliser pour inhiber la papaïne après papainisation des cellules, sachant qu'elles n'étaient pas cytotoxiques. Le protocole préliminaire qu'on a testé est donc le suivant : après avoir rincé les cellules, on laisse agir la papaïne à 0,005 % durant 20 minutes puis elle est inhibée par les inhibiteurs à une concentration de 5 $\mu\text{g/ml}$. La suspension cellulaire est alors récoltée et centrifugée pendant 10 minutes afin d'éliminer les complexes enzyme-inhibiteur qui se sont formés. Une vérification par dosage biochimique nous confirme la formation de ces complexes.

Les fibroblastes MRC-5 semblent bien se comporter après une papainisation, puisque l'estimation de l'incorporation à la thymidine tritiée est semblable à celle des MRC-5 repiquées à la trypsine. L'observation des cellules en microscopie photonique et électronique soutient cette constatation ainsi qu'une expérience d'incorporation de la BrdU, qui permet de visualiser les cellules entrant en phase S du cycle cellulaire.

Dans un deuxième temps, on a voulu préciser l'effet cumulatif de quatre papainisations successives. Dans ces conditions, on observe que la papaïne affecte négativement la capacité proliférative des cellules :

- d'une part, on a observé que les cellules requièrent plus de temps pour arriver à confluence;
- d'autre part, elles incorporent moins de thymidine tritiée, sur une période de 24 heures, après leur attachement au polystyrène des flacons de culture. Les dosages protéiniques à 24 et 48 heures après le repiquage confirment également ce ralentissement de la croissance.

On a réalisé une dernière expérience de clonage sur des cellules papainisées une seule

fois. Celle-ci révèle que même lorsque les cellules ne sont papainisées qu'une seule fois leur comportement prolifératif est affecté négativement. Par conséquent, on en conclut qu'à plus long terme, le nouveau système enzyme-inhibiteur s'avère toxique pour les cellules. Il reste donc à optimiser cette nouvelle technique de repiquage.

L'intérêt de ce travail est double. D'une part, il démontre clairement que lorsqu'on veut tester les effets par exemple d'un traitement enzymatique tel que la papainisation, il faut pouvoir évaluer les effets à court terme (par exemple en mesurant l'incorporation de thymidine tritiée) et à plus long terme (par exemple, par les expériences de clonage). Il faut aussi déterminer les effets de traitements successifs, à effet cumulatif. On s'est limité à 4 papainisations, avec déjà des effets défavorables. En admettant qu'on parvienne à améliorer la procédure, il faudra suivre l'évolution de la survie et de la prolifération cellulaires, à partir de cultures "jeunes", donc de génération réduite, qui seraient papainisées jusqu'à épuisement du potentiel prolifératif. Enfin, on pourrait compléter la batterie de tests qu'on a utilisé, en y incluant des tests donnant une indication sur l'état de "vieillesse" de la culture. Toussaint et al. (1992) ont montré que le vieillissement *in vitro* de plusieurs lignées de fibroblastes s'accompagnait de modifications morphologiques, observables en microscopie photonique. Ces auteurs classent les cellules en sept morphotypes, dont les morphotypes I à III, mitotiques et les morphotypes IV à VII, post-mitotiques. Les proportions relatives de ces différents morphotypes varient au cours du vieillissement de la culture et permettent d'évaluer son état de vieillissement. Les stress (avec de l'éthanol, des peroxydes, les rayons UV,...) accélèrent le processus d'apparition des morphotypes post-mitotiques. On pourrait donc évaluer les effets de la papaine sur la distribution des morphotypes à une génération donnée. Plus récemment, Dimri et al. (1995) ont également caractérisé un "biomarqueur" du vieillissement cellulaire *in vitro* : il s'agit d'une β -galactosidase, qu'on peut mettre en évidence par histochimie à pH 6 et qui n'est décelable que dans les cellules vieilles, contrairement à la β -galactosidase lysosomale, présente dans les cellules jeunes et vieilles, mais qui requiert un pH plus acide pour être révélée.

D'autre part, même si le protocole de papainisation proposée, n'est pas satisfaisant, à l'heure actuelle, il existe plusieurs voies possibles qui devraient l'améliorer. Primo, il est reconnu que la trypsine est d'autant plus active, qu'elle est contaminée par d'autres protéases. Combiner la papaine avec une ou d'autres protéases d'origine végétale semble donc une

première approche possible. Secundo, on peut également agir au niveau des inhibiteurs, la leupeptine et l'antipain. On choisirait un inhibiteur beaucoup plus spécifique que les deux qui ont retenu notre attention depuis le début du mémoire. En effet, la leupeptine et l'antipain sont capables d'inhiber non seulement la plupart des cystéine protéases mais aussi certaines sérine protéases proches de la trypsine. Elles peuvent donc altérer le métabolisme intracellulaire et perturber l'action de certaines enzymes, nécessaires au bon fonctionnement de la cellule. En effet, la leupeptine pourrait inhiber les phospholipases C et D chez les hépatocytes de rat. Ces deux enzymes sont reconnues pour jouer un rôle dans les réponses mitogéniques induites par les facteurs de croissance (Benistant, 1994). L'inhibiteur E-64 conviendrait donc mieux puisqu'il ne réagit qu'avec les thiols du site actif des cystéine protéases et semble donc beaucoup plus spécifique.

Il reste quelques problèmes pratiques à améliorer. Il serait intéressant de pouvoir congeler et décongeler le stock de papaïne (0,005 %) sans pour autant perdre une partie de l'activité enzymatique. Une autre solution pourrait être de tester d'autres tampons capables de diluer la papaïne sans la précipiter et qui conviendraient aussi aux cellules; on se tournerait vers des tampons plus réducteurs qui protégeraient mieux le groupe thiol du site actif de l'enzyme.

En conclusion, remplacer la trypsine qui a fait ses preuves depuis plusieurs dizaines d'années, n'est pas une tâche facile. Les résultats préliminaires obtenus dans ce mémoire suggèrent que la papaïne pourrait être une alternative intéressante, même si l'optimisation de la procédure de papaïnisation, est loin d'être terminée. Si une procédure optimale aboutissait pour les cellules MRC-5, il serait également intéressant de voir si elle s'applique à d'autres types cellulaires.

BIBLIOGRAPHIE

Adolphe M. (1988).

"Bases des méthodes de culture." 1-8 dans

Cultures de cellules animales.

Edité par Adolphe M. and Barlovatz-Meinon G.,

Altschuh D., Tessier D.C. and Vernet T. (1994).

"Modulation of the enzymatic activity of papain by interdomain residues remote from the active site."

Protein Engineering, 7, n° 6 (769-775),

Arnon R. (1970).

"Papain." 226-244 dans

Methods in enzymology : proteolytic enzymes (volume XIX).

Edité par Colowick S.P. and Kaplan N.O.,

Auerswald E.A., Nägler D.K., Assflag-Machleidt I., Stubbs M.T., Machleidt W. and Fritz H. (1995).

"Hairpin loop mutations of chicken cystatin have different effects on the inhibition of cathepsin B, L and papain."

FEBS lett., 361 (179-184),

Bader C.R. (1978).

"Responses to light of solitary rod photoreceptors isolated from tiger salamander retina."

Proc. Nat. Acad. Sci., 75, n° 7 (3507-3511),

Barrett A.J. (1981).

" α_2 -macroglobuline." 737-754 dans

Methods in enzymology : proteolytic enzymes (part C).

Edité par Laszlo Lorand,

Barrett A.J. (1987).

"The cystatins : a new class of peptidase inhibitors."

TIBS, 12 (193-196),

Berti P.J. and Storer A.C. (1995).

"Alignment/Phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases."

J. mol. biol., 246 (273-283),

Butterfield A. and Lee J. (1994).

"Active site structure and stability of the thiol protease papain studied by electron paramagnetic resonance employing a methanethiosulfonate spin label."

Arch. biochem. biophys, 310, n° 1 (167-171),

Cartwright T. and Shah G.P. (1994).

"Culture media." 69-79 dans

Basic cell culture : a practical approach.

Edité par Davis J.M.,

Cuvellier G.F. (1993).

"Production des enzymes." 351-364 dans

Biotechnologie.

4^e Edition par Scriban R.,

Davis J.M. (1994).

Basic cell culture : a practical approach.

Edité par IRL Press.

Delforge D., Art M., Gillon B., Dieu M., Delaive E., Raes M. and Remacle J. (1996).

"Automated solid-phase synthesis of cyclic peptides bearing a side-chain tail designed for subsequent chemical grafting."

Analytical Biochemistry, 242 (180-186),

Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J. (1995).

"A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo."

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92** (9363-9367),

Dufour E., Storer A.C. and Ménard R. (1995).

"Peptide aldehydes and nitriles as transition state analog inhibitors of cysteine proteases."

Biochemistry, **34**, n° 28 (9136-9143).

Dunn B.M. (1989).

"Determination of protease mechanism." 57-81 dans

Proteolytic enzymes : a practical approach.

Edité par Beynon R.J. and Bond J.S.,

Durand G. and Mosan P. (1982).

Les enzymes : production et utilisations industrielles.

Edité par Gauthier-Villars,

Eagle H. (1955).

"Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture."

Science, **122**, n° 3168 (501-504),

Freshney R. (1987).

Culture of animal cells : a manual of basic technique.

Seconde édition par Alan R. Liss, Inc.,

Froger B. and Adolphe M. (1988).

"Besoins nutritifs des cellules en culture." 9-15 dans

Cultures de cellules animales.

Edité par Adolphe M. and Barlovatz-Meinon G.,

Hansen M.B., Nielsen S.E., Berg K. (1989).

"Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill."

J. Immunol. Methods, **119** (203-210),

Hanzlik R.P., Jacober S.P. and Zygmunt J. (1990).

"Reversible binding of peptide aldehydes to papain. Structure - activity relationships."

Biochimica and biophysica acta, **1073** (33-42),

Hayflick L. and Moorhead P.S. (1961).

"The serial cultivation of human diploid cell strains."

Exp. cell research, **25** (585-621),

Hsieh M.C. and Berry H.K. (1984).

"Measurement of trypsin-like activity of saliva, serum and meconium by a synthetic substrate carbobenzoxy-L-arginine-7-amino-4-methylcoumarin amide (CAMCA)."

Clinica Chimica Acta, **138** (221-227),

Ito Y., Liu S., Nakabayashi M. and Imanishi Y. (1992).

"Cell growth on immobilized cell growth factor."

Biomaterials, **13**, n° 11 (789-794),

Jacobs J.P. (1970).

Nature, **227** (168-170).

Jayme D.W. and Gruber D.F. (1994).

Cell biology : a laboratory Handbook (Volume I).

Edité par Julio E. Celis,

Klagsbrun M., Langer R., Levenson R., Smith S. and Lillehei C. (1977).

"The stimulation of DNA synthesis and division in chondrocytes and 3T3 cells by a growth factor isolated from cartilage."

Exp. Cell. Res., **105** (99-108),

Lam D.M.K. (1972).

"Biosynthesis of acetylcholine in turtle photoreceptors."

Proc. Nat. Acad. Sci., **69**, n° 7 (1987-1991),

Lecomte V., Knott I., Burton M., Remacle J., Raes M. (1994).

"Cathepsin B and N-acetyl- β -D-glucosaminidase in human synovial cells in culture : effects of interleukin-1."

Clinica Chimica Acta, **228** (143-159),

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951).

"Protein mesurment with the folin phenol reagent."

J. Biol. Chem., **193** (265-275),

Matsumoto K., Murata M., Sumiya S., Kitaamura K. and Ishida T. (1994).

"Clarification of substrate specificity of papain by crystal analyses of complexes with covalent-type inhibitors."

Biochim. biophys. acta, **1208** (268-276),

Mc Ateer J. and Davis J.

"Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines." 93-148 dans

Basic cell culture : a pratical approach.

Edit  par Davis J.M.,

Mosmann T. (1983).

"Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays."

J. Immunol. Meth., **65** (55-63),

Okano T., Yamada N., Okuhara M., Sakai H. and Sakurai Y. (1994).

"Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces."

Biomaterials, **16** (297-303),

Parks D.R., Bryan V.M., OI V.M., OI V.T. and Herzenberg L.A. (1979).

"Antigenic specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence activated cell sorter."

Proc. Nat. Acad. Sc. USA, **76** (1962-1966),

Pickersgill R.W., Harris G.W., Garman E. (1992).

"Structure of monoclinic papain"

Acta crystallogr., Sect. B, **48** (59),

Rawn J.D. (1990).

Traité de biochimie.

Edité par les éditions universitaires,

Remacle J., Houben A., Leblon J.P., Somville M., Mbemba F., Houbion A. and Raes M. (1982).

"Evolution, plasticité et modification des cellules au cours du vieillissement. Effet de la vincamine sur le vieillissement cellulaire."

Agence MK pour les laboratoires DAUSSE, Paris, France,

Rezania A., Thomas Ch. H., Healy K.E. (1996).

"Immobilization of biomimetic cell-adhesive peptides on model biomaterials for enhancing bone cell adhesion."

Surfaces in biomaterials foundation, (147-151),

Ruoslahti E., Noble N.A., Kagami S. and Border W.A. (1994).

"Integrins."

Kidney Int., **45** (S17-S22),

Salvesen G. and Nagase H. (1989).

"Inhibition of proteolytic enzymes." 83-104 dans

Proteolytic enzymes : a practical approach.

Edité par Beynon R.J. and Bond J.S.,

Schen J., Watanabe S. and Kaneko A. (1995).

"Cell dissociation with papain reduces the density of c GMP-activated channels of the retinal rod."

Jpn. J. physiol, **45**, n° 1 (151-164),

Schroder E., Phillips C., Garman E., Harlos K. and Crawford C.

"X-ray crystallographic structure of papain-leupeptin complex."

FEBS lett., **315**, n° 1 (38-42),

Serveau C., Juliano L., Bernard P., Moreau T., Mayer R., Gauthier F. (1994).

"New substrates of papain, based on the conserved sequence of natural inhibitors of the cystatin family."

Biochimie, **76** (153-158),

Storer A.C. and Ménard R. (1994).

"Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases."

Methods enzymol., **244** (4866-500),

Tachibana M. and Kanko A. (1987).

"Gamma-Aminobutyric acid exerts a local inhibitory action on the axon terminal of bipolar cells : evidence for negative feedback from amacrine cells."

Prot. Natl. Acad. Sci., **84** (3501-3505),

Tamada Y. and Ikada Y. (1994).

"Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen."

J. of biomedical materials research, **28** (783-789),

Taylor M., Briggs G.S., Baker K.C., Cummings N.J., Pratt K.A., Freedman R.B. and Goodenough P.W. (1995).

"Expression of the pro-regions of papain and papaya proteinase IV in Escherichia coli and their inhibition mature cysteine proteinases."

Biochem. Soc. Trans., **23**, n° 1 (805),

Toussaint O., Houbion A. and Remacle J. (1992).

"Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture."

Mech. Ageing Dev., **65** (65-83),

Umezawa H. (1976).

"Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin." 678-695 dans Methods in enzymology : proteolytic enzymes (part B) (volume XLV).

Édité par Laszlo Lorand,

Venstrom K.A. and Reichardt L.F. (1993).

"Extracellular matrix 2 : role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system."

FASEB J., **7** (996-1003),

Vernet T., Tessier D.C., Richardson C., Laliberté F., Khouri H.E., Bell A.W., Storer A.C. and Thomas D.Y. (1990).

"Secretion of functional papain precursor from insect cell."

Journal of biological chemistry, **265**, n° 27 (16661-16666),

Vernet T., Khouri H.E., Laflamme P., Tessier D.C., Musil R., Gour-Salin B.J., Storer A.C. and Thomas D.Y. (1991).

"Processing of the papain precursor."

Journal of biological chemistry, **266**, n° 32 (21451-21457),

Vernet T., Tessier D.C., Chatelier J., Plouffe C., Lee T.S., Thomas D.Y., Storer A.C. and Ménard R. (1993).

"Structural and functional roles of asparagine 175 in the cysteine protease papain."

J. biol. chem., **270**, n° 28 (16645-16652),

Wang J., Xiang Y. and Lim C. (1993).

"The double catalytic triad, Cys-25 His-159 Asp-158 and Cys-25 His-159 Asn-175,
in papain catalysis role of Asp-158 and Asn-175."

Protein engineering, 7, n° 1 (75-82),

Wingender W. (1974).

"Proteinase inhibitors of microbial origin."

Proteinase inhibitors, 5 (548-559),

Zubay G. (1983).

Biochemistry.

Édité par Addison-Wesley Publishing Company,

Zubay G. (1993).

Biochemistry.

Troisième édition par William C. Brown Publishing Company.