



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

**THESE**

(M)1995 PERANI, A.

*Label Européen*

*Présentée et soutenue publiquement*

*le 20 Juillet 1995*

*dans le but d'obtenir le titre de*



*MENTION GÉNIE BIOLOGIQUE*

*DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE*

*par*

*Angelo PERANI*

## *Cultures d'hybridomes*

*Production d'anticorps monoclonaux - Etude de l'apoptose  
et application à la toxicité de surfactifs*

### **Membres du jury**

|               |                           |  |
|---------------|---------------------------|--|
| Président :   | M. le Pr. Claude SELVE    | Professeur à l'Université Henri Poincaré Nancy I   |
| Rapporteurs : | Mme le Dr. M-Rosa INFANTE | Directeur de Recherches au CISC Barcelone          |
|               | M. le Dr. Alan DOYLE      | Directeur de Recherches au CAMR Salisbury          |
|               | M. le Dr. Otto MERTEN     | Directeur de Recherches à l'Institut Pasteur Paris |
| Examineurs :  | M. le Dr. Glyn STACEY     | Directeur de Recherches à l'ECACC Salisbury        |
|               | M. le Dr. Michel MAUGRAS  | M.C.U. à l'Université Henri Poincaré Nancy I       |

Service Commun de la Documentation  
INPL  
Nancy-Brabois

## AVANT PROPOS

*Ce travail a été réalisé principalement au sein de l'ex-unité INSERM U284 (Vandoeuvre-lès-Nancy, France). Dans le cadre de la thèse à label européen, nous avons effectué une autre partie du travail expérimental à l'ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures) (Salisbury, Angleterre).*

*Je tiens, tout d'abord, à exprimer ma profonde gratitude à M. le Pr. Claude SELVE, pour avoir bien voulu être le Président de mon jury de thèse. Je voudrais également le remercier pour m'avoir permis d'approcher les problèmes concernant la chimie des tensioactifs, avec compétence et une extrême gentillesse.*

*Agradezco muy sinceramente à la Dra Ma Rosa INFANTE de haberse desplazado desde Barcelona para ser miembro del jurado de tesis y de haber revisado mi manuscrito del punto de vista químico. Lleve Ud. mi profunda gratitud.*

*I would like to thank Dr. Alan DOYLE to accept to review my thesis and to give me some interesting remarks concerning the cell culture part of my thesis. I would also thank him, to allow me, to do my PhD project at ECACC in the best conditions.*

*Je remercie tout particulièrement le Dr. Otto MERTEN d'avoir bien voulu être membre de mon jury de thèse en tant que rapporteur. Sa compétence dans le domaine des cultures d'hybridomes et dans celui de la production d'anticorps s'est traduite sous la forme de remarques très judicieuses sur le contenu de ce manuscrit. Je vous exprime ma profonde reconnaissance.*

*I would specially thank Dr. Glyn STACEY for his scientific managing during the last two years. He brought me all the necessary knowledge about molecular biology and hybridoma cell stability. He also participate to all the publications and scientific researchs that I have realized during this period. Glyn be sure of my respect and friendship.*

*Je tiens à remercier tout spécialement le Dr. Michel MAUGRAS qui a été mon directeur de thèse. Une grande partie du travail que je présente dans ce manuscrit lui est due. Tout au long des cinq années passées ensemble, il a su me faire confiance et m'apporter tout son savoir-faire. Je voudrais ici lui exprimer ma reconnaissance pour sa précieuse aide scientifique. Je tiens également à souligner ici sa générosité et ses autres qualités humaines qui font de lui quelqu'un avec qui il m'a été très agréable de travailler.*

*J'exprime mes remerciements sincères à Mme Mireille DONNER sans qui ce travail n'aurait pas pu voir le jour dans les meilleures conditions au sein de la nouvelle équipe du GRIMI. Son amabilité et sa disponibilité ont permis la réalisation matérielle et technique de cette thèse.*

*I would also like to thank all the ECACC team (present in early 1994) : the Dr. Alison STACEY who help me with fingerprints gels; Helen BEVINS for her ELISA tests, Sue HAVIS for the mycoplasma tests, and all the other members of the staff. You have to know that I have spend a very good time with you.*

*Je voudrais remercier également Dominique DUMAS (mon "coéquipier" de DEA). Une partie des résultats concernant les adaptations lui est due. Pendant de longs mois, il a partagé avec moi les longs comptages mais aussi de bons moments. Je tiens à lui souhaiter une excellente réussite professionnelle et familiale.*

*Je remercie très sincèrement Jacky DIDELON qui, avec son excellent talent d'ingénieur, a su développer le système de tubes à dialyse. Mais je voudrais également le remercier pour sa gentillesse et son amitié.*

*Le travail concernant la cytométrie en flux n'aurait jamais pu être réalisé sans la précieuse aide de Mme Sophie MARCHAL qui avec M. Jean Louis MERLIN m'ont permis de réaliser le travail de cytométrie au Centre Alexis Vautrin de Nancy.*

*La partie concernant l'étude des surfactifs à base de noyaux  $\beta$ -lactame a été réalisée conjointement avec Mme Laurence MOLINA. Je tiens à lui exprimer toute mon amitié et à la remercier pour sa collaboration.*

*Je voudrais remercier, tout particulièrement, Mmes Monique GENTIL et Ghislaine GAUCHOIS, qui m'ont fourni des échantillons sanguins pendant plusieurs années. Je tiens à les remercier pour leur gentillesse et leur disponibilité.*

*Ce travail est le fruit d'un esprit d'équipe. Il a été enrichi par la collaboration et le travail de différents étudiants en DEA au sein du laboratoire : Mlle Maria Guadalupe SOLIS RECENDEZ qui a participé avec moi au passionnant travail de recherche sur l'apoptose mais également sur les antiprotéases ; M. Bruno D'HABIT avec qui j'ai partagé les premiers pas de notre équipe dans la biologie moléculaire, M. Francis BICHAT et Mlle Florence POIRSON qui ont travaillé dans la partie correspondant aux systèmes de tubes à dialyse et dans celle concernant les surfactifs non ioniques ; Mlle Sophie LAMBERT pour sa collaboration dans le travail sur les surfactifs et les myélomes et Mlle Béatrice MATHIOT qui a participé pendant mon DEA et ma première année de thèse, à la mise au point des milieux sans sérum et l'amélioration du système de tubes à dialyse.*

*Je remercie également pour son aide technique M. Mehdi Roger BARROIS qui a réalisé un grand nombre d'expériences de culture et de tests ELISA. Je tiens à lui exprimer mes remerciements les plus sincères.*

*Je voudrais également remercier également l'équipe " Donner " : Mme Sylvaine MULLER, Mlle Nezha ZEGARI et Mme Sandrine SAVONNIERE-MICCOLI qui ont permis également de mener à bien ce travail. Mais aussi tous les autres membres du laboratoire.*

*Un grand merci également à Mlle Sophie BRUNET qui participe activement aux expériences qui font suite à ce travail.*

*Je ne saurais oublier l'aide technique qui m'a été apportée par Mme Michelle PFISTER.*

*Enfin et surtout je remercie de tout coeur mes parents Milena et Michel PERANI qui m'ont apporté le soutien nécessaire, matériel et moral, à tout*

*moment. Il en est de même pour mes frères et soeurs ainsi que pour les familles MONTIGNY et HAMER.*

*Enfin mes plus grands remerciements reviennent à ma femme, Fabienne, qui m'a accompagné tout au long de ce travail de thèse. Elle a su me soutenir moralement, m'aider avec sa gentillesse et sa compréhension. Elle a consacré beaucoup de temps et d'amour pour que je mène ce projet à terme. Je la remercie du fond de mon coeur.*

## TABLE DES MATIERES

|  |           |
|--|-----------|
| <b><u>I. INTRODUCTION</u></b> .....  | <b>18</b> |
| <b>I.A. Généralités</b> .....  | <b>19</b> |
| <b>I.B. Milieux et cultures cellulaires</b> .....                              | <b>21</b> |
| <b>I.C. Hybridomes et systèmes de production d'anticorps monoclonaux</b> ..... | <b>24</b> |
| <b>I.D. Apoptose ou mort cellulaire programmée</b> .....                       | <b>27</b> |
| <b><u>II. MATÉRIEL ET MÉTHODES</u></b> .....                                   | <b>31</b> |
| <b>II.A. Lignées cellulaires</b> .....   | <b>32</b> |
| <b>II.B. Milieux de culture</b> .....  | <b>32</b> |
| II.B.1. RPMI 1640 .....  | 32        |
| II.B.2. DMEM .....   | 33        |
| II.B.3. F12 de HAM .....   | 33        |
| II.B.4. BM .....   | 33        |
| <b>I.C. Systèmes de culture</b> .....  | <b>34</b> |
| II.C.1. Plaques de culture .....   | 34        |
| II.C.2. Boîtes de culture .....  | 34        |
| II.C.3. Spinners .....   | 34        |
| II.C.4. Systèmes à membrane de dialyse .....                                   | 34        |
| <b>II.D. Manipulation et entretien des cellules</b> .....                      | <b>36</b> |
| II.D.1. Cellules semi ou peu adhérentes .....                                  | 36        |
| II.D.2. Congélation des cellules .....   | 36        |
| II.D.3. Décongélation des cellules .....                                       | 36        |
| II.D.4. Cas des tubes à dialyse .....  | 36        |
| <b>II.E. Adaptations</b> .....   | <b>37</b> |
| II.E.1. Définition .....   | 37        |
| II.E.2. Paramètres mesurés .....   | 37        |
| <b>II.F. Détermination des paramètres cellulaires</b> .....                    | <b>38</b> |
| II.F.1. Coloration au bleu trypan .....  | 38        |
| II.F.1.a) Réactifs .....   | 38        |

|  |           |
|--|-----------|
| II.F.1.b) Paramètres mesurés .....   | 39        |
| II.F.2. Coloration avec le mélange bromure d'éthidium/acridine<br>orange ..... | 41        |
| II.F.2.a) Réactifs .....   | 41        |
| II.F.2.b) Paramètres mesurés .....   | 42        |
| <b>II.G. Analyse des métabolites .....</b>                                     | <b>42</b> |
| II.G.1. Dosage des anticorps par test ELISA .....                              | 42        |
| II.G.1.a) Principe .....   | 43        |
| II.G.1.b) Réactifs .....   | 43        |
| II.G.1.b.1) Tampons .....  | 43        |
| II.G.1.b.2) Anticorps de revêtement des plaques .....                          | 44        |
| II.G.1.b.3) Anticorps standard .....   | 44        |
| II.G.1.b.4) Anticorps marqués à la peroxydase .....                            | 44        |
| II.G.1.b.5) Substrat de la peroxydase .....                                    | 44        |
| II.G.1.c) Revêtement des plaques "coating" .....                               | 45        |
| II.G.1.d) Dépôt de l'anticorps à doser .....                                   | 45        |
| II.G.1.e) Dépôt du conjugué anticorps-peroxydase .....                         | 45        |
| II.G.1.f) Paramètres mesurés .....   | 46        |
| <b>II.H. Analyse de l'ADN par électrophorèse.....</b>                          | <b>47</b> |
| II.H.1. Extraction de l'ADN .....  | 47        |
| II.H.2. Dosage de l'ADN .....  | 49        |
| II.H.3. Electrophorèse sur gel d'agarose.....                                  | 50        |
| II.H.3.a) Préparation des échantillons .....                                   | 50        |
| II.H.3.b) Séparation .....   | 50        |
| II.H.3.c) Visualisation .....  | 50        |
| II.H.4. Empreinte digitale de l'ADN .....                                      | 51        |
| II.H.4.a) Principe .....   | 51        |
| II.H.4.b) Marquage de la sonde oligonucléotidique 33.15 .....                  | 52        |
| II.H.4.b.1) Hybridation, lavage et marquage des<br>southern blots .....        | 52        |



|   |            |
|---|------------|
| III.B.1.a) Concentrations cellulaires.....  | 83         |
| III.B.1.b) Viabilités .....   | 84         |
| III.B.2. Culture en flacons à agitation .....   | 85         |
| III.B.2.a) Concentrations cellulaires.....  | 85         |
| III.B.2.b) Viabilités .....   | 86         |
| III.B.3. Culture en tubes à dialyse .....   | 87         |
| III.B.3.a) Concentrations cellulaires.....  | 88         |
| III.B.3.b) Viabilités .....   | 89         |
| III.B.4. Empreinte digitale de l'ADN.....   | 90         |
| III.B.5. Analyse de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose.....                     | 91         |
| III.B.5.a) Culture en boîtes.....   | 91         |
| III.B.5.b) Culture en flacons à agitation.....  | 92         |
| III.B.5.c) Culture en tubes à dialyse.....  | 93         |
| III.B.6. Discussion.....  | 94         |
| III.B.7. Etude complémentaire de systèmes de culture à base de<br>tubes à dialyse ..... | 99         |
| III.B.7.a) Présentation du système.....   | 99         |
| III.B.7.b) Culture d'hybridomes 12H8 et A49 .....                                       | 100        |
| III.B.7.b.1) Culture avec des milieux sans sérum .....                                  | 100        |
| III.B.7.b.2) Utilisation d'antiprotéases .....  | 103        |
| III.B.7.c) Evolution du système de culture à dialyse.....                               | 105        |
| III.B.7.d) Utilisation du système de culture, son évolution .....                       | 107        |
| III.B.7.e) Différentes lignées cultivées .....  | 109        |
| <b><u>IV. MORT CELLULAIRE.....</u></b>  | <b>113</b> |
| <b>IV.A. Techniques de détection .....</b>  | <b>113</b> |
| <b>IV.B. Apoptose induite.....</b>  | <b>113</b> |
| IV.B.1. Choc thermique.....   | 114        |
| IV.B.1.a) AFRC MAC 65 .....   | 114        |
| IV.B.1.b) HF2 x 653 .....   | 115        |
| IV.B.1.c) OX 19 .....   | 116        |

|  |                   |
|--|-------------------|
| IV.B.2. Privation de sérum - Adaptation à un milieu sans sérum.....                      | 117               |
| IV.B.3. Induction par des molécules de faible poids moléculaire.....                     | 124               |
| <b>IV.C. Apoptose spontanée .....</b>  | <b>126</b>        |
| IV.C.1. Hybridome A49 .....  | 126               |
| IV.C.2. Hybridome 12H8 .....   | 129               |
| IV.C.3. Généralisation du phénomène.....   | 130               |
| <b>IV.D. Caractérisation d'une lignée d'hybridomes résistante à<br/>l'apoptose .....</b> | <b>131</b>        |
| IV.D.1. Comparaison avec les cellules A49.....   | 131               |
| IV.D.2. Myélomes .....   | 136               |
| IV.D.3. Conclusions .....  | 138               |
| <b><u>V. MORT CELLULAIRE ET SURFACTIFS .....</u></b>                                     | <b><u>140</u></b> |
| <b><u>VI. DISCUSSION GENERALE .....</u></b>  | <b><u>149</u></b> |
| VI.A. Production d'anticorps monoclonaux .....   | 150               |
| VI.B. Mort des hybridomes par apoptose.....  | 153               |
| VI.C. Surfactifs non ioniques et toxicologie.....  | 159               |
| <b><u>VII. CONCLUSION.....</u></b>   | <b><u>163</u></b> |
| <b><u>VIII. BIBLIOGRAPHIE.....</u></b>   | <b><u>168</u></b> |
| <b><u>IX. ANNEXE.....</u></b>  | <b><u>186</u></b> |

## INDEX

### **Figures :**

- 1.1 : Eléments essentiels à la croissance cellulaire, *21*
- 1.2 : Eléments constitutifs d'un milieu de culture, *22*
- 1.3 : Différentes étapes de l'hybridation cellulaire, *25*
- 1.4 : Différents types de mort cellulaire, *29*
- 2.1 : Schéma de principe du système de culture à dialyse, *35*
- 2.2 : Molécule de bleu trypan, *38*
- 2.3 : Formules du bromure d'éthidium et de l'acridine orange, *41*
- 2.4 : Cellules colorées avec le mélange bromure d'éthidium, *42*
- 2.5 : Schéma de principe du test ELISA, *43*
- 2.6 : Schéma d'extraction et de dosage de l'ADN cellulaire, *48*
- 2.7: Spectre du couple ADN/HOECHST 33258, *49*
- 2.8 : Empreinte digitale de l'ADN, *51*
- 2.9 : Méthode NICE™ de marquage des sondes oligonucléotides, *52*
- 2.10 : Calibration du tube de l'électrophorèse capillaire, *55*
- 2.11 : Molécule de TMA-DPH, *57*
- 2.12 : Surfactifs à base de noyau bêta-lactame, *61*
- 2.13 : Protocole d'incubation des surfactifs, *64*
- 3.1 : Adaptation par étapes avec trois souches d'hybridomes, *68*
- 3.2 : Adaptations par une méthode dérivant de celle décrite par, *70*
- 3.3 : Adaptations suivant la méthode décrite par Chandler, *71*
- 3.4 : Adaptations à un nouveau milieu de base, *72*
- 3.5 : Adaptations de trois souches d'hybridomes, *74*
- 3.6 : Adaptations vers milieu BM-IBF, *75*
- 3.7 : Intégrales de cellules vivantes après adaptation, *76*
- 3.8 : Production d'IgM avant et après adaptation, *77*
- 3.9 : Productivité en anticorps avant et après adaptation, *77*
- 3.10 : Evolution de la concentration en cellules vivantes, *83*
- 3.11 : Evolution de la concentration en cellules totales, *84*

- 3.12 : Evolution des pourcentages de viabilité, *84*
- 3.13 : Evolution de la concentration en cellules vivantes, *85*
- 3.14 : Evolution de la concentration en cellules totales, *86*
- 3.15 : Evolution des pourcentages de viabilité, *86*
- 3.16 : Evolution de la concentration en cellules vivantes, *88*
- 3.17 : Evolution de la concentration en cellules totales, *88*
- 3.18 : Evolution des pourcentages de viabilité, *89*
- 3.19 : Empreinte digitale de l'ADN, *90*
- 3.20 : Electrophorèse sur gel d'agarose, *91*
- 3.21 : Electrophorèse sur gel d'agarose, *92*
- 3.22 : Electrophorèse sur gel d'agarose, *93*
- 3.23 : Comparaison des intégrales des cellules vivantes, *95*
- 3.24 : Comparaison des intégrales des cellules totales, *95*
- 3.25 : Productivité des cellules OX 19, *97*
- 3.26 : Croissance de cellules A49 en milieu sans sérum, *101*
- 3.27 : Croissance de cellules A49 en milieu RPMI U SVF, *102*
- 3.28 : Dégradation des anticorps par des protéases, *104*
- 3.29 : Action d'antiprotéases, *105*
- 3.30 : Concentrations cellulaires, *106*
- 3.31 : Production d'IgG par l'hybridome 12H8, *107*
- 3.32 : Intégrales de cellules, *110*
- 3.33 : Productions des cultures en tubes à dialyse, *111*
- 3.34 : Productivités des cultures en tubes à dialyse, *112*
- 4.1 : Electrophorèse sur gel des cellules AFRC MAC 65, *114*
- 4.2 : Electrophorèse sur gel des cellules HF2 x 653, *115*
- 4.3 : Electrophorèse sur gel des cellules OX 19, *116*
- 4.4 : Adaptation des cellules A49 à un milieu sans sérum, *118*
- 4.5 : Evolution du cycle cellulaire, *119*
- 4.6 : Evolution du cycle cellulaire, *120*
- 4.7 : Evolution des différentes phases du cycle cellulaire, *122*

- 4.8 : Evolution du pourcentage de cellules apoptotiques, *122*
- 4.9 : Corrélation entre les pourcentages d'apoptose, *123*
- 4.10 : Fragmentation de l'ADN, *125*
- 4.11 : Analyse des ADN de cellules A49, *127*
- 4.12 : Analyse en électrophorèse capillaire, *128*
- 4.13 : Analyse des ADN extraits de cellules 12H8, *129*
- 4.14 : Comparaison morphologique, *132*
- 4.15 : Evolution des concentrations cellulaires, *133*
- 4.16 : Marquage avec le TMA-DPH des cellules HF2 x 653, *134*
- 4.17 : Fragmentation de l'ADN des cellules A49 et HF2 x 653, *135*
- 4.18 : Croissances cellulaires de 4 myélomes, *137*
- 4.19 : Cellules IL-A43 cultivées en boîtes, *138*
- 5.1 : Pourcentages des différents types cellulaires, *144*
- 5.2 : Electrophorèse sur gel d'agarose, *145*
- 5.3 : Comparaison des structures chimiques, *148*
- 6.1 : Hypothèse de régulation génétique de l'apoptose, *155*

## **Tableaux**

- I : Description des lignées cellulaires utilisées, *32*
- II : Caractéristiques des différents systèmes à dialyse, *35*
- III : Propriétés physico-chimiques des surfactifs, *59*
- IV : Production d'IgG des cellules OX 19, *97*
- V : Valeurs des paramètres temps et température, *114*
- VI : Composition des solutions d'incubation, *124*
- VII : Détection de l'apoptose spontanée, *130*
- VIII : Action des surfactifs sur les hybridomes HF2 x 653, *146*
- IX : Gènes contrôlant l'apoptose, *154*
- IX : Gènes contrôlant l'apoptose, *150*

## ABRÉVIATIONS

|                    |   |
|--------------------|---|
| <b>ADN :</b>       | Acide désoxyribonucléique   |
| <b>ARN :</b>       | Acide ribonucléique   |
| <b>DMEM :</b>      | Milieu minimum d'Eagle modifié par Dulbecco<br>"Dulbecco's modified Eagle medium"                   |
| <b>DMSO :</b>      | Diméthylsulfoxyde   |
| <b>ECACC :</b>     | Banque européenne de cultures cellulaires animales<br>"European Collection of Animal Cell Cultures" |
| <b>EDTA :</b>      | Ethylène diamine tetra acétate de sodium  |
| <b>ELISA :</b>     | Dosage par immunoadsorption<br>"Enzyme linked immuno sorbent assay"                                 |
| <b>H.S.A. :</b>    | Sérum albumine humaine  |
| <b>HAM'S F12 :</b> | Milieu nutritif F12 de Ham  |
| <b>HEPES :</b>     | Acide [(hydroxy-2-éthyl)-4-pipérasine]-1-éthane sulfonique  |
| <b>IgG :</b>       | Immunoglobuline de classe G   |
| <b>IgM :</b>       | Immunoglobuline de classe M   |
| <b>PBS :</b>       | Tampon sel phosphate<br>"Phosphate buffered saline"   |
| <b>(p/p) :</b>     | Poids par poids   |
| <b>(p/v) :</b>     | Poids par volume  |
| <b>PM :</b>        | Poids moléculaire   |
| <b>RPMI :</b>      | Milieu "Rosewell Park Memorial Institute"   |
| <b>SVF :</b>       | Sérum de veau foetal  |

## *Culture d'hybridomes : production d'anticorps, étude de l'apoptose et application à la toxicité de surfactifs*

### RÉSUMÉ

*La production d'anticorps monoclonaux par des cultures d'hybridomes peut être optimisée en utilisant des milieux sans sérum ou en effectuant des cultures en masse. Par ailleurs, la production d'anticorps peut être améliorée en maintenant les cultures en vie pendant des temps de plus en plus longs. Ceci nous a donc amené à étudier la mort des cellules par apoptose et nécrose.*

*Trois hybridomes différents (A49, A64 et B146) ont été adaptés à plusieurs types de milieux sans sérum suivant une technique dite d'adaptations lentes. Nous décrivons ensuite un autre type d'adaptations qui ont été réalisées en un temps plus court : adaptations rapides. Nous avons, par ailleurs, comparé trois hybridomes (AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19) dans 3 systèmes de culture différents (boîtes, flacons à agitation et systèmes comportant des tubes à dialyse), en observant leur croissance et l'état du matériel génétique (empreinte digitale et fragmentation de l'ADN). Un certain nombre d'expériences complémentaires ont été réalisées afin de tester les propriétés du système de culture à base de tubes à dialyse : Utilisation de différents tubes à dialyse, utilisation de différentes souches cellulaires ; culture dans un milieu sans sérum ; utilisation d'antiprotéases, "scaling up".*

*Nous avons étudié la mort cellulaire programmée ou apoptose chez les hybridomes à l'aide de techniques diverses : électrophorèse sur gel, observations morphologiques et suivi du cycle cellulaire. L'apoptose a été induite en utilisant des chocs thermiques, privation de sérum et des inhibiteurs de la synthèse des protéines. Nous avons mis en évidence l'existence d'apoptose spontanée chez la plupart des hybridomes étudiés avec une étude plus approfondie concernant les hybridomes A49 et 12H8. Un hétérohybridome "résistant" à l'apoptose a été étudié plus en détail (hétérohybridome homme-souris HF2 x 653).*

*Enfin nous avons examiné la toxicité de surfactifs non-ioniques à base de noyau  $\beta$ -lactame en étudiant respectivement l'apoptose et la nécrose sur les hybridomes HF2 x 653 et l'hémolyse sur les globules rouges. Nous avons ensuite débattu des éventuels mécanismes d'action provoquant la mort cellulaire.*

*Mots clés : Culture d'hybridomes, production d'anticorps monoclonaux, système de culture à base de tubes à dialyse, milieu sans sérum, mort cellulaire programmée, apoptose spontanée, hétérohybridome HF2 x 653, surfactifs non ioniques.*

## *Hybridoma cells culture: monoclonal antibody production, study of apoptosis and application to surfactants toxicity*

### SUMMARY

*Monoclonal antibody (Mab) production by hybridoma cell cultures could be improved by using serum-free media or high density cell cultures. Furthermore, Mab production could be increased by keeping cells alive for a longer period. That leads us to study hybridoma cell death: apoptosis and necrosis.*

*Three different hybridoma cell lines (A49, A64 and B146) have been cultivated in various serum-free media using slow adaptations. We describe another kind of adaptations realised during a shorter time: fast adaptations. Thus, we compared three other hybridoma cell lines (AFRC MAC 65, HF2 x 653 and OX 19) which have been cultivated in three different culture systems (flasks, spinners and dialysis tubing systems), by the study of their cell growth and the quality of their genetic material (DNA fingerprinting and DNA fragmentation). Experiments have been conducted to test the dialysis tubing system properties: use of different dialysis membranes, use of different cell lines, serum-free cultures, activity of antiproteases, scaling up.*

*We studied hybridoma programmed cell death or apoptosis using different techniques: gel electrophoresis, morphologic observations and cell cycle monitoring. Apoptosis have been induced by: heat shocks, serum deprivation and protein synthesis inhibitors. We have shown spontaneous apoptosis in most of the hybridoma cell lines. More detailed study has been made with A49 and 12H8 hybridomas. An apoptosis "resistant" heterohybridoma has been studied (human-mouse HF2 x 653 heterohybridoma).*

*Finally we studied  $\beta$ -lactam non ionic surfactants toxicity by determination of the heterohybridoma HF2 x 653 apoptosis and necrosis and red blood cell haemolysis. Thus, we discussed the hypothetical mechanisms of cell death.*

**Key words:** *Hybridoma cell culture, monoclonal antibody production, dialysis culture system, serum-free media, programmed cell death, spontaneous apoptosis, HF2 x 653 heterohybridoma, non ionic surfactants.*

*Cultivo de hibridomas : producción de anticuerpos monoclonales, estudio de la apoptosis y aplicación a la toxicidad de tensioactivos*

**RESUMEN**

*La producción de anticuerpos monoclonales a partir de cultivos de hibridomas, puede ser optimizada utilizando medios sin suero o realizando cultivos masivos. Además la producción de anticuerpos puede ser mejorada si los hibridomas se mantienen en vida durante un periodo de tiempo más largo. Todo esto nos ha llevado a estudiar la muerte de los hibridomas por apoptosis o necrosis.*

*Tres hibridomas diferentes (A49, A64 y B146) han sido adaptados a varios medios sin suero mediante la técnica de adaptaciones lentas. Describimos luego otro tipo de adaptaciones realizadas en un tiempo más corto : adaptaciones rápidas. Por otra parte, hemos comparado tres hibridomas (AFRC MAC 65, HF2 x 653 y OX 19) cultivados en tres sistemas de cultivo diferentes (cajas, frascos agitados y botellas comportando tubos de diálisis). Para eso se ha observado el crecimiento celular y el estado del material genético (impresión digital y fragmentación del ADN). Se realizaron varios experimentos complementarios para testar las propiedades del sistema de cultivo a base de tubos de diálisis : Utilización de diferentes membranas de diálisis, utilización de diferentes líneas celulares, cultivo en medio sin suero, utilización de antiproteasas, "scaling up".*

*Hemos estudiado la muerte celular programada o apoptosis de los hibridomas utilizando varias técnicas : electroforesis en gel, observaciones morfológicas con la mezcla de colorantes (bromuro de etidio / naranja de acridina) y seguimiento del ciclo celular. Hemos provocado la apoptosis por medio de choques térmicos, privación de suero y inhibidores de la síntesis de las proteínas. Fuera de eso hemos puesto en evidencia el fenómeno de apoptosis espontánea en la mayoría de los hibridomas estudiados y en particular en los hibridomas A49 y 12H8. Un heterohibridoma "resistente" a la apoptosis ha sido estudiado más detalladamente (heterohibridoma hombre-ratón HF2 x 653).*

*Finalmente se ha estudiado la toxicidad de tensioactivos no iónicos a base de nucleos  $\beta$ -lactámicos observando respectivamente la apoptosis y la necrosis en los hibridomas HF2 x 653 y la hemólisis en los glóbulos rojos. Hemos terminado debatiendo sobre los eventuales mecanismos de acción que provocan la muerte celular.*

**Palabras clave** : *Cultivo de hibridomas, producción de anticuerpos monoclonales, sistema de cultivo a base de tubos de diálisis, medio sin suero, muerte celular programada, apoptosis espontánea, heterohibridoma HF2 x 653, tensioactivos no iónicos.*

## *I. INTRODUCTION*

## I.A. Généralités

Depuis de nombreuses années les cultures de cellules ont commencé à remplacer l'expérimentation animale *in vivo* en tant qu'outil de recherche. Dans le domaine industriel, par exemple, les méthodes de production d'anticorps monoclonaux se sont également adaptées à ces nouvelles techniques. C'est ainsi que la technique des ascites (où les anticorps sont produits par tumeur intrapéritonéale provoquée chez la souris ou le rat) est pratiquement remplacée par la fabrication d'hybridomes. Köhler et Milstein (76) ont été les premiers à décrire la technique de fusion d'un lymphocyte B provenant d'une souris (préalablement immunisée contre un antigène donné) et d'une cellule de myélome (cellule provenant d'une lignée cancéreuse). Après un certain nombre d'étapes de clonage et de sélection, on obtient quelques clones de cellules ayant une partie des caractéristiques génétiques et physiologiques des cellules parentales. En particulier, on sélectionne les clones producteurs d'anticorps dirigés contre l'antigène utilisé pour l'immunisation de la souris (héritage du lymphocyte). Par ailleurs, les cellules obtenues doivent pouvoir être cultivées. On sélectionne donc les cellules ayant les caractéristiques "d'immortalité" (héritage génétique des cellules myélomateuses). Les cellules hybrides ainsi obtenues sont appelées des **hybridomes**.

Les hybridomes obtenus, les plus intéressants, sont ceux qui peuvent être cultivés de manière à produire le maximum d'anticorps monoclonaux.

Pour optimiser la culture des hybridomes *in vitro*, on peut envisager trois axes principaux de recherche :

- Définir un milieu de culture le plus adapté à la production de molécules ; l'idéal étant que les molécules produites puissent être utilisées en thérapeutique.
- Sélectionner un système de culture pour lequel on puisse obtenir des fortes concentrations cellulaires.

- Sélectionner des clones sur-exprimant les caractéristiques génétiques parentales (sélection de souches hautement productrices et en même temps ayant une forte résistance à la dégénérescence et à la mort cellulaire).

Au cours de ce travail, nous allons nous intéresser à certains aspects de ces trois axes de recherche :

- Adaptation des cellules à des milieux optimisés (en particulier à des milieux sans sérum).
- Comparaison de trois systèmes de culture et étude d'un système, non commercialisé, de culture en masse dans des tubes à dialyse ; contrôle de la stabilité génétique des cellules (empreinte génétique de l'ADN).
- Etude de la mort cellulaire chez les hybridomes (apoptose et nécrose) :
  - \* Détection et mise en évidence
  - \* Induction de la mort cellulaire
  - \* Etude de l'apoptose spontanée
  - \* Description d'un hybridome résistant à l'apoptose.
  - \* Utilisation de surfactifs non ioniques pour étudier la toxicité et l'induction de la mort cellulaire

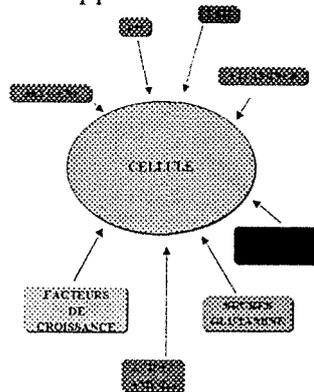
Avant de nous intéresser à ces différents aspects des cultures d'hybridomes, nous allons rappeler quelques notions nécessaires à la compréhension de ce travail de thèse.

## I.B. Milieux et cultures cellulaires

Les cellules animales appartenant à un tissu possèdent au sein de celui-ci tous les éléments nécessaires à leur croissance, à leur "reproduction" par mitose ou méiose mais aussi à leur mort et à leur élimination.

Pour la compréhension des mécanismes cellulaires, des études ont été réalisées depuis longtemps, de manière à maintenir des cellules vivantes *in vitro*.

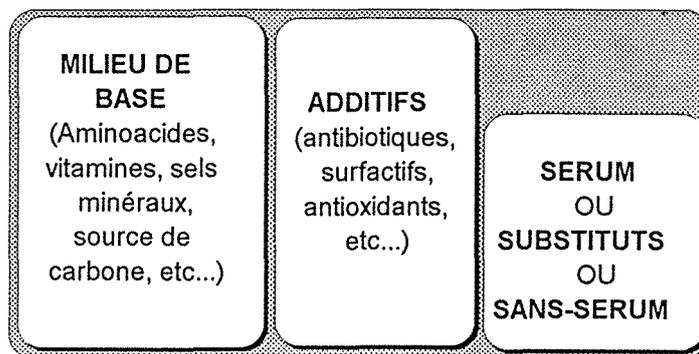
La culture de cellules, de tissus ou même d'organes à l'extérieur de l'organisme date du début du siècle. Ainsi Harrison en 1907, observa des embryons de poulet maintenus en vie dans de la lymphe (60) alors que Carrel et al (19) ont réalisé la culture *in vitro* de tissus et d'organes. L'échec du maintien en vie des cellules en dehors de leur contexte biologique a conduit à développer des techniques et à étudier les paramètres qui interviennent dans les cultures. En 1943, Harris réussit à isoler des cellules fibroblastiques issues de tumeurs (lignée L929) (59). Plus tard, en 1959, Eagle a mis au point un milieu de culture tenant compte des besoins nutritionnels des cellules HeLa (34,35). La figure 1.1 donne un résumé des éléments nécessaires au développement des cellules.



*Figure 1.1 : Eléments essentiels à la croissance cellulaire.*

Pendant la culture des cellules *in vitro*, il est nécessaire de réguler au mieux tous les paramètres nécessaires au bon fonctionnement de la machinerie cellulaire (température, éléments nutritifs, pH, osmolarité, etc.). C'est ce qui est réalisé dans les diverses formulations de milieux de culture.

La figure 1.2 donne un résumé des principaux composants d'un milieu de culture, qui est constitué d'un **milieu de base**, d'additifs (nature et quantité variables) et de sérum ou substituts.



*Figure 1.2 : Eléments constitutifs d'un milieu de culture.*

Il existe de nombreux milieux de base, comme par exemple les milieux RPMI 1640 et DMEM dont les compositions sont données en annexe.

Cependant, en fonction du type cellulaire, les besoins peuvent être différents. Ainsi, des cellules hépatiques mises en culture nécessitent un apport en facteurs de croissance spécifiques comme le HGF (Hepatocyte Growth Factor) (131), de même, les cellules nerveuses ont leur croissance stimulée par le NGF (Neuronal Growth Factor) (36). Ces facteurs de croissance, souvent mal connus, sont difficiles à purifier d'où leur prix élevé. Pour pallier ces difficultés, on ajoute au milieu de base, un certain nombre d'additifs et en particulier du **sérum d'origine animale**. On utilise principalement du sérum de veau foetal ou de nouveau-né. Ils vont apporter des facteurs de croissance, des protéines, des inhibiteurs de protéases (56). On privilégie les sérums provenant de fœtus ou de nouveau-nés car ils contiennent très peu d'anticorps. L'albumine, présente en quantité importante dans le sérum (70 g/l), joue par ailleurs un rôle régulateur de l'équilibre osmotique et détoxifie également le milieu de culture (50).

Le sérum peut véhiculer des éléments nocifs comme des mycoplasmes (135) ou des virus (171) qui peuvent échapper aux étapes de stérilisation par filtration.

Pour ces raisons et plus spécialement pour des raisons de coût, un certain nombre de substituts de sérum ont été utilisés.

L'utilisation en thérapeutique des composés produits par culture de cellules, impose qu'aucun produit d'origine animale ne soit utilisé dans les milieux. De plus, la composition des milieux doit être maîtrisée au mieux. La qualité principale de ces **substituts de sérum** doit être une composition chimique totalement définie avec une absence de risques pathogènes. Des substituts de sérum comme l'ULTROSER®, ou le NU-SERUM®, sont commercialisés par différentes sociétés. Plusieurs milieux sans sérum de composition définie ont été mis au point au laboratoire et en particulier le milieu BM. Ils sont dérivés du milieu sans sérum décrit par Schneider en 1989 (139). Sa composition chimique est décrite dans le chapitre Matériel et méthodes. Il peut être additionné de sérum albumine humaine (HSA) (93). L'utilisation de milieux sans sérum nécessite cependant une période pendant laquelle les cellules doivent s'adapter à ces milieux.

La première partie de notre travail va tenter de dégager un certain nombre de considérations techniques sur la méthodologie d'adaptation à ces milieux sans sérum.

### I.C. Hybridomes et systèmes de production d'anticorps monoclonaux

Un hybridome est une cellule créée artificiellement. Il résulte de la fusion d'un lymphocyte, qui apporte le caractère "biosynthèse d'anticorps" et d'un myélome, qui apporte le caractère "d'immortalisation". Le meilleur taux de réussite pour l'obtention des hybridomes est obtenu quand les lymphocytes et les myélomes proviennent de la même espèce animale (en général des rongeurs comme les rats Lou, souris Balb-c).

Les lymphocytes sont d'abord stimulés *in vivo* par immunisation des animaux avec l'antigène étudié. Ils sont récupérés à partir de la rate des animaux immunisés puis fusionnés, en présence d'un agent fusogène comme le polyéthylène glycol (PEG), avec une lignée cellulaire myélomateuse issue de cellules tumorales provenant d'animaux de la même espèce et portant une déficience dans la voie secondaire de synthèse de l'ADN définie comme HPGRT<sup>-</sup>. Par analogie les lymphocytes vont avoir un phénotype HPGRT<sup>+</sup>.

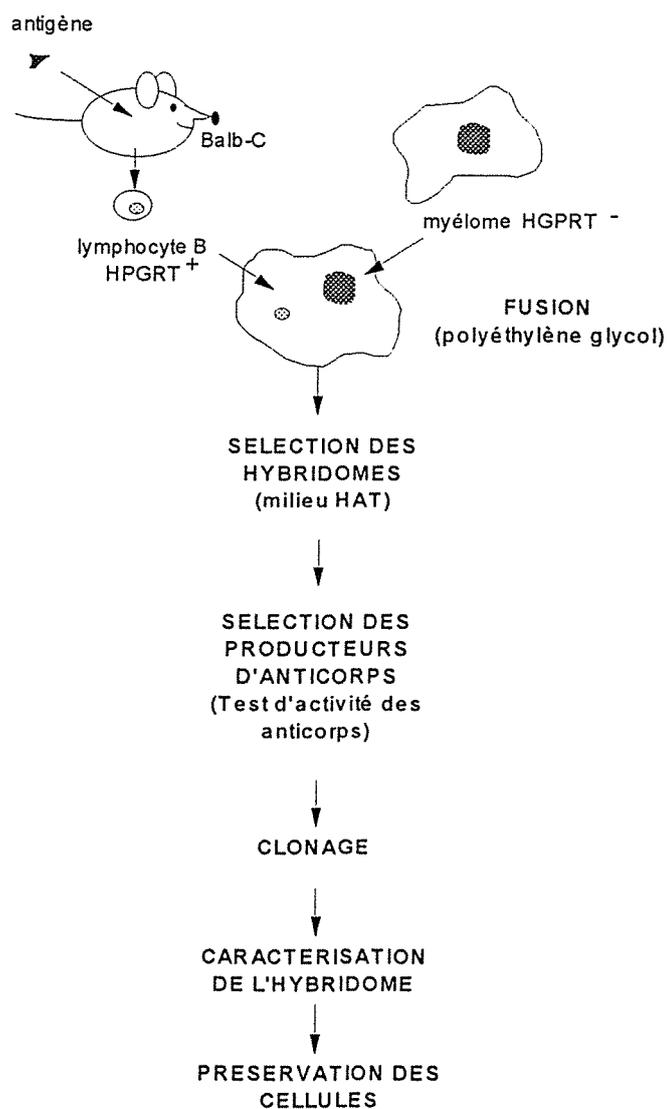
On obtient ainsi des :

- \* Homocaryons lymphocyte-lymphocyte
- \* Homocaryons myélome-myélome
- \* Hétérocaryons myélome-lymphocyte

On utilise un milieu de culture sélectif (milieu HAT : hypoxanthine, aminoptérine, thymidine), les myélomes ne peuvent pas s'y développer car ils ne peuvent pas synthétiser de l'ADN (car ils sont HPGRT<sup>-</sup>). Les lymphocytes vont également mourir car ils sont incapables de se diviser. On privilégie donc la croissance d'hybridomes provenant des hétérocaryons myélome-lymphocyte. Au cours des cultures des hybridomes formés, le matériel génétique se stabilise à la suite de remaniements et d'éliminations. On réalise alors la sélection des hybridomes (myélome-lymphocyte) qui produisent effectivement des anticorps dirigés contre l'antigène qui avait servi à la sensibilisation des lymphocytes.

On effectue des clonages afin d'obtenir des lignées cellulaires provenant d'un même clone. Ces clones obtenus peuvent ensuite être caractérisés par différentes techniques (réponse qualitative et quantitative contre l'antigène de départ, empreinte digitale de l'ADN, analyse des isoenzymes, milieu de culture etc.). Les hybridomes sont conservés par congélation dans l'azote liquide. Cette technique de base décrite initialement par Köhler et Milstein (76) a subi depuis, de nombreuses modifications ou améliorations (52,95,141).

La figure 1.3 résume les différentes étapes de l'hybridation cellulaire.



*Figure 1.3 : Différentes étapes de l'hybridation cellulaire.*

Un hybridome moyennement producteur, cultivé en boîte, permettra d'obtenir environ 50 µg/ml d'anticorps (130). Il faudrait 20 l de surnageant de culture pour obtenir 1 g d'anticorps, si on admet un rendement de purification de 100%. Pour augmenter la production d'anticorps, des systèmes de culture très variés, faisant appel à des technologies différentes, ont été développés.

Les systèmes de production *in vitro* peuvent être classés en plusieurs catégories :

- culture en mode "batch" : on utilise un système clos contenant la suspension cellulaire. Le milieu nutritif n'est pas renouvelé, ce qui entraîne une accumulation des "déchets métaboliques" ainsi qu'un épuisement des nutriments.
- culture en mode "fed batch" : cette technique utilise un système alimenté continuellement en milieu de culture frais qui maintient stable la quantité de nutriments alors que les déchets toxiques s'accumulent.
- culture en mode "continu" : ce type de culture présente la particularité de maintenir constants les taux de nutriments et de déchets toxiques par un apport régulier d'un certain volume de milieu frais accompagné du prélèvement du même volume de suspension cellulaire "usé".
- culture en mode perfusé : ce système est basé sur la capture des hybridomes par des techniques diverses (filtres, encapsulation, fixation sur des supports solides, culture en tubes à dialyse). Dans ce cas, les cellules sont alimentées en milieu frais alors que le milieu usé est évacué.

Le choix d'un système de culture se fait en tenant compte de très nombreux paramètres : prix de revient, rendement de production, concentrations cellulaires obtenues, temps disponible pour la réalisation des cultures, quantité d'anticorps désirée, etc. On a voulu souvent transposer la technologie et le savoir-faire déjà acquis en microbiologie (production par fermentation) aux cultures de cellules animales. Malheureusement les régulations de tous les facteurs métaboliques chez les micro-organismes qui sont simples deviennent très complexes chez les cellules

animales. C'est ainsi que beaucoup de systèmes de production à grande échelle d'anticorps monoclonaux n'ont pas permis d'augmenter le rendement final. Dans ces systèmes la production augmente mais le prix de revient atteint des valeurs importantes, ce qui module à la baisse son intérêt.

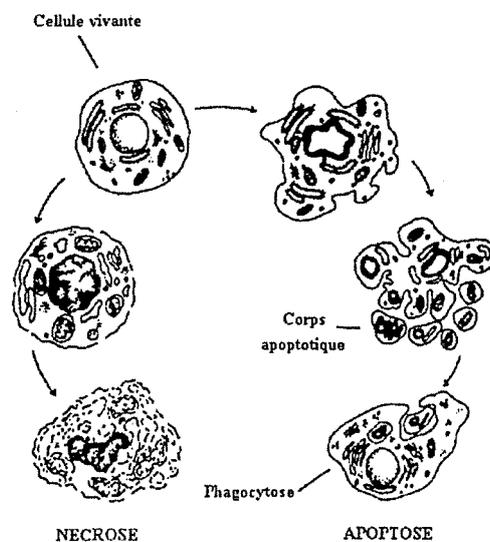
En fonction des différents systèmes de culture, les hybridomes se développeront de façon différente. Il est nécessaire de s'assurer de la qualité et de la quantité des anticorps produits, d'où l'intérêt de contrôler la stabilité génétique des hybridomes dans différents systèmes de culture. C'est dans cette optique que nous avons axé la deuxième partie de notre travail, en comparant la croissance d'hybridomes dans 3 systèmes de culture différents et en observant l'état du matériel génétique par empreinte digitale de l'ADN. Nous avons, par ailleurs, suivi l'éventuelle fragmentation de l'ADN (caractéristique de la mort cellulaire par apoptose), dans les trois systèmes de culture et avec 3 souches d'hybridomes différents.

#### **I.D. Apoptose ou mort cellulaire programmée**

Au cours d'une culture d'hybridomes, on essaie par des techniques diverses d'optimiser la production d'anticorps (optimisation du milieu ou du système de culture). Pour produire des anticorps utilisables en thérapeutique et peu onéreux, on a souvent opté pour la solution des cultures en milieux sans sérum et des cultures en masse dans des bioréacteurs brassant d'énormes quantités de milieu et de cellules. Remarquons que la production d'anticorps sera améliorée si les cultures peuvent être maintenues pendant des temps de plus en plus longs. Ceci amène donc à envisager la mort des cellules.

Il existe deux types de mort cellulaire assez bien définis : la **nécrose** et l'**apoptose**.

Le premier type, le plus anciennement décrit, est la nécrose dont la cause est le plus souvent accidentelle, ou due à des phénomènes physiques, et est basée sur des propriétés mécaniques de la membrane. Dans ce type de mort cellulaire, la cellule augmente de volume car la membrane plasmique perd une partie de son intégrité ; de nombreux ions et molécules de faible masse quittent les cellules et sont remplacés par de l'eau. Le deuxième, récemment mis en évidence et moins bien connu, est le plus souvent déclenché par des phénomènes physiques, biochimiques ou génétiques. Dans ce cas, la cellule subit une cascade de remaniements biochimiques, morphologiques et physiologiques qui provoquent une désorganisation du contenu intracellulaire, accompagnée d'une diminution de volume. Des invaginations cellulaires vont conduire à la formation de corps apoptotiques qui contiennent les restes de la cellule, enfermés dans des membranes qui expriment des molécules marqueurs. Les macrophages ou les cellules environnantes reconnaîtront ces marqueurs et phagocyteront les corps apoptotiques avant qu'ils éclatent. De cette façon les hydrolases contenues dans ces corps apoptotiques ne nuiront à la vie ni des cellules environnantes ni de l'organisme. Les différences morphologiques entre l'apoptose et la nécrose sont décrites sur la figure 1.4.



*Figure 1.4 : Différents types de mort cellulaire : nécrose et apoptose.*

Ce type de mort cellulaire a été décrit dans un très grand nombre de populations cellulaires. Elle est présente chez les plantes (55), les invertébrés : *Caenorhabditis elegans* (61), les insectes (172), les rongeurs (137), les bovins (87), les primates (75) et l'homme (75). Quelques études laissent penser que ce phénomène existe même chez les levures (102) ou les bactéries (110).

Chez l'homme, on trouve l'apoptose aussi bien au niveau des neurones (134), des myocytes (143), des cellules sanguines (89), des cellules visuelles (48), des adipocytes (125).

Au niveau des lignées cellulaires en culture, on rencontre également très souvent le phénomène apoptotique : HeLa (111), PC12 (124), HL60(53), 3T3 (80).

Ce n'est que depuis les années 70 que l'on a commencé à caractériser la mort cellulaire et à distinguer morphologiquement l'apoptose de la nécrose (70). En 1980, Wyllie et al (175) relia ces observations morphologiques à l'activité d'endonucléases sur des thymocytes dont la mort cellulaire est induite par l'action de glucocorticoïdes. Horvitz et al (38) au Massachusetts Institute of Technology ont identifié plusieurs gènes appelés *ced-3*, *ced-4* et *ced-9*, responsables de la disparition des cellules chez un nématode *Caenorhabditis elegans* au cours de son développement. Des travaux ultérieurs ont montré qu'au cours de l'évolution, ces gènes ont été assez bien conservés. C'est en particulier le cas du gène *bcl-2* correspondant à *ced-3* (167) et plus récemment le gène *ICE* correspondant à *ced-4* (179) qui ont été retrouvés chez les eucaryotes .

L'apoptose joue, dans tous les organismes, le rôle de régulateur physiologique en éliminant les cellules indésirables ou qui sont trop vieilles. C'est ainsi qu'au cours du développement embryonnaire, beaucoup de cellules comme les cellules nerveuses se débarrassent des cellules inutiles (16,54). Dans la régulation du système immunitaire, les lymphocytes qui fabriquent des anticorps contre les molécules du soi, sont détruites par apoptose pour éviter une autodestruction de l'organisme (79). Le terme de mort cellulaire programmée a souvent été associé ou

confondu avec le terme d'apoptose ce qui a conduit un certain nombre d'auteurs à essayer de définir ces deux termes (6,25,144). Dans un souci de simplification nous ne ferons pas de différence entre eux.

Ces observations nous ont amenés à nous poser un certain nombre de questions :

Les hybridomes meurent-ils par apoptose ?

Si oui, pouvons-nous estimer le pourcentage de mort par apoptose ?

Quels peuvent être les inducteurs de l'apoptose chez les hybridomes ?

Que peut apporter l'étude de l'apoptose des hybridomes dans l'étude de la toxicologie d'un composé ?

La dernière partie de ce manuscrit va essayer de répondre à ces questions, après quoi nous débattons de l'ensemble des résultats obtenus.

## *II. MATÉRIEL ET MÉTHODES*

## II.A. Lignées cellulaires

Nous avons utilisé un certain nombre de lignées cellulaires dont les caractéristiques sont décrites brièvement dans le tableau I.

**Tableau I : Description des lignées cellulaires utilisées.**

| Lignée cellulaire | Type                      | Myélome      | Lymphocyte    | Type       | Production        | Origine | Référence |
|-------------------|---------------------------|--------------|---------------|------------|-------------------|---------|-----------|
| A 49              | Hybridome (souris/souris) | SP2/0-Ag14   | Souris Balb/C | Suspension | IgM               | INSERM  | (95)      |
| A 64              | Hybridome (souris/souris) | SP2/0-Ag14   | Souris Balb/C | Suspension | IgG <sub>2</sub>  | INSERM  | (95)      |
| B 146             | Hybridome (souris/souris) | SP2/0-Ag14   | Souris Balb/C | Suspension | IgG <sub>3</sub>  | INSERM  | (95)      |
| 12H8 *            | Hybridome (souris/souris) | SP2/0-Ag14   | Souris Balb/C | Suspension | IgG <sub>2a</sub> | INSERM  | (129)     |
| OX 19 *           | Hybridome (souris/souris) | NS1          | Souris Balb/C | Suspension | IgG <sub>2a</sub> | ECACC   | (28)      |
| AFRC MAC 65*      | Hybridome (rat/rat)       | Y3.Ag.1.2.3  | Rat Lou/Tap   | Semi-adh.  | IgM               | ECACC   | (15)      |
| HF2 x 653 *       | Hybridome (homme/souris)  | P3X63Ag8.653 | WIL2729-F2    | Semi-adh.  | IgG               | ECACC   | (122)     |
| IM101BIS          | Hybridome                 | NS1          | Souris Balb/C | Suspension | IgG <sub>2a</sub> | BIOTROL | nd        |
| IL-A42 *          | Hybridome (souris/souris) | P3X63Ag8.653 | Souris Balb/C | Suspension | IgG <sub>2a</sub> | ECACC   | (29)      |
| IL-A43 *          | Hybridome (souris/souris) | P3X63Ag8.653 | Souris Balb/C | Suspension | IgG <sub>2a</sub> | ECACC   | (29)      |
| SP2/0-Ag14 *      | Myélome souris            |              |               | Suspension |                   | ECACC   | (116,149) |
| P3/NS1/1-Ag4.1 *  | Myélome souris            |              |               | Suspension |                   | ECACC   | (27,77)   |
| P3x63Ag8.653 *    | Myélome souris            |              |               | Suspension |                   | ECACC   | (69)      |
| Y3.Ag.1.2.3 *     | Myélome rat               |              |               | Suspension |                   | ECACC   | (46)      |

*Les cellules marquées avec un astérisque (\*) ont été testées contre les mycoplasmes par la méthode au Hoechst décrite dans (108).*

## II.B. Milieux de culture

La composition chimique des différents milieux de base est donnée dans l'annexe 1.

### II.B.1. RPMI 1640

Le milieu RPMI 1640 (SEROMED, Berlin, Allemagne) est additionné de : glutamine 1 mM (SIGMA, St. Louis, USA) ; pénicilline G 100 UI/ml (DIAMANT, Puteaux, France) ; streptomycine 100 µg/ml (DIAMANT, Puteaux, France) et d'hydroxy-éthyl-pipérazine-éthyl-sulfonate (HEPES) 20 mM (SEROMED, Berlin, Allemagne). Exception faite des expériences d'adaptation, ce milieu a été supplémenté soit avec du sérum de veau foetal (SVF) 10% v/v (DUTSCHER, Brumath, France) soit avec de l'ULTROSER HY 2% p/v (SEPRACOR, Villeneuve la Garenne, France) et SVF 0,5% v/v. Pour certaines expériences

réalisées en tubes à dialyse, il a été ajouté du glucose (SIGMA, St. Louis, USA) de manière à obtenir une concentration finale de 4 g/l.

### II.B.2. DMEM

Le milieu DMEM (LIFE TECHNOLOGIES, Paisley, Scotland) a été additionné de glutamine 2 mM (SIGMA, St. Louis, USA) ; de pénicilline G 100 UI/ml (DIAMANT, Puteaux, France) ; de streptomycine 100 µg/ml (DIAMANT, Puteaux, France) et d'HEPES 20 mM (SEROMED, Berlin, Allemagne). Ce milieu a été supplémenté avec du SVF 10% v/v (DUTSCHER, Brumath, France).

### II.B.3. F12 de HAM

Au milieu de HAM's F12 (LIFE TECHNOLOGIES, Paisley, Scotland) sont ajoutés de la glutamine 2 mM (SIGMA, St. Louis, USA) ; de la pénicilline G 100 UI/ml (DIAMANT, Puteaux, France) ; de la streptomycine 100 µg/ml (DIAMANT, Puteaux, France) et de l'HEPES 20 mM (SEROMED, Berlin, Allemagne).

### II.B.4. BM

Ce milieu est obtenu en mélangeant les milieux de base DMEM et F-12 1:1 (v/v) auquel on ajoute :

- du 2-mercaptoéthanol 50 µM (SIGMA, St. Louis, USA),
- du pluronic F68 0,01 % (p/v) (SERVA, Le Perray-en-Yvelines, France),
- de l'éthanolamine (0,01 %), 50 µM (SIGMA, St. Louis, USA).

Pour certaines expériences, ce milieu est en outre additionné de :

- Sérum albumine humaine (HSA) 1 g/l,
- et de SVF à diverses concentrations.

Pour d'autres expériences, le milieu BM a été supplémenté avec des additifs IBF. Ce milieu que nous appellerons BM-IBF est commercialisé sous le nom de IMOCELL®.

## I.C. Systèmes de culture

Les cultures ont été réalisées dans 4 systèmes de culture différents. Dans tous les cas, ces systèmes ont été maintenus à 37°C, soit dans un incubateur thermostaté (JOUAN, Saint Nazaire, France), soit dans un incubateur équipé de rouleaux tournants (BELLCO, Vineland, USA).

### II.C.1. Plaques de culture

Pour l'étude des adaptations, on a utilisé des plaques stériles à 24 puits (COSTAR, Cambridge, USA) en utilisant 1 ml de milieu par puits.

### II.C.2. Boîtes de culture

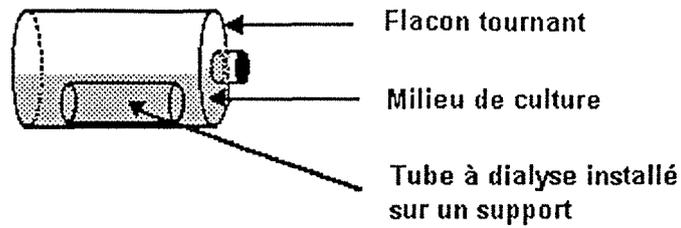
Les cultures en "batch" ont été réalisées dans des boîtes de culture de 25 cm<sup>2</sup> et 75 cm<sup>2</sup> (CORNING, New York, USA) contenant respectivement 10 et 30 ml de milieu.

### II.C.3. Spinners

Des "spinners à boule" de 250 ml (TECHNE, Cambridge, UK) contenant 100 ml de milieu ont été utilisés. Ils sont agités par un agitateur magnétique tournant à 10 rpm (TECHNE, Cambridge, UK).

### II.C.4. Systèmes à membrane de dialyse

Nous avons mis au point un système (94) permettant l'obtention de solutions concentrées d'anticorps ou de molécules produites par des cellules en culture. Ce dispositif a été préalablement décrit (Lettre Soleau déposée à l'Institut National de la Protection Industrielle, France N° 67637). Il est constitué d'un tube à dialyse de point de coupure 25 kDa (SPECTRUM, Los Angeles, USA) contenant la suspension cellulaire, le tout placé dans un flacon tournant (CORNING, New York, USA) (figure 2.1) à une vitesse de 20 rpm.



*Figure 2.1 : Schéma de principe du système de culture à dialyse. Le tube à dialyse, maintenu sur un support, est rempli avec une suspension de cellules prélevées en phase exponentielle de croissance. Le tube à dialyse sur son support est placé à l'intérieur d'un flacon tournant, partiellement rempli de milieu de culture. L'ensemble est placé à 37°C sur un dispositif permettant la rotation continue du flacon.*

Trois systèmes de tubes de volumes différents ont été réalisés (tableau II).

*Tableau II : Caractéristiques des différents systèmes à dialyse.*

| Type de système | $V_i$ (ml) | $V_e$ (ml) | Flacon tournant     |
|-----------------|------------|------------|---------------------|
| Système I       | 10         | 200        | 490 cm <sup>2</sup> |
| Système II      | 40         | 400        | 850 cm <sup>2</sup> |
| Système III     | 80         | 800        | 850 cm <sup>2</sup> |

*$V_i$  : volume du tube à dialyse contenant la suspension cellulaire.  $V_e$  : volume dans lequel est immergé le tube à dialyse.*

## II.D. Manipulation et entretien des cellules

### II.D.1. Cellules semi ou peu adhérentes

Ces cellules sont mises en suspension avec un grattoir stérile (COSTAR, Cambridge, USA).

### II.D.2. Congélation des cellules

Chaque souche cellulaire est régulièrement congelée.  $10^6$  cellules en phase exponentielle de croissance sont centrifugées. Le culot cellulaire est resuspendu dans 1 ml de mélange stérile constitué de 90% de SVF (DUTSCHER, Brumath, France) et 10% de diméthyl sulfoxyde DMSO (SIGMA, St. Louis, USA). La solution est placée dans un cryotube de 1 ml (NUNC, Kamstrup, Danemark). Le cryotube est maintenu 1h 30min à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant d'être stocké dans l'azote liquide.

### II.D.3. Décongélation des cellules

Un cryotube sorti de l'azote liquide est maintenu 2 minutes à la température ambiante. Il est alors partiellement décongelé dans un bain-marie à  $37^{\circ}\text{C}$  jusqu'à décollement du culot, puis dilué dans 50 ml de milieu frais préalablement chauffé à  $37^{\circ}\text{C}$ . Après une centrifugation de 5 minutes à 100 g, le culot cellulaire est prêt à être utilisé.

Dans certains cas, le culot cellulaire est repris dans un milieu de 2 à 3 fois plus riche en SVF de manière à obtenir une viabilité cellulaire supérieure à 80%, après quoi les cellules sont placées dans leur milieu normal.

### II.D.4. Cas des tubes à dialyse

L'ensemencement des systèmes à base de tube à dialyse ainsi que le prélèvement des cellules est réalisé à l'aide d'une seringue stérile.

## II.E. Adaptations

### II.E.1. Définition

On appelle **adaptation** d'une lignée cellulaire à un milieu donné, la période transitoire pendant laquelle on remplace progressivement le milieu de culture initial par un autre milieu. On effectue ainsi un certain nombre de **passages**. Un passage est un renouvellement de milieu classique. Suivant l'évolution des différents paramètres observés, on conserve le milieu, ou on augmente la proportion de nouveau milieu. On appelle  $P_0$  le premier changement de milieu.

### II.E.2. Paramètres mesurés

Le **nombre de doublements**  $d_i$  est défini à partir du nombre de cellules au passage  $i$  ( $n_i$ ) et du nombre de cellules au passage  $i-1$  ( $n_{i-1}$ ) par la formule suivante :

$$d_i = \frac{\text{Log} (n_i / n_{i-1})}{\text{Log} (2)}$$

On utilise la **courbe de doublements cumulés**. Cette courbe est obtenue en additionnant les nombres de doublements depuis le 1<sup>er</sup> jusqu'au  $i^{\text{ème}}$  passage pour obtenir le nombre de doublements cumulés  $N_i$ .

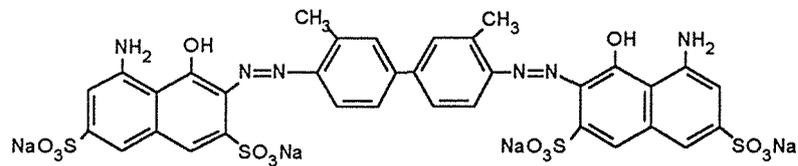
$$N_i = \sum_{i=1}^i d_i$$

L'allure de cette courbe et en particulier sa pente permettent d'apprécier la manière dont les cellules doublent leur nombre.

## II.F. Détermination des paramètres cellulaires

### II.F.1. Coloration au bleu trypan

#### *II.F.1.a) Réactifs*



*Figure 2.2 : Molécule de bleu trypan.*

Le bleu trypan (formule figure 2.2) pénètre dans les cellules dont la membrane plasmique est détériorée. Elles se trouveront alors colorées en bleu.

Cette coloration est obtenue avec le mélange suivant :

- un volume d'une solution de NaCl à 4,25% (p/v) (SIGMA, St. Louis, USA),
- quatre volumes d'une solution de bleu trypan à 0,20% (p/v) (SIGMA, St. Louis, USA).

On observe, au microscope optique, une suspension faite avec 1 volume de la solution précédemment décrite de bleu trypan et 1 volume de la suspension cellulaire placée dans un hémocytomètre de Thoma.

### II.F.1.b) Paramètres mesurés

On définit :

- La concentration de cellules de l'espèce x ( $C_x$ ) par :

$$C_x = \frac{\sum_{k=1}^k n_x \cdot d}{k} \cdot 10^4 \text{ cellules / ml}$$

avec :

$n_x$  : nombre de cellules de l'espèce x comptées sur un hémocytomètre,

$d$  : facteur de dilution pour la mesure,

$k$  : nombre de comptages.

On définit ainsi :

- La concentration de cellules vivantes :  $C_v$ .
- La concentration de cellules mortes :  $C_m$ .
- La concentration de cellules totales  $C_t$  ( $C_t = C_v + C_m$ ).

On définit également :

- Le % de cellules de l'espèce x (%X) par :

$$\% X = \frac{C_x}{C_t} \cdot 100$$

- Le pourcentage de cellules vivantes (%V) est également appelé **viabilité**.
- Le pourcentage de cellules mortes (%M) est également appelé **mortalité**.
- L'intégrale de cellules vivantes  $I_V$  (ou de cellules totales  $I_T$ ), entre les temps  $t_0$  et  $t$ , est définie comme suit :

$$I_V = \int_{t_0}^t c_V(t) dt \quad \text{et} \quad I_T = \int_{t_0}^t c_T(t) dt$$

avec :

$t$  : temps,

$c_V$  : concentration de cellules vivantes au temps  $t$ ,

$c_T$  : concentration de cellules totales au temps  $t$ ,

$t_0$  : premier temps de comptage,

$t$  : dernier temps de comptage.

- Les valeurs de  $I_V$  et  $I_T$  entre les temps  $t_0$  et  $t$  sont estimées expérimentalement par la détermination de l'aire sous la courbe à l'aide de la méthode des trapèzes donnant la concentration en fonction du temps, en utilisant la formule :

$$I_V = \sum_{i=t_0}^{i=t} \left[ \frac{1}{2} \cdot (C_{V_i} + C_{V_{i+1}}) \cdot (t_{i+1} - t_i) \right]$$
$$I_T = \sum_{i=t_0}^{i=t} \left[ \frac{1}{2} \cdot (C_{T_i} + C_{T_{i+1}}) \cdot (t_{i+1} - t_i) \right]$$

avec :

$C_{V_i}$  : concentration de cellules vivantes au temps  $t_i$ ,

$C_{T_i}$  : concentration de cellules totales au temps  $t_i$ .

- La **vitesse spécifique de croissance** d'une culture pendant la phase exponentielle de croissance est déterminée par :

$$\mu = \frac{1}{C_T} \cdot \frac{dC_T}{dt}$$

avec :

$\mu$  : vitesse de croissance spécifique dont l'unité est l'inverse de l'unité de temps,

$C_T$  : concentration de cellules totales au temps  $t$ .

- Si on se place dans la phase exponentielle de croissance entre deux temps  $t_1$  et  $t_2$ , on peut écrire :

$$\mu_{t_2-t_1} = \frac{\text{Log } C_{T_2} - \text{Log } C_{T_1}}{t_2 - t_1}$$

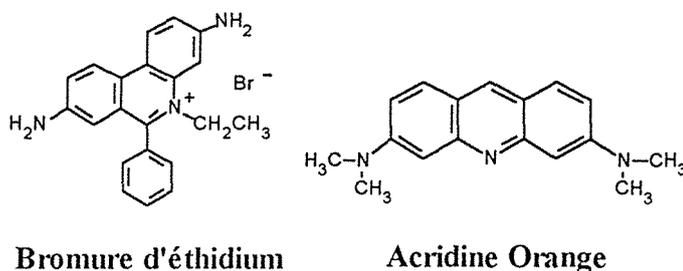
avec :

$\mu_{t_2-t_1}$  : vitesse de croissance spécifique entre les temps  $t_1$  et  $t_2$ .

## II.F.2. Coloration avec le mélange bromure d'éthidium/acridine orange

Cette technique est dérivée de celle décrite par Mercille et Massie (98). Elle utilise un mélange de bromure d'éthidium et d'acridine orange (figure 2.3).

### II.F.2.a) Réactifs



*Figure 2.3 : Formules du bromure d'éthidium et de l'acridine orange.*

On utilise une solution contenant 100  $\mu\text{g/ml}$  d'acridine orange et 100  $\mu\text{g/ml}$  de bromure d'éthidium (SIGMA, St. Louis, USA), préparée dans du PBS sans  $\text{Ca}^{2+}$  et sans  $\text{Mg}^{2+}$  pH 7,4. 4  $\mu\text{l}$  de ce mélange sont ajoutés à 100  $\mu\text{l}$  de suspension cellulaire ( $10^6$  cellules/ml). 8  $\mu\text{l}$  de cette suspension sont déposés sur une lame et recouverts d'une lamelle pour l'estimation des pourcentages des différentes populations cellulaires et 20  $\mu\text{l}$  sur un demi-hémocytomètre pour l'estimation des concentrations cellulaires. L'observation a été réalisée avec un microscope à fluorescence Axioskop (ZEISS, Strasbourg, France) avec une longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) : 450-490 nm et une longueur d'onde d'émission ( $\lambda_{\text{em}}$ ) : 520 nm.

L'acridine orange pénètre dans toutes les cellules (vivantes ou non) et s'intercale dans les ADN double-brin qui apparaîtront colorés en vert. Elle se fixe également aux ARN et ADN simple-brin qui apparaîtront colorés en rouge-orange. Une cellule vivante va donc présenter un noyau vert et un cytoplasme rouge-orange. Le bromure d'éthidium pénètre uniquement dans les cellules dont la membrane est altérée, (pour s'intercaler dans les ADN bicaténaires). Les cellules apparaîtront alors colorées en orange vif. Il se fixe un peu de bromure d'éthidium dans les ARN qui apparaîtront légèrement colorés en rouge. Donc, une cellule

morte aura une chromatine orange vif (la coloration du bromure d'éthidium dominera celle de l'acridine orange) et son cytoplasme apparaîtra rouge foncé.

### *II.F.2.b) Paramètres mesurés*

On définit les différents stades cellulaires :

VNA : cellules Vivantes avec noyau Non Apoptotique,

VA : cellules Vivantes avec noyau Apoptotique,

NVA : cellules Non Vivantes avec noyau Apoptotique,

N : cellules nécrotiques (cellules mortes avec noyau normal).

Les pourcentages des différentes populations cellulaires sont calculés par rapport au nombre total de cellules.

$$\% \text{ VNA} = \frac{\text{VNA}}{(\text{VNA} + \text{VA} + \text{NVA} + \text{N})} \cdot 100$$



*Figure 2.4 : Cellules colorées avec le mélange bromure d'éthidium / acridine orange et observées au microscope à fluorescence.*

## II.G. Analyse des métabolites

### II.G.1. Dosage des anticorps par test ELISA

Pour doser les anticorps présents dans les différents surnageants de culture obtenus, on a utilisé la méthode E.L.I.S.A. (Enzymed Linked Immuno Sorbent Assay).

### II.G.1.a) Principe

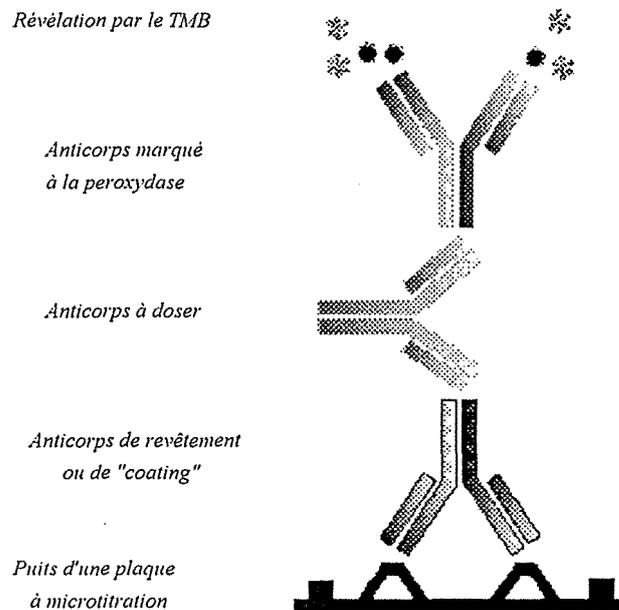


Figure 2.5 : Schéma de principe du test ELISA.

Cette méthode immunochimique permet le dosage des protéines en phase hétérogène par immunoabsorption d'immunoglobulines préalablement fixées à une surface plastique. Elle combine une action enzymatique et immunologique en vue d'obtenir un titrage colorimétrique (figure 2.5).

### II.G.1.b) Réactifs

#### II.G.1.b.1) Tampons

- Tampon PBS-Tween :

|  |          |
|--|----------|
| NaCl.....                              | 130 mM   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 5 mM     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....  | 1,5 mM   |
| Tween 20.....                          | 0,1% v/v |

- Tampon de revêtement :

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.....50 mM ajusté à pH 9,6 par NaHCO<sub>3</sub> solide

- Tampon acétate/citrate :

CH<sub>3</sub>COONa.....140 mM ajusté à pH 6,0 par une solution d'acide citrique 100 mM.

#### II.G.1.b.2) Anticorps de revêtement des plaques

- IgG de chèvre anti-IgG de souris (TAGO, Burlingame, USA)
- IgG de chèvre anti-IgM de souris (TAGO, Burlingame, USA)
- Solution de saturation : HSA 2% p/v dans du PBS-Tween.

#### II.G.1.b.3) Anticorps standard

- IgG standard (JACKSON IMMUNORESEARCH INC., West Grove, USA) à 1 mg/ml dans du tampon NaHPO<sub>4</sub> (10 mM) / NaCl (500 mM) à pH 8 diluée dans du PBS Tween.
- IgM standard (SOUTHERN BIOTECHNOLOGY ASSOCIATES INC., Birmingham, UK) à 1 mg/ml diluée dans du PBS Tween.

#### II.G.1.b.4) Anticorps marqués à la peroxydase

- Anticorps de chèvre anti-IgG de souris marqués à la peroxydase (TAGO, Burlingame, USA) en solution dans du PBS Tween.
- Anticorps de chèvre anti-IgM de souris marqués à la peroxydase (NORDIC IMMUNOLOGY, Tilburg, Pays Bas) en solution dans du PBS Tween.

#### II.G.1.b.5) Substrat de la peroxydase

- Solution mère de 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine (TMB) 1% v/v dans le tampon acétate/citrate à laquelle on rajoute du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 volumes) 0,04% v/v.
- Solution de fin de réaction : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.

### *II.G.1.c) Revêtement des plaques "coating"*

Les 96 puits d'une plaque de microtitration (COSTAR, Cambridge, USA) sont recouverts d'anticorps en déposant :

- Pour le dosage des IgG : 100 µl de la solution d'anti Ig G de souris dans du PBS Tween à une dilution de 1/500.
- Pour le dosage des IgM : 100 µl de la solution d'anti Ig M de souris dans du PBS Tween à une dilution de 1/1000.

Après une nuit d'incubation à 4°C les puits sont lavés 3 fois avec du PBS Tween puis saturés avec une solution de gélatine de poisson (0,2% dans PBS) (SIGMA, St. Louis, USA-Ref G 7765) à raison de 150 µl/puits et conservés ainsi une nuit à 4°C.

### *II.G.1.d) Dépôt de l'anticorps à doser*

Les plaques sont lavées 3 fois avec du PBS Tween. Les échantillons à doser sont ensuite déposés à raison de 100 µl/puits aux dilutions allant de 1/50 à 1/51200 dans du PBS-Tween (10 minutes à 20°C). On réalise parallèlement une gamme étalon avec l'anticorps standard (IgG ou IgM suivant le type de dosage).

### *II.G.1.e) Dépôt du conjugué anticorps-peroxydase*

Les plaques sont lavées 3 fois avec du PBS Tween, puis on ajoute 100 µl/puits de la solution d'IgG (ou IgM) marquée à la peroxydase à une dilution de 1/2000 pour les IgG et de 1/1000 pour les IgM. On laisse incuber les plaques pendant 1 heure à température ambiante et dans l'obscurité.

Après 5 lavages avec du PBS Tween puis 1 lavage avec le tampon acétate/citrate, les puits sont remplis avec 100 µl de la solution de révélation. Après 10 min. d'incubation dans l'obscurité, on arrête la réaction en déposant

25 µl par puits d'acide sulfurique 2N. Les valeurs d'absorbance à 450 nm sont lues par un lecteur de microplaques Titertek (FLOW LABORATORIES, Puteaux, France).

Les concentrations sont calculées graphiquement à partir de courbes étalon réalisées sur chaque plaque.

#### *II.G.1.f) Paramètres mesurés*

- La **production en anticorps** au temps  $t$  ( $P_t$ ) d'une culture, correspond à la concentration en anticorps mesurée au temps  $t$ .
- La **productivité en anticorps** d'une culture, en fonction des cellules vivantes  $\Pi_V$  (ou des cellules totales  $\Pi_T$ ) sera obtenue par le quotient de la production par l'intégrale de cellules au temps correspondant, soit :

$$\Pi_V = \frac{P_t}{I_V} \quad \text{et} \quad \Pi_T = \frac{P_t}{I_T}$$

## II.H. Analyse de l'ADN par électrophorèse

### II.H.1. Extraction de l'ADN

Des suspensions cellulaires (environ  $10^7$  cellules), sont centrifugées à 100 g pendant 5 minutes. Les culots cellulaires sont lavés deux fois avec 5 ml de PBS froid (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,8 mM, pH 7,4). Les cellules sont reprises dans 0,5 ml de tampon de lyse (Tris 10 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,5%, Protéinase K 50  $\mu\text{g/ml}$ , pH 7,8) et incubées 1h à 37°C. L'ADN est extrait avec 400  $\mu\text{l}$  d'un mélange phénol (équilibré avec du Tris 100 mM pH 8) (FLUKA, Buchs, Suisse) / chloroforme (PROLABO, Paris, France) / alcool isoamylique (SIGMA, St. Louis, USA) (25 : 24 : 1 v/v). Après 5 minutes de centrifugation à 12000 g, la phase aqueuse (phase supérieure) est prélevée et extraite de nouveau avec 400  $\mu\text{l}$  de chloroforme. L'ADN est précipité en mélangeant la phase aqueuse avec 70% d'éthanol (concentration finale) pendant une nuit. Après centrifugation (10 minutes à 12000 g à température ambiante) le culot d'ADN est séché et repris dans 400  $\mu\text{l}$  de tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). Cette solution d'ADN est alors incubée à 37°C avec de la ribonucléase A (SIGMA, St. Louis, USA) à une concentration finale de 0,2 g/ml. La réaction est arrêtée et les protéines retirées par une nouvelle extraction phénol/chloroforme comme précédemment. Finalement l'ADN est précipité avec 70% d'éthanol auquel on ajoute 10  $\mu\text{l}$  d'une solution d'acétate d'ammonium 4M et 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  1,5 M pour améliorer la précipitation des ADN de petite taille. Après 10 minutes de centrifugation à 12000 g, le culot est repris dans 50  $\mu\text{l}$  de tampon TE. Ces solutions d'ADN sont conservées à 4°C si elles ne sont pas analysées immédiatement. Ce protocole est schématisé sur la figure 2.6.

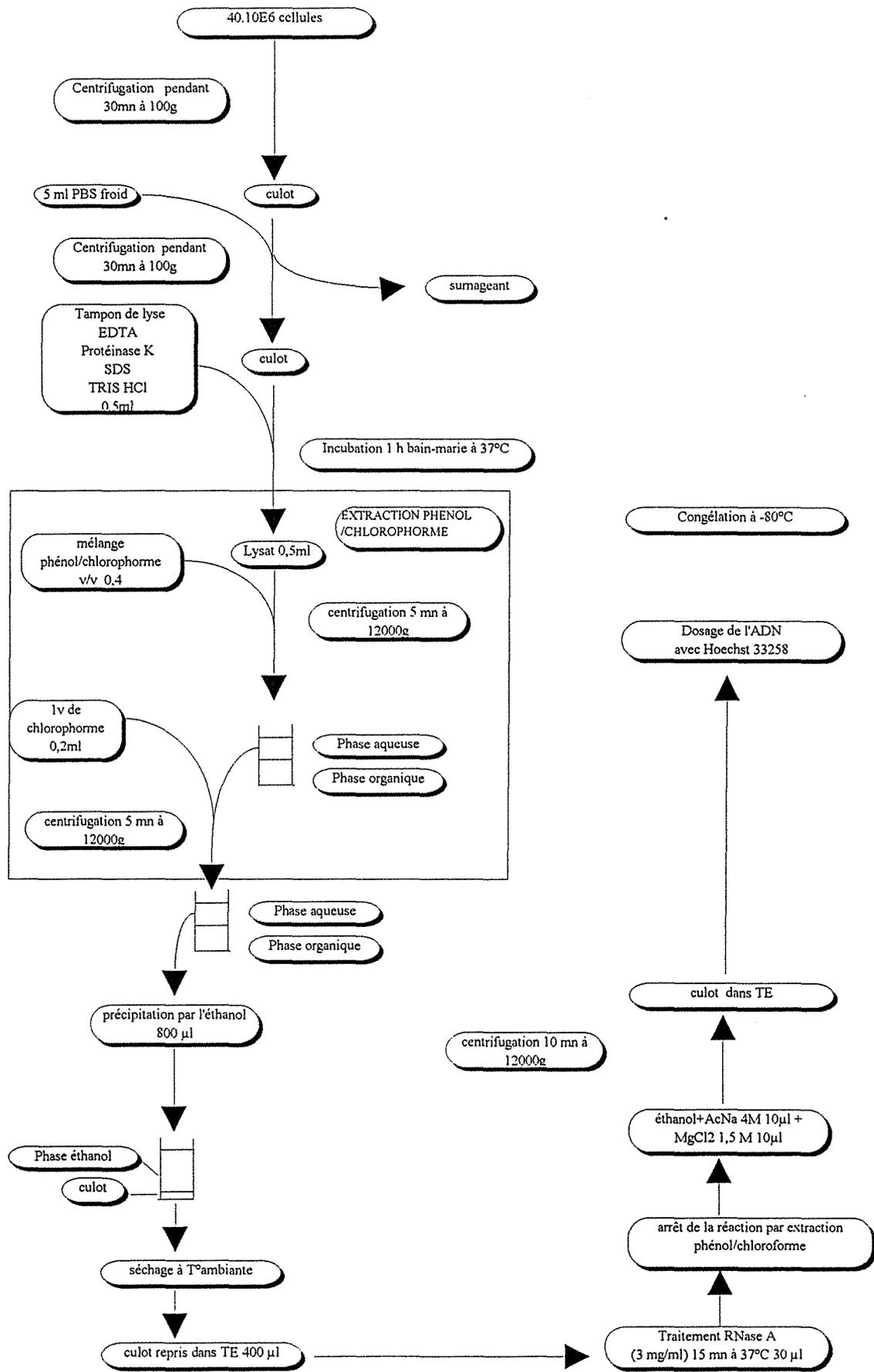
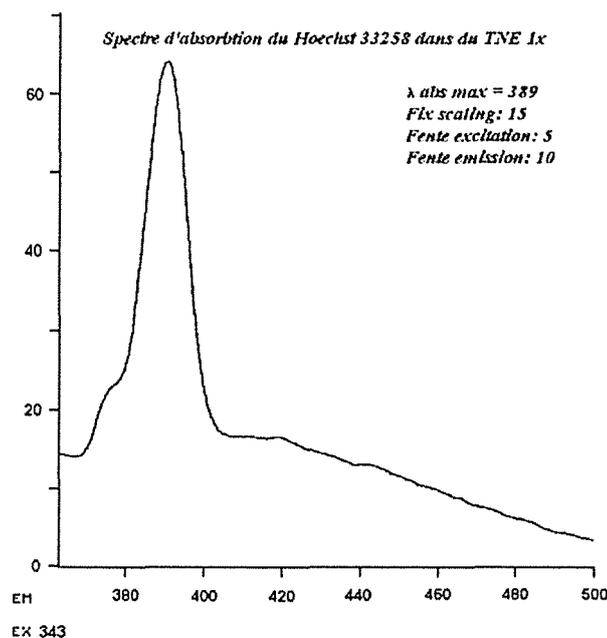


Figure 2.6 : Schéma d'extraction et de dosage de l'ADN cellulaire.

## II.H.2. Dosage de l'ADN

La pureté des échantillons est vérifiée en les diluant dans du tampon TE et en déterminant leur absorbance à 260 et 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-160 (SHIMADZU, Kyoto, Japon). Les échantillons pour lesquels le rapport des absorbances à 260 nm et 280 nm est  $>2$  ou  $<1,6$  sont écartés.

Le dosage de l'ADN est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre à fluorescence LS-5 (PERKIN-ELMER, Bucks, UK) en utilisant le colorant HOECHST 33258 (SIGMA, St. Louis, USA) dilué à 10% v/v dans du tampon TNE (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM pH 8). Afin de déterminer  $\lambda_{\text{max}}$  pour le couple HOECHST 33258 / ADN, on utilise de l'ADN de thymus de veau (SIGMA, St. Louis, USA) à 100  $\mu\text{g/ml}$  dans du tampon TE. Le spectre obtenu est présenté sur la figure 2.7. La quantité d'ADN est proportionnelle à la quantité de fluorescence émise par le Hoechst 33258, jusqu'à la concentration de 100  $\mu\text{g/ml}$ , lorsqu'il s'intercale à l'ADN.



*Figure 2.7: Spectre du couple ADN/HOECHST 33258. Ce spectre d'émission est obtenu pour  $\lambda_{\text{ex}} = 343$  nm.*

### II.H.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les gels sont préparés avec 2% d'agarose (SIGMA, St. Louis, USA - Ref A9539) dans du tampon TBE avec 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium (SIGMA, St. Louis, USA).

#### *II.H.3.a) Préparation des échantillons*

Les échantillons sont préparés avec au moins 5 µg d'ADN en solution dans 10 µl de tampon TE. On leur ajoute 1 µl d'une solution de bleu de bromophénol à 0,01% et Ficoll 400 à 20% (PHARMACIA, Uppsala, Suède) dans du tampon TE.

#### *II.H.3.b) Séparation*

La migration électrophorétique est réalisée dans une cuve HORIZON 58 (LIFE TECHNOLOGY, Gaithersburg, USA) avec un champ électrique de 4V/cm. En fonction des expériences, différents marqueurs de taille de l'ADN ont été utilisés :

1. Echelle de 100 pb (PHARMACIA, Uppsala, Suède)
2. pBR322 hydrolysé par Hae III (SIGMA, St. Louis, USA)
3. ADN marqueur II (BOEHRINGER, Mannheim, Allemagne)
4. ADN marqueur IV (BOEHRINGER, Mannheim, Allemagne)
5. ADN marqueur VI (BOEHRINGER, Mannheim, Allemagne)
6. Megabase II (LIFE TECHNOLOGIES, Gaithersburg, USA)

#### *II.H.3.c) Visualisation*

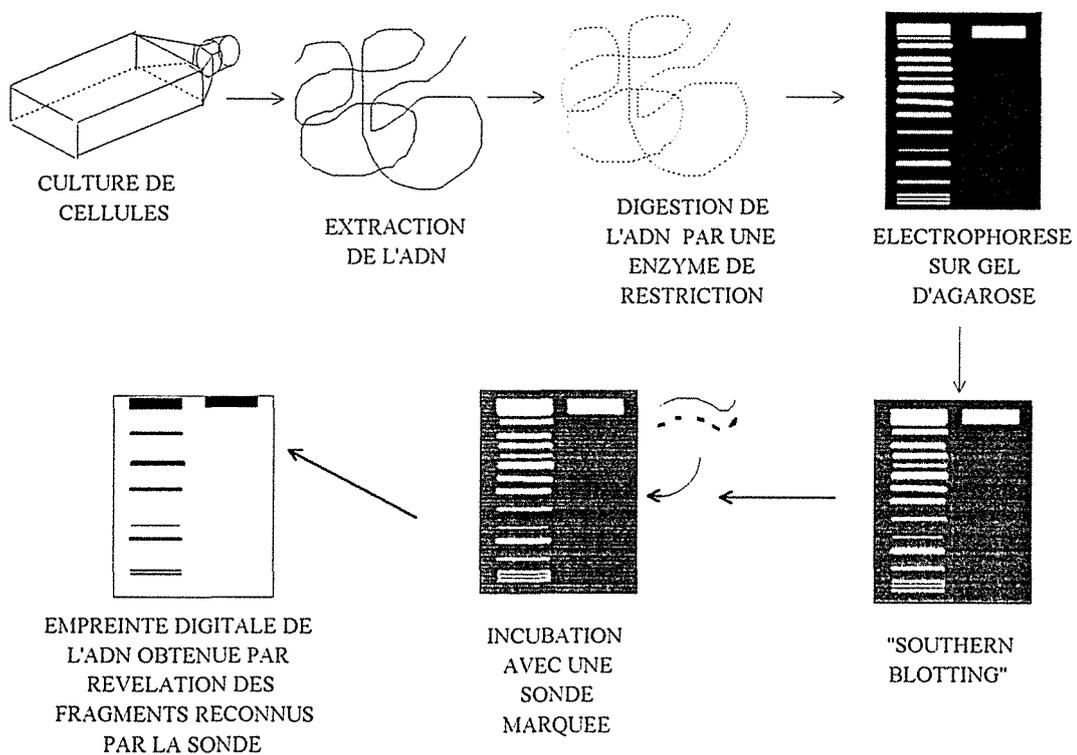
Après migration, le gel est lavé pendant 12h à l'eau distillée pour être ensuite observé sous lumière UV avec une table Fluo-Link FL-35.M (EST.LAB.,

Strasbourg, France). Le gel est photographié à l'aide un système Polaroid avec des films 667 (POLAROID, Cambridge, USA).

#### II.H.4. Empreinte digitale de l'ADN

##### *II.H.4.a) Principe*

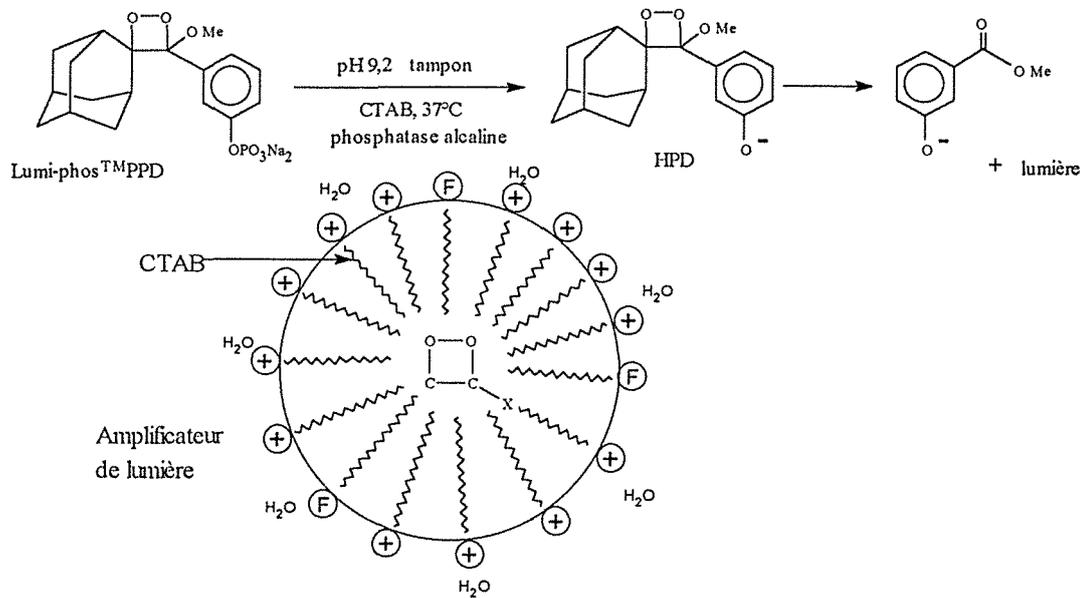
Pour réaliser l'empreinte digitale de l'ADN, nous avons utilisé le protocole sous licence de ICI Cellmark Diagnostics Ltd décrit dans (156). Les enzymes de restriction Hinf I et Hae III ont été utilisées. La figure 2.8 résume les différentes étapes nécessaires à la réalisation de l'empreinte génétique.



*Figure 2.8 : Principe de la détermination de l'empreinte digitale de l'ADN.*

### II.H.4.b) Marquage de la sonde oligonucléotidique 33.15

Les oligonucléotides de la sonde 33.15 (sonde de Jeffrey) ont été marqués avec de la phosphatase alcaline comme il est montré dans la figure 2.9.



**Figure 2.9** : Méthode NICE<sup>TM</sup> de marquage des sondes oligonucléotides avec émission lumineuse. La molécule PPD en présence de la phosphatase alcaline donne un intermédiaire instable HPD qui va se dégrader en libérant de la lumière. L'énergie absorbée par un complexe moléculaire fluorescéine (F) / surfactif cationique (+) excite les groupements fluorescéine qui émettent de la lumière visible.

#### II.H.4.b.1) Hybridation, lavage et marquage des southern blots

Une préhybridation est réalisée pendant 20 minutes à 50°C dans du Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 M (pH 7,2) contenant 0,1% de SDS. Les oligonucléotides de la séquence 33.15 marqués à la phosphatase alcaline, sont utilisés dans une solution d'hybridation (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 M (pH 7,2) avec 0,1% de SDS) avec 10% d'un bloqueur des sites spécifiques de la membrane. Après 20 minutes d'hybridation à 50°C, on lave deux fois avec du Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80 mM contenant 0,1% de SDS

pendant 10 minutes à 50°C. On lave ensuite deux fois avec la même solution pendant 5 minutes à température ambiante. Les tampons d'hybridation sont stérilisés (chauffage 2 minutes dans un four à micro-ondes puissance maximale).

#### II.H.4.b.2) Mécanisme d'action du marquage

Une fois hybridées et lavées, les membranes sont enfermées avec 3 ml de Lumi-phos™ 530 (ZENECA, Manchester, UK) entre des feuilles de polyester scellées avec du ruban adhésif de manière à être "autoluminographiées".

Le Lumi-phos™ est un mélange de : dioxétane phényl phosphate (PPD), un "activateur", un promoteur d'activité enzymatique et du bromure de cétyle triméthyl ammonium,  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$  (CTAB).

La phosphatase alcaline fixée à la sonde, hydrolyse le groupement phosphate du PPD en produisant un intermédiaire instable qui se dégrade et libère de la lumière (figure 2.9). L'amplificateur est un complexe de surfactifs cationiques et de fluorescéine liée à un surfactif et qui forme des micelles avec CTAB, ce qui permet d'augmenter l'émission de lumière. L'énergie lumineuse libérée excite les groupements fluorescéine dans les micelles, qui réémettent de la lumière visible pendant plusieurs jours.

Les membranes hybridées avec la sonde 33.15 et traitées au Lumi phos™ sont recouvertes d'un film sensible aux rayons X (FUJI-RX). Le film est exposé pendant 3h à 37°C. D'autres expositions deux à trois jours plus tard peuvent être nécessaires pour améliorer la révélation.

#### *II.H.4.c) Deshybridation*

Les sondes en excès sont éliminées par incubation de la membrane à 80°C pendant 15 minutes dans une solution de SDS 0,1% (v/v dans de l'eau désionisée) et un rinçage dans du tampon SSC (NaCl 150 mM et citrate de trisodium 12 mM à

pH 7,4). La membrane est ensuite séchée à l'air puis stockée dans des sachets de polythène.

#### *II.H.4.d) Observation des empreintes digitales de l'ADN*

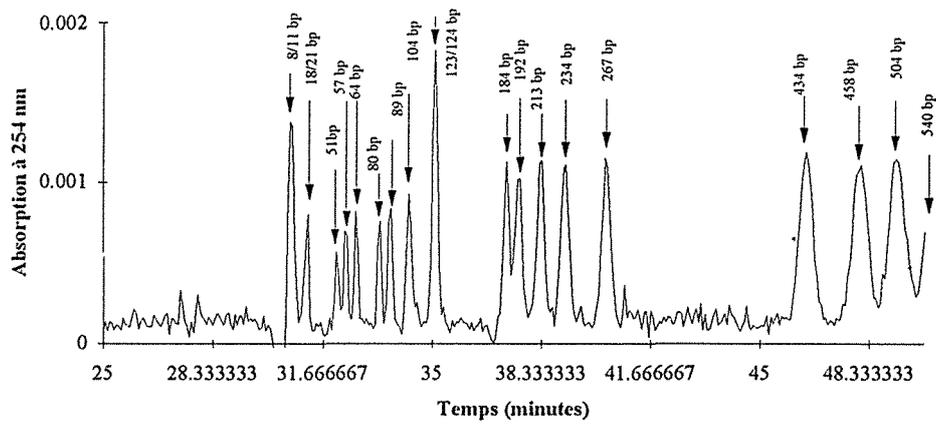
Les bandes des empreintes digitales d'ADN sont lues à l'aide d'un transilluminateur à lumière blanche. L'identification des bandes communes entre les différentes pistes est réalisée en alignant des pistes standard de chaque côté du gel provenant de HeLa S3.

#### II.H.5. Electrophorèse capillaire

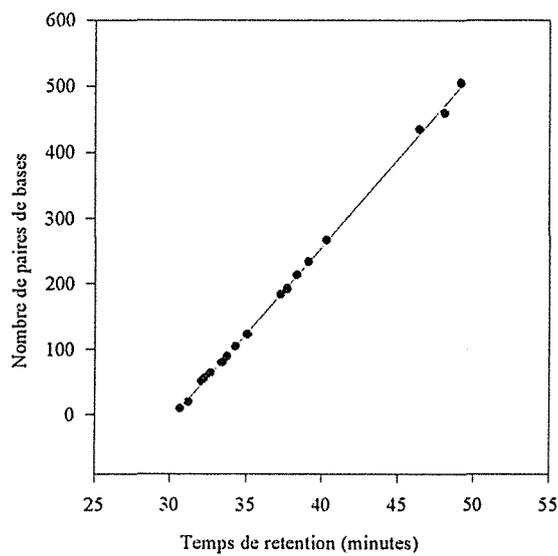
Les analyses sont réalisées avec une unité d'électrophorèse capillaire PACE 2000, pilotée par le logiciel System GOLD Software (BECKMANN, Fullerton, USA).

Les échantillons et les mélanges standard sont dilués dans un tampon TE auquel on ajoute 5% (v/v) de solution d'Orange G.

Les séparations se font à 30 kV à intensité et température constantes (16  $\mu$ A et  $21 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ). On utilise une cartouche comportant un capillaire de 75  $\mu\text{m}$  de diamètre interne (kit eCAP™ ds DNA 1000, BECKMANN, Fullerton, USA). Le capillaire est rempli avec un gel actif à base de polyacrylamide. Les échantillons ont été injectés en appliquant une tension de 5 kV pendant 10 secondes. Chaque injection a été réalisée en triple. La détection est effectuée par mesure de la lumière à 254 nm et un échantillonnage de données de 2 Hz. Les paramètres suivants ont été également respectés : Echelle de détection 0,0050 UA, sensibilité d'augmentation de temps de détection normale, seuil négatif de détection 10%. La calibration a été faite avec de l'ADN de pBR322 coupé par Hae III (SIGMA, St. Louis, USA). Les résultats obtenus sont donnés sur la figure 2.10.



a)



b)

*Figure 2.10 : Calibration du tube de l'électrophorèse capillaire. L'électrophorégramme a) correspond au marqueur de taille de l'ADN pBR 322 digéré par Hae III (cf. chapitre Matériel et méthodes). La figure b) présente la courbe de calibration donnant les temps de rétention en fonction du nombre de paires de base.*

## II.I. Analyse de l'ADN par cytométrie en flux

### II.I.1. Fixation des cellules

Des suspensions contenant de  $10^6$  à  $10^7$  cellules sont prélevées dans la culture et centrifugées à 100 g pendant 5 minutes. Le culot est repris dans du PBS puis centrifugé à 100 g pendant 5 minutes. Le culot est resuspendu dans une solution CABS/éthanol (1:1) (v/v) préparée extemporanément. Le tampon CABS (citric acid buffered saline) est préparé selon une méthode dérivée de celle décrite par Alanen et al. (5). Il est constitué de saccharose 83,5 g (MERCK, Darmstadt, Allemagne), citrate de trisodium 11,8 g (SIGMA, St. Louis, USA), DMSO 50 ml (MERCK, Darmstadt, Allemagne), eau distillée q.s.p. 1000 ml, pH 7,6. La solution est stérilisée par passage sur 0,22  $\mu$ m. Les cellules ainsi fixées se conservent plusieurs mois à 4°C.

### II.I.2. Coloration à l'iodure de propidium

0,2 ml d'une suspension de cellules ( $4 \cdot 10^6$  cellules/ml) fixées suivant le protocole décrit ci-dessus, est mélangé à 1 ml de PBS. Le mélange obtenu est centrifugé pendant 3 minutes à 3500 rpm. Le culot cellulaire repris dans 4 ml de PBS est maintenu à température ambiante pendant 15 minutes. La solution obtenue est de nouveau centrifugée (3 minutes à 2500 rpm). Le culot est repris dans 1 ml de tampon de coloration (PBS + EDTA 0,1 mM + Triton X-100 0,1%) auquel sont ajoutés 50  $\mu$ l d'une solution d'iodure de propidium (1 mg/ml dans H<sub>2</sub>O additionnée de 4% d'éthanol pour conservation) et 10  $\mu$ l d'une solution de RNaseA (BOEHRINGER Mannheim, Allemagne) (2,5 mg/ml dans H<sub>2</sub>O préalablement chauffée pendant 10 minutes à 95°C afin d'éliminer toute activité DNase).

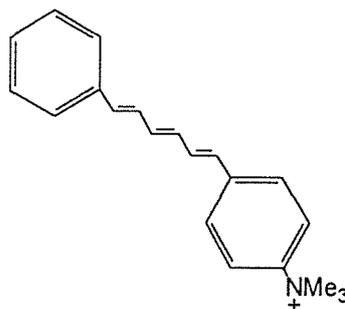
### II.I.3. Analyse du cycle cellulaire

L'étude du cycle cellulaire a été effectuée à l'aide d'un cytomètre en flux ORTHO CYTE® (ORTHO-DIAGNOSTICS, Roissy, France). Les analyses du cycle cellulaire ont été réalisées en utilisant le module "Multiple Option Cell Cycle Fitting" du logiciel MULTICYCLE Autofit Version 2.10 (PHOENIX FLOW SYSTEMS, San Diego, USA). Ce logiciel calcule les pourcentages des différentes phases du cycle avec la méthode paramétrique de Dean et Jett qui assimile les phases G1 et G2/M à deux distributions gaussiennes, alors que la phase S est approximée par un polynôme du deuxième degré. Le calcul du pourcentage de cellules en apoptose est réalisé à l'aide du module "Multiple Option Two Parameters Analysis" du logiciel MULTI2D Version 3.0 (PHOENIX FLOW SYSTEMS, San Diego, USA).

### II.J. Analyse de la fluidité membranaire

La fluidité membranaire a été déterminée par polarisation de fluorescence en utilisant un fluofluidimètre (REGULEST, Florange, France) avec comme sonde fluorescente le 1-[4-(triméthylamino) phényl] 6-phényl hexa 1,3,5-triène TMA-DPH (Molecular probes, Oregon, USA) dont la formule est représentée sur la figure 2.11.

TMA-DPH



*Figure 2.11 : Molécule de TMA-DPH : Structure chimique.*

Le TMA-DPH dissous dans la N,N'-diméthylformamide (DMF) (SIGMA, St. Louis, USA) à la concentration de  $2 \cdot 10^{-3}$  M, est conservé à  $+4^{\circ}\text{C}$  pendant 3 semaines maximum. Ses caractéristiques optiques sont les suivantes : longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{\text{ex}} = 365$  nm et longueur d'onde d'émission  $\lambda_{\text{em}} = 425$  nm.

Pour introduire la sonde dans les cellules, on incube (pendant 10 minutes dans  $20^{\circ}\text{C}$  à l'obscurité) 3 ml de suspension cellulaire dans du PBS ( $2 \cdot 10^6$  cellules/ml) auxquels on ajoute 3  $\mu\text{l}$  de solution de TMA-DPH. Les mesures de polarisation de fluorescence et les observations au microscope à épifluorescence sont réalisées immédiatement.

On détermine les intensités de lumière à travers un polariseur placé parallèlement ( $I_{\parallel}$ ) et perpendiculairement ( $I_{\perp}$ ) à la direction de polarisation de la lumière excitatrice. On en déduit l'anisotropie de fluorescence  $\langle r \rangle$  qui est donnée par :

$$\langle r \rangle = \frac{(I_{f\parallel} - I_{b\parallel}) - (I_{f\perp} - I_{b\perp})}{I_F}$$

$$\text{avec } I_F = (I_{f\parallel} - I_{b\parallel}) + 2(I_{f\perp} - I_{b\perp})$$

$I_f$  : intensité de fluorescence mesurée pour l'échantillon (parallèlement et perpendiculairement).

$I_b$  : intensité de fluorescence mesurée pour le blanc (parallèlement et perpendiculairement).

## **II.K. Expériences de choc thermique**

Pour 3 hybridomes nous avons étudié l'effet d'un choc thermique sur l'évolution d'une culture en batch.

Nous avons utilisé les hybridomes suivants :

- AFRC MAC 65 dans du DMEM + 10% SVF,
- HF2 x 653 dans du RPMI + 10% SVF,
- OX 19 dans du RPMI + 10% SVF.

Les cultures sont réalisées dans des boîtes de 25 cm<sup>2</sup> (CORNING, New York, USA). L'ensemencement des cellules se fait à 5.10<sup>5</sup> cellules/ml. Pour effectuer un choc thermique, les cellules sont plongées dans un bain-marie thermostaté à différentes températures et pendant des laps de temps différents. Après le choc thermique, les cellules sont placées dans une étuve à 37°C. La culture est arrêtée 18 heures plus tard. On réalise alors un comptage au bleu trypan et une analyse de l'ADN.

### II.L. Etude de surfactifs non-ioniques

Les surfactifs non-ioniques utilisés ont tous été synthétisés par L. Molina, dans l'équipe du professeur C. Selve au LESOC, Université Henri Poincaré, Nancy I. Ils possèdent un noyau  $\beta$ -lactame susceptible de leur conférer des propriétés antibiotiques. Les structures chimiques de ces composés sont rassemblées dans la figure 2.12 (cf. page suivante).

Les propriétés physico-chimiques des surfactifs ont été mesurées par L. Molina (107) et sont rassemblées dans le tableau III.

*Tableau III : Propriétés physico-chimiques des surfactifs décrits dans la figure 2.12.*

| Produits | PM (g/mol) | 10 <sup>3</sup> CMC (M) | $\gamma$ (mN/m) | Solvant   | Phase      | HLB  |
|----------|------------|-------------------------|-----------------|-----------|------------|------|
| S1       | 488,6      | 3,7                     | 32              | eau       | micelles   | 15,5 |
| S5       | 461,2      | 0,1                     | 16              | eau       | lamellaire | 4,9  |
| S4       | 227,3      | 0,039                   | 29              | eau       | micelles   | 10,0 |
| S9       | 375,5      | nd                      | 35              | formamide | micelles   | 9,1  |
| S7       | 361,5      | nd                      | 47              | formamide | micelles   | 9,5  |
| S3       | 431,6      | nd                      | 35              | formamide | micelles   | 7,9  |
| S6       | 333,4      | nd                      | 35              | formamide | micelles   | 9,7  |
| S8       | 374,5      | nd                      | 38              | formamide | micelles   | 9,1  |
| S2       | 631,7      | 1,2                     | 32              | eau       | micelles   | 13,5 |

*Les surfactifs ont été numérotés de S1 à S9. Le poids moléculaire PM est calculé à partir de la formule chimique. Dans le cas des surfactifs solubles dans l'eau, on a pu mesurer la concentration micellaire critique CMC. On a également mesuré la tension superficielle  $\gamma$  ainsi que la balance hydrophile/lipophile HLB.*

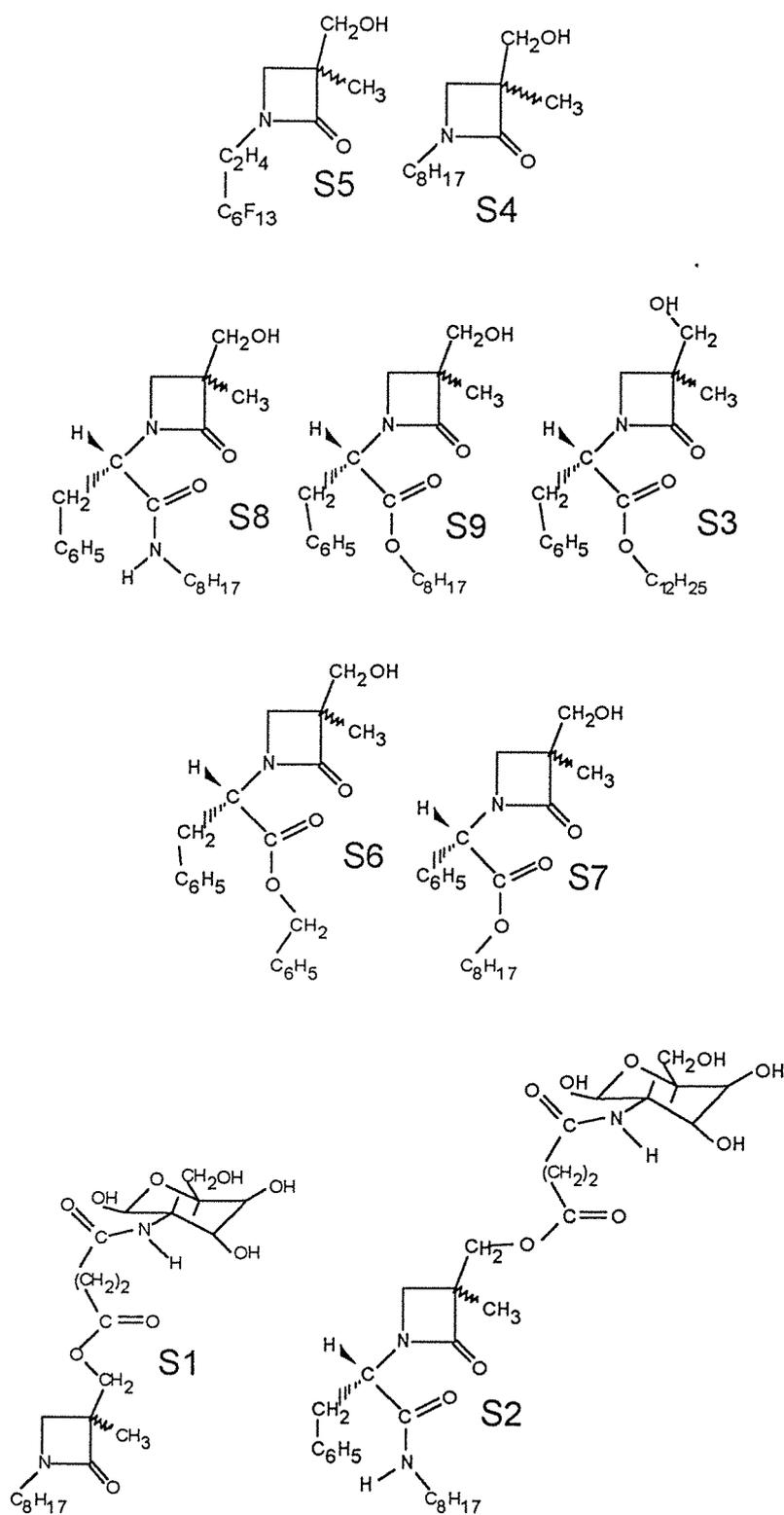


Figure 2.12 : Surfactifs à base de noyau bêta-lactame. Les structures chimiques des surfactifs sont accompagnées de leur dénomination.

### II.L.1. Tests d'hémolyse

Les échantillons sanguins nous ont été fournis par le laboratoire d'hématologie de la Faculté de Médecine (Université Henri Poincaré, Nancy I). Les hématies sont obtenus par centrifugation à 100 g à 4°C pendant 5 minutes. Les culots sont repris dans du tampon PBS.

La concentration en globules rouges de la suspension obtenue est déterminée par comptage dans une cellule de Thoma. On mélange le volume nécessaire de suspension à un volume de surfactif, de manière à obtenir une suspension contenant une concentration donnée de surfactif en présence d'une concentration en globules rouges de  $10^9$  cellules / ml. Parallèlement des témoins permettant d'obtenir 0% d'hémolyse (globules rouges + PBS) et 100% d'hémolyse (globules rouges + eau), sont préparés.

Les différents échantillons ont été mis à incuber à température ambiante (20°C), sous agitation constante pendant 1 heure, puis les échantillons sont centrifugés à 100 g pendant 5 minutes. Les surnageants sont dilués 1000 fois et leur absorbance est mesurée à 414 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-160 (SHIMADZU, Kyoto, Japon). Le pourcentage d'hémolyse pour un échantillon  $\%H_{ech}$  est calculé de la manière suivante :

$$\%H_{ech} = \frac{A_{ech} - A_0}{A_{100} - A_0}$$

avec :

$A_{ech}$  : absorbance mesurée pour l'échantillon,

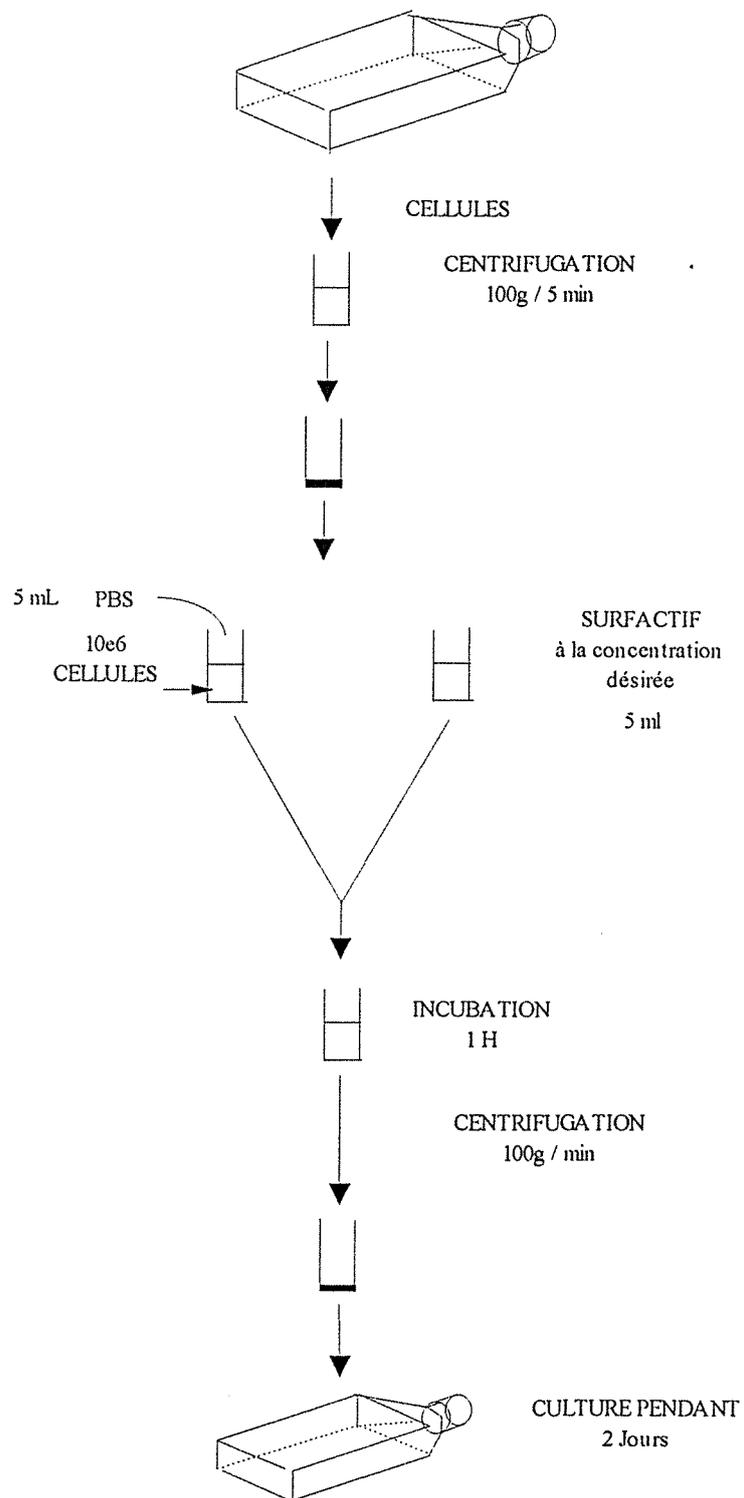
$A_{100}$  : absorbance mesurée pour le témoin globules rouges dans l'eau,

$A_0$  : absorbance mesurée pour le témoin globules rouges dans le PBS.

## II.L.2. Toxicité des surfactifs sur des cultures d'hybridomes

Afin d'étudier l'éventuelle toxicité des différents surfactifs sur des cultures cellulaires, nous avons choisi, pour des raisons que nous expliquerons plus loin, des hétérohybridomes homme-souris HF2 x 653.

Les différentes concentrations en surfactifs ont été réalisées dans 5 ml de PBS de manière non stérile à partir d'une solution mère à 5 g/l dans la N,N'-diméthylformamide (DMF) (SIGMA, St. Louis, USA). Les hybridomes HF2 x 653 sont prélevés en phase exponentielle de croissance et centrifugés à 100 g pendant 5 minutes. 10<sup>6</sup> cellules sont ensuite reprises dans 5 ml de PBS stérile. On ajoute 5 ml d'une solution de surfactif préparée de la manière suivante : à 5 ml de tampon PBS est ajouté le volume nécessaire de solution mère à 5 g/l dans la DMF pour obtenir la concentration finale en surfactif désirée. Après 1 heure d'incubation à 37°C, la suspension est centrifugée à 100 g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est repris dans 10 ml de milieu de culture (RPMI 1640 + 10% SVF). Après deux jours de culture, les cellules sont comptées (test au bleu trypan) et observées au microscope à l'aide de la coloration au bromure d'éthidium / acridine orange. Les cultures sont faites chaque fois en triple exemplaire. Le principe de ces manipulations est résumé dans la figure 2.13.



*Figure 2.13 : Protocole d'incubation des surfactifs.*

### *III. RESULTATS - DISCUSSION*

### III.A. Adaptations des cellules à un nouveau milieu de culture

Dans les cultures d'hybridomes, pour obtenir des taux de croissance et des productions d'anticorps maximum, on a l'habitude d'utiliser des milieux de culture supplémentés en sérum d'origine animale. L'emploi de sérum animal présente un certain nombre d'inconvénients comme : prix élevé du sérum, variations entre lots, composition chimique mal définie, difficultés rencontrées lors de la purification des anticorps monoclonaux, en particulier. Pour ces raisons, de nombreuses recherches ont été développées pour mettre au point des milieux sans sérum. De plus, l'utilisation de composés obtenus par culture cellulaire (anticorps monoclonaux par ex.) en imagerie médicale ou en thérapeutique, rendent nécessaire l'emploi de milieux de culture dont la composition est totalement définie. En particulier, les protéines utilisées dans ces milieux doivent être le plus pure possible et doivent également être d'origine humaine pour éviter d'éventuels chocs anaphylactiques. Les protéines les plus couramment employées dans les milieux de culture sont, l'insuline pour son rôle de régulation de l'utilisation du glucose, la transferrine pour ses propriétés de transport du fer et l'albumine pour sa capacité à fixer des molécules hydrophobes, à jouer un rôle de désintoxication et à maintenir constantes certaines propriétés physico-chimiques du milieu (pression oncotique). Ces protéines étant d'origine humaine, la très faible quantité qui peut subsister à la fin de la purification des anticorps monoclonaux ne va donc présenter que peu de danger pour l'homme. Par ailleurs, le risque de contamination par des agents infectieux animaux (ex: encéphalopathie spongiforme pouvant être véhiculée par la sérum albumine bovine) est éliminé.

Pour l'obtention d'anticorps monoclonaux utilisables chez l'homme il faut donc "adapter" les cellules à des nouveaux milieux mieux définis. Le temps nécessaire pour pouvoir obtenir des cellules stabilisées dans un nouveau milieu est appelé "Adaptation" (cf. chapitre Matériel et méthodes). Cette technique est assez mal décrite dans la littérature. Chandler (20) a été parmi ceux qui ont publié une

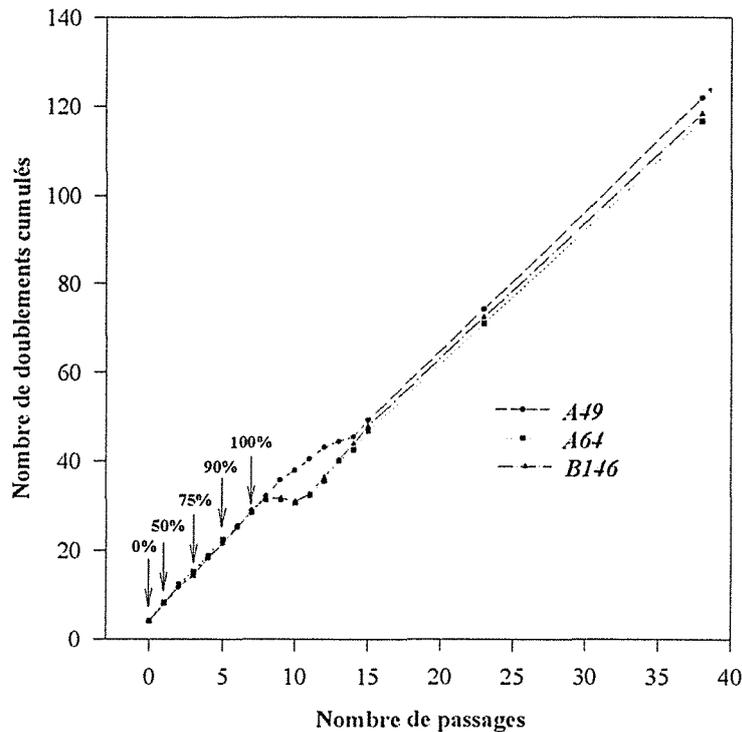
stratégie d'adaptation pour les cultures cellulaires d'hybridomes. Elle consiste à cultiver les cellules dans des milieux dont la proportion en ancien milieu va aller progressivement en diminuant lors des différents repiquages ou "passages".

Dans ce chapitre nous allons présenter des résultats obtenus avec trois hybridomes différents (A49, A64 et B146) au cours d'adaptations à plusieurs types de milieux suivant une technique modifiée par rapport à celle décrite par Chandler (20). Nous nommerons ces adaptations "adaptations lentes" par opposition aux adaptations que nous décrirons et qui ont été réalisées en un temps plus court "adaptations rapides".

### III.A.1. Adaptations lentes

Des cellules cultivées dans un milieu contenant du SVF ont été adaptées à un milieu sans sérum. Pour cela les cellules sont successivement cultivées dans des mélanges d'ancien et de nouveau milieu dont le pourcentage de nouveau milieu est graduellement augmenté. Le changement de proportion se fait en fonction, soit de la viabilité, (les changements de milieu ne sont faits que si le pourcentage de viabilité est supérieur à 60%), soit en fonction du nombre de doublements (le changement de milieu se fait si le nombre de doublements est supérieur à 1,3).

### III.A.1.a) Adaptations tenant compte de la viabilité



**Figure 3.1 :** Adaptation par étapes avec trois souches d'hybridomes A49, A64 et B146. Les cellules qui étaient initialement cultivées dans du milieu RPMI U SVF ont été adaptées pour être cultivées dans du milieu BM0. L'adaptation des cellules est matérialisée par la courbe donnant le nombre de doublements cumulés des cellules en fonction du nombre de passages. Chaque étape de l'adaptation est notée par une flèche associée au pourcentage de volume de nouveau milieu contenu dans le milieu de culture.

La figure 3.1 montre les résultats de l'adaptation des hybridomes A49, A64 et B146 cultivés initialement en RPMI U SVF et adaptés, par étapes, à du milieu sans sérum (et sans protéines) BM0 en utilisant le pourcentage de viabilité comme critère de changement de milieu (les changements de milieu ne sont faits que si le pourcentage de viabilité est supérieur à 60%).

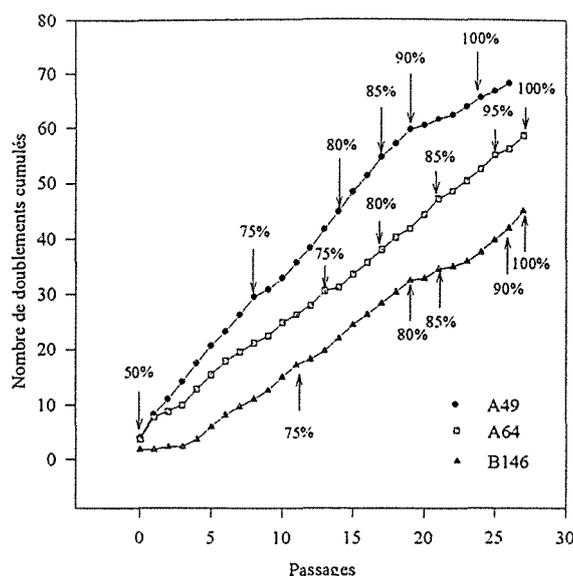
Quatre étapes correspondant à des pourcentages en BM0 de 50, 75, 90 et 100% sont utilisées pour les trois souches. Jusqu'à 75% de milieu BM0, les trois

hybridomes se dédoublent de manière identique, mais à partir de 90%, les cellules A64 et B146 arrêtent de se diviser pendant deux passages pour reprendre le même taux de doublement qu'avant. La souche A49 ne subit qu'un léger fléchissement de sa courbe de doublements cumulés pendant 3 à 4 passages. L'observation des doublements a été poursuivie jusqu'à 40 passages (environ deux mois et demi de culture) bien qu'après 20 passages, les cellules semblent être adaptées. Ceci a été fait dans le but de prévenir un éventuel arrêt de la croissance cellulaire.

### *III.A.1.b) Adaptations tenant compte de la viabilité et du temps de génération*

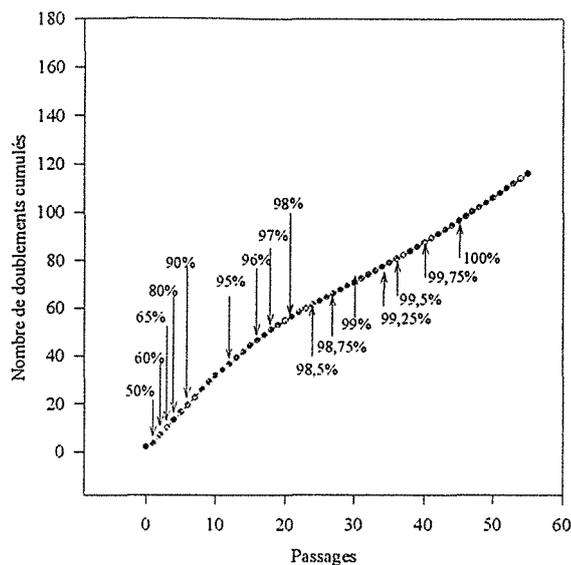
La figure 3.2 montre les résultats de l'adaptation des trois souches (A49, A64 et B146) cultivées initialement en RPMI U SVF et adaptées au milieu BM-HSA (1 g/l). Les changements de milieu sont réalisés à la condition, d'une part, que le pourcentage de viabilité soit supérieur à 60%, et d'autre part, que depuis le dernier passage, le nombre de cellules soit au moins multiplié par 1,3, ce qui correspond à un temps de doublement d'au moins 30 heures.

L'adaptation a été réalisée en 6 étapes (50, 75, 80, 85, 90 et 100% en BM-HSA) en essayant de s'approcher des conditions d'adaptation proposées par Chandler (20). On peut constater que les trois souches se comportent différemment au cours de l'adaptation. En effet, la pente moyenne de la courbe de doublements cumulés donne les temps moyens de génération des doublements, 19 heures pour A49, 24 heures pour A64 et 28 heures pour B146. Le temps nécessaire à l'adaptation a correspondu à 22 passages. 5 passages ont été réalisés dans le nouveau milieu BM-HSA.



**Figure 3.2 :** Adaptations par une méthode dérivant de celle décrite par Chandler avec trois souches d'hybridomes A49, A64 et B 146. Les cellules qui sont initialement dans du RPMI U SVF sont adaptées au milieu BM0-HSA (1 g/l). Les changements de milieu sont indiqués par une flèche. Ils sont donnés en pourcentage de nouveau milieu.

Au cours d'un travail de DEA réalisé au laboratoire, D. Dumas (32) a utilisé la méthode décrite par Chandler pour adapter l'hybridome A49 du milieu RPMI U SVF au milieu BM-HSA (1 g/l) mais en réalisant des étapes pour lesquelles les variations de pourcentage en nouveau milieu sont de plus en plus faibles après 90%. Les résultats donnés dans la figure 3.3 montrent que le nombre d'étapes est beaucoup plus élevé (17 étapes : 50, 60, 65, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 98.5, 98.75, 99, 99.25, 99.5, 99.75 et 100% en BM-HSA) ce qui équivaut à 55 passages (4 mois de culture). On constate que le temps de génération augmente quand on passe d'un milieu donné à un milieu plus "pauvre". L'augmentation du temps de génération survient lorsque le milieu contient 90% de nouveau milieu. De sa valeur initiale de 13h, il augmente jusqu'à 28h pour revenir à la valeur de 22h en fin d'adaptation. Si l'adaptation avait été faite jusqu'à un milieu contenant seulement 60% de nouveau milieu, les cultures auraient gardé leur temps de doublement initial de 13 h.

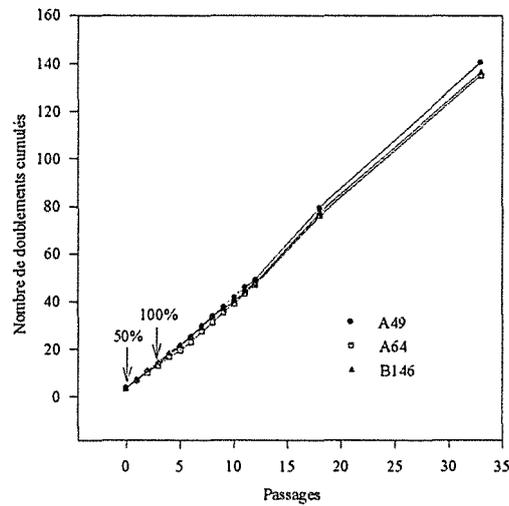


**Figure 3.3 :** Adaptations suivant la méthode décrite par Chandler avec l'hybridome A49 cultivé dans du RPMI U FCS vers du BM0-HSA (1 g/l) avec comme référence la courbe correspondant à une adaptation des cellules A49 à un milieu contenant 60% de nouveau milieu. Les changements de milieu sont indiqués par une flèche. Ils sont donnés en pourcentage de nouveau milieu.

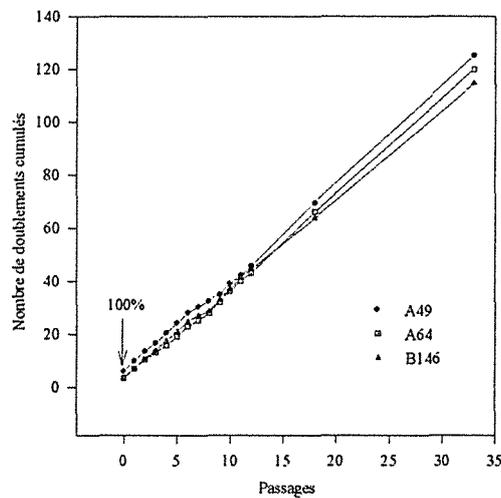
### III.A.2. Adaptations rapides

Au cours des expériences précédentes nous avons adapté des cellules d'un milieu initial RPMI U SVF c'est-à-dire constitué du milieu de base RPMI, supplémenté avec du substitut de sérum (Ultrosor HY) et du SVF, vers le milieu final formé avec le milieu de base BM (Mélange volume à volume de milieu F12 : DMEM, cf. chapitre Matériel et méthodes) supplémenté avec 1 g/l de HSA. Le temps nécessaire à ces adaptations étant long, nous avons tenté une autre stratégie. Celle-ci consiste à passer du milieu initial vers le nouveau milieu de base, supplémenté soit avec 10% de SVF, soit avec un certain nombre de composés autres que du SVF (BM-IBF).

### III.A.2.a) Changement de milieu de base



a) RPMI U SVF → BM 10% SVF



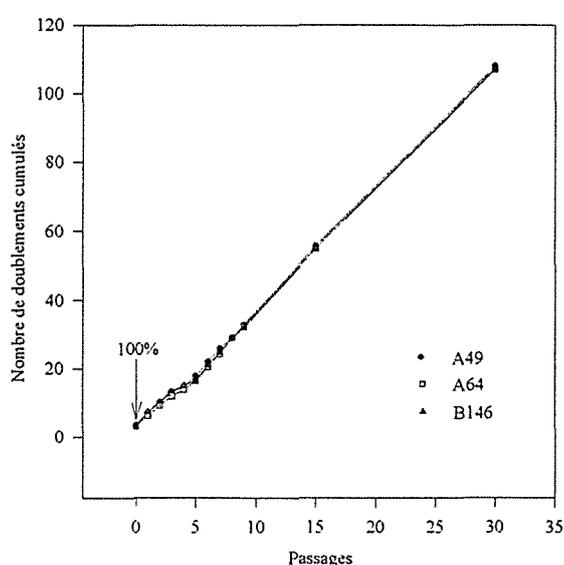
b) RPMI U SVF → BM-IBF

**Figure 3.4 :** Adaptations de trois souches d'hybridomes (A49, A64 et B146) à un nouveau milieu de base : a) cellules cultivées dans du milieu RPMI U SVF adaptées au milieu BM-10% SVF, b) cellules cultivées dans du milieu RPMI U SVF adaptées au milieu BM-IBF.

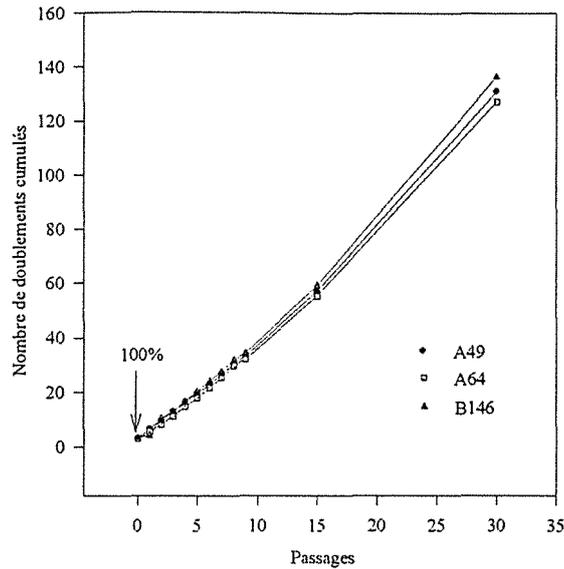
On peut observer dans la figure 3.4 a), les résultats de l'adaptation des trois hybridomes cultivés dans du RPMI U SVF vers le milieu constitué du milieu de base BM supplémenté avec 10% de SVF. L'adaptation est réalisée en 2 étapes (50 et 100%). On observe les cellules pendant 33 passages. Les trois hybridomes se sont adaptés sans problème sans que leur temps de doublement ne soit modifié. Dans la figure 3.4 b), sont donnés les résultats de l'adaptation des trois mêmes hybridomes cultivés dans du milieu RPMI U SVF vers le milieu BM-IBF. Les cellules ont été placées directement dans le nouveau milieu et observées pendant 33 passages. Pour les trois souches, les temps de doublements moyens qui sont de 14,5 heures jusqu'au 7ème passage, augmentent à 21 heures, puis reprennent leur valeur initiale dès le 9ème passage.

***III.A.2.b) Passage d'un milieu supplémenté en SVF à un milieu sans sérum en conservant le même milieu de base***

Des cellules adaptées au milieu BM-10% SVF sont placées dans un milieu contenant le même milieu de base supplémenté, soit par des additifs IBF (BM-IBF), soit par 1 g/l de HSA (BM-HSA).



a) BM 10% → BM-IBF



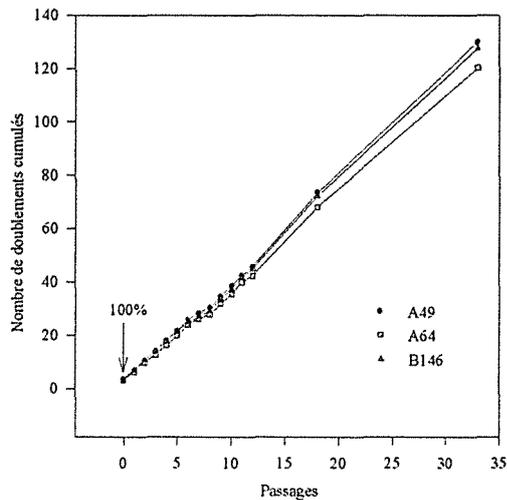
b) BM 10% SVF → BM-HSA

**Figure 3.5 :** Adaptations de trois souches d'hybridomes (A49, A64 et B146) vers des milieux sans sérum : a) cellules cultivées dans du milieu BM 10% SVF vers du milieu BM-IBF, b) cellules cultivées dans du milieu BM-10% SVF vers du milieu BM-HSA.

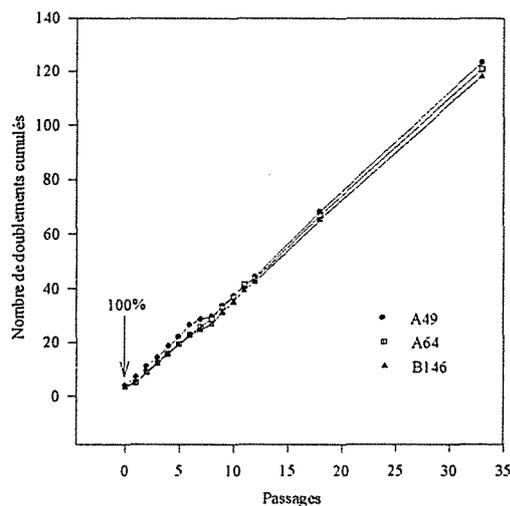
Les figures 3.5 a) et 3.5 b) donnent les résultats obtenus en plaçant les hybridomes A49, A64 et B146 qui étaient cultivés dans du milieu BM-10% SVF, puis adaptés dans du milieu BM-IBF et dans du milieu BM-HSA (1 g/l) respectivement. Les cellules adaptées à du milieu BM-IBF présentent une augmentation de leur temps moyen de doublement entre le 3ème et le 4ème passage de 15 heures à 32 heures puis les cellules retrouvent leur temps de doublement initial. Le passage du milieu BM 10% SVF au milieu BM-HSA (1 g/l) se fait sans modification du temps de doublement.

### III.A.2.c) Passage d'un milieu sans sérum à un milieu supplémenté avec des additifs

Les trois hybridomes cultivés respectivement dans du milieu sans sérum BM-HSA 1 g/l et dans du milieu de base BM0, sont placés dans du milieu BM-IBF. Les résultats sont donnés dans les figures 3.6 a) et 3.6 b).



a) BM-HSA → BM-IBF



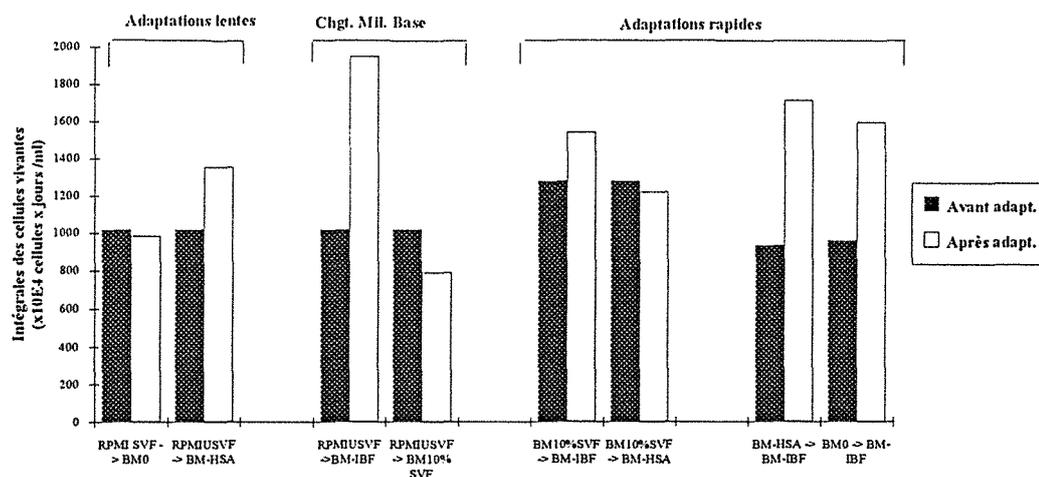
b) BM0 → BM-IBF

**Figure 3.6 :** Adaptations de trois souches d'hybridomes (A49, A64 et B146) : a) cellules cultivées dans du milieu BM-HSA (1 g/l) adaptées au milieu BM-IBF, b) cellules cultivées dans du milieu BM0 adaptées au milieu BM-IBF.

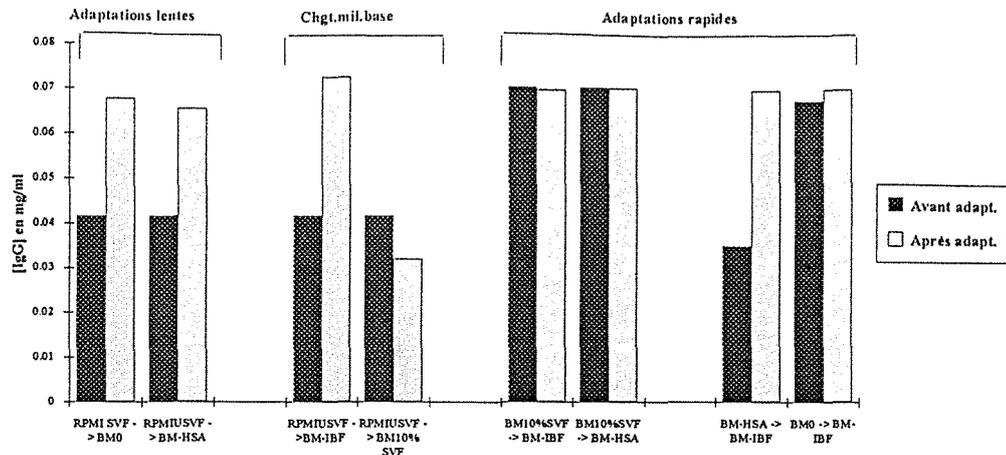
Dans les deux cas, les différentes lignées cellulaires conservent un temps de doublement de 14,5 heures.

### III.A.3. Evolution de la croissance cellulaire et production d'anticorps au cours de changements de milieu

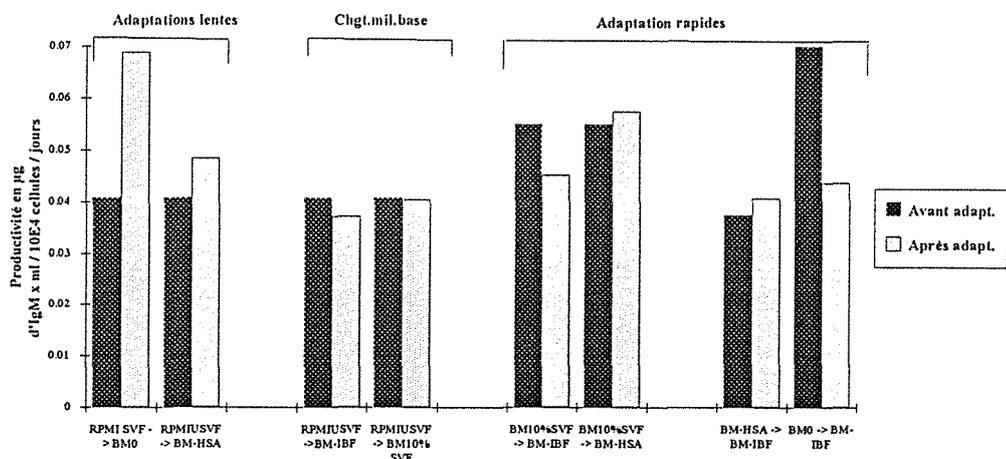
Nous avons comparé différents paramètres relatifs à la croissance et à la production d'anticorps monoclonaux de la souche A49 avant et après adaptation. Des prélèvements ont été réalisés tous les jours dans des cultures en boîtes de 25 cm<sup>2</sup>. Le pourcentage de viabilité et la concentration cellulaire (tests d'exclusion au bleu trypan) ainsi que des dosages d'anticorps (tests ELISA) ont été effectués. A partir de ces résultats, nous avons calculé les aires sous les courbes donnant les concentrations cellulaires en fonction du temps, et à partir des productions en anticorps des cultures, nous en avons déduit les productivités des cellules en anticorps (cf. chapitre Matériel et méthodes). Les résultats sont présentés dans les figures 3.7, 3.8 et 3.9.



*Figure 3.7 : Intégrales de cellules vivantes après adaptation. Les mesures correspondent à des intégrales estimées à l'aide de la méthode des trapèzes (cf. Matériel et méthodes) appliquée à des courbes de croissance réalisées avant et après adaptations pour la souche A49. Chaque valeur correspond à la moyenne de trois déterminations.*



*Figure 3.8 : Production d'IgM avant et après adaptation des cellules. La production est déterminée par des dosages ELISA, réalisés en fin de culture pour la souche A49, avant et après adaptations. Les valeurs correspondent à une moyenne de 5 déterminations réalisées sur trois courbes de croissance différentes.*



*Figure 3.9 : Productivité en anticorps avant et après adaptation de la souche A49. Les productivités sont déterminées par le rapport des productions d'anticorps aux intégrales de cellules vivantes pour des cultures réalisées avant et après adaptation. Les valeurs correspondent à une moyenne de 5 déterminations.*

Les résultats des figures 3.7, 3.8 et 3.9 nous donnent la comparaison des intégrales de cellules vivantes de l'hybridome A49. Ces intégrales correspondent à des courbes de croissance réalisées après adaptation pour 8 expériences différentes. On peut constater que, de manière générale, les intégrales de cellules vivantes sont supérieures dans les cultures réalisées dans des milieux complets

comme le BM-SVF 10% SVF ou le BM-IBF, par rapport à celles effectuées dans des milieux sans sérum BM-HSA ou BM0. Ces résultats laissent penser qu'un milieu supplémenté en SVF est préférable à un milieu sans sérum (exception faite du milieu BM-IBF), si l'on veut obtenir le maximum de concentration cellulaire.

L'adaptation d'une lignée cellulaire à un milieu sans sérum va diminuer la quantité de cellules pouvant être obtenue lors d'une culture.

La figure 3.8 donne les résultats comparés des productions d'anticorps avant et après adaptation pour l'hybridome A49. Les cellules cultivées dans du milieu RPMI U SVF et adaptées à d'autres milieux, produisent davantage d'anticorps après ( $>0,062$  g/l) qu'avant adaptation ( $<0,042$  g/l). Seule l'adaptation RPMI U SVF  $\rightarrow$  BM-10%SVF semble échapper à la règle avec une diminution de la production d'anticorps.

Dans le cas des adaptations vers des milieux sans sérum en gardant le même milieu de base, des niveaux de production élevés sont conservés ( $\approx 0,07$  g/l). Les adaptations inverses (milieu sans sérum vers milieu supplémenté en sérum ou substituts) voient le taux de production en IgM augmenter.

La production d'anticorps est reliée à la croissance cellulaire (plus il y a de cellules dans un milieu et plus la culture devrait contenir d'anticorps). Nous avons calculé les productivités des cellules vivantes, avant et après adaptation. Les résultats représentés sur la figure 3.9 montrent que, dans tous les cas d'adaptations d'un milieu avec sérum vers un milieu sans sérum, il y a augmentation de la productivité. En particulier, pour l'adaptation de RPMI U SVF vers BM0 la productivité passe d'environ 0,04 à un peu moins de 0,07  $\mu\text{g d'IgM} \times 10^5 \text{cellules}^{-1} \times \text{heure}^{-1}$  (environ 100 molécules par seconde pour une cellule). En ce qui concerne les adaptations de type changement de milieu de base, il y a une légère diminution de la productivité.

#### III.A.4. Discussion

Tout d'abord, il paraît possible de réaliser des adaptations beaucoup plus rapides, en quelques étapes ou même directement, au lieu de procéder à un grand nombre d'étapes avec de très faibles variations dans les pourcentages des milieux. Notons que ceci semble difficile si le milieu de départ et le milieu d'arrivée ne sont pas constitués du même milieu de base, comme par exemple l'adaptation du milieu RPMI U SVF vers le milieu BM0.

On peut envisager qu'une lignée cellulaire puisse adapter rapidement son métabolisme à un mélange différent d'éléments nutritifs, mais qu'elle nécessite davantage de temps pour s'adapter à la fois à un changement de milieu et à une privation de sérum.

Pour envisager ces changements, il faut tenir compte de nombreux paramètres comme par exemple :

- Les différences de composition du milieu, dans lequel on veut adapter les cellules, avec celles du milieu d'origine,
- L'absence ou non de protéines,
- Le temps dont on dispose pour réaliser l'adaptation,
- Le maintien constant de la quantité et de la qualité des molécules produites (comme les immunoglobulines pour les hybridomes).

Il paraît évident que si les teneurs en acides aminés, en sels et autres éléments constitutifs des milieux, sont changées de façon importante, les cellules peuvent avoir un certain mal à rétablir rapidement leur physiologie à ce nouveau milieu de culture. La cellule doit dans ce cas, utiliser d'autres mécanismes biochimiques de biosynthèse des molécules essentielles à son bon fonctionnement, soit en synthétisant ses biomolécules vitales par des voies métaboliques différentes déjà existantes, soit en utilisant ses propriétés de régulation pour compenser le manque de certains nutriments et les synthétiser *de novo* (92).

Dans les milieux sans sérum mis au point jusqu'à ce jour, quelques additifs sont rajoutés au milieu de base. Ces suppléments peuvent rendre plus facile, donc

plus rapide, l'adaptation des cellules à ces milieux. Par exemple le milieu BM0, utilisé ici, est un mélange de deux milieux de base (cf. chapitre Matériel et méthodes) et comporte 3 additifs :

- Le 2-mercaptoéthanol (50  $\mu\text{M}$ ) joue un rôle protecteur contre les peroxydes et en plus facilite la transition de la phase G1 à la phase S dans le cycle cellulaire (51),
- L'éthanolamine (50  $\mu\text{M}$ ) qui peut avoir une activité type "insuline-like" (11),
- Le pluronic F-68 (0,01% p/v ou  $1,2 \cdot 10^{-6}$  M), un copolymère de polypropylène glycol et de polyéthylène glycol, possède les propriétés d'un surfactif non-ionique. Il stimule la croissance cellulaire et la sécrétion des anticorps monoclonaux (139,148), et protège également les cellules contre les effets mécaniques, comme l'éclatement des bulles de gaz (66).

Dans un milieu sans sérum, les cellules sont plus sensibles aux contraintes mécaniques (bulles, forces de cisaillement) qu'elles peuvent subir dans des biofermenteurs (100).

Les hybridomes peuvent s'adapter à des milieux aussi simples que le milieu BM0 qui est un milieu sans sérum et sans protéines (23,147).

L'addition de protéines facilite l'adaptation des cellules à un milieu sans sérum. Ainsi dans le cas du milieu BM-HSA, les protéines vont protéger les cellules du stress mécanique. Par ailleurs, la sérum albumine humaine va agir en "détoxifiant" le milieu, (78) et en maintenant la pression oncotique ainsi que d'autres paramètres physico-chimiques du milieu. D'autres protéines d'origine humaine comme l'insuline (facteur de croissance) et la transferrine (transport du fer) peuvent être utilisées. Nous avons constaté que pour les trois hybridomes considérés, les temps de doublement des cellules sont identiques quand les cellules sont adaptées du milieu RPMI U SVF vers le milieu BM-HSA, les hybridomes possèdent des temps de doublement différents les uns des autres. Ceci montre que parmi les "additifs IBF" certains améliorent réellement les propriétés du milieu de base.

L'adaptation à un milieu sans sérum peut également être influencée par des paramètres de rentabilité. Un industriel par exemple, qui voudrait réaliser de telles adaptations va avoir des impératifs de temps. Il est évident qu'au lieu d'essayer d'adapter des hybridomes par la méthode décrite par Chandler qui peut prendre plusieurs mois, il sera plutôt tenté d'adapter le plus rapidement possible la souche et ceci au détriment d'un éventuel milieu sans sérum.

D'autre part, la nature de la lignée cellulaire et sa fonction vont également rentrer en ligne de compte. Si l'intérêt est porté par exemple, sur la production d'un anticorps bien spécifique ayant un impact potentiel important (par exemple en thérapeutique), on pourra alors envisager de favoriser davantage le facteur "qualitatif" par rapport au facteur "quantitatif".

Nous avons comparé le résultat des différentes adaptations des cellules A49 en observant la production et la productivité en immunoglobulines avant et après adaptation. Si on s'intéresse à la production globale en anticorps d'une souche, le résultat des productions des cultures sera le critère principal dans le choix d'une stratégie d'adaptation plutôt qu'une autre. Au vu de nos résultats, il apparaît qu'une culture en milieu BM-SVF est aussi avantageuse qu'en milieu BM0. Cependant, si l'on considère la production des cellules prises individuellement, ce sont les résultats des productivités qui vont guider le choix d'adaptation. Dans notre cas, après adaptation dans le milieu BM0, l'hybridome A49 voit sa productivité augmenter d'environ 25%. C'est-à-dire qu'un hybridome pris séparément produit théoriquement 25% de plus de molécules d'IgM. D'autres auteurs ont déjà montré qu'il est possible d'adapter des hybridomes à des milieux sans sérum sans avoir une perte de la production d'anticorps (126) bien que celle-ci puisse avoir lieu dans certains cas (117,118). Quoiqu'il en soit, les cellules adaptées dans de tels milieux produisent bien souvent davantage d'immunoglobulines (21).

Un autre problème d'ordre beaucoup plus théorique, peut également être posé dès maintenant. En effet, les calculs de productivité que nous avons effectués précédemment prennent uniquement en compte les cellules vivantes. Or on peut se demander si ce sont uniquement ces cellules vivantes (déterminées par le test

d'exclusion au bleu trypan) qui sont les cellules productrices. C'est-à-dire quelle est la population cellulaire qui produit effectivement les anticorps ?

Après adaptation, on peut aussi penser que les anticorps produits puissent être de qualité différente. C'est-à-dire que leur structure chimique soit modifiée (sites antigéniques différents ou glycosylation et/ou glycation des protéines). Si une étude exhaustive n'est pas envisageable, cette question a déjà été posée et on a montré que la structure des immunoglobulines produites dans des milieux sans sérum peut différer de celle du clone original (138) avec des modifications de la chaîne légère (104), sans que pour autant le site antigénique soit modifié.

Enfin, des résultats précédents obtenus au laboratoire ont déjà montré que les cellules A49 présentent, au cours d'une culture en milieu sans sérum, l'apparition d'une sous-population cellulaire qui avait été appelée "hypochromosomique" (car elle présente des cycles cellulaires montrant une perte d'ADN). Le moment d'apparition de cette sous-population semblerait lié à la composition du milieu, à la nature des cellules mais aussi à la durée de la culture cellulaire (92,168). Cette population correspond en fait à des cellules qui seraient en état d'apoptose ou mort cellulaire programmée et qui peut être induite par une privation en sérum dans les cultures. Nous traiterons de ce problème dans un prochain chapitre.

### III.B. Systèmes de culture

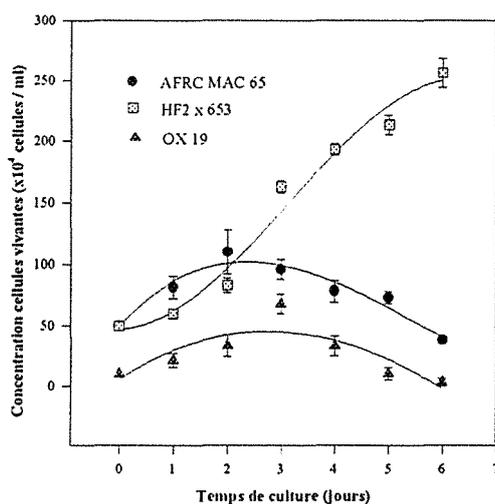
Trois types de systèmes : boîtes, flacons à agitation et tubes à dialyse ont été utilisés ainsi que trois types d'hybridomes différents (cf. chapitre Matériel et méthodes) :

- un hybridome de rat : AFR MAC 65,
- un hétérohybridome homme-souris : HF2 x 653,
- un hybridome de souris : OX 19.

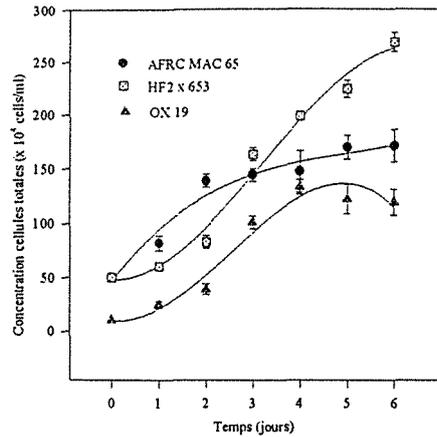
Le système de tubes à dialyse sera le thème d'une étude plus détaillée avec en plus des trois hybridomes cités auparavant, 3 autres lignées cellulaires.

#### III.B.1. Culture en boîtes

##### *III.B.1.a) Concentrations cellulaires*

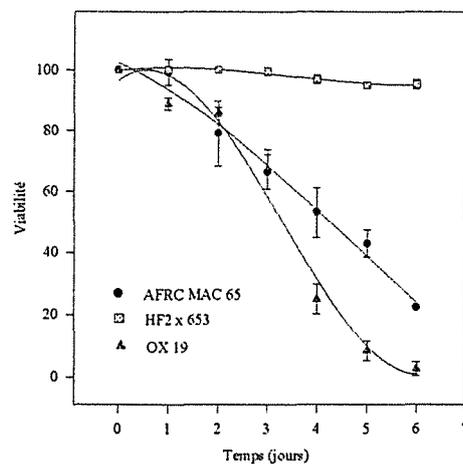


*Figure 3.10 : Evolution de la concentration en cellules vivantes, au cours de cultures en boîtes, d'hybridomes AFR MAC 65, HF2 x 653 et OX 19. La détermination des cellules vivantes a été réalisée à l'aide du test d'exclusion au bleu trypan. Les résultats correspondent à la moyenne de 9 expériences.*



*Figure 3.11 : Evolution de la concentration en cellules totales, au cours de cultures en boîtes, d'hybridomes AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19. La détermination des cellules a été réalisée à l'aide du test d'exclusion au bleu trypan. Les résultats correspondent à la moyenne de 9 expériences.*

### III.B.1.b) Viabilités



*Figure 3.12 : Evolution des pourcentages de viabilité, au cours de cultures en boîtes, d'hybridomes AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19. La détermination de la viabilité a été réalisée à l'aide du test d'exclusion au bleu trypan. Les résultats correspondent à la moyenne de 9 expériences.*

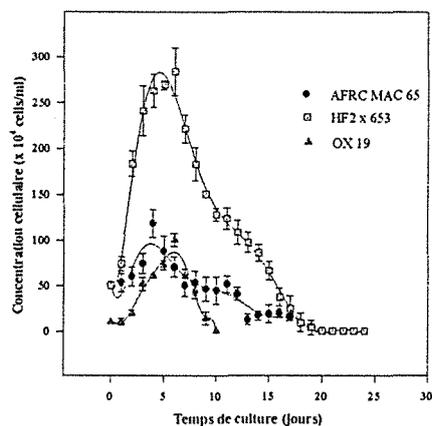
Les résultats des cultures effectuées, sont présentés sur les figures 3.10, 3.11 et 3.12. En ce qui concerne les concentrations en cellules totales, les souches

AFRC MAC 65 et OX 19 présentent une phase de croissance avec un maximum atteint le jour 2 ( $110 \cdot 10^4$  cellules/ml) et 3 ( $60 \cdot 10^4$  cellules/ml) respectivement et une phase de dégénérescence cellulaire. En fin de croissance, la concentration maximale en cellules totales est d'environ  $100-150 \cdot 10^4$  cellules/ml (figure 3.11). Les viabilités cellulaires chutent rapidement pour atteindre 50% entre les jours 3 et 4 de culture. Par contre, les cellules HF2 x 653 présentent une croissance beaucoup plus longue et plus lente (au bout du 7ème jour de culture, elles semblent tout juste avoir atteint le maximum de croissance ( $250 \cdot 10^4$  cellules/ml) avec une viabilité pratiquement égale à 100%).

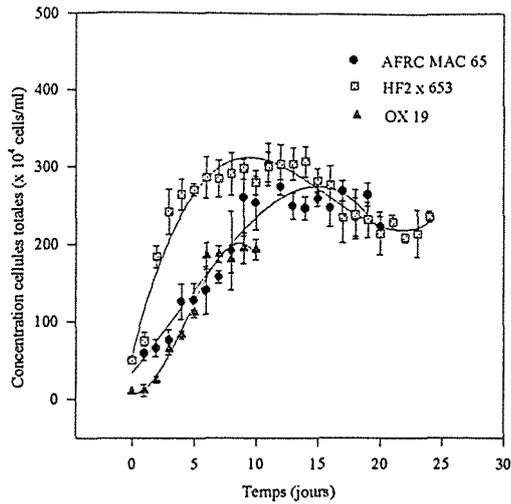
### III.B.2. Culture en flacons à agitation

Les cultures sont réalisées dans des flacons à agitation de 250 ml contenant 100 ml de milieu (TECHNE, Cambridge, UK). Ces flacons utilisent une agitation à boule (vitesse de rotation 10 rpm).

#### III.B.2.a) Concentrations cellulaires

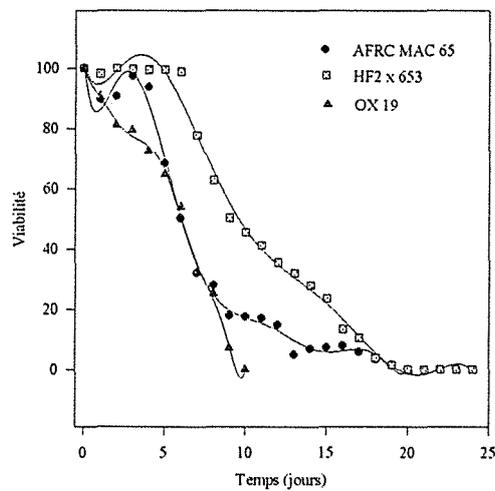


*Figure 3.13 : Evolution de la concentration en cellules vivantes, au cours de cultures en flacons à agitation, d'hybridomes AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19. La détermination des cellules vivantes a été réalisée à l'aide du test d'exclusion au bleu trypan. Les résultats correspondent à la moyenne de 5 expériences.*



*Figure 3.14 : Evolution de la concentration en cellules totales, au cours de cultures en flacons à agitation, d'hybridomes AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19. La détermination des cellules totales a été réalisée à l'aide du test d'exclusion au bleu trypan. Les résultats correspondent à la moyenne de 5 expériences.*

### III.B.2.b) Viabilités



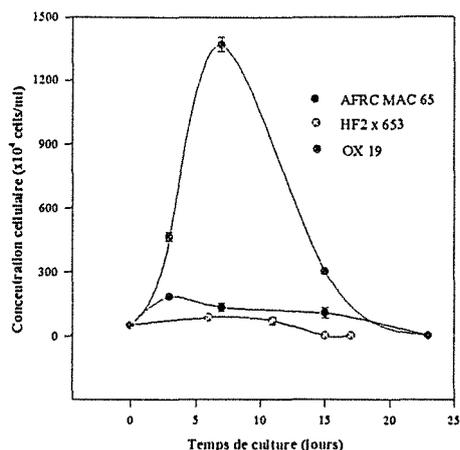
*Figure 3.15 : Evolution des pourcentages de viabilité, au cours de cultures en flacons à agitation, d'hybridomes AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19. La détermination de la viabilité a été réalisée à l'aide du test d'exclusion au bleu trypan. Les résultats correspondent à la moyenne de 5 expériences.*

Les figures 3.13, 3.14 et 3.15 donnent les concentrations en cellules vivantes (test d'exclusion au bleu trypan), et en cellules totales obtenues pour les cultures en flacons à agitation. Les 3 lignées présentent une courbe de croissance classique avec une concentration maximale en cellules vivantes entre le 4<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour pour les trois lignées cellulaires d'environ  $1.10^6$  cellules/ml pour AFRC MAC 65 et OX 19 et  $2,75.10^6$  cellules/ml pour HF2 x 653. Les concentrations maximum en cellules totales varient entre  $2.10^6$  pour les cellules OX 19 et  $3.10^6$  pour les cellules HF2 x 653. La viabilité diminue assez rapidement pour les 3 souches cellulaires pour atteindre 50% aux alentours du 6<sup>ème</sup> jour pour les cellules OX 19 et AFRC MAC 65 et aux alentours du 10<sup>ème</sup> jour pour les cellules HF2 x 653.

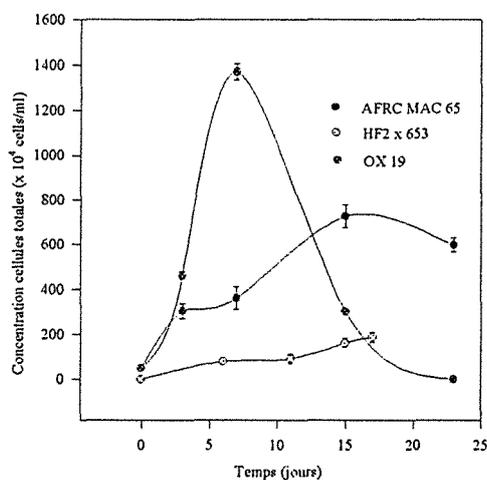
### III.B.3. Culture en tubes à dialyse

Les cultures décrites ici sont réalisées dans un tube à dialyse de 10 ml immergé dans 200 ml de milieu (cf. chapitre Matériel et méthodes). Une étude plus détaillée de ce système sera exposée dans le chapitre suivant. Nous comparerons ici les résultats obtenus avec ce système de culture, à ceux obtenus en utilisant des boîtes de culture statiques et les spinners.

### III.B.3.a) Concentrations cellulaires

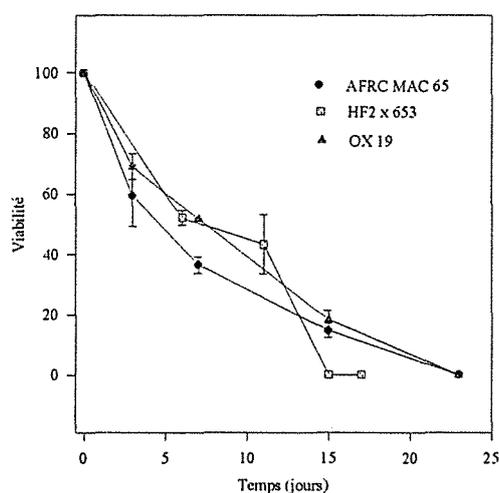


*Figure 3.16 : Evolution de la concentration en cellules vivantes, au cours de cultures en tubes à dialyse, d'hybridomes AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19. La détermination des cellules vivantes a été réalisée à l'aide du test d'exclusion au bleu trypan. Les résultats correspondent à la moyenne de 4 expériences.*



*Figure 3.17 : Evolution de la concentration en cellules totales, au cours de cultures en tubes à dialyse, d'hybridomes AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19. La détermination des cellules vivantes a été réalisée à l'aide du test d'exclusion au bleu trypan. Les résultats correspondent à la moyenne de 4 expériences.*

### III.B.3.b) Viabilités

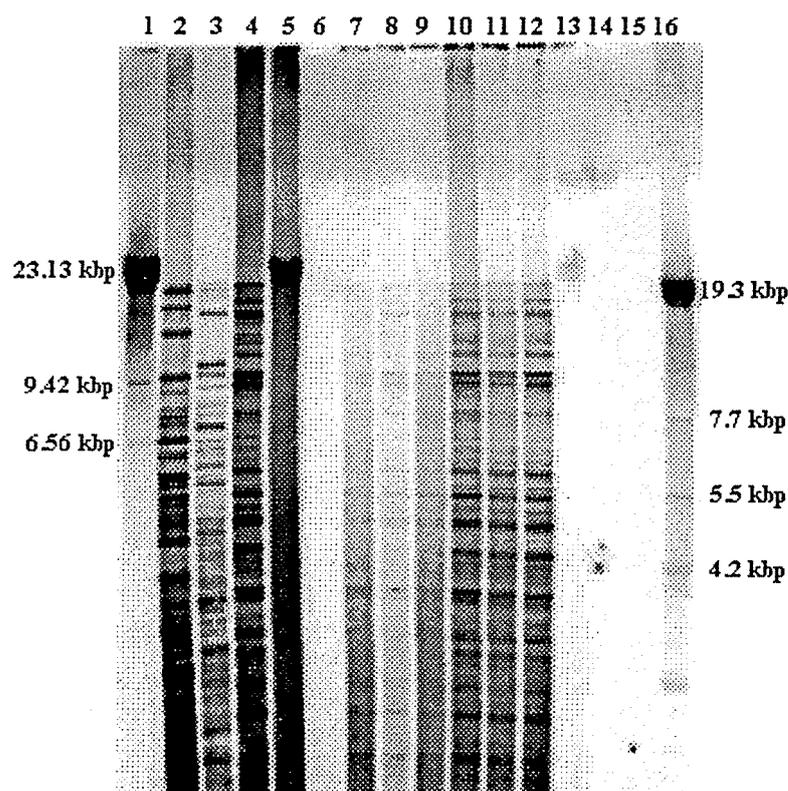


*Figure 3.18 : Evolution des pourcentages de viabilité, au cours de cultures en tubes à dialyse, d'hybridomes AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19. La détermination de la viabilité a été réalisée à l'aide du test d'exclusion au bleu trypan. Les résultats correspondent à la moyenne de 4 expériences.*

Les résultats présentés sur les figures 3.16, 3.17 et 3.18 donnent les résultats obtenus pour les cultures en tubes à dialyse. Pour les cellules HF2 x 653 et AFRC MAC 65, on observe une croissance cellulaire réduite avec une concentration maximale en cellules vivantes aux alentours de  $2.10^6$  cellules/ml alors que pour les cellules OX 19, elle est de environ  $1,3.10^7$  cellules/ml. La concentration en cellules totales est également la plus élevée pour les cellules OX 19 aux alentours de  $1,4.10^7$  cellules/ml, par contre pour les cellules HF2 x 653 et AFRC MAC 65, elle est respectivement de  $2.10^6$  et  $6.10^6$  cellules/ml. La viabilité décroît rapidement pour les 3 souches cellulaires. Elle atteint 50% de viabilité aux alentours du 6ème jour de culture.

### III.B.4. Empreinte digitale de l'ADN

La stabilité génétique des différentes souches a été analysée en réalisant une "empreinte digitale" de l'ADN. Cette technique donne des renseignements concernant les changements éventuels du matériel génétique, au cours de cultures de l'hybridome AFRC MAC 65 dans les trois systèmes de culture (boîtes, flacons à agitation et tubes à dialyse).



*Figure 3.19 : Empreinte digitale de l'ADN réalisée suivant le protocole décrit dans le chapitre Matériel et méthodes. Les pistes 1 et 16 correspondent aux marqueurs de taille II et IV (cf. chapitre Matériel et méthodes). Les pistes 2 et 3 correspondent respectivement à l'ADN provenant des lignées HeLa et K562. Les pistes 4,7,8,9,10,11 et 12 correspondent à l'ADN provenant de cultures de l'hybridome AFRC MAC 65 en flacons à agitation (Jour 3 - piste 4) ; en boîte (Jours 1,3 et 6 - pistes 7,8 et 9) et en tubes à dialyse (Jours 3,7 et 15 - pistes 10,11 et 12).*

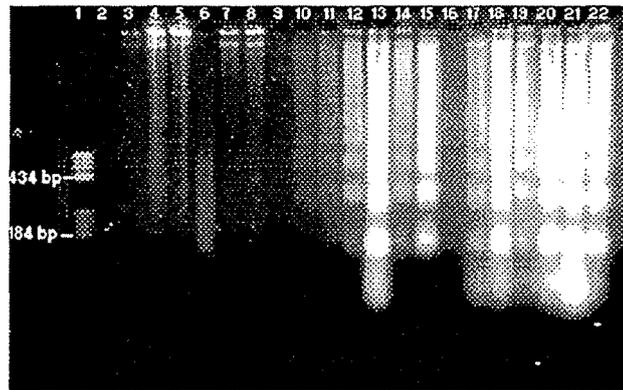
Les résultats donnés par la figure 3.19 montrent que quel que soit le système de culture utilisé, l'empreinte de l'ADN de l'hybridome AFRC MAC 65 reste identique. Cela signifie que l'ADN reste stable et qu'il n'y a pas de remaniement du

matériel génétique (pas de recombinaisons de grande amplitude ni de pertes de gènes). Nous avons utilisé ce type d'analyse car c'est la méthode de choix pour caractériser la qualité de l'ADN d'une lignée cellulaire (159,160).

### III.B.5. Analyse de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Un chapitre sera consacré ultérieurement à l'apoptose, au cours duquel nous montrerons que les ADN de certaines cellules sont hydrolysés par des endonucléases qui catalysent la libération de fragments d'ADN dont les tailles sont des multiples de 180 bp. Cette fragmentation est le reflet de phénomènes d'apoptose qui vont conduire à la mort des cellules et à l'arrêt des cultures. Nous donnerons ici les analyses des ADN des cellules cultivées dans les différents systèmes de culture et nous envisagerons simplement la présence et l'importance de cette fragmentation.

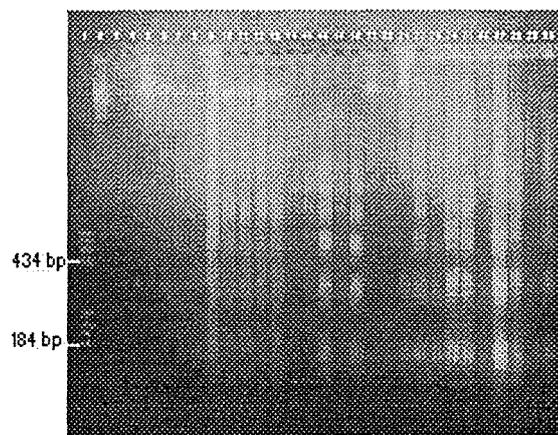
#### *III.B.5.a) Culture en boîtes*



*Figure 3.20 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 2% de l'ADN de cellules cultivées en boîtes pour les hybridomes AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19. L'ADN extrait des cellules (cf. chapitre Matériel et méthodes) correspondant à une culture en boîtes de 75 cm<sup>2</sup>, est analysé sous une tension de 80 V pendant 1h30. La piste 1 correspond au marqueur de taille pBR 322 digéré par Hae III. L'ensemble de pistes 3-8, 10-15 et 17-22 correspondent respectivement aux ADN extraits de cultures de HF2 x 653, OX 19 et AFRC MAC 65 (jours 1 à 6 de culture).*

La figure 3.20 donne les résultats obtenus pour l'analyse de l'ADN au cours de cultures en boîtes pour les trois hybridomes AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19 pendant 6 jours. On observe une fragmentation importante pour les hybridomes AFRC MAC 65 et OX 19 tout au long de la culture. Par contre, les cellules HF2 x 653 ne présentent pas ce type de fragmentation de l'ADN au cours de leurs cultures. On doit cependant remarquer l'existence d'un fragment de haut poids moléculaire qui est présent dans les cultures des trois lignées mais qui est moins important dans les cultures de cellules OX 19 (la nature de cette bande sera discutée dans le chapitre Apoptose).

### *III.B.5.b) Culture en flacons à agitation*

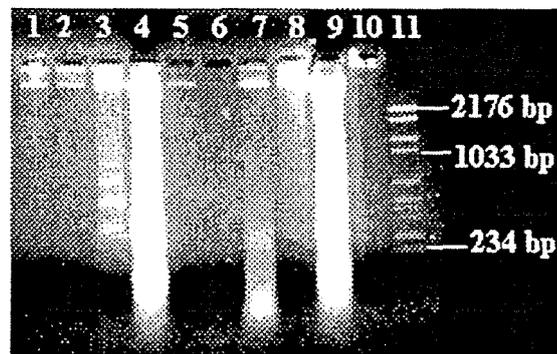


*Figure 3.21 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 2% de l'ADN de cellules cultivées en flacons à agitation, pour les hybridomes AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19. L'ADN extrait des cellules (cf. chapitre Matériel et méthodes) correspondant à une culture en flacons à agitation de 250 ml est séparé sous une tension de 80 V pendant 2 h. La piste 1 correspond au marqueur de taille pBR 322 digéré par Hae I. L'ensemble de pistes 5-16, 14-18 et 19-30 correspondent respectivement aux ADN extraits de cultures de HF2 x 653 (jours 2,4,6,8-16), OX 19 (jours 2-5,7) et AFRC MAC 65 (jours 1-12).*

Les résultats correspondant aux extractions d'ADN des cultures des 3 hybridomes cultivés dans des flacons à agitation sont présentés sur la figure 3.21.

On observe une fragmentation importante pour les cultures des cellules OX 19 et AFRC MAC 65, et faible pour les ADN des cellules HF2 x 653. Pour ces dernières, la fragmentation apparaît aux alentours du 8ème jour de culture alors que pour les deux autres hybridomes, elle est visible dès le 3ème jour. La bande de haut poids moléculaire citée précédemment est ici très marquée pour les cellules HF2 x 653 alors qu'elle est complètement absente des analyses d'ADN provenant des cellules OX 19. Dans le cas des cultures de AFRC MAC 65, cette bande disparaît progressivement au cours du déroulement des cultures.

### III.B.5.c) Culture en tubes à dialyse



*Figure 3.22 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 2% de l'ADN de cellules cultivées en tubes à dialyse pour les hybridomes AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19. L'ADN extrait des cellules (cf. chapitre Matériel et méthodes) correspondant à une culture en tubes à dialyse de 10 ml est séparé sous une tension de 80 V pendant 2 h. La piste 11 correspond au marqueur de taille pBR 328 digéré par Bgl I et Hinf I. L'ensemble de pistes (1,4-5) ; (3,9) et (2,6-8) correspondent respectivement aux ADN extraits de cultures de HF2 x 653 (jours 2,7,6), OX 19 (jours 7,15) et AFRC MAC 65 (jours 3,7,12,15).*

Pour les cultures en tubes à dialyse, il a été plus difficile d'obtenir un grand nombre d'échantillons, du fait du faible nombre de systèmes pouvant être mis en culture simultanément. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 3.22. Le fragment de haut poids moléculaire est présent dans toutes les extractions. La fragmentation de l'ADN en fragments multiples de 200 pb apparaît sur les

échantillons provenant des cultures de HF2 x 653 et de OX 19 alors qu'elle n'est pas visible dans les cellules AFRC MAC 65.

On peut conclure que la fragmentation de l'ADN observée dans les différentes souches d'hybridomes n'est pas influencée de manière importante par le système de culture utilisé pour les cellules HF2 x 653 et OX 19.

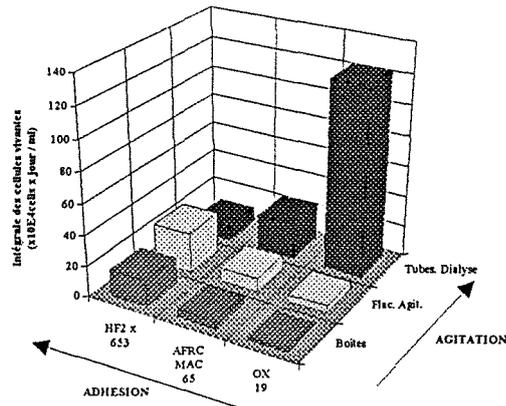
### III.B.6. Discussion

Les analyses faites par "fingerprint" des ADN ne nous ont pas montré de variation entre les différents systèmes de culture pour les différents types cellulaires. Il n'en est pas de même des analyses de fragmentation de l'ADN. Ce phénomène, qui est dû à l'action d'endonucléases présentes dans la cellule, a été décrit par de nombreux auteurs (2046, 3867, 121). Il est lié au phénomène de mort cellulaire programmée que nous étudierons dans un chapitre suivant. Pour les cellules OX 19 et AFRC MAC 65, ce phénomène est très marqué et débute très tôt au cours des cultures réalisées en boîte ou en flacons à agitation. Par contre, les cellules HF2 x 653 ne présentent une fragmentation que tardivement au cours des mêmes cultures. Dans les systèmes à dialyse et malgré le peu d'échantillons mesurés, nous constatons que ce phénomène se déroule d'une façon similaire.

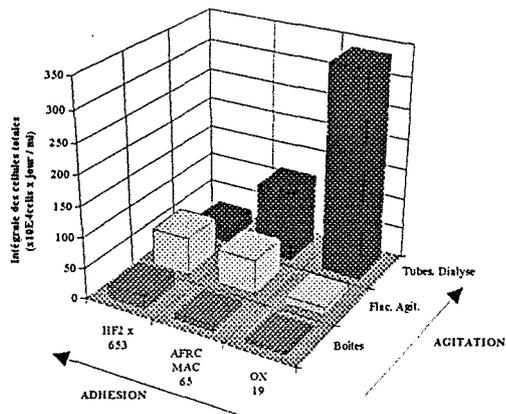
Cette étude met à jour un certain nombre de problèmes rencontrés lors de l'optimisation du couple (système de culture / lignée cellulaire). Que ce soit dans le but d'obtenir des concentrations cellulaires élevées ou de produire la quantité maximale d'anticorps, il faut que la stabilité génétique des cellules soit maintenue tout au long des cultures.

Sur les figures 3.23 et 3.24, nous avons comparé les croissances cellulaires dans les 3 systèmes étudiés et pour les 3 hybridomes. Pour cela, nous avons utilisé les intégrales des cellules vivantes et des cellules totales. Ces paramètres nous renseignent sur la quantité totale de cellules obtenue tout le long de la culture. Ils

donnent un renseignement beaucoup plus précis de la façon dont les cellules se comportent dans les différents systèmes.



*Figure 3.23 : Comparaison des intégrales des cellules vivantes pour les hybridomes AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19 cultivés dans trois systèmes de culture. Les hybridomes ont été classés suivant leur aptitude, plus ou moins grande, à adhérer sur les supports. Les systèmes de culture ont été classés suivant l'agitation plus ou moins grande qu'il font subir aux cellules.*



*Figure 3.24 : Comparaison des intégrales des cellules totales pour les hybridomes AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19 cultivés dans trois systèmes de culture. Les hybridomes ont été classés suivant leur aptitude, plus ou moins grande, à adhérer sur les supports. Les systèmes de culture ont été classés suivant l'agitation plus ou moins grande qu'il font subir aux cellules.*

D'autre part, nous avons tenu compte du caractère adhérent d'une lignée cellulaire. Ce caractère adhérent des cellules est le plus marqué pour les cellules

HF2 x 653 ; les cellules AFRC MAC 65 adhèrent un peu moins alors que les cellules OX 19 ont complètement perdu leur propriété d'adhésion et se développent en suspension.

Nous avons cultivé trois hybridomes dans trois systèmes de culture différents. Les lignées cellulaires étudiées ont été délibérément choisies d'origine différente : hybridome souris-souris OX 19, hétérohybridome homme-souris HF2 x 653, hybridome rat-rat (AFRC MAC 65). Nous avons classé les trois systèmes de culture en fonction de l'agitation relative des cellules. L'agitation du milieu cellulaire va en augmentant progressivement en allant de la culture statique en boîtes (où il n'y a pas d'agitation) en passant par la culture en "spinners" (dans lesquels les suspensions cellulaires subissent une agitation moyenne) pour terminer avec les tubes à dialyse (où la vitesse de rotation du système est légèrement supérieure).

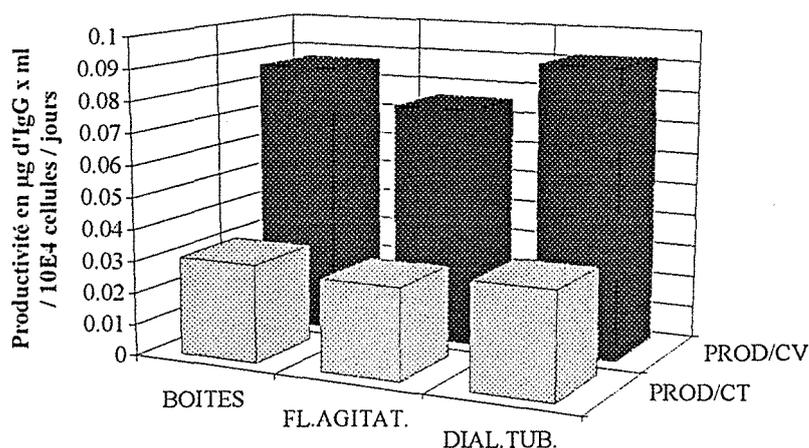
D'après nos résultats, il semble qu'il existe une influence entre le caractère "adhérent" de la lignée cellulaire et les systèmes de culture. En effet pour les boîtes et les flacons à agitation, plus les cellules sont adhérentes et plus l'intégrale des cellules vivantes (ou totales) est élevée avec un maximum pour les cellules HF2 x 653 en "spinners" (environ  $20 \cdot 10^6$  cellules vivantes x jour / ml et plus de  $50 \cdot 10^6$  cellules totales x jour / ml ). Par contre, pour les tubes à dialyse, cet ordre est inversé avec une intégrale de cellules la plus importante pour les cellules en suspension OX 19 (environ  $120 \cdot 10^6$  cellules vivantes x jour / ml et  $320 \cdot 10^6$  cellules totales x jour / ml ). Si on prend en compte le paramètre "agitation", plus les cellules sont agitées et plus elles vont croître. Nous devons remarquer que, pour pouvoir comparer des résultats, nous avons dû utiliser, pour des cultures en "spinner", une vitesse de rotation très lente 10 rpm. En effet, des résultats préliminaires effectués à l'ECACC ont montré que les cellules OX 19 cultivées en spinner sont extrêmement sensibles à la vitesse de rotation.

*Tableau IV : Production d'IgG des cellules OX 19 cultivées dans le milieu RPMI 10% SVF dans différents systèmes de culture.*

| Systèmes            | [IgG] en µg/ml | Jours de culture |
|---------------------|----------------|------------------|
| Tubes à dialyse.    | 1125±150       | 25               |
| Flacons à agitation | 33±2           | 10               |
| Boîtes              | 15±1,5         | 6                |

*Les IgG ont été dosées en utilisant la méthode ELISA décrite dans le chapitre Matériel et méthodes. Chaque valeur correspond à la moyenne de 4 déterminations.*

Les anticorps ont été dosés pour les cellules OX 19 par la méthode ELISA (cf. chapitre Matériel et méthodes). A partir de ces résultats, nous avons pu calculer la productivité des cellules en fonction des cellules vivantes ou mortes (cf. chapitre Matériel et méthodes). L'ensemble de ces résultats est présenté dans le tableau IV et sur la figure 3.25.



*Figure 3.25 : Productivité des cellules OX 19 cultivées dans le milieu RPMI 10% SVF dans trois systèmes de culture (boîtes, flacons à agitation et tubes à dialyse). Le calcul de la productivité est fait suivant l'intégrale des cellules vivantes (PROD/CV) ou totales (PROD/CT) (cf. chapitre Matériel et méthodes).*

Dans les tubes à dialyse, cet hybridome produit environ 100 fois plus d'anticorps en fin de culture qu'avec les deux autres systèmes. Cependant la productivité des cellules, que ce soit par rapport aux cellules vivantes ou aux cellules mortes, reste sensiblement la même dans les trois systèmes. Les productivités peuvent être calculées en fonction des cellules vivantes ou des cellules totales. Cela pose en fait le problème de savoir si ce sont uniquement les cellules vivantes qui sont productrices d'anticorps ou alors si des cellules qui sont en train de mourir ou qui sont mortes (estimées par le test d'exclusion au bleu trypan) peuvent également libérer des anticorps qui vont s'ajouter à ceux produits par les cellules vivantes.

### III.B.7. Etude complémentaire de systèmes de culture à base de tubes à dialyse

#### *III.B.7.a) Présentation du système*

L'interdiction probable de l'utilisation d'ascites pour la production d'anticorps monoclonaux donne de plus en plus d'importance aux systèmes de production. Le système que nous utiliserons, a été décrit la première fois par Mathiot et al (94) en 1993. (cf. chapitre Matériel et méthodes). L'originalité du système utilisé est de pouvoir concentrer cellules et métabolites de poids moléculaire élevé à l'intérieur du système, grâce aux propriétés de perméabilité des tubes à dialyse. Ceci facilite la purification de biomolécules produites et augmente la concentration cellulaire pouvant être obtenue.

Un certain nombre d'expériences complémentaires ont été réalisées afin de tester les propriétés du système : utilisation de différents tubes à dialyse, utilisation de différentes souches cellulaires ; culture dans un milieu sans sérum ; utilisation d'antiprotéases, "scaling up".

Les études précédentes nous ont montré que la vitesse de croissance des cellules est d'autant plus importante que la taille des pores des tubes à dialyse est plus élevée (39). Toutes les manipulations avaient été réalisées avec des tubes à dialyse calibrés de seuil de coupure 25 kDa (SPECTRUM, Los Angeles, USA). Le prix de ces tubes étant élevé, nous avons effectué quelques essais avec des tubes plus ordinaires et de faible coût. Les résultats obtenus nous ont montré que des tubes Visking (VISKING, Polylabo, France) pouvaient être utilisés sans même effectuer les lavages préconisés par Sjögren et al (153). Leur seuil de coupure est d'environ 10 kDa. Ils sont donc utilisables pour une production d'anticorps monoclonaux (ou autres protéines) de masse supérieure à 20 kDa. Toutes les manipulations qui vont suivre ont été réalisées, sauf exception, avec des tubes à dialyse de seuil de coupure 25 kDa (SPECTRUM, Los Angeles, USA). Des cultures de cellules A49 dans le milieu sans protéines BM0 ont été réalisées

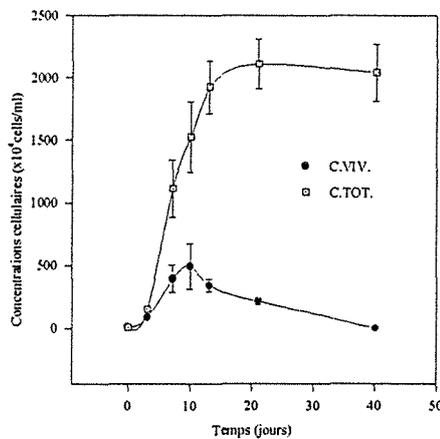
pendant 20 jours. L'absorption lumineuse du milieu intérieur à 280 nm est 9 fois plus élevée que celle du milieu extérieur, ce qui montre que peu de protéines diffusent à travers la membrane.

Le système de cultures a été utilisé pour la culture de différentes souches cellulaires, pour vérifier qu'il n'est pas spécifique de quelques lignées particulières. Dans toutes les expériences qui sont décrites, nous avons utilisé des tubes à dialyse de 10 ml (Système du type I, cf. chapitre Matériel et méthodes) immergés dans 200 ml de milieu. Avec certaines souches cellulaires (12H8 et IM01BIS), une étude plus approfondie a été réalisée en utilisant des antiprotéases dans le milieu de culture.

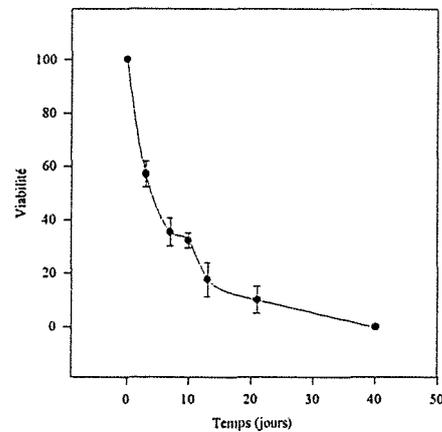
### III.B.7.b) Culture d'hybridomes 12H8 et A49

#### III.B.7.b.1) Culture avec des milieux sans sérum

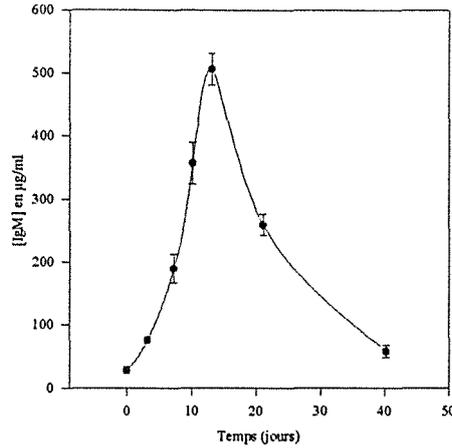
Des hybridomes A49 ont été cultivés en utilisant le milieu sans sérum BM-HSA.



a)



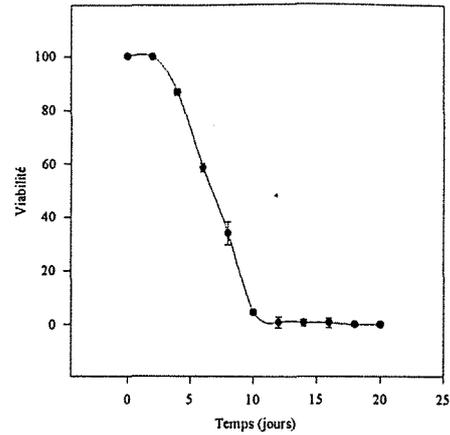
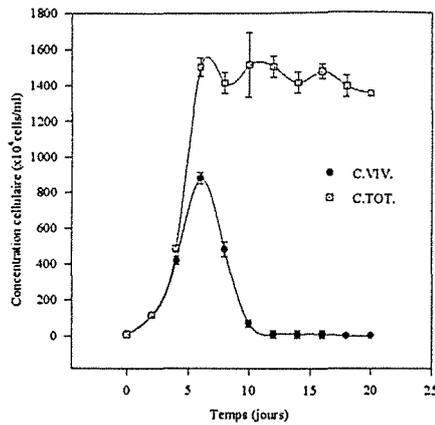
b)



c)

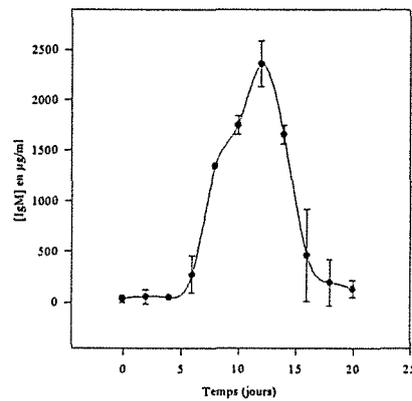
*Figure 3.26 : Croissance de cellules A49 en milieu sans sérum cultivées dans des tubes à dialyse. Le milieu utilisé est BM-HSA (1 g/l). a) Evolution de la concentration cellulaire, b) Evolution de la viabilité, c) Evolution de la concentration en anticorps présents dans le surnageant. Les populations cellulaires ont été déterminées à l'aide du test d'exclusion au bleu trypan. Les IgM ont été dosées par ELISA comme décrit dans le chapitre Matériel et méthodes. Chaque point correspond à la moyenne de 3 valeurs.*

Les résultats obtenus avec des cultures de cellules A49 dans le milieu BM-HSA avec des tubes à dialyse, sont présentés sur la figure 3.26. Les cultures ont été maintenues pendant 40 jours. Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus pour une culture des mêmes cellules en utilisant le milieu RPMI U SVF qui est supplémenté avec le substitut de sérum Ultrosor HY® et du SVF. Les résultats de ces cultures sont donnés dans la figure 3.27.



a)

b)



c)

**Figure 3.27 :** Croissance de cellules A49 en milieu RPMI U SVF cultivées dans des tubes à dialyse. a) Evolution de la concentration cellulaire, b) Evolution de la viabilité, c) Evolution de la concentration en anticorps présents dans le surnageant. Les populations cellulaires ont été déterminées à l'aide du test d'exclusion au bleu trypan. Les IgM ont été dosées par ELISA comme décrit dans le chapitre Matériel et méthodes. Chaque point correspond à la moyenne de 3 valeurs.

Dans ce dernier milieu, la viabilité cellulaire est nulle après 10 jours de culture.

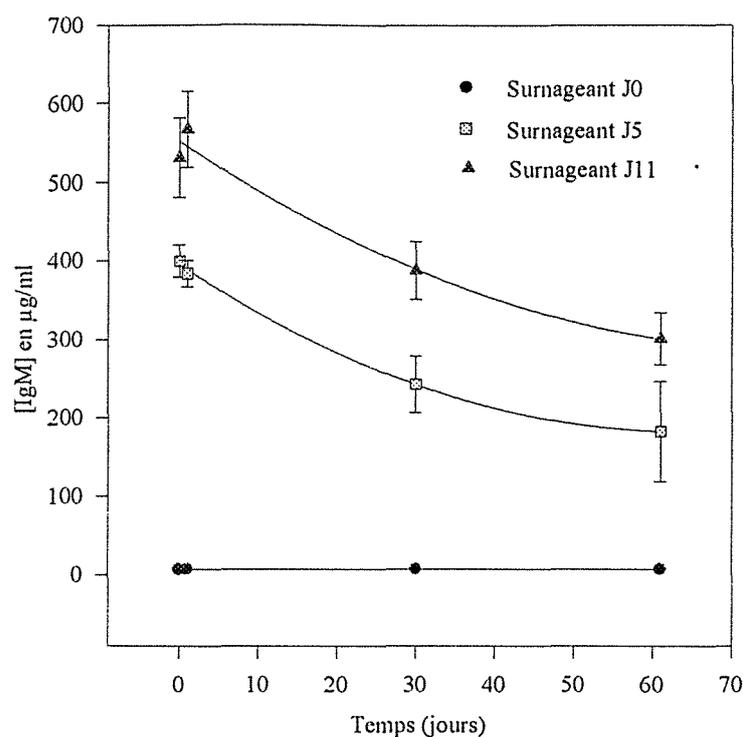
En milieu BM-HSA, la densité cellulaire maximale de cellules vivantes est atteinte au 10ème jour (6 jours en milieu RPMI U SVF). La concentration de cellules totales est légèrement supérieure (environ  $21 \cdot 10^6$  cellules/ml) à celle obtenue en milieu RPMI U SVF (environ  $15 \cdot 10^6$  cellules/ml). Cependant bien que

d'allure similaire, la courbe de production d'IgM dans le milieu sans sérum, présente un maximum d'environ 500 µg/ml, bien inférieur à celui obtenu en milieu RPMI U SVF (environ de 2300 µg/ml). Nous avons décrit ce phénomène précédemment (94) en émettant l'hypothèse de l'action de protéases libérées dans le surnageant par des cellules. L'utilisation d'antiprotéases pourrait empêcher, sinon limiter ce type de dégradation.

### III.B.7.b.2) Utilisation d'antiprotéases

Nous avons utilisé l'aprotinine comme antiprotéase (ce composé présente l'avantage d'être utilisé en thérapeutique). Nous l'avons ajouté dans les surnageants et dans le milieu de culture afin de tester son éventuelle action "protectrice". Des expériences préliminaires réalisées au laboratoire avec différents inhibiteurs de protéases (leupeptine, aprotinine, E64 et cystatine) (157) ont montré que l'aprotinine (inhibiteur des sérine-protéases) utilisée à la concentration de  $6.25.10^{-2}$  u.Ph.Eur./ml protège le mieux les anticorps contre la protéolyse. De plus, elle n'a pas d'effet toxique sur la croissance des cellules A49 et 12H8 cultivées en microplaques de 96 puits ou en boîtes.

Des surnageants prélevés dans une culture de cellules A49 en tubes à dialyse dans du milieu RPMI U SVF ont été maintenus à +4°C dans des conditions stériles (passage sur filtres de 0,22 µm) et les concentrations en anticorps ont été déterminées au cours du temps.

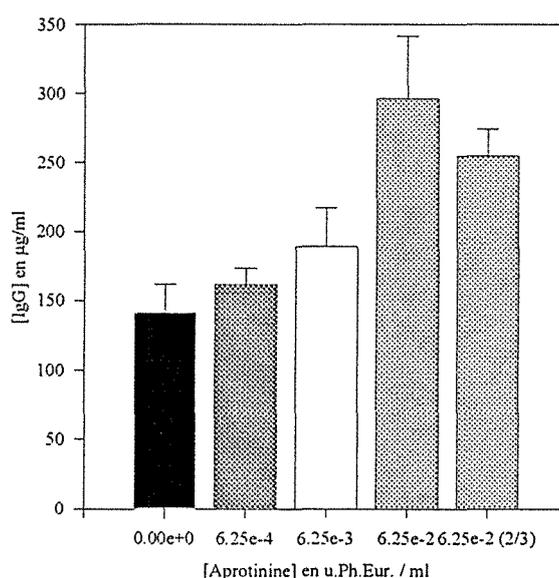


*Figure 3.28 : Dégradation des anticorps par des protéases dans des surnageants provenant de cultures de cellules A49 en tube à dialyse (milieu RPMI U SVF). Les IgM ont été dosées par ELISA comme décrit dans le chapitre Matériel et méthodes. Chaque point correspond à la moyenne de 3 valeurs.*

Les résultats donnés dans la figure 3.28 montrent qu'il y a dégradation des anticorps conservés à +4°C dans des conditions stériles. Ce phénomène peut être dû à l'action de protéases. Cette diminution d'activité déjà décrite pour des cultures en "batch" semble être réduite dans des cultures de type semi-continu (94) ou continu (106). Des expériences complémentaires nous ont montré que l'ajout d'inhibiteurs de protéases (aprotinine) aux surnageants, réduit considérablement la dégradation des anticorps. Nous avons donc ajouté cet inhibiteur de protéases à différentes concentrations dans le milieu de culture avec des cellules 12H8 cultivées dans des tubes à dialyse.

La figure 3.29 résume les résultats obtenus après 25 jours de culture des cellules 12H8 dans le milieu RPMI U SVF. 3 autres cultures dans des systèmes à

tube à dialyse ont été réalisées en ajoutant une dose de  $6,25 \cdot 10^{-2}$  u.Ph.Eur/ml. au 20ème jour de culture. Les surnageants obtenus sont prélevés stérilement et les IgG présentes sont dosées immédiatement. On remarque une augmentation de la concentration d'anticorps dosés dans les surnageants en fonction de la quantité d'aprotinine. Par ailleurs, on constate que l'inhibiteur de protéases protège davantage les anticorps contre la protéolyse s'il est présent dès le début de la culture.

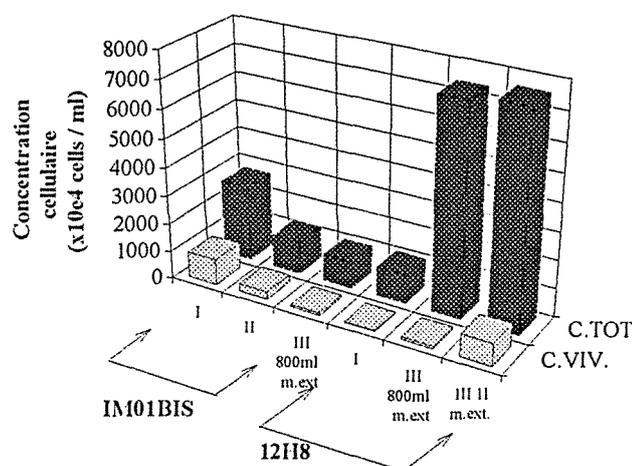


*Figure 3.29 : Action d'antiprotéases, au cours de la production d'IgG par l'hybridome 12H8 cultivé dans des tubes à dialyse du type III avec du milieu RPMI U SVF en présence d'aprotinine (INIPROL®, CHOAY, Paris, France). Chaque histogramme correspond à 3 dosages d'anticorps par la méthode ELISA (cf. chapitre Matériel et méthodes). Un dosage correspond à la concentration d'anticorps mesurée dans le surnageant du milieu intérieur. La quantité d'aprotinine utilisée est mesurée en u.Ph.Eur. (62,5 u.Ph.Eur. correspondent à 1 million d'unités inhibitrices de protéases u.I.P.).*

### **III.B.7.c) Evolution du système de culture à dialyse**

Tous les résultats décrits précédemment ont été obtenus avec le système I. Pour l'obtention de quantités plus importantes d'anticorps, nous avons élaboré

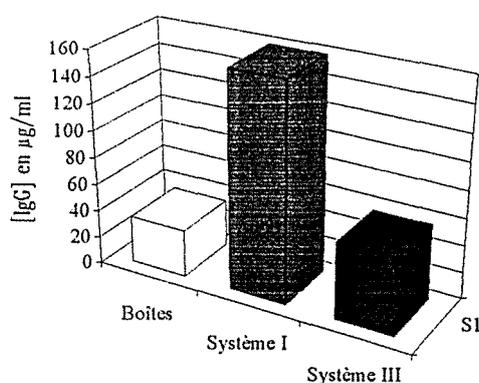
deux modèles de systèmes de tubes à dialyse de taille supérieure (cf. chapitre Matériel et méthodes). Un certain nombre d'expériences ont été réalisées avec ces systèmes. Deux souches cellulaires ont été utilisées : les hybridomes 12H8 et IM01BIS. La figure 3.30 donne les concentrations en cellules totales et vivantes obtenues au cours de ces expériences.



*Figure 3.30 : Concentrations cellulaires obtenues dans des systèmes de culture en tubes à dialyse pour les hybridomes IM01BIS et 12H8. Les systèmes type I, II, III ont été utilisés avec 800 ml ou 1 l de volume de milieu extérieur (cf. chapitre Matériel et méthodes). Le graphique donne, pour chaque système utilisé, les concentrations en cellules totales et vivantes (détermination à l'aide du test d'exclusion au bleu trypan).*

Les concentrations en cellules totales et vivantes pour les cellules IM01BIS diminuent quand la taille des systèmes augmente. Le phénomène inverse est observé pour l'hybridome 12H8. Avec ces dernières, cellules le volume de milieu extérieur a été porté à un litre. On obtient une légère augmentation de la concentration cellulaire.

Dans le cas des cellules 12H8, les anticorps produits ont été dosés. La figure 3.31 donne les résultats obtenus.



*Figure 3.31 : Production d'IgG par l'hybridome 12H8 dans différents systèmes de culture. Les IgG ont été dosées par ELISA comme décrit dans le chapitre Matériel et méthodes. Chaque point correspond à la moyenne de 3 valeurs.*

On constate que la production IgG a été multipliée par un facteur 4,6 en passant de cultures en boîtes au système à dialyse de 10 ml (type I) et par un facteur 1,8 en passant des cultures en boîtes aux cultures dans le système à dialyse de 80 ml (type III) immergé dans 800 ml de milieu. Ceci montre qu'une augmentation d'échelle est possible. Une optimisation devrait encore améliorer les performances.

### ***III.B.7.d) Utilisation du système de culture, son évolution***

L'évolution du système de culture cellulaire est encore poursuivie. Mais auparavant, faisons un bref résumé des différentes améliorations techniques réalisées au cours du temps.

L'idée originale du système a été inspirée des travaux réalisés par Adamson et al (1) puis repris par l'équipe de Sjögren-Jansson et al (153,154). Dans ce type de systèmes, les hybridomes étaient cultivés dans un tube à dialyse qui était lavé avec différents composés, puis bouilli avant d'être utilisé. Le tube à dialyse était fermé aux extrémités par deux noeuds réalisés manuellement. Il était ensuite introduit dans un flacon tournant ou "roller" rempli d'un certain volume de milieu

de culture qui était renouvelé ou non. Des suspensions cellulaires étaient alors obtenues avec des concentrations élevées d'anticorps monoclonaux.

Ce type de cultures n'utilisent pas le même principe que les réacteurs à fibres creuses (113,142) qui s'appuient également sur le principe de la dialyse (pour concentrer les cellules et pour permettre les échanges avec le milieu extérieur) mais dont l'inconvénient majeur est de présenter une limitation voire une absence d'échanges dans les parties profondes des fibres (73,88).

Un tel système a l'avantage d'être d'une grande simplicité et d'un faible coût. Au début des études entreprises, il était peu pratique à mettre en oeuvre et les résultats obtenus étaient peu reproductibles. De nombreux paramètres ont été étudiés pour l'améliorer. En particulier, un support a été créé pour maintenir le tube à dialyse et assurer une agitation régulière. Les tubes à dialyse de point de coupure 25 kDa se sont avérés être ceux qui permettent, d'une part d'obtenir des échanges suffisamment rapides entre le milieu intérieur au tube et le milieu extérieur, et d'autre part de maintenir, donc de concentrer, les anticorps produits dans le tube (92).

D'autres travaux ont permis d'optimiser le volume de milieu extérieur utilisé (39). La production d'anticorps monoclonaux à partir de cultures d'hybridomes adaptés à des milieux sans sérum a été étudiée par de nombreux auteurs (32,121) et un certain nombre de systèmes à dialyse sont décrits dans la littérature (41,68,85,97). Ils mettent souvent en jeu un appareillage complexe. Un système similaire à celui que nous avons développé a été proposé par Pannell et al (119). Des tubes à dialyse sont fixés dans un roller de manière à osciller pour assurer l'agitation par une bulle d'air présente dans le tube. Ce système semble de manipulation complexe.

Récemment, des améliorations pratiques ont été apportées de manière à permettre des manipulations stériles aisées. Les tubes à dialyse installés sur leur support, sont maintenus dans une boîte servant de portoir. Après stérilisation de l'ensemble, les tubes à dialyse peuvent être remplis avec la suspension cellulaire. Ils sont bouchés en utilisant un outil particulier qui permet de les introduire

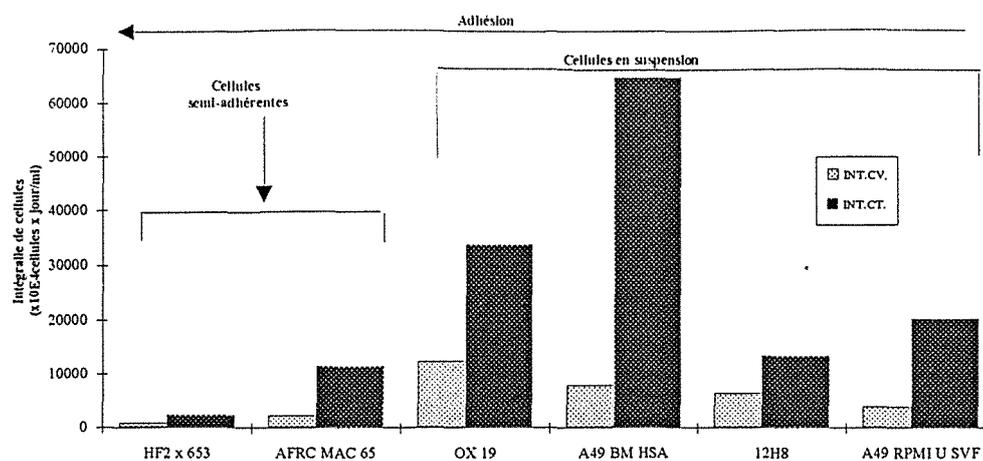
stérilement dans un flacon tournant. La manipulation peut donc être réalisée sans toucher manuellement les systèmes. De plus, l'utilisation de cette boîte permet un remplissage rapide de plusieurs tubes à dialyse au cours d'une même opération.

L'originalité de notre système réside dans sa facilité d'utilisation et dans la concentration élevée d'anticorps monoclonaux (nous avons obtenu jusqu'à 5 g/l d'anticorps en utilisant un mode semi-continu (94)). En présence d'antiprotéases, on peut envisager d'obtenir des concentrations encore plus importantes.

Un certain nombre de travaux font état de la production d'enzymes extracellulaires (97) et d'interleukines (152) en utilisant des systèmes similaires. On pourrait, par exemple, envisager de produire des grandes quantités de molécules d'interféron- $\gamma$ , qui sont produites normalement en faibles quantités, par les cellules CHO en culture en batch (84) ou d'autres types de biomolécules, à condition d'adapter la porosité de la membrane à la taille des molécules à produire. Ces dernières cellules sont adhérentes. Cette propriété n'est pas un obstacle pour l'utilisation du système. Nous avons en effet produit des fibroblastes (L929) dans notre système (une concentration de  $10^7$  cellules/ml a pu être obtenue).

### *III.B.7.e) Différentes lignées cultivées*

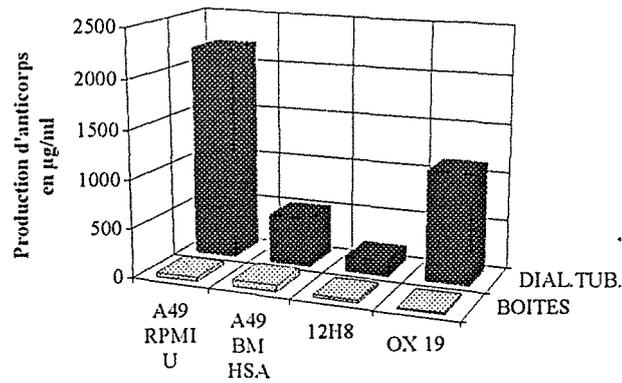
Un certain nombre de lignées cellulaires ont été cultivées dans le système de tube à dialyse. Pour comparer tous ces résultats, nous avons calculé les intégrales des courbes donnant l'évolution des concentrations cellulaires en fonction du temps. Ces résultats sont rassemblés dans la figure 3.32.



**Figure 3.32 :** Intégrales de cellules obtenues dans les systèmes à tubes à dialyse. Le graphique donne les résultats obtenus pour 7 expériences de culture de cellules en tubes à dialyse : Hétérohybridomes homme-souris HF2 x 653 / RPMI 10%SVF ; Hybridomes de rat AFRC MAC 65 / DMEM 10%SVF ; Hybridomes de souris OX 19 / RPMI 10%SVF, 12H8 / RPMI-U-SVF, A49 RPMI-U-SVF ou BM-HSA. Les valeurs des intégrales de cellules sont calculées en tenant compte des cellules vivantes et des cellules totales. Les expériences ont été regroupées suivant le caractère adhérent des cellules.

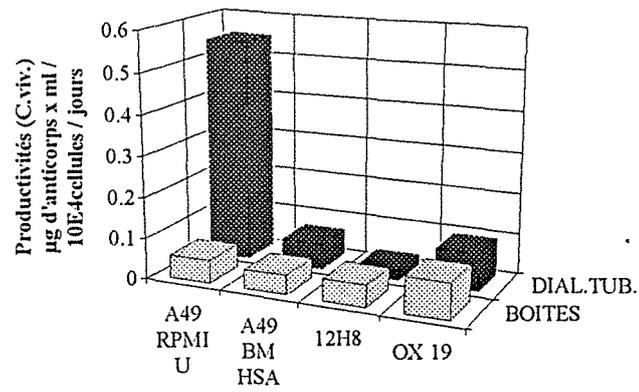
Il est intéressant de remarquer que l'intégrale des cellules la plus élevée est obtenue avec le milieu sans sérum. Bien que la concentration en cellules vivantes ne soit pas très élevée, comme la culture s'est prolongée pendant 40 jours, l'intégrale des cellules totales est supérieure à  $6.10^8$  cellules x jour/ml. Dans le cas de cellules semi-adhérentes, plus les cellules ont tendance à adhérer et plus les intégrales des cellules sont faibles. Les valeurs trouvées avec ces cellules peuvent être sous-évaluées dans certains cas.

Pour conclure ce chapitre sur l'utilisation de différents systèmes de culture nous avons comparé, pour trois souches cellulaires, les productions obtenues en anticorps et les productivités des différentes cellules. La figure 3.33 montre l'avantage du système à dialyse par rapport aux cultures en boîte. Il doit être noté que les valeurs données sont sous estimées à cause de l'action des protéases. C'est certainement le cas de l'hybridome 12H8 pour lequel les cultures ont été prolongées pendant 25 jours.



*Figure 3.33 : Productions des cultures en tubes à dialyse et en boîtes. Trois hybridomes murins ont été utilisés : A49 / (RPMI-U-SVF ou BM-HSA), 12H8 / RMPI-U-SVF et OX 19 / RPMI 10%SVF. Les IgG (OX19 et 12H8) et les IgM (A49) ont été dosées par ELISA comme il a été décrit dans le chapitre Matériel et méthodes.*

La figure 3.34 donne les productivités des cellules. Ce paramètre renseigne sur la physiologie des cellules. Pour les souches A49 et OX 19, les productivités des cellules sont similaires, que les cultures soient effectuées en boîte ou en tube à dialyse. Il n'en est pas de même pour la lignée A49 cultivée en milieu RPMI U SVF et pour la souche 12H8. Nous avons donné quelques arguments pour expliquer la faible production de cette dernière lignée dans des tubes à dialyse. Les mêmes arguments expliquent la diminution de productivité quand on passe des cultures en boîtes à des cultures en tubes à dialyse. Le cas d'augmentation de productivité de la lignée A49 est difficile à expliquer. Il serait très intéressant d'approfondir ce phénomène et de trouver quels sont les métabolismes qui ont été modifiés par le changement de mode de culture.



*Figure 3.34 : Productivités des cultures en tubes à dialyse et en boîtes. Trois hybridomes murins ont été utilisés : A49 / (RPMI-U-SVF ou BM-HSA), 12H8 / RMPI-U-SVF et OX 19 / RPMI 10%SVF. Les productivités ont été calculées en fonction des intégrales des cellules vivantes (cf. chapitre Matériel et méthodes).*

## **IV. MORT CELLULAIRE**

La production d'anticorps par culture d'hybridomes peut être optimisée par des techniques diverses (optimisation du milieu de culture ou du système de culture). Pour produire des anticorps de qualité thérapeutique et peu onéreux, on a souvent opté pour la solution des cultures en milieux sans sérum, en même temps que pour des cultures en masse. Si certaines de ces options se sont montrées concluantes, beaucoup d'autres ont été des échecs (57), en particulier quand elles ont conduit à la mort des cellules.

Dans les chapitres suivants, nous analyserons un certain nombre d'aspects concernant la mort cellulaire chez les hybridomes.

### **IV.A. Techniques de détection**

Différentes techniques peuvent servir à détecter la mort cellulaire et conduire à des déterminations quantitatives, semi quantitatives ou qualitatives du phénomène.

- Les techniques morphologiques :
  - Coloration au bleu trypan
  - Coloration au mélange bromure d'éthidium / acridine orange
- La détection de la fragmentation de l'ADN
  - Electrophorèse capillaire
  - Electrophorèse sur gel d'agarose
- La modification du cycle cellulaire
  - Cytométrie en flux

### **IV.B. Apoptose induite**

Le phénomène apoptotique peut être induit par de très nombreux facteurs physiques, chimiques, biochimiques, etc..

Nous avons utilisé le choc thermique et la privation de sérum (dans le phénomène d'adaptation).

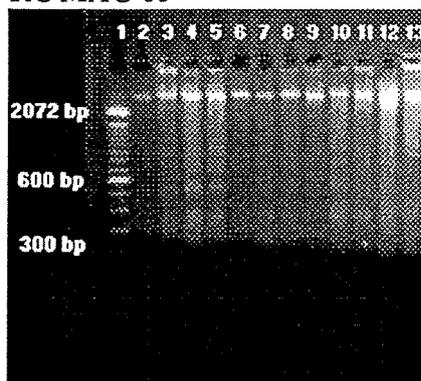
#### IV.B.1. Choc thermique

Le rôle de chocs thermiques sur la fragmentation de l'ADN de 3 lignées d'hybridomes (AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19) a été étudié. Les cellules ont été portées à des températures différentes pendant des laps de temps variables (tableau V). Les cellules sont remises en culture pendant 18 heures et les ADN sont extraits et analysés.

*Tableau V : Valeurs des paramètres temps et température utilisées pour réaliser des chocs thermiques.*

|                | 41°C | 50°C | 70°C |
|----------------|------|------|------|
| <b>1 min.</b>  | HS1  | HS4  | HS7  |
| <b>5 min.</b>  | HS2  | HS5  | HS8  |
| <b>15 min.</b> | HS3  | HS6  | HS9  |

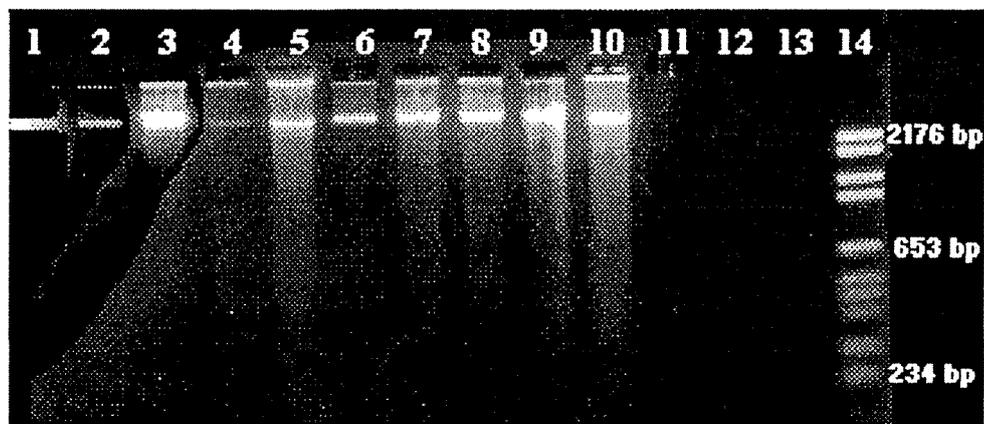
#### *IV.B.1.a) AFRC MAC 65*



*Figure 4.1 : Electrophorèse sur gel des ADN extraits des cellules AFRC MAC 65 ayant subi un choc thermique. La piste 1 correspond au marqueur de taille d'ADN d'échelle 100 pb. Les pistes 3 à 5 correspondent à l'ADN des échantillons ayant subi les traitements : HS1, HS2, HS3. Les pistes 7 à 9 correspondent à l'ADN des échantillons ayant subi les traitements : HS4, HS5, HS6. Les pistes 11 à 13 correspondent à l'ADN des échantillons ayant subi les traitements : HS7, HS8, et HS9 respectivement. Les pistes 2, 6 et 10 correspondent à des échantillons témoins.*

Pour les cellules AFRC MAC 65, les résultats présentés sur la figure 4.1 montrent qu'un choc thermique provoque une fragmentation de l'ADN plus importante que celle observée chez les cellules témoins. Cette fragmentation est d'autant plus importante que le temps d'incubation est plus grand à une température donnée, tant à 42°C qu'à 50°C. A 70°C, une incubation de 1 minute est suffisante pour déclencher l'apoptose. Pour un temps d'incubation de 5 minutes, les fragments d'ADN sont masqués par une traînée ou "smear". Si l'incubation est de 15 minutes, les fragments d'ADN ne sont plus visibles, seule la traînée apparaît. Celle-ci correspond à des ADN dégradés provenant de cellules en nécrose.

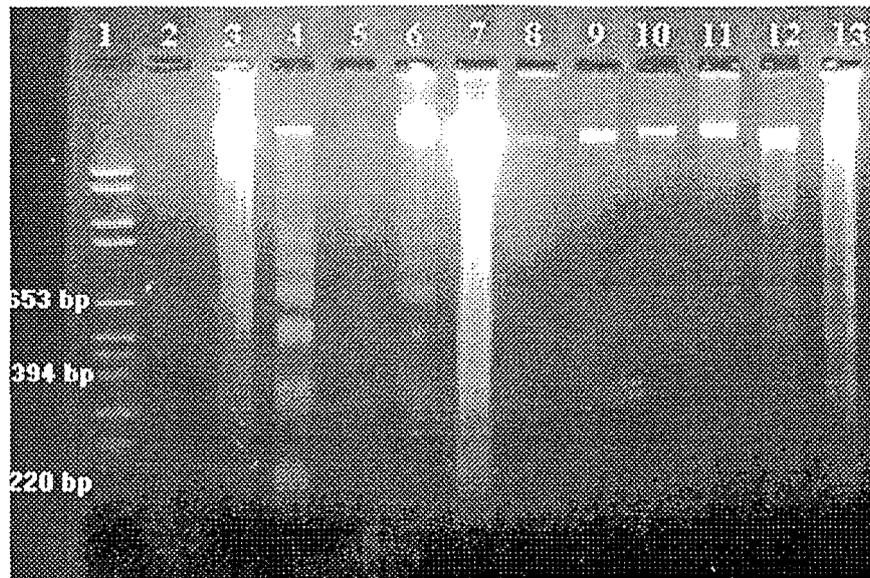
#### *IV.B.1.b) HF2 x 653*



*Figure 4.2 : Electrophorèse sur gel des ADN des cellules HF2 x 653 ayant subi un choc thermique. La piste 1 correspond à l'ADN extrait d'un échantillon témoin. Les pistes 2 à 10 correspondent à l'ADN des échantillons ayant subi les traitements HS1, HS2, HS3, HS4, HS5, HS6, HS7, HS8 et HS9 respectivement. La piste 14 correspond au marqueur de taille d'ADN : pBR 322 digéré par Hae III.*

Les résultats rapportés dans la figure 4.2 montrent qu'une hyperthermie, même importante, ne provoque pas de fragmentation de l'ADN. Cependant pour le traitement à 70°C, pendant 15 minutes, on observe une légère traînée pouvant correspondre à de la nécrose cellulaire.

#### IV.B.1.c) OX 19



*Figure 4.3 : Electrophorèse sur gel des ADN des cellules OX 19 ayant subi un choc thermique. La piste 1 correspond au marqueur de taille d'ADN qui est ici pBR 322 digéré par Hae III. Les pistes 4 à 6 correspondent à l'ADN des échantillons ayant subi les traitements : HS1, HS2, HS3. Les pistes 7 à 9 correspondent à l'ADN des échantillons ayant subi les traitements : HS4, HS5, HS6. Les pistes 11 à 13 correspondent à l'ADN des échantillons ayant subi les traitements : HS7, HS8, et HS9 respectivement. Les pistes 2, 6 et 10 correspondent à des échantillons témoins.*

Les résultats rapportés dans la figure 4.3 montrent que le comportement des cellules OX 19 est voisin de celui des cellules AFRC MAC 65, c'est-à-dire qu'un choc thermique conduit à la fragmentation des ADN des cellules en culture.

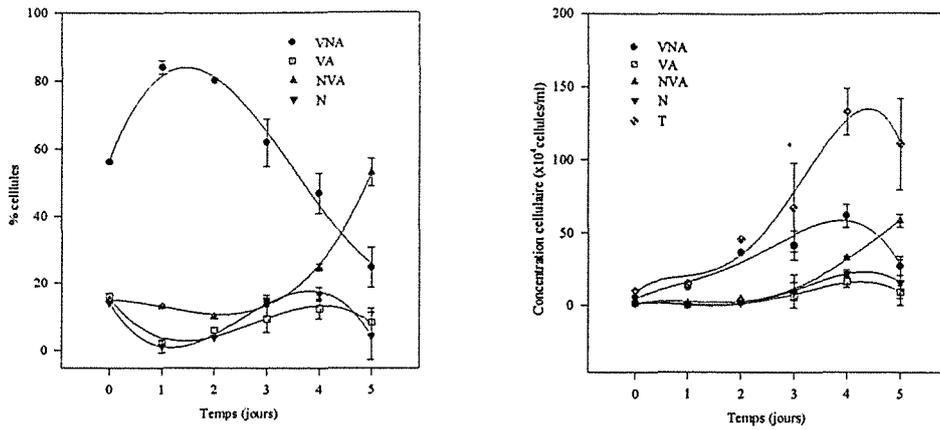
#### IV.B.2. Privation de sérum - Adaptation à un milieu sans sérum

Au cours des expériences d'adaptation à des milieux sans sérum, nous avons vu que certaines adaptations, pour lesquelles le milieu de culture était appauvri en SVF, présentaient un taux de mortalité très élevé. Des travaux sur différentes lignées cellulaires ont montré que l'apoptose pouvait être déclenchée uniquement par une privation de sérum (47,80). Nous avons voulu savoir si au cours d'une adaptation on pouvait déceler cette induction d'apoptose.

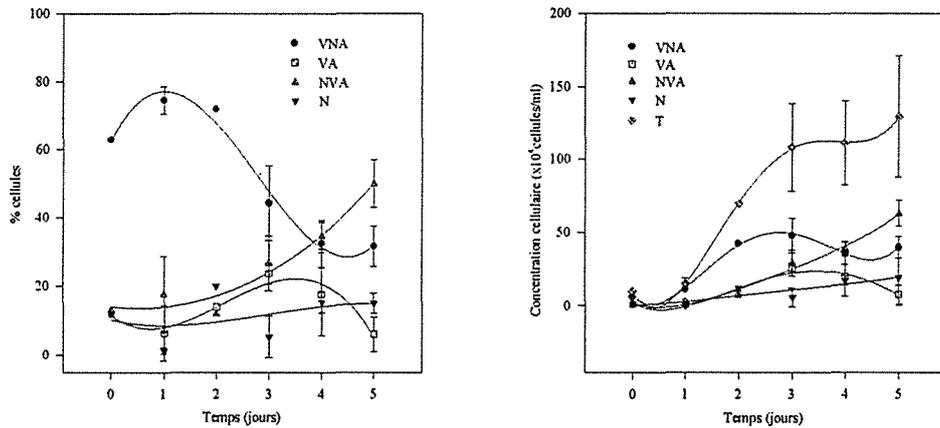
Nous avons réalisé l'adaptation, vers un milieu appauvri en sérum, des cellules A49 cultivées initialement dans le milieu BM contenant 5% de SVF. Les cellules ont été adaptées en les cultivant successivement dans des milieux BM contenant des pourcentages décroissant en SVF. A chaque modification de la constitution du milieu, les différents types cellulaires sont déterminés par la méthode décrite par Mercille et Massie (98).

L'évolution des courbes au fur et à mesure de la diminution en pourcentage de SVF n'est pas significative. Seules les courbes obtenues pour les cultures réalisées dans du milieu BM sans SVF présentent quelques différences. Nous ne reproduisons que les résultats obtenus pour les cultures dans les milieux BM + 2,5% SVF (BM 2,5) et BM sans SVF (BM0) sur la figure 4.4.

## BM 2.5



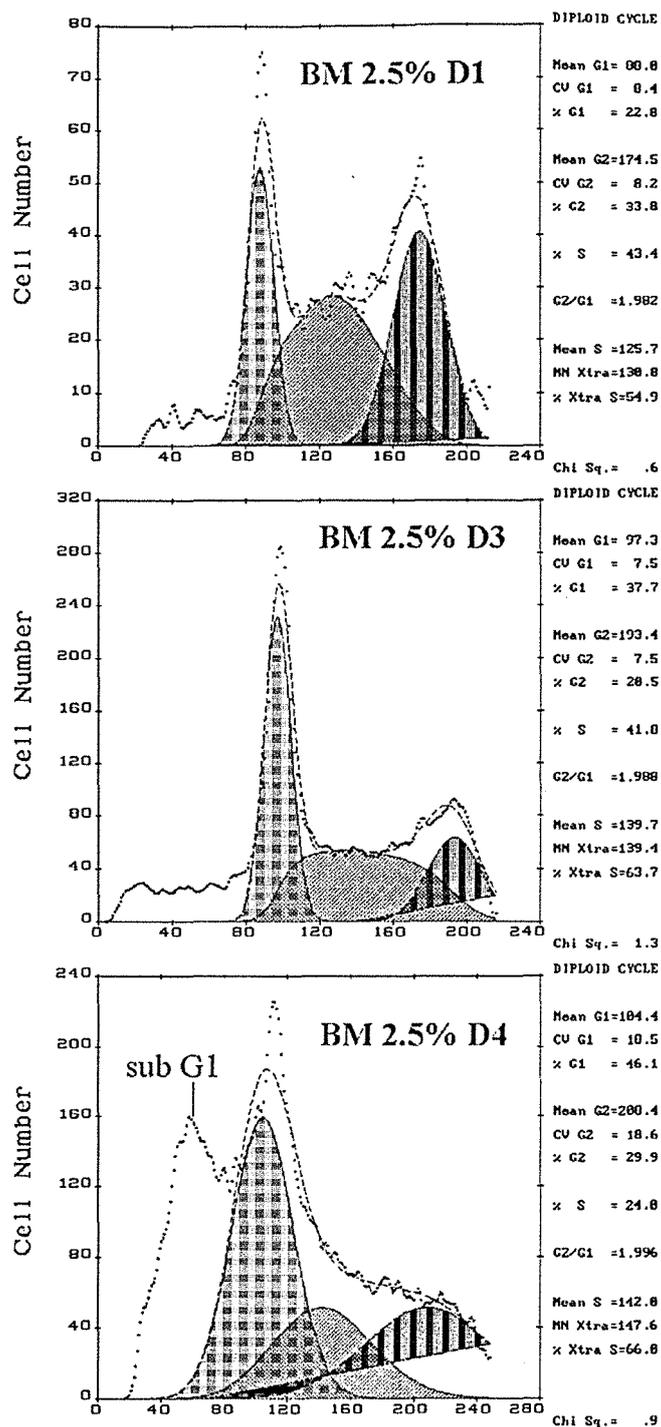
## BM0



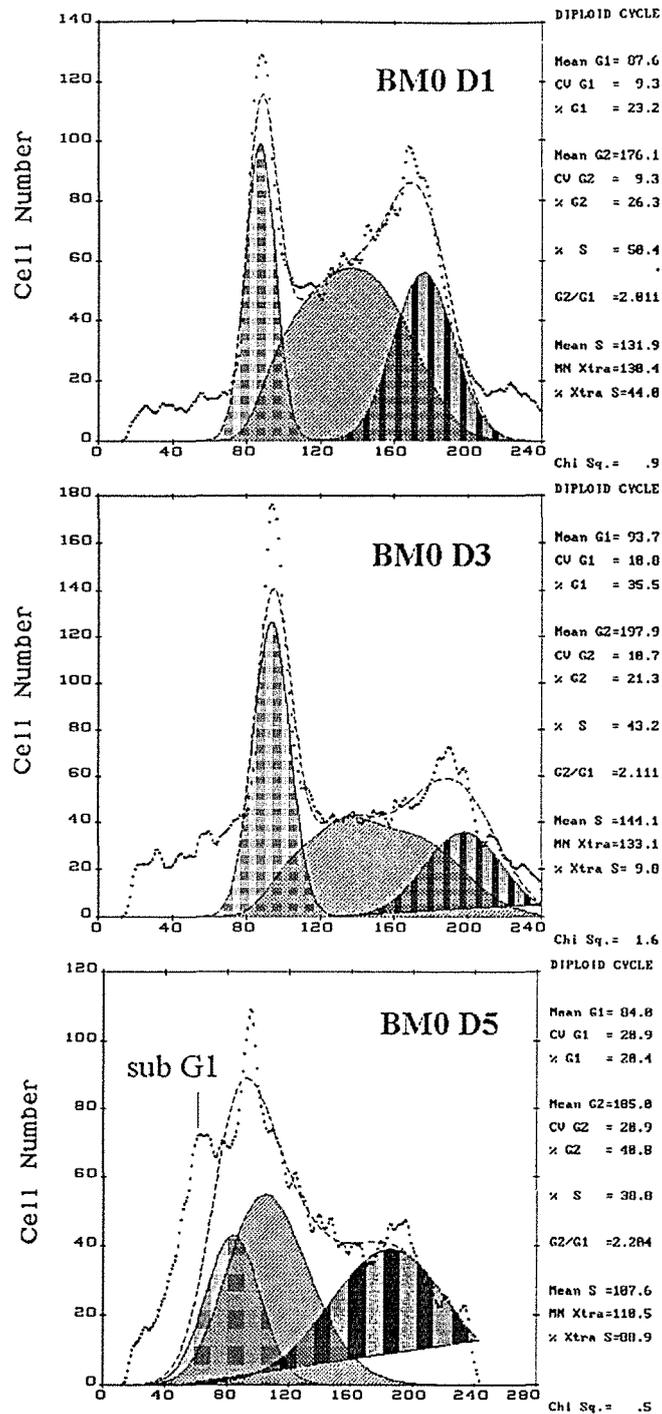
*Figure 4.4 : Adaptation des cellules A49 à un milieu sans sérum. Courbes de croissance et pourcentage des différentes populations déterminées à l'aide de la coloration au BE/AO. Les courbes ont été réalisées en ensemençant des cultures avec des cellules prises au cours de l'adaptation aux passages 0, 2, 6, 8, 10, 15.*

Les maximum des concentrations en cellules vivantes sont plus faibles en absence qu'en présence de SVF mais les concentrations en ces cellules diminuent moins en fin de culture.

Parallèlement à ces déterminations, toutes les 24 heures, nous avons observé les cycles cellulaires des cellules pour les cultures dans les différents milieux.

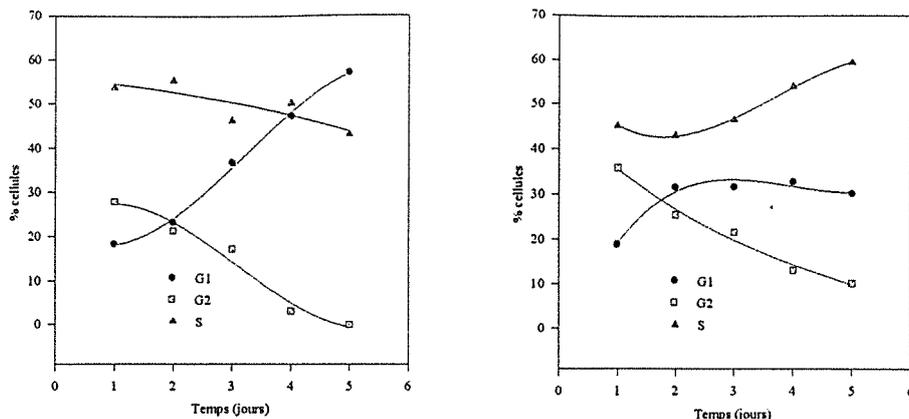


*Figure 4.5 : Evolution du cycle cellulaire au cours d'une culture de cellules A49 cultivées dans du milieu BM 2.5. Les cycles correspondent successivement à ceux obtenus pour des cellules prélevées les jours 1, 3 et 5 de culture. Les cellules ont été fixées et marquées à l'iodure de propidium comme indiqué dans le chapitre Matériel et méthodes. Les pourcentages des cellules en phase G1, S ou G2/M ont été estimés en utilisant le modèle de Dean et Jett. Le pic sub G1 correspond aux cellules apoptotiques.*



*Figure 4.6 : Evolution du cycle cellulaire au cours d'une culture de cellules A49 cultivées dans du milieu BM0. Les cycles correspondent successivement à ceux obtenus pour des cellules prélevées les jours 1, 3 et 5 de culture. Les cellules ont été fixées et marquées à l'iodure de propidium comme indiqué dans le chapitre Matériel et méthodes. Les pourcentages des cellules en phase G1, S ou G2/M ont été estimés en utilisant le modèle de Dean et Jett. Le pic sub G1 correspond aux cellules apoptotiques.*

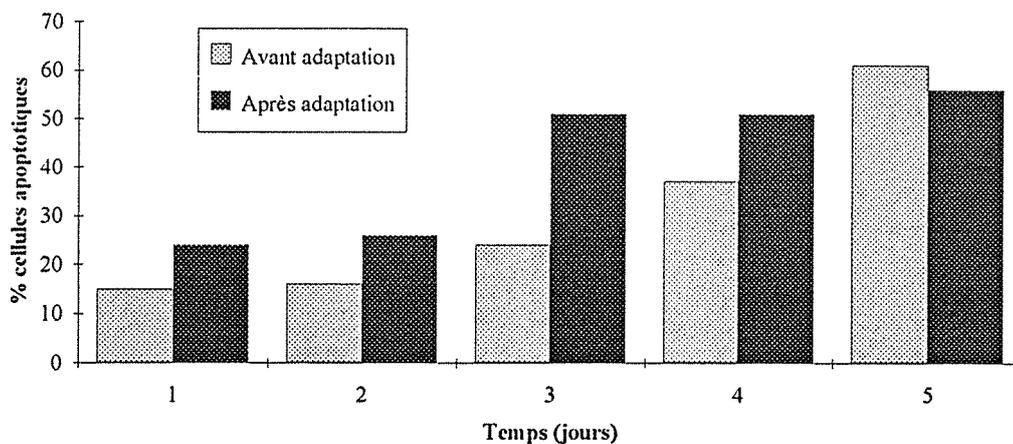
Les figures 4.5 et 4.6 montrent l'évolution des cycles cellulaires réalisés quotidiennement pour les cultures de cellules A49 en milieux BM 2,5 et BM0. Au cours du temps, une population cellulaire dont le contenu en ADN est inférieur à celui des cellules en G1 apparaît. En fin de culture, le schéma obtenu ressemble à la superposition de deux cycles. C'est l'hypothèse qu'avait été faite quand les résultats cités précédemment avaient été publiés. Nous savons maintenant que le pic "sub G1" doit être attribué aux cellules apoptotiques. Dans la méthode utilisée pour ces déterminations (cf. chapitre Matériel et méthodes), les cellules sont incubées dans des solutions tampon avant d'effectuer les cycles cellulaires. Pour les cellules apoptotiques, des fragments d'ADN sont éliminés des noyaux cellulaires. L'analyse de la fluorescence fait apparaître des cellules dont le contenu en ADN est plus faible. Il est donc logique de trouver un cycle cellulaire qui se superpose au cycle normal, mais décalé vers les faibles fluorescences. En particulier, la population de cellules en phase G1 devient une population sub G1. Le pic sub G1 étant partiellement isolé du reste du cycle, son évolution va caractériser l'évolution des cellules apoptotiques. Au fur et à mesure que la culture évolue, le pourcentage du pic sub G1 va en croissant. Les déterminations des pourcentages de cellules dans les différentes phases du cycle peuvent être déterminées. Leurs valeurs sont plus ou moins entachées d'erreurs à cause de la superposition des pics. Elles varient suivant le logiciel utilisé pour les calculer. Les résultats que nous avons trouvés sont en accord avec ceux déjà obtenus avec les cellules A49 (168). Les pourcentages déterminés pour les cellules cultivées dans les milieux avec et sans sérum sont donnés dans la figure 4.7. Dans le cas du milieu supplémenté avec 2,5% de SVF, les pourcentages de cellules en phase S sont surévalués à cause de la superposition des cycles des cellules apoptotiques et non apoptotiques d'une part, et la croissance plus lente des cellules dans le milieu non supplémenté.



a)

b)

**Figure 4.7 :** Evolution des populations cellulaires dans les différentes phases du cycle cellulaire avant et après adaptation des cellules A49 cultivées en milieu BM 2.5 a) et en milieu BM0 b). Les pourcentages des cellules en phase G1/M, S ou G2 ont été estimés en utilisant le modèle de Dean et Jett avec le logiciel MULTICYCLE Autofit Version 2.10 (cf. chapitre Matériel et méthodes).

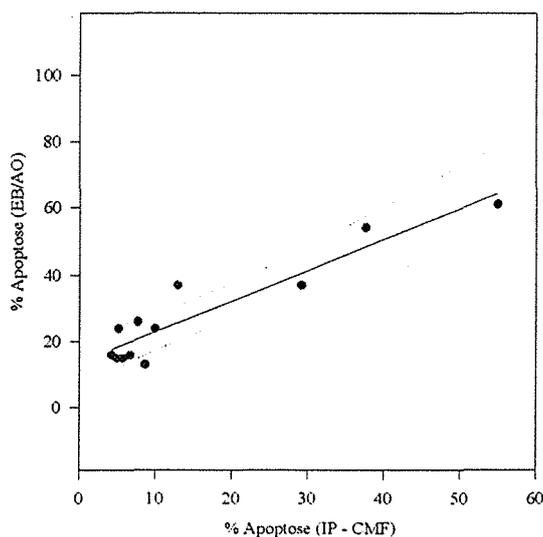


**Figure 4.8 :** Evolution du pourcentage de cellules apoptotiques estimées par cytométrie en flux avant et après adaptation des cellules A49 (cultivées initialement en milieu BM 2.5 et adaptées au milieu sans protéines BM0). On définit comme apoptotiques les cellules marquées à l'iodure de propidium et présentes dans le pic sub-G1. Le calcul du pourcentage de cellules en apoptose est réalisé à l'aide du logiciel MULTI2D Version 3.0 comme il a été décrit dans le chapitre Matériel et méthodes.

Ce dernier phénomène se retrouve dans l'histogramme de la figure 4.8, comparant les pourcentages des cellules apoptotiques avant et après adaptation à un milieu sans sérum.

Alors que ce pourcentage croît au cours du déroulement des cultures réalisées dans le milieu supplémenté, il se stabilise dans les cultures réalisées dans le milieu sans sérum. Autrement dit, plus les cellules se développent rapidement et plus le phénomène d'apoptose est apparent.

Nous avons vérifié la correspondance entre les pourcentages de cellules apoptotiques déterminés morphologiquement et par cytométrie. Les résultats sont donnés dans la figure 4.9. Dans un intervalle de confiance de 99%, les valeurs trouvées sont bien corrélées, les valeurs déterminées morphologiquement étant plus élevées. Ceci s'explique, d'une part, par la superposition des pics sub G1 et G1, et d'autre part il est possible que le pic sub G1 ne contienne pas de cellules vivantes apoptotiques dont la membrane n'est pas détériorée.



**Figure 4.9** : Corrélation entre les pourcentages d'apoptose déterminés morphologiquement et à l'aide de la cytométrie en flux (intervalle de confiance 99%). Abscisses : pourcentages d'apoptose mesurés avec la coloration à iodure de propidium en cytométrie en flux. Ordonnées : pourcentages de cellules apoptotiques comptées à l'aide de la coloration au bromure d'éthidium / acridine orange.

### IV.B.3. Induction par des molécules de faible poids moléculaire

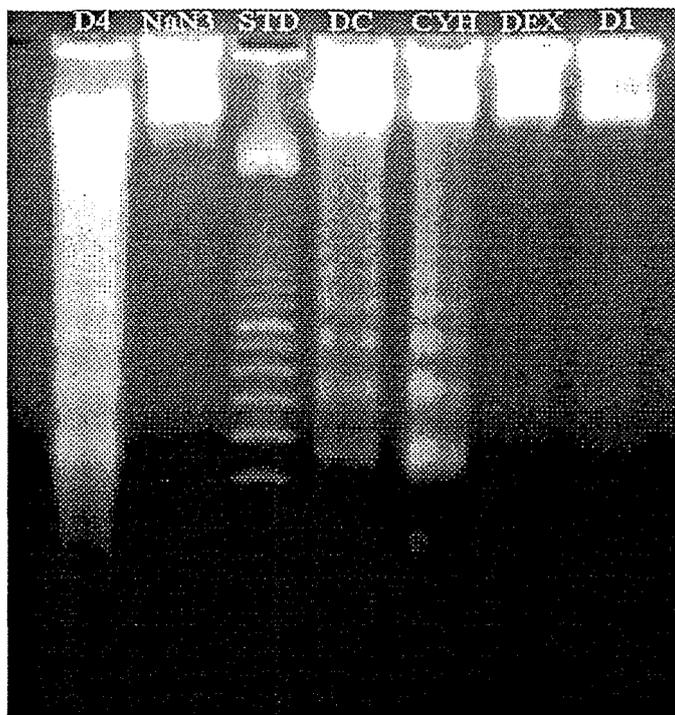
De nombreux composés chimiques sont utilisés dans les études sur les phénomènes d'apoptose. Nous avons employé un certain nombre d'entre eux, pour vérifier que leurs actions sur les hybridomes sont les mêmes que celles décrites dans la littérature pour d'autres cellules. Ces composés, ainsi que leurs conditions d'utilisation vis-à-vis des hybridomes A49 sont rassemblés dans le tableau VI.

*Tableau VI : Composition des solutions d'incubation.*

|                              | <b>Concentration</b> | <b>Temps d'incubation</b> |
|------------------------------|----------------------|---------------------------|
| <b>Témoin</b>                | -                    | 18h                       |
| <b>NaN3</b>                  | 1 M                  | 18h                       |
| <b>Cycloheximide</b>         | 10 <sup>-1</sup> M   | 18h                       |
| <b>Dexaméthasone</b>         | 10 <sup>-1</sup> M   | 18h                       |
| <b>Cyclohex. + Dexaméth.</b> | 10 <sup>-1</sup> M   | 18h                       |

Des cellules A49 ont été incubées pendant 18 h à 37°C dans différentes solutions des composés précédemment décrits dans le milieu de culture BM0. Les ADN des cellules sont extraits, puis analysés par électrophorèse. Les résultats sont rapportés dans la figure 4.10.

La dexaméthasone n'induit pas de fragmentation de l'ADN. Par contre, la cycloheximide provoque une fragmentation importante caractéristique de l'apoptose. Ces résultats seront discutés dans le chapitre suivant. Le même schéma de fragmentation est obtenu avec le mélange dexaméthasone-cycloheximide. Les ADN extraits de cellules témoins (prélevées aux jours 1 et 4 de culture) sont analysés. On observe qu'au 4<sup>ème</sup> jour, les ADN sont fragmentés. L'azide de sodium induit la nécrose des cellules et les ADN ne sont scindés qu'en grands fragments, sans que la fragmentation caractéristique de l'apoptose n'apparaisse.



*Figure 4.10 : Fragmentation de l'ADN induite par les composés décrits dans le tableau VI. Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN extrait de cultures de l'hybridome A49 (cultivé dans du BM0). STD : marqueur de taille de l'ADN avec échelle de 100 pb. D1 et D4 : ADN de cellules A49 témoin extraits les jours 1 et 4 respectivement après ensemencement. CYH : ADN extrait de cellules cultivées en présence de 0,1 M de cycloheximide. DEX : ADN extrait de cultures avec 0,1 M de dexaméthasone. DC : ADN extrait de cellules cultivées en présence de 0,1 M de cycloheximide et 0,1 M de dexaméthasone. NaN<sub>3</sub> : ADN extrait de cellules cultivées en présence de 1 M d'azide de sodium NaN<sub>3</sub>.*

L'action de la dexaméthasone semble en contradiction avec certains résultats obtenus avec des cellules T ou des cellules leucémiques (2,9,42,101,150,173). Les cellules A49 sont en fait issues de cellules B, ce qui peut expliquer l'absence de réponse à la dexaméthasone. Par contre la cycloheximide provoque bien le phénomène d'apoptose. Cette molécule, qui est un antibiotique appartenant à la famille des macrolides, agit comme un inhibiteur de la synthèse des protéines en bloquant l'action de la peptidyl-transférase. La cycloheximide a déjà été citée comme un inducteur d'apoptose (49,53), toutefois dans certains cas elle agit

comme inhibitrice de l'apoptose sur des thymocytes immatures, des cellules nerveuses ou cancéreuses (74,115,161,177). Il est possible d'envisager une action dose-dépendante comme l'a décrit Tortosa (165) avec une action inhibitrice à faible dose et inductrice à fortes doses.

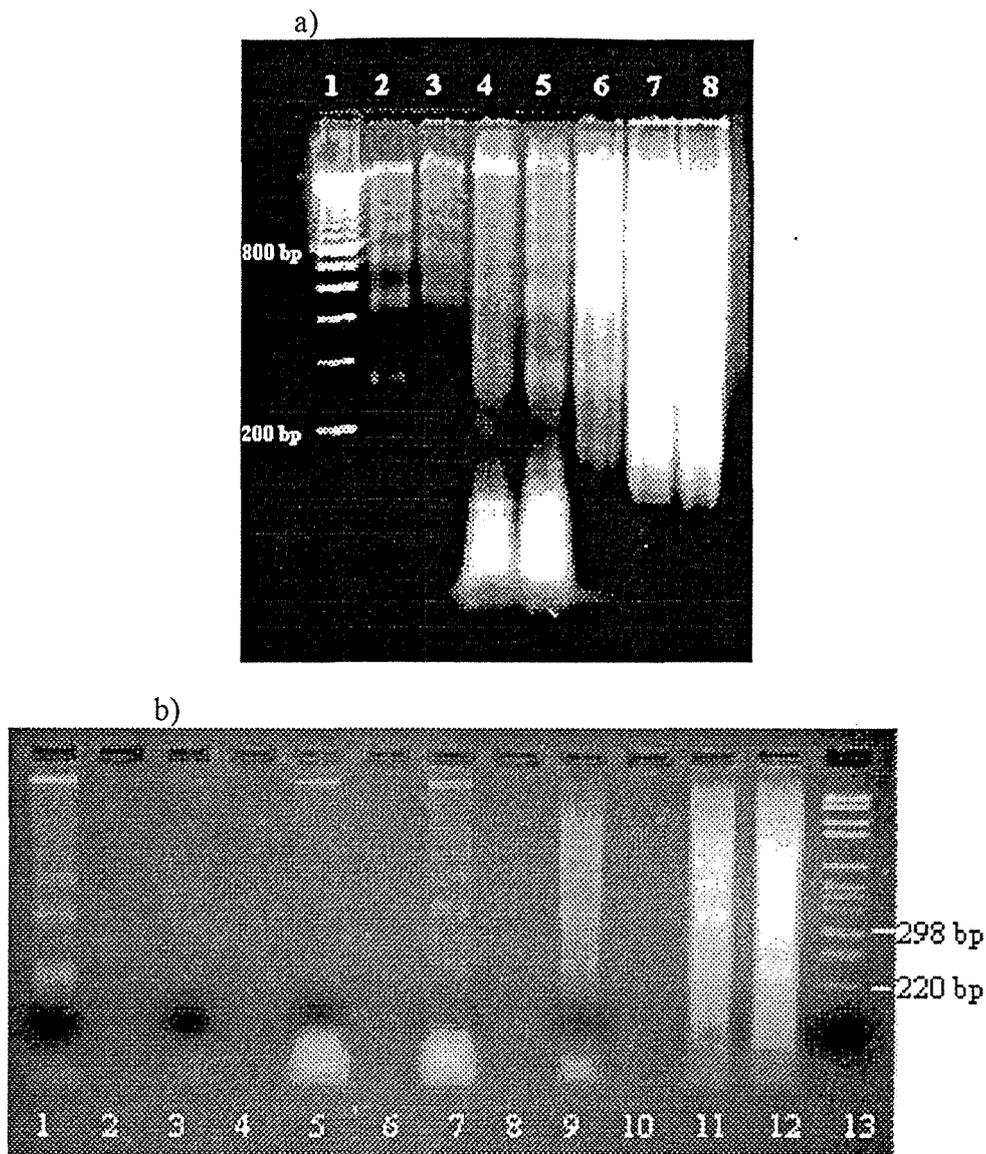
#### **IV.C. Apoptose spontanée**

Dans le paragraphe précédent nous avons montré que dès le premier jour de culture, les cellules A49 cultivées dans du milieu BM supplémenté avec du SVF, ou non, contiennent un certain pourcentage de cellules apoptotiques. Puisque ce phénomène d'apoptose n'a pas été induit, il paraît intéressant d'envisager le phénomène d'apoptose spontanée.

##### **IV.C.1. Hybridome A49**

Les expériences du chapitre précédent ont été réalisées en effectuant des observations morphologiques et par cytométrie en flux. Dans ce chapitre, nous donnerons les résultats obtenus par l'analyse de l'ADN de cellules A49 cultivées dans du RPMI supplémenté avec de l'Ultroser HY ou du SVF.

Des prélèvements ont été réalisés dans des boîtes de culture, les ADN ont été extraits et analysés. Les résultats d'une analyse par électrophorèse sur gel d'agarose sont donnés dans la figure 4.11.

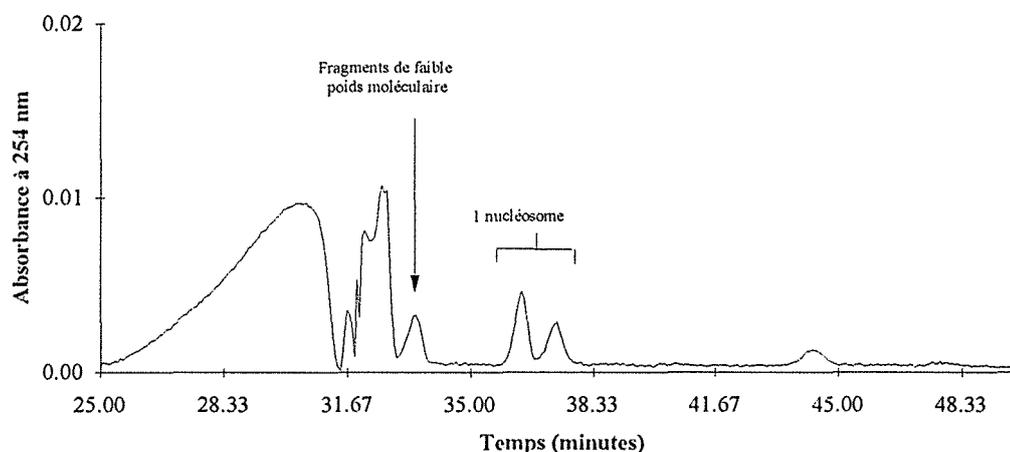


*Figure 4.11 : Analyse des ADN de cellules A49 cultivées dans deux milieux : a) Cultures réalisées en milieu RPMI U SVF. La piste 1 correspond au marqueur de taille de l'ADN pBR 322 digéré par Hae III (Cf. chapitre Matériel et méthodes). Les pistes 2-8 correspondent aux ADN extraits au temps 12h, 18h, 1, 2, 3, 4 et 5 jours respectivement. b) Cultures réalisées en milieu RPMI 10% SVF. La piste 13 correspond au marqueur de taille de l'ADN type VI (cf. chapitre Matériel et méthodes). Les pistes 1, 3, 5, 7, 9, 11, 12 correspondent aux ADN extraits au temps 12h, 18h, 1, 2, 3, 4 et 5 jours respectivement.*

Le phénomène d'apoptose est très précoce. La fragmentation de l'ADN apparaît dès 12 h de culture bien qu'aucune apoptose ne soit induite. L'analyse des ADN extraits aux temps 18 h, 1-3 jours montre l'apparition d'un fragment de faible poids moléculaire (environ 20 pb). Ce fragment disparaît vers la fin de la culture. Il

est aussi visible dans l'analyse des ADN des mêmes cellules cultivées dans le milieu de base RPMI supplémenté avec 10% de SVF.

Pour mieux caractériser le fragment d'ADN de faible poids moléculaire nous avons utilisé l'électrophorèse capillaire.



*Figure 4.12 : Analyse en électrophorèse capillaire d'ADN extrait de cultures de cellules A49 au 1er jour de culture. La méthode utilisée est celle décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.*

Les échantillons analysés par électrophorèse sur gel (figure 4.11 a) sont analysés en électrophorèse capillaire comme décrit dans le chapitre Matériel et méthodes. Les chromatogrammes correspondants sont donnés dans la figure 4.12.

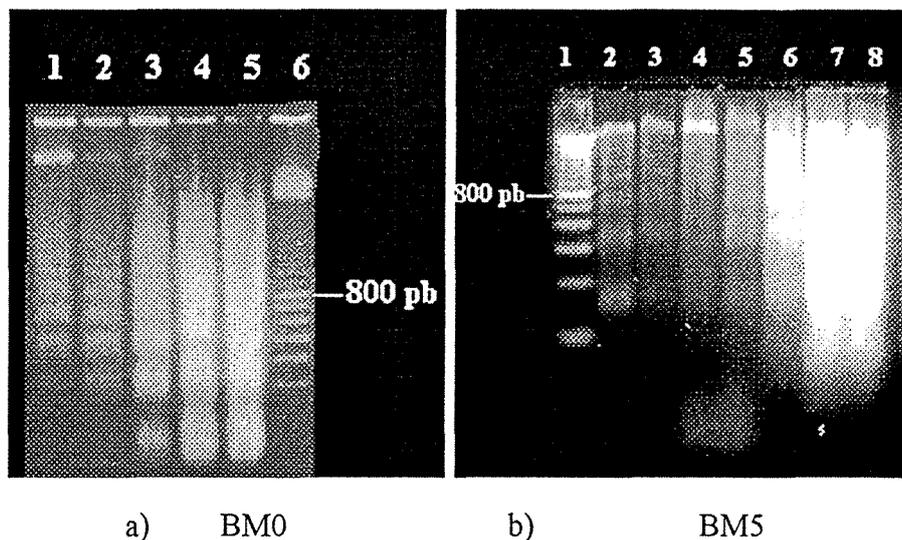
Tous les pics observés à des temps inférieurs à 31,8 minutes correspondent à des petites molécules et ions absorbant à 254 nm. Le pic à 33,4 minutes n'apparaît qu'à partir de 18 heures de culture pour devenir de plus en plus important aux jours 1 et 2 et disparaître à partir du 4ème jour de culture. Cette variation est aussi observée dans les gels d'agarose. En utilisant la courbe de calibration (cf. chapitre Matériel et méthodes), la vitesse de migration permet d'évaluer à 80 pb la taille de ce fragment. Outre ce fragment d'ADN les électrophorégrammes montrent la présence d'un nucléosome qui est résolu sous forme d'un doublet dont les pics correspondent à 160 et 190 pb.

Cette résolution bimodale à déjà été mise en évidence par Todd et al (164) par électrophorèse bidimensionnelle.

#### IV.C.2. Hybridome 12H8

L'hybridome 12H8 (cf. chapitre Matériels et méthodes) a été cultivé dans deux milieux : le milieu de base BM0 et le même milieu supplémenté avec 5% de SVF (BM5).

Comme dans le cas précédent des cellules sont prélevées à des temps de culture différents, les ADN sont extraits puis analysés par électrophorèse sur gel à 2% d'agarose. Les résultats présentés sur la figure 4.13 sont comparables à ceux obtenus avec la lignée A49, que le milieu de base soit supplémenté avec 5% de sérum de veau ou non.



*Figure 4.13 : Analyse des ADN extraits de cellules 12H8 cultivées dans deux milieux de culture. Electrophorèses sur gel d'agarose (2%). a) ADN extraits de cellules cultivées en milieu BM0. Les pistes 1-5 correspondent aux échantillons prélevés les jours 1-5 respectivement. La piste 6 comporte le marqueur de taille de l'ADN à échelle de 100 pb. b) ADN extraits de cultures en milieu BM5. La piste 1 correspond au marqueur de taille de l'ADN à échelle de 100 pb. Les pistes 2-8 correspondent respectivement aux échantillons prélevés aux temps 12h, 18h, 1, 2, 3, 4 et 5 jours.*

Les analyses réalisées par électrophorèse capillaire sont similaires à celles obtenues avec la souche A49. Le phénomène d'apoptose spontanée semble donc ne pas être réservé à quelques lignées d'hybridomes.

L'apoptose apparaît ici comme un phénomène spontané. Il ne semble pas être inhibé par une culture en milieu riche en facteurs de croissance (comme l'est le milieu BM5). Ce phénomène a déjà été cité à plusieurs reprises dans l'étude des cultures d'hybridomes (33,169) mais n'a jamais été généralisé. Nous l'avons étudié dans différentes souches d'hybridomes.

#### IV.C.3. Généralisation du phénomène

En réalisant une étude de 32 souches différentes d'hybridomes avec G. Stacey à l'ECACC, nous avons mis en évidence qu'une majorité de cellules présente des signes d'apoptose spontanée. Sur le tableau VII nous avons résumé les résultats correspondant aux hybridomes que nous avons étudiés au laboratoire.

*Tableau VII : Apoptose spontanée sur 5 souches d'hybridomes.*

| <b>Lignée cellulaire</b> | <b>Echelle d'ADN 180 pb</b> | <b>Morphologie</b> |
|--------------------------|-----------------------------|--------------------|
| <b>A49</b>               | +                           | +                  |
| <b>12H8</b>              | +                           | +                  |
| <b>AFRC MAC 65</b>       | +                           | +                  |
| <b>OX 19</b>             | +                           | +                  |
| <b>HF2 x 653</b>         | -                           | -                  |

*Les symboles + et - correspondent respectivement à la présence ou absence de signes caractéristiques de l'apoptose spontanée.*

Il semble que cet apoptose spontanée soit un phénomène présent chez la plupart des hybridomes. Elle a pour conséquence de limiter la durée des cultures de ces cellules. Le tableau VII montre que la lignée HF2 x 653 ne présente pas ce phénomène. Nous avons approfondi l'étude de cette lignée.

#### IV.D. Caractérisation d'une lignée d'hybridomes résistante à l'apoptose

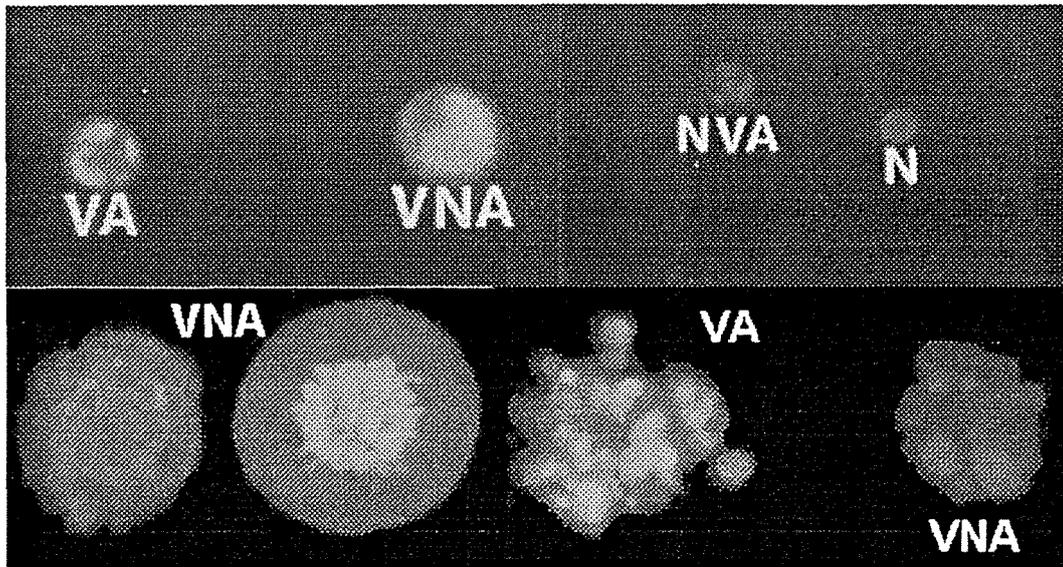
##### IV.D.1. Comparaison avec les cellules A49

Nous avons constaté que la souche HF2 x 653 ne présentait pas de fragmentation de son ADN au cours des cultures, c'est-à-dire qu'elle ne présentait pas d'apoptose spontanée. Des travaux réalisés à l'ECCAC (Angleterre) ont montré que sur 32 types différents d'hybridomes testés, 24 présentaient de la fragmentation spontanée de leur ADN. Alors que sur 17, lignées non hybridomes, aucune n'a présenté des signes de fragmentation spontanée (158).

La lignée HF2 x 653 fait partie des 12 hybridomes (sur 32) ne présentant pas de fragmentation spontanée des ADN, c'est-à-dire ne donnant pas de fragments multiple de nucléosomes au cours de l'analyse de son ADN. Cette lignée possède une vitesse de croissance spécifique faible. De plus, nous avons remarqué qu'en fin de culture, dans des flacons à agitation, la fragmentation des ADN était visible. Nous avons pensé que la faible vitesse de croissance de cette lignée ne permettait pas de mettre en évidence la fragmentation qui ne survenait qu'en fin de croissance, alors que les hybridomes A49, capables de se développer très rapidement permettaient de mettre rapidement en évidence la fragmentation des ADN avant d'attendre la fin des cultures.

Nous avons donc comparé ces deux lignées A49 et HF2 x 653 en observant les cellules par coloration avec le mélange bromure d'éthidium/acridine orange au cours de la croissance. Les caractéristiques des cellules sont rapportées dans la figure 4.14. Les cellules HF2 x 653 sont de petite taille. Les cellules apoptotiques ne présentent pas d'invaginations de la membrane. La chromatine condensée est disposée autour de la membrane nucléaire. Les cellules A49, par contre, sont de plus grande taille. Leurs cellules apoptotiques présentent des invaginations et donnent des corps apoptotiques bien marqués.

Les cellules des deux lignées ne présentent pas les mêmes caractéristiques morphologiques.



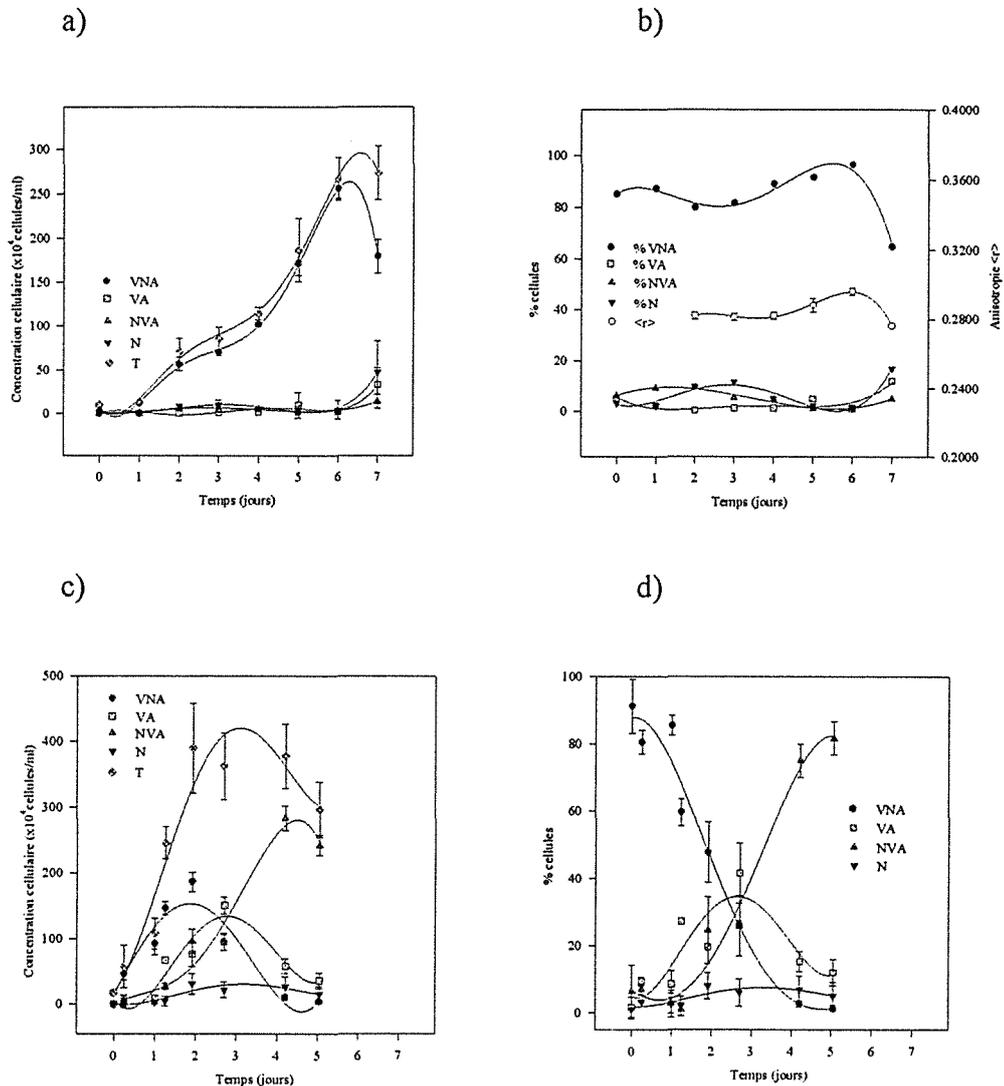
*Figure 4.14 : Comparaison morphologique des différents types cellulaires rencontrés dans des cultures de cellules HF2 x 653 (haut) et de A49 (bas) en utilisant la double coloration bromure d'éthidium et acridine orange. VNA : cellules vivantes non apoptotiques ; VA : cellules vivantes apoptotiques ; NVA : cellules non vivantes apoptotiques ; N : cellules nécrotiques.*

Les déterminations des concentrations cellulaires ainsi que leurs pourcentages relatifs sont donnés dans la figure 4.15.

Nous remarquons que les vitesses de croissances spécifiques au cours de la phase exponentielle de croissance, sont très différentes pour les deux lignées : respectivement 0,02 et 0,07 h<sup>-1</sup>, pour HF2 x 653 et A49.

La courbe donnant la concentration des cellules vivantes non apoptotiques pour la lignée HF2 x 653, est très proche de la courbe donnant les concentrations en cellules totales, donc les concentrations en cellules apoptotiques et nécrotiques restent très faibles. C'est seulement à partir du jour 6 que la concentration en cellules totales amorce une diminution. Pour la lignée A49, le maximum de concentration pour les cellules vivantes non apoptotiques se situe au jour 2 de la culture ; le maximum de concentration en cellules apoptotiques non vivantes est

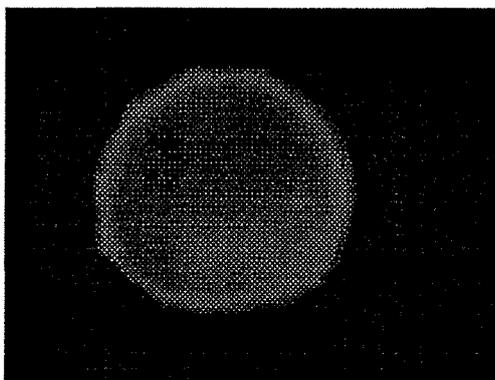
trouvé au jour 3 de la culture, alors que le maximum de concentrations des cellules vivantes (non apoptotiques) apparaît au jour 4 de la culture. La décroissance de la concentration en cellules totales se situe dès le jour 4 de la culture. Tous ces résultats se retrouvent dans les graphes donnant les pourcentages pour les différents types de cellules.



**Figure 4.15 :** Evolution des concentrations cellulaires, et pourcentage des différents types cellulaires au cours d'une culture d'hybridomes HF2 x 653 et A49 cultivés dans du milieu RPMI 10% SVF en boîtes de 25 cm<sup>2</sup>. a) et b) Courbe de croissance, pourcentages des différentes populations cellulaires et mesure de l'anisotropie de fluorescence pour l'hybridome HF2 x 653. c) et d) Courbe de croissance, pourcentage des différentes populations cellulaires pour l'hybridome A49.

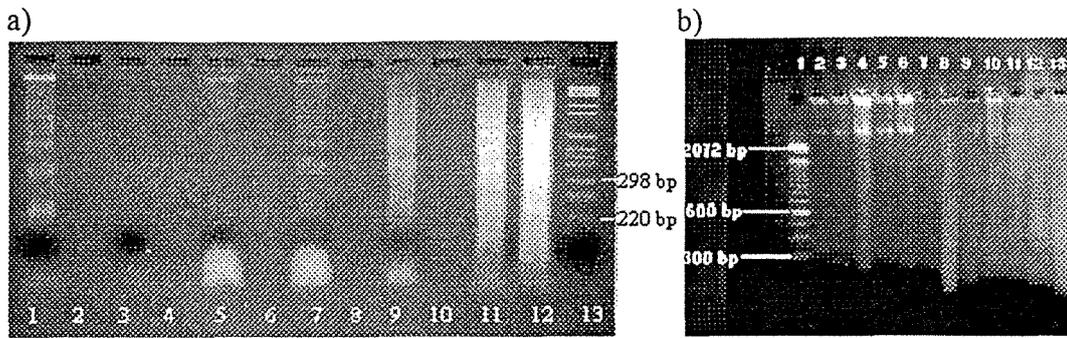
On constate donc que ces deux lignées cellulaires ont un comportement de croissance complètement différent et en particulier, que pour les cellules HF2 x 653, les concentrations en cellules apoptotiques sont très faibles. Ces résultats confirment le fait qu'aucune fragmentation des ADN n'est visible pour ces cellules.

Sur la figure 4.15 b), nous avons porté les variations de la fluidité des membranes estimée par la mesure de l'anisotropie de la membrane. Celles-ci ont été obtenues par l'utilisation du TMA-DPH, sonde fluorescente qui se fixe plus spécifiquement sur la membrane plasmique comme le montre la figure 4.16. L'anisotropie de fluorescence reste pratiquement constante au cours de la culture et passe par un maximum en même temps que la concentration en cellules vivantes. Ce résultat correspond à celui trouvé pour l'hybridome A49 (40). La membrane plasmique conserve ses propriétés de fluidité constante pendant le début de la phase exponentielle de croissance.



*Figure 4.16 : Marquage avec le TMA-DPH des cellules HF2 x 653. Les cellules sont marquées suivant le protocole décrit dans le chapitre Matériel et méthodes. Les cellules proviennent d'une culture réalisée en boîte dans du milieu RPMI + 10% de SVF, et prélevées le 3ème jour de culture.*

La fragmentation de l'ADN des hybridomes A49 et HF2 x 653 est donnée par les électrophoregrammes présentés dans la figure 4.17. Aucune fragmentation n'est décelable pour les hétérohybridomes HF2 x 653 avant le 9ème jour de culture alors que les cellules A49 présentent l'échelle d'ADN caractéristique de l'apoptose dès le premier jour de culture.

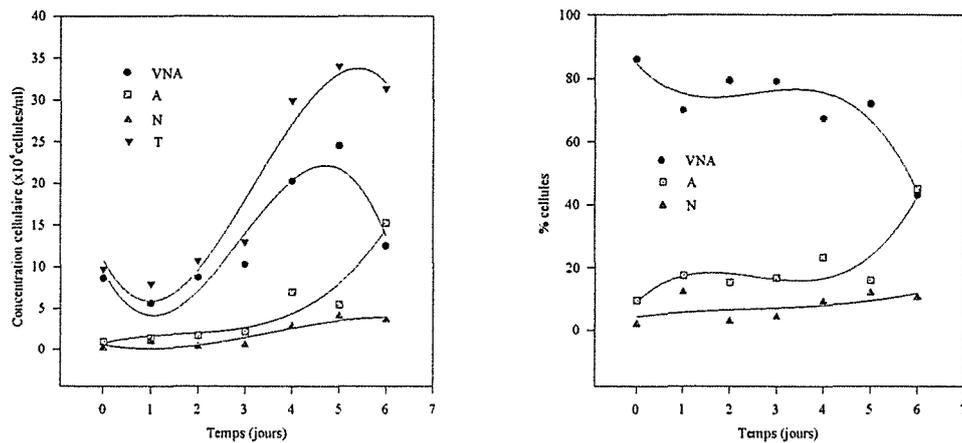


*Figure 4.17 : Fragmentation de l'ADN des cellules A49 et HF2 x 653. Après extraction, les ADN sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (2%). a) Echantillons d'ADN d'une culture de cellules A49. Les pistes 1, 3, 5, 7, 9, 11 et 12 correspondent aux échantillons extraits aux temps 12h, 18h, 1, 2, 3, 4 et 5 jours de culture. La piste 13 correspond au marqueur de taille pBR 328 digéré par Bgl I et Hinf I. b) Echantillons d'ADN d'une culture de cellules HF2 x 653. Les pistes 2-13 correspondent aux échantillons extraits aux temps de culture 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 et 12 jours. La piste 1 correspond au marqueur de taille de l'ADN d'échelle 100 pb.*

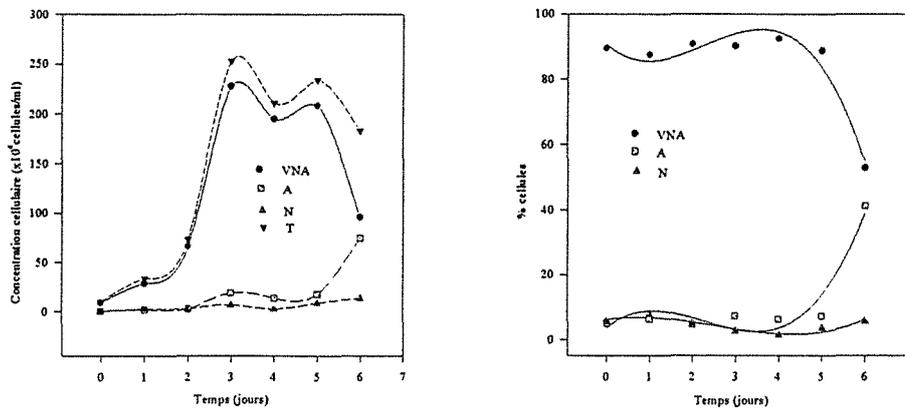
Les cellules HF2 x 653 présentent une résistance à l'apoptose montrée par l'absence de fragmentation de l'ADN en fragments multiples de 180-200 pb et par l'absence de signes morphologiques caractéristiques de l'apoptose. Ces signes n'apparaîtraient qu'en fin de culture à la suite de la dégradation du milieu, causée par un appauvrissement en facteurs nutritifs et l'accumulation des déchets toxiques. Il peut aussi être supposé que l'hétérohybridome HF2 x 653 présente le même phénomène d'apoptose spontanée décrit pour les cellules A49, mais dont les signes caractéristiques apparaîtraient très tard du fait de la croissance lente de cet hybridome. Cette dernière hypothèse est étayée par l'apparition de fragments d'ADN de 50 kpb. Il a été montré qu'ils correspondent à une dégradation précoce de l'ADN observée au cours de l'apoptose (24,180). L'action des endonucléases conduisant à la fragmentation en multiples de nucléosomes ne serait observable qu'en fin de culture.

#### IV.D.2. Myélomes

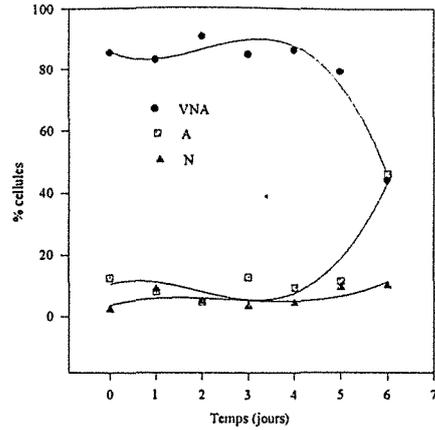
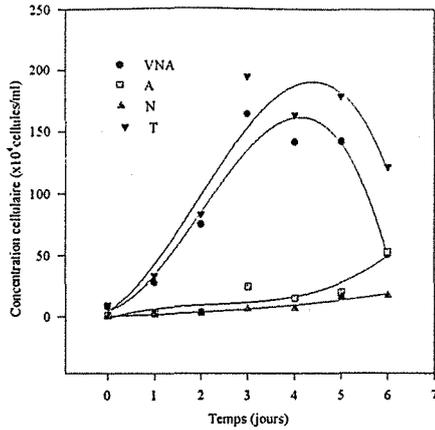
L'apoptose spontanée, qui semble être une caractéristique de la majorité des hybridomes (33,158,169), peut provenir des myélomes qui ont servi à la formation des hybridomes, des lymphocytes, ou d'une action provenant des deux types cellulaires. Nous avons observé la morphologie au cours de leur croissance pour quatre myélomes parmi les plus utilisés : SP2/0-Ag14, P3/NS1/1-Ag4.1, P3x63Ag8.653 et Y3.Ag.1.2.3. Ces myélomes ont été observés au cours de leurs cultures. Les résultats obtenus sont donnés dans la figure 4.18.



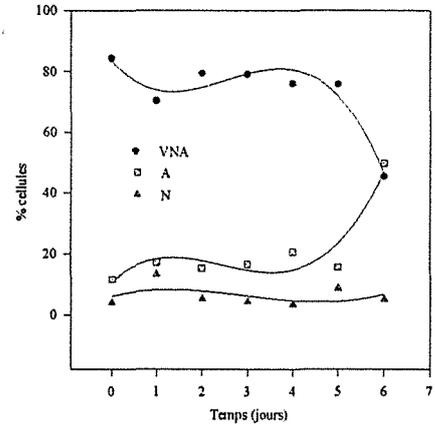
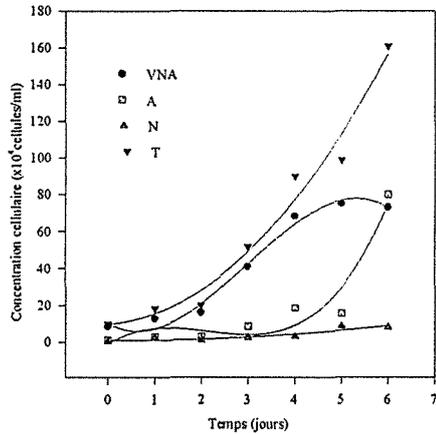
#### Y3.Ag.1.2.3



#### P3x63Ag8.653



SP2/0-Ag14

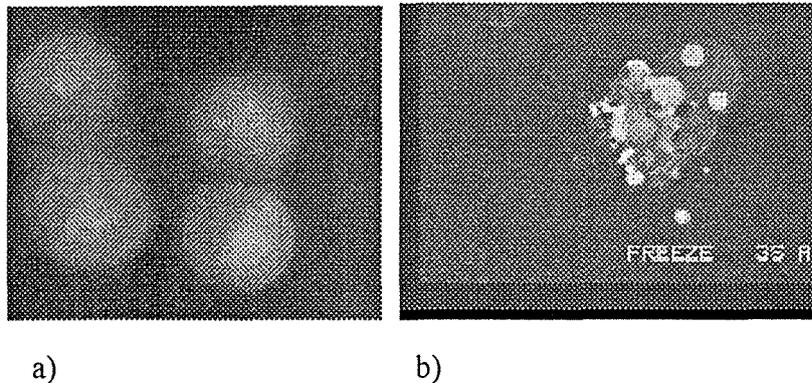


P3/NS1/1-Ag4.1

*Figure 4.18 : Croissances cellulaires de 4 myélomes cultivés en boîtes. L'évolution des cultures est caractérisée par la détermination des concentrations cellulaires (graphiques de gauche) et les % des différents types de cellules observés (graphiques de droite). Les différentes populations cellulaires ont été déterminées à l'aide de la coloration acridine orange / bromure d'éthidium (cf. chapitre Matériel et méthodes). VNA : cellules vivantes non apoptotiques ; A : cellules apoptotiques (obtenues en ajoutant les % ou les concentrations des cellules vivantes apoptotiques (VA) et les cellules non vivantes apoptotiques (NVA)) ; N : cellules nécrotiques.*

Par ailleurs, nous avons obtenu via l'ECACC, deux hybridomes issus de fusions faites à partir du myélome P3x63Ag8.653 et des cellules lymphocytaires de

souris Balb/c. Ces hybridomes (IL-A42 et IL-A43) ne présentent pas de fragmentation d'ADN. L'observation avec la technique de coloration acridine orange / bromure d'éthidium montre une prédominance de cellules vivantes non apoptotiques au début de culture, mais très vite, dès le 3<sup>e</sup> jour de culture, on observe des cellules apoptotiques en grand nombre (figure 4.19).



*Figure 4.19 : Cellules IL-A43 cultivées en boîtes et colorées avec le mélange acridine orange / bromure d'éthidium. a) cellules vivantes non apoptotiques VNA. b) Cellule non vivante apoptotique NVA.*

#### IV.D.3. Conclusions

En conclusion, les cellules HF2 x 653 ne présentent pas les signes d'une apoptose spontanée (pas de fragmentation de l'ADN en multiples de 180-200 pb) comme cela a été constaté pour les autres hybridomes, quel que soit le système de culture utilisé (boîtes, flacons à agitation ou tubes à dialyse) (cf. chapitre Systèmes de culture). Cette observation est confirmée par l'absence de signes morphologiques caractéristiques de l'apoptose (condensation de la chromatine, invaginations membranaires, formation de corps apoptotiques, etc.), par observation avec la double coloration acridine orange / bromure d'éthidium.

Par ailleurs, face à des inducteurs puissants de l'apoptose comme l'hyperthermie, les cellules HF2 x 653 présentent peu de fragmentation de l'ADN par rapport aux autres hybridomes étudiés (cf. chapitre Apoptose).

Tous les myélomes que nous avons testé sont apoptose résistants. En outre, tous les hybridomes étudiés présentent le phénomène d'apoptose spontanée

exception faite pour l'hybridome HF2 x 653. Or celui-ci est un hétérohybridome formé à partir d'un myélome de souris (P3x63Ag8.653) et d'une cellule d'origine humaine (WI-L2-729-HF2). On peut donc penser que la résistance à l'apoptose pourrait provenir d'un remaniement des gènes qui serait différent suivant les espèces fusionnées. Il est connu qu'au cours des fusions cellulaires homme-souris les gènes d'origine humaine sont plus facilement rejetés que les gènes d'origine murine.

Une étude complète de la présence d'apoptose spontanée doit tenir compte de l'expression de certains gènes impliqués dans la régulation, comme par exemple, bcl-2, bax, bcl-x, p53, c-myc. De plus ceux-ci peuvent être modifiés de façon très importante au cours des remaniements chromosomiques ayant lieu après fusion des cellules parentales. L'étude de la façon dont ces différents gènes sont recombinaisonnés lors des fusions et du maintien de leur fonctionnalité permettrait de vérifier si une cellule fusionnée est bonne candidate pour être apoptose-résistante. Lors des différents clonages, il serait intéressant de tester et de sélectionner les clones qui synthétisent l'anticorps recherché mais également ceux qui ne donnent pas d'apoptose spontanée. Le laboratoire du Pr. Hickman à Manchester a transfecté dans le myélome NS0, le gène bcl-2. Les hybridomes obtenus à partir de ces myélomes ne semblent pas être totalement protégés contre la mort cellulaire (travaux non publiés). D'autres perspectives doivent être envisagées.

## V. MORT CELLULAIRE ET SURFACTIFS

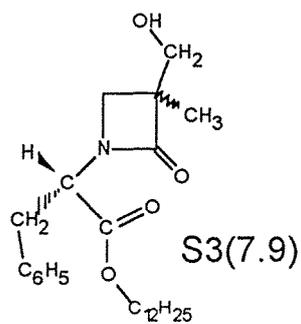
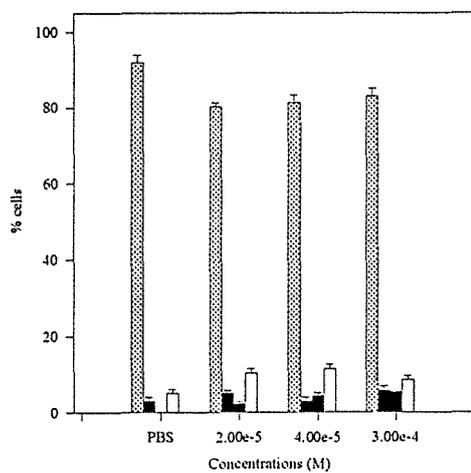
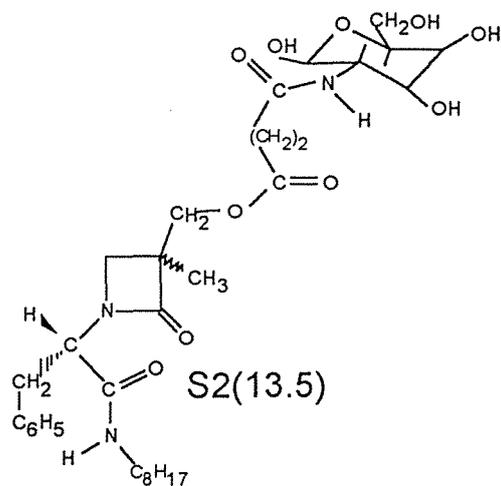
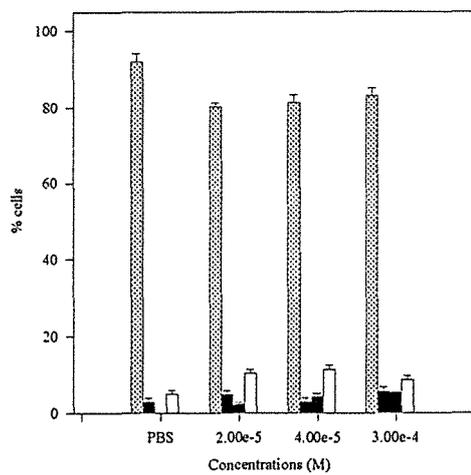
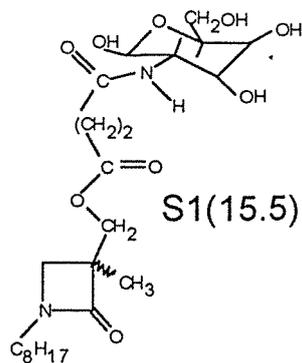
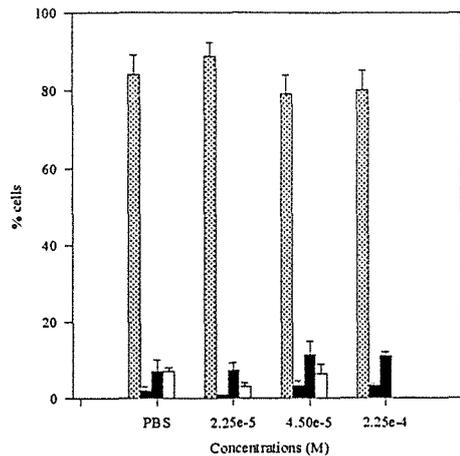
Le phénomène d'apoptose peut être créé par de nombreux paramètres, en particulier des incubations d'une heure ont été montrées être suffisantes pour provoquer la fragmentation de l'ADN de cellules en culture. Ainsi il a été publié récemment que le triton X-100 induit l'apoptose d'une lignée de carcinome humain (14). Nous avons utilisé cette propriété pour déterminer la toxicité d'un certain nombre de surfactifs.

Ces derniers ont été synthétisés par Molina et al (107), partant de l'idée que, d'une part des antibiotiques comme la pénicilline sont utilisés dans les milieux de culture des cellules de mammifères, et d'autre part, que l'addition de surfactifs à faible concentration, améliore la croissance cellulaire certainement par modification de la tension interfaciale. La synthèse de surfactifs possédant un cycle  $\beta$ -lactame a été entreprise. Ces composés que l'on peut désigner par "antibiosurfactifs" se sont avérés posséder des propriétés antibiotiques apportées par le cycle  $\beta$ -lactame ainsi que des propriétés surfactives qui varieront suivant les groupements d'atomes fixés sur le cycle  $\beta$ -lactame (voir formules figure 5.1). Pour que ces antibiosurfactifs soient utilisables dans des milieux de culture, il est nécessaire de mesurer leur toxicité vis à vis des cellules. L'induction de l'apoptose semble être une caractéristique intéressante pour évaluer cette toxicité.

Nous avons utilisé une technique voisine de celle décrite par Borner et al (14) dans le cas du triton X-100 (cf. chapitre Matériel et méthodes) pour le traitement des cellules, et la méthode de coloration au mélange bromure d'éthidium/acridine orange pour déterminer les différents états cellulaires.

Puisqu'elle ne donne pas d'apoptose spontanée, la lignée d'hybridomes HF2 x 653 a été choisie pour réaliser ces expériences. Parallèlement, nous avons étudié les propriétés hémolytiques des surfactifs vis à vis d'hématies humaines.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure 5.1.



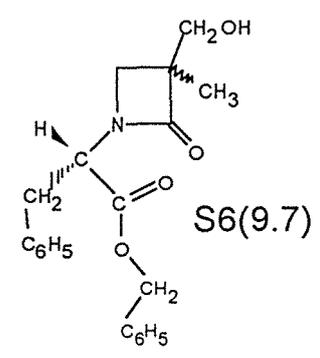
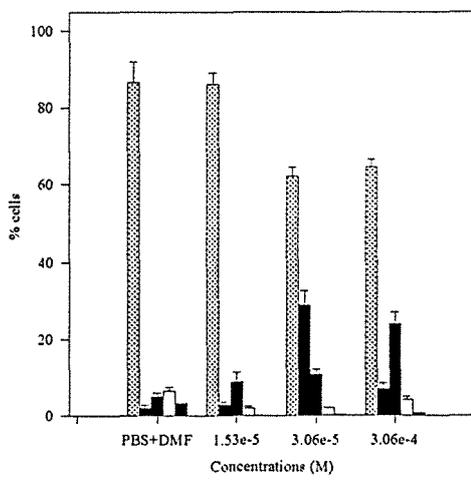
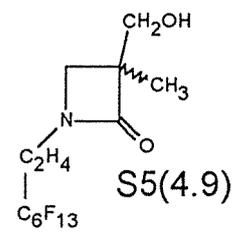
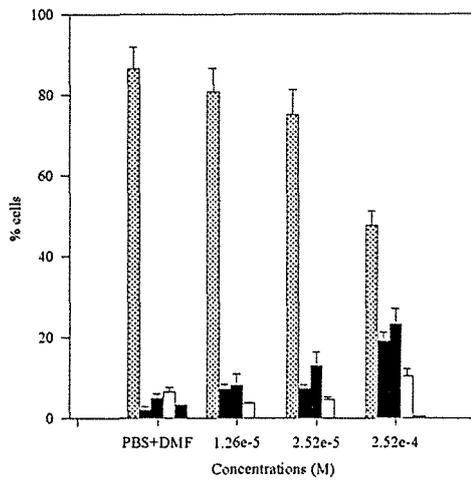
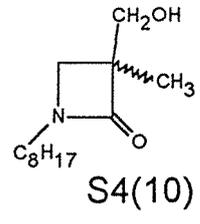
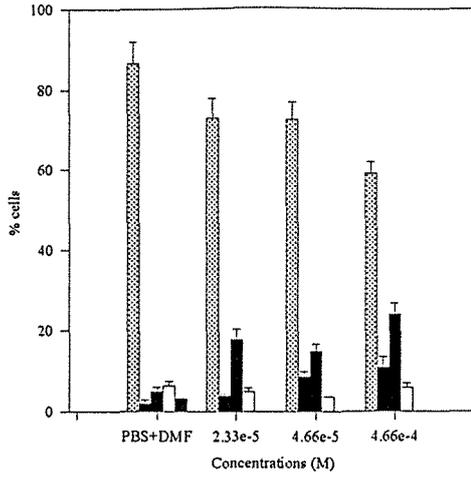
▨ VNA

■ VA

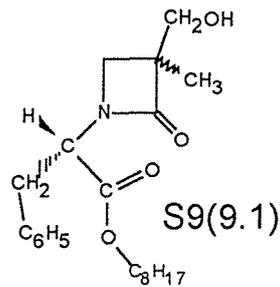
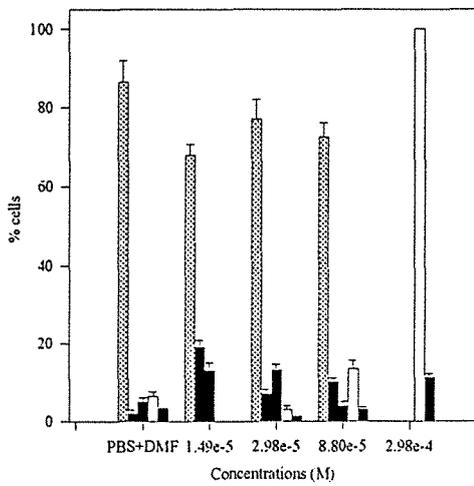
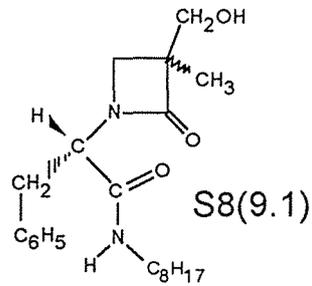
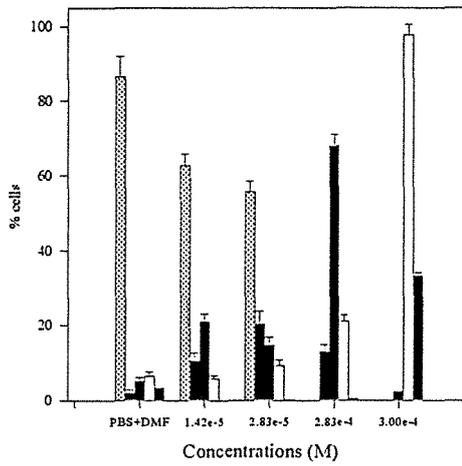
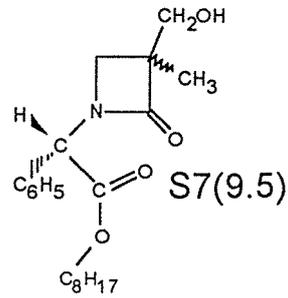
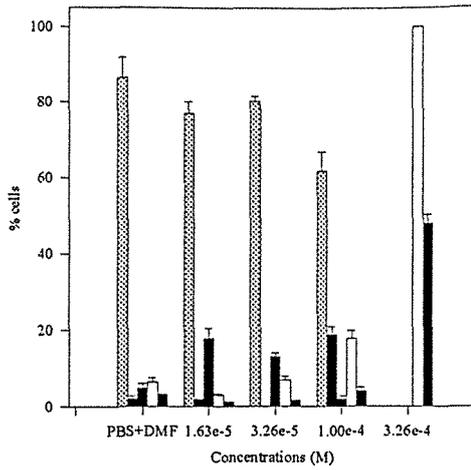
■ NVA

□ N

■ HAEMOLYSIS



VNA    
  VA    
  NVA    
  N    
  HAEMOLYSIS



VNA    
  VA    
  NVA    
  N    
  HAEMOLYSIS

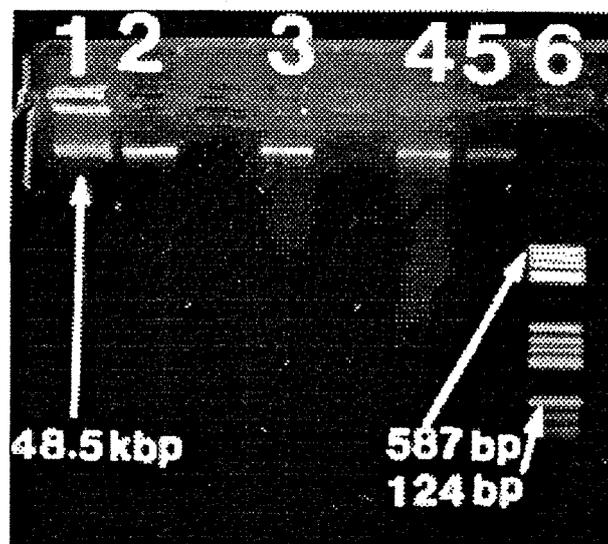
*Figure 5.1 : Pourcentages des différents types cellulaires dénombrés après 2 jours de culture d'hybridomes HF2 x 653, incubés 1/2h avant la mise en culture, en présence de différentes concentrations de surfactifs. La formule chimique de chaque surfactif et sa balance lipophile/hydrophile (HLB) sont inscrites à côté de chaque diagramme. Les diagrammes donnent aussi les pourcentages d'hémolyse induite par les surfactifs.*

D'une façon générale, la plupart des surfactifs induisent de l'apoptose de manière dose dépendante. Dans la gamme des concentrations utilisées, les surfactifs peuvent être classés en deux groupes :

- Groupe 1 : Composés S1, S2 et S3. Aucune activité apoptotique ou nécrotique (pour les hybridomes) ni hémolytique (pour les érythrocytes) n'est détectée.
- Groupe 2 : Composés S4, S5, S6, S7, S8 et S9. Ces surfactifs, contrairement aux précédents, ont une action apoptotique et/ou nécrotique sur les cellules étudiées. Ce groupe peut être subdivisé en deux sous-groupes :
  - ♦ Sous-groupe 2.1 : Composés S4, S5 et S6. Pour lesquels une augmentation de la concentration entraîne une diminution du pourcentage de cellules vivantes avec une augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques et l'apparition d'un faible pourcentage de cellules nécrotiques. Par ailleurs, aucune activité hémolytique n'est observée.
  - ♦ Sous-groupe 2.2 : Composés S7, S8 et S9. Ces surfactifs possèdent un comportement similaire à celui des composés du sous-groupe précédent mais pour la concentration maximum, toutes les cellules sont nécrosées. De plus, ces trois molécules ont une action hémolytique importante.

L'ADN des cellules HF2 x 653 incubées avec le surfactif S8 a été extrait puis analysé par électrophorèse sur gel d'agarose. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 5.2. Aucune fragmentation de l'ADN conduisant à l'obtention d'une "échelle de 180-200 pb" n'est observable. Seule une bande de haut poids moléculaire aux alentours de 50 kpb est visible tant pour les ADN extraits de

cellules témoins que pour ceux extraits de cellules ayant été mises en contact avec le surfactif.



*Figure 5.2 : Electrophorèse sur gel d'agarose des ADN extraits de cellules HF2 x 653 ayant été mises en présence du surfactif S8. Les pistes 2, 3 et 4 correspondent aux incubations réalisées avec les concentrations  $10^{-5}$ ,  $3.10^{-5}$  et  $3.10^{-4}$  M respectivement. La piste 5 correspond à l'ADN provenant de cellules témoin. Les pistes 1 et 6 correspondent aux marqueurs de taille de l'ADN respectivement de haut et faible poids moléculaire (Megabase II et pBR 322 digéré par Hae III).*

Pour caractériser les propriétés surfactives des composés étudiés, nous avons calculé leurs balances hydrophile lipophile HLB (cf. chapitre Matériel et méthodes). Pour ces calculs, nous avons admis que seules les chaînes grasses et/ou les résidus aminoacyl constituent la partie hydrophobe de la molécule. Les valeurs trouvées sont notées à côté des formules chimiques dans la figure 5.1 et rassemblées dans le tableau VIII. Le classement par groupe donné précédemment en tenant compte de l'aptitude à induire le phénomène d'apoptose, correspond aux valeurs des HLB calculées.

*Tableau VIII : Action des surfactifs sur les hybridomes HF2 x 653 et sur les globules rouges.*

|            | Composé | HLB  | Apoptose | Nécrose | Hémolyse |
|------------|---------|------|----------|---------|----------|
| Groupe 1   | S1      | 15,5 | -        | -       | -        |
|            | S2      | 13,5 | -        | -       | -        |
|            | S3      | 7,9  | -        | -       | -        |
| Groupe 2.1 | S4      | 10   | +        | -       | -        |
|            | S5      | 4,9  | +        | -       | -        |
|            | S6      | 9,7  | +        | -       | -        |
| Groupe2.2  | S7      | 9,5  | +        | +       | +        |
|            | S8      | 9,1  | +        | +       | +        |
|            | S9      | 9,1  | +        | +       | +        |

Un parallélisme existe entre les réponses obtenues pour la nécrose et l'hémolyse. Celui-ci s'explique par les mécanismes mis en jeu dans ces deux phénomènes, qui correspondent à une action mécanique au niveau des membranes. Les surfactifs responsables de ces activités détériorent les membranes, soit en provoquant des perturbations en s'insérant dans les bicouches lipidiques, soit en dissolvant des composés membranaires, en particulier des protéines. L'apoptose, au contraire, est un phénomène qui fait appel à des mécanismes biochimiques.

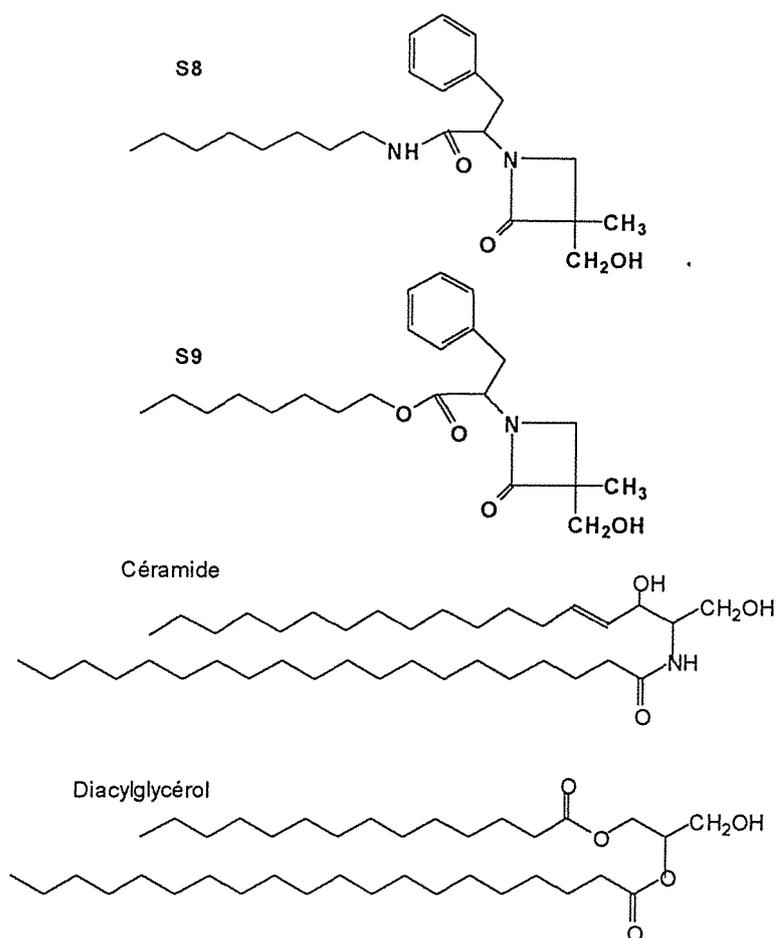
Les composés du groupe 1 sont parfaitement tolérés par les cellules dans la marge des concentrations utilisées. Cette tolérance s'explique par la solubilité importante des composés S1 et S2 (HLB élevée). On peut aussi émettre l'hypothèse que ces composés peuvent se lier à des lectines de la surface des cellules par l'intermédiaire de leur glucosamine et ainsi de ne pas les perturber. Ces explications ne s'appliquent pas au composé S3 qui est bien toléré par les cellules. Son manque d'agressivité peut s'expliquer par la longueur de la chaîne grasse en C12 qui lui permettrait de s'insérer dans la bicouche lipidique sans apporter de perturbation. Un certain nombre de travaux ont en effet montré qu'une longueur de chaîne de 12 à 18 atomes de carbone permet aux surfactifs de s'intégrer dans les membranes sans apparemment causer de dégradation (82,96).

Les composés du groupe 2 dont la HLB est voisine de 10, sont capables d'induire l'apoptose de manière dose dépendante. La nécrose n'existe qu'à partir

d'une concentration caractéristique des surfactifs ce qui nous a conduit à définir deux sous-groupes. Cette concentration est d'autant plus faible que l'HLB est plus faible.

Il faut noter le cas particulier du surfactif S5 dont la HLB est très faible (4,9) et qui, dans les concentrations utilisées, devrait induire une forte apoptose. Les chaînes perfluorées possèdent des caractéristiques différentes de celles des chaînes perhydrogénées puisqu'elles sont oléophobes et leur faible toxicité a déjà été décrite dans la littérature (82,96).

Considérons les composés S8 et S9, malgré la grande similitude de leurs structures, leurs toxicités sont différentes vis-à-vis des hybridomes HF2 x 653. Pour une même concentration, le surfactif S8 induit davantage d'apoptose que le surfactif S9. Ceci est peut-être à rapprocher de l'induction de la mort cellulaire provoquée par la fixation du TNF- $\alpha$  sur son récepteur. Dans ce mécanisme, la fixation de la molécule à son récepteur membranaire active une sphingomyélinase qui transforme les sphingolipides membranaires en céramides. Beaucoup de travaux ont montré que les céramides entraînent la mort cellulaire par apoptose (58,64,65,112). Le diacylglycérol (DAG) est un second messenger produit dans les membranes cellulaires pendant la transduction de signaux hormonaux principalement ; or la structure chimique de cette molécule ne diffère de celle des céramides que par le remplacement de la liaison amide des céramides par une liaison ester (figure 5.3). Il apparaît donc que l'étude de l'activité de surfactifs, analogues structuraux des céramides et du DAG, peuvent fournir des informations sur le rôle des seconds messagers pendant le phénomène d'apoptose (58,86).



*Figure 5.3 : Comparaison des structures chimiques du surfactif S8, du surfactif S9, d'un céramide et d'un diacylglycérol.*

## VI. DISCUSSION GENERALE

Notre discussion sera axée autour de trois grands thèmes : la production des anticorps monoclonaux, la mort cellulaire des hybridomes et l'étude des surfactifs non ioniques en biologie.

### **VI.A. Production d'anticorps monoclonaux**

Nous avons vu dans le chapitre Adaptations que les cultures d'hybridomes réalisées en milieu sans sérum posent un certain nombre de problèmes. Il est parfois long et difficile de changer de milieu de culture pour passer de milieux riches en sérum de veau à des milieux contenant des substituts de sérum ou voire l'utilisation de simple milieu de base. Nous avons vu qu'une stratégie de changement de milieu de culture avec de multiples étapes, méthode décrite par Chandler (20), où les variations de composition du milieu sont de plus en plus faibles dès qu'on s'approche du milieu sans sérum, conduit à des manipulations très longues. Cependant, lorsque l'on dispose de peu de temps, on peut tenter des adaptations plus rapides (avec moins de 5 changements de milieu). Il existe des milieux de culture commercialisés, pour lesquels les adaptations peuvent se faire en très peu de passages mais si les adaptations ne peuvent aboutir, il est nécessaire de revenir à des adaptations lentes.

S'il est nécessaire d'adapter une lignée d'hybridomes à un milieu sans sérum dont le milieu de base diffère de celui de départ, pour diminuer le temps d'adaptation, il est préférable d'effectuer l'adaptation en deux temps. La lignée cellulaire est d'abord cultivée dans le nouveau milieu de base supplémenté en SVF, puis après deux ou trois passages, les hybridomes sont adaptés le plus rapidement possible à ce nouveau milieu dépourvu de SVF. Il est toujours prudent de réaliser parallèlement une adaptation plus lente.

De nombreux phénomènes de régulation du métabolisme des cellules doivent survenir pendant les adaptations. Cependant, des paramètres comme la

consommation spécifique de glucose ou de glutamine ou bien la production de lactate ou d'ions ammonium ne varient pas de manière significative (118).

En ce qui concerne la production d'anticorps monoclonaux, les résultats sont plus nuancés. Au cours de travaux précédents nous avons vu que dans le cas d'adaptations lentes, les hybridomes A49, A64 et B146 retrouvaient leur taux de production d'anticorps après plusieurs semaines de culture (121). Une fois adaptés à un milieu dépourvu de sérum, les hybridomes présentent une productivité le plus souvent supérieure à celle obtenue dans un milieu avec sérum. Ce phénomène a déjà été décrit de nombreuses fois au cours de travaux concernant la production d'anticorps monoclonaux (21,103) mais aussi au cours d'essais de production de composés biologiques comme des vaccins ou des glycoprotéines (99). Cependant, plusieurs auteurs ont décrit l'apparition de populations produisant peu ou pas d'anticorps au cours d'adaptations (117,118).

L'augmentation de la productivité en anticorps des hybridomes a souvent été reliée au stress subi par les cellules. Il a été montré que des hybridomes soumis à un stress métabolique, comme une brusque diminution du pourcentage de sérum ou un stress hyperosmotique, voient leur productivité et/ou leur production en anticorps augmenter (22,83).

Cependant des stress thermiques ou mécaniques peuvent causer la mort cellulaire des hybridomes, en particulier lorsque ceux-ci sont cultivés dans des bioreacteurs (43,174). Singh et al (3,4,151) ont montré que des hybridomes cultivés dans des fermenteurs subissant une forte agitation, voient leurs cellules de grande taille (qui sont préférentiellement en phase S ou G2 du cycle cellulaire) être détruites par les forces de cisaillement via le phénomène d'apoptose. Une variation trop brusque des conditions de culture est donc souvent synonyme de mort cellulaire. On peut alors se demander, pourquoi certaines cellules d'hybridomes résistent à ces différents phénomènes. Il a été démontré que les propriétés de fluidité de la membrane cellulaire sont en relation avec la sensibilité des cellules au stress hydrodynamique, plus la membrane est fluide et plus la cellule est sensible

(127). Par ailleurs, le SVF apporte une bonne protection mécanique aux cellules ayant une membrane sensible aux forces de cisaillement (128).

Des cellules adaptées à des milieux sans sérum seront plus fragiles vis-à-vis du stress hydrodynamique, mais le plus souvent leur productivité augmentera.

Pour expliquer ce phénomène on peut se référer aux paramètres de croissance cellulaire dans des milieux sans sérum (cf. chapitre Adaptations). En effet, les productivités sont calculées en tenant compte des intégrales de cellules. Ces dernières sont en général plus faibles lorsque les cellules sont cultivées dans des milieux dépourvus de sérum, il s'en suit donc un accroissement de la productivité :  $\Pi = P/I$  avec  $\Pi$  productivité, P production en anticorps et, I intégrale des cellules.

Dans le chapitre Systèmes de culture, nous avons constaté la différence de comportement de 3 hybridomes suivant, qu'ils sont cultivés en boîte, en flacons à agitation ou en tubes à dialyse. Les productions d'anticorps pour les cellules OX 19 sont supérieures dans les systèmes agités (spinners ou systèmes à tube à dialyse) mais les productivités sont sensiblement les mêmes. Cependant dans la majorité des cas, la productivité augmente elle aussi du fait de l'augmentation de la production et en même temps de l'augmentation des concentrations cellulaires comme dans le cas de l'hybridome A49. La croissance cellulaire est donc fonction à la fois du système utilisé mais aussi du type de cellules cultivées. Nos résultats montrent qu'il est très avantageux d'utiliser un système comme celui des tubes à dialyse. Il permet non seulement d'obtenir des concentrations cellulaires élevées mais aussi d'obtenir des surnageants contenant des quantités élevées d'anticorps. Nous avons par ailleurs contrôlé la conservation de l'activité biologique des anticorps obtenus (94,121) en tubes à dialyse avec les cellules A49. De plus, les anticorps étant concentrés dans les tubes à dialyse, la purification est facilitée et son rendement amélioré. Nous avons poursuivi l'étude de ce système de culture car l'interdiction future de la pratique des ascites nécessitera l'usage de systèmes de culture simples tels que celui décrit.

## VI.B. Mort des hybridomes par apoptose

Au cours de toute notre étude nous avons été confrontés aux problèmes de la mort cellulaire des hybridomes. Nous avons vu au chapitre Apoptose que les hybridomes meurent spontanément par apoptose. Ce phénomène a été décrit par un certain nombre d'auteurs (33,45,158,169). Cette mort peut être induite par des facteurs très divers comme un choc thermique, le manque de facteurs de croissance, l'action de certains rayonnements.

La mise en évidence d'une lignée "résistante" à l'apoptose (HF2 x 653) pose la question de l'origine de cette particularité des hybridomes à déclencher leur mort dès leur mise en culture.

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre d'introduction, les hybridomes sont des cellules chimériques provenant de la fusion d'un lymphocyte B mature avec une cellule cancéreuse : le myélome. Il a souvent été décrit que le cancer n'est autre chose qu'une dérégulation des contrôles de la mort et de la survie des cellules (91). Les cellules cancéreuses (comme les myélomes) possèdent une capacité à se développer beaucoup plus importante que les cellules normales et sont beaucoup plus résistantes à l'apoptose. Cependant, si les cellules cancéreuses se divisent sans cesse dans un tissu, elles présentent en culture cellulaire, le phénomène d'apoptose spontanée (72). Les lymphocytes B matures (de même que les thymocytes) sont par contre très fragiles et peuvent déclencher leur mort programmée par de multiples facteurs. Il a été montré que ces cellules, après maturation, présentent une apoptose spontanée (8,71,133). Nous avons pensé que la résistance à l'apoptose de l'hybridome HF2 x 653 pouvait provenir du myélome parent. Dans le chapitre Apoptose, nous avons vu que tous les myélomes étudiés présentaient eux aussi des signes d'apoptose spontanée. Nous avons émis l'hypothèse que la résistance à l'apoptose (ou en tout cas le déclenchement retardé de celle-ci) dans les cellules HF2 x 653, pouvait provenir de l'origine humaine de la lignée de lymphocytes B parentale (WI-L2-729-HF2).

Cependant, d'autres facteurs peuvent être mis en cause dans cette résistance à la mort programmée. En effet, plus d'une dizaine de gènes contrôlant l'apoptose de manière directe ou indirecte ont été mis en évidence.

Le tableau IX donne les gènes connus à ce jour, qui sont impliqués dans le contrôle de l'apoptose.

*Tableau IX : Gènes contrôlant l'apoptose.*

| <i>C. elegans</i> | Mammifères                 | Apoptose | Croissance | Cycle cellulaire |
|-------------------|----------------------------|----------|------------|------------------|
| <i>ced 9</i>      | bcl 2                      | -        | +          | régule p53       |
| <i>ced 3</i>      | ICE                        | +        | -          | ?                |
| <i>ced 4</i>      | ?                          | +        | -          | ?                |
|                   | bax                        | +        | -          | ?                |
|                   | bcl-xL                     | -        | +          | ?                |
|                   | bcl-xS                     | +        | -          | ?                |
|                   | bad                        | +/-      | +/-        | ?                |
|                   | BAG-1                      | +/-      | +/-        | ?                |
|                   | c-myc                      | +        | +          | +                |
|                   | max                        | -        | -          | -                |
|                   | mad                        | +/-      | +/-        | +/-              |
|                   | p53                        | +        | +/-        | G1-S             |
|                   | p 35                       | -        | ?          | ?                |
|                   | nedd-2                     | +        | -          | ?                |
|                   | ich-1                      | +        | -          | ?                |
|                   | crm A                      | -        | +          | ?                |
|                   | Fas/APO-1                  | +        | -          | ?                |
|                   | c-fos/c-jun                | +?       | -?         | ?                |
| <i>nuc-1</i>      | nuc-1                      | +        | -          | ?                |
|                   | E1A                        | +        | +/-        | +/-              |
|                   | cycline D1                 | +        | +/-        | +/-              |
|                   | p34 <sup>cdc2</sup> kinase | +        | +/-        | G2/M             |

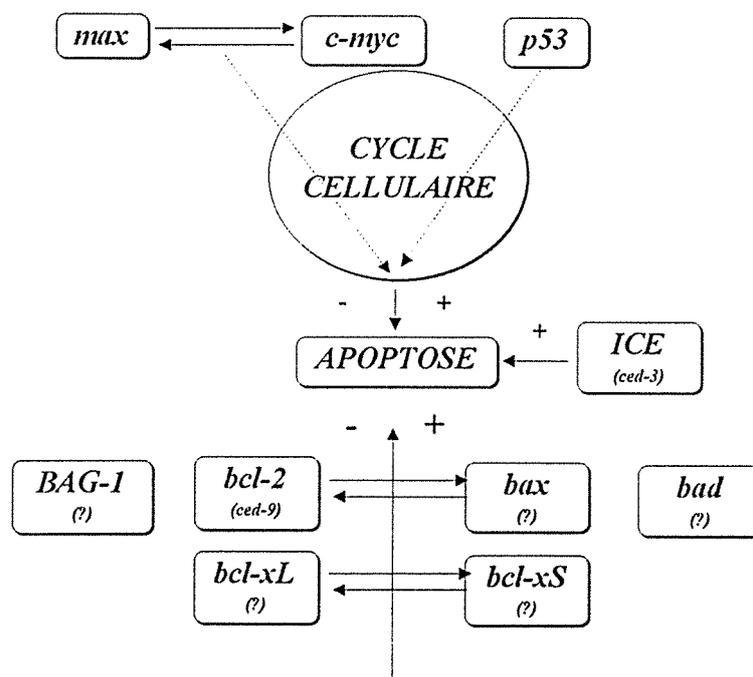
Une régulation de l'apoptose par un équilibre entre les protéines codées par les gènes bcl-2 et bax (114,176) a été montrée. Des homodimères bcl-2/bcl-2 ou bax/bax, ou encore des hétérodimères bcl-2/bax peuvent se former entre les protéines codées par les gènes bcl-2 et bax. Plus le nombre d'homodimères bcl-2/bcl-2 est élevé, plus les cellules résistent à l'apoptose. Inversement, plus les homodimères bax/bax sont nombreux plus les cellules sont sensibles à l'apoptose.

Ce même type d'équilibre par dimérisation est obtenu avec les protéines codées par les gènes bcl-x<sub>L</sub> (L pour " long " car il code pour une protéine de 233 acides aminés, homologue de bcl-2) et bcl-x<sub>S</sub> (s pour " short " codant pour une

protéine composée par 170 acides aminés, homologue de bax) (10,13). La protéine bad a la propriété de se fixer à bcl-x<sub>L</sub> et d'inverser son activité pour créer l'apoptose (176). D'autres gènes sont venus s'ajouter à cette régulation, en particulier, la famille des bcl-x qui ont un comportement semblable au couple bcl-2/bax. Plus récemment, les gènes bad et BAG-1 ont été mis en évidence. Ils s'ajoutent aux deux couples précédents (163,176).

Il est possible que les cellules HF2 x 653 présentent une sur-expression de la protéine codée par le gène bcl-2 ou une sous-expression du gène bax.

Nous avons résumé dans la figure 6.1 une hypothèse de la régulation génétique de la mort cellulaire.



**Figure 6.1 :** Hypothèse de régulation génétique de l'apoptose(- inhibition, + induction de l'apoptose).

La protéine BAG-1, pour sa part, peut se fixer à la protéine bcl-2 et inhiber l'apoptose dans des cellules où bcl-2 semble inactif s'il est pris isolément.

Le gène codant pour une protéase ICE (Interleukin-1- Converting Enzyme) va induire l'apoptose (63). D'autres gènes apparentés à ICE comme (nedd-2 ou

ich-1) ont des propriétés semblables à ICE et peuvent être inhibés par le gène crmA (81,170).

D'autres gènes intervenant normalement dans la prolifération cellulaire via le cycle cellulaire peuvent jouer un rôle d'activateurs de l'apoptose. La protéine c-myc qui contrôle le cycle cellulaire, peut donner un dimère avec la protéine codée par le gène max, pour contrôler la prolifération cellulaire mais également la mort par apoptose (7). Par ailleurs, la protéine p53 codée par le gène du même nom, bloque le cycle cellulaire en phase S quand le matériel génétique est endommagé pour induire l'apoptose si la cellule ne réussit pas à réparer l'ADN (67).

D'autres gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire sont également cités comme intervenant dans le processus d'apoptose : Rb-1, E1A, cycline D1, c-fos, p34<sup>cdc2</sup>kinase (146,155,178). Certains auteurs pensent même que l'apoptose et le cycle cellulaire seraient régulés par un certain nombre de gènes communs ce qui a amené à avancer l'hypothèse dans laquelle l'apoptose serait une mitose "ratée" (136).

Une fois déclenchée, l'apoptose met en jeu tout une cascade d'événements morphologiques et biochimiques. Morphologiquement, l'apoptose se différencie de la nécrose par la diminution de volume de la cellule, suivie d'une condensation et fragmentation de la chromatine, puis d'un morcellement en corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques contiennent des restes du matériel cellulaire comme des organites et toutes les protéines intracellulaires qui ont été clivées par des protéases. La membrane plasmique garde son intégrité tout en subissant des remaniements structuraux qui mettent en évidence des marqueurs de surface. Ceux-ci vont permettre aux corps apoptotiques d'être phagocytés par des macrophages ou d'autres cellules environnantes.

Au contraire, le volume de la cellule nécrotique va augmenter à la suite d'une dégradation de la perméabilité membranaire. Les ions et molécules intracellulaires de faible poids moléculaire, vont quitter la cellule et être remplacés par du liquide extracellulaire jusqu'à son éclatement. Dans ce type de mort, le noyau ne subira pas de fragmentation et tout le contenu cellulaire se déversera dans le milieu

environnant. Dans un organisme, ce mécanisme nécessitera l'intervention de réactions de détoxification.

Au cours de notre étude sur la mort cellulaire chez les hybridomes, nous avons rencontré l'existence de ces deux types de mort cellulaire. En particulier nous avons mis en évidence la fragmentation de l'ADN en fragments de 50 kpb chez l'hétérohybridome HF2 x 653 par exemple (cf. chapitres Systèmes de culture et Apoptose) mais surtout en fragments de tailles multiples de 180-200 pb (cf. chapitres Systèmes de culture et Apoptose). Cette fragmentation est due à l'action d'une endonucléase. Bien qu'une demi-douzaine de molécules candidates aient été proposées, aucune nucléase n'a pu être totalement isolée et caractérisée comme responsable de ces clivages (120).

Cette fragmentation de l'ADN peut être visualisée indirectement par les analyses du cycle cellulaire des cellules après marquage par des molécules intercalantes et fluorescentes comme l'iodure de propidium que nous avons utilisé au chapitre Apoptose. Les cellules apoptotiques ayant perdu des fragments d'ADN sont responsables du pic sub G1 caractéristique des cellules en apoptose (30). Il est évident qu'avec ce type de marquage nous ne pouvons pas distinguer de façon claire les cycles cellulaires des cellules apoptotiques (62). Des études précédentes menées au laboratoire sur des cycles aberrants trouvés dans des cultures d'hybridomes, nous avaient conduit à émettre des hypothèses semblables (168).

Le marquage de l'ADN, par des molécules fluorescentes, a permis de développer des techniques de visualisation morphologiques de cellules apoptotiques présentant une condensation de la chromatine. Des marqueurs comme le Hoechst 33342, le DAPI, l'acridine orange, le bromure d'éthidium ou l'iodure de propidium peuvent mettre en évidence la fragmentation de l'ADN dans les cellules apoptotiques (31). La technique de marquage de l'ADN que nous avons utilisée pour les comptages morphologiques (mélange d'acridine orange et bromure d'éthidium) permet de distinguer instantanément les populations cellulaires apoptotiques des cellules vivantes et nécrotiques.

Le déroulement de l'apoptose implique d'autres événements biochimiques. Une augmentation des concentrations intracellulaires d'ions libres  $Ca^{2+}$ , précède souvent l'apoptose (12). Certaines enzymes comme les tyrosine kinases ou la protéine kinase C, semblent également être impliquées dans le déroulement de la mort cellulaire (37,90). Nous avons vu au chapitre Apoptose que la cycloheximide (inhibiteur de la synthèse des protéines) accélérât la fragmentation de l'ADN chez l'hybridome A49. Il a été montré que la cycloheximide à faible dose, induit une diminution du taux des cellules apoptotiques alors qu'à des doses plus fortes elle accélère au contraire la mort cellulaire (165). Par ailleurs, l'acide aurintricarboxylique a souvent été cité comme un inhibiteur des endonucléases et donc par extension de l'apoptose (105). Nous avons montré que chez les hybridomes B, l'acide aurintricarboxylique diminue l'apoptose en ralentissant la dégradation de l'ADN mais il inhibe aussi la croissance cellulaire (157,158).

Au cours d'études réalisées sur des hybridomes T, il a été mis en évidence un mécanisme de déclenchement de l'apoptose via le récepteur membranaire FAS gouverné par l'activité du couple fas/APO-1 (17). Par ailleurs, dans toutes les cellules T, l'apoptose est induite par des glucocorticoïdes (44). Nous avons vu que la dexaméthasone (analogue des glucocorticoïdes) n'induit pas de fragmentation de l'ADN chez les hybridomes A49. Ces deux types de mécanismes de déclenchement de la mort cellulaire programmée ne semblent pas exister dans les hybridomes B.

Au cours de la maturation des cellules T et B dans un organisme, il faut que les cellules matures ne puissent pas reconnaître les antigènes du soi. Il a été montré que les lymphocytes T et B peuvent être éliminés sélectivement par la propriété qu'ils ont de déclencher leur mort programmée lorsque leurs IgM membranaires se lient aux antigènes du soi (166). Une fois matures, les cellules lymphocytaires perdent cette propriété, or les hybridomes B qui proviennent de cellules B matures, ne devraient donc pas exprimer ces propriétés.

Un certain nombre de bouleversements des composants membranaires ont également été décrits au cours du déroulement de l'apoptose. Des transglutaminases intracellulaires sont responsables de la production de protéines

qui maintiendraient l'intégrité de la membrane en interagissant avec les constituants du cytosquelette et en favorisant la formation de corps apoptotiques (123).

### VI.C. Surfactifs non ioniques et toxicologie

Depuis un certain nombre d'années notre laboratoire collabore avec le laboratoire de chimie du LESOC (Université Henri Poincaré, Pr Selve). Cette collaboration nous a amené à tester différentes techniques permettant d'envisager de nouveaux tests de toxicité *in vitro*. Jusqu'à présent, nous avons envisagé l'action de surfactifs sur la croissance cellulaire d'hybridomes. Nous avons été guidés par l'utilisation potentielle de tels composés dans les milieux de culture. Le pluronic a été décrit comme un composé permettant l'amélioration de la croissance cellulaire d'hybridomes (140). De plus, en interagissant avec la membrane des hybridomes, il protège ces derniers contre le stress hydrodynamique (109,127). Une grande variété de surfactifs non ioniques a été testée sur des cultures cellulaires. L'addition de PEG à faibles doses, dans des milieux de culture sans sérum, permet une croissance cellulaire comparable à celle obtenue avec le même milieu de base supplémenté avec du SVF (148). De même, des travaux effectués au laboratoire avaient montré que de nombreux surfactifs utilisés à faible concentration, favorisaient la croissance cellulaire. Puisque de nombreux paramètres induisent un signal d'apoptose, nous avons pensé que l'action de surfactifs pourrait créer un signal d'apoptose. Ce phénomène a déjà été décrit dans la littérature (14) pour l'action du triton X-100. Nous avons appliqué la technique décrite dans ce dernier cas à une série de surfactifs originaux.

Les composés étudiés comportent un noyau  $\beta$ -lactame qui leur confère une activité antibiotique, comme pour les pénicillines, et pourraient agir sur des bactéries en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne. Des études complémentaires effectuées sur plus de 20 bactéries différentes ont montré que les

composés S8, S1 et S2 ont une faible activité antibiotique alors que les composés S5 et S7 présentent une activité sur 15 des 21 bactéries étudiées (107).

Les résultats que nous avons obtenus au chapitre Toxicologie nous ont permis de faire un classement des surfactifs en fonction de deux paramètres principaux : leur capacité à se dissoudre dans les milieux aqueux et la longueur des chaînes hydrophobes. Il avait déjà été montré que des surfactifs non ioniques ayant une chaîne hydrophobe supérieure à 10 atomes de carbone, étaient peu agressifs vis-à-vis des hybridomes (96).

Une exception a été trouvée pour un surfactif fluoré qui, malgré sa faible solubilité, s'est montré peu agressif vis-à-vis des cellules. Ce résultat est en accord avec ceux déjà trouvés au laboratoire pour d'autres surfactifs fluorés (145). Notons que ces derniers pourraient présenter un intérêt particulier pour leur propriété de transporteurs d'oxygène (132). En effet, certains composés fluorés se sont avérés être des transporteurs d'oxygène potentiels. Ils ne peuvent cependant être utilisés car ils sont très toxiques vis-à-vis de certaines cellules comme les macrophages (18). Cet exemple montre bien l'intérêt de la connaissance de la cytotoxicité de composés sur les cellules avant de les utiliser dans l'organisme.

Une seule étude a jusqu'à ce jour été réalisée pour évaluer la toxicité d'un surfactif en tenant compte de l'apoptose (14). Dans cette étude, il est montré que le Triton X-100 (PEG (9,6) p-t-octylphényl éther) n'est pas toxique à faible concentration. Au fur et à mesure que sa concentration augmente, il provoque l'apoptose puis la nécrose. Ce type d'action biologique dose-dépendante a été avancé par Corcoran et al (26). Ces résultats correspondent à ceux que nous avons trouvés.

L'étude que nous avons réalisée sur les surfactifs, amène quelques réflexions générales. En effet, la technique utilisée a consisté à incuber une suspension cellulaire dans une solution tamponnée du composé étudié. Les cellules, débarrassées du composé étudié, sont observées après un certain temps de culture. La présence de cellules nécrotiques indiquera une toxicité aiguë. A noter qu'un tel composé agit mécaniquement sur les membranes cellulaires comme nous l'avons

montré par des tests d'hémolyse de globules rouges. L'observation des cellules apoptotiques donnera de bons renseignements sur les dégâts que pourront provoquer les toxiques sur les cellules. A noter que cette toxicité est le reflet de la traduction d'un signal donné au niveau de la membrane cellulaire, signal qui provoque des métabolismes encore inconnus. Cette technique élimine un certain nombre de critiques faites aux essais toxicologiques réalisés *in vitro* (162), comme par exemple les interactions possibles des composés étudiés avec les nombreux composants des milieux de culture. La technique utilisée fait intervenir trois paramètres qui sont liés, à savoir la concentration en toxique, le temps d'incubation et le temps de culture, ceci pour une lignée cellulaire donnée. L'étude de ces paramètres donnera des renseignements intéressants sur l'utilisation de cette technique.

Nous avons utilisé plusieurs techniques qui permettent d'induire un signal d'apoptose. Dans les deux cas, action de la température, action de surfactifs, les pourcentages de cellules apoptotiques mesurés, l'induction du signal d'apoptose est dose dépendant. (Une étude que nous avons faite sur des cellules sanguines, en induisant l'apoptose par des doses variables de rayonnements  $\gamma$ , nous a montré le même phénomène). Il faut noter la nature différente des trois inductions. Comme nous l'avons vu dans le chapitre Toxicologie, les molécules S8 et S9 possèdent des structures identiques à une liaison chimique près (liaison amide pour S8 et ester pour S9). Le parallélisme de ces deux structures est à rapprocher de celui existant entre les céramides et les diacylglycérols qui diffèrent par le même type de liaison (cf. chapitre Toxicologie figure 5.3). Pour une concentration  $2,85 \cdot 10^{-4}$  M, le surfactif S8 induit deux fois plus d'apoptose que son homologue S9 (après une incubation d'une heure, deux jours de culture de l'hybridome HF2 x 653) (107). Le céramide naturel déclenche l'apoptose chez les cellules U937 dès  $0,001 \cdot 10^{-4}$  M (incubation de trois heures en utilisant le mélange éthanol/dodécane pour faire pénétrer le lipide dans les membranes plasmiques) (65). Il est impossible de comparer avec précision l'action de ces deux composés car trop de paramètres différents interviennent (matériel cellulaire, temps d'incubation et temps de

culture). Il serait très intéressant de pouvoir utiliser des tensioactifs analogues non métabolisables des diacylglycérols et des céramides pour étudier l'induction de l'apoptose par des molécules comme le TNF- $\alpha$ .

Toutes ces études sur l'apoptose nous montrent l'importance de ce phénomène dans les cultures cellulaires. La mise en évidence de ces phénomènes n'a pas été faite au début de notre travail. Il est certain que nous aurions trouvé des explications à un certain nombre de faits mis en évidence, comme par exemple, l'arrêt de la croissance de cellules au cours de l'adaptation dans un nouveau milieu.

## *VII. CONCLUSION*

Au cours de ce travail, nous avons tenté de cerner différents aspects des cultures d'hybridomes, et en particulier, l'amélioration des cultures en considérant trois paramètres principaux : les milieux de culture, les systèmes de culture et la mort cellulaire.

Dans une première partie, nous avons dégagé un certain nombre de considérations techniques concernant l'adaptation de trois hybridomes (A49, A64 et B146) à des cultures en milieu sans sérum. Nous avons tiré les conclusions suivantes :

- Les trois hybridomes étudiés peuvent être adaptés à des milieux sans sérum (RPMI+ULTROSER, BM-IBF ou BM-HSA) voire sans protéines (BM0) en quelques passages.
- Si le milieu de base est le même que celui de départ, on peut envisager une adaptation complète en quelques passages ; si le milieu est différent, il est préférable de réaliser un ou deux passages dans un milieu contenant le nouveau milieu de base supplémenté de SVF puis, d'abaisser graduellement le pourcentage en sérum.
- Un ralentissement de la croissance, une augmentation de la production d'anticorps d'où une augmentation de la productivité des cellules est observé dans un milieu sans sérum.

Il apparaît donc que l'utilisation des hybridomes à des milieux sans sérum, optimise la production en anticorps des cellules tout en modifiant la croissance cellulaire.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé la culture de trois hybridomes (AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19) dans trois systèmes de culture différents (boîtes, flacons à agitation et tubes à dialyse).

Les résultats sont difficilement comparables, car il faut tenir compte non seulement du type de cellule utilisée (semi-adhérente ou en suspension), mais aussi du type de système employé, ainsi que de l'agitation. On peut toutefois noter que la

croissance cellulaire et la production d'anticorps monoclonaux est fortement stimulée, pour les hybridomes OX 19, dans le système à tube à dialyse. Par ailleurs, les cellules semi-adhérentes présentent une meilleure croissance dans les spinners.

Pour toutes les cellules, la qualité du matériel génétique (estimée par empreinte génétique de l'ADN) reste stable quel que soit le système de culture. Cependant, dans les trois systèmes, nous avons constaté que l'ADN des hybridomes subissait une fragmentation qui s'accroît au fur et à mesure que le temps de culture avance. Ce phénomène est curieusement très atténué pour l'hétérohybridome HF2 x 653.

Nous avons réalisé ensuite une étude plus approfondie du système à base de tubes à dialyse. Nous avons testé avec succès la possibilité de cultiver 5 lignées d'hybridomes différents (3 hybridomes murins, 1 hybridome de rat, un hétérohybridome homme-souris). Au cours d'un travail non rapporté ici, nous avons montré que d'autres lignées cellulaires, en particulier, des cellules adhérentes, pouvaient être cultivées dans ce système. Nous avons également cultivé des hybridomes en utilisant un milieu sans sérum (A49 dans du milieu BM-HSA). Par ailleurs, l'activité de protéases cellulaires (pouvant dégrader les anticorps) a pu être montrée dans ces systèmes. Cette protéolyse peut être limitée en partie par l'addition d'inhibiteurs de protéases, en particulier l'aprotinine. Enfin, nous avons réalisé des modifications du système de culture de manière à augmenter son volume. Une étude de ce "scaling up" avec deux lignées d'hybridomes (12H8 et IM01BIS) montre que la concentration cellulaire et la production cellulaire peuvent ainsi être augmentées. Finalement, des améliorations récentes des systèmes sur le plan pratique (conception d'un portoir et d'un outil de manipulation) ont été réalisées au laboratoire. L'utilisation de ce système, en tant qu'outil de culture en masse d'hybridomes, paraît envisageable. Ce système serait utilisable pour la culture à petite échelle réalisée au niveau des laboratoires de recherche à l'aide d'ascites. En outre, la très grande maniabilité et le faible coût des cultures ainsi réalisées seraient appréciables.

En dernier lieu, nous avons étudié la mort cellulaire des hybridomes au cours des cultures cellulaires. Nous avons utilisé pour cela l'observation de la fragmentation de l'ADN par des endonucléases en "échelle de 180 pb" caractéristique du phénomène de mort cellulaire programmée ou apoptose. Nous avons distingué ce type de mort cellulaire de la nécrose. Les hybridomes apoptotiques et nécrotiques ont été différenciés en utilisant des intercalants de l'ADN, bromure d'éthidium/acridine orange, pour les comptages tenant compte de la morphologie, et l'iodure de propidium dans le cas de l'étude des cycles cellulaires.

Nous avons induit ce phénomène d'apoptose en utilisant des chocs thermiques, et des inhibiteurs de la synthèse des protéines (cycloheximide).

Nous avons montré que tous les hybridomes cultivés *in vitro* meurent par apoptose, même quand ils sont cultivés dans des milieux riches en SVF (cellules A49 et 12H8). Nous avons étudié ce phénomène d'apoptose spontanée sur une grande variété d'hybridomes (études réalisées à l'ECACC sur une trentaine de lignées) pour montrer que la majorité de ces derniers présente ce phénomène.

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'hétérohybridome homme-souris HF2 x 653 car cette cellule ne présente pas d'apoptose spontanément quel que soit le système de culture utilisé (boîtes, spinners, tubes à dialyse). De plus, différents chocs thermiques d'amplitude et de durée variables n'induisent pas la fragmentation de l'ADN (en échelle de 180 pb) chez cet hétérohybridome.

Pour les raisons citées précédemment, la lignée d'hétérohybridomes HF2 x 653 a été choisie comme matériel biologique dans une étude toxicologique. Une série de 9 surfactifs non-ioniques comportant un noyau  $\beta$ -lactame a été mise en présence de cellules HF2 x 653 et de globules rouges à différentes concentrations. L'apparition de mort cellulaire par apoptose et nécrose sur les hybridomes a été étudiée en même temps que le taux d'hémolyse des hématies a été mesuré. On a ainsi classé ces surfactifs en trois groupes suivant leur agressivité vis-à-vis des

cellules. Au cours de cette étude nous avons plus particulièrement remarqué deux composés de structure chimique très voisine (ayant comme différence, la nature d'une liaison chimique : ester ou amide). Le comportement de ces deux composés a été rapproché de celui de deux messagers secondaires (les diacylglycérols et les céramides), dont les structures chimiques se différencient également par une liaison ester ou amide. Ils sont impliqués dans des transductions de signaux, via les protéines kinase C, qui peuvent mener à la mort cellulaire par apoptose.

La partie concernant la synthèse et l'étude des surfactifs à noyau  $\beta$ -lactame est également en cours de publication (107).

Notre travail pourrait se poursuivre en envisageant un certain nombre de voies de recherches.

L'hétérohybridome homme-souris HF2 x 653 se présente comme un bon modèle pour comprendre le phénomène d'apoptose spontanée chez les hybridomes. Une étude visant à montrer l'expression des régulateurs de l'apoptose comme les couples *bcl-2/bax* et *bcl-x<sub>L</sub>/bcl-x<sub>S</sub>* sur ces cellules, paraît intéressante. Par ailleurs, l'expression de l'apoptose sur d'autres lignées d'hétérohybridomes créés avec des partenaires de fusion d'origine animale, serait à entreprendre. Pour optimiser la production d'anticorps monoclonaux, il peut être envisagé d'utiliser des hybridomes transfectés avec des gènes (comme le gène *bcl-2*) inhibiteurs de l'apoptose.

L'étude de l'utilisation des surfactifs, dans les recherches sur l'apoptose, est poursuivie actuellement en synthétisant des molécules surfactives fluorescentes (ce qui permettra de les localiser dans la cellule). De telles molécules, analogues des DAG et des céramides, seraient utiles pour l'étude des mécanismes d'action de substances tels le TNF- $\alpha$  qui induisent la mort cellulaire par apoptose et la transduction du signal d'apoptose.

Enfin, l'utilisation de l'induction de l'apoptose dans la détermination de la toxicité de composés nouvellement synthétisés, serait à développer.

## VIII. BIBLIOGRAPHIE

1. Adamson, S. R., S. L. Fritzpatrick, L. A. Behie, G. M. Gaucher, and B. H. Lesser. 1983. *In vitro* production of high titre monoclonal antibody by hybridoma cells in dialysis culture. *Biotechnol. Lett.* 5:573.
2. Adebodun, F. and J. F. M. Post. 1994.  $P^{31}$  NMR Characterization of cellular metabolism during dexamethasone induced apoptosis in human leukemic cell lines. *J. Cell. Physiol.* 158:180.
3. Al-Rubeai, M., R. P. Singh, A. N. Emery, and Z. Zhang. 1995. Cell cycle and cell size dependence of susceptibility to hydrodynamic forces. *Biotechnol. Bioeng.* 46:88.
4. Al-Rubeai, M., R. P. Singh, M. H. Goldman, and A. N. Emery. 1995. Death mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation. *Biotechnol. Bioeng.* 45:463.
5. Alanen, K. A., P. J. Klemi, S. Taimela, and H. Joensuu. 1989. A simple preservative for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 10:86.
6. Alles, A., K. Alley, J. C. Barrett, R. Buttyan, A. Columbano, F. O. Cope, E. A. Copelan, R. C. Duke, P. B. Farel, L. E. Gershenson, D. Goldgaber, D. R. Green, K. V. Honn, J. Hully, J. T. Isaacs, J. F. R. Kerr, P. H. Krammer, R. A. Lockshin, D. P. Martin, D. J. McConkey, J. Michaelson, R. Schulte-Hermann, A. C. Server, B. Szende, L. D. Tomei, T. R. Tritton, S. R. Unansky, K. Valerie, and H. R. Warner. 1991. Apoptosis: a general comment. *FASEB J.* 5:2127.
7. Amati, B., T. D. Littlewood, G. I. Evan, and H. Land. 1993. The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *EMBO J.* 12:5083.
8. Ashman, R. F., D. W. Peckham, D. Mower, M. Wilson, and L. Stunz. 1995. Interactions between regulatory agents in the control of a cell apoptosis. *FASEB J.* 9:A814.

9. Bansal, N., A. Houle, and G. Melnykovich. 1993. Apoptosis: mode of cell death induced in T cell leukemia lines by dexamethasone and other agents. *FASEB J.* 5:211.
10. Barinaga, G. M. 1994. Cell suicide: by ICE, not FIRE. *Science* 263:754.
11. Barserghian, G., T. Papoian, D. L. Hwang, A. Roitman, and A. Lev-Ran. 1984. Ethanolamine mimics insulin effects *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121:413.
12. Bellomo, G., M. Perotti, and F. R. Taddei. 1992. Tumor necrosis factor alpha induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration and DNA fragmentation. *Cancer Res.* 52:1342.
13. Boise, L. H., M. González-García, C. E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L. A. Turka, X. Mao, G. Nuñez, and C. B. Thompson. 1993. *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74:597.
14. Borner, M. M., E. Schneider, F. Pirnia, O. Sartor, J. B. Trepel, and C. E. Myers. 1994. The detergent Triton X-100 induces a death pattern in human carcinoma cell lines that resembles cytotoxic lymphocyte-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 353:129.
15. Brewin, N. J., J. G. Robertson, E. A. Wood, B. Wells, A. P. Larkins, G. Galfre, and G. W. Butcher. 1985. Monoclonal antibodies to antigens in the peribacteroid membrane from Rhizobium-induced root nodules of pea cross-react with plasma membranes and Golgi bodies. *EMBO J.* 4:605.
16. Brown, G. D. A., C. Hulme, P. D. Hyland, and I. J. Mitchell. 1994. Cell suicide in the developing nervous system: A functional neural network model. *Cognit. Brain Res.* 2:71.
17. Brunner, T., R. J. Mogil, D. LaFace, N. J. Yoo, A. Mahboubi, F. Echeverri, S. J. Martin, W. R. Force, D. H. Lynch, C. F. Ware, and D. R. Green. 1995. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Letters to nature* 373:441.

18. Bucala, R., M. Kawakami, and A. Cerami. 1983. Cytotoxicity of a perfluorocarbon blood substitute to macrophages *in vitro*. *Science* 220:965.
19. Carrel, A. and M. T. Burrows. 1910. Cultivation of adult tissues and organs outside of the body. *J. Am. Med. Ass.* 55:1379.
20. Chandler, J. P. 1990. Cultivation of mammalian cells in serum-free medium. *Am. Biotechnol. Lab.* 1:18.
21. Chua, F., S. K. W. Oh, M. Yap, and W. K. Teo. 1994. Enhanced IgG production in eRDF media with and without serum. A comparative study. *J. Immunol. Methods* 167:109.
22. Chua, F. K. F., M. G. S. Yap, and S. K. W. Oh. 1994. Hyper-stimulation of monoclonal antibody production by high osmolarity stress in eRDF medium. *J. Biotechnol.* 37:265.
23. Clark, S. A., D. Looby, and J. B. Griffiths. 1991. The adaptation of hybridoma cell lines to grow and secrete monoclonal antibody in serum-free/defined medium. In J.B. Spier, J.B. Griffiths and B. Meignier, eds. ESACT BUTTERWORTH-HEINEMANN, Oxford, p. 291.
24. Cohen, G. M., X.-M. Sun, H. O. Fearnhead, M. MacFarlane, D. G. Brown, R. T. Snowden, and D. Dinsdale. 1994. Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J. Immunol.* 153:507.
25. Cohen, J. J., R. C. Duke, V. A. Fadok, and K. S. Sellins. 1992. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 10:267.
26. Corcoran, G. B., L. Fix, D. P. Jones, M. T. Moslen, P. Nicotera, F. A. Oberhammer, and R. Buttyan. 1994. Apoptosis: Molecular control point in toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128:169.
27. Cowan, N. J., D. S. Secher, and C. Milstein. 1974. Intracellular immunoglobulin chain synthesis in non-secreting variants of a mouse myeloma: Detection of an inactive light-chain messenger RNA. *J. Mol. Biol.* 90:691.

28. Dallman, M. J., D. W. Mason, and M. Webb. 1982. The roles of host and donor cells in the rejection of skin allografts by T cells-deprived rats injected with syngeneic T cells. *Eur. J. Immunol.* 12:511.
29. Davis, W. C. and G. S. Splitter. 1991. Individual antigens of cattle-Bovine CD2 (BoCD2). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 27:43.
30. Del Bino, G., S. Bruno, P. N. Yi, and Z. Darzynkiewicz. 1992. Apoptotic cell death triggered by camptothecin or teniposide. The cell cycle specificity and effects of ionizing radiation. *Cell Prolif.* 25:537.
31. Duke, R. C. and J. J. Cohen. 1992. Morphological and biochemical assays of apoptosis. In *Current protocols in immunology*. K. Janssen, ed. Wiley, New York, p. 3.17.1.
32. Dumas D.(1991) Adaptation d'une souche d'hybridomes à différents milieux de base en vue d'une production d'anticorps en masse. D.E.A. Université de Nancy I.
33. Duval, D., C. Demangel, I. Geahel, K. Blondeau, and A. Marcaret. 1990. Comparison of various methods for monitoring hybridoma cell proliferation. *J. Immunol. Methods* 134:177.
34. Eagle, H. 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 122:501.
35. Eagle, H. 1955. The minimum vitamins requirements of the L and HeLa cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies and their cure. *J. Exp. Med.* 102:595.
36. Edwards, S. N. and A. M. Tolkovsky. 1994. Characterization of apoptosis in cultured rat sympathetic neurons after nerve growth factor withdrawal. *J. Cell. Biol.* 124:537.
37. Eischen, C. M., C. J. Dick, and P. J. Leibson. 1994. Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis. *J. Immunol.* 153:1947.
38. Ellis, H. M. and H. R. Horvitz. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44:817.

39. Eumont E. (1989) Etudes préliminaires de production d'anticorps monoclonaux par cultures d'hybridomes dans des tubes à dialyse. DEA de Génie Biologique. Université de Nancy I.
40. Eyl, V., S. Muller, M. Donner, M. Maugras, and J.-F. Stoltz. 1992. Use of fluorescence anisotropy determinations for indicating the physiological status of hybridoma cell cultures. *Cytotechnology* 8:5.
41. Falkenberg, F. W., T. Hengelage, M. Krane, I. Bartels, A. Albrecht, N. Holtmeier, and M. Wüthrich. 1993. A simple and inexpensive high density dialysis tubing cell culture system for the *in vitro* production of monoclonal antibodies in high concentration. *J. Immunol. Methods* 165:193.
42. Fearnhead, H. O., M. Chwalinski, R. T. Snowden, M. G. Ormerod, and G. M. Cohen. 1994. Dexamethasone and etoposide induce apoptosis in rat thymocytes from different phases of the cell cycle. *Biochem. Pharmacol.* 48:1073.
43. Fenge, C., C. Klein, C. Heuer, U. Siegel, and E. Fraune. 1993. Agitation, aeration and perfusion modules for cell culture bioreactors. *Cytotechnology* 11:233.
44. Fraker, P. J., F. Osati-Ashtiani, M. A. Wagner, and L. E. King. 1995. Possible roles for glucocorticoids and apoptosis in the suppression of lymphopoiesis during zinc deficiency: A review. *J. Am. Coll. Nutr.* 14:11.
45. Franek, F. and J. Dolniková. 1991. Nucleosomes occurring in protein-free hybridoma cell culture. Evidence for programmed cell death. *FEBS Lett.* 2:285.
46. Galfrè, G., C. Milstein, and B. Wright. 1979. Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG. *Nature* 277:131.
47. Galli, G. and M. Fratelli. 1993. Activation of apoptosis by serum deprivation in a teratocarcinoma cell line: inhibition by L-acétylcarnitine. *Exp. Cell Res.* 204:54.
48. Garcia-Valenzuela, E., W. Gorczyca, Z. Darzynkiewicz, and S. C. Sharma. 1994. Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy. *J. Neurobiol.* 25:431.

49. Geier, A., M. Haimshon, R. Beery, R. Hemi, and B. Lunenfeld. 1992. Insulin-like growth factor-1 inhibits cell death induced by cycloheximide in MCF-7 cells: A model system for analyzing control of cell death. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28:725.
50. Glacken, M. W., R. J. Fleischaker, and A. J. Sinskey. 1986. Reduction of waste product excretion via nutrient control : possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* 28:1376.
51. Glassy, M. C., J. P. Tharakan, and P. C. Chau. 1988. Serum free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* 32:1015.
52. Goding, J. W. 1980. Antibody production by hybridomas. *J. Immunol. Methods* 39:285.
53. Gong, J., X. Li, and Z. Darzynkiewicz. 1993. Different patterns of apoptosis of HL-60 cells induced by cycloheximide and camptothecin. *J. Cell. Physiol.* 157:263.
54. Gordon, N. 1995. Apoptosis (programmed cell death) and other reasons for elimination of neurons and axons. *Brain Dev.* 17:73.
55. Greenberg, J. T., A. Guo, D. F. Klessig, and F. M. Ausubel. 1994. Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77:551.
56. Griffiths, J. B. 1987. Serum and growth factors in cell culture media - an introductory review. *Develop. Biol. Standard.* 66:155.
57. Griffiths, J. B. 1992. Animal cell culture processes - batch or continuous? *J. Biotechnol.* 22:21.
58. Hannun, Y. A. and L. M. Obeid. 1995. Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* 20:73.
59. Harris, H. and R. Sutherland. 1943. L929 cells. *J. Nat. Canc. Inst.* 4:165.
60. Harrison, R. F. 1907. Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 4:140.

61. Hengartner, M. O. and H. R. Horvitz. 1994. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4:581.
62. Hotz, M. A., J. P. Gong, F. Traganos, and Z. Darzynkiewicz. 1994. Flow cytometric detection of apoptosis - Comparison of the assays of *in situ* DNA degradation and chromatin changes. *Cytometry* 15:237.
63. Jacobson, M. D. and G. I. Evan. 1994. Apoptosis: Breaking the ICE. *Curr. Biol.* 4:337.
64. Jarvis, W. D., R. N. Kolesnick, F. A. Fornari, R. S. Traylor, D. A. Gewirtz, and S. Grant. 1994. Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:73.
65. Ji, L., G. Zhang, S. Uematsu, Y. Akahori, and Y. Hirabayashi. 1995. Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death by natural ceramide. *FEBS Lett.* 358:211.
66. Jordan, M., H. Sucker, A. Einsele, F. Widmer, and H. M. Eppenberger. 1994. Interactions between animal cells and gas bubbles: The influence of serum and pluronic F68 on the physical properties of the bubble surface. *Biotechnol. Bioeng.* 43:446.
67. Kahn, A. 1994. Cycle cellulaire, cancer, sénescence et p53. *M/S* 10:206.
68. Käzehagen, C., F. Linz, G. Kretzmer, T. Sheper, and K. Schügerl. 1991. Metabolism of hybridoma cells and antibody secretion at high cell densities in dialysis tubing. *Enzyme Microb. Technol.* 13:873.
69. Kearney, J. F., A. Radbruch, B. Liesegang, and K. Rajewsky. 1979. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* 123:1548.
70. Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239.

71. King, L. B., R. Hunziker, D. H. Margulies, and J. D. Ashwell. 1995. A targeted glucocorticoid receptor antisense transgene enhances apoptotic thymocyte deletion. *FASEB J.* 9:A778.
72. Kluck, R. M., D. E. Chapman, M. Egan, C. A. McDougall, B. V. Harmon, D. J. Moss, J. F. R. Kerr, and J. W. Halliday. 1993. Spontaneous apoptosis in NS-1 myeloma cultures: Effects of cell density, conditioned medium and acid pH. *Immunobiology* 188:124.
73. Knight, P. 1989. Hollow fiber bioreactors for mammalian cell culture. *Biotechnology* 7:459.
74. Kobayashi, T., T. Tominaga, and T. Yoshimoto. 1994. Cell death due to ACNU-induced DNA fragmentation: Inhibition by cycloheximide. *J. Neurooncol.* 22:23.
75. Koering, M. J., D. R. Danforth, and G. D. Hodgen. 1994. Early follicle growth in the juvenile macaca monkey ovary - The effects of estrogen priming and follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.* 50:686.
76. Köhler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495.
77. Köhler, G. and C. Milstein. 1976. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 6:511.
78. Kragh-Hansen, U. 1990. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Danish Medical Bulletin* 37:57.
79. Krammer, P. H., I. Behrmann, P. Daniel, J. Dhein, and K.-M. Debatin. 1994. Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 6:279.
80. Kulkarni, G. V. and C. A. G. McCulloch. 1994. Serum deprivation induces apoptotic cell death in a subset of Balb/c 3T3 fibroblasts. *J. Cell Sci.* 107:1169.
81. Kumar, S., M. Kinoshita, M. Noda, N. G. Copeland, and N. A. Jenkins. 1994. Induction of apoptosis by the mouse *Nedd2* gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-3* and the mammalian IL-1 $\beta$ -converting enzyme. *Genes Dev.* 8:1613.

82. Leblanc, M., J. G. Riess, D. Poggi, and R. Follana. 1985. Use of lymphoblastoid Namalva cell cultures in a toxicity test. Application to the monitoring of detoxification procedures for fluorocarbons to be used as intracellular oxygen carriers. *Pharm. Res.* 5:246.
83. Lee, G. M. and S. Y. Park. 1995. Enhanced specific antibody productivity of hybridomas resulting from hyperosmotic stress is cell line-specific. *Biotechnol. Lett.* 17:145.
84. Leelavatcharamas, V., A. N. Emery, and M. Al-Rubeai. 1994. Growth and interferon-gamma production in batch culture of CHO cells. *Cytotechnology* 15:65.
85. Linardos, T. I., N. Kalogerakis, and L. A. Behie. 1992. Monoclonal antibody production in dialysis continuous suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.* 39:504.
86. Liscovitch, M. and L. C. Cantley. 1994. Lipid second messengers. *Cell* 77:329.
87. Lohmann, R. D. and D. Beyersmann. 1994. Effects of zinc and cadmium on apoptotic DNA fragmentation in isolated bovine liver nuclei. *Environ. Health Perspect.* 102 Suppl. 3:269.
88. Lowrey, D., S. Murphy, and R. A. Goffe. 1994. A comparison of monoclonal antibody productivity in different hollow fiber bioreactors. *J. Biotechnol.* 36:35.
89. Lucas, M., F. Solano, and A. Sanz. 1993. Induction of programmed cell death (apoptosis) in mature lymphocytes. *FEBS Lett.* 279:19.
90. Marti, A., B. Jehn, E. Costello, N. Keon, G. Ke, F. Martin, and R. Jaggi. 1994. Protein kinase A and AP-1 (c-Fos/JunD) are induced during apoptosis of mouse mammary epithelial cells. *Oncogene* 9:1213.
91. Martin, S. J. and D. R. Green. 1995. Apoptosis and cancer: The failure of controls on cell death and cell survival. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 18:137.

92. **Mathiot B.**(1992) Etudes de méthodes de culture et de milieux contenant des protéines humaines pour la production d'anticorps monoclonaux. Thèse. Université de Nancy I.
93. **Mathiot, B., M. Dusch, M. Maugras, and J.-F. Stoltz.** 1990. Comparaison de différents milieux de cultures cellulaires. Aspects techniques et économiques. *Innov. Tech. Biol. Med.* 11:65.
94. **Mathiot, B., A. Perani, D. Dumas, M. Maugras, J. Didelon, and J.-F. Stoltz.** 1993. Increase of hybridoma productivity using an original dialysis culture system. *Cytotechnology* 11:41.
95. **Maugras, M., C. Janot, M. Dusch, M. Pfister, F. Streiff, and J.-F. Stoltz.** 1987. Préparation d'anticorps monoclonaux anti-A et anti-B (Système ABO). *Ann. Med. Nan. Est* 26:427.
96. **Maugras, M., J.-F. Stoltz, C. Selve, M. Mounni, and J.-J. Delpuech.** 1989. Préparation et première évaluation de l'agressivité d'une nouvelle classe de surfactifs fluorés par examen de la viabilité cellulaire d'une lignée d'hybridomes. *Innov. Tech. Biol. Med.* 10:145.
97. **Märkl, H., M. Lechner, and F. Götz.** 1990. A new dialysis fermentor for the production of high concentrations of extracellular enzymes. *J. Ferment. Bioeng.* 69:244.
98. **Mercille, S. and B. Massie.** 1994. Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnol. Bioeng.* 44:1140.
99. **Merten, O.-W., J. V. Kierulff, N. Castignolles, and P. Perrin.** 1994. Evaluation of the new serum-free medium (MDSS2) for the production of different biologicals: Use of various cell lines. *Cytotechnology* 14:47.
100. **Merten, O.-W. and J. Litwin.** 1991. Serum-free medium for fermentor cultures of hybridomas. *Cytotechnology* 5:69.
101. **Migliorati, G., I. Nicoletti, F. Dadamio, A. Spreca, C. Pagliacci, and C. Riccardi.** 1994. Dexamethasone induces apoptosis in mouse natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 81:21.

102. Miloshev, G., P. Venkov, K. Van Holde, and J. Zlatanova. 1994. Low levels of exogenous histone H1 in yeast cause cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11567.
103. Mochizuki, K., S. Sato, M. Kato, and S. Hashizume. 1993. Enhanced production of human monoclonal antibodies by the use of fructose in serum-free hybridoma culture media. *Cytotechnology* 13:161.
104. Moellering, B. J., J. L. Tedesco, R. R. Townsend, M. R. Hardy, R. W. Scott, and C. P. Prior. 1990. Electrophoretic differences in a MAb expressed in three media. *Biopharm.* 3:30.
105. Mogil, R. J., Y. F. Shi, R. P. Bissonnette, P. Bromley, I. Yamaguchi, and D. R. Green. 1994. Role of DNA fragmentation in T cell activation-induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* 152:1674.
106. Mohan, S. B., S. R. Chohan, J. Eade, and A. Lyddiatt. 1993. Molecular integrity of monoclonal antibodies produced by hybridoma cells in batch culture and in continuous-flow culture with integrated product recovery. *Biotechnol. Bioeng.* 42:974.
107. Molina, L., A. Perani, M.-R. Infante, M.-A. Manresa, M. Maugras, S. Achilefu, M. J. Stebe, and C. Selve. 1995. Bioactive surfactants containing a  $\beta$ -lactam group: Synthesis and properties. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* :1279
108. Mowles, J. M. 1990. Mycoplasma detection. In *Animal cell culture*. J.W. Pollard and J.M. Walkers, eds. The Humana Press Inc, New Jersey (USA),
109. Murhammer, D. W. and C. F. Goochee. 1990. Structural features of nonionic polyglycol polymer molecules responsible for the protective effect in sparged animal cell bioreactors. *Biotechnol. Prog.* 6:142.
110. Naito, T., K. Kusano, and I. Kobayashi. 1995. Selfish behavior of restriction-modification systems. *Science* 267:897.
111. Negri, C., R. Bernardi, A. Braghetti, G. C. B. A. Ricotti, and A. I. Scovassi. 1993. The effect of the chemotherapeutic drug Vp-16 on poly(ADP-ribosylation) in apoptotic HeLa cells. *Carcinogenesis* 14:2559.

112. Obeid, L. M., C. M. Linardic, L. A. Karolak, and Y. A. Hannun. 1993. Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259:1769.
113. Oh, D. J. and H. N. Chang. 1992. High density culture of hybridoma cells in a dual hollow fiber bioreactor. *Biotechnol. Techniques* 6:77. .
114. Oltvai, Z. N., C. L. Milliman, and S. J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609.
115. Owenschaub, L. B., R. Radinsky, E. Kruzel, K. Berry, and S. Yonehara. 1994. Anti-fas on nonhematopoietic tumors - levels of fas/Apo-1 and bcl-2 are not predictive of biological responsiveness. *Cancer Res.* 54:1580.
116. Ozato, K. and D. H. Sachs. 1981. Monoclonal antibodies to mouse MHC antigens - III. Hybridoma antibodies reacting to antigens of the H-2<sup>b</sup> haplotype reveal genetic control of isotype expression. *J. Immunol.* 126:317.
117. Ozturk, S. S. and B. O. Palsson. 1990. Loss of antibody productivity during long-term cultivation of a hybridoma cell line in low serum and serum free media. *Hybridoma* 9:167.
118. Ozturk, S. S. and B. O. Palsson. 1991. Physiological changes during the adaptation of hybridoma cells to low serum and serum-free media. *Biotechnol. Bioeng.* 37:35.
119. Pannell, R. and C. Milstein. 1992. An oscillating bubble chamber for laboratory scale production of monoclonal antibodies as an alternative to ascitic tumors. *J. Immunol. Methods* 146:43.
120. Peitsch, M. C., H. G. Mannherz, and J. Tschopp. 1994. The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death? *Trends Cell Biol.* 4:37.
121. Perani A.(1991) Comparaison de trois souches d'hybridomes : Adaptation à un milieu sans sérum et production en masse. DEA. INPL.
122. Perani, A., L. Molina, G. N. Stacey, M.-R. Infante, C. Selve, and M. Maugras. 1995. Mechanism of cell death due to surfactant toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (submitted):

123. Piacentini, M., M. Fesus, M. C. Farrace, L. Ghibelli, L. Prelredda, and G. Melino. 1991. The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer lines is related with the programmed cell death (apoptosis). *Eur. J. Cell Biol.* 54:246.
124. Pittman, R. N., S. Wang, A. J. DiBenedetto, and J. C. Mills. 1993. A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death. *J. Neurosci.* 13:3669.
125. Prins, J. B., N. I. Walker, C. M. Winterford, and D. P. Cameron. 1994. Apoptosis of human adipocytes *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201:500.
126. Radford, K., W. Niloperbowo, S. Reid, and P. F. Greenfield. 1991. Weaning of three hybridoma cell lines to serum free low protein medium. *Cytotechnology* 6:65.
127. Ramírez, O. T. and R. Mutharasan. 1990. The role of the plasma membrane fluidity on the shear sensitivity of hybridomas grown under hydrodynamic stress. *Biotechnol. Bioeng.* 36:911.
128. Ramírez, O. T. and R. Mutharasan. 1992. Effect of serum on the plasma membrane fluidity of hybridomas : an insight into its shear protective mechanism. *Biotechnol. Prog.* 8:40.
129. Regnault, V., C. Rivat, M. Pfister, and J.-F. Stoltz. 1991. Monoclonal antibodies against human protein C and their uses for immunoaffinity chromatography. *Thrombosis Research* 63:629.
130. Renard, J. M., R. Spagnoli, C. Mazier, M. F. Salles, and E. Mandine. 1988. Evidence that monoclonal antibody production kinetics is related to the integral of the viable cells curve in batch systems. *Biotechnol. Lett.* 2:91.
131. Revoltella, R. P., F. Borney, B. Dal Canto, and C. M. D'Urso. 1993. Apoptosis of serum-free C2.8 mouse embryo hepatocytic cells caused by hepatocyte growth factor deprivation. *Cytotechnology* 13:13.

132. Riess, J. G. 1988. Fluorocarbon emulsions for *in vivo* oxygen delivery. The decisive role expected of the surfactant in future progress. *2e Congrès mondial des agents de surface*. 4:256.
133. Rinner, I., P. Felsner, D. Hofer, A. Globerson, and K. Schauenstein. 1995. Characterization of spontaneous apoptosis of rat thymus cells. *FASEB J*. 9:A815.
134. Rose, C. D. and R. C. Henneberry. 1993. Mechanisms of programmed cell death and their implications for the brain. *Neurodegeneration* 2:287.
135. Rottem, S. and M. F. Barile. 1993. Beware of mycoplasmas. *Tibtech* 11:143.
136. Rubin, L. L., K. L. Philpott, and S. F. Brooks. 1993. Apoptosis: The cell cycle and the cell death. *Curr. Opin. Immunol.* 3:391.
137. Russell, J. H., B. Rush, C. Weaver, and R. Wang. 1993. Mature T cells of autoimmune *lpr/lpr* mice have a defect in antigen-stimulated suicide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4409.
138. Schepers, A., D. Pich, and W. Hammerschmidt. 1993. A transcription factor with homology to the AP-1 family links RNA transcription and DNA replication in the lytic cycle of Epstein-Barr virus. *EMBO J*. 12:3921.
139. Schneider, Y.-J. 1989. Optimisation of hybridoma cell growth and antibody secretion in a chemically defined, serum- and protein-free culture medium. *J. Immunol. Methods* 116:65.
140. Schneider, Y.-J. and A. Lavoix. 1991. Monoclonal antibody production in semi-continuous serum- and protein-free culture; effect of glutamine concentration and culture conditions on cell growth and antibody secretion. *J. Immunol. Methods* 129:251.
141. Schönherr, O. T. and E. H. Houwink. 1984. Antibody engineering, a strategy for the development of monoclonal antibodies. *Anto. Leeuwenhoek* 50:597.
142. Schönherr, O. T., P. T. J. A. Van Gelder, P. J. Van Hees, A. M. J. M. Van Os, and H. W. M. Roelofs. 1987. A hollow fiber dialysis system for the *in*

- in vitro* production of monoclonal antibodies replacing *in vivo* production in mice. *Develop. Biol. Standard.* 66:211.
143. Schwartz, L. M., M. E. E. Jones, L. Kosz, and K. Kuah. 1993. Selective repression of actin and myosin heavy chain expression during the programmed death of insect skeletal muscle. *Dev. Biol.* 158:448.
144. Schwartz, L. M., S. W. Smith, M. E. E. Jones, and B. A. Osborne. 1993. Do all programmed cell death occur via apoptosis? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:980.
145. Selve, C., F. Hamdoune, J.-C. Ravey, J.-J. Delpuech, S. Ramzaoui, B. Lakhssassi, M. Maugras, and J.-F. Stoltz. 1989. Préparation d'alkylfluorolipopeptides et évaluation de leur agressivité sur culture cellulaire d'une lignée d'hybridomes. *Innov. Tech. Biol. Med.* 10:145.
146. Shi, L., W. K. Nishioka, J. Thng, E. M. Bradbury, D. W. Litchfield, and A. H. Greenberg. 1994. Premature p34<sup>(cdc2)</sup> activation required for apoptosis. *Science* 263:1143.
147. Shinmoto, H. and S. Dosako. 1993. Adaptation of mouse-human hybridomas to a protein free medium. *Biotechnol. Lett.* 15:327.
148. Shintani, Y., K. Iwamoto, and K. Kitano. 1988. Polyethylene glycols for promoting the growth of mammalian cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27:533.
149. Shulman, M., C. D. Wilde, and G. Köhler. 1978. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* 276:269.
150. Sikora, E., E. Grassilli, E. Radziszewska, E. Bellesia, D. Barbieri, and C. Franceschi. 1993. Transcription factors DNA-binding activity in rat thymocytes undergoing apoptosis after heat-shock or dexamethasone treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197:709.
151. Singh, R. P., M. Al-Rubeai, C. D. Gregory, and A. N. Emery. 1994. Cell death in bioreactors: A role for apoptosis. *Biotechnol. Bioeng.* 44:720.
152. Sjögren Jansson, E., C. Gustafsson, S. Jeansson, U. Karlsson, and N. Lycke. 1994. Production of large amounts of recombinant interleukins by

- cDNA transfected mouse myeloma cells cultured in dialysis tubing. *J. Immunol. Methods* 168:131.
153. **Sjögren Jansson, E. and S. Jeansson.** 1985. Large-scale production of monoclonal antibodies in dialysis tubing. *J. Immunol. Methods* 84:359.
154. **Sjögren Jansson, E., M. Ohlin, C. Borrebaeck, and S. Jeansson.** 1991. Production of human monoclonal antibodies in dialysis tubing. *Hybridoma* 10:411.
155. **Smeyne, R. J., M. Vendrell, M. Hayward, S. J. Baker, G. G. Miao, K. Schilling, L. M. Robertson, T. Curran, and J. I. Morgan.** 1993. Continuous *c-fos* expression precedes programmed cell death *in vivo*. *Nature* 363:166.
156. **Smith, J. C., C. R. Newton, A. Alves, R. Anvar, D. Jenner, and A. F. Markham.** 1990. Highly polymorphic minisatellite probes. Further evaluation for individual identification and paternity testing. *J. Forensic Science Soc.* 30:3.
157. **Solis-Recendez M. G.**(1993) Etude de l'évolution d'hybridomes (12H8) au cours du temps, de leur production d'anticorps monoclonaux et de la présence de proteases dans les cultures. DEA. INPL.
158. **Solis-Recendez, M. G., A. Perani, B. D'Habit, G. N. Stacey, and M. Maugras.** 1995. Hybridoma cell cultures continuously undergo apoptosis and reveal a novel 100 bp DNA fragment. *J. Biotechnol.* 38:117.
159. **Stacey, G. N., B. J. Bolton, and A. Doyle.** 1991. The quality control of cell banks using DNA fingerprinting. In *DNA fingerprinting approaches and applications*. T. Burke, G. Dolf, A.J. Jeffreys and R. Wolff, eds. Birkhauser Verlag, Basel (Switzerland), p. 361.
160. **Stacey, G. N., B. J. Bolton, and A. Doyle.** 1992. DNA fingerprint transforms the art of cell authentication. *Nature* 357:261.
161. **Sun, X. M., R. T. Snowden, D. Dinsdale, M. G. Ormerod, and G. M. Cohen.** 1994. Changes in nuclear chromatin precede internucleosomal DNA cleavage in the induction of apoptosis by etoposide. *Biochem. Pharmacol.* 47:187.

162. Syversten, T. 1990. Factors important to the quality of cell culture toxicology. *Scand. Cell Toxicology Congress. 12.* 234.
163. Takayama, S., T. Sato, S. Krajewski, K. Kochel, S. Irie, J. A. Millan, and J. C. Reed. 1995. Cloning and functional analysis of BAG-1: A novel bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 79.
164. Todd, R. D. and W. T. Garrard. 1979. Overall pathway of nucleosome production. *J. Biol. Chem.* 254:3074.
165. Tortosa, A., R. Rivera, and I. Ferrer. 1994. Dose-related effects of cycloheximide on delayed neuronal death in the gerbil hippocampus after bilateral transitory forebrain ischemia. *J. Neurol. Sci.* 121:10.
166. Tsubata, T., M. Murakami, and T. Honjo. 1994. Antigen-receptor cross-linking induces peritoneal B-cell apoptosis in normal but not autoimmunity-prone mice. *Curr. Biol.* 4:8.
167. Tsujimoto, Y., L. R. Finger, J. Yunis, P. C. Novell, and C. M. Croce. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of the neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226:1097.
168. Voisin, P., V. Eyl, S. Muller, M. Donner, M. Maugras, and J.-F. Stoltz. 1990. Cell cycle analysis of hybridoma cell cultures: study by cytofluorometry. *Comptes Rendus Acad. Sci.* 8:17.
169. Vomastek, T. and F. Franek. 1993. Kinetics of development of spontaneous apoptosis in B cell hybridoma cultures. *Immunol. Lett.* 35:19.
170. Wang, L., M. Miura, L. Bergeron, H. Zhu, and J. Yuan. 1994. *Ich-1*, an *Ice/ced-3*-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 78:739.
171. Werner, R. and W. Berthold. 1988. Purification of proteins produced by technological process. *Arzneim. Forsch/drug. Res.* 38:422.
172. White, K., M. E. Grether, J. M. Abrams, L. Young, K. Farrell, and H. Steller. 1994. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 264:677.

173. Wood, A. C., C. M. Waters, A. Garner, and J. A. Hickman. 1994. Changes in *c-myc* expression and the kinetics of dexamethasone-induced programmed cell death (apoptosis) in human lymphoid leukaemia cells. *Br. J. Cancer* 69:663.
174. Wu, J. and M. F. A. Goosen. 1995. Evaluation of the killing volume of gas bubbles in sparged animal cell culture bioreactors. *Enzyme Microb. Technol.* 17:241.
175. Wyllie, A. H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555.
176. Yang, E., J. Zha, J. Jockel, L. H. Boise, C. B. Thompson, and S. J. Korsmeyer. 1995. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-x<sub>L</sub> and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80:285.
177. Yin, D. L., S. Kondo, J. Takeuchi, and T. Morimura. 1994. Induction of apoptosis in murine ACTH-secreting pituitary adenoma cells by bromocriptine. *FEBS Lett.* 339:73.
178. Yonish-Rouach, E., D. Resnitzky, J. Lotem, L. Sachs, A. Kimchi, and M. Oren. 1991. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Letters to nature* 352:345.
179. Yuan, J., S. Shaham, S. Ledoux, H. M. Ellis, and H. R. Horvitz. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. *Cell* 75:641.
180. Zhiotovskiy, B., D. Wade, A. Gahm, S. Orrenius, and P. Nicotera. 1994. Formation of 50 kbp chromatin fragments in isolated liver nuclei is mediated by protease and endonuclease activation. *FEBS Lett.* 351:150.

*IX. ANNEXE*

ANNEXE - COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

| <i>Composant (mg/l)</i>                               | <i>RPMI</i> | <i>DMEM</i> | <i>F12</i> | <i>JOKLIK</i> |
|---|-------------|-------------|------------|---------------|
| <b>SELS INORGANIQUES</b>                              |             |             |            |               |
| CaCl <sub>2</sub> (anhyd.)                            | -           | 200,00      | 33,22      | -             |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O | 100,00      | -           | -          | -             |
| CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O                 | -           | -           | 0,003      | -             |
| Fe(NO <sub>3</sub> ) . 9H <sub>2</sub> O              | -           | 0,10        | -          | -             |
| FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O                 | -           | -           | 0,834      | -             |
| KCl   | 400,00      | 400,00      | 223,60     | 400,00        |
| MgCl <sub>2</sub> (anhyd.)                            | -           | -           | 57,22      | -             |
| MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O                 | -           | -           | -          | 200,00        |
| MgSO <sub>4</sub> (anhyd.)                            | -           | 97,67       | -          | -             |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O                 | 100,00      | -           | -          | -             |
| NaCl  | 6000,00     | 6400,00     | 7599,00    | 6500,00       |
| NaHCO <sub>3</sub>                                    | 2000,00     | -           | -          | 2000,00       |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 800,00      | -           | -          | -             |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anhyd.)             | -           | -           | 142,04     | -             |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O     | -           | 125,00      | -          | 1327,00       |
| ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O                 | -           | -           | 0,863      | -             |
| <b>AUTRES COMPOSANTS</b>                              |             |             |            |               |
| D-Glucose   | -           | 4500,00     | 1802,00    | 2000,00       |
| Glutathion (réduit)                                   | 1,00        | -           | -          | -             |
| Hypoxanthine (sel sodique)                            | -           | -           | 4,77       | -             |
| Acide Linoléique                                      | -           | -           | 0,084      | -             |
| Acide Lipoïque  | -           | -           | 0,21       | -             |
| Rouge de Phénol                                       | 5,00        | 15,00       | 1,20       | 10,00         |
| Putrécine 2HCl  | -           | -           | 0,161      | -             |
| Pyruvate de Sodium                                    | -           | -           | 110,00     | -             |
| Streptomycine   | -           | -           | -          | 50,00         |
| Thymidine   | -           | -           | 0,73       | -             |
| <b>ACIDES AMINES</b>                                  |             |             |            |               |
| L-Alanine   | -           | -           | 8,90       | -             |
| L-Arginine  | -           | -           | -          | 105,00        |
| L-Arginine . HCl                                      | 24,00       | 84,00       | 211,00     | -             |
| L-Asparagine  | 50,00       | -           | -          | -             |
| L-Asparagine H <sub>2</sub> O                         | -           | -           | 15,01      | -             |
| Acide L-Aspartique                                    | 20,00       | -           | 13,30      | -             |
| L-Cystéine HCL H <sub>2</sub> O                       | -           | -           | 35,12      | -             |
| L-Cystine   | 50,00       | -           | -          | -             |
| L-Cystine 2HCl  | -           | 62,57       | -          | 24,00         |
| Acide L-Glutamique                                    | 20,00       | -           | 14,70      | -             |
| L-Glutamine   | -           | 584,00      | 146,00     | 294,00        |
| Glycine   | 10,00       | 30,00       | 7,50       | -             |
| L-Histidine   | -           | -           | -          | 31,00         |

| <i>Composant (mg/l)</i>            | <i>RPMI</i> | <i>DMEM</i> | <i>F12</i> | <i>JOKLIK</i> |
|------------------------------------|-------------|-------------|------------|---------------|
| <b>ACIDES AMINES (Suite)</b>       |             |             |            |               |
| L-Histidine (base libre)           | 15,00       | -           | -          | -             |
| L-Histidine HCl . H <sub>2</sub> O | -           | 42,00       | 20,96      | -             |
| L-Hydroxproline                    | 20,00       | -           | -          | -             |
| L-Isoleucine                       | -           | 105,00      | 3,94       | 52,00         |
| L-Isoleucine (sans allo)           | 50,00       | -           | -          | -             |
| L-Leucine                          | -           | 105,00      | 13,10      | 52,00         |
| L-Leucine (sans méthionine)        | 50,00       | -           | -          | -             |
| L-Lysine                           | -           | -           | -          | 58,00         |
| L-Lysine . HCl                     | 40,00       | 146,00      | 36,50      | -             |
| L-Méthionine                       | 15,00       | 30,00       | 4,48       | 15,00         |
| L-Phénylalanine                    | 15,00       | 66,00       | 4,96       | 32,00         |
| L-Proline                          | -           | -           | 34,50      | -             |
| L-Proline (sans OH-L-proline)      | 20,00       | -           | -          | -             |
| L-Sérine                           | 30,00       | 42,00       | 10,50      | -             |
| L-Thréonine                        | -           | 95,00       | 11,90      | 48,00         |
| L-Thréonine (sans allo)            | 20,00       | -           | -          | -             |
| L-Tryptophane                      | 5,00        | 16,00       | 2,04       | 10,00         |
| L-Tyrosine                         | 20,00       | -           | -          | -             |
| L-Tyrosine . Na                    | -           | -           | -          | 36,00         |
| L-Tyrosine (sel disodique)         | -           | 104,20      | 7,81       | -             |
| L-Valine                           | 20,00       | 94,00       | 11,70      | 46,00         |
| <b>VITAMINES</b>                   |             |             |            |               |
| Biotine                            | 0,20        | -           | 0,007      | -             |
| Pantothénate de Calcium D          | 0,25        | 4,00        | 0,48       | 1,00          |
| Chlorure de Choline                | 3,00        | 4,00        | 13,96      | 1,00          |
| Acide Folique                      | 1,00        | 4,00        | 1,30       | 1,00          |
| i-Inositol                         | 35,00       | 7,20        | 18,00      | 2,00          |
| Niacinamide                        | -           | -           | 0,037      | -             |
| Nicotinamide                       | 1,00        | 4,00        | -          | -             |
| Acide Amide Nicotinique            | -           | -           | -          | 1,00          |
| Acide Para-aminobenzoïque          | 1,00        | -           | -          | -             |
| Pyridoxal HCl                      | -           | 4,00        | -          | 1,00          |
| Pyridoxine HCl                     | 1,00        | -           | 0,062      | -             |
| Riboflavine                        | 0,20        | 0,40        | 0,038      | 0,100         |
| Thiamine                           | -           | -           | -          | 1,00          |
| Thiamine HCl                       | 1,00        | 4,00        | 0,34       | -             |
| Vitamine B <sub>12</sub>           | 0,005       | -           | 1,36       | -             |

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE  
DE LORRAINE

oOo

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame INFANTE Maria Rosa, Directeur de Recherches, CID/CSIC  
Barcelone (Espagne),  
Monsieur DOYLE Alan, Directeur de Recherches, CAMR Wiltshire  
(Grande Bretagne),  
Monsieur MERTEN Otto, Directeur de Recherches, Institut Pasteur  
Paris.

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Monsieur PERANI Angelo**

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,  
une thèse intitulée :

**"Cultures d'hybridomes : Production d'anticorps monoclonaux -  
Etude de l'apoptose et application à la toxicité de surfactifs".**

en vue de l'obtention du titre de :

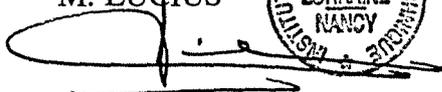
**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE  
LORRAINE**

Spécialité : **"GENIE BIOLOGIQUE"**

Fait à Vandoeuvre le, 6 Juillet 1995

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

M. LUCIUS



NANCY BRABOIS  
2, AVENUE DE LA  
FORET-DE-HAY  
BOITE POSTALE  
F - 5 4 5 0  
VANDOEUVRE CEDEX

## RÉSUMÉ

*La production d'anticorps monoclonaux par des cultures d'hybridomes peut être optimisée en utilisant des milieux sans sérum ou en effectuant des cultures en masse. Par ailleurs, la production d'anticorps peut être améliorée en maintenant les cultures en vie pendant des temps de plus en plus longs. Ceci nous a donc amené à étudier la mort des cellules par apoptose et nécrose.*

*Trois hybridomes différents (A49, A64 et B146) ont été adaptés à plusieurs types de milieux sans sérum suivant une technique dite d'adaptations lentes. Nous décrivons ensuite un autre type d'adaptations qui ont été réalisées en un temps plus court : adaptations rapides. Nous avons, par ailleurs, comparé trois hybridomes (AFRC MAC 65, HF2 x 653 et OX 19) dans 3 systèmes de culture différents (boîtes, flacons à agitation et systèmes comportant des tubes à dialyse), en observant leur croissance et l'état du matériel génétique (empreinte digitale et fragmentation de l'ADN). Un certain nombre d'expériences complémentaires ont été réalisées afin de tester les propriétés du système de culture à base de tubes à dialyse : Utilisation de différents tubes à dialyse, utilisation de différentes souches cellulaires ; culture dans un milieu sans sérum ; utilisation d'antiprotéases, "scaling up".*

*Nous avons étudié la mort cellulaire programmée ou apoptose chez les hybridomes à l'aide de techniques diverses : électrophorèse sur gel, observations morphologiques et suivi du cycle cellulaire. L'apoptose a été induite en utilisant des chocs thermiques, privation de sérum et des inhibiteurs de la synthèse des protéines. Nous avons mis en évidence l'existence d'apoptose spontanée chez la plupart des hybridomes étudiés avec une étude plus approfondie concernant les hybridomes A49 et 12H8. Un hétérohybridome "résistant" à l'apoptose a été étudié plus en détail (hétérohybridome homme-souris HF2 x 653).*

*Enfin nous avons examiné la toxicité de surfactifs non-ioniques à base de noyau  $\beta$ -lactame en étudiant respectivement l'apoptose et la nécrose sur les hybridomes HF2 x 653 et l'hémolyse sur les globules rouges. Nous avons ensuite débattu des éventuels mécanismes d'action provoquant la mort cellulaire.*

**Mots clés :** *Culture d'hybridomes, production d'anticorps monoclonaux, système de culture à base de tubes à dialyse, milieu sans sérum, mort cellulaire programmée, apoptose spontanée, hétérohybridome HF2 x 653, surfactifs non ioniques.*