

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE FERHAT ABBAS - SETIF1 FACULTE DES
SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Département de Biochimie



Support de cours

**Techniques de culture, d'analyse des cellules et
applications en santé**

Niveau : 1^{ere} ANNEE master Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Dr. Derafa Ismahane

FSNV-UFAS1 | 2023-2024

Sommaire

Chapitre 1

1- Lignées cellulaires	1
1.1 les cultures primaires	1
1.1.1.Obtention des cellules.	1
1.1.1.1 Méthode par dissection	2
1.1.1. 2 Dissociation enzymatique	3
1.1. 2.Méthodes de culture	3
1.1. 2.1.Culture stationnaire ou monocouche	3
1.1.2.2. Cultures en suspension	4
1.2. Culture secondaire (repiquage)	5
1.2.1. Problème posé par le repiquage	6
1.2.3. Les étapes du repiquage d'une lignée cellulaire	7
1.3. Cellules immortalisées	8
1.4. Cellules tumorales	10
1.5. Différentes lignées (quelque exemple)	14
1.5.1. Les hybridome.....	14
1.5.2. La lignée cellulaire Vero	15
1.5.3. Les lignées CHO	16
1.5.4. Les cellules BHK	17
1.5.5. Les cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)	17

Chapitre 2

2 Techniques spéciales de culture cellulaire	18
2.1 Méthode d'études de la viabilité cellulaire	18
2.1.1.Approches morphologiques.....	18
2.1.2. Méthodes de quantification de la viabilité cellulaire	19
2.2.Quantification des cellules mortes par la perte d'intégrité de la membrane plasmique	21
2.1.2 Méthodes utilisant l'exclusion de colorants vitaux	21
2.1.3 Méthodes utilisant la libération d'enzyme intracellulaire.....	22
2.2 .Détection couplée des cellules mortes et des cellules vivantes	23
2.3 Méthodes d'étude de la prolifération cellulaire	24
2.3.1. Dénombrement des cellules	24
2.3.2. Quantification des acides nucléiques	28
2.3.4 .Incorporation d'un précurseur de l'ADN	28
2.4 Etude du cycle cellulaire	29
2.5 Méthodes d'étude de la génotoxicité (test de comètes)	29

Chapitre 3

3.construction d'un system d'expresion	31
3.1. La Transformation	31
3.1.1- La découverte de la transformation	31
3.1.2. Caractéristiques de la transformation:	31
3.1.3. Les bactéries naturellement transformables : notion d'état de compétence.....	32
3.1.4 Mécanisme de la transformation	32
3.1.5. Conséquences de la transformation.....	34
3.2. La Transduction	34
3.2.1. Rappel sur les bactériophages	34
3.2.2 Les différents types de transduction	35
3.2.2.1La transduction généralisée	35

3.2.2.2. <i>La transduction spécialisée</i>	36
3.3. La Transfection	37
3.3.1. Méthodes.....	37
3.3.2. Transfection stable et transitoire.....	39

Chapitre 4

4. Les Systèmes d'expression	40
4.1. Systèmes d'expression procaryotes	40
4.1.1. Escherichia coli.....	40
4.1.2. Caulobacter crescentus.....	43
4.1.3. Les Bacillus.....	43
4.1.4. Ralstonia eutropha.....	44
4.2. Systèmes d'expression eucaryotes	44
4.2.1. Les levures.....	44
4.2.2. Les champignons filamenteux.....	45
4.2.3. Baculovirus-cellules d'insectes.....	45
4.2.4. Les cellules animales.....	46
4.2.5. L'ovocyte de Xénope.....	47
4.2.6. Expression dans des eucaryotes unicellulaires.....	48
4.2.7. Animaux transgéniques.....	48
4.2.7.1. les rongeurs.....	48
4.2.7.2. Les lapines.....	49
4.2.7.2. Les ruminants.....	49

Chapitre 5

5. production des protéines recombinantes	53
5.1. Composition du transgène.....	53
5.2. ADN recombinant.....	54
5.3. Clonage.....	54
5.4. Produire une protéine recombinante, pourquoi ?.....	54
5.5. Choix de l'hôte.....	55
5.6. Synthèse des protéines.....	56
5.6.1. La transcription.....	56
5.6.2. la traduction.....	57
5.7. Étapes d'une production de protéine recombinante	57
5.7.1. Obtention de ADNc correspondant à la protéine d'intérêt.....	57
5.7.2. Clonage dans un vecteur d'expression.....	57
5.7.3. Transformation/transfection.....	59
5.7.4. Purification de protéine d'intérêt.....	59

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1. Culture d'un explant	2
Figure 2. Dissociation mécanique et enzymatique	3
Figure 3. Culture de cellules sur support. Adhésion des cellules sur la paroi au fond du flacon ou de la boîte de culture	4
Figure 4. Culture de cellule en suspension (lymphocytes, moelle osseuse, ...). Les cellules flottent dans le milieu et prolifèrent en suspension	4
Figure 5. Culture secondaire (repiquage).	6
Figure 6. Immortalisation des cellules B avec le virus d'Epstein-Barr.	9
Figure 7. Un bref aperçu du processus de transformation immortalisée induite par le SV40	10

Chapitre 2

Figure 1. Test au MTT.....	20
Figure 2. Principe du test d'accumulation du rouge neutre.....	20
Figure 3. Test du bleu de trypan	21
Figure 4. Test du lactate déshydrogénase (LDH).	22
Figure 5. Détection couplée des cellules mortes et des cellules vivantes par le test calcéine-acetométhoxyl (AM) + iodure de propidium	23
Figure 6. Dénombrement des cellules manuel par lame de Malassez.....	25
Figure 7. Quantification des acides nucléiques le Cyquant GR	28
Figure 8. Test de comètes.....	30

Chapitre 3

Figure1. La découverte de la transformation	32
Figure2 : Les étapes de la transformation.....	33
Figure 3 : La transduction Généralisée	36
Figure 4: La transduction Spécialisée	37

Chapitre 4

Figure 1. Les différentes méthodes pour l'obtention d'animaux transgéniques.	49
Figure 2 : la modification végétale grâce à l'Agrobacterium.....	50

Chapitre 5

Figure 1. Synthèse des protéines.....	55
Figure 2. Deux techniques d'amplification de l'ADN. a. La PCR, b. La RT-PCR.....	57
Figure 3. L'insertion d'un fragment simple d'ADN dans un plasmid.....	58

Liste des Tableaux

Chapitre 1

Tableau 1. Exemples des lignées cellulaires tumorales humaines	12
---	----

1- Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont issues du développement de cultures primaires qui au fur et à mesure du temps et des repiquages, perdent leur hétérogénéité pour permettre l'émergence d'un type cellulaire. Il est important de souligner que le terme *sensu stricto* de lignée cellulaire est attribué à la culture dès lors que la culture primaire subie son premier repiquage.

Elles sont le plus souvent constituées de cellules tumorales ou de cellules "transformées" (immortalisées), chimiquement ou via un virus oncogène, et possèdent la caractéristique de pouvoir se diviser de façon illimitée.

On distingue les lignées cellulaires finies qui présentent une dégénérescence des cellules au bout d'un certain nombre de repiquages, et des lignées continues à durée de vie illimitée.

Malgré leur composition homogène, ces lignées cellulaires doivent conserver les propriétés morphologiques, phénotypiques et génotypiques de la tumeur originelle, et ainsi pouvoir représenter une source renouvelable de matériel cellulaire pour les différentes études, malgré les mitoses successives subies par ces cellules.

Classiquement on a trois grands types majeurs de lignées cellulaires : les lignées primaires, les cellules "immortalisées" et les cellules tumorales. Cependant aucun outil n'est parfait, il y a toujours des avantages et des inconvénients.

1.1 Les cultures primaires

Lorsque les cellules sont prélevées chirurgicalement d'un organisme et placées dans un environnement de culture approprié, elles se fixent, se divisent et prolifèrent. C'est ce qu'on appelle une culture primaire.

1.1.1.Obtention des cellules.

On distingue 2 types de cellules, les cellules circulantes (sang, lymphes, ascite, épanchement pleural) et les cellules cohésives (prélèvement tissulaire). Les cellules libres, ou circulantes, sont obtenues par centrifugation après prélèvement par des techniques de type ponction, prise de sang... Tandis que les cellules en cohésion sont obtenues grâce à 2 grands procédés : les méthodes de dissection ou les méthodes enzymatiques.

1.1.1.1 Méthode par dissection

Cette méthode est la plus ancienne. Elle a permis aux précurseurs de la culture de tissu d'obtenir les premières cellules in vitro (figure 1).

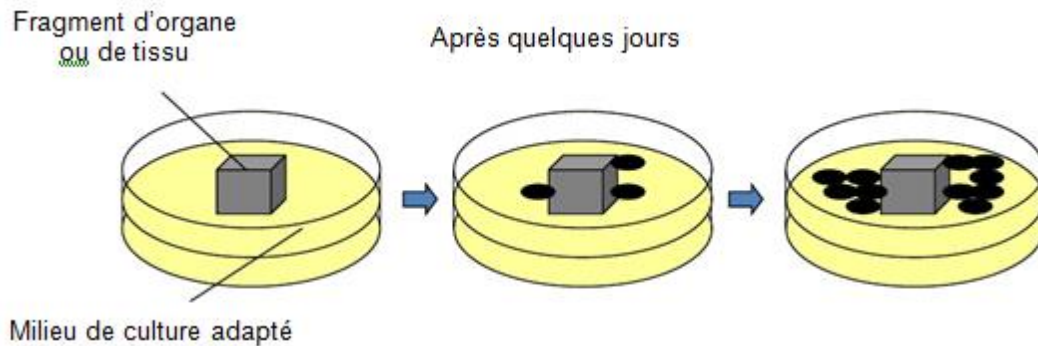


Figure 1. Culture d'un explant.

- **Méthode de Carrel** consiste à prélever un morceau de tissu qui est réduit en un très petit rectangle et déposé à la surface d'un mélange de deux gouttes de plasma de coq et de deux gouttes d'extrait embryonnaire à 50%. Après une incubation de 24h à l'étuve, on voit migrer les premières cellules à partir de l'explant.
- **Méthode de dissection** consiste à couper en fragment d'environ 1 à 4 mm³ le tissu que l'on réduit encore à l'aide de pince. Ces fragments sont ensuite placés dans un flacon de culture contenant un milieu nutritif. Les cellules vont migrer à partir des différents fragments puis se multiplier. Cette méthode s'appelle également la méthode des explants.
- **Méthode Jensen** : cette technique est plus rarement utilisée. Les fragments de tissus de 1 mm³ sont placés sur un disque de papier filtre qui repose sur un support métallique dans une boîte de Pétri. Les cellules qui prolifèrent à partir du fragment du tissu traversent les pores du papier et se fixent au fond de la boîte. Cette technique donne l'avantage d'une séparation constante entre l'explant et les cellules migrantes évitant l'étape délicate de l'élimination de l'explant lorsqu'une couche subconfluente est obtenue.
- **Méthode mécanique** : cette technique s'applique pour des tissus mous comme le thymus et la rate. Elle consiste à frotter le tissu sur une grille puis de filtrer et centrifuger. On peut également dilacérer les tissus à l'aide d'une pipette en verre en pipétant et refoulant les tissus.

1.1.1. 2 Dissociation enzymatique

Dans la deuxième (figure 2), méthode la plus généralement utilisée, ce processus est accéléré en ajoutant des enzymes de digestion (protéolytiques), telles que la trypsine ou la collagénase, à des fragments de tissus pour dissoudre le ciment maintenant les cellules ensemble. Ceci crée une suspension de cellules individuelles qui sont placées dans des récipients de culture contenant un milieu de culture pour les laisser pousser et se diviser.

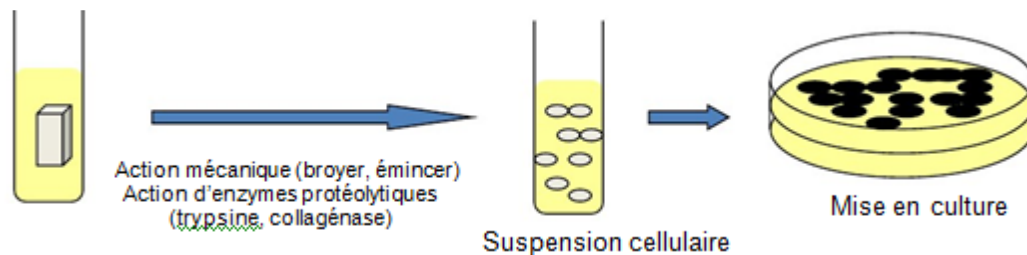


Figure 2. Dissociation mécanique et enzymatique.

Avantages et inconvénients

- La méthode par dissection est souvent utilisée quand le tissu à mettre en culture est très petit. L'obtention nécessaire pour avoir des couches cellulaires confluentes est relativement long (environ 30 jours). Le type cellulaire recherché est rarement le premier à "sortir" de l'explant.
- La méthode enzymatique est beaucoup plus rapide avec un bon rendement mais certaines cellules à membrane fragile peuvent être lésées par cette méthode. On peut retrouver un nombre important de cellules non viables après action enzymatique.

1.1. 2.Méthodes de culture

Deux systèmes de base de culture cellulaire sont utilisés pour cultiver des cellules. Ils sont essentiellement basés sur l'aptitude des cellules à pousser attachées sur un substrat de verre ou de plastique traité (systèmes de culture monocouche) ou à flotter librement dans le milieu de culture (systèmes de culture en suspension).

1.1. 2.1.Culture stationnaire ou monocouche

Ce type de culture (figure 3) est basé sur l'affinité des cellules pour un support. Celui-ci peut-être du verre ou du plastique. Il peut être recouvert ou non de collagène, de gélatine ou encore d'éléments de la matrice extra cellulaire comme la fibronectine, la laminine ou une combinaison de ces composants.

Les cellules peuvent aussi former une monocouche sur des billes ou micro-porteurs. Ces derniers peuvent être aussi recouverts d'un substrat. Plusieurs systèmes de maintien des cellules existent :

- Les systèmes clos : flacons placés dans des étuves bactériologiques et dont le milieu n'est pas changé.
- Les systèmes semi-clos : les boîtes de Pétri ou flacons placés dans des étuves spéciales dont l'atmosphère est contrôlée par l'arrivée permanente d'un mélange gazeux composé de 95% d'air et de 5% de CO₂, 37°C.
- Les systèmes ouverts ou systèmes de perfusion : les chambres de Rosé, de Pomerat ou autre, utilisées surtout pour des études nécessitant une observation longue au microscope, par exemple : la micro-cinématographie.

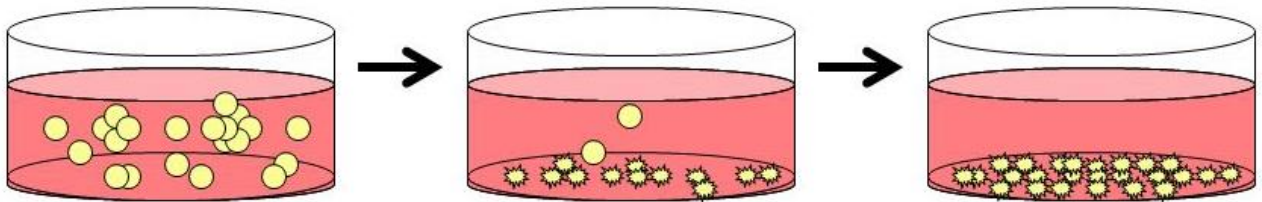


Figure 3. Culture de cellules sur support. Adhésion des cellules sur la paroi au fond du flacon ou de la boîte de culture.

1.1.2.2. Cultures en suspension

Les cultures en suspension (figure 4) sont généralement cultivées :

- ✓ dans des flacons Spinner (rotation magnétique) ou dans des Erlenmeyers agités dans lesquels les cellules sont activement gardées en suspension dans le milieu;
- ✓ dans des récipients de culture stationnaires comme les flacons T et les bouteilles dans lesquels, bien qu'elles ne soient pas maintenues en agitation, les cellules sont incapables de se fixer fermement au substrat.

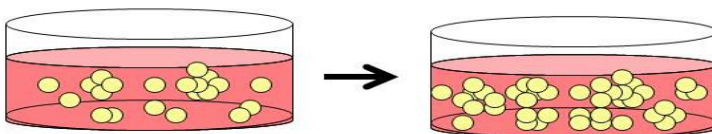


Figure 4. Culture de cellule en suspension (lymphocytes, moelle osseuse, ...). Les cellules flottent dans le milieu et prolifèrent en suspension.

De nombreuses lignées cellulaires, surtout celles dérivées de tissus normaux, sont considérées comme adhérentes, c'est-à-dire qu'elles poussent uniquement lorsqu'elles adhèrent à un substrat leur convenant.

Certaines lignées cellulaires qui ne sont plus considérées comme normales (fréquemment désignées par cellules transformées) sont souvent capables de croître soit fixées à un substrat soit en flottant librement en suspension ; elles sont en suspension. De plus, certaines cellules normales, comme celles trouvées dans le sang, ne se fixent pas normalement aux substrats et poussent toujours en suspension.

Avantages

- ✓ Proche de la "réalité" de la vie d'une cellule.
- ✓ Les lignées primaires présentent un grand avantage puisque c'est ce qui est le plus proche de la réalité. C'est pour ça que malgré que ce soit pénible d'en obtenir, on va essayer d'avoir accès à ce type de cellule.

Inconvénients

- ✓ Matériel en faible quantité.
- ✓ Mélange de différents types cellulaires.
- ✓ Ces cellules ne peuvent être maintenues en culture au mieux que pendant quelques générations.
- ✓ Evidemment le gros souci c'est qu'on est sur du prélèvement de tissu donc on va avoir plein de types cellulaires qui sont mélangés et il va falloir séparer tout ça : tri cellulaire.

1.2. Culture secondaire (repiquage)

Ce sont les cellules de la culture primaire qui sont utilisées pour ensemercer d'autres cultures et ainsi de suite : ce sont donc les cultures secondaires (figure 5). Ces cellules ainsi obtenues conservent les caractéristiques du tissu d'origine mais leur nombre de divisions est limité comme dans l'organisme.

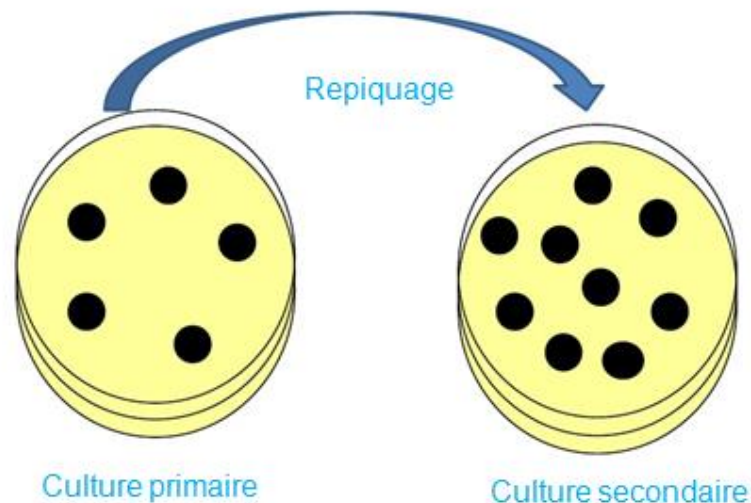


Figure 5. Culture secondaire (repiquage).

Lorsque les cellules dans le récipient de culture primaire ont poussé et couvert tout le substrat de culture disponible, elles doivent être repiquées pour leur donner de la place afin d'avoir une croissance continue. Cela se fait généralement en les retirant aussi délicatement que possible du substrat avec des enzymes. Ces enzymes sont similaires à celles utilisées pour obtenir la culture primaire et sont utilisées pour rompre les liaisons protéiques liant les cellules au substrat. Certaines lignées cellulaires peuvent être récoltées en grattant délicatement les cellules du fond du récipient de culture.

1.2.1. Problème posé par le repiquage

Trypsination

Les cellules cultivées *in vitro* adhèrent au support et adhèrent entre elles grâce à la matrice extracellulaire. Le repiquage des cellules nécessite leur décollement du support et leur séparation les unes des autres, ce qui est obtenu par action d'une enzyme protéolytique, la trypsine. Son action est inhibée par les ions calcium et par le sérum de veau foetal (SVF).

Conséquences:

- ✓ avant de faire agir la trypsine, toute trace de calcium et de SVF doit être éliminée: étape du lavage du tapis cellulaire
- ✓ une fois que l'enzyme a individualisé les cellules, il faut que l'action de la trypsine soit arrêtée par addition de SVF avant que les cellules ne soient abîmées. Il faut donc contrôler l'action de la trypsine en stoppant son activité dès que le tapis cellulaire s'est individualisé du support.

Numération

Le repiquage des cellules dans le milieu neuf doit se faire à une densité inférieure à celle de la confluence. Connaissant la surface de la boîte et la quantité de cellules à repiquer pour obtenir une croissance optimale, il faut après trypsination dénombrer les cellules vivantes et mortes pour déterminer avec précision le volume de suspension cellulaire à introduire dans une nouvelle boîte de culture (lors d'un repiquage de routine, l'étape de numération devient souvent inutile).

Préparation du milieu de culture

Les cellules sont cultivées en milieu DMEM. Ce milieu doit être complété au moment de l'emploi.

1.2.3. Les étapes du repiquage d'une lignée cellulaire

Toutes ces opérations auront lieu sous hotte à flux laminaire, mise à part la numération, en respectant les conditions de « bonnes » manipulations.

Observation des cellules au microscope inversé

- Observer l'aspect des cellules au microscope inversé.
- Distinguer cellules mortes et cellules vivantes.
- Vérifier que le tapis cellulaire est uniforme et confluent.
- Noter la couleur du milieu.

Lavage du tapis cellulaire

- ✓ Éliminer le milieu par retournement (ou par tout autre moyen respectant les règles d'asepsie).
- ✓ Laver le tapis cellulaire en introduisant 5mL de PBS sans Ca^{2+} (ou 2mL de trypsine 0,25% + EDTA pour les cellules difficiles à décoller).
- ✓ Agiter doucement la boîte pendant 30sec et éliminer tout le liquide à l'aide d'une pipette Pasteur.

Trypsination

- ✓ Introduire 1,5 à 2mL de trypsine 0,25% + EDTA.
- ✓ Bien répartir sur tout le tapis cellulaire.
- ✓ Laisser agir à l'étuve.
- ✓ Examiner la bouteille toutes les 1 à 2 minutes à l'oeil nu et au microscope inversé pour surveiller le décollement du tapis cellulaire du support et l'individualisation des cellules qui deviennent rondes.
- ✓ Si besoin, aider le décollement en tapant sur la boîte.
- ✓ Dès que décollement et individualisation se sont produits, arrêter l'action de la trypsine.

Arrêt de la trypsination

- ✓ Introduire 3mL de milieu de culture complété (l'action de la trypsine est stoppée par le SVF).
- ✓ Disperser soigneusement les cellules par aspiration et refoulement à la pipette.
- ✓ A chaque refoulement, envoyer le liquide sur le fond de la bouteille pour finir le décollement des cellules.

Numération

- ✓ Prélever 0,4mL de suspension cellulaire dans un tube à hémolyse stérile afin de réaliser une numération en présence de 0,1mL de bleu Trypan (concentration finale: 0,2%) en cellule de Malassez.

Mise en culture dans de nouvelles boîtes

- ✓ Calculer le volume de suspension cellulaire et le volume de milieu à introduire dans chaque bouteille de sorte que les cellules en culture sont placées à une densité finale d'environ 4.10⁴ cellules par cm de; surface (bouteille de 25cm² de surface contenant 10 ml de milieu).
- ✓ Ajouter du milieu de culture complété à qsp 10 mL.
- ✓ Placer les bouteilles à l'étuve à 37°C et à 5% CO₂. Dévisser d'un quart de tour les bouchons.

Entretien

- ✓ Tous les 2 jours, observer le milieu de culture et les cellules.
- ✓ Repiquer lorsque les cellules sont à confluence.
- ✓ Adapter le taux de repiquage en fonction de la vitesse de croissance de la lignée observée.
- ✓ Ne plus effectuer de numération lors d'un repiquage de routine.

1.3. Cellules immortalisées

Ces lignées ne sont évidemment pas des toutes immortelles mais on prolonge un petit peu leur vie, c'est tout ce qu'on est capable de faire. Cela n'existe que pour deux types de cellules : lymphocytes B (figure 6) et fibroblastes (figure 7). Dans ces cellules-là, on va les infecter avec des virus pour les lymphocytes B, on les infecte avec le virus Epstein Barr Virus (EBV) et pour les fibroblastes on les infecte avec le virus Simian Virus (SV40) exclusivement. L'EBV possède un récepteur sur les lymphocytes B et ne peut infecter que les lymphocytes B et c'est la même chose pour SV40 qui n'a son récepteur que sur les fibroblastes.

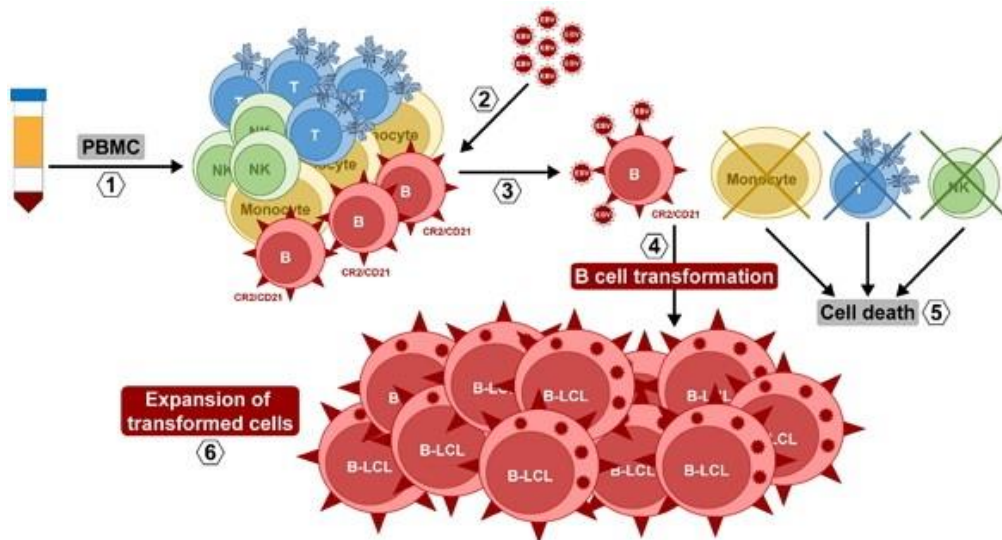


Figure 6. Immortalisation des cellules B avec le virus d'Epstein-Barr. (1) Isolement des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) par gradient de densité. (2) Ajout du surnageant de culture B95-8 contenant le virus EBV. (3) Les virus EBV infectent spécifiquement les cellules B par le biais du récepteur CR2 / CD21. (4) Une fois à l'intérieur, l'EBV transforme les lymphocytes B en lignées cellulaires B-lymphoblastoïdes (B-LCL), tandis que le reste des PBMC non infectées meurent (5). (6) Lorsqu'ils sont transformés / immortalisés, les B-LCL prolifèrent et se développent.

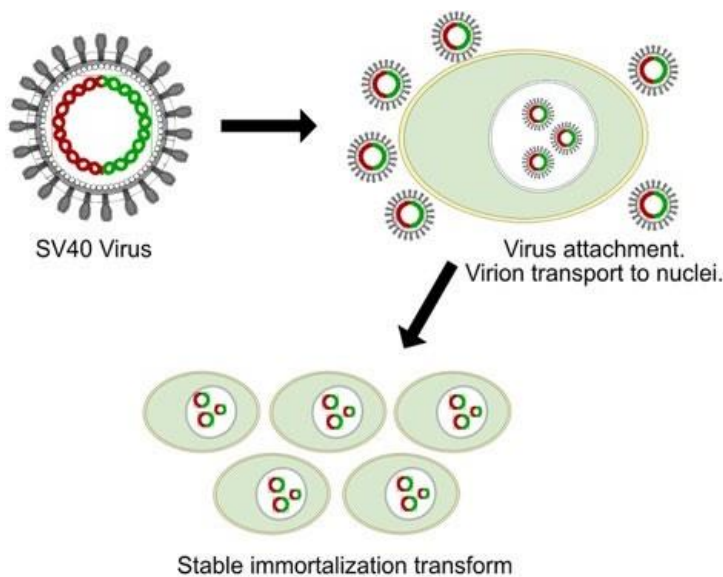


Figure 7. Un bref aperçu du processus de transformation immortalisée induite par le SV40.

Pour l'instant on ne sait immortaliser ces lignées là car on dispose de ces deux virus mais ils sont tellement tropiques et ils ont une telle spécificité tissulaire qu'on ne sait faire marcher ça que sur ces deux lignées.

Les virus vont introduire des gènes qui vont permettre à la cellule de se diviser un petit peu plus et surtout de résister à l'apoptose. Le principe c'est que ces cellules ne sont évidemment pas

immortelles mais simplement elles vont résister un tout petit peu mieux à la mort cellulaire et elles vont proliférer un tout petit peu plus rapidement que les autres cellules de culture primaires.

Du coup, on augmente le nombre de génération de ces cellules d'un facteur 3-4 ce qui est un gros avantage.

Les cellules "immortalisées" ne sont pas immortelles, mais leur nombre de doublements est augmenté par rapport à une culture primaire :

Fibroblaste primaire : 10-12 générations. Fibroblaste

humain immortalisé : 30-40 générations.

Avantages

- ✓ On dispose de plus de matériel.
- ✓ Ces cellules sont peu différentes d'une culture primaire.

On a évidemment un petit peu plus de matériel cellulaire et c'est relativement peu différent qu'une culture primaire (par rapport aux lignées tumorales).

Inconvénients

- ✓ Seuls deux types cellulaires sont disponibles sous cette forme.
- ✓ On introduit des gènes à effet prolifératif et anti-apoptotique, modifiant donc ces activités cellulaires.

On ne sait faire ça réellement bien que sur deux types cellulaires, les lymphocytes B et les fibroblastes, ça qui limite le nombre d'analyses.

1.4. Cellules tumorales

La culture des cellules tumorales reste très proche de celle des cellules normales, néanmoins certains traits des cellules tumorales sont importants à souligner et permettent d'expliquer les différences observées lors de la mise en culture.

Avantages

Parmi les différences entre les caractéristiques des cellules normales et celles des cellules tumorales, quatre avantages sont très importants à souligner du fait de leur influence sur les conditions de mise en culture.

- ✓ Ces cellules-là permettent d'accéder quasiment à tout puisqu'il existe des cancers de quasiment tous les types de cellules (table 1).

- ✓ De plus les cellules vont se diviser de manière extrêmement rapide avec très peu d'apoptose et souvent les cellules réexpriment la télomérase ce qui va faire qu'elles ne sont plus sensibles à la sénescence, soit elles entrent en sénescence mais elles ne le sentent pas, soit elles limitent la sénescence. Du coup c'est des cellules qu'on peut garder X temps en culture.

Inconvénients

- ✓ Les cellules tumorales ont souvent acquis beaucoup de mutations et sont donc extrêmement trompeuses sur le phénotype observé. Il faut donc toujours garder en tête que ce sont des cellules tumorales et du coup ce sont des lignées qui vont continuer à accumuler des mutations et il est évident qu'elles ne vont pas se comporter de manière normale.

Cependant on utilise quand même ces lignées car une lignée tumorale se divise en 24h, une lignée immortalisée en 2-3 jours et une lignée primaire qui marche bien, qui est jeune, c'est une semaine puis toutes les 2 à 3 semaines.

Tableau 1. Exemples des lignées cellulaires tumorales humaines.

Histotype	Cell Line	Species
Adrenal	NCI-H295R	Human
Bladder	SW 780	Human
Brain	BT142 D54-Luc LN-827(pMMP-LucNeo) U-251-Luc-mCh-PuroU-87 MG-Luc	Human
Cervical	HeLaKB	Human
Colon	COLO 205DLD-1 HCT-116 HT-29 SW-480SW-620	Human
Epidermoid	A-431	Human
Epithelial	HEK293	Human
Erythroleukemia	HEL	Human
Esophageal	OE33	Human
Fibroblast	Hs 895.TNHDF TE 353.SkTE 354.T	Human
Gastric	GIST-T1NCI-N87SNU-5	Human
Head and Neck [squamous carcinoma]	CAL 27 FaDu	Human
Leukemia [Acute Promyelocytic]	HL-60	Human
Liver	Hep 3B2.1-7 Hep G2	Human
Lung [Adenosquamous]	NCI-H596	Human
Lung [Anaplastic Carcinoma]	Calu-6	Human
Lung [Bronchioalveolar]	NCI-H322M	Human
Lung [SCLC]	DMS 114 NCI-H446SHP-77	Human
Lymphoma [B-Cell]	DB DB/M2 GRANTA-519	Human
Mammary/Breast	BT-20 HCC70MCF-7 MDA-MB-231	Human

Melanoma	A2058 A375 COLO 829 LOX-IMVI SK-MEL-28	Human
Normal Fibroblast	Hs 895.Sk	Human
Ovarian	A2780 A2780-LucIGROV1 IGROV1-Luc-Mch-PuroNIH:OVCAR-3 NIH:OVCAR-3-Luc-mCh-PuroOV-90 OVCAR-4OVCAR-5 OVCAR-5-Luc-mCh-PuroOVCAR-8 OVCAR-8-Luc-mCh-PuroSK-OV-3 SK-OV-3-Luc-D3	Human
Pancreatic	Bx-PC-3 Capan-1KP4 MIA PaCa-2PANC-1 SU-86.86SW 1990	Human
Placental Choriocarcinoma	BeWo	Human
Prostate	22Rv1 CWR-22-RDU 145 PC-3	Human
Renal	769-P 786-O A-498 ACHN HEK 293TK-10	Human
Sarcoma	A-673 HT-1080MG-63 Saos-2 SJSA-1SW 872	Human
	RIF-1	Mouse
Thyroid	MB-1TT	Human

1.5. Différentes lignées (quelque exemple)

1.5.1. Les hybridomes

Un hybridome est une lignée cellulaire hybride obtenue par fusion d'un lymphocyte B produisant l'anticorps spécifique d'intérêt, avec une lignée cellulaire de myélome (lymphocyte B cancéreux) qui ne produit pas sa propre immunoglobuline. On obtient ainsi une lignée cellulaire immortelle capable de produire l'anticorps monoclonal utile, qui peut être récupéré à partir du milieu.

✓ La fusion avec une cellule tumorale pour fabriquer l'hybridome entraîne la production d'anticorps monoclonaux contre le virus spécifique. Les cellules d'hybridome sont placées dans des milieux qui peuvent les aider à se développer et à produire les quantités massives d'anticorps monoclonaux.

✓ Dans la technique de l'hybridome, les cellules productrices d'anticorps (cellules B) sont fusionnées avec les cellules de myélome (cellules cancéreuses), résultant en des hybrides quasi immortels qui produisent des anticorps monoclonaux. Étant donné que les cellules B ont une durée de vie limitée, une culture efficace dans des conditions de laboratoire n'est pas possible.

✓ À leur tour, les cellules de myélome sont des cellules fortement dérégulées qui ne sont pas sujettes à la mort cellulaire programmée (apoptose). En fusionnant les deux types de cellules, leurs propriétés peuvent être combinées sous la forme de cellules dites d'hybridome. Ceux-ci sont désormais capables de sécréter des anticorps monoclonaux sans restriction. Cette technique a permis de produire des anticorps en grande quantité et avec une spécificité sur mesure. Les principaux domaines d'application des anticorps monoclonaux sont les applications pharmaceutiques, le diagnostic et la recherche.

✓ La technologie des hybridomes a révolutionné la façon dont les anticorps sont créés en laboratoire et a été essentielle au développement d'anticorps thérapeutiques pour le traitement du cancer, des maladies auto-immunes et au développement de diagnostics innovants. Les hybridomes sont des fusions cellulaires de splénocytes prélevés sur des souris immunisées avec un antigène d'intérêt et des cellules de myélome immortalisées. Un seul hybridome se multiplie en clones cellulaires et produit un anticorps monoclonal contre un épitope de l'antigène immunisant, et cet anticorps sécrété peut être collecté et utilisé pour une grande variété d'applications.

✓

1.5.2. La lignée cellulaire Vero

Historiquement, la cellule Vero a été isolée et décrite pour la première fois en mars 1962 par Y.Yasumura et Y.Kawakita à l'université de Chiba au Japon. Cette cellule est issue de rein de singe vert adulte d'Afrique (*Cercopithecus aethiops*). Son nom "Vero" résulte de l'abréviation du terme "Verda Reno", qui signifie lui-même "rein vert" en espéranto.

La lignée Vero a été caractérisée comme substrat pour la production de vaccins viraux par les équipes de l'Institut Mérieux dans les années 1980. La caractérisation initiale de cette lignée cellulaire a facilité l'obtention des molécules biologiques à usage thérapeutique tout en s'affranchissant de l'utilisation d'animaux et des nombreux agents infectieux potentiellement présents dans les cultures primaires extraites de reins de singes verts. Les principales caractéristiques de cette lignée cellulaire sont présentées dans le tableau.

Dans le souci de revenir sur ce vocable assez spécifique, une lignée continue peut être théoriquement répliquée à plusieurs reprises sans pour autant devenir sénescence. La transformation correspond au passage des cellules d'un état différencié, vers un état dédifférencié. Enfin, la lignée cellulaire Vero est continue et aneuploïde. L'aneuploïdie correspond quant à elle à la propriété de présenter un nombre anormal de chromosomes. Contrairement à d'autres cellules mammaliennes, les cellules Vero ne sécrètent pas d'interféron de type 1 lors de l'infection par un virus;elles possèdent par contre toujours des récepteurs aux interférons et répondent donc correctement aux sources d'interféron extérieures.

Origine	Rein de singes verts d'Afrique
Transformation	Naturelle ; au cours des passages successifs
Tumorigénicité	Non tumorigène (d'après la définition du WHO) pas de nodules dont la taille augmente avec le temps (>21j) pas de métastases
Caryotype	Aneuploïde : 58 chromosomes dans 66 % des cellules
Culture	Adhérente
Référence ATCC	CCL81, 124 ^o passage
Traçabilité	Suivie depuis son origine, traçabilité complète (milieu, sérum ¹)
Permissivité	SV-40, SV-5, rougeole, arbovirus, réovirus, rubéole, adeno-virus simien, poliovirus, grippe, virus respiratoire syncytial, virus vaccinia
Caractéristiques	Ne produit pas d'interféron

Les cellules Vero ont été utilisées pour la première fois en 1984 pour la production de vaccins viraux contre les poliovirus. Ces cellules peuvent être cultivées en flacons, ou encore sur microporteurs

Depuis, de nombreux autres procédés de production ont été développés. En effet, de part sa capacité à se développer sur microporteurs, la lignée des cellules Vero a été une des principales lignées cellulaires à être utilisée pour des productions industrielles à grande échelle. Par conséquent, l'utilisation de cellules Vero s'est largement diffusée ; elles servent maintenant de « substrat » pour la production de multiples vaccins. Le tableau 2.2 se propose de faire la synthèse des principaux vaccins viraux vivants ou inactivés, produits à l'aide de cellules Vero. Dans ce type de procédés de production, une des préoccupations majeures est d'augmenter la densité cellulaire afin d'augmenter au maximum le titre viral final et les quantités produites. L'impact de l'aération, de l'agitation, de la concentration en microporteurs, du type de surface d'adhésion ou de la concentration à l'ensemencement sont autant de paramètres primordiaux étudiés afin d'optimiser le procédé. Un autre paramètre apparaît comme crucial dans le bon déroulement de la culture cellulaire ainsi que dans la production virale : il s'agit de la composition du milieu de culture.

1.5.3. Les lignées CHO

Les cellules CHO sont une lignée cellulaire issue d'ovaires de hamster de Chine (*Cricetulus griseus*) couramment utilisée en recherche dans le domaine médical, en biotechnologie et par l'industrie pharmaceutique pour la production de protéines thérapeutiques.

Elles ont été introduites dans les années 1960, à partir d'une lignée isolée en 1957^{2,3}, comme culture cellulaire monocouche nécessitant l'adjonction de proline dans leur milieu de culture. Elles existent aujourd'hui selon différentes lignées présentant des altérations génétiques variables. Elles sont utilisées pour les études génétiques, les recherches sur l'expression des gènes notamment pour produire des protéines recombinantes et la nutrition, ainsi que pour réaliser des analyses de toxicité.

Pourquoi les cellules CHO sont-elles utilisées ?

Plusieurs propriétés clés des cellules CHO ont conduit à leur établissement en tant que lignée cellulaire hôte préférée pour les approbations réglementaires des produits thérapeutiques recombinants :

- ✓ Adaptable à la croissance de la culture en suspension, ce qui est idéal pour la production à grande échelle dans les bioréacteurs.
- ✓ Adaptable à la croissance dans des milieux de culture sans sérum et chimiquement définis (sans animaux), ce qui garantit la reproductibilité entre les différents lots de culture cellulaire.
- ✓ Permettre des modifications post-traductionnelles (par ex. glycosylations) des protéines recombinantes qui sont compatibles et bioactives chez l'homme.
- ✓ Plusieurs systèmes de sélection chimique et d'amplification génétique ont été développés pour les cellules CHO, optimisés pour un rendement plus élevé de protéine recombinante par cellule.

1.5.4. Les cellules BHK

Les fibroblastes rénaux de bébé hamster (cellules BHK) sont une lignée cellulaire adhérente utilisée en biologie moléculaire. Les cellules ont été dérivées en 1961 par I. A. Macpherson et M. G. P. Stoker. De nos jours, on utilise occasionnellement le sous-clone 13, dérivé à l'origine de l'isolement d'une seule cellule à partir des reins de cinq hamsters non sexés âgés d'un jour.

Les cellules BHK-21 sont sensibles à l'adénovirus humain D, au réovirus 3 et au virus de la stomatite vésiculaire (souche Indiana). Les cellules BHK-21 sont résistantes au poliovirus 2 et au vésivirus du lapin (RaV). Les cellules sont négatives pour la transcriptase inverse, ce qui signifie qu'elles ne possèdent pas de génome intégral de rétrovirus.

Les cellules BHK-21 sont utiles pour les transformations et pour les transfections stables et temporaires. Les cellules BHK sont également utilisées pour étudier les infections virales et pour la production d'antigènes viraux.

1.5.5. Les cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)

une lignée cellulaire modèle utilisée dans la recherche en biologie et biophysique des épithéliums. Elles sont étudiées pour comprendre notamment la polarité cellulaire, les adhérences cellule-cellule (appelées jonctions adhérentes), la motilité cellulaire collective, ainsi que les réponses aux facteurs de croissance. C'est l'un des rares modèles de culture cellulaire qui convient à la culture cellulaire 3D et aux réarrangements multicellulaires connus sous le nom de morphogénèse ramifiée.

2. Techniques spéciales de culture cellulaire

Quand une cellule est-elle morte ? Une cellule doit être considérée comme morte lorsque l'un des critères suivants est observé :

- ✓ La cellule a perdu l'intégrité de sa membrane plasmique.
- ✓ La cellule aussi que son noyau a subi une fragmentation complète au corps discrets (corps apoptotiques).
- ✓ La cellule ou ses fragments sont phagocytés *in vivo* par les macrophages ou les cellules voisines.

Il convient de souligner que les cellules qui sont arrêtées dans le cycle cellulaire au cours de la sénescence doivent être considérées comme des cellules vivantes.

2.1 Méthode d'études de la viabilité cellulaire

2.1.1. Approches morphologiques

L'observation au microscope optique des altérations morphologiques constitue un moyen rapide et peu coûteux permettant de détecter la mort cellulaire d'une manière non spécifique et donc de déterminer si la viabilité des cellules est compromise.

Cependant, ces techniques basées sur la microscopie optique prennent du temps et ont tendance à entraîner une sous-estimation de la fraction de cellules mortes car les phases précoces de la mort cellulaire peuvent être accompagnées de changements morphologiques discrets qui ne sont pas nécessairement détectés par l'observateur.

Par ailleurs, les débris cellulaires peuvent se révéler trop petit pour être observables en microscopie optique.

Dans ce contexte, l'utilisation de colorants vitaux (des colorants qui colorent sélectivement soit des cellules vivantes ou mortes) tel que le bleu trypan, est avantageuse car elle permet l'identification des cellules mortes qui n'ont pas encore fait l'objet d'importantes modifications structurales.

La microscopie électronique à transmission permet de visualiser des modifications ultra-structurales subtiles et précoces qui accompagnent la mort cellulaire telles que la rupture de la membrane plasmique et la membrane externe mitochondriale, le gonflement de la matrice mitochondriale. La microscopie électronique peut être complétée à l'utilisation des anticorps afin de détecter la présence et/ou la localisation subcellulaire de protéines spécifiques de certaines voies de more.

Certaines altérations morphologiques intervenant dans la mort cellulaire par apoptose peuvent être détectées par cytométrie en flux.

- ✓ La lumière diffuse aux petits angles donne une estimation relative de la taille des cellules.
- ✓ La diffusion aux grands angles (90°) fournit des indications sur la granulosité cellulaire qui rend compte des altérations de la surface cellulaire.

2.1.2. Méthodes de quantification de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire peut être définie comme le nombre de cellules vivantes dans une population cellulaire.

Les tests de viabilité cellulaire ont pour objectif de mesurer des activités liées au maintien cellulaire et à la survie.

Typiquement, on suit des biomarqueurs métaboliques comme l'ATP ou l'activité enzymatique par des tests d'inclusion de colorant par les cellules vivantes.

Un certain nombre d'entre eux déterminent le nombre de cellules vivantes grâce à la métabolisation de substrat colorés par les cellules métaboliquement active ou bien grâce à l'accumulation de colorants vitaux. Ces activités métaboliques ou l'accumulation de colorant étant spécifiques des cellules vivantes, elles sont considérées comme étant directement proportionnelles au nombre de cellules viables.

- ✓ Réalisé en plaque multi-puits, ce qui permet des mesures rapides à grande échelle.
- ✓ Repose sur l'utilisation de colorants ou de fluorochrome ; la viabilité cellulaire est évaluée par une mesure de l'absorbance en comparant du culture témoins à des culture dont les conditions de culture sont différentes.

✓ *Mesures des atteintes métaboliques*

Il existe une série de tests colorimétriques dont le principe repose sur la réduction de réactifs colorés, des sels de tetrazolium, par déshydrogénases des cellules viables.

Trois sels sont couramment utilisés : MTT (figure 1), XTT, WST-1 ; test représentatif de l'activité mitochondriale car ils sont réduits en grande partie par la chaîne respiratoire.

La résazurine de couleur bleu-non fluorescent (soluble, stable, non toxique) devient rose – fluorescent pour des mesures en contenu.

Le taux d'ATP peut également être analysé et donc une indication sur les capacités énergétiques

de la cellule : les cellules non viables perdent non seulement la capacité de synthétiser l'ATP mais contiennent également des ATPases endogènes qui dégradent rapidement l'ATP existant. La luciférine plus la luciférase dont l'activité ATP dépendante va générer un signal de luminescence

Principe : une indication sur l'activité mitochondriale

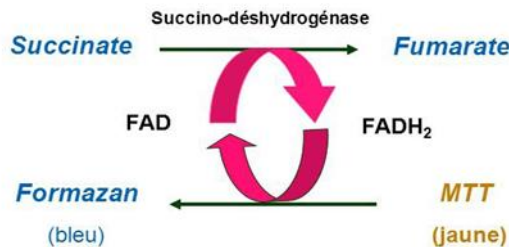


Figure 1. Test au MTT.

Test d'accumulation du rouge neutre

Le rouge neutre est un colorant vital faiblement cationique qui diffuse facilement au travers la membrane plasmique, puis qui s'accumule dans les lysosomes où il se lie aux sites anioniques de la matrice lysosomale. La séquestration du rouge neutre dans les lysosomes ne se maintient pas dans les cellules non viables (figure 2).

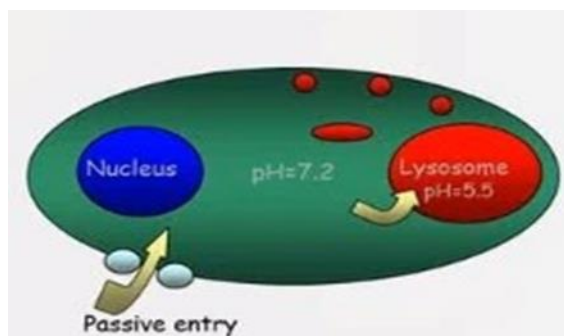


Figure 2. Principe du test d'accumulation du rouge neutre.

L'évaluation du taux d'incorporation du rouge neutre par les cellules viables se fait après fixation des cellules au formaldéhyde puis extraction du rouge neutre avec un mélange d'acide acétique-éthanol et quantification par spectroscopie.

La limite de ces tests de viabilité cellulaire est qu'ils ne permettent pas de différencier les cellules proliférantes des cellules quiescentes. Aussi pour une interprétation correcte de ces tests, il est préférable de les réaliser sur une durée assez courte ou bien sur des cellules qui ne sont plus en phase exponentielle de croissance.

En effet, si une prolifération se poursuit chez le témoin, une diminution du biomarqueur

métabolique dans les cultures traitées pourrait être interprétée comme une baisse de viabilité alors qu'elle peut être liée à un effet cytostatique.

2.2. Quantification des cellules mortes par la perte d'intégrité de la membrane plasmique

Les tests de cytotoxicité détectent la perte d'intégrité membranaire associée à la mort cellulaire.

Il existe deux approches :

- ✓ Basée sur l'utilisation de colorants dit : exclusion (ne rentre que dans les cellules mortes).
- ✓ Repose sur la mesure du relargage d'enzyme cytosolique.

2.1.2 Méthodes utilisant l'exclusion de colorants vitaux

Deux molécules sont fréquemment utilisées pour identifier les cellules mortes : bleu de trypan (microscopie optique en visible) et iodure de propidium (microscope optique à fluorescence).

Le bleu de trypan (figure 3) est utilisé couramment en culture cellulaire pour évaluer la viabilité cellulaire. Ce colorant est activement expulsé des cellules vivantes alors qu'il diffuse dans les cellules mortes qui prennent alors une coloration bleue identifiable au microscope. La détermination du taux de mortalité se fait par comptage cellulaire en cellule de Malassez. Peu rapide, la fiabilité peut varier selon le manipulateur.

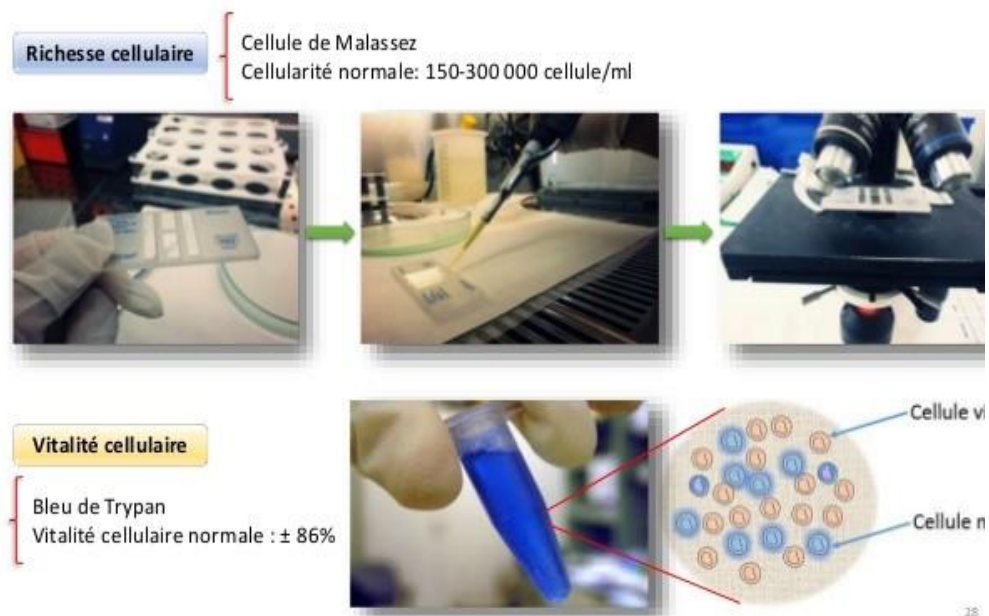


Figure 3. Test du bleu de trypan.

Iodure de propidium est un fluorochrome non perméant qui ne diffuse qu'au travers des membranes plasmiques perméabilisées des cellules mortes où il s'intercale de manière non spécifique toutes les 4 à 5 paires de base de l'ADN. Seules les cellules mortes présentent donc une

fluorescence rouge de leur noyau détectable soit par microscopie de fluorescence soit par cytométrie en flux pour une analyse quantitative sur un nombre important de cellule.

Pour le dénombrement, une étape de trypsination avec soin afin de ne pas altérer les membranes(faux positifs).

2.1.3 Méthodes utilisant la libération d'enzyme intracellulaire

En cas d'altérations de l'intégrité membranaire, des enzymes intracellulaires sont libérées dans le milieu extracellulaire ou la détection de leur activité signe une cytotoxicité. Le test le plus connu est le test de la lactate déshydrogénase (LDH) : enzyme cytosolique stable qui catalyse la conversion du lactate en pyruvate avec production concomitante de NADH (figure 4).

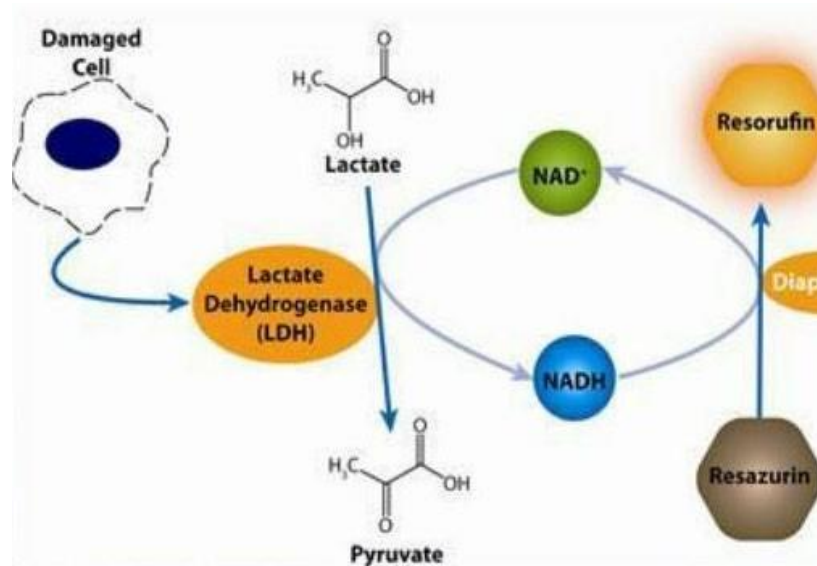


Figure 4. Test du lactate déshydrogénase (LDH).

La mesure de son activité dans le milieu de culture rend compte du nombre des cellules lysées.

Le test est non destructif car il consiste juste à prélever le surnageant de cultures, il est ainsi possible d'y associer une autre mesure.

Inconvénients : la diminution spontanée de l'activité enzymatique en raison de la dégradation naturelle de l'enzyme sous l'influence de pH, ...

2.2 .Détection couplée des cellules mortes et des cellules vivantes

La discrimination entre ces deux populations se fait par l'utilisation d'un couple de colorants qui permettent de mesurer en parallèle l'activité métabolique des cellules vivantes et la perte d'intégrité de ces cellules mortes.

✓ **Calcéine- acetomethoxyl (AM) + iodure de propidium**

La calcéine, non fluorescent et perméant, reste piégé dans les cellules vivantes grâce au clivage du AM par les estérases cellulaire ou' la calcéine forme une fluorescence verte (figure 5).

La quantification et la détection peuvent se faire par microscopie à fluorescence par cytométrie en flux ou grâce à un lecteur de microplaques à fluorescence.

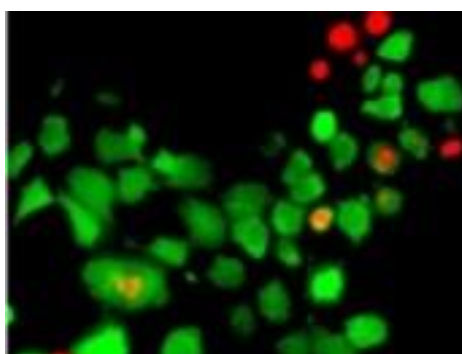


Figure 5. Détection couplée des cellules mortes et des cellules vivantes par le test calcéine-acetomethoxyl (AM) + iodure de propidium.

Les cellules mortes apparaissent rouges due à l'iodure de propidium qui est perméant uniquement aux cellules mortes, tandis que les cellules vivantes apparaissent vertes due à la conversion intracellulaire de la calcéine- AM à la calcéine fluorescente vertes après le clivage du AM par les estérases intracellulaire.

- ✓ Une autre association possible de fluorochrome est la carboxyfluorescine diacetate (CEDA)/ bromure d'éthidium (BTT).
 - ✓ Détecter deux activités protéases différentes : le réactif combine deux peptides substrats couplés à des fluorophores et appliqués simultanément lors de la réalisation du test.
1. Le 1^{er} substrat est perméant et permet de détecter une activité protéase spécifique des cellules vivantes par génération d'un signal fluorescent. Cette protéase devient inactive lorsqu' elle se trouve dans le milieu extracellulaire par la perte d'intégrité membranaire.
 2. peptide : non perméant et détecte l'activité des protéases extracellulaire relarguées par les cellules mortes.

2.3 Méthodes d'étude de la prolifération cellulaire

Dans la mesure du possible, il est préférable de réaliser les tests de viabilité cellulaire sur des cellules non cyclantes afin de s'assurer que l'effet observé est bien lié à la mort cellulaire et non à une atteinte de la prolifération cellulaire. Sinon, il convient d'évaluer en parallèle la prolifération cellulaire qui est définie par la mesure des cellules se divisent dans une population.

2.3.1. Dénombrement des cellules

C'est une étape obligatoire, parfois fastidieuse mais incontournable en culture cellulaire. Elle permet d'avoir une information qualitative, et surtout quantitative sur sa culture cellulaire à un temps T.

- ***Principe du comptage cellulaire***

Le comptage ou numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis d'un milieu liquide.

On exprime le résultat d'un comptage en concentration cellulaire, c'est à dire en unité d'événements par unité de volume (par ex. nombre de cellules / ml). Le comptage cellulaire s'effectue toujours sur une partie de l'échantillon et jamais sur sa totalité. Pour cela un échantillon défini de la solution totale est prélevé puis le nombre d'événements Compteurs présents est compté. Le nombre obtenu est extrapolé au volume total pour estimer la concentration.

- La numération cellulaire peut se faire soit par un comptage manuel au microscope, soit par un comptage automatisé avec des équipements dédiés.
- Selon la nature de l'échantillon (lysate de broyage d'organes, suspension d'une culture cellulaire, extrait de sang de patients, etc ...), le principe du comptage est identique mais avec les compteurs automatisés des optimisations sont nécessaires pour éviter de sur ou sous-exprimer la concentration cellulaire.
- En complément, nous verrons qu'il est possible de combiner le comptage avec la viabilité des cellules.

- ***Le comptage manuel***

Le comptage manuel est le comptage le plus répandu dans les laboratoires, car il est rapide et très facile à mettre en oeuvre (nécessite peu de matériel). C'est l'utilisateur lui-même qui choisit de compter ou non certaines cellules. Pour ce comptage manuel, l'expérimentateur a besoin :

- D'une lame porte objet, généralement en verre épais, dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu et comportant un quadrillage
- D'une pipette et de tampon PBS pour les dilutions

- D'un microscope et d'une solution à compter

Les lames utilisées pour le comptage manuel sont des lames spécifiques, en verre ou en plastique. Généralement, les lames en verre sont les plus utilisées. Ces lames sont en forme de porte-objet de 30 x 70 mm et de 4 mm d'épaisseur comme montré ci-dessous:

La partie centrale possède un quadrillage différent selon le type de lame (Par ex : Malassez Neubauer, Bürker, Fuchs Rosenthal, Thoma, ou Bürker Türk) :

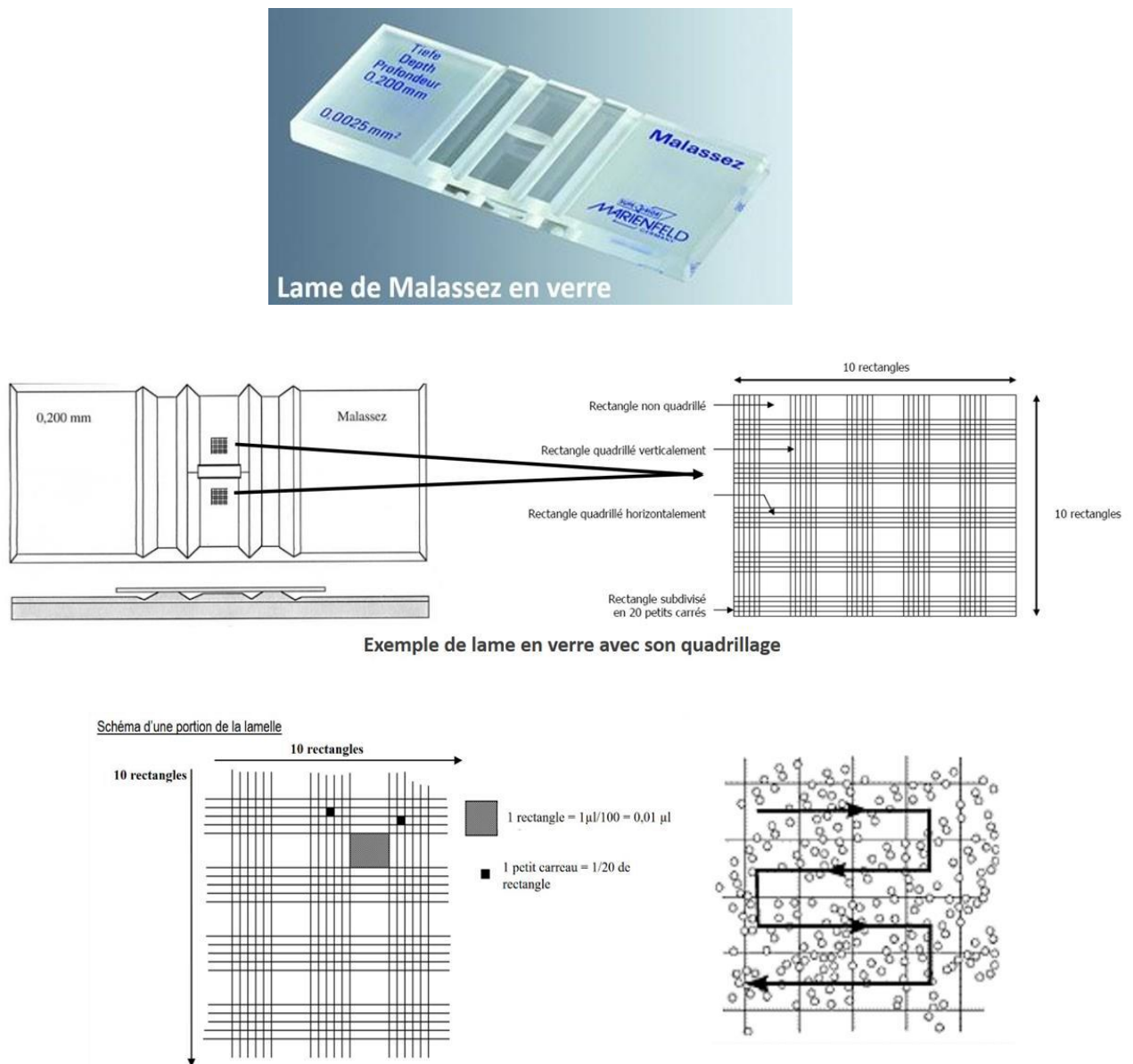


Figure 6. Dénombrement des cellules manuel par lame de Malassez.

Les lames Malassez : généralement utilisées pour le comptage d'échantillons à forte densité cellulaire, tel que le sang. Ces lames permettent le comptage d'une majorité d'échantillons et sont donc les plus répandues en laboratoire.

Les lames Neubauer : dédiées au comptage d'érythrocytes et de thrombocytes

Les lames Bürker : utilisées pour le comptage de leucocytes

Les lames Fuchs Rosenthal : ont une surface bien plus grande que les autres lames, et sont adaptées pour le comptage d'échantillons tel que le liquide céphalorachidien.

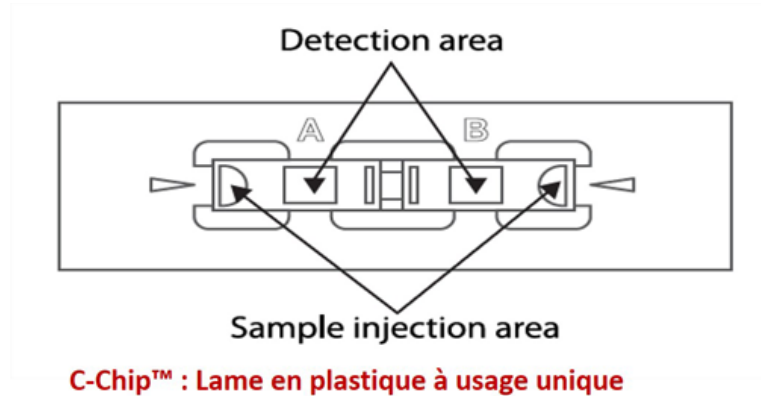
Les lames Thoma : plutôt réservées pour le comptage d'hématies et de leucocytes

Les lames Bürker Türk : sont une combinaison des lames Bürker et Thoma.

La lame la plus répandue en laboratoire est la lame de Malassez. Elle est gravée de 100 rectangles, eux-mêmes recoupés en 25 rectangles qui sont subdivisés en 20 petits carrés pour faciliter le comptage. Le volume correspondant au quadrillage total est égal à 1 μ l.

- Pour réaliser le comptage, un volume d'échantillon de la solution à compter (en général entre 10 et 20 μ l) est déposé entre la lame et la lamelle au niveau du quadrillage (étalement de l'échantillon par capillarité entre la lame et la lamelle).
- Cas d'une culture de cellules adhérentes : pour obtenir la concentration il est nécessaire de décoller au préalable les cellules en ajoutant de la trypsine pour obtenir une suspension cellulaire à partir de laquelle le comptage sera fait.
- La gamme de concentration pour ce type de comptage se situe entre 250 000 et 2 500 000 cellules/ml :
 - Au-dessus de cette concentration, le risque d'erreur augmente de façon significative
 - En-dessous de cette gamme, l'extrapolation est faite sur une quantité de cellules trop faible pour être fiableLa concentration optimale lue avec cette méthode est de 1 million de cellules/ml.
- En fonction de la confluence des cellules dans la suspension cellulaire, il est recommandé de faire une dilution avant le comptage. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution dans le calcul de la concentration totale de la suspension cellulaire.
- Une fois la lame chargée, elle est observée sous le microscope. Après la mise au point, on compte le nombre d'événements sur au moins 4 ou 5 carrés du quadrillage. Le but est de compter environ 100 cellules.
- Après le comptage, il suffit alors d'extrapoler pour déduire la concentration totale de l'échantillon/suspension cellulaire : Formule de calcul pour obtenir la concentration cellulaire :
Concentration (cel/ml) = Quantité de cellules / Volume (en ml)
- Formule de calcul modifiée appliquée aux lames de comptage :
Concentration = (Quantité de cellules x 10 000) / (Quantité de cadres x dilution)
- Comme dans toute expérience, il est important de faire des répliques.

- Ce type de comptage manuel, bien que fastidieux, est économique et facile à mettre en place dans un laboratoire. Cependant, après le comptage il est essentiel de nettoyer les lames en verre pour éviter toutes contaminations croisées.
- Pour pallier ce risque de contamination, des lames en plastique à usage unique ont été développées : les hémocytomètres C-Chip™. Ces lames en plastique comportent 2 chambres de dépôt avec chacune 2 quadrillages permettant d'effectuer 2 comptages à partir d'une seule lame.



- **Compteurs automatisés**

- Des compteurs automatisés disponibles sur le marché utilisent une lecture de cellules en bleu de trypan, ils possèdent une caméra CCD, un logiciel de traitement des résultats et certains sont équipés d'un portoir de tubes (comptage haut-débit). L'échantillon est aspiré ainsi que le bleu de trypan, puis le mélange est injecté dans le système fluide et passe à travers une cellule qui permet de capter une image de la suspension cellulaire. L'acquisition porte sur une centaine d'images qui déterminent le nombre de cellules, la concentration et la viabilité de l'échantillon. Les données obtenues sont des résultats numériques, des histogrammes de distribution des tailles de cellules et des images des cellules. Le fait de visualiser les cellules post-comptage permet de s'assurer que le dispositif n'a pas compté de faux positifs ou des débris cellulaires. En plus des données quantitatives, l'utilisateur a accès à des données qualitatives, essentielles et complémentaires pour la suite de ses expériences.

- Pour ces compteurs, le volume d'échantillon utilisé peut être important (environ 500 μ l) auquel il faut ajouter le volume mort et le volume de nettoyage du système fluide. Ce dispositif est donc gourmand en tampon et en échantillon, d'autant plus que le volume utilisée d'une suspension cellulaire n'est pas ré-utilisable après le comptage.

- De plus, le volume de comptage utilisé et la fluide exigent des étapes contraignantes de nettoyage pour écarter tout risque de contamination croisée.

2.3.2. Quantification des acides nucléiques

Le Cyquant GR est un indicateur fluorescent du contenu en acide nucléique qui permet une quantification rapide aisée du nombre de cellule. Il présente l'avantage de se liant aux acides nucléiques de présenter une plus grande stabilité. Il est appliqué sur des cellules qui ont été congelées puis perméabilisées en présence du tampon de lyse afin de faciliter l'accès du colorant à l'acide nucléique (figure 7).

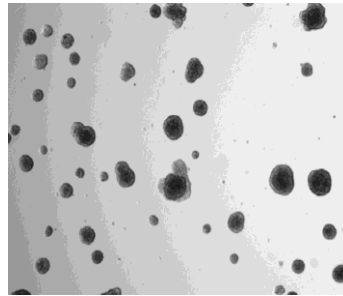


Figure 7. Quantification des acides nucléiques le Cyquant GR. Le colorant CyQUANT® GR a été incubé avec du lysat cellulaire et a présenté une forte fluorescence verte lorsqu'il est lié à des acides nucléiques cellulaires.

Bien que le contenu en acide nucléique par cellule change au cours de temps, le contenu net dans une culture asynchrone reste constant. Les conditions exponentielles conduisent à un arrêt des cellules en des points spécifiques du cycle.

2.3.4. Incorporation d'un précurseur de l'ADN

Le paramètre le plus important pour analyser la prolifération est la mesure de la synthèse d'ADN comme marqueur spécifique de la réplication.

Des précurseurs marqués de l'ADN sont utilisés tels que ³Hthymidine, bromo-désoxyuridine (BrdU), éthynyl-désoxyuridine (EdU). Lors de la synthèse d'ADN, ces précurseurs sont incorporés à la place de la thymidine. L'incorporation est détectée par la mesure de la radioactivité (une grande sensibilité). Inconvénient : la manipulation de radio-éléments. C'est la raison pour laquelle BrdU et EdU sont utilisés en préférence.

BrdU : la détection nécessite l'utilisation d'anticorps anti-BrdU et donc une étape préalable de dénaturation de l'ADN pour permettre à l'anticorps d'interagir avec le BrdU.

EdU : la détection est basée sur la chimie clic c.à.d. une réaction de covalence catalysée par le cuivre : azide, fluorochrome et alkyne et la moité éthynyle de EdU => cytométrie en flux.

Que soit le précurseur choisi, si l'étude est réalisée sur des cellules non synchronisé et qui sont donc dans les différentes phases de cycle => déterminer la durée et le moment d'application.

2.4 Etude du cycle cellulaire

Pour une évaluation plus approfondie de l'impact d'une substance sur le cycle cellulaire, celui-ci peut être étudié par une analyse de la distribution d'une population cellulaire dans les différentes phases du cycle.

Elle peut être réalisée par cytométrie en flux sur une population cellulaire dont l'ADN est marqué par l'iodure de propidium.

Les cellules en G0/G1 ont une intensité de fluorescence deux fois moindre G2/M ; alors que les cellules en phase S présentent une intensité intermédiaire.

2.5 Méthodes d'étude de la génotoxicité (test de comètes)

L'étude de la génotoxicité couvre trois domaines : la mutation génique, les cassures et les aberrations chromosomiques (clastogénicité) et le gain ou la perte de chromosome (aneuploidie).

Le test des comètes (single cell gel electrophoresis or comet assay) est un test qui permet de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique, indirectement lors des processus enzymatiques de réparation des dommages et enfin lors de processus secondaire de fragmentation comme lors dans l'apoptose.

Le test de comète devenu une technique standard pour l'évaluation des dommages à l'ADN. Le principe (figure 8) de ce test est basé sur l'encapsulation de cellule dans une suspension d'agarose qui est déposé sur une lame de microscope ces cellules sont ensuite lysées en condition neutre ou alcaline, et les boucles superenroulées de l'ADN devenues plus libre du fait des cassures sont déplacées vers l'anode au sein du gel d'agarose pour une électrophorèse.

Le terme comète désigne ainsi les structures issues de la migration de l'ADN ressemblant à des comètes. Elles peuvent être observées par microscope à fluorescence. L'intensité de la queue de la comète par rapport à la tête reflète le nombre de cassure.

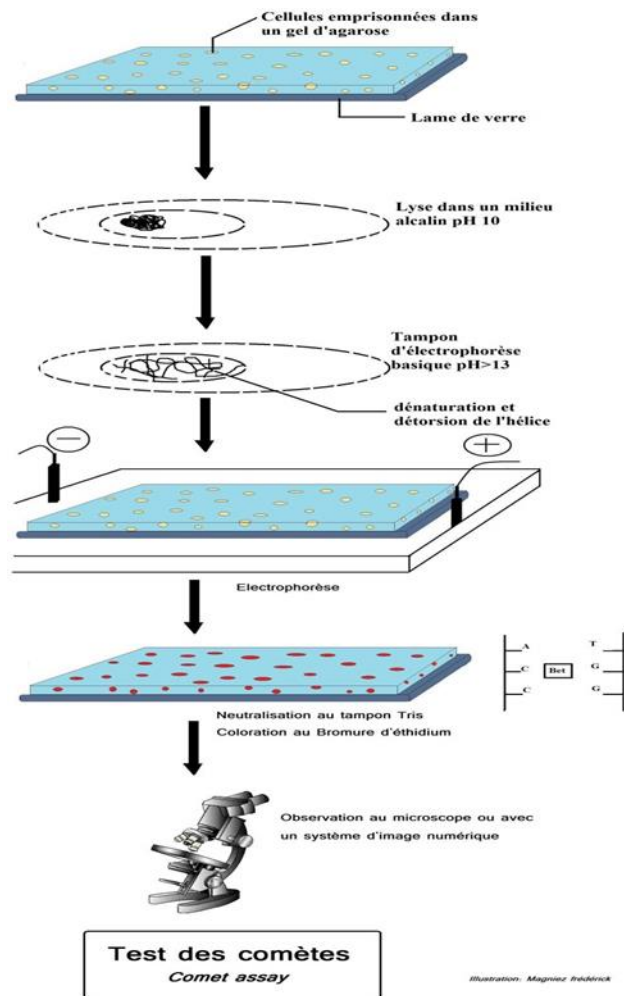


Figure 8. Test de comètes.

3. Construction d'un système d'expression

3.1. La Transformation

3.1.1- La découverte de la transformation

Le phénomène de transformation a été mis en évidence pour la première fois chez les pneumocoques (*Streptococcus pneumoniae*) par Griffith (1928) qui montra que l'ADN était bien le matériel génétique.

Griffith (1928) avait observé que l'injection à des souris d'un mélange de pneumocoques avirulents ("rough") vivants et de pneumocoques virulents ("smooth") tués pouvait provoquer une septicémie mortelle. Des souris mortes, il avait isolé des pneumocoques virulents ("smooth"). Cette observation resta sans interprétation satisfaisante. Griffith donna le nom de transformation à ce changement de bactéries non virulentes en bactéries virulentes pathogènes. Plus tard, Avery, MacLeod et McCarty (1944) déterminèrent par la suite le constituant responsable de la transformation décrite par Griffith.

Dans un premier temps, ils préparèrent des extraits de pneumocoque virulent et détruisirent sélectivement l'ADN, l'ARN ou les protéines de l'extrait à l'aide d'enzyme appropriées. Ils exposèrent ensuite des pneumocoques non virulents aux extraits traités. La transformation des bactéries non virulentes n'avait plus lieu lorsque l'ADN avait été hydrolysé, ce qui suggère que l'ADN portait l'information requise pour la transformation. Avery et ses collègues en 1944 apportèrent pour la première fois la preuve que le principe transformant découvert par Griffith était bien l'ADN et c'était donc cette molécule qui portait l'information Génétique.

3.1.2. Caractéristiques de la transformation:

- ✓ L'ADN doit être libéré d'une bactérie (exogénote)
- ✓ L'ADN ne doit se fixer sur une bactérie réceptrice et en phase de compétence.
- ✓ L'absorption d'ADN est suivie d'une recombinaison légitime avec acquisition de nouveaux caractères génétiques stables, transmissibles à la descendance (recombinants ou transformants)
- ✓ Le transfert est partiel: une partie de l'exogénote (1 à 2 % du génome) pénètre et se recombine (si l'homologie est suffisante).
- ✓ Ce transfert naturel d'ADN bactérien est limité à quelques espèces telles *Streptococcus* dont *S. pneumoniae*, *Neisseria*, *Haemophilus*.....

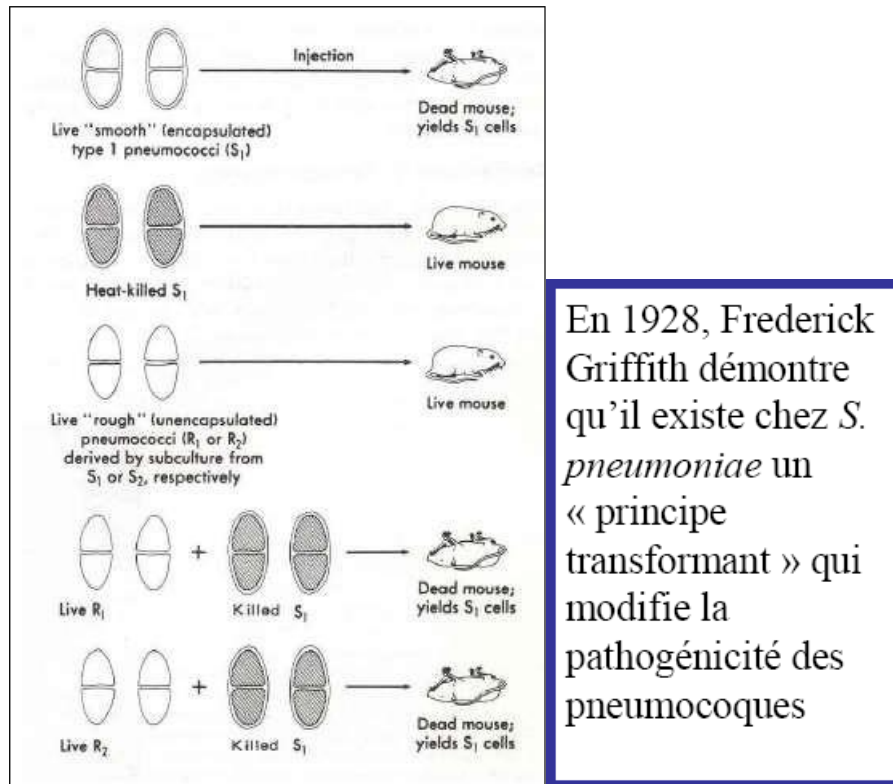


Figure1. La découverte de la transformation

3.1.3. Les bactéries naturellement transformables : notion d'état de compétence

La compétence est la capacité d'une bactérie de recevoir de l'ADN exogène liée à des mécanismes différents en fonction des espèces. C'est un état physiologique particulier caractérisé par la synthèse de protéines particulières (protéines membranaires fixant le DNA, autolysines de la paroi, nucléases, etc.). Certaines espèces bactériennes sont naturellement compétentes (*Bacillus subtilis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, etc.); d'autres ne le sont pas mais peuvent le devenir expérimentalement (*Escherichia coli*), par exemple par un traitement au CaCl_2 qui rend la membrane cellulaire plus perméable au DNA.

3.1.4 Mécanisme de la transformation

La transformation résulte de l'incorporation de DNA nu du milieu extérieur avec, pour conséquence, l'acquisition définitive par la bactérie réceptrice de caractères héréditaires de la bactérie donneuse de DNA.

L'ADN, à l'état bicaténaire, se fixe au niveau d'un site récepteur (30 à 80 sites par cellules); là l'ADN adsorbé porte des coupures simples brin. La pénétration dans la cellule fait intervenir une endonucléase membranaire qui sert d'ADN translocase en dégradant l'un des brins et favorisant

la pénétration de l'autre. L'intégration se fait par recombinaison avec déplacement de la chaîne homologue du receveur pour former un segment hétéroduplex. La taille moyenne des fragments intégrés est de 10 à 20 Kb et plusieurs insertions sont possibles par chromosome.

Remarque:

Le mécanisme de transformation est sensiblement différent chez les bactéries à Gram négative en raison de la particularité de la paroi. C'est le cas de *Haemophilus influenzae* où la compétence est liée à une augmentation dans le taux de lipopolysaccharides de la membrane externe. D'autre part cette espèce ne produit pas de facteur de compétence et ne peuvent absorber que de l'ADN venant de souches apparentées.

La spécificité de transformation de *H. influenzae* est due à une séquence spéciale de 11 pb (5'AAGTGCGGTAC 3'), répétée 600 fois dans l'ADN de *H. influenzae*. L'ADN doit posséder cette séquence pour être lié à une cellule compétente.

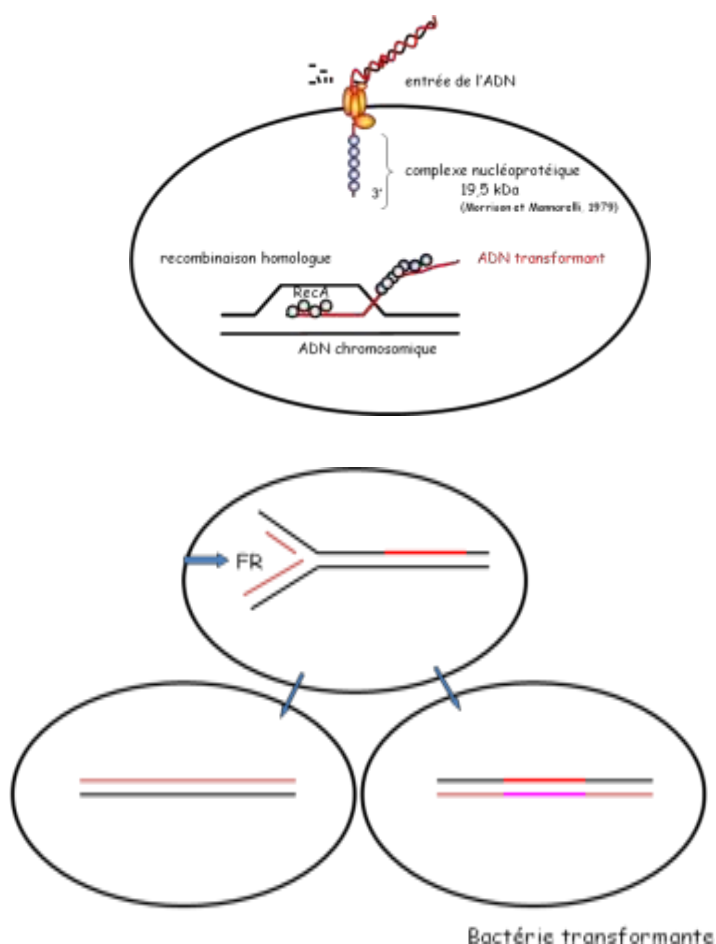


Figure 2 : Les étapes de la transformation

3.1.5. Conséquences de la transformation

- ✓ Ce mode de transfert a permis de montrer que l'ADN est le support chimique de l'hérédité, et non les protéines.
- ✓ Il a permis l'établissement des premières cartes génétiques partielles chez les bactéries et donc des études plus précises sur la virulence, la résistance aux antibiotiques...
- ✓ C'est une technique de base de génie génétique, utilisée quotidiennement dans les laboratoires lors de clonage (transformation), dans des bactéries non transformables naturellement comme *E. coli*.
- ✓ C'est le mécanisme de la variation antigénique chez les gonocoques et les méningocoque et de l'émergence de certaines espèces résistantes aux antibiotiques (pneumocoque, méningocoque)

3.2. La Transduction

La transduction est un transfert génétique par l'intermédiaire d'un virus (bactériophage) qui est le vecteur de l'exogénote (matériel génétique du donneur).

3.2.1. Rappel sur les bactériophages

Les bactériophages sont des particules infectieuses parasites strictes des bactéries; ils sont constitués d'un génome (ADN mono- ou bicaténaire, ou ARN) protégé par une capsidie protéinique. Il existe différents types morphologiques de capsidie.

Les bactériophages se distinguent des bactéries par les propriétés suivantes:

- Présence d'un seul type d'acide nucléique
- Absence de systèmes de biosynthèse
- Mode particulier de multiplication.

3.2.1.1. Cycle lytique: Exemple: phages de type "T"

a) Adsorption: résulte de la rencontre fortuite entre une particule phagique et une bactérie; dépend de la spécificité de la capsidie par rapport à des sites récepteurs sur la bactérie.

b) Injection: la pénétration de l'acide nucléique phagique.

c) Synthèse des constituants phagiques et maturation. On distingue:

- L'arrêt des réplifications et transcription de l'ADN bactérien
- La transcription et répllication de l'ADN phagique
- La synthèse des protéines capsidiques avec l'encapsidation du génome = maturation.

d) Lyse de la bactérie: le relâchement des particules infectieuses nouvellement formées est provoqué par l'action d'un lysozyme codé par l'ADN phagique.

3.2.1.2.Cycle lysogène: Exemple: phage lambda.

Certains bactériophages, après la phase d'injection, peuvent entrer dans un cycle lysogène et persister à l'état de prophage à l'intérieur de la bactérie. Occasionnellement, le prophage pourra être induit et entrer dans un cycle lytique (multiplication des bactériophages).

Les phages qui entraînent une infection lytique sont dits virulents et ceux qui entraînent une infection lysogénique sont dits tempérés.

3.2.2 Les différents types de transduction

La capsid d'un bactériophage peut servir de vecteur pour véhiculer des gènes bactériens d'une bactérie à un'autre. On distingue:

3.2.2.1La transduction généralisée

N'importe quel gène bactérien a théoriquement, la même probabilité d'être transduit. Au cours de l'infection, le phage se fixe à la paroi de la cellule bactérienne donneuse et injecte son ADN dans la bactérie. L'ADN de phage sert de matrice pour la synthèse de nouvelles molécules d'ADN viral. Il dirige également la synthèse de la capsid protéique du phage. Pendant ce temps le chromosome bactérien est fragmenté par des enzymes virales, il arrive que, durant l'assemblage des phages, quelques fragments d'ADN bactériens soient enfermés par erreur à l'intérieur de la capsid protéique des bactériophages. Certaines particules virales ainsi formées contiennent alors de l'ADN bactérien plutôt que l'ADN phagique. Quand les particules virales libérées infectent par la suite une nouvelle population de bactéries, il y a à l'occasion transfert de gènes bactériens à des cellules receveuses. La transduction de l'ADN cellulaire par un virus peut avoir pour conséquence la recombinaison de l'ADN de la cellule hôte donneuse et de celui de la cellule hôte receveuse. Le processus de la transduction généralisée est typique des bactériophages tels que le phage P1 de *E. coli* et le phage P22 de *Salmonella*.

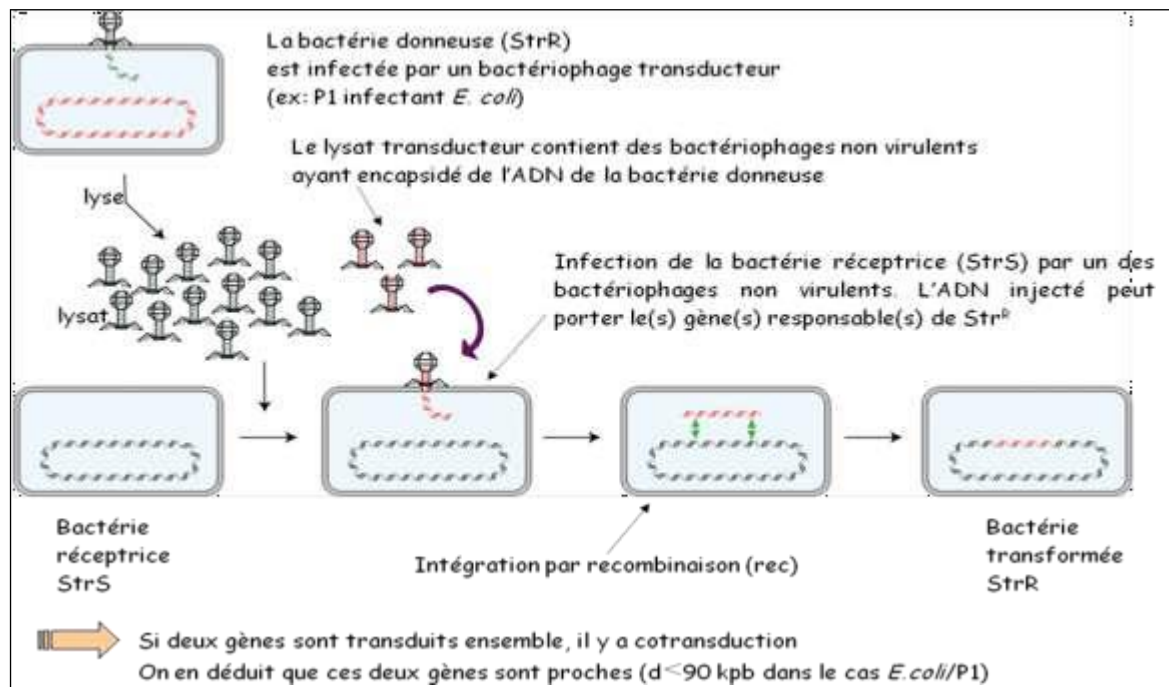


Figure 3 : La transduction Généralisée

3.2.2.2. La transduction spécialisée

Pour un phage donné et pour une espèce bactérienne donnée, ce sont toujours les mêmes gènes qui sont transduits; exemple: phage λ et gène *gal*: cette spécificité dépend du site spécifique d'intégration du prophage dans le chromosome bactérien pendant le cycle lysogène. Lorsque le phage λ se fixe comme un prophage en point précis du chromosome, situé près du locus *Gal*. Des échanges peuvent survenir entre phage et la partie du chromosome proche du site de fixation. Lorsque le prophage se transforme en bactériophage virulent et se multiplie, certains virus seront porteurs de matériel génétique de l'hôte. Certains des bactériophages formés qui portent des gènes bactériens peuvent avoir perdu un ou plusieurs de leurs propres gènes: ils sont dits **défectifs** (λ_d). Un tel bactériophage porteur de gène bactérien *gal* sera dit $\lambda_{d_{gal}}$. Les bactériophages porteurs d'exogénote (matériel génétique issus d'une autre cellule) pourront le transmettre à la bactérie qu'ils infectent. Ce transfert est rare, sa fréquence est de 10^{-5} (transduction à basse fréquence).

Lorsque un tel bactériophage devient prophage, la bactérie infectée devient partiellement diploïde: avec le bactériophage λ , le gène *gal* peut être transmis à une bactérie Gla^- avec la formation un hétérozygote gal^+/gal^- .

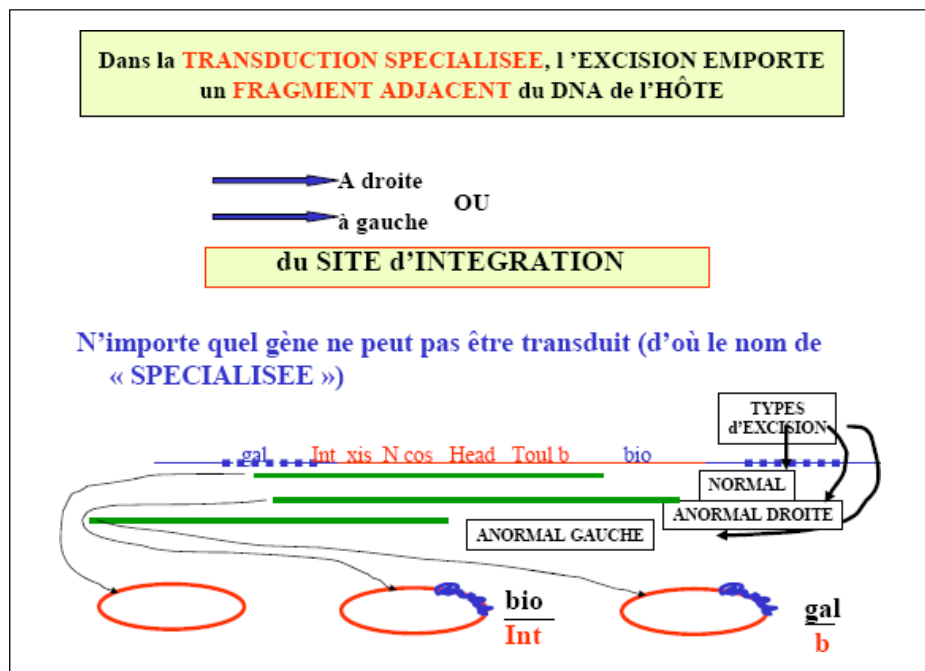


Figure 4: La transduction Spécialisée

3.3. La Transfection

On appelle transfection le processus de transfert de gènes, c'est-à-dire l'introduction de matériel génétique exogène dans des cellules eucaryotes, n'utilisant pas comme vecteur un virus, par opposition à la transduction.

À noter que le terme « transfection » est assez analogue au processus de transformation bactérien, mais ce terme n'a pas été appliqué aux cellules animales, du fait de son association à un phénotype altéré et une croissance anarchique (en clair, d'un stade précancéreux).

Elle est typiquement réalisée par l'ouverture transitoire de pores dans les cellules pour permettre l'entrée de molécules extracellulaires, comme un plasmide d'ADN superenroulé, un petit ARN interférent, ou d'autres.

Les cellules manipulées pour accepter un ADN étranger (les cellules avec des pores) sont appelées « cellules compétentes » (competent cells).

3.3.1. Méthodes

Il existe différentes méthodes pour introduire un ADN exogène dans une cellule.

3.3.1.1. Phosphate de calcium

-L'une des plus classiques et des moins chères, mais aussi des moins fiables, est la transfection par phosphate de calcium, Une solution saline tamponnée par HEPES (HEPES-buffered saline solution - HeBS) doublement concentrée et contenant des ions phosphate est combinée avec une solution de chlorure de calcium contenant l'ADN à transférer. Lorsque ces deux solutions sont combinées, il se forme un fin précipité de phosphate de calcium, liant l'ADN à transférer à sa

surface. La suspension contenant le précipité est alors ajoutée aux cellules à transférer (habituellement une culture cellulaire monocouche). Par un procédé non entièrement compris, les cellules incorporent le précipité contenant l'ADN (les ions Ca^{2+} masquent la polarité négative de l'ADN lui permettant d'entrer dans la cellule).

La transfection par phosphate de calcium est particulièrement employée avec les cellules 293 pour assurer des transfusions transitoires.

3.3.1.2. L'inclusion de l'ADN à transférer dans des liposomes

Une méthode très efficace est l'inclusion de l'ADN à transférer dans des liposomes, c'est-à-dire des micelles possédant des propriétés structurales analogues à celles des membranes cellulaires, et leur permettant de fusionner effectivement avec elles, libérant l'ADN dans la cellule. Pour les cellules eucaryotes, une transfection basée sur les lipides et les polycations est utilisée, du fait de la plus grande sensibilité des cellules.

3.3.1.3. Agents polycationiques

D'autres méthodes utilisent des agents polycationiques hautement branchés, appelés dendrimères, comme le polyéthylèneimine (PEI), pour lier l'ADN et le transporter dans la cellule.

Le polycation se fixe aux phosphates négatifs de l'ADN et l'englobe entièrement. Le complexe formé est globalement positif et va pouvoir se fixer aux polysaccharides de la membrane plasmique, qui sont négatifs. Du Tris, souvent inclus dans la solution de transfection, améliore la perméabilité membranaire. Une fois fixé à la membrane, le complexe est endocyté et adressé à l'endosome. De plus, le polyéthylèneimine possède des propriétés uniques d'éponge à protons, captant les protons du lysosome lors de sa fusion avec l'endosome, inactivant ainsi les hydrolases acides pouvant dégrader l'ADN. Dans le cas du DEAE-Dextran, la captation des protons lysosomaux est assurée par un agent lysosomotropique (chloroquine). Par un processus encore mal connu, le complexe ADN-polycation quitte l'endosome, et est transloqué dans le noyau, où il est exprimé (transfection transitoire, cf. infra) ou intégré au génome puis exprimé (transfection stable, cf. infra).

3.3.2.4. L'électroporation

D'autres encore utilisent l'électroporation, le choc thermique (heat shock), et les propriétés particulières de réactifs comme le GeneCellin. Une approche directe de la transfection est le gene gun, dans lequel système l'ADN est couplé à une nanoparticule d'un solide inerte (généralement de l'or), qui est ensuite « tiré » (shot) directement dans le noyau des cellules-cibles.

3.3.2.5 .La magnétofection

La magnétofection est une méthode de transfection qui utilise des champs magnétiques pour concentrer des particules contenant de l'acide nucléique et des échantillons *in utero* vers les cellules cibles du corps¹. Cette méthode tente d'unir les avantages des méthodes de transfection biochimique (lipides cationiques ou atomes de polymère) et physique (électroporation, biolistique) dans un même système en excluant leurs inconvénients (faible efficacité, toxicité).

3.3.2. Transfection stable et transitoire

Dans la plupart des applications de la transfection, il suffit que le gène transfecté ne le soit que de manière transitoire. Comme l'ADN introduit n'est habituellement pas introduit dans le génome cellulaire, il est normalement perdu au plus tard lors de la mitose des cellules. Si l'on souhaite que ce gène demeure dans le génome des cellules-mères ainsi que des cellules-filles, il faut réaliser une transfection stable.

Pour ce faire, un autre gène est co-transfecté. Ce gène confère à la cellule un avantage sélectif, comme la résistance à une toxine donnée. Bien que le rendement soit très faible, certaines cellules auront transloqué l'ADN exogène et l'auront intégré à leur génome; si l'on ajoute la toxine (à laquelle la cellule est devenue résistante) au milieu de culture cellulaire, seules les cellules transfectées seront capables de proliférer, tandis que les autres mourront. Après application de cette pression de sélection pendant quelques passages en culture, seules les cellules transfectées de façon stable résistent et peuvent continuer à être cultivées.

Un agent habituellement utilisé pour réaliser une transfection stable est le G418 (généticine), une toxine pouvant être neutralisée par le produit du gène de résistance à la néomycine.

4. Les Systèmes d'expression

Différents systèmes eucaryotes et procaryotes sont utilisés pour la production des protéines d'intérêt thérapeutiques et biotechnologiques (bactéries, levures, champignons, plantes, cellules d'insectes, cellules de mammifères, animaux transgéniques, etc...) Le choix d'un système adéquat dépend de la nature, de l'origine et de l'utilisation de la protéine désirée, ainsi de sa quantité et de son coût de fabrication.

Le choix de l'hôte d'expression sera en partie dicté par les impératifs économiques mais la qualité des protéines produites constituera également un paramètre déterminant, en particulier dans le cas de la production de protéines destinées à être injectées chez l'homme. Plusieurs systèmes sont aujourd'hui disponibles et chacun d'eux possède des avantages et des inconvénients.

4.1. Systèmes d'expression procaryotes

4.1.1. *Escherichia coli*

-*Escherichia coli* a été très étudié depuis les années 60 si bien que c'est un des organismes actuellement les mieux connus. L'ensemble de ces connaissances en biochimie, génétique et biologie moléculaire a été exploitée pour exprimer des protéines en grande quantité.

-Cette bactérie a plusieurs propriétés intéressantes lui permettant d'être utilisée pour exprimer des protéines : elle est facile à manipuler, elle pousse vite dans des milieux relativement peu cher et les souches de laboratoires sont inoffensives. De plus, tous les laboratoires de biologie moléculaire utilisent *E. coli* pour d'autres expériences (clonage, séquence...). Cette facilité en a fait le système d'expression le plus populaire. Pour exprimer un gène dans *E. coli*, il doit être inséré dans un vecteur qui contient plusieurs éléments :

1. Une origine de répllication

Un marqueur sélectionnable pour trier et maintenir les bactéries ayant incorporé le vecteur et un polylinker, comme tous les plasmides servant de vecteur. Le gène doit être répliqué dans la bactérie, autrement, on va le perdre très rapidement. La méthode générale consiste à l'insérer dans un plasmide qui porte une origine de répllication, si le produit du gène est toxique on utilisera une origine de répllication qui donne peu de copies, mais si le gène n'est pas toxique et s'il est bien régulé, on utilisera une origine à fort nombre de copies.

On peut positionner l'origine de répllication pour favoriser la production de protéines. Si on veut exprimer un gène non toxique pour la bactérie, l'expression sera simultanée à la croissance

(Phase exponentielle) de la population bactérienne. La fourche de réplication doit alors plutôt progresser dans le même sens que la transcription du gène de sélection. Si on veut exprimer un gène toxique pour la bactérie, l'expression s'effectuera en phase stationnaire, lorsqu'il n'y a plus de réplication. La fourche de réplication doit progresser en sens inverse de la transcription pour avorter toute transcription non désirée.

2. Un promoteur

(Un segment qui contrôle l'expression des gènes) si possible contrôlable, dont l'induction produira une grande quantité d'ARNm à partir du gène cloné. Deux domaines en amont du site d'initiation de la transcription sont importants dans les promoteurs procaryotes: Le domaine à -10 (Pribnow box, 5' T-A-T-A-A 3') et un domaine à -35 (5' T-T-G-A-C-A 3'). Ces deux domaines sont en contact avec l'ARN polymérase lors de l'initiation de la transcription.

Deux caractéristiques des promoteurs sont importantes pour l'expression des protéines, la force (vitesse) du promoteur et son inductibilité.

La force du promoteur : les promoteurs bactériens sont relativement faibles du moins pour les besoins de production. Pour les améliorer, des mutations ponctuelles ou des petites délétions (élimination) ont été effectuées au sein de ces promoteurs, ce qui a permis d'augmenter la transcription.

L'inductibilité, c'est à dire son contrôle : le plus souvent on désire utiliser un promoteur inductible par exemple lorsque la protéine est très toxique pour la bactérie. Dans ce cas, la protéine est produite en début de la culture et inhibe la croissance cellulaire.

3. Les séquences responsables de la traduction

Chez les procaryotes, l'initiation s'effectue par reconnaissance d'une séquence particulière (RBS, ribosome binding site). Cette séquence est composée d'une séquence riche en purine (Shine-Dalgarno, SD, AGGAGG) et du codon d'initiation qui doit être proche, idéalement, l'extrémité 3' de la boîte de Shine-Dalgarno doit être à 6 bases de l'ATG. Il y a plusieurs possibilités de boîte de Shine-Dalgarno : UAAGGAGG donne une meilleure traduction que AAGGA. Donc, si on veut exprimer un clone provenant d'une cellule eucaryote dans une bactérie, il faudra incorporer cette séquence en amont de l'ATG d'initiation.

Généralement, on mutagenise la séquence du gène d'intérêt au niveau de l'ATG en y incorporant un site de restriction tel que NdeI (CATATG). Ce site est présent sur le vecteur 8 nucléotides en aval d'un site de liaison au ribosome.

La bactérie *E. coli* fut et reste le premier hôte utilisé pour la production de protéines recombinantes, la première protéine recombinante (insuline) ayant été mise sur le marché en 1982. D'autres protéines sont depuis lors produites, comme par exemple, l'hormone de croissance, les interférons alpha et bêta, l'interleukine et le TNF (tumor necrosis factor).

Avantages

- ✓ -une excellente caractérisation génétique et physiologique,
- ✓ -un temps de génération court
- ✓ -une bonne adaptation à la culture en masse.
- ✓ De nombreux vecteurs plasmidiques ont été construits et sont disponibles afin d'insérer et exprimer un gène étranger.
- ✓ Cette bactérie possède une grande capacité à accumuler des protéines étrangères, puisque ces dernières peuvent représenter plus de 20 % des protéines cellulaires totales.

Les Inconvénients

- ✓ Le niveau d'expression de la protéine peut atteindre plusieurs grammes par litre.

E. coli est parfois incapable de synthétiser des protéines recombinantes possédant une conformation tridimensionnelle identique à celle de la protéine naturelle, en raison de l'absence de protéines chaperonnes spécifiques.

- ✓ De plus, les protéines sont souvent accumulées dans le cytoplasme sous forme d'agrégats protéiques insolubles, appelés « corps d'inclusions ».

-Il est souvent difficile de récupérer ces protéines mal repliées, car les étapes successives de dénaturation et de renaturation sont susceptibles d'amoindrir l'activité biologique des protéines.

4.1.2. *Caulobacter crescentus*

Est une bactérie gram négative non toxique qui est très répandue dans l'environnement principalement dans les biofilms. Cette bactérie est couverte à sa surface par une protéine qui s'arrange selon un réseau en deux dimensions régulièrement structuré. Cette protéine sert vraisemblablement à se protéger contre les virus, les bactéries pathogènes ou les enzymes lytiques susceptibles d'attaquer la protéine.

-Le système de sécrétion de cette protéine (RsaA) a été utilisée pour produire des protéines recombinantes en faisant une fusion entre la protéine RsaA et la protéine recherchée.

-Les protéines secrétées se retrouvent à la surface de la bactérie ou sur des liposomes.

-Le vecteur doit comporter deux origines de réplication, une pour *E. coli* et une pour *C. crescentus*, le signal de sécrétion en C terminal de la protéine produite et un promoteur pour l'expression.

4.1.3. Les Bacillus

Parmi les bactéries Gram positives, les Bacillus ont été et sont toujours très utilisés pour produire des protéines pour plusieurs raisons :

-Ils sont depuis longtemps utilisés par l'industrie pour produire des protéines. La subtilisine, protéase incorporée aux lessives. Il existe donc de nombreuses souches modifiées pour les contingences industrielles. Toutefois ces souches ne sont généralement pas disponibles. On les connaît bien au niveau génétique et leur manipulation par les techniques de biologie moléculaire est bien développée. Des promoteurs forts sont connus et des peptides signaux responsables de la sécrétion sont disponibles. Par exemple le peptide signal d'une subtilisine de *Bacillus amylolique fasciens* de 30 acides aminés a été utilisé avec succès.-

Un cas intéressant est l'expression avec *Bacillus brevis*, la souche 47 produit de 12 à 25 g de deux protéines secrétées appelées MWP (the middle wall protein) et OWP (outer wall protein) par litre de milieu.

-Durant la phase logarithmique, les deux protéines sont insérées dans la membrane mais elles continuent d'être produites pendant la phase stationnaire et elles sont alors secrétées dans le milieu.

-Les deux protéines appartiennent au même opéron (cpw), elles sont donc sous la dépendance d'un seul promoteur, et présentent un peptide signal.

4.1.4. *Ralstonia eutropha*

Depuis quelques années, une bactérie à Gram négatif, est également utilisée pour produire des protéines recombinantes ; il s'agit de *Ralstonia eutropha*. *Ralstonia* peut pousser à haute densité, jusqu'à 230 g par litre et il semble que les protéines qui font des corps d'inclusion chez *E. coli* reste solubles.

-Un système développé a produit des souches qui utilisent la T7 RNA polymérase sous le control du promoteur fort et inductible phaP. Le gène d'intérêt est cloné en aval du promoteur T7 puis introduit dans le génome de la bactérie

-L'enzyme organophosphorylase, connue pour être produite sous forme de corps d'inclusion chez *E. coli* avec une concentration inférieure à 0,1 g/L, a été produite avec succès chez *R. eutropha*, à une concentration de 10 g/L.

4.2. Systèmes d'expression eucaryotes

La production d'une protéine eucaryote dans un système bactérien n'est souvent envisageable que :

- ✓ -Pour des protéines dont l'activité n'est pas requise (pour faire un anticorps par exemple)
- ✓ Pour les protéines dont les modifications post-traductionnelle ne sont pas importantes. En effet, les procaryotes sont incapables de réaliser la plupart des modifications catalysées par des enzymes.
- ✓ Pour les protéines dont le repliement n'est pas dû à des protéines comme c'est le cas pour la plupart des protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique. dans les autres cas on utilisera un système eucaryote.

4.2.1. Les levures

Les levures sont utilisées depuis l'Antiquité dans l'alimentation humaine, pour la fabrication du pain et des boissons alcoolisées. Plusieurs levures sont utilisées pour exprimer les protéines. Les plus souvent utilisées sont *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactus* et *Pichia pastoris*.

Saccharomyces cerevisiae présente deux avantages : d'une part, on dispose de vecteurs qui peuvent se maintenir dans les cellules comme des plasmides bactériens, d'autre part, on peut facilement intégrer un gène par recombinaison dans le chromosome.

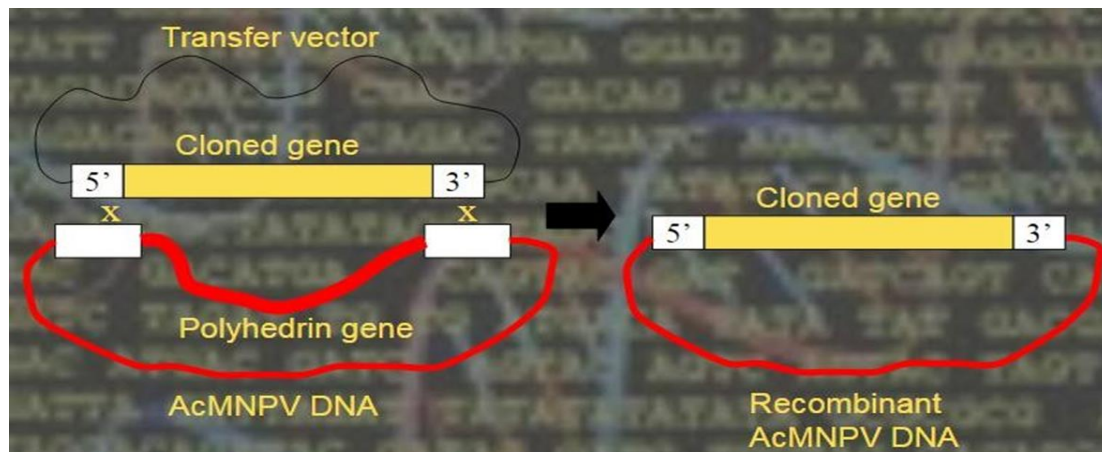
- ✓ Les levures sont capables de proliférer rapidement et dans un milieu de culture simple, peu coûteux, en absence de facteurs de croissance d'origine animale.
- ✓ S'adaptant bien à la culture en masse, les fermentations produisent en général une haute densité cellulaire et le taux d'expression de la protéine hétérologue est généralement voisin de la centaine de milligrammes par litre.
- ✓ - Les levures offrent également l'avantage d'avoir un matériel génétique simple et de n'être ni pyrogènes, ni pathogènes et constituent ainsi un organisme de choix pour la production de protéines à visée thérapeutique.

4.2.2. Les champignons filamenteux

On utilise principalement deux espèces, *Trichoderma reesei* et *Aspergillus niger*. Les productions sont très importantes (la cellulase est produite à 30 g/l, l'interleukine à 300 mg/l, la chymosine bovine à 1 g/l et la lactoferrine humaine à 3 g/l). Cette production au stade industriel est due à des mutagenèses aléatoires visant à obtenir des super producteurs. Généralement on effectue une fusion avec une protéine du champignon pour obtenir la sécrétion de la protéine d'intérêt.

4.2.3. Baculovirus-cellules d'insectes

Nécessite la recombinaison homologe pour créer un baculovirus recombinant, cette recombinaison se produit entre : une version linéaire du génome baculoviral auquel manque un gène permettant la sélection (p.ex. gentamicine); un vecteur de transfert portant le gène de résistance à la gentamicine ainsi que le gène encodant la protéine d'intérêt (ce dernier sous le contrôle du puissant promoteur de la polyhédrine). Le virus recombinant est ensuite utilisé afin d'infecter des cellules d'insectes. Ces dernières produiront alors de grandes quantités de la protéine d'intérêt.



Ce système offre l'avantage de pouvoir obtenir, dans des temps relativement courts, des vecteurs recombinants faciles à sélectionner et de très hauts niveaux d'expression, allant de quelques dizaines à quelques centaines de milligrammes par litre de culture. Une autre considération importante est liée à la sécurité : aucun virus de vertébrés ne semble se multiplier dans les cellules de lépidoptères employées. Quant au baculovirus, il ne peut accomplir sa multiplication que dans les cellules d'insectes.

- ✓ L'absence de sérum dans le milieu de culture constitue un avantage non négligeable en terme de coût.
- ✓ Les cellules présentent également une meilleure tolérance à l'osmolarité et aux coproduits du métabolisme cellulaire.
- ✓ Un inconvénient majeur réside dans la nécessité de procéder à la réinfection virale à chaque nouvelle culture, compte tenu du cycle lytique du virus.

4.2.4. Les cellules animales

L'émergence de la culture de cellules animales a commencé avec la production de tPA (tissue Plasminogen Activator, Activase®) par la société Genentech en 1987. Le marché des protéines recombinantes produites par ce système d'expression dépasse aujourd'hui 20 milliards de dollars annuels et représentant 60 à 70% des protéines thérapeutiques disponibles.

La plupart sont exprimées dans les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO), mais aussi dans d'autres lignées telles que les cellules de rein de hamster nouveau-né BHK (Baby Hamster Kidney), les cellules de myélomes de souris comme les cellules NSO et Sp2/0, les cellules rénales d'embryons humains (HEK- 293), les cellules humaines issues de carcinome cervical HeLa, les cellules de rétine humaine... (voir chapitre 3)

Les avantages et inconvénients du système sont :

Avantages

- ✓ Les cellules animales se prêtent bien à la culture en masse en bioréacteurs, même si les rendements plus faibles qu'avec les bactéries ou les levures, soit de l'ordre de 5 à 10 milligrammes par litre de milieu.
- ✓ les cellules CHO sont capables de synthétiser des protéines complexes, de poids moléculaire élevé, correctement repliées, et possédant les modifications post-traductionnelles très proches de celles retrouvées sur les protéines humaines.
- ✓ Leur physiologie est relativement bien connue et l'optimisation des rendements fait l'objet de nombreuses études.
- ✓ Parallèlement au développement de vecteurs toujours plus puissants, il est notamment possible de travailler sur le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose, afin d'augmenter la productivité et d'améliorer la qualité des protéines recombinantes synthétisées.
- ✓ Des travaux portant sur l'amélioration de la composition du milieu de culture ou sur le contrôle de l'expression des gènes endogènes sont également menés.
- ✓ Les améliorations récentes portent aussi sur la sécurité sanitaire : la tendance est au remplacement de substances d'origine animale dans le milieu par des substances végétales afin de limiter les risques de contamination.

Inconvénients

Les cellules animales sont relativement exigeantes en éléments nutritifs, et la culture est délicate, limitée et coûteuse. En effet, les investissements requis pour mettre en place une unité de fermentation de cellules mammifères sont importants (environ 200 millions \$US pour une capacité de 200 kg d'anticorps annuelle).

4.2.5. L'ovocyte de Xénope

On peut faire exprimer une protéine par l'ovocyte de Xénope en injectant de l'ADN dans le noyau. Le noyau est situé au 2/3 du pôle animal et n'est pas visible sur l'ovocyte vivant. Pour pouvoir injecter l'ADN on centrifuge doucement (200-400 g) pendant 5 min. Le noyau plus dense que le cytoplasme se déplace vers le pôle animal jusqu'à le toucher. On observe alors une décoloration au pôle animal qui nous permet de le localiser. On injecte environ 10 nl d'ADN. Le gène d'intérêt est cloné derrière un promoteur eucaryote fort. Il y a alors transcription puis traduction.

Les avantages et inconvénients du système sont les mêmes que ceux énoncés pour l'injection d'un ARNc, c'est à dire peu de protéines sont produites mais cette protéine est active. On va donc l'utiliser principalement pour exprimer des récepteurs.

-Par rapport à l'injection d'un ARNc, il y a plusieurs avantages: c'est plus facile à réaliser puisque la transcription in vitro n'est plus nécessaire de plus, on obtient généralement plus de protéines.

-Toutefois il y a aussi des désavantages : la production est très variable selon les ovocytes, certains produisent beaucoup de protéines alors que d'autres n'en produisent que très peu. Cette variabilité est sans doute due au moins en partie à la centrifugation et à l'injection dans les noyaux qui peut les abîmer.

4.2.6. Expression dans des eucaryotes unicellulaires

Exemple de l'utilisation de *Leishmania tarentolae*, un Kinetoplastidae non pathogène. Ce système a été développé par une compagnie, Jena BioScience. Le gène est introduit par transfection et maintenu soit sous forme épisomale soit par intégration dans le génome. Les protéines sont produites avec les maturations post- traductionnelles des eucaryotes. Avantage du système : la culture est facile dans un milieu peu cher.

4.2.7. Animaux transgéniques : les principales techniques de transgénèse utilisées sont la micro-injection dans les pronucléus ou dans le cytoplasme de l'embryon. Les animaux transgéniques peuvent être utilisés afin de produire des protéines hétérologues : production de facteur IX de la coagulation dans le lait de brebis transgéniques, lactoferrine humaine obtenue dans le lait de vache transgénique, hormone de croissance humaine dans le lait de souris, hémoglobine humaine produite dans le sang du porc... L'intérêt d'une production de protéines recombinantes dans le lait ou le sang d'animaux transgéniques se heurte cependant à des niveaux d'investissements très lourds pour des marchés a priori très restreints. Plusieurs espèces de mammifères sont couramment étudiées et utilisées comme des system d'expression : lapines, truies, brebis, chèvres, et vaches

4.2.7.1. les rongeurs

Les souris et les rats sont des animaux très utilisés dans les laboratoires de recherche pour tester la toxicité de certaines substances, pour servir de modèle dans l'étude de certaines maladies, pour le test de nouvelles thérapies ou la production d'anticorps monoclonaux.

En 1982 le premier animal transgénique est développé, c'est une souris qui sécrétait une plus grande quantité d'hormone de croissance que la normale. Sa taille était similaire à celle d'un petit rat. La première plante transgénique n'a été développée qu'un an plus tard. Des souris génétiquement modifiées, les souris knock-out, permettent, grâce à une modification génétique donnée, d'étudier le rôle d'un gène en observant les conséquences de son inactivation. L'étude du rôle d'un gène peut également passer par l'observation de souris transgéniques surexprimant ce gène.

La souris génétiquement modifiée est une valeur montante de la recherche pharmaceutique. Ainsi l'entreprise française GenOway, en passe de devenir l'un des leaders du marché du rongeur génétiquement modifié a vu son titre augmenter de près de 10 % le 17 octobre 2007 sur le marché Alternext, après l'annonce de la signature d'un contrat de 2 millions de dollars (1,4 million d'euros) avec un laboratoire américain désirant garder l'anonymat. Le chiffre d'affaires 2006 de GenOway, estimé à 4,4 millions d'euros devrait être doublé en 2007.

4.2.7.2. Les lapines offrent un grand nombre d'avantages :

- ✓ génération facile de fondateurs et de progénitures transgéniques
- ✓ grande fertilité,
- ✓ production relativement importante de lait,
- ✓ insensibilité aux maladies à prions pas de transmissions de maladies sévères à l'homme.

4.2.7.2. Les ruminants sont potentiellement mieux appropriés pour une grande production de protéines, mais :

- ✓ Les étapes de clonage ou d'utilisation de vecteurs lentiviraux pour l'intégration d'ADN étranger sont fastidieuses,
- ✓ leur reproduction est relativement lente.
- ✓ De plus, ils ne glycosylent pas les protéines aussi bien que les lapines ou les truies, et sont sensibles aux maladies à prions.

pour la transformation des monocotylédones telles que le riz.

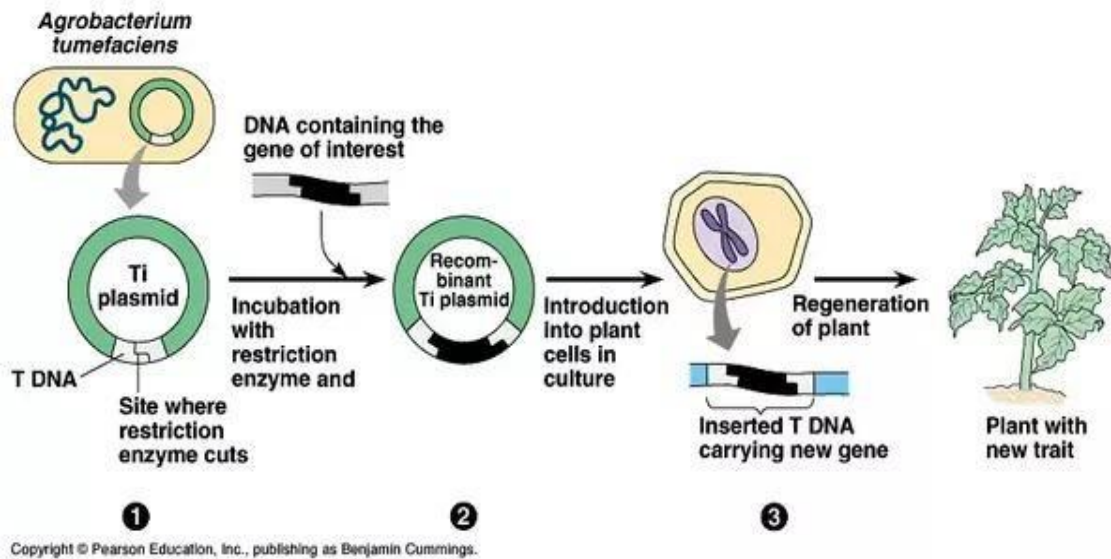


Figure 3 : la modification végétale grâce à l'Agrobacterium.

Au cours de la transformation, plusieurs éléments du plasmide Ti permettent un transfert effectif des gènes d'intérêt dans les cellules de la plante cible. Ce sont entre autres :

- ✓ Les séquences bordures de l'ADN-T qui délimitent le segment d'ADN (ADN-T) à transférer dans le génome de la plante.
- ✓ Les gènes vir (gènes de virulence) qui sont nécessaires au transfert de la région de l'ADN-T dans la plante mais sans être eux-mêmes transférés.
- ✓ et la région modifiée de l'ADN-T où les gènes qui causent la galle du collet sont enlevés et remplacés par les gènes désirés.

Processus de transformation végétale utilisant *l'Agrobacterium* comprend un certain nombre d'étapes :

- ✓ l'isolation des gènes désirés de l'organisme source ;
- ✓ l'élaboration d'une plateforme fonctionnelle transgénique incluant le gène cible, les promoteurs pour coder l'expression du caractère, la modification du codon, si nécessaire pour réussir à améliorer la production de protéine et les gènes marqueurs pour faciliter le traçage des gènes introduits dans la plante hôte ;
- ✓ l'introduction du transgène dans le plasmide-Ti ;
- ✓ l'introduction de l'ADN-T contenant le plasmide dans l'Agrobacterium;
- ✓ le mélange du Agrobacterium avec les cellules de la plante afin de permettre le transfert de l'ADN-T dans les chromosomes de la plante ;
- ✓ la régénération des cellules GM en plantes génétiquement modifiées (GM)

- ✓ l'évaluation de la performance du caractère ou de l'expression du transgène aux niveaux du laboratoire, de la serre et du champ.

Avantage de l'expression dans les cellules végétales.

-Ces cellules se multiplient facilement. En effet, même si les rendements sont souvent encore limités dans les systèmes d'expression végétaux, la capacité de production dans les plantes transgéniques est quasiment illimitée puisqu'elle dépend exclusivement des surfaces mises en culture.

-Ainsi un "bioréacteur" végétal permettra d'obtenir jusqu'à 20 kg de protéines recombinantes par hectare qu'il s'agisse de tabac, de maïs, de soja ou de luzerne.

-méthode permettant une montée en échelle rapide, utilisant des techniques de purification simple et à moindre coût, avec une qualité reproductible.

-Enfin, le principal avantage des plantes transgéniques par rapport aux systèmes traditionnels de culture de cellules de mammifères en fermenteur, est que la production d'anticorps recombinants serait jusqu'à 500 fois moins coûteuse.

5. Production des protéines recombinantes

Une protéine hétérologue ou recombinante est une protéine produite par une cellule dont le matériel génétique a été modifié par recombinaison génétique. Un gène codant une protéine d'intérêt est introduit dans le génome de l'espèce productrice (bactéries, cellules mammifères en culture, animaux transgéniques, etc.). Les protéines recombinantes peuvent être purifiées et utilisées à des fins thérapeutiques, industrielles ou bien encore dans les activités de recherche.

C'est en 1972 que les premières manipulations *in vitro* sur gènes ont commencé. À cette époque, le biochimiste Paul Berg obtient le premier ADN recombinant grâce aux enzymes de restriction. Un an plus tard, S. Cohen et H. Boyer parviennent à introduire des gènes d'amphibien dans la bactérie *Escherichia coli*. Le premier organisme transgénique était né.

Dans les années 1980, le premier produit issu du génie génétique est commercialisé. Il s'agit de l'insuline recombinante humaine produite par des bactéries génétiquement modifiées. C'est aussi à cette période que les scientifiques se rendent compte que toutes les protéines produites par cette méthode ne sont pas fonctionnelles. Ce problème vient du fait que les bactéries n'ont pas toute la machinerie qui permet aux protéines d'avoir leur maturation post-traductionnelle et donc d'acquérir une activité biologique. Les chercheurs se tournent alors vers des modèles de cellules eucaryotes. En 1982, la première souris transgénique voit le jour. Elle produit une quantité d'hormone plus grande que la normale.

5.1. Composition du transgène

Le vecteur est un moyen de transport de l'ADN. C'est un fragment capable de réplication autonome et qui peut supporter l'insertion d'un autre fragment d'ADN de taille variable (plasmide bactérien). L'organisme donneur exprime la protéine d'intérêt. L'ARNm codant cette protéine est isolé de cet organisme. L'ARNm permet la synthèse de l'ADNc qui sera utilisé pour le clonage. En effet, l'ADN génomique eucaryote n'est pas utilisable dans un système bactérien car les bactéries ne possèdent pas la machinerie d'épissage des ARNm eucaryotes.

C'est pourquoi la technique RT-PCR est souvent utilisée pour l'obtention de l'ADNc codant le gène d'intérêt. À la suite de la transcription inverse des ARNm totaux en ADNsb (simple brin) grâce à des amorces poly dT spécifique des extrémités poly A des ARNm, l'ADNc correspondant à l'ARNm codant la protéine d'intérêt est amplifié par PCR en utilisant des amorces spécifiques auxquels sont ajoutés des sites de restrictions qui seront ensuite utilisés pour le clonage.

5.2. ADN recombinant

L'ADN recombinant est une molécule d'acide désoxyribonucléique composée de séquences nucléotidiques provenant de plusieurs sources créant ainsi des séquences qui n'existent pas dans les organismes vivants.

5.3. Clonage

Le terme clonage est l'opération faisant appel au génie génétique et permettant la production d'un clone. À partir de cellules isolées, il s'agit d'obtenir une lignée (plusieurs cellules similaires appelées clones) dérivant d'un seul ancêtre. La spécificité de ce processus est le fait d'avoir un patrimoine génétique rigoureusement identique. Autrement dit le clonage permet d'obtenir un grand nombre de copies absolument identiques soit d'une cellule et l'on parle alors de clonage cellulaire soit d'un fragment d'ADN et l'on parle alors de clonage moléculaire.

5.4. Produire une protéine recombinante, pourquoi ?

La technologie de l'ADN recombinant est un outil pour comprendre la structure, la fonction et la régulation des gènes et leurs produits. Les objectifs de cette technologie sont :

- ✓ L'identification des gènes.
- ✓ L'isolement des gènes.
- ✓ La modification des gènes.
- ✓ La réexpression des gènes dans d'autres systèmes.
- ✓ La production d'une petite quantité de protéines d'intérêt scientifique comme les anticorps pour des applications expérimentales (ELISA, Western Blot...).
- ✓ La production de protéines d'intérêt médical comme les anticorps, les vaccins ou les enzymes pour le traitement et parfois dans des cas d'un manque ou d'une déficience
Produire des anticorps pour le diagnostic.
- ✓ La production d'une grande quantité de protéines d'intérêt économique et commercial.

Quelques exemples

L'exemple connu des protéines recombinantes est l'insuline recombinante. L'insuline fut cristallisée en 1926. Elle fut la première protéine à être complètement séquencée en 1955, la première à être synthétisée chimiquement en 1958 et la première protéine humaine produite par biotechnologies en 1979 et commercialisée en 1982. L'insuline est sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Elle exerce un effet hypoglycémiant.

- L'antithrombine III est une protéine produite au niveau du foie et de cellules endothéliales chez l'homme. Son rôle est d'empêcher la formation de caillots sanguins dans les veines et les artères. La diminution des taux d'antithrombine III entraîne un risque de maladie thromboembolique. Les déficiences en antithrombine peuvent venir de problèmes congénitaux ou être acquises au cours de la vie. De nos jours, avec les progrès de la science, il est possible de la synthétiser grâce au génie génétique.

-L'autre exemple de protéines recombinantes est l'hormone de croissance. L'hormone de croissance est une substance chimique naturelle que sécrète l'hypophyse. Elle règle la croissance et le développement normal chez les enfants. L'hormone de croissance recombinante humaine (rHGH) est produite à partir de cellules modifiées par génie génétique afin de produire cette hormone. Un déficit en hormones de croissance entraîne une maladie appelée le nanisme hypophysaire. Les autres exemples sont résumés ci-dessous.

Anticoagulants	
Erythropoïétine	CHO
Interférons α , β et γ	
Facteurs VIII et IX de la coagulation	
Antithrombine	
α 1-antitrypsine	
TNF (tumor necrosis factor)	
Insuline	<i>E. coli</i>
EGF (epidermal growth factor)	
G-CSF (granulocyte colony stimulating factor)	
Anticorps	
Interleukine 2	<i>E. coli</i>
Vaccin contre l'hépatite B	
Lipocortine	

5.5. Choix de l'hôte

Il se fera en fonction de l'utilisation désirée de la protéine recombinante ainsi que des mécanismes cellulaires nécessaires à la production d'une protéine fonctionnelle :(voire chapitre 4)

- **Bactéries** : forte croissance, niveau de sécrétion variable mais pas de modification post-traductionnelle. Formation de corps d'inclusion si la protéine n'est pas sécrétée.
- **Levures** : faciles à cultiver, modifications post-traductionnelles, bonne expression mais faible capacité de sécrétion des grosses protéines.

- **Champignons** : bonne sécrétion, modifications post-traductionnelles mais parfois indésirables.
- **Cellules de mammifères** : production de grosses molécules possible mais faible rendement pour des coûts élevés.
- **Plantes** : utilisées dans le cas de productions de plantes transgéniques permettant une résistance à des parasites ou à des pesticides (par exemple, le maïs Bt).
- **Animaux** : productions de grosses molécules, possibilité de consommer les protéines recombinantes dans l'alimentation, nécessite de grande structure pour l'élevage.

5.6. Synthèse des protéines

La synthèse comprend deux étapes :

5.6.1. La transcription permet de copier l'ADN en ARN messager (ARNm). Elle se déroule dans le noyau chez les eucaryotes et dans le cytoplasme chez les procaryotes. On parle de transcription car l'ADN est copié en ARNm sans changement de langage (langage de nucléotides). Elle est réalisée grâce à l'ARN polymérase qui se fixe sur l'ADN déroulé et synthétise un brin d'ARN complémentaire à l'ADN. Elle nécessite des Nucléosides triphosphates et progresse dans le sens 5'-3'.

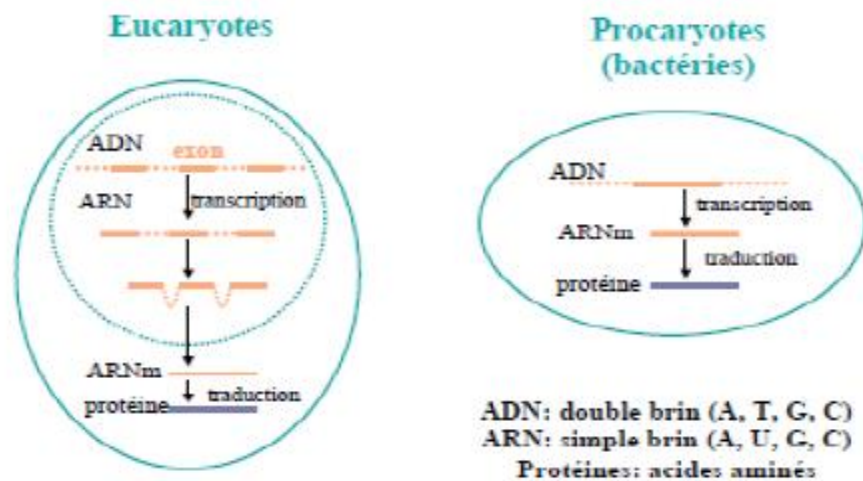


Figure 1. Synthèse des protéines.

5.6.2. La traduction correspond au décodage de l'information portée par l'ARN messenger en protéines. Dans ce cas on passe du langage de nucléotides au langage des acides aminés grâce au code génétique.

5.7. Étapes d'une production de protéine recombinante

- ✓ Obtention de cDNA correspondant à la protéine d'intérêt.
- ✓ Clonage dans un vecteur d'expression.
- ✓ Transformation/transfection dans une cellule hôte.
- ✓ Purification et analyse de la protéine d'intérêt.

5.7.1. Obtention de ADNc correspondant à la protéine d'intérêt

Pour le clonage en vue de l'obtention d'une protéine recombinante on doit utiliser soit l'ADN génomique (l'ADN génomique est obtenu à partir de lignées cellulaires, de tissus ou d'organismes entiers en fonction de la taille de l'organisme. Pour un organisme donné on part de n'importe quel lot de cellules, l'ADN génomique sera le même) et l'amplifier par la PCR ou l'ARNm (si la protéine n'est exprimée que dans certains tissus : on doit récupérer l'ARNm à partir de ces cellules puis la conversion de ARNm en ADN par l'utilisation de la technique de RT-PCR). Comme pour l'ADN génomique, l'ARN est obtenu à partir de lignées cellulaires, de tissus ou d'organismes entiers. Mais chaque type cellulaire exprime un lot donné de gènes donc pour un organisme donné on part d'un lot de cellules ; l'ARN est différent pour chaque type cellulaire.

Informations portées par l'ADN donneur :

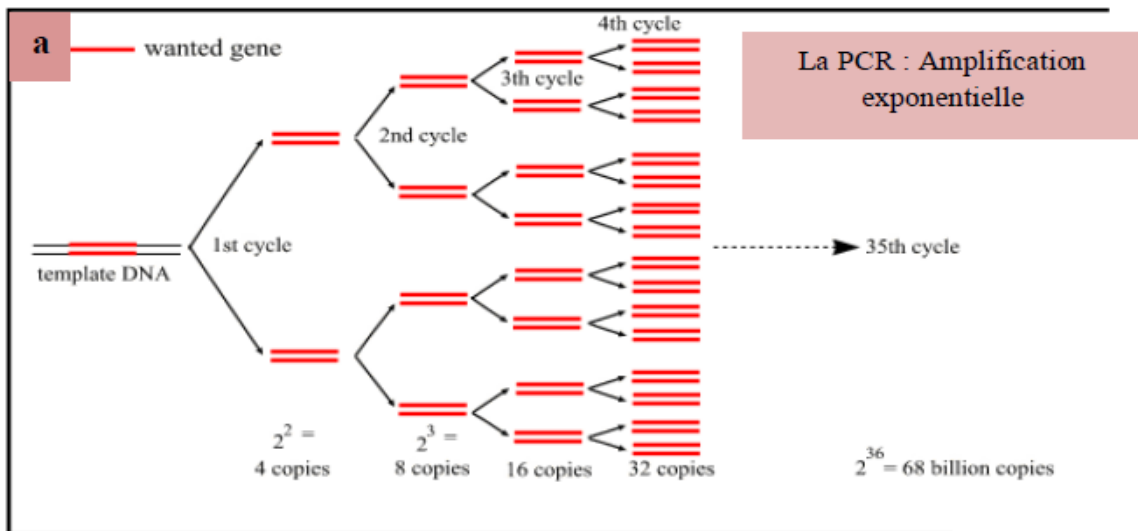
- ✓ Sur l'ADN génomique : région codante et non codante (régions promotrices, régulatrices).
- ✓ Sur l'ADN complémentaire : région codante, mais il y a aussi les régions (5' et 3' non traduites).

5.7.2. Clonage dans un vecteur d'expression

Le cDNA et le vecteur doivent couper par l'utilisation des enzymes de restrictions qui sont des enzymes bactériennes qui reconnaissent des séquences spécifiques sur l'ADN (le cDNA ou le vecteur) de 4 à 8 paires de bases, et qui clivent l'ADN sur les deux brins au niveau de ces sites. Elles coupent l'ADN au niveau des ponts phosphodiester.

- La plupart des sites sont des séquences inversées répétées (palindromes) cas de EcoRI : 5'GAATTC 3' ; 3'CTTAAG 5'.

- Les vecteurs de clonage doit être Capables de répliquer autonome dans une cellule hôte donnée (origine de répllication de type procaryotique et/ ou eucaryotique).
- Possèdent un polylinker ou site multiple de clonage.
- Supportent l'insertion d'un fragment d'ADN plus ou moins grand.



b

Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction (RT–PCR)

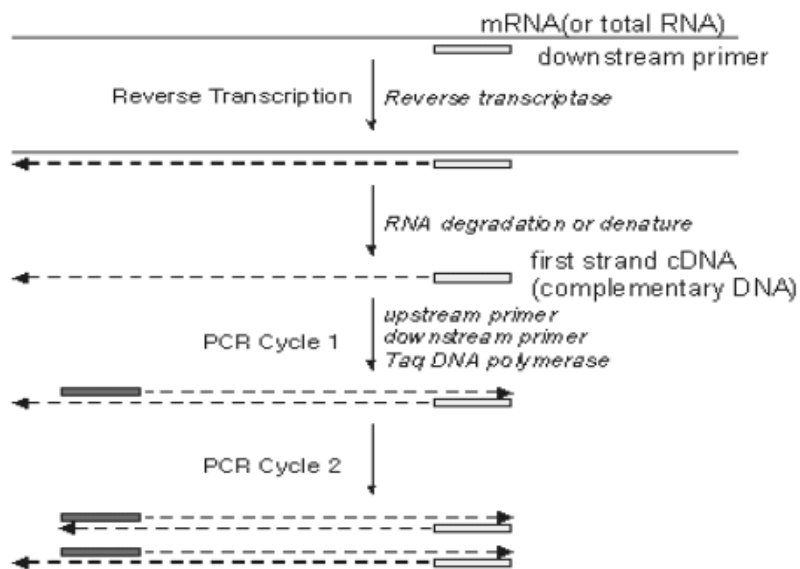


Figure 2. Deux techniques d'amplification de l'ADN. a. La PCR, b. La RT-PCR

Ligation (ligature...)

Une enzyme, la ligase, est capable de lier de façon covalente deux molécules d'ADN en une.

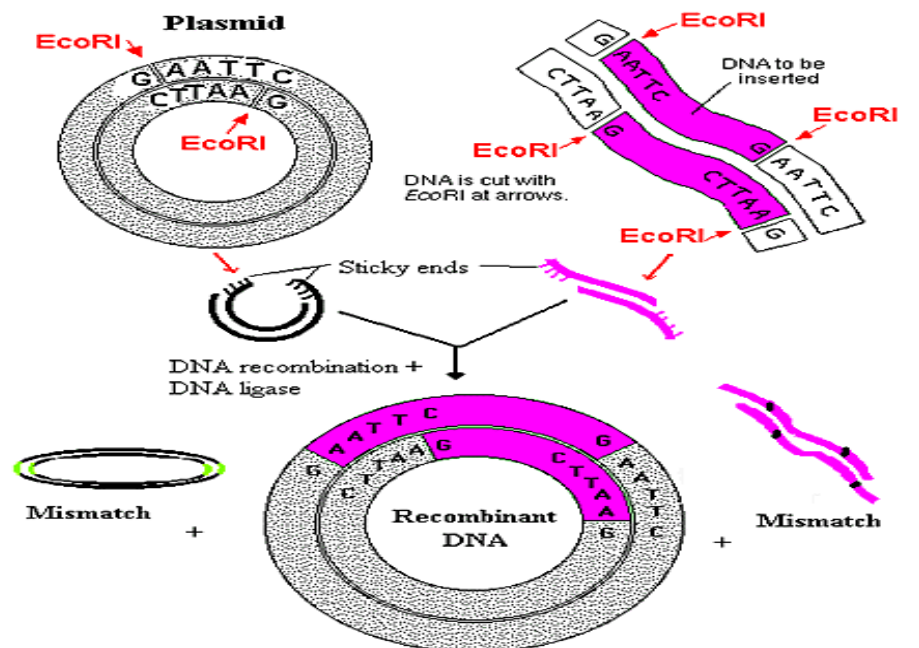
5.7.3. Transformation/transfection dans une cellule hôte : il existe plusieurs méthodes de transformation/transfection de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes (voire chapitre 3).

5.7.4. Purification de protéine d'intérêt

Potéine est-elle excrétée par la cellule productrice?

- Si oui : récupération dans le milieu de culture + purification.
- Si non : il faut casser les cellules.

Avant de casser les cellules : récupération de la biomasse (centrifugation, décantation).

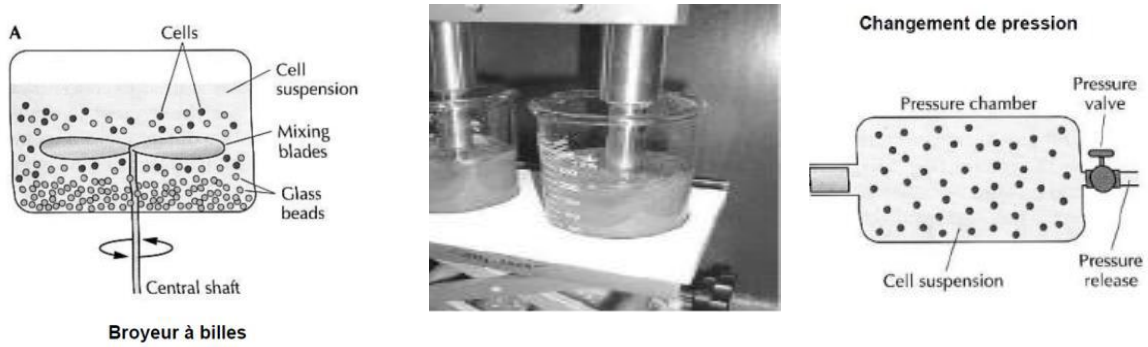


Inserting a DNA Sample into a Plasmid

Figure 3. L'insertion d'un fragment simple d'ADN dans un plasmide

Méthodes pour casser les cellules :

- Choc osmotique
- Traitement alcalin
- Extraction par solvants organiques
- Sonication.



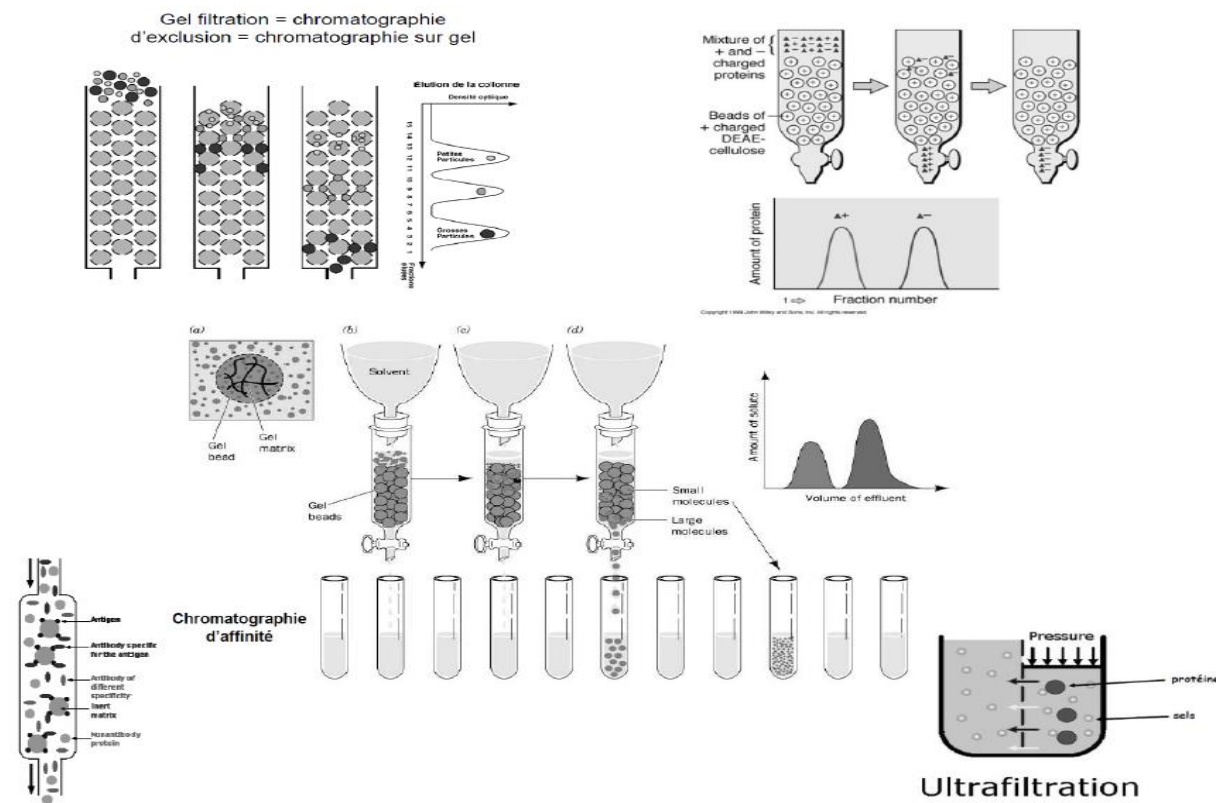
Méthodes pour purifier les protéines

- Précipitation: concentration par des solvants ou des sels (sulfates d'ammonium ou de sodium).
- Purification: chromatographies : différents types selon la protéine à purifier la filtration sur gel, la chromatographie d'affinité et la chromatographie d'échange d'ions.

Stockage

Forme liquide.

Forme solide : atomisation, lyophilisation (Pulvérisation de la solution protéique dans un une enceinte chauffée à 130°C : déshydratation : on collecte la poudre. Lyophilisation = cryodessiccation = surgélation + pression ; point triple puis dessiccation)



Références bibliographique

- Adolphe M. (1988). Base des méthodes de culture. In : Barlovatz-Meimon G. et Adolphe M. Culture de Cellules Animales: Méthodologies-Applications. Paris : INSERM. P. 1-8.
- Baeza-Squiban A. et Andréau K. (2014). Viabilité, cytotoxicité, génotoxicité. In Barlovatz-Meimon G. et Ronot X. Culture de cellules animales. 3e édition. Paris : Lavoisier. P. 139-152.
- Berridge M.V., Herst P.M. et Tan A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology : new insights into their cellular reduction. *BiotechnolAnnuRev* 11:127-152.
- Burlinson B. (2012). The in vitro and in vivo comet assays. *Methods Mol Biol* 817:143-163.
- Cezard F. (2013). Milieux et matériels de culture cellulaire. In : Biotechnologies en 27 fiches. 2e édition. Paris : DUNOD. P. 5-11.
- Curtet-Benitski S. et Filiputti-Gilquin A.-L. (2014). Bonnes pratiques de culture cellulaire. In : Barlovatz-Meimon G. et Ronot X. Culture de cellules animales. 3e édition. Paris : Lavoisier. P. 118-127.
- Freshney R.I. (2005). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, chapitre 12 : primary culture. 5e édition. John Wiley & Sons, Inc. P. 175-197.
- Froger B. et Adolphe M. (1988). Besoins nutritifs des cellules en culture. In : Barlovatz-Meimon G. et Adolphe M. Culture de Cellules Animales : Méthodologies-Applications. Paris : INSERM. P. 9-15.
- Houdebine, L. M. (2009). Les applications des animaux génétiquement modifiés (AGM). *Journal de la Société de Biologie*, 203(4), 323-328.
- Johnson S., Nguyen V. et Coder D. (2013). Assessment of cell viability. *Curr Protoc Cytom* 64: 9.2.1-9.2.26.
- Jones L.J., Gray M., Yue S.T., Haugland R.P. et Singer V.L. (2001). Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay. *J Immunol Methods* 254:85-98.
- Langdon S.P. (2004). Basic Principles of Cancer Cell Culture. In : *Methods in Molecular Medicine*, volume 88, Cancer Cell Culture : Methods and Protocols. Totowa : Humana Press Inc. P. 3-15.
- Langdon S.P. (2004). Cell Culture Contamination : An Overview. In : *Methods in Molecular Medicine*, volume 88, Cancer Cell Culture : Methods and Protocols. Totowa : Humana Press Inc. P. 309-317.
- Macleod K.G. et Langdon S.P. (2004). Essential Techniques of Cancer Cell Culture. In : *Methods in Molecular Medicine*, volume 88, Cancer Cell Culture : Methods and Protocols. Totowa : Humana Press Inc. P. 17-29.

- Mather J.P. et Roberts P.E. (1998). Introduction to Cell and Tissue Culture : Theory and Technique. Chapitre 2,3,4 et 7. New York et London : Plenum Press. 241 pages.
- Niles A.L., Moravec R.A., EricHesselberth P., Scurria M.A., Daily W.J. et Riss T.L. (2007). A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal Biochem* 366:197-206.
- Philippeos C., Hughes R.D., Dhawan A. et Mitry R.R. (2012). Introduction to cell culture, chapter 1. In Mitry R.R. et Hughes R.D. *Human Cell Culture Protocols*, volume 806, *Methods in Molecular Biology*. P. 1-13.
- Plank C, Zelphati O, Mykhaylyk O, « Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-progress and prospects », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, nos 14–15, 2011, p. 1300–31 (PMID 21893135, PMCID 7103316, DOI 10.1016/j.addr.2011.08.002)
- Plumb J.A. (2004). Cell Sensitivity Assays : Clonogenic assay. In : Longdson S.P. *Methods in Molecular Medicine*, volume 88, *Cancer Cell Culture : Methods and Protocols*. Totowa : Humana Press Inc. P. 159-164.
- Plumb J.A. (2004). Cell Sensitivity Assays : The MTT Assays. In : Longdson S.P. *Methods in Molecular Medicine*, volume 88, *Cancer Cell Culture : Methods and Protocols*. Totowa : Humana Press Inc. P. 165-170.
- Ronot X., KadriM. et Martel-Frchet V. (2014). Cryopréservation des cellules. In : Barlovatz-Meimon G. et Ronot X. *Culture de cellules animales*. 3e édition. Paris : Lavoisier. P. 128-136.
- Ryan J.A. (2007). Introduction à la culture cellulaire. Corning Life Sciences Technical Bulletin. Disponible sur le site web Corning Life Sciences dans : www.corning.com/lifesciences.
- Ryan J.A. (2007). Les bonnes pratiques de culture cellulaire. Corning Life Sciences Technical Bulletin. Disponible sur le site web Corning Life Sciences dans : www.corning.com/lifesciences.
- Sigma Aldrich (2016). *Fundamental techniques in cell culture. Handbook*. 3e édition. 80 pages.
- Sumantran V. M. (2011). Cellular Chemosensitivity Assays : An overview, In : CREE I.A.(ed), *Cancer Cell Culture : Methods and Protocl*, *Methods in Molecular Bology*, volume 731.2e édition. Totowa :Humana Press Inc. P. 219-236.