

Cours GCH8650

# GÉNIE BIOCHIMIQUE

---

## La problématique cellulaire

---

**Mario Jolicoeur, ing., Ph.D.**

Professeur titulaire

Chaire de recherche du Canada en génie métabolique appliqué  
Coordonnateur, Génie biopharmaceutique

mario.jolicoeur@polymtl.ca  
bureau JAB-3069

# La problématique cellulaire

---

1. Revue des différents types de cellules
2. La mise en culture aseptique
  - Historique et techniques particulières
3. Les paramètres de mise en culture
  - Les besoins nutritionnels
  - Les caractéristiques physiques des divers cellules
  - Inoculation
  - Caractéristiques des bouillons de culture

# 1. Revue des différents types de cellules

---

Les problématiques de mise en culture *in vitro* ainsi que de mise à l'échelle sont reliées au type de cellule en culture

## Les protistes (organismes unicellulaires)

- résistance au cisaillement
- aérobie/anaérobie

### Procaryotes

#### Archaeobactéries

**Conditions extrêmes**  
(°T, Mpa, pH, S)

- thermoacidophiles
- halobactérie (haute salinité)

**Hôtes de production:**

- Méthanogènes
- nouvelles molécules (antibiotique)

#### Bactéries

**Hôtes de production:**

- enzymes (ex. amylase)
- biopolymères (ex. PHA et PHB)
- protéines naturelles et recombinantes\*
- ADN plasmidique \*

\* ingénierie cellulaire

#### Algue bleu-verte

cyanobactéries

**Hôtes de production:**

- H<sub>2</sub>
- et +

**Hôtes de production:**

- enzymes
- protéines naturelles et recombinantes glycosylées

### Eucaryotes

#### Champignons

Moisissures

**Hôtes de production:**

- antibiotiques
- acide citrique

Levures

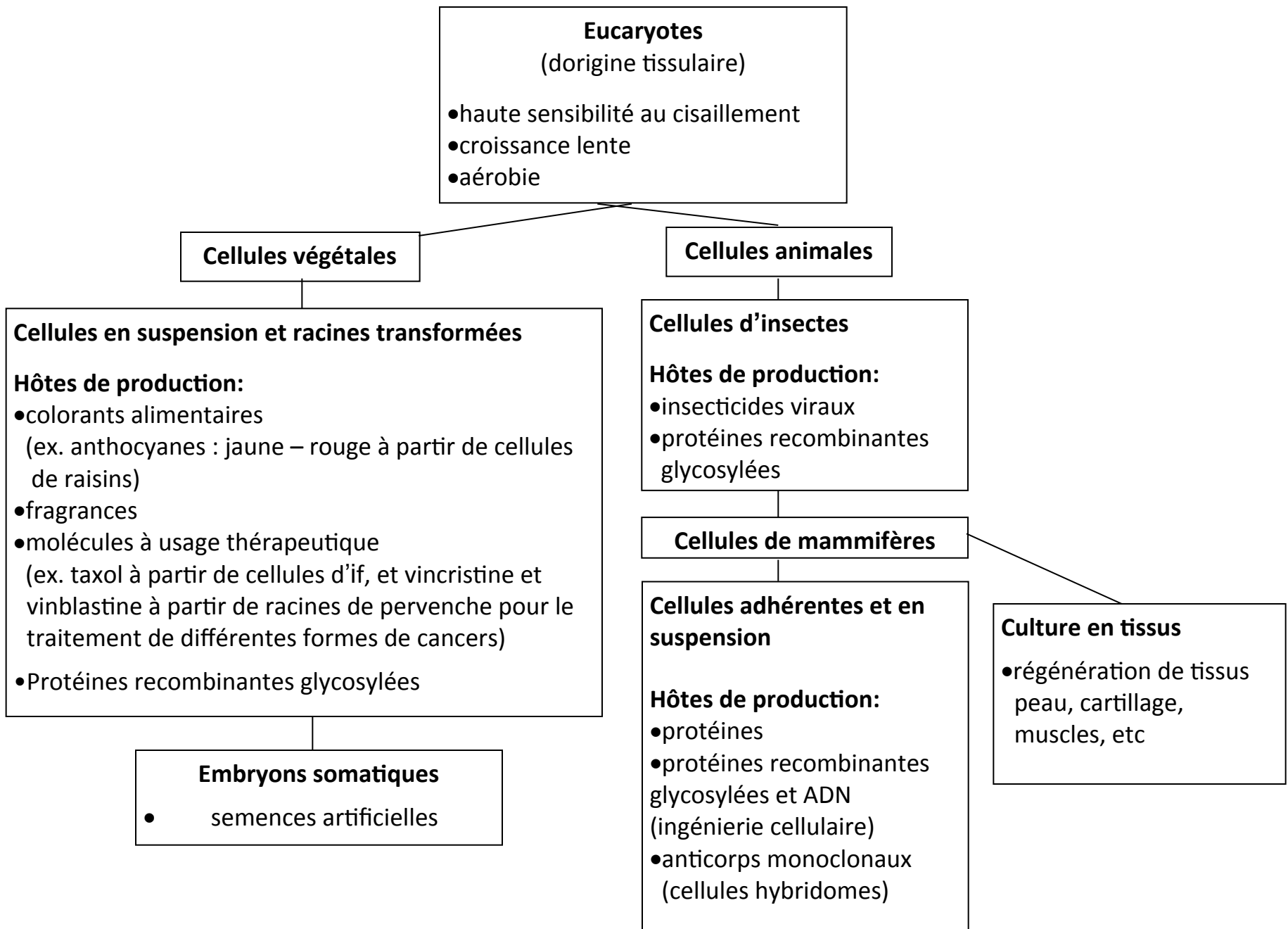
#### Algues

#### Protozoaires

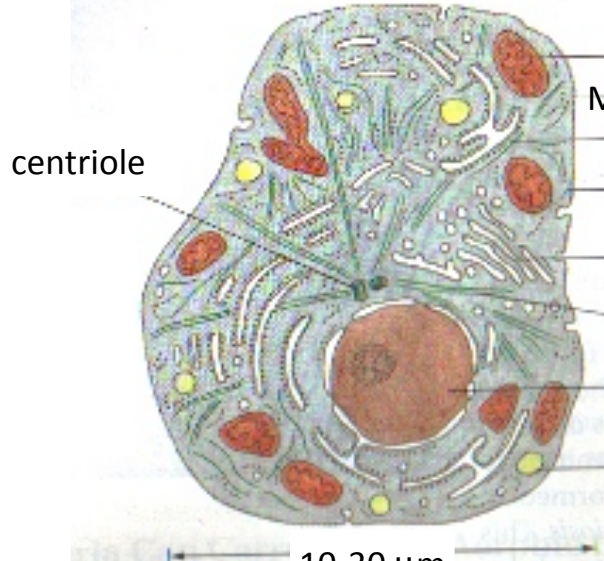
et microalgues

**Hôtes de production:**

- lipides = biodiésel
- H<sub>2</sub>
- Cosmécétiques
- protéines naturelles et recombinantes glycosylées

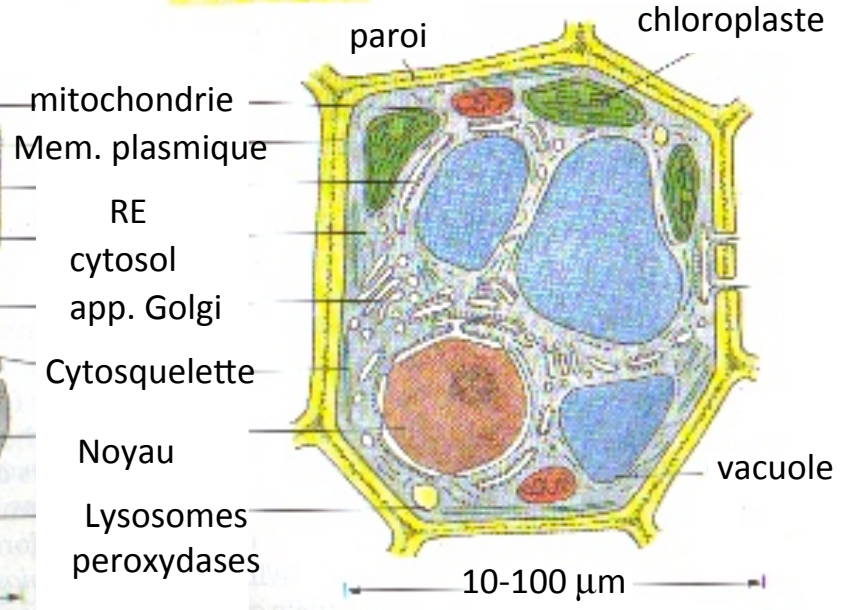


**ANIMAL CELL**



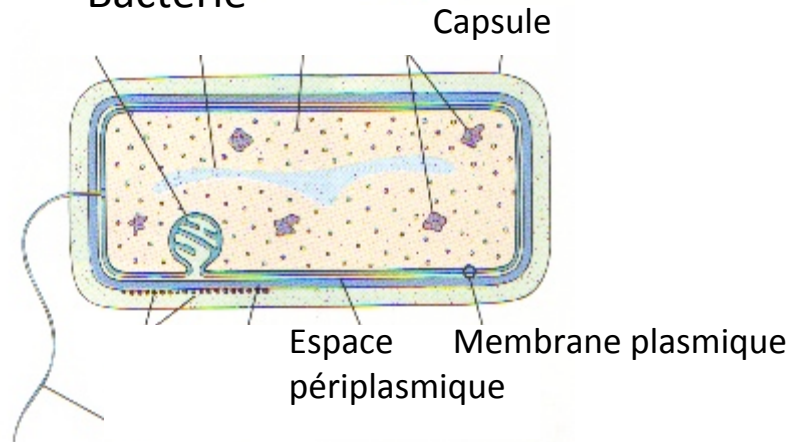
10-30  $\mu\text{m}$

**PLANT CELL**

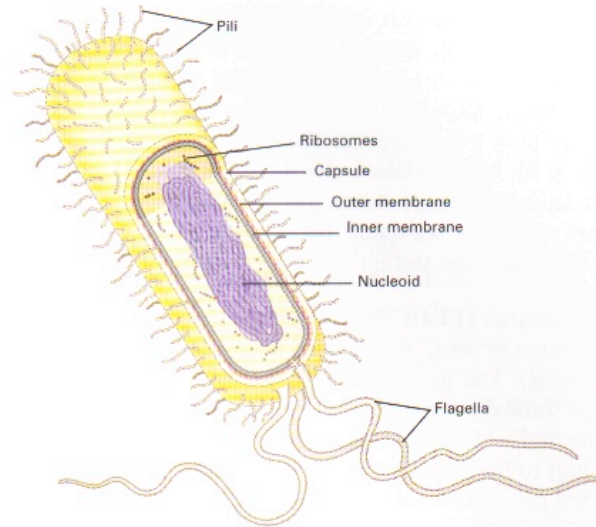


10-100  $\mu\text{m}$

**Bactérie**



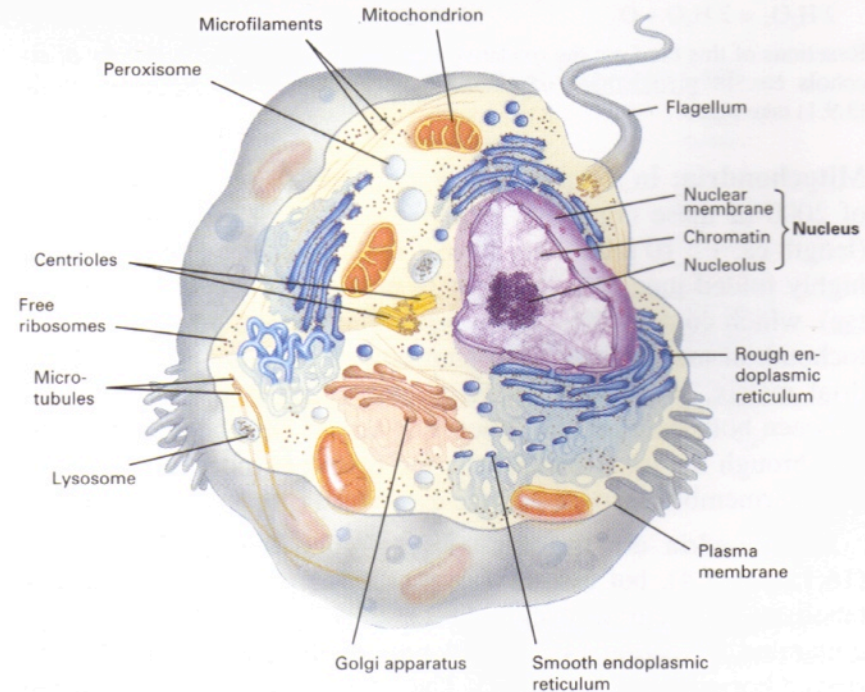
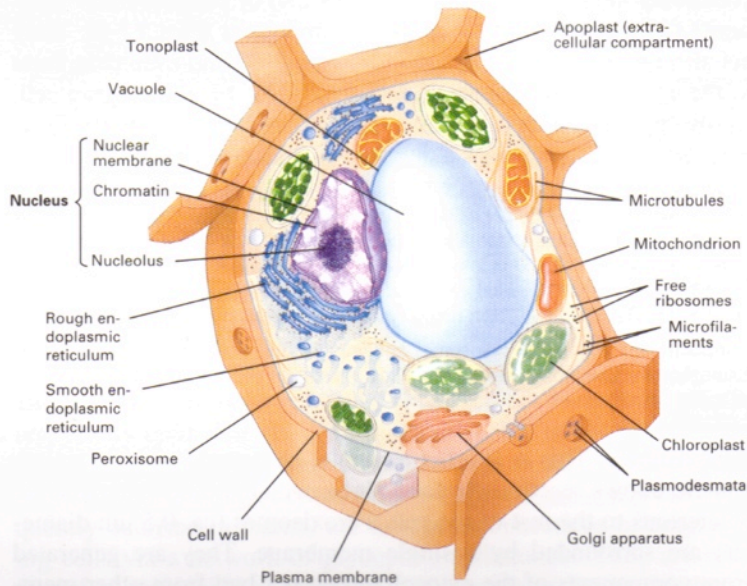
**Figure 2.2-1. General Structure of a Bacterial Cell**  
 After Campbell, N.A.: *Biology* 4/e. Benjamin/Cummings 1996. The colors are for easy differentiation only.



Tiré de: *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, G. Michal, 1998 John Wiley & Sons;

**Figure 2.2-2. General Structure of a Plant Cell (Top) and an Animal Cell (Below)**

After Campbell, N.A.: *Biology* 4/e. Benjamin/Cummings 1996. The colors are for easy differentiation only.



## 2. MISE EN CULTURE : Historique

### À l'origine de la culture *in vitro*

- Milieux de culture constitués d'extraits de plantes ou d'animaux

### **Pasteur (1869) : Culture de levures**

- Premier milieu défini chimiquement ou dit pseudo-synthétique:
  - ⇒ glucose, tartrate d'ammonium, cendres de levures

### **Wildiers (1901)**

- Démonstration du besoin de vitamines pour la culture de levures
  - ⇒ + extraits organiques de levures séchées
- On croit que Pasteur a du utiliser un inoculum important, contenant ainsi une quantité suffisante de facteurs de croissances produites par la culture

### **Raulin (1869) (étudiant de Pasteur) : Culture d'*Aspergillus niger***

- Premier milieu entièrement synthétique
  - ⇒ glucose, éléments majeurs et mineurs, éléments traces (Fe, Zn, Si)



## 2. MISE EN CULTURE : Les cellules animales

- 1885 Roux** démontre que des cellules d'embryons de poulets peuvent être maintenues en vie dans une solution saline
- 1907 Harrison** cultive des fragments de moelle épinière de grenouille dans un caillot de lymphe
- 1913 Carrel** mise en culture de cellules animales sur de longues périodes lorsque nourries aseptiquement sur une base régulière
- 1916 Rous et Jones** introduisent la trypsine pour la sous-culture de cellules adhérentes
- 1940** Usage des antibiotiques pénicilline et streptomycine réduisent les contaminations
- 1941 Fisher** étudie l'ajout de sérum dialysé
- 1948 Earle et al.** isolent des cellules de souris (lignée L): formation de clones
- 1952 Gey et al.** première lignée cellulaire continue humaine à partir de cellules tumorales d'un carcinome cervical de Mme Helena Lasker: lignée HeLa
- 1955 Eagle** première étude systématique sur un milieu de base défini + sérum
- 1960 Barski et al.** technique de la fusion cellulaire
- 1961 Hayflick et Moorhead** les fibroblastes humains sénescent puis meurent après un nombre déterminé de divisions en culture
- 1965 Ham** introduit un milieu sans sérum pour la culture de fibroblastes
- 1970 Sato** définit les facteurs de croissance et hormones de plusieurs cellules
- 1975 Köhler et Milstein** production d'anticorps monoclonaux par des lignées d'hybridomes (suite de Barski et al. 1960)

## 2. MISE EN CULTURE : Cellules animales

### Types de culture

- **Culture d'organe** : on cherche à préserver la structure 3D de l'organe d'origine
  - la culture tend à retenir l'état de différenciation
  - très peu ou pas de croissance
- **Culture d'explant primaire** :
  - lorsqu'un fragment d'un tissu est déposé sur une surface plane pour promouvoir la croissance de cellules en feuillets
- **Culture de cellules** :
  - lorsque les cellules d'un explant primaire sont dispersées

## 2. MISE EN CULTURE : Cellules animales

**Les cultures de cellules animales sont initiées à partir de cellules à divers niveau de différenciation :**

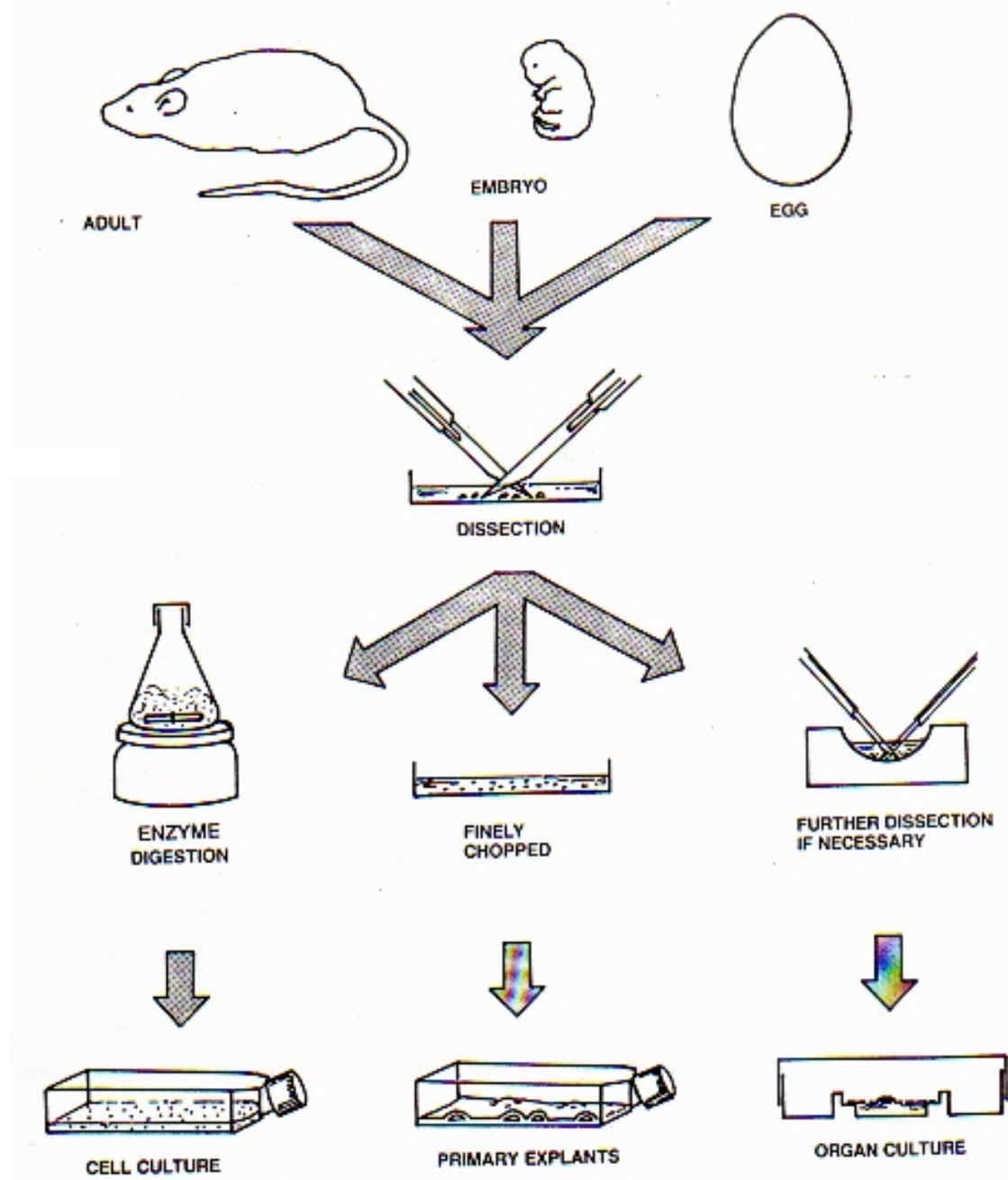
- de **cellules souches** qui peuvent se différencier dans plusieurs directions
- de **cellules précurseurs** engagées qui vont se développer dans un seul lignage
- de **cellules différenciées** telles les fibroblastes qui vont se dédifférencier et proliférer tout en conservant leur lignage

**Le différenciation** est un processus conduisant à l'expression phénotypiques des propriétés caractéristiques de la cellule fonctionnellement mature *in vivo*.

**La dédifférenciation** : régression, i.e. perte des propriétés, et prolifération à nouveau

## 2. MISE EN CULTURE :

- Cellules animales

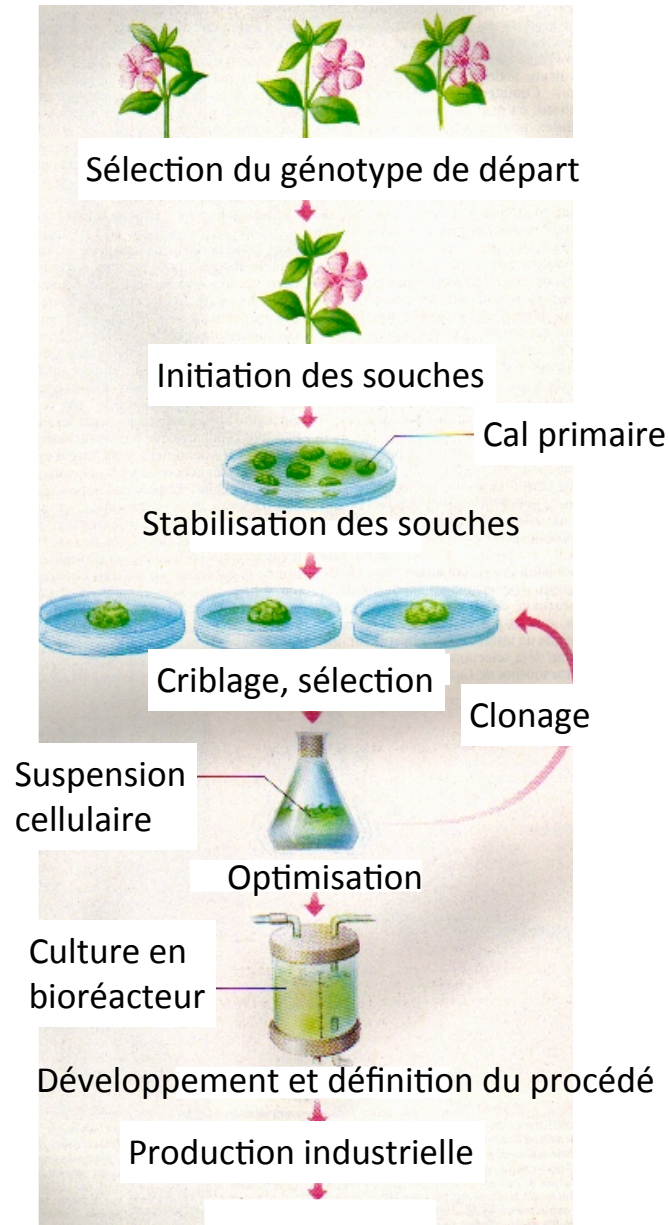


## 2. MISE EN CULTURE : Cellules végétales

- 1934 Gautheret** (France) et **White** (USA) établissent les premières cultures de tissus végétaux et obtiennent des cals ou cellules indifférenciées
- 1952 Morel et Martin** démontrent la totipotence de cellules en obtenant des plantes entières à partir de cellules méristématiques en culture
- 1954 Muir, Hildebrandt et Riker** première culture de cellules en suspension
- 1956 Routien et Nickell** (Pfizer Inc.) déposent le premier brevet pour la production de métabolites secondaires
- 1976 Zenk** démontre que bien que certains métabolites secondaires ne sont produit dans la plante qu'à un endroit particulier l'on peut arriver à sélectionner une lignée cellulaire productive en culture indifférenciée, ce qui relance l'intérêt pour ce type de culture cellulaire
- 1983 Mitsui Petrochemicals** (Japon) commercialise le premier produit issus de biotechnologie végétale *in vitro*, la shikonine, un colorant

## 2. MISE EN CULTURE :

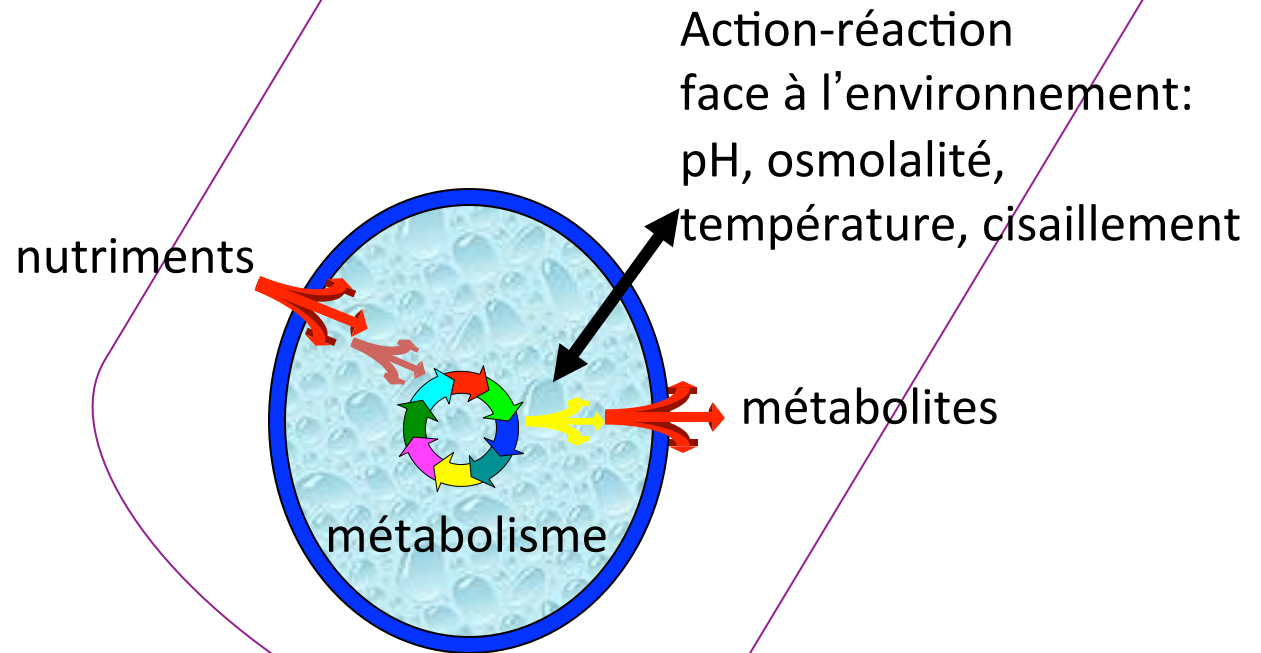
- Cellules végétales



### 3. Paramètres de mise en culture aseptique

---

- a. Besoins nutritionnels
- b. Caractéristiques des cellules



### **3.a Les besoins nutritionnels**

**Objectif:** imiter l'environnement chimique naturel tout en maximisant la croissance ou la production

- les composés minéraux offrent généralement des propriétés de tampon afin de minimiser les fluctuations pH en cours de culture
- contrairement à ce que l'on penserait, il est nécessaire de fournir les différents composés selon un dosage (concentrations) précis
- une alimentation en excès peut avoir des effets inhibiteurs sur les cellules
- généralement, il est primordial de pouvoir fixer le composé qui sera limitant pour les cellules

**synthétiques :** la composition chimique est bien définie

**complexes :** la composition chimique n'est pas entièrement définie

ex. extraits de levures  
sérum fœtal bovin  
lait, sirop de maïs



### **3.a Les besoins nutritionnels**

**1. Sources d'éléments majeurs: C, H, O, N**

**2. Sources d'éléments mineurs: P, K, S, Mg**

**3. Vitamines et hormones, etc.**

- facteurs de croissance: nutriments organiques essentiels tels que des acides aminés incorporés dans la structure cellulaire

**4. Sources d'éléments traces**

### **3.a Les besoins nutritionnels**

**Un milieu minimal** ne contient que les nutriments essentiels pour la croissance.

**Un milieu riche** est un milieu minimal contenant en plus d'autres nutriments représentant des sources alternatives d'éléments:

- acides aminés
- vitamines
- précurseurs d'acides nucléiques
- intermédiaires des réactions de synthèse cellulaire.

### 3.a Les besoins nutritionnels : Constituants de différents organismes

g/100 g de masse sèche

Élément	Bactérie	Champignon	Levures	Cellules végétale et animale
Carbone	47-53	~50	44-50	~44
Oxygène	19-30	~30	~30	~44
Hydrogène	~7	~7	~7	~6
Azote	~12	~12	7-11	1-4
Phosphore	2.0-3.0	0.4-4.5	0.8-2.6	0.1-0.8
Soufre	0.2-1.0	0.1-0.5	0.01-0.24	0.05-1
Potassium	1.0-4.5	0.2-2.5	1.0-4.0	0.5-6
Magnésium	0.1-0.5	0.1-0.3	0.1-0.5	0.1-0.8
sodium	0.5-1.0	0.02-0.5	0.01-0.1	-----
Calcium	0.01-1.1	0.1-1.4	0.1-0.3	0.2-3.5
Fer 0.02-0.2	0.1-0.2	0.01-0.5	0.025-0.3	
Cuivre	0.01-0.02	-----	0.002-0.01	0.004-0.03
Manganèse	0.001-0.01	-----	0.0005-0.007	0.015-0.8
Molybdène	-----	-----	0.0001-0.0002	0.0001-0.005
et autres traces				

Tiré de : Biochemical Engineering Fundamentals, 2<sup>nd</sup> Edition, Bailey et Ollis, McGraw-Hill, 1986, p. 621 et p. 282.  
 et de : Biology of Plants, 5<sup>e</sup> Edition, Raven, Evert et Eichhorn, Worth Publ., 1992, p. 596.

### 3.a Les besoins nutritionnels

<b>Éléments</b>	<b>Formes</b>	<b>Utilisation</b>
C,H,O,N	organique	énergie, synthèses diverses
H	inorg./organique	régulation du pH intracellulaire, signalisation cellulaire
N	inorg./organique	synthèse de protéines, acides nucléiques et polymères des parois cellulaires
P	inorg. (Pi)	ATP, phosphorylation de protéines, acides nucléiques, sucres phosphatés, phospholipides, coenzymes
S	inorg.	composé de plusieurs acides aminés, acides nucléiques et protéines, coenzyme A
Mg	inorg.	complexe ATP, stabilise les ribosomes et les membranes
Mn	inorg.	requis pour des enzymes impliqués dans le transport du Pi, autres enzymes (ex. kinases)
Ca	inorg.	cofacteur d'enzymes impliqués dans l'hydrolyse d'ATP et de phospholipides, signalisation cellulaire
K	inorg.	cofacteur de plusieurs enzymes, régulation osmotique, régulation du potentiel membranaire
Cl	inorg.	régulation osmotique, régulation du potentiel membranaire
Mo	inorg.	constituant de la nitrogénase, nitrate réductase et autres
Co,Fe,Cu, Zn	inorg.	cofacteur d'enzymes
acides aminés	lévo./dextrogyre	synthèse de protéines

### 3.a Les besoins nutritionnels

### Composition générale de différents milieux de culture

#### Composé

#### Bactéries et levures

#### cellules végétales

#### cellules animales

#### Glucides

glucose

30 000 mg/L

30 000 mg/L

4 500 mg/L

sucrose

x

x

autres

x

x

#### Macronutriments

$\text{KH}_2\text{PO}_4$

1 500

170-275

KCl

330

$\text{KNO}_3$

2 000

0.076

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

600

370

98

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

50

300-400

165

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

6 000

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

150

125

NaCl

4 505

$\text{NaHCO}_3$

3 024

#### Micronutriments

$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$

1.5

2-8.6

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.6

2-8.6

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0.6

0.025

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0.6

10

KI

0.75-0.83

$\text{H}_3\text{BO}_3$

3-6.2

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0.025

$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0.0173

### 3.a Les besoins nutritionnels

#### Composition générale de différents milieux de culture

Composé	cellules		
	Bactéries et levures	végétales	animales
<b>Chelateurs</b>			
EDTA	4 000 mg/L	43 mg/L	
<b>Tampon</b>			
HEPES			5 958 mg/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 000/10 000	x	
<b>Indicateur de pH</b>			
Rouge phénol			15
<b>Précurseur</b>			
Pyruvate de sodium			110
<b>Vitamines (total)</b>		4	10
<b>Acides aminés (total)</b>	parfois		20
<b>Facteurs de croissance (total)</b>		3	serum bovin
<b>Extraits de levures</b>	x		
<b>Milieu utilisé ajouté</b>		parfois	parfois

Bioprocess Engineering, Basic Concepts, Shuler et Kargi, Prentice Hall, 1992, p. 54.

Plant Tissue Culture Methods, 2<sup>e</sup> Ed., Wetter et Constabel, 1982, NRC, p.132

GibcoBRL Catalogue de produits. Milieu IMDM.

## **3.b Caractéristiques des cellules**

*La plupart des cellules vivent en société*

### **Processus de démarrage d'une culture aseptique: Inoculation**

- Des cellules sont ajoutées à un milieu stérile

#### **1. Bactéries et levures**

- 1:100 à 1:10 lorsque des facteurs de croissance sont requis
- $10^{12}$  cell/mL à l'inoculation

#### **2. Cellules végétales**

- 1:20 à 1:10
- $10^6$  cell/mL à l'inoculation

#### **3. Cellules animales**

- 1:10 à 1:3 lorsque des facteurs de croissance sont requis
- $2 \times 10^5$  cell/mL à l'inoculation

### 3.b Caractéristiques des cellules

	<u>bactéries</u>	<u>levures</u>	<u>champignon</u>	<u>cellules végétales</u>	<u>animales</u>
<b>Groupe</b>	procaryotes	eucaryotes			
<b>Taille</b>	0,5 - 3 $\mu\text{m}$	~5 $\mu\text{m}$	~5 $\mu\text{m}$ - km	~20-150 $\mu\text{m}$	5- 20 $\mu\text{m}$
<b>Formes</b>	unicellulaire et associées	unicellulaire	uni et pluricellulaires et même tissulaire		
<b>Paroi</b>	gram+: peptidoglycane gram-: membrane externe peptidoglycane	glucane chitine	chitine	cellulose rigide fragile	aucune
<b>Membrane plasmique</b>	double couche phospholipides	double couche de phospholipides (ex. cholestérol) flexible			
<b>Cytosquelette</b>	aucun	aucun	structure - signalisation - mobilité		
<b>Organelles</b>	aucunes	noyau défini - appareil de Golgi - mitochondrie réticulum endoplasmique			



## 4. La problématique cellulaire et les bioréacteurs

Peut-on utiliser une plate-forme bioréacteur unique?

bactéries

levures

moisissures

cellules  
de mammifère

cellules  
de plante



*E. coli*



*P. pastoris*



*P. chrysogenum*



CHO



tabac

# 4. La problématique cellulaire et les bioréacteurs

## Plate-formes cellulaires et plate-formes bioréacteurs

bactéries

levures

moisissures

cellules  
de mammifère

cellules  
de plante

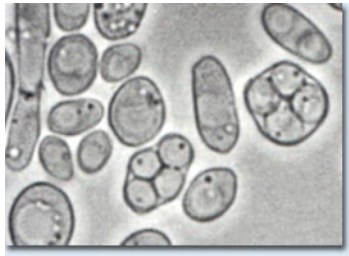
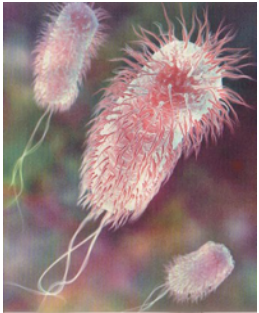
*E. coli*

*P. pastoris*

*P. chrysogenum*

CHO

tabac



cellules résistantes et  
hautement  
consommatrices en O<sub>2</sub>

Contrôle du  
diamètre des  
pelotes

Sensibilité au cisaillement  
Suspension visqueuse

## 5. Références

- Bioprocess Engineering, Basic Concepts, Shuler et Kargi, Prentice Hall, 1992, p. 54.
- Biochemical Engineering Fundamentals, 2<sup>nd</sup> Edition, Bailey et Ollis, McGraw-Hill, 1986, p. 621 et p. 282.
- Biology of Plants, 5<sup>e</sup> Edition, Raven, Evert et Eichhorn, Worth Publ., 1992, p. 596.
- Bioprocess Engineering Principles, Doran, Academic Press, 1997
- GibcoBRL Catalogue de produits. Milieu IMDM.
- La Recherche: L'avenir des biotechnologies, Cahier spécial, no. 188, mai 1987
- Microbiologie industrielle et environnementale: notes de cours MCB 3995, Massie, Institut de recherche en biotechnologie, 1998
- Molecular Biology of the Cell, Alberts et al., 1994
- Plant Physiology, Taiz et Zeigler, Sinauer Publ., 1998
- Plant Tissue Culture Methods, 2<sup>e</sup> Ed., Wetter et Constabel, 1982, NRC, p.132