Nancy-Université
INPL

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.
Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur au même titre que sa version papier. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.
D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite entraîne une poursuite pénale.

Contact SCD INPL: mailto:scdinpl@inpl-nancy.fr

LIENS

Code de la propriété intellectuelle. Articles L 122.4
Code de la propriété intellectuelle. Articles L 335.2 – L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
E*cole *N*ationale *S*upérieure d'*A*gronomie et des *I*nsdustries *A*limentaires (ENSAIA***)
Ecole doctorale ***R*essources *P*rocédés *P*roduits *E*nvironnement (**RP2E**)
L*aboratoire des *S*ciences du *G*énie *C*himique (LSGC***)

THESE

Présentée à l'INPL par

Emma PETIOT

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

PROCEDES DE CULTURES DE CELLULES VERO EN MILIEU SANS SERUM :

Contributions au développement d'une stratégie PAT.

Soutenue publiquement le 6 novembre 2009
devant la commission d'examen

Membres du jury

Président du Jury :	Pascal SOMMER	Directeur de Recherche CNRS, IBCP, Lyon
Rapporteurs :	Amine KAMEN	Professeur, IRB-CNRC, Montréal
	Otto MERTEN	Responsable bioprocédés, Généthon, Evry
Examinateurs :	Noël DETRAZ	Responsable développement industriel, Mérial, Lyon
	Annie MARC	Directeur de Recherche CNRS, LSGC, Nancy
	Hervé PINTON	Directeur Global Technologies Innovation, Sanofi-pasteur, Marcy L'Etoile
Invitée :	Cécile GENY	Chef de projet, Sanofi-pasteur, Marcy L'Etoile

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
E*cole *N*ationale *S*upérieure d'*A*gronomie et des *I*nsdustries *A*limentaires (ENSAIA***)
Ecole doctorale ***R*essources *P*rocédés *P*roduits *E*nvironnement (**RP2E**)
L*aboratoire des *S*ciences du *G*énie *C*himique (LSGC***)

THESE

Présentée à l'INPL par

Emma PETIOT

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

PROCEDES DE CULTURES DE CELLULES VERO EN MILIEU SANS SERUM :

Contributions au développement d'une stratégie PAT.

Soutenue publiquement le 6 novembre 2009
devant la commission d'examen

Membres du jury

Président du Jury :	Pascal SOMMER	Directeur de Recherche CNRS, IBCP, Lyon
Rapporteurs :	Amine KAMEN	Professeur, IRB-CNRC, Montréal
	Otto MERTEN	Responsable bioprocédés, Généthon, Evry
Examinateurs :	Noël DETRAZ	Responsable développement industriel, Mérial, Lyon
	Annie MARC	Directeur de Recherche CNRS, LSGC, Nancy
	Hervé PINTON	Directeur Global Technologies Innovation, Sanofi-pasteur, Marcy L'Etoile
Invitée :	Cécile GENY	Chef de projet, Sanofi-pasteur, Marcy L'Etoile

A deux petits anges,

Remerciements

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au Laboratoire des Sciences du Génie Chimique de Nancy, au sein du groupe « Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires », c'est pourquoi je tiens à remercier Mr Michel Sardin de m'y avoir acceuillie. Je souhaite aussi exprimer ma profonde reconnaissance à Mme Annie Marc et Mr Hervé Pinton pour leur encadrement et leurs conseils scientifiques, mais aussi pour la confiance et l'autonomie qu'ils m'ont accordée tout au long de cette thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr. Pascal Sommer de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider mon jury de thèse ainsi que à Mr. Amine Kamen et Mr. Otto Merten d'avoir accepté de juger ces travaux. Je souhaite aussi remercier Mr Noël Detraz pour sa participation à mon jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier tous les membres des équipes « Dengue » de Sanofi pasteur pour leur aide précieuse, et en particulier Laetitia, Gabriel, Fleurine, Isabelle, Mounir pour leur disponibilité et leur participation active à ce travail. Je souhaite aussi remercier tout particulièrement Cécile Gény, Thierry Magadoux et Isabelle Bernard qui m'ont suivie et encadrée.

Ces trois années de thèse ont représenté pour moi une transition sur bien des plans, c'est pourquoi, mes pensées vont aux personnes qui ont marquées cette période. En premier lieu, un grand merci à mes collèges de travail, actuels et passés pour m'avoir acceptée, écoutée (et peut être supportée), et parmi eux, je tiens à remercier tout particulièrement Naziha, Eric O., Marie W., Jean-Mathieu, Frédérique, Marie-Françoise, Mathilde, Caroline… Merci surtout à Fabrice Blanchard et ses perpétuels « thésards et thésardes préférés », et qui entre autre, m'a initiée à la culture en réacteur…
Mes pensées vont aussi à mes amis proches, toujours présents à mes côtés et qui m'ont accompagnée tout au long de ce périple. Une petite pensée pour mes compagnes de galère durant ces derniers mois, Laure et Maia, probablement aussi entrain d'écrire leurs remerciements, mais aussi à tous les autres qui m'ont permis de temps à autres de m'échapper de ce « grand froid nancéen », Paulo, Kloé, Ché, Mathieu, Pauline, Alban, Charlotte… sans oublier tous ceux qui m'ont aidée à le supporter ici, Sophie, Christophe, Greg, Georges, Apo… Je pense aussi très fort à ma famille qui a été présente quand j'en avais le plus besoin et surtout à ma mère, qui m'a écoutée et soutenue dans les moments difficiles...

Enfin, je tiens à remercier une personne qui a véritablement beaucoup comptée et a marquée cette période, et qui j'espère, marquera la prochaine, Eric.

Abréviations

ACP	Analyse en composante principale
ATCC	American Type Culture Collection
DoE	Plan d'expériences (Design of Experiment)
FDA	Food and Drug Administration
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée la spectrométrie de masse
MCS	Microporteurs
MIR	Moyen infrarouge
NIR	(Near Infrared) Proche infrarouge
ORA	Office of Regulatory Affairs
OUR	Taux de consommation d'oxygène (Oxygen uptake rate)
PAT	Process Analytical technology
PLS	Régression des moindres carrés (Partial Least Square)
PS	Phosphatidyl-sérine
QbD	Quality by Design
TCA	Cycle des acides tricarboxyliques
LDH	Lactate déshydrogénase
EAEMP	European Agency for the Evaluation of Medical Product
FSC	Forward scatter (cytométrie)
SSC	Side scatter (cytométrie)
BSA	Bovine Serum Albumine (Albumine bovine)
PBS	Phosphate buffer saline (tampon phosphate)
CER	Taux d'évolution du CO_2

SOMMAIRE GENERAL

INTRODUCTION GENERALE - 1 -

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE - 5 -

1.1. La cellule Vero en milieu sans sérum - 10 -
1.2. Le virus de la dengue - 20 -
1.3. La mort cellulaire - 28 -
1.4. Le métabolisme cellulaire - 35 -
1.5. L'approche PAT appliquée à la culture de cellules animales - 59 -

OBJECTIFS DES TRAVAUX - 77 -

MATERIEL & METHODES - 83 -

1.1. Culture cellulaire et production virale - 87 -
1.2. Croissance et viabilité cellulaires - 91 -
1.3. Etude du métabolisme cellulaire - 95 -
1.4. Calcul des paramètres cinétiques - 98 -
1.5. Autres techniques analytiques - 99 -

RESULTATS & DISCUSSION - 103 -

1. Criblage de groupes de composés d'un milieu de culture sans sérum pour la culture de cellules Vero - 105 -

1.1. Criblage rapide de milieux de culture sans sérum pour des cellules Vero adhérentes par une méthode à petite échelle et non invasive. - 111 -

2. Etudes cinétiques et métaboliques de culture de cellules Vero en milieu sans sérum - 129 -

2.1. Culture en milieu de référence - 135 -
2.2. Culture de cellules Vero en milieu de référence avec renouvellement du milieu - 140 -
2.3. Influence de la dilution du milieu de référence ou de l'ajout de glutamine dans le milieu de culture - 149 -
2.4. Etude métabolique et physiologique de la cellule Vero en milieu sans sérum - 153 -

3. Nouveaux outils de suivi en-ligne pour l'évaluation d'une approche PAT dans le cas de culture de cellules Vero. - 185 -

3.1. Analyse en ligne de la croissance et de la mort de cellules Vero cultivées sur microporteurs - 191 -
3.2. Etude préliminaire de l'analyse des cellules Vero et du milieu de culture par microspectroscopie Raman - 211 -
3.3. Analyse en-ligne de métabolites du milieu de culture par spectroscopie proche-Infrarouge - 217 -

4. Culture des cellules Vero en bioréacteur et production virale - 239 -

4.1. Etudes cinétiques de cultures de cellules Vero à l'échelle du bioréacteur - 244 -
4.2. Influence du milieu de culture sur la production virale en bioréacteur - 251 -
4.3. Impact de la substitution de la glutamine sur l'extrapolation du procédé - 261 -

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES - 271 -

BIBLIOGRAPHIE - 285 -

Introduction générale

Introduction

L'utilisation de procédés de cultures de cellules animales pour la production de nombreuses molécules à visée thérapeutique, telles que des protéines recombinantes (facteurs de croissance, anticorps monoclonaux, hormones, cytokines…) ou des vaccins viraux, est en large expansion depuis le milieu du siècle dernier (Kretzmer 2002). Plus spécifiquement, dans le cas de la production de vaccins, le procédé de production du virus de la poliomyélite basé sur la culture de cellules Vero, a été l'un des premiers procédés à être développé par l'Institut Mérieux (Montagnon *et al.,* 1981; Montagnon *et al.,* 1999). Depuis ce jour, le nombre de vaccins viraux à usage vétérinaire ou humain, produits avec cette lignée cellulaire, a fortement augmenté. De plus, sa capacité à proliférer sur microporteurs a permis d'envisager sa culture en masse dans des bioréacteurs, ce qui en fait un support cellulaire aujourd'hui incontournable dans l'industrie pharmaceutique.

A la fin du siècle dernier, l'utilisation de milieux de culture sans sérum de veau fœtal ni molécules d'origine animale, a été fortement préconisée par les organismes réglementaires tels que la FDA, en raison des risques sanitaires potentiels. Malheureusement, pour la plupart des lignées cellulaires utilisées, l'élimination du sérum s'est traduite par une diminution des performances de croissance, de viabilité et d'adhérence cellulaire ou de production. C'est pourquoi, de nombreux travaux ont été réalisés pour approfondir les connaissances de base sur la croissance, le métabolisme et la mort des lignées cellulaires cultivées dans ces nouveaux milieux de culture. On note ainsi un nombre important de publications traitant de différentes lignées cellulaires, comme les hybridomes, les cellules CHO ou les cellules BHK, …, études le plus souvent focalisées sur des procédés en développement. De façon assez surprenante, en dépit de cette littérature fournie, très peu d'articles se sont penchés sur le cas particulier des procédés existants mettant en oeuvre la culture des cellules Vero. Les articles concernant celles-ci s'attachent essentiellement aux performances de production virale, sans détailler leur physiologie et leur métabolisme. Néanmoins, il est clair que ces paramètres sont fortements interconnectés, et que le rendement et la qualité d'une production virale dépendent fortement de l'état physiologique et métabolique des cellules. Par conséquent, afin de pouvoir exploiter au mieux les potentialités de cette lignée cellulaire, une étude approfondie du procédé de culture de cellules Vero en milieu sans sérum se révèle être, encore à ce jour, un enjeu majeur tant au niveau académique qu'industriel.

Par ailleurs, la FDA a initié en 2002 la démarche PAT (Process Analytical Technology), dédiée au soutien de l'innovation dans les procédés pharmaceutiques en vue d'améliorer les critères de production et d'assurance qualité. Appliqués aux procédés de culture de cellules animales, les objectifs de cette approche sont multiples. En effet, ils incluent une meilleure compréhension du procédé par une connaissance accrue de la physiologie et du métabolisme cellulaire, mais aussi, la mise en place de nouveaux outils de contrôle en-ligne des paramètres clés du procédé de culture. Le but ultime est de parvenir à prédire, optimiser et contrôler l'évolution du procédé par des outils appropriés en vue de renforcer la qualité du produit final.

L'objectif général de cette étude est d'améliorer la compréhension, donc la maîtrise du procédé de culture de cellules Vero en milieu sans sérum pour la production virale d'un candidat vaccin contre la dengue, et de contribuer ainsi au développement d'une stratégie PAT. L'amélioration des performances cellulaires sera évaluée à partir d'une approche intégrative sur le milieu de culture, le métabolisme cellulaire et les outils d'analyse en-ligne mais aussi lors d'une production virale. La démarche adoptée sera précisée plus en détail juste après la présentation du contexte bibliographique.

Etude bibliographique

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE - 5 -

Introduction - 9 -

1.1. La cellule Vero en milieu sans sérum - 10 -
1.1.1. Origine et historique de la lignée cellulaire Vero - 10 -
1.1.2. Les milieux sans sérum - 11 -
1.1.3. Les procédés de culture de cellules Vero en milieu avec et sans sérum - 14 -

1.2. Le virus de la dengue - 20 -
1.2.1. Caractéristiques du virus de la dengue - 20 -
1.2.2. Epidémiologie et pathogenèse - 21 -
1.2.3. Mécanisme d'infection cellulaire et de prolifération du virus de la dengue - 22 -
1.2.4. Réponse immunitaire - 23 -
1.2.5. Infection des cellules Vero par le virus de la dengue - 24 -
1.2.6. Vaccination contre la dengue - 25 -
1.2.7. Les vaccins chimères - 27 -

1.3. La mort cellulaire - 28 -
1.3.1. Les deux mécanismes de la mort cellulaire - 28 -
1.3.1.1 La nécrose - 29 -
1.3.1.2 L'apoptose - 29 -
1.3.2. La mort cellulaire en systèmes de culture agités - 31 -
1.3.2.1 Impact de l'environnement physique et mécanique - 31 -
1.3.2.2 Impact de l'environnement biochimique - 32 -
1.3.2.3 Stratégies de limitation de la mort par apoptose en milieu sans sérum - 33 -

1.4. Métabolisme cellulaire - 35 -
1.4.3. Le métabolisme du glucose - 35 -
1.4.4. Métabolisme de la glutamine - 42 -
1.4.5. Métabolisme des acides aminés - 45 -
1.4.6. Production de lactate et d'ions ammonium - 50 -
1.4.6.1 Le lactate - 50 -
1.4.6.2 Les ions ammonium - 51 -
1.4.7. Amélioration des performances d'une culture cellulaire par le contrôle du métabolisme cellulaire - 51 -
1.4.7.1 Stratégie de rééquilibrage du métabolisme du glucose / lactate - 52 -
1.4.7.2 Stratégies de rééquilibrage de la glutaminolyse - 55 -

1.5. L'approche PAT appliquée à la culture de cellules animales - 59 -
1.5.1. L'approche PAT et la méthodologie QbD - 59 -
1.5.2. Suivi de la concentration et de la viabilité cellulaires - 61 -
1.5.3. Suivi en ligne des composés du milieu de culture - 67 -
1.5.3.1 Spectroscopie Raman - 68 -
1.5.3.2 Spectroscopie proche infrarouge (NIR) - 69 -

Introduction

Dans cette première partie, nous proposons une analyse bibliographique des différents aspects concernés par l'objectif de nos travaux.

Ainsi, la première partie de notre étude bibliographique relate de façon exhaustive les données disponibles dans la littérature sur la cellule Vero cultivée en milieu avec ou sans sérum. Les points plus particulièrement accentués touchent aux principales utilisations de ces cellules dans les procédés industriels et académiques ainsi qu'à leur utilisation en absence de sérum.

Les deux parties suivantes traitent respectivement de la mort et du métabolisme des cellules animales. Les travaux présentés s'intéressent à diverses lignées cellulaires, en développant plus particulièrement les lignées cellulaires issues de tissus rénaux, telles que les cellules BHK, MDCK ou HEK 293. Le peu de données disponibles sur la mort et le métabolisme des cellules Vero, notamment en milieu sans sérum, est aussi présenté.

Notre étude bibliographique s'intéresse aussi à la particule virale produite, qui est un virus chimère de la dengue. Cette partie nous permet de présenter le contexte général de la production d'un candidat vaccin contre la dengue et les caractéristiques de ce virus.

Enfin, la mise en œuvre d'une démarche PAT nécessite la mise en place de nouvelles méthodes de suivi du procédé, avec, notamment, le développement de nouveaux capteurs de suivi en-ligne. Une vue d'ensemble des technologies disponibles pour les procédés de culture de cellules animales est donc proposée dans la dernière partie de notre étude bibliographique. Une présentation plus détaillée concerne les technologies choisies dans notre étude.

1.1. La cellule Vero en milieu sans sérum

1.1.1. Origine et historique de la lignée cellulaire Vero

La lignée de cellules Vero a été isolée et établie à partir de rein de singe vert adulte d'afrique (*Certopithecus aethiops*) en mars 1962 par Y. Yasumura et Y. Kawakita à l'université de Chiba au Japon. Le nom donné à cette lignée cellulaire a été choisi par le Dr. Yasumura et provient de la langue Esperanto. « Vero » signifie la vérité en Esperanto, mais est aussi l'acronyme de « Verda » et de « Reno » (vert et rein respectivement en Esperanto). En 1964, cette lignée a été transmise à la banque cellulaire mondiale ATCC au passage 113. Elle a ensuite été propagée jusqu'au passage 121 avant d'établir une banque cellulaire. Cette lignée cellulaire était alors cultivée en milieu M199 avec 5 % de sérum.

La caractérisation initiale de cette lignée cellulaire en tant que substrat pour la production de vaccins viraux a été réalisée dans les années 1980 par l'Institut Mérieux, maintenant connu sous le nom de Sanofi Pasteur. Les principales caractéristiques de cette lignée sont présentées ci-dessous dans le tableau 1. Il est incontestable que la production de molécules biologiques à usage thérapeutique a été facilitée par l'utilisation de cette lignée cellulaire. En effet, cela a permis de s'affranchir de l'utilisation d'animaux, et donc de la variabilité concernant leur provenance, ainsi que des nombreux agents infectieux potentiellement présents dans les cultures primaires extraites de reins de singes verts (Merten 2006). La tumorigénicité de ces cellules a été évaluée à partir de rats nouveaux nés immunodéprimés. Ainsi, il a été montré que les nodules formés chez ces rats, à la suite d'injection de cellules Vero régressaient jusqu'au 169ème passage subi (Montagnon *et al.,* 1999). Ces propriétés ont permis l'utilisation de cette lignée pour la production de vaccins humains selon les exigences et réglementations imposées par l'organisation mondiale de la santé (OMS, 1982).

Tableau 1. Caractéristiques de la cellule Vero

Origine	Rein de singe vert adulte 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 (>21 j)* *Pas de métastases*
Caryotype	Aneuploïde : 58 chromosomes dans 66% des cellules
Culture	Adhérente
Référence ATCC	CCL81, 124° passage
Traçabilité	Suivie depuis son origine, traçabilité complète (milieu, sérum)
Permissivité	SV-40, SV-5, rougeole, arbovirus, réovirus, rubéole, adenovirus simien, poliovirus, grippe, virus respiratoire syncytial, virus vaccinia ...
Caractéristique	Ne produit pas d'interféron

1.1.2. Les milieux sans sérum

Une des principales difficultés de la culture de cellules animales réside dans les besoins complexes en éléments nutritifs. C'est pourquoi, pendant de nombreuses années, le sérum de veau fœtal a été le complément qui favorisait le mieux la croissance et le maintien cellulaire, et ce, pour une grande majorité des lignées cellulaires, qu'elles soient continues ou non. Ces qualités tiennent à la composition complexe du sérum et à son apport en éléments généralement peu ou pas présents dans les milieux de bases eux-mêmes. En effet, les milieux de bases, tel que les milieux MEM, DMEM, EMEM, GMEM, IMDM et RPMI apportent essentiellement les éléments nutritifs nécessaires à la biosynthèse cellulaire (sucres, acides aminés, vitamines, ions, …). Cependant, la culture de cellules animales nécessite aussi de nombreuses autres molécules qui participent à la croissance, la protection, l'adhésion, l'approvisionnement en nutriments etc… (Tableau 2) .

La provenance animale de ces sérums reste néanmoins un inconvénient majeur pour les nombreux industriels qui mettent en œuvre des procédés de production de molécules biologiques à usage thérapeutique à partir de cellules animales et en particulier pour les vaccins humains (Merten 2000). En effet, l'utilisation de sérum engendre divers problèmes d'ordre éthique et sanitaire, mais aussi de qualité et de traçabilité des produits finis. Premièrement, les sérums sont sujets à des variations de composition de part leur provenance. Ils peuvent aussi être la source de contaminations (ex : mycoplasmes, agents de transmission des encéphalopathies spongiformes notamment bovine) et génèrent des coûts supplémentaires de purification (Castle *et al.,* 1998; Keenan *et al.,* 2006). C'est pourquoi, l'évolution des procédés actuels tend à l'élimination du sérum et, de façon plus large, à l'élimination de tout composé de provenance animale.

Différents types de formulation existent pour les milieux sans sérum, parmi lesquelles on peut distinguer les appellations suivantes (Zhang *et al.,* 2005):

- milieu sans sérum (SFM : Serum-free medium)
- milieu sans protéines d'origine animale (APFM : Animal protein free medium)
- milieu sans protéines (PFM : Protein free medium)
- milieu sans composés d'origine animale (AFM : Animal free medium)
- milieu de composition chimiquement définie (CDM : Chemically defined medium)

Il s'agit donc de faire proliférer les cellules dans des milieux sans sérum en remplaçant ou non celui-ci par d'autres composés d'origine non animale (extraits de levures, protéines recombinantes, hydrolysats de protéines végétales), l'objectif étant d'obtenir des résultats comparables, voire améliorés par rapport à ceux jusqu'alors connus (Kim *et al.,* 2006). Pour cela, une connaissance détaillée des composés du sérum et de leur rôle a été nécessaire (Doverskog *et al.,* 1997; Keenan *et al.,* 2006). Cette dynamique a été initiée dans les années 1970 à 1980, et les études sont suffisamment avancées à l'heure actuelle pour que de nombreuses lignées cellulaires, telles que les lignées industrielles CHO ou les lignées d'hybridomes, soient adaptées et cultivées en routine dans des milieux sans sérum (Kim *et al.,* 2006). En revanche, les cellules adhérentes, telles que les cellules VERO, CHO, BHK et MDCK, qui ont des besoins plus importants, notamment pour les mécanismes d'adhésion, sont beaucoup moins faciles à adapter à une culture sans sérum (Merten *et al.,* 1997; Keenan *et al.,* 2006).

Depuis les années 90, certaines lignées adhérentes ont été adaptées à la culture en milieu sans sérum (Merten *et al.,* 1994) et de nombreuses études ont permis de définir de nouveaux agents, notamment impliqués dans la prolifération, l'adhésion et la protection des cellules adhérentes (Keenan *et al.,* 2006) (Tableau 2). Il faut cependant noter que les milieux sans sérum développés à ce jour sont souvent spécifiques d'une lignée cellulaire. La mise au point d'une technique de détachement cellulaire n'utilisant pas de molécules d'origine animale, contrairement aux procédures habituelles basées sur la trypsine extraite de pancréas de porc ou de bœuf, est aussi un défi majeur pour la culture de cellules adhérentes en milieux sans sérum (Rourou *et al.,* 2007).

Tableau 2. Comparaison des composés du sérum de veau fœtal et de suppléments de remplacement pour les milieux sans sérum.

Fonctions	**Composants du sérum**	**Composants de remplacement**
Facteurs de croissance	insuline- hormones (PDGF-EGF-FGF) - putrescine	zinc/ insuline recombinante/ LongR^3 : analogue EGF-1 (Morris *et al.,* 2000)
Protéines de transport et agents détoxifiants	albumine – globulines-transferrine	di-tripeptides - albumine recombinante- cholestérol-acides gras – lipoprotéine - cyclodextrines - protéines de faible poids moléculaire - citrate de fer - Delta transferrine (recombinante)
Facteurs d'adhésion	collagène – fibronectine – lamiline	pronectine - fibronectine synthétique- enactine recombinante - $CaCl_2$ - Site RGD synthétique (site actif des facteurs d'adhésion) (Tarone *et al.,* 1982; Yelian *et al.,* 1993)
Inhibiteurs de protéases	α1 anti-trypsine (Tarone *et al.,* 1982)	protéines de soja
Vitamines et cofacteurs	riboflavine - pyridoxine	
Agents protecteurs	albumine – apo-transferrine	pluronic F68 - tween 80
Détachement cellulaire	trypsine pancréatique	trypsine recombinante – accutase – collagenase - papaïnase

En ce qui concerne les cellules Vero, quelques milieux spécifiquement développés pour ces cellules sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3. Milieux sans sérum dédiés à la culture de cellules Vero

Milieu	Composition	Origine	Lignée cellulaire	Publication
Ex-cell medium	Contient des hydrolysats de plantes et a un faible contenu en protéines recombinantes	JRH Biosciences	Vero	Kolell *et al.,* 2007
MDSS2		Axcell Biotechnologies	Vero / BHK	Merten *et al.,* 1994
M-VSFM	Addition de 10 % à un milieu DMEM	Department of Microbiology, University of Manitoba	Vero / MDCK / BHK	Butler *et al.,* 2000
VP-SFM		Invitrogen	Vero	Frazatti-Gallina *et al.,* 2004
SFM	1 :1 volume VP-SFM / William's E	Invitrogen / Sigma	Vero	Quesney *et al.,* 2003

Dans la plupart des cas, les milieux sans sérum engendrent une réduction de la croissance cellulaire, notamment pour les cellules adhérentes (Merten *et al.,* 1997). C'est pourquoi l'optimisation de milieu reste encore un défi pour les industries dont la production est basée sur la croissance de cellules adhérentes. Par ailleurs, il faut insister sur le fait que la mise en place de milieux sans sérum adaptés spécifiquement à la culture d'une lignée nécessite des étapes d'optimisation successives généralement longues et coûteuses. La plupart des études récentes font appel à des plans d'expériences et/ou des plans de mélanges, suivis d'analyses statistiques, qui permettent d'obtenir des informations sur l'impact des composants d'un milieu de façon plus rapide que les techniques classiques qui réalisent l'étude d'un facteur à la fois (Franco-Lara *et al.,* 2006; Liu *et al.,* 2007b; Ren *et al.,* 2008). Cependant, ces techniques ne sont pas forcément plus aisées et moins coûteuses, étant donné qu'elles nécessitent un nombre important de données ; d'autant plus important que le nombre de composés du milieu à étudier augmente. Le principal problème réside donc dans la capacité à suivre la concentration cellulaire de façon non-invasive pour évaluer l'impact de ces composés, si possible dans des systèmes de cultures à petite échelle permettant le criblage de milieux (Girard *et al.,* 2001; Cheung *et al.,* 2007; Sander *et al.,* 2007).

A ce jour, peu de systèmes de criblage non invasifs sont disponibles, notamment dans le cas de culture de cellules adhérentes. La mise au point de nouvelles techniques de criblage et d'optimisation de milieux reste donc une problématique d'actualité.

1.1.3. Les procédés de culture de cellules Vero en milieu avec et sans sérum

La lignée cellulaire Vero a été développée principalement pour des productions industrielles à grande échelle. Cette lignée a été utilisée pour la première fois en 1984 par Montagnon *et al.* pour la production de vaccins viraux contre les poliovirus. Cette production était réalisée sur microporteurs pour atteindre de hautes densités cellulaires en milieu contenant du sérum. En effet, les cellules Vero ont été cultivées, dans un premier temps, en flacons de Roux (Montagnon *et al.*, 1981; Saito *et al.*, 1981), puis sur microporteurs lisses ou macroporeux présentant de nombreux avantages pour la production à grande échelle (White *et al.*, 1990; Souza *et al.*, 2007).

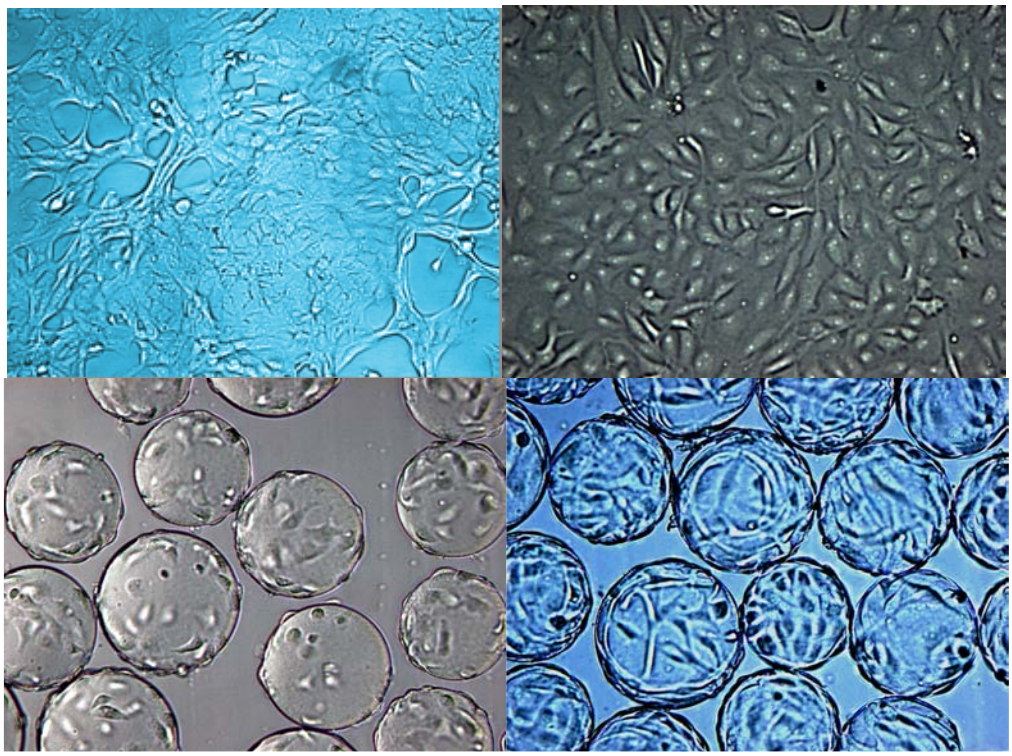


Figure 1. Cellules Vero cultivées en flacon de culture cellulaire (en haut après 2 et 3 jours de culture) et sur microporteurs (en bas après 1 et 3 jours de culture).

Depuis, l'utilisation des cellules Vero s'est largement répandue avec notamment la production, dans le domaine académique, de réovirus (Butler *et al.*, 2000), de virus de l'encéphalite japonaise (Wu *et al.*, 2002; Toriniwa *et al.*, 2007), de virus de l'hépatite A (Sun *et al.*, 2004), du virus du Chikungunya (Tiwari *et al.*, 2009), de virus de la rage (Frazatti-Gallina *et al.*, 2004; Trabelsi *et al.*, 2006; Rourou *et al.*, 2007; Rourou *et al.*, 2009) et d'entérovirus 71 (Wu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007a). Les cellules Vero ont aussi été cultivées pour la production de certains parasites (De Meerschman *et al.*, 2002) comme indiqué dans le tableau 4.

Tableau 4. Synthèse bibliographique des procédés de production virale basés sur la croissance des cellules Vero avec et sans sérum de veau fœtal.

Production	Milieu	Sérum	Système de culture - Volume utile	Mode de culture	Xmax (cell.ml^{-1})	Ensemencement (cell.ml^{-1})	MCS	Résultats	Référence
Haute densité cellulaire	L15 + 4 mM glutamine +10 mM fructose vs galactose	5 %	Bioréacteur 500ml	Discontinu / Perfusé	3×10^7	0,7 à 1,3 $\times 10^8$	20 g.l^{-1} Superbeads	Densité maximale atteinte en mode perfusé (10 fois plus importante qu'en mode batch)	Nahapetian *et al.*, 1986
Cellules	L15 + 4 mM galactose + 2 mM glutamine	5 %	Spinner 100 ml	Discontinu / Semi-discontinu	$1{,}75 \times 10^6$	1×10^5	2 g.l^{-1} Cytodex-1	Alimentation en glutamine et/ou galactose prévient l'apoptose cellulaire	Mendonca *et al.*, 2002
Haute densité cellulaire	L15 + 2mM glutamine	5 %	Bioreacteur 3,7 l	Discontinu / Discontinu avec changement de milieu / Perfusé	6×10^6	$3{,}4 \times 10^5$	2 ou 10 g.l^{-1}	Etude de l'adhésion sur microporteurs	Mendonça *et al.*, 1999
Hépatite A	MEM + 10 mM glucose + 5mM glutamine	10 % croissance - 2 % production	Bioréacteur 4 l	Discontinu	$1{,}5 \times 10^6$	1×10^5	Cytodex-1	Production possible de HAV par culture sur microsupports de cellules Vero	Sun *et al.*, 2004
Chikungunhya	MEM	10 %	Spinner 1 l	Discontinu	2×10^6	$2{,}5 \times 10^5$	3 g.l^{-1} Cytodex 1	Production de vaccin inactivé contre le chikunguhya avec les mêmes performances que en milieu avec sérum.	Tiwari *et al.*, 2009
	VP-SFM	0 %							
Rage	MEM ou M199 + 0,2 mM méthionine / sérine	10 %	Bioréacteur 2 l	Perfusé / Recirculation	$4{,}7 \times 10^6$	1×10^7	3 g.l^{-1} Cytodex 1	Evaluation de différents modes de culture pour la production de virus rabique	Trabelsi *et al.*, 2005
Encéphalite japonaise	M199	10 %	Spinner 100 ml	Batch	1×10^6	1×10^5	2 g.l^{-1} Cytodex-1	Impact de l'hydrodynamique sur la production de virus encéphalite japonaise	Wu *et al.*, 2000
Encéphalite japonaise	M199	5 %	Bioréacteur 500 l	Fed-Batch	2×10^6		3 g.l^{-1} Cytodex 1	Mise au point d'une production de vaccin inactivé contre l'encéphalite japonaise	Sugawara *et al.*, 2002

Tableau 4. (suite)

Production	Milieu	Sérum	Sytème de culture - Volume utile	Mode de culture	Xmax (cell.ml^{-1})	Ensemencement (cell.ml^{-1})	MCS	Résultats	Publication
Neospora caninum / Toxoplasma gondii tachyzoites	RPMI	Additif Deffcell	Flacons statiques	Discontinu	6×10^5	$1,9 \times 10^5$		Pas de croissance cellulaire satisfaisante avec un milieu sans sérum, néanmoins, production de parasite comparable à une culture avec sérum	De Meerschman *et al.*, 2002
		10 %			$1,2 \times 10^6$				
Entérovirus 71	M199	10 %	Bioréacteur 2 l	Discontinu / Semi- discontinu	$1, 4 \times 10^6$	5×10^5	5 g.l^{-1} Cytodex-1	Production d'entérovirus 71 plus importante que pour les cellules MRC5 ou WI-38	Wu *et al.*, 2004
	M-VSFM	0 %			$1,6 \times 10^6$	5×10^5			
Cellules	IMDM	4 %	Bioréacteur 3 l	Discontinu	$2,3 \times 10^6$	4×10^5	3 g.l^{-1} Cytodex 1	Caractérisation de la mort cellulaire en bioréacteur : En milieu sans sérum le taux de décès est plus élevé. La mort survient majoritairement par apoptose	Quesney *et al.*, 2001; Quesney *et al.*, 2003
	VP-SFM + milieu williams E	0 %			$1,8 \times 10^6$				
Entérovirus 71	M-VSFM	0 %	Spinner 100 ml	Discontinu	$1,4\text{-}1,8 \times 10^6$	1×10^6	5 g.l^{-1} Cytodex-1	Diminution de la productivité en milieu sans sérum / Augmentation du taux de décès des cellules / Amélioration de l'immunogénicité des entérovirus 71	Liu *et al.*, 2007a
Grippe	Adapté du DMEM	0 %	Bioréacteur 1,5 l	Discontinu / Semi - discontinu	5×10^6		Cytodex 3	Production de virus de la grippe sur cellules Vero adhérentes. Immunogénicité 2 à 4 fois plus importante que pour les productions sur œuf embryonnés	Kistner *et al.*, 1998
Rage	VP-SFM	0 %	Spinner / Bioréacteur 2 l	Discontinu	3×10^6	$2,5 \times 10^5$	3 g.l^{-1} Cytodex 1	Production de virus rabique sans composés d'origine animale à partir d'une culture à haute densité cellulaire	Rourou *et al.*, 2007
Rage	IPT-AF (basé sur le milieu M199)	0 %	Bioréacteur 1,2 l	Discontinu	$1,95 \times 10^6$	$2,5 \times 10^5$	2 g.l^{-1} Cytodex 1	Développement d'un procédé de production de virus rabique dans un milieu sans composés d'origine animale	Rourou *et al.*,
Rage	VP-SFM + 4mM glutamine	0 %	Bioréacteur	Discontinu				Les milieux sans sérum facilitent les étapes de purification des vaccins. Immunogénicité des virions satisfaisante	Frazatti-Gallina *et al.*, 2004

Tableau 4. (suite)

Production	Milieu	Sérum	Sytème de culture - Volume utile	Mode de culture	Xmax (cell.ml^{-1})	Ensemencement (cell.ml^{-1})	MCS	Résultats	Référence
Cellules	MDSS2	0 %	Spinner	Discontinu avec changement de milieu	1 × 10^6	1 × 10^5	3 g.l^{-1} Dormacell	Croissance identique à un milieu DMEM supplémenté par 2 à 5 % de SVF	Merten *et al.*, 1994
Encéphalite Japonaise	VP-SFM + 4mM Glutamine	0 %	Bioréacteur 50 l	Discontinu avec changement de milieu	1,2 × 10^6	1× 10^5	3 g.l^{-1} Cytodex-1	Production d'un vaccin inactivé contre l'encéphalite japonaise dans un milieu sans sérum / Conservation de la qualité et amélioration de l'immunogénicité des virions	Toriniwa *et al.*, 2008
Poliovirus	MDSS2	0 %	Bioréacteur 1,6 l	Batch / Perfusé	1,5 × 10^6	2,3 × 10^5	6,25 g.l^{-1} Superbead	Production de virus plus importante pour une culture sans sérum par rapport à une culture supplémenté en sérum	Merten *et al.*, 1997
Réovirus	DMEM+10% M-VSFM	0 %	Spinner 100 ml	Batch	1 × 10^6	2 × 10^5	2 g.l^{-1} Cytodex-1	Titre viral plus important en milieu sans sérum	Butler *et al.*, 2000

Toutes ces études ont notamment débouché sur un nombre important de productions industrielles de vaccins viraux attenués vivants ou inactivés, exposées dans le tableau 5 (Barrett *et al.*, 2009). C'est pourquoi, la lignée cellule Vero est aujourdhui présentée comme une plateforme cellulaire pour la production de vaccins.

Tableau 5. Synthèse des vaccins viraux produits à partir de la culture de cellules Vero (Barrett *et al.*, 2009)

Genre	Virus	Type de vaccin	Produit	Société productrice	Stade
Poliovirus	poliomyélite	inactivé	Imovax polio®	Sanofi pasteur	1982
		vivant atténué	OPV-Mérieux®	Sanofi pasteur	1988
Lyssavirus	rage	inactivé	Verorab®	Sanofi pasteur	1985
Rotavirus	rotavirus humain et bovin	pentavalent vivant	RotaTeq®	Merck	2006
	rotavirus	monovalent atténué	Rotarix®	GlaxoSmithKline	2007
Flavivirus	encéphalite japonaise	inactivé atténué	Ixiaro®	Intercell	2009
		inactivé atténué	JE-PIV	Walter red army institute of research/ Cheil Jedang corporation of South Corea	Phase II
		vivant atténué chimérique	ChimeriVax®-JE	Acambis	Phase III
	dengue	vivant atténué chimérique à partir du sérotype DEN-4		Blomberg School of Public Health /NIH	
		vivant atténué chimérique tétravalent basé sur la plateforme ChimeriVax	ChimeriVax®-Dengue	Acambis	Phase III
	encéphalite West Nile	vivant atténué chimérique basé sur la plateforme ChimeriVax	ChimeriVax®-WN02	Acambis	Phase II
Alphavirus	ross river virus RRV	inactivé		Baxter	Phase I/II
	chikungunya	inactivé		Baxter	tests pré cliniques
		vivant atténué chimérique		Université du Texas	tests pré cliniques
	SARS	inactivé		Baxter	Phase I
Smallpox virus	smallpox virus		ACAM2000	Acambis	Phase III
Influenza	grippe saisonnière	inactivé		Baxter	Phase III
	grippe A H5N1	inactivé	Cepavalan	Baxter	2009

Dans de ce type de procédés de production, afin d'augmenter le titre viral final, l'un des principaux objectifs est de pouvoir augmenter la densité cellulaire. Ainsi, diverses études on été conduites sur l'impact de l'aération, de l'agitation, de la concentration en microporteurs, du type de surface d'adhésion, de la concentration à l'ensemencement et du procédé de culture (tableau 4).

La concentration cellulaire maximale atteinte pour les cellules Vero, à ce jour, est de 30 × 10^6 cell.ml^{-1} (Nahapetian *et al.,* 1986) sur milieu L15 additionné de 5 % de sérum. Cette performance a été réalisée avec 20 g.l^{-1} de microsupports Superbeads (Flow Laboratories) en réacteur perfusé de 100 ml et un débit de perfusion de 800 ml.j^{-1}, sur une durée de culture de 16 jours avec une concentration d'ensemencement de 6 × 10^5 cell.ml^{-1}. Par contre, la majorité des travaux concernant les cellules Vero sont réalisés en mode discontinu et/ou semi-continu, et conduisent à des concentrations cellulaires de l'ordre de 2 à 6 × 10^6 cell.ml^{-1} (Mendonça *et al.,* 1998), la plupart de ces travaux ayant été réalisés en milieu contenant 5 % de sérum.

Il faut aussi souligner que le passage des cellules Vero à un mode de culture sans sérum implique pour celles-ci une diminution de la croissance cellulaire et de la concentration maximale de cellules destinées à être infectées (voir tableau 4 : X_{max} entre 1 et 3 × 10^6 cell.ml^{-1}) (Liu *et al.,* 2007a). Pourtant, dans certains cas de production virale en milieu sans sérum, la productivité de virus et l'immunogénicité des virions peuvent être plus importantes que dans les cultures supplémentées en sérum. C'est notamment le cas pour le virus de la rage (Frazatti-Gallina *et al.,* 2004) mais aussi pour les entérovirus type 71 (Wu *et al.,* 2004; Liu *et al.,* 2007a). Les auteurs expliquent cette meilleure immunogénicité (capacité des virions à développer une réponse immunitaire) par une meilleure stabilité et une augmentation du contenu antigénique des doses injectées. En effet, ceci résulte du fait que seules les particules infectieuses sont prises en compte lors des immunisations, alors que de nombreuses particules non infectieuses, mais potentiellement antigéniques, sont produites que ce soit avec ou sans sérum (Liu *et al.,* 2007a). Il se peut, par ailleurs, que l'état métabolique cellulaire en milieu sans sérum soit plus propice à une infection virale. Ces résultats, constatant une diminution de la concentration cellulaire mais une augmentation de la production de pathogènes, en milieu sans sérum sont également observés lors de productions de parasites sur cellules Vero (De Meerschman *et al.,* 2002). Certains auteurs soulignent aussi que le milieu de culture optimal peut être différent entre la phase de croissance et la phase de production virale (Butler *et al.,* 2000), c'est pourquoi, lors de certaines production l'infection virale a lieu dans un milieu de culture différent de la phase d'expansion cellulaire (Trabelsi *et al.,* 2006).

Contrairement aux travaux décrits avec diverses lignées cellulaires, comme par exemple les cellules CHO ou MDCK, peu d'études de la littérature se sont intéressées au cas particulier de l'adaptation des cellules Vero à un milieu sans sérum. De plus, ces études concernent principalement l'impact sur la phase de production virale. Aussi, améliorer les connaissances sur le comportement des cellules Vero pendant la phase d'expansion cellulaire en milieu sans sérum pourrait être bénéfique.

1.2. Le virus de la dengue

1.2.1. Caractéristiques du virus de la dengue

Le virus de la dengue fait partie de la famille des *Flaviviridae* du genre flavivirus. Cette famille compte 70 autres virus à ARN simple brin dont le virus de la fièvre jaune et le virus de l'encéphalite japonaise (Monath *et al.*, 2002). Le virus de la dengue est présent sous quatre sérotypes différents, DEN-1 à 4. Il s'agit d'un virus enveloppé dont le diamètre est de 50 nm et qui possède un génome de 10,7 kb. Le brin d'ARN code sur une même phase ouverte de lecture pour trois protéines de structure (la capside C, une protéine de membrane M et une glycoprotéine d'enveloppe E) ainsi que pour sept autres protéines (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b et NS5) (McBride *et al.*, 2000) (figure 1).

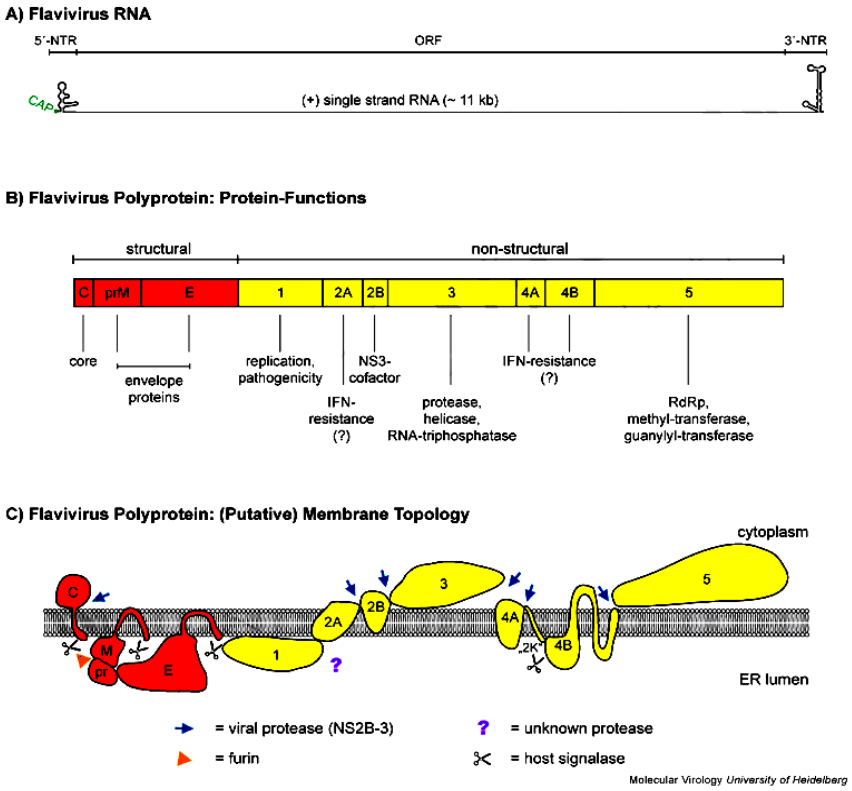


Figure 2 : Structure d'un flavivirus

La protéine E est notamment impliquée dans les mécanismes d'infection et d'invasion de l'hôte. Elle est constituée d'homo-dimères, et chaque monomère est composé de trois domaines distincts. Le domaine C-terminal ou domaine III porte notamment la majorité des épitopes cibles des anticorps neutralisants de la réponse immune et le site de liaison aux récepteurs cellulaires (Pattnaik *et al.*, 2007).

1.2.2. Epidémiologie et pathogenèse

Le virus de la dengue infecte l'homme *via* une piqûre de moustique. C'est pourquoi la dengue sévit principalement dans les zones tropicales d'Asie, d'Océanie, d'Afrique et d'Amérique (McBride *et al.*, 2000). Dans ces zones, environ 2,5 milliards de personnes ont un risque d'être infectées alors que l'on estime à 100 millions par an, les personnes atteintes par une des pathologies liées à l'infection par le virus de la dengue. Il faut noter que les formes sévères de cette maladie touchent majoritairement des enfants (McBride *et al.*, 2000). L'extension actuelle de cette maladie provient notamment de l'accroissement de la population, d'une insuffisance de prévention, de contrôle, de surveillance et surtout d'un manque de ressources pour la santé publique dans les pays en voie de développement.

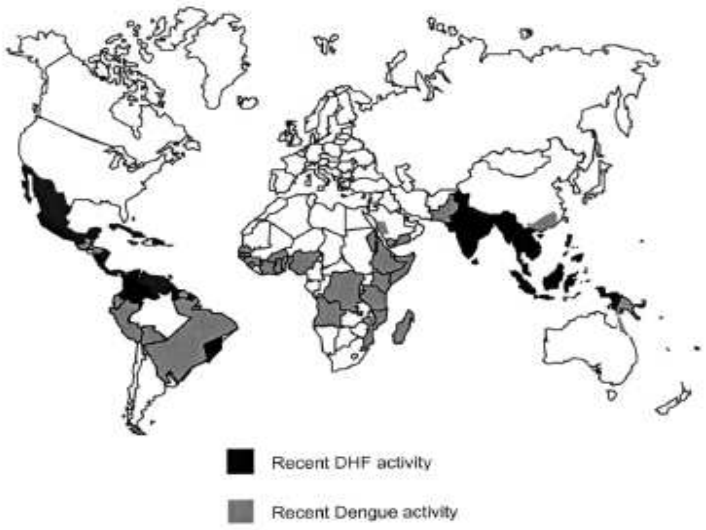


Figure 3 : Zones géographiques touchées par la dengue.

La dengue est une maladie ancienne connue dès le XIXème siècle, longtemps considérée comme une fièvre tropicale d'adaptation à la vie coloniale, la maladie a pris une évolution nouvelle en 1954, date de l'apparition de la forme hémorragique aux Philippines, décrites chez les enfants. La dengue hémorragique est devenue la principale cause d'hospitalisation des enfants en Asie du sud. Cette évolution de la maladie reste encore mal expliquée, parmi les facteurs favorables on doit prendre en considération les déplacements des populations notamment pendant la seconde guerre mondiale qui ont aboutit à une dispersion des 4 sérotypes de virus en Asie, la concentration des populations dans des bidonvilles où les conditions d'hygiène et notamment l'absence d'adduction de l'eau potable ont aboutit au stockage dans des réserves non adaptées favorisant ainsi à la pullulation du vecteur *Aedes aegypti*. Progressivement on est passée d'un stade d'une maladie endémique à un sérotype à une circulation hyperendémique associée à la circulation des 4 sérotypes.

Cette situation en Asie dans les années 1960 est en train de se retrouver en Amérique du sud où, progressivement, les 4 sérotypes ont été introduits et où, pour la première fois, la dengue hémorragique a fait son apparition, en 1981, dans l'ile de Cuba et s'étend actuellement dans l'ensemble de la région.

Chez l'enfant la plupart des infections de dengue sont asymptomatiques. De ce fait, il est relativement difficile de diagnostiquer une infection de dengue tant que l'infection n'est pas sévère. Il existe une graduation dans les pathologies engendrées par la dengue (McBride *et al.*, 2000; Guzman 2002). Ainsi, les manifestations les plus sévères et mortelles de la dengue se caractérisent par des fièvres hémorragiques (DHF) où apparaissent des saignements spontanés de la peau, des ecchymoses etc… Les cas les plus graves évoluent vers la dengue avec syndrome de choc (DSS) où apparaissent de fortes chutes de tension, des déficiences circulatoires voire l'impossibilité de détection du pouls.

1.2.3. Mécanisme d'infection cellulaire et de prolifération du virus de la dengue

Lors de l'infection virale, *via* une piqûre de moustique sous cutanée, le virus est libéré dans l'hôte humain. Afin de se propager et se multiplier, les flavivirus ciblent des récepteurs cellulaires membranaires. La détermination des récepteurs concernés et des cellules cibles est pour l'instant encore sujet à controverse dans le milieu scientifique. Il semblerait pourtant que la protéine d'enveloppe E du virus de la dengue soit incontestablement impliquée. Les étapes de l'infection d'une cellule par le virus de la dengue ont été largement décrites et sont présentées dans la figure 4 (Modis *et al.*, 2004).

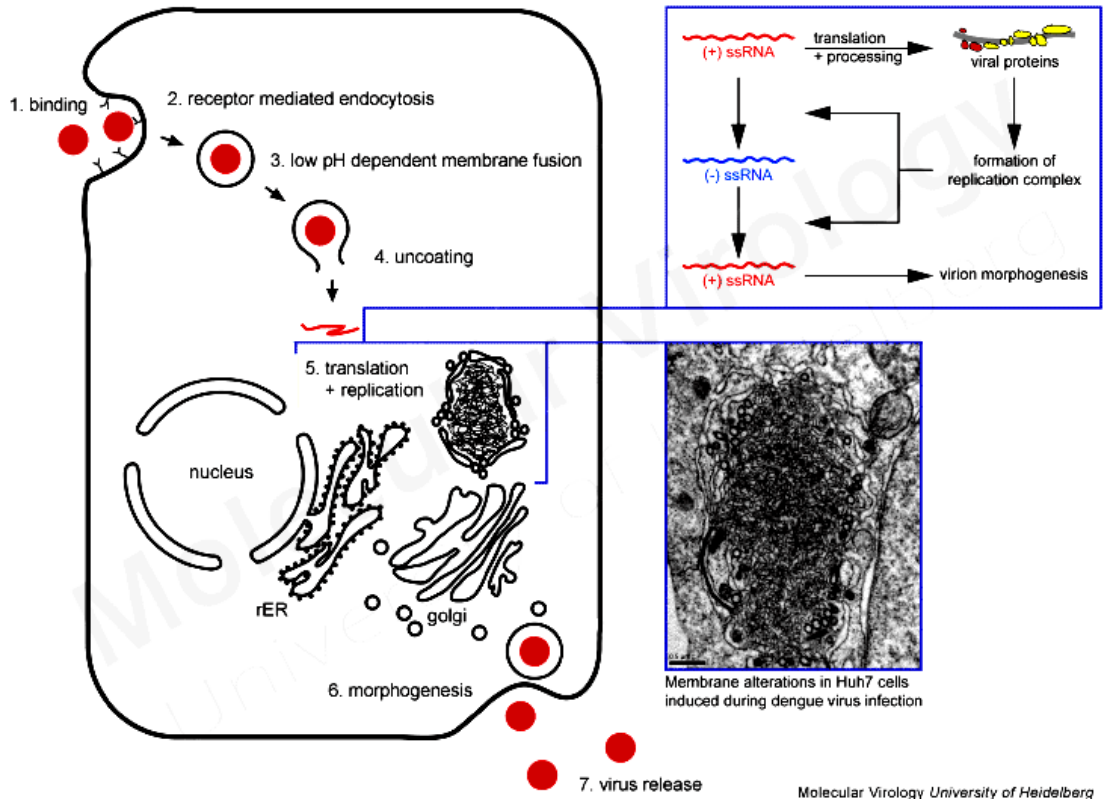


Figure 4 : Mécanisme d'infection cellulaire par le virus de la dengue

1.2.4. Réponse immunitaire

La réponse humorale est principalement dirigée contre la protéine d'enveloppe E. Les anticorps inhibent l'adhésion virale aux cellules et sont capables de neutraliser l'infectivité des virus in vitro (Chaturvedi *et al.*, 2005). La réponse immunitaire humorale, outre son rôle de protection par rapport au sérotype infectant, pourrait jouer un rôle dans la survenue de la dengue hémorragique. Dans les années 1960, en Thaïlande, S. Halstead avait établi que la DH était observée principalement chez les enfants au cours d'infection séquentielle par deux sérotypes de la dengue. Les conditions optimales décrites étaient celles d'une infection primaire dengue 1 suivie, 3 à 5 ans après par une infection secondaire dengue 2. S. Halstead avait proposé l'hypothèse suivante : lors d'une infection primaire apparaissent des anticorps neutralisants vis-à-vis du virus infectant ainsi que des anticorps hétérologues vis-à-vis d'autres sérotypes de dengue. Ces anticorps hétérologues perdent rapidement leur propriétés neutralisantes et lors d'un contact avec un nouveau sérotype il se forme un complexe virus / récepteur Fc de l'anticorps qui se fixe sur les cellules cibles monocytaire et permet au virus de pénétrer et de se multiplier dans ces cellules aboutissant à l'amplification virale et à la sécrétion de cytokines qui vont jouer un rôle dans la perturbation de la perméabilité vasculaire et favoriser l'hémorragie.

Cette hypothèse appelée d'anticorps facilitants (ADE en anglais) reste discutée, elle constitue un frein au développement d'un vaccin contre la dengue (McBride *et al.,* 2000; Chaturvedi *et al.,* 2005).
Il semblerait que l'apparition de fièvres hémorragiques soit aussi caractérisée par une réponse cellulaire spécifique. En effet, une réponse cellulaire majoritairement de type Th1 avec de fortes sécrétions de cytokines IL-12 a été observée dans les cas courants de fièvre de dengue. En revanche, lors de l'apparition de fièvres hémorragiques, la réponse cellulaire est orientée majoritairement vers le type Th2, et la sécrétion d'IL-12 est diminuée au profit de la sécrétion de cytokines IL-8 (Chaturvedi *et al.,* 2005). L'unique cytokine spécifique produite durant cette réponse cellulaire est une cytokine appelée hcF. Elle serait directement liée à la production de radicaux libres, de nitrites et d'oxygène réactif, elle induirait l'apoptose cellulaire et la surexpression de cytokines pro-inflammatoire. Cette cytokine serait notamment à l'origine de la perméabilité vasculaire étant donné qu'elle exacerbe les pathologies sévères de la dengue suite à un passage de la réponse Th1 à la réponse Th2. Il est d'ailleurs envisagé d'utiliser cette cytokine comme indicateur de la gravité de la maladie dans les diagnostics des pathologies liées à la dengue.

1.2.5. Infection des cellules Vero par le virus de la dengue

Il est connu que l'entrée du virus de la dengue est médiée, pour certains types cellulaires, par un complexe avec des anticorps non neutralisant qui forment un pont avec des récepteurs cellulaires cibles (le récepteur Fc chez les macrophages). Mais ce mécanisme, observé dans le cas de l'ADE, ne peut pas expliquer les infections primaires chez les patients n'ayant pas été en contact avec le virus et la capacité de ces virus à infecter des cellules non phagocytaires. Le mécanisme de liaison du virus à ses cellules cibles a aussi été étudié sur les cellules VERO. En effet, ce virus est capable d'infecter naturellement cette lignée cellulaire. Il a pu être démontré que la protéine d'enveloppe E du virus était capable de se lier à la membrane cytoplasmique des cellules VERO par un domaine précis de cette protéine entre le 281ème et le 423ème acide aminé. La rapidité de la cinétique de liaison laissait présupposer une adhésion spécifique de cette protéine à un récepteur cellulaire des cellules VERO (Chen *et al.,* 1996). Des études complémentaires ont pu à partir de ces travaux, identifier le récepteur de cette liaison chez les cellules VERO mais aussi chez d'autres types cellulaires en sachant que les récepteurs cibles sont variables selon les lignées cellulaires. Dans le cas des cellules VERO, le récepteur concerné est le sulfate d' héparan, un protéoglycane fortement sulfaté (Chen *et al.,* 1997 ; Germi *et al.,* 2002). L'identification de co-récepteurs capables de lier la protéine d'enveloppe E a permis de présumer l'existence d'un complexe de récepteurs pour l'adhésion et l'infection des cellules par le virus de la dengue (Martinez-Barragan *et al.,* 2001).

Le rôle du sulfate d'héparan pourrait alors être de recruter et concentrer les virus à la surface cellulaire pour faciliter ensuite les interactions virus / co-récepteurs de ce complexe ayant une forte affinité spécifique avec la protéine d'enveloppe E (Germi *et al.*, 2002).

1.2.6. Vaccination contre la dengue

Il n'existe pour l'instant pas de vaccin ou de traitement disponible contre le virus de la dengue. En revanche, certains candidats vaccins sont en cours de développement (Tableau 6).

Tableau 6 : Candidats vaccins contre le virus de la dengue (2007)

Approach	Vaccine developer	DEN[a] genes or antigens	Status
Live, attenuated, produced on PDK cells[b]	Mahidol/Sanofi Pasteur	All 10 DEN genes	Phase 2 tetravalent, long-term follow-up data up to eight years
Live, attenuated, produced on FRhL cells[c]	WRAIR[d]/GSK Biologicals[e]	All 10 DEN genes	Phase 2b tetravalent
Live, rationally attenuated with 3' deletion mutation	U.S. NIAID,[f] Johns Hopkins University.	All 10 DEN genes	Phase 1–2 monovalent
Live, 3' deletion mutation, DEN/DEN chimeric	U.S. NIAID, Johns Hopkins University.	8 DEN4, 2 chimeric	Phase 1–2 monovalent
Live, rationally mutated with 3' point mutations	U.S. FDA[g]	All 10 DEN genes (currently only DEN2)	Preclinical (nonhuman primates)
Live, attenuated DENV-2 vector, DEN/DEN chimeric	InViragen/Shanta	8 DEN2, 2 chimeric	Preclinical (nonhuman primates), scheduled for human studies
Live, attenuated YF17D vector, YF[h]/DEN chimeric	Acambis, Sanofi Pasteur	8 YF genes, 2 chimeric DEN genes	Phase 1–2 tetravalent
Subunit recombinant antigen, adjuvanted	Hawaii Biotech	2 (80%E[i] and NS1[i])	Preclinical (nonhuman primates), scheduled for human studies

[a] DEN = candidate dengue vaccine virus.
[b] PDK cells = Primary dog kidney cells.
[c] FRhL cells = fetal rhesus lung cells.
[d] WRAIR = Walter Reed Army Institute of Research.
[e] GSK Biologicals = GlaxoSmithKline Biologicals.
[f] U.S. NIAID = United States National Institute of Allergy and Infectious Diseases.
[g] U.S. FDA = United States Food and Drug Administration.
[h] YF = yellow fever.
[i] 80%E = extracellular portion of the E protein.
[i] NS1 = nonstructural proteins of dengue viruses.

Différents types de vaccins ont été envisagés (Rothman *et al.,* 2004) :

- les virus vivants atténués,
- les virus inactivés,
- les clones infectieux dérivés de virus atténués,
- les vaccins à ADN (ex : Apt *et al.,* 2006),
- les vaccins par vecteurs,
- les protéines virales de dengue recombinantes exprimées par des systèmes hétérologues.

La meilleure stratégie semble être celle de la vaccination par des virus vivants atténués (Tableau 2). En effet, ce sont les plus intéressants étant donné qu'ils se multiplient par réplication dans l'hôte et présentent des antigènes similaires au virus sauvage. La réponse immune et la libération de cytokines sont alors comparables à celle engendrée par une infection naturelle.

Tableau 7. Comparaison des caractéristiques immunologiques de différents types de candidats vaccins contre le virus de la dengue (Rothman *et al.,* 2004).

	Live attenuated	Chimeric virus	Plasmid DNA	Subunit
No. of dengue antigens included	All (10)	2 (10 for viral "backbone" only)	1 to several	Usually 1
In vivo replication	Yes	Yes	No	No
Elicits T and B cell memory	Best	Best	Excellent	Fair: Th, B; Poor: CTL
Anticipated durability of immune response	Best	Best	Good	Usually poor
Protective in animal models	Yes	Yes	Yes	Yes
Status of vaccine development	Phase I/II	Phase I/II	Preclinical	Preclinical

Cependant, il existe certains problèmes associés au développement d'un vaccin contre la dengue (Chaturvedi *et al.,* 2005):

- l'absence de modèle animal capable de reproduire la maladie
- la fiabilité des données obtenues à partir de modèles animaux (Bente *et al.,* 2005),
- la nécessité de produire un vaccin tétravalent,
- le phénomène d'interférence virale entre les 4 sérotypes pour les vaccins vivants atténués,
- les insuffisances dans la compréhension de la pathogenèse des formes sévères de la maladie,
- la nécessité de doses multiples pour la vaccination,
- l'impossibilité d'évaluer directement chez l'humain la capacité du vaccin à prévenir l'apparition de fièvres hémorragiques.

1.2.7. Les vaccins chimères

Le virus utilisé pour le développement d'un candidat vaccin est dans notre cas un vaccin chimère. La stratégie des vaccins chimères est basée sur l'utilisation de vaccins vivants atténués préexistants, donc sûrs et efficaces, pour développer une réponse immunitaire contre de nouveaux antigènes, ici ceux de la dengue. Bien évidemment, il est nécessaire de se baser sur un virus de la même famille que le virus de la dengue.

Le vaccin contre le virus de la fièvre jaune, YF-Vax, un vaccin vivant atténué ayant été mis en place pour le clone 17D du virus de la fièvre jaune, est alors un bon candidat. Par ailleurs, ce clone a déjà été utilisé pour construire un vaccin chimère contre l'encéphalite japonaise (Monath *et al.,* 2002; Monath *et al.,* 2003). Ainsi, le vaccin chimère appelé ChimeriVax-DEN2, mis au point pour le sérotype 2 du virus de la dengue par Guirakhoo *et al.,* 2000), est aussi basé sur le vaccin vivant atténué YF-Vax. Cette chimère est construite à partir du génome du virus atténué de la fièvre jaune 17D où l'on a introduit les protéines E, et preM du virus de la dengue. Ces chimères ont donc été construites et validées en tant que vaccin sous leur forme monovalente puis sous une formulation tétravalente suite à la construction de ChimeriVax-DEN1, ChimeriVax-DEN3 et ChimeriVax-DEN4 (Guirakhoo *et al.,* 2004; Guirakhoo *et al.,* 2006).

Un tel vaccin vivant atténué, à l'instar du vaccin fièvre jaune 17D n'est pas apte à infecter les moustiques vecteurs par voie orale, ce qui évite sa propagation dans le milieu naturel, une bonne efficacité chez la souris et le singe en terme d'immunogénicité, et la possibilité d'une production par réplication dans la cellule VERO (Guirakhoo *et al.,* 2004; Chaturvedi *et al.,* 2005). Un autre élément important tient au fait que, dans les travaux de Guirakhoo *et al.,* 2006), suite à une pré-immunisation par le vaccin atténué de la fièvre jaune, YF-Vax, l'immunogénicité du vaccin ChimeriVax-DEN 2 a été amplifiée.

Néanmoins, il existe certaines difficultés pour le développement d'un vaccin chimère contre le virus de la dengue. Premièrement, la vaccination contre la dengue doit prendre en compte le phénomène d'ADE. Un vaccin inadéquat pourrait conduire à la production d'anticorps non neutralisants qui amplifieraient alors l'infection par le virus de la dengue sauvage (Guirakhoo *et al.,* 2006). Deuxièmement, il est nécessaire d'envisager, dans le cas de l'utilisation d'un vaccin chimère, que lors d'une co-infection (vaccination simultanée à une infection par le virus de la fièvre jaune), on assiste à une recombinaison entre les deux souches. Cette recombinaison pourrait donner lieu à l'apparition de nouveaux virus mutants. Toutefois ce point est loin d'être admis et la recombinaison chez les flavivirus n'est pas connue.

L'amplification du virus de la dengue et plus particulièrement du candidat vaccin Chimeri-Vax a déjà été réalisée sur la lignée de cellules Vero. Bien que ce candidat vaccin soit très intéressant, il n'existe pas, à ce jour, de données dans la littérature qui présente cette amplification à grande échelle lors de culture en bioréacteur. A notre connaissance, l'impact de la composition du milieu de culture ou de l'état physiologique des cellules sur la production de ce virus n'a encore jamais été étudié.

1.3. La mort cellulaire

L'étude et le contrôle de la mort cellulaire ont longtemps été mis au second plan lors de la mise en oeuvre d'un procédé de culture de cellules animales en bioréacteur. Pourtant, depuis un peu plus de 10 ans maintenant, il est admis que la mort cellulaire en système de culture agité peut parfois avoir un fort impact négatif sur les rendements et la qualité de la production. De plus, dans le cas des procédés de production virale, l'état cellulaire peut avoir un impact important au moment de l'infection virale (Ren *et al.,* 2006), il s'avère donc important d'étudier et de maîtriser l'évolution de la mort cellulaire dans les procédés de culture. Il est maintenant acquis qu'il existe deux mécanismes de mort cellulaire ; la mort par nécrose et la mort par apoptose, communément appelée suicide cellulaire. Les mécanismes et les causes de ces deux phénomènes de mort cellulaire seront précisés dans ce chapitre.

1.3.8. Les deux mécanismes de la mort cellulaire

Deux types de mort cellulaire peuvent apparaître lors d'un procédé de culture de cellules animales. Pourtant, selon la lignée cellulaire étudiée, une voie de mort cellulaire peut être privilégiée. Ainsi, les cellules d'insectes Sf-9 et les cellules CHO-K1 ont montrées une mort par nécrose majoritaire alors que les cellules CHO DUX et des cellules d'hybridomes de souris présentent une claire prédominance de mort par apoptose (Singh *et al.,* 2001).

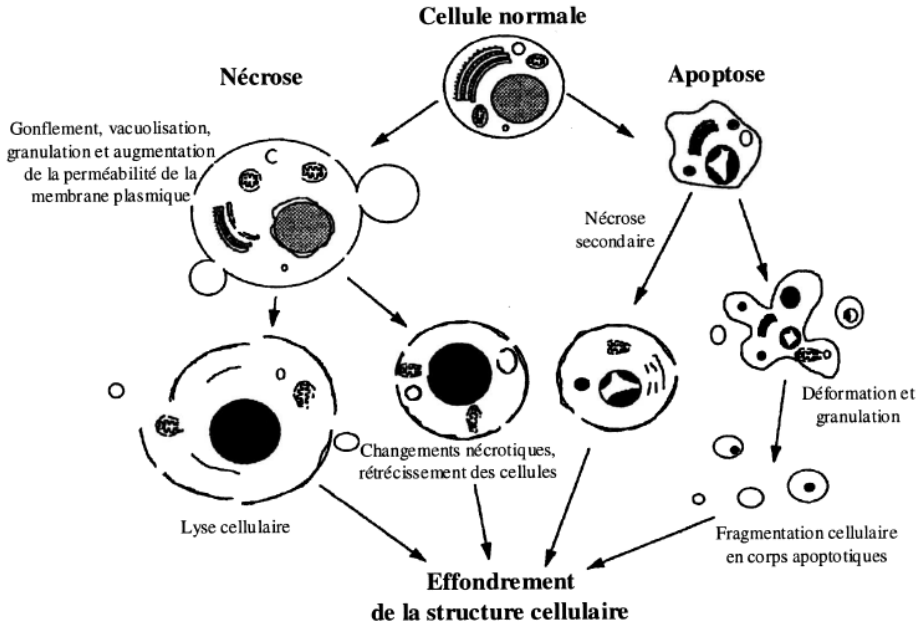


Figure 5. Changements morphologiques survenant durant la nécrose et l'apoptose (Barbouche 2008)

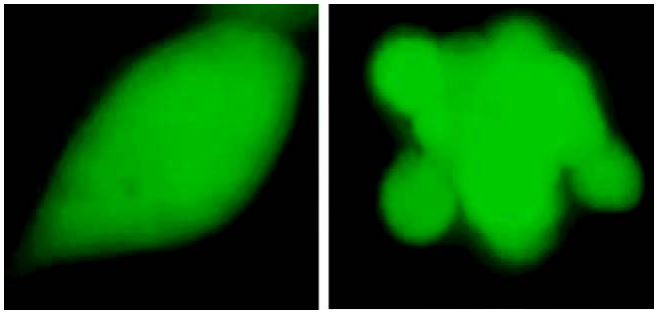
1.3.8.1 La nécrose

La nécrose est une mort cellulaire dite passive et fut la première forme de mort cellulaire à être mise en évidence. Elle est généralement induite par des conditions extrêmes et immédiates qui endommagent physiquement les cellules, et provoquent la rupture de leur membrane cytoplasmique et donc la libération de leur contenu cellulaire dans l'environnement extérieur (Figure 5). Cette dernière étape correspond à la phase de lyse cellulaire qui induit généralement une réponse inflammatoire dans les tissus. La nécrose commence typiquement par le gonflement de la cellule et de ses organelles dû à une entrée massive d'eau, suivi d'une digestion aléatoire de la chromatine. Enfin, suite à la rupture des lysosomes, la libération d'enzymes hydrolytiques contribuent à la dégradation de la membrane et des organites cellulaires.

1.3.8.2 L'apoptose

L'apoptose, au contraire, fait partie des mécanismes de régulations cellulaires en réponse à des stimuli externes non létaux. Ce mécanisme est une réponse physiologique de la cellule induisant l'activation d'une cascade d'évènements qui conduisent à la mort cellulaire en quelques heures. L'apoptose est considérée comme un mécanisme de survie cellulaire, impliqué autant dans le renouvellement de la population cellulaire, que dans des mécanismes immunitaires ou le développement embryonnaire.

Le processus d'apoptose cellulaire est contrôlé génétiquement et présente des caractéristiques morphologiques et biochimiques très spécifiques. Les premiers stades de l'apoptose sont caractérisés par une réduction du volume cellulaire dûe à la condensation du noyau et du cytoplasme (Barbouche 2008). Afin d'éviter une réponse inflammatoire dans les tissus, à la fin du processus d'apoptose, les cellules sont fragmentées en corps apoptotiques (Figure 5 et Figure 6).



Cellule viable Cellule apoptotique

Figure 6. Cellules CHO viable et apoptotique transfectées par la GFP. Apparition de corps apoptotiques. (Arden *et al.,* 2006)

Les cellules apoptotiques présentent aussi différentes modifications biochimiques. On observe par exemple, le clivage de protéines, la fragmentation de l'ADN ainsi que la perte de l'asymétrie phospholipidique de la membrane cellulaire. Ceci conduit à l'exposition de protéines sur la face externe de la membrane cellulaire en particulier les phosphatidyl-sérines (PS) généralement situées au niveau de la face cytoplasmique de la membrane (Vermes *et al.,* 1995). Cette réorganisation de la membrane cytoplasmique est un processus qui permet ensuite aux phagocytes de repérer les cellules apoptotiques avant qu'elles n'atteignent le stade de la nécrose secondaire (voir Figure 5) et donc d'éviter une réponse inflammatoire. Les modifications intracellulaires importantes observées durant l'apoptose sont principalement dues à des enzymes protéolytiques activées en cascades appelées Caspases. Le tableau 5 indique les différences morphologiques et biochimiques majeures entre la mort par nécrose et la mort par apoptose.

Il semblerait que certains mécanismes à l'origine de la mort cellulaire soient spécifiques aux cellules adhérentes. En effet, un mécanisme de mort cellulaire programmée appelé anoïkis a été identifié chez les cellules adhérentes. Ce type de mort cellulaire programmée est induit par le détachement des cellules et a notamment été étudié pour des cellules MDCK (Tsutsumi *et al.,* 2006) ou les cellules p6 issues de souris Balb/c 3T3 (Valentinis *et al.,* 1998).

Tableau 8. Principales différences entre nécrose et apoptose (Al-Rubeai *et al.*, 1998).

Nécrose	**Apoptose**
Mort anormale des cellules	Mort cellulaire programmée
Spontanée = ne nécessite pas d'énergie	Contrôlée = nécessite de l'énergie (ATP)
Bourgeonnement cellulaire	Bourgeonnement par corps apoptotiques
Fragments d'ADN de tailles aléatoires	Condensation de la chromatine puis Fragmentation de l'ADN par des endonucléases (tailles multiples)
Perte de l'intégrité membranaire	Dissolution de l'enveloppe nucléaire
Libération du contenu cellulaire	Rétrécissement de la cellule
Déclenchement d'une réaction inflammatoire	Contenu cellulaire encapsulé
Phagocytose des débris cellulaires chez les organismes multicellulaires	Phagocytose des corps apoptotiques chez les organismes multicellulaires

1.3.9. La mort cellulaire en systèmes de culture agités

1.3.9.1 Impact de l'environnement physique et mécanique

Les dommages infligés aux cellules dans les cultures en bioréacteurs sont principalement dus à l'agitation et à l'aération. Les forces hydrodynamiques engendrées par ces deux modes opératoires sur les cellules peuvent être à l'origine de leur mort par nécrose et/ou par apoptose. En effet, différents travaux démontrent que l'aération des bioréacteurs par bullage d'air ou d'oxygène pur, génère la mort cellulaire par interaction entre les cellules et les bulles de gaz, et que l'homogénéisation du milieu par agitation mécanique participe aussi à l'apparition de la mort cellulaire (Chisti 2000; Hu *et al.*, 2008). Dans le cas des cultures sur microporteurs, il est important de noter que les contraintes subies par les cellules sont plus élevées que pour les cellules en suspension du fait de l'existence de chocs entre les porteurs (Gregoriades *et al.*, 2000). Cependant, différentes stratégies ont été développées pour pallier l'effet de ce stress mécanique parmi lesquelles l'addition d'agents protecteurs dans les milieux de cultures tels que le pluronic-F68 ou le dextran (Tableau 9). Le mécanisme engendrant la protection des cultures cellulaires par ces surfactants est maintenant bien connu. En effet, ces polymères forment une couche protectrice à la surface de la membrane cellulaire induisant une baisse significative de son hydrophobicité (Tharmalingam *et al.*, 2008). On remarquera par ailleurs que la mort cellulaire est souvent accentuée dans les procédés de culture en milieux sans sérum. En effet, le sérum ajouté dans les milieux de culture, présente aussi une fonction de protection des cellules grâce à l'albumine qu'il contient (Murhammer *et al.*, 1990).

Tableau 9. Synthèse de quelques travaux réalisés sur l'impact d'additifs sur la viabilité cellulaire par rapport à différentes contraintes hydrodynamiques.

Référence	***Type cellulaire***	***Forces mécaniques appliquées***	***Additifs***
Martens *et al.*, 1992	cellules d'hybridomes Mn12	culture en réacteur air lift ou culture en bioréacteur agité	sérum
Octavio *et al.*, 1992	cellules d'hybridomes HB-32	culture en spinner	sérum
Van Der Pol *et al.*, 1995	cellules d'hybridomes PFU-83	culture en bioréacteur continu	dextran
Butler *et al.*, 1999	cellules d'hybridomes murines CC9C10	culture en spinner	acide linoléique
Palomares *et al.*, 2000	cellules d'insectes Sf-9	vitesse de cisaillement laminaire	pluronic F-68
Hellung-Larsen *et al.*, 2000	cellules de protozoaires tetrahymena	stress mécanique	pluronic F-68
Keane *et al.*, 2003	cellules CHO	microréacteur	pluronic F-68, Sérum
Sobczuk *et al.*, 2006	micro algues	cultures continues aérées	pluronic F-68
Quesney *et al.*, 2001	cellules Vero	culture discontinue en bioréacteur	sérum
Hu *et al.*, 2008	cellules CHO	intéraction bulle-cellule dans une colonne à bulle	pluronic F-68, sulfate de sodium, glucopyranoside, N-oxides, bromure d'ammonium
Tharmalingam *et al.*, 2008	cellules CHO	culture en bioréacteur	pluronic F-68
Legazpi *et al.*, 2009	cellules d'hybridomes HB-8852	contraintes induites par un rhéomètre	sérum

1.3.9.2 Impact de l'environnement biochimique

Les limitations nutritives observées durant les phases de déclin de la concentration cellulaire au cours de cultures discontinues ont été largement décrites dans la littérature comme induisant l'apoptose cellulaire. Ainsi, l'apparition d'une déplétion en glucose, substrat carboné majeur, ou en acides aminés, peut provoquer une forte mortalité par apoptose (Al-Rubeai *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 1998). De fortes concentrations de lactate peuvent aussi être à l'origine de mort cellulaire par nécrose, ainsi que cela a été montré pour les cellules d'hybridomes et de myélomes (Mercille *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1994). Par ailleurs, les cellules cultivées *in vitro* sont aussi fortement dépendantes de différentes molécules de petites tailles, telles que les facteurs de croissance ou les cytokines généralement présentes dans le sérum (Zanghi *et al.*, 1999). Ainsi, le passage à une culture sans sérum induit chez certaines cellules d'hybridomes (Sp2/0) une diminution de 90% de leur viabilité, qui peut être recouvrée grâce à l'ajout d'IL-6 dans le milieu de culture (Chung *et al.*, 1997). De la même façon, pour la mort cellulaire de cellules CHO, l'effet positif de la suramine (molécule présentant un activité anti-tumorale), a été démontré par l'augmentation de 25 % de leur viabilité (Zanghi *et al.*, 2000). On comprend donc l'intérêt d'étudier et de contrôler l'apparition de l'apoptose dans un procédé de culture en milieu sans sérum.

1.3.9.3 Stratégies de limitation de la mort par apoptose en milieu sans sérum

La compréhension et la maîtrise de la mort cellulaire dans les procédés de culture sont devenues stratégiques. Ainsi, de nombreuses études ont été réalisées pour tenter de réduire ce phénomène. Les effets physiques et mécaniques peuvent être réduits par une meilleure conception des équipements et des systèmes d'agitation, notamment dans le cas des cellules adhérées sur microsupports. Comme nous l'avons dit plus tôt l'ajout de surfactant peut permettre de limiter les contraintes subies par les cellules.

En ce qui concerne la mort par apoptose, son étude est d'autant plus importante qu'elle est considérée comme étant réversible, notamment dans ses premiers stades. Sa détection précoce peut être utile pour envisager de la stopper (Drugmand 2007). Différentes stratégies de limitation de l'apoptose ont été proposées ces dernières années, que ce soit par génie génétique afin d'inhiber la cascade de signalisation de l'apoptose, avec notamment l'étude du facteur Bcl-2 prépondérant dans l'apparition de l'apoptose (Tina *et al.,* 2003; Sauerwald *et al.,* 2006), ou par l'optimisation des milieux de cultures pour éviter les limitations nutritives (voir Tableau 10).

Tableau 10 Différentes méthodes employées pour limiter l'apoptose chez diverses lignées cellulaires (extrait de Arden *et al.,* 2004).

Cell lines	***Cell environment protection methods***	***Genetic protection methods***
NSO, CHO, HEK-293, BHK, Hybridoma		Bcl-2
CHO, HEK-293		Bcl-2 Δ mutant
CHO, BHK, Hybridoma		Bcl-xL
CHO		Bcl-xL Δ mutant
NS0		E1B-19K
Hybridoma		Bhfr-1, kblc-2
CHO, HEK-293		XIAP/XIAP mutant
CHO, HEK-293		CrmA / CrmA mutant
CHO, HEK-293		caspase inhibitors
Hybridoma		caspase inhibitors
human epidermal keratinocytes		dominant negative caspase-9
Jurkat cells		dominant negative FADD
CSM14.1 neuron cells, SF268 glioblastoma cells		humanin
CHO	transferrin and insulin-like growth factor-1 receptor	
NS0	Hsp-70	
Hybridoma	high mithochondrial membrane potential selection	
CHO	suramin	
HeLa	silkworm hemolymph	
Hybridoma	rapamycin	
Hybridoma	serum growth factors	
NS0, Hybridoma	glutamine	
Vero	galactose, glutamine	
CHO	glutamine, asparagine, glucose feeding	
CHO, Hybridoma	glycine betaine, glycine, asparagine, threonine	

En ce qui concerne l'étude de la mort des cellules Vero, les données bibliographiques sont à nouveau principalement orientées vers les productions virales. De nombreuses études ont été réalisées sur la capacité des virus à provoquer l'apoptose de cellules Vero lors d'une infection (Chan *et al.,* 2003; Ren *et al.,* 2005; Ravindra *et al.,* 2008). Cependant, les causes de l'apparition de l'apoptose préalable à l'infection virale et son influence sur le rendement de production final dans les procédés de culture de cellules Vero ont été peu étudiées, et, seuls les travaux de Mendonça *et al.* (2002) et de Quesney *et al.* (2001) traitent cette question. Ainsi, dans le cas des cellules Vero, il est possible de retarder la mort par apoptose en supplémentant la culture en glutamine et galactose (Mendonca *et al.,* 2002). Les travaux de Quesney *et al.* (2001) présentent une étude plus complète avec une comparaison des profils de mort des cellules Vero dans un milieu avec ou sans sérum. Il est alors démontré, à 5 jours de culture, que l'absence de sérum induit une augmentation du nombre de cellules apoptotiques de 6 % par rapport au milieu contenant du sérum, valeur considérée alors comme significativement suppérieure.

Pourtant, ces travaux ne concernent que la proportion de cellules Vero détachées au cours du procédé de culture, car les analyses de mort par apoptose sur les cellules adhérées n'ont pas été concluantes. Il n'existe donc pas à ce jour d'étude de la mort cellulaire des cellules Vero adhérées. L'analyse de cellules apoptotiques adhérées a pourtant été présentée récemment pour les cellules MDCK, lors de l'étude d'une infection de cette lignée par un virus de la grippe (Schulze-Horsel *et al.,* 2009).

Peu de travaux de la littérature sont dédiés à l'étude de la mort cellulaire au cours de procédés mettant en œuvre des cellules Vero adhérées sur microporteurs. Or, ce phénomène important peut influencer les rendements de production virale. De plus, il peut être accentué pendant la phase d'expansion cellulaire lors de l'utilisation de milieux sans sérum. Mieux suivre, quantifier et éventuellement détecter les mécanismes de mort cellulaire en milieu sans sérum peut donc s'avérer essentiel.

1.4. Métabolisme cellulaire

Le métabolisme cellulaire est aussi directement impliqué dans la survie cellulaire. C'est pourquoi il est important, lors de l'étude de procédés de culture de prendre en compte simultanément le métabolisme et la viabilité cellulaire comme deux aspects complémentaires, afin d'avoir une vision d'ensemble des facteurs et éléments qui influencent le procédé.

Le métabolisme cellulaire est constitué de l'anabolisme, qui comprend toutes les voies de biosynthèse nécessaires à la croissance de la cellule, et du catabolisme, qui correspond aux voies métaboliques qui pourvoient l'anabolisme en précurseurs métaboliques et en énergie. Le métabolisme énergétique de la cellule est aussi assimilé au métabolisme carboné central et comprend la glycolyse, le cycle des acides tricarboxyliques (communément appelé cycle de Krebs), la chaîne respiratoire et la glutaminolyse. Ce métabolisme carboné central est généralement affecté par i) la compartimentalisation cellulaire, ii) les mécanismes de transport, iii) les différentes voies métaboliques qui débouchent sur le métabolisme carboné central et iv) des modifications physico-chimiques des conditions de culture. Le glucose et la glutamine sont les principales sources d'énergie pour la croissance de cellules animales. En effet, il s'agit de deux substrats carbonés dont les voies métaboliques sont centrales et qui permettent d'alimenter la cellule en divers précurseurs métaboliques essentiels (Godia *et al.*, 2006).

1.4.1. Le métabolisme du glucose

Les cellules immortalisées et cultivées *in vitro* présentent la caractéristique commune d'un métabolisme du glucose très actif mais néanmoins très peu efficace. La métabolisation de ce substrat entraîne la formation d'un métabolite secondaire potentiellement inhibiteur de la croissance cellulaire, le lactate. C'est pourquoi, le transport et le métabolisme du glucose ont été largement étudiés pour la plupart des lignées cellulaires continues.

La métabolisation de ce substrat débute par son transport à l'intérieur de la cellule, étant donné que la membrane cytoplasmique, imperméable aux molécules polaires, ne permet pas l'entrée du glucose par diffusion membranaire simple. Le glucose est donc pris en charge par deux mécanismes de transport distincts (
Tableau **11**).

D'une part, un transport actif, grâce à des protéines de transport SLGT-1 et SLGT-2, qui concentrent le glucose à l'intérieur de la cellule en consommant l'énergie générée par un co-transport d'ions Na^+ (voir figure 7). Ces transporteurs sont uniquement présents sur la face apicale des cellules épithéliales intestinales ou de reins. Le second mécanisme est un transport passif facilité, ce qui signifie qu'une protéine spécifique de la famille SLC-2 est capable de changer de conformation, suite à une liaison entre un site spécifique et la molécule de glucose, afin de libérer celui-ci de l'autre côté de la membrane cellulaire (Mueckler 1994). Les hexokinases transmembranaires de la famille SLC-2 qui réalisent ce transport, présentes sous 8 isoformes dans les tissus mammifères, ne consomment pas d'énergie contrairement aux transporteurs dits actifs (Mueckler 1994; Olson *et al.*, 1996; Stuart Wood *et al.*, 2003; Wahl *et al.*, 2008).

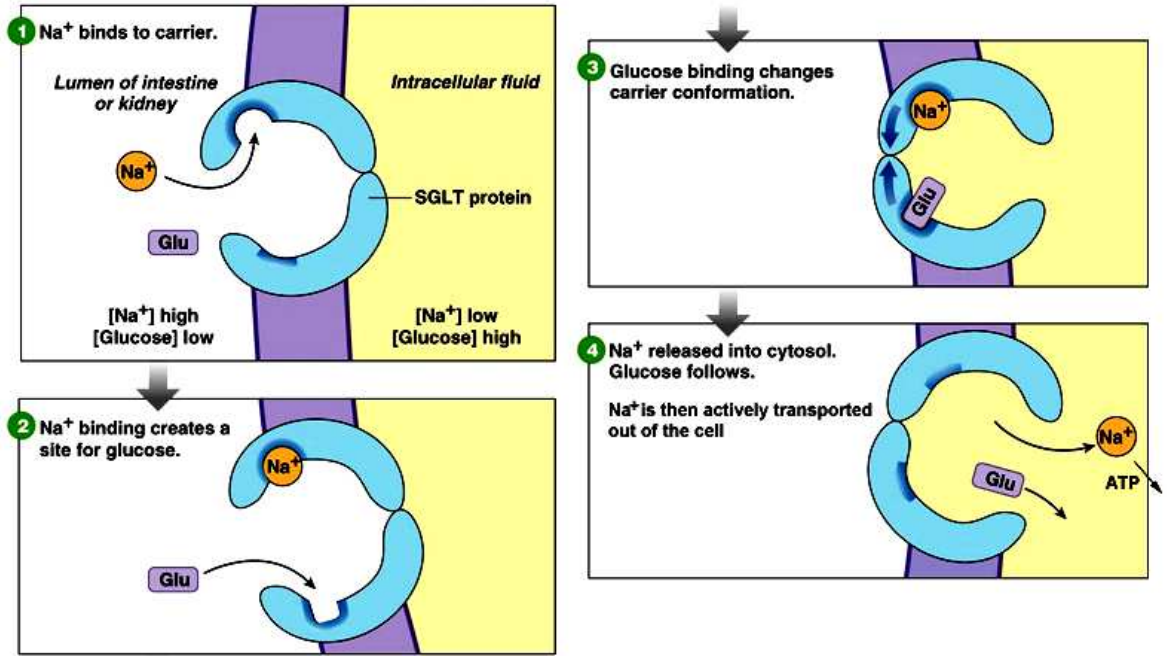


Figure 7. Transport du glucose par les protéines de transport actif de la famille SGLT

Les particularités de trois isoformes de protéines de transport passif facilité du glucose, notamment présentes chez les lignées de cellules rénales telles que les cellules Vero, sont présentées ci-dessous. Dans tous les cas, l'entrée du glucose est toujours favorisée par rapport à son export hors de la cellule (Godia *et al.*, 2006).

- **Protéine de transport Glut 1**

La principale isoforme des protéines de transport est l'isoforme Glut 1. Il s'agit de l'isoforme la plus abondante, présente dans la quasi-totalité des tissus de mammifères (Figure 8).

Glut 1 semble être à l'origine du transport constitutif du glucose. La très forte affinité de cette isoforme pour le glucose ($K_{m\ entrée}$ = 1-2 mM contre $K_{m\ sortie}$ = 10-20 mM) explique les fortes consommations de glucose observées chez les lignées continues.

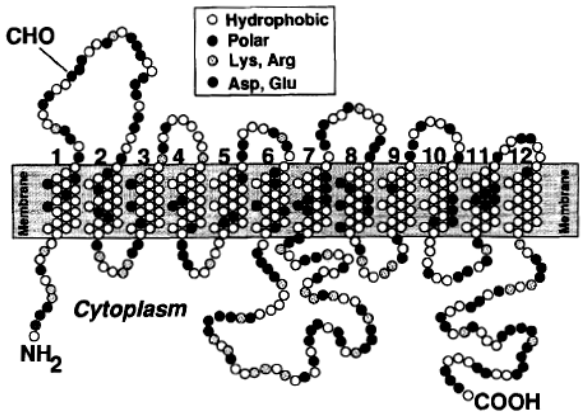


Figure 8. Topologie prédictive de la protéine transmembranaire Glut 1 (Mueckler 1994)

- **Protéine de transport Glut 2**

La protéine Glut2 est une isoforme qui est exprimée au niveau des hépatocytes, des cellules pancréatiques β et au niveau des cellules épithéliales des membranes basolatérales du rein et de l'intestin. Cette isoforme présente un fort K_m (18-21 mM) et agit en tant que système de transport non inhibé permettant un flux de glucose « illimité » vers l'intérieur ou l'extérieur de ces cellules (Mueckler 1994).

- **Protéine de transport Glut 5**

La particularité de Glut 5 tient à son affinité particulière pour le fructose (Mueckler 1994; Inukai *et al.*, 1995). Il s'agit de l'isoforme la plus éloignée structurellement de cette famille de protéines.

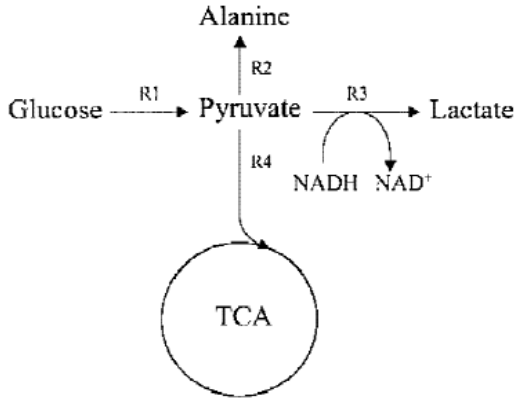
Tableau 11. Transporteurs du glucose chez les cellules de mammifères d'après Mueckler *et al.* (1994).

Name	Tissue distribution	Proposed function
Sglt1	kidney, intestine	Na^+-dependent active transport; concentration across apical epithelial membranes
Glut1	many fetal and adult tissues; abundant in human red cells, endothelia, and many immortalized cell lines	basal glucose and increased supply for growing/dividing cells; transport across blood brain barrier and other barrier tissues
Glut2	hepatocytes, pancreatic β-cells, intestine, kidney	high-capacity low-affinity transport; transepithelial transport (basolateral membrane)
Glut3	widely distributed in human tissues; restricted to brain in other species	basal transport in many human cells; uptake from cerebral fluid into brain parenchymal cells
Glut4	skeletal muscle, heart, adipocytes	rapid increase in transport in response to elevated blood insulin; important in whole-body glucose disposal
Glut5	intestine (jejunum), lesser amounts in adipose, muscle, brain, and kidney tissues	intestinal absorption of fructose and other (?) hexoses
Glut7	hepatocytes and other (?) gluconeogenic tissues	mediates flux across endoplasmic reticulum membrane

Une fois le glucose intégré dans le cytoplasme, sa métabolisation par les lignées continues de cellules animales est caractérisée par une très forte vitesse spécifique de consommation, généralement dépendante de la concentration en glucose extracellulaire. En effet, cette vitesse augmente graduellement en fonction de la concentration en glucose présente dans le milieu de culture (Godia *et al.,* 2006). La concentration minimale pour laquelle le glucose semblerait être limitant varie entre 0,5 et 1 $g.l^{-1}$ selon les lignées cellulaires (Godia *et al.,* 2006). Le glucose est principalement métabolisé par la voie de la glycolyse, mais peut aussi être partiellement métabolisé par la voie des pentoses phosphates. Il est donc majoritairement converti en ATP, NADH et pyruvate, intermédiaires intégrés ensuite dans le métabolisme énergétique de la cellule (cycle des acides tricarboxyliques, TCA).

Cependant, pour la majorité des lignées cellulaires continues, le métabolisme carboné central présente une forte dérégulation. En effet, la majorité du glucose consommé et transformé en pyruvate est métabolisée en lactate, alors que seule une faible partie est dirigée vers le cycle de Krebs, voie métabolique impliquée dans la production de l'énergie cellulaire (Neermann *et al.,* 1996; Cruz *et al.,* 1999) (Figure 9). Ce mécanisme métabolique peut être apparenté à l'effet Crabtree observé chez la levure. Il est fortement délétère pour la cellule car, d'une part, il produit une molécule potentiellement inhibitrice de la croissance, le lactate, et, d'autre part, cette voie métabolique ne produit que 2 ATP contre 36 ATP via le cycle de Krebs (Godia *et al.,* 2006).Il peut aussi être intéressant de remarquer que les concentrations présentes dans les liquides extracellulaires (sang, lymphe) sont généralement faibles (entre 0,7 et 1,1 $g.l^{-1}$ dans le sang) en comparaison de celles présentes dans les milieux de culture cellulaire (entre 2 et 4 $g.l^{-1}$). Ceci pourrait expliquer la consommation massive et rapide du glucose lors de cultures en mode discontinu.

Le métabolisme cellulaire carboné central semble être plus efficace et mieux adapté à des concentrations en glucose faibles, contrôlées par exemple par une alimentation progressive.



	High Glc (1.24 mM)	Low Glc (0.14 mM)
q_{Glc}	1.84 (100)	0.22 (100)
R1	1.27 (69)	0.19 (86)
R2	0.12 (7)	0.01 (0.5)
R3	2.37 (129)	0.06 (27)
R4	0 (0)	0.29 (132)

Values in nmol 10^{-6}cells min^{-1}

Figure 9. Flux intracellulaires au carrefour métabolique du pyruvate lors d'une culture en mode continu de cellules BHK avec une concentration faible (0,14 mM) et élevée en glucose (1,24 mM) (Cruz *et al.*, 1999). R1 représente la glycolyse ; R2 représente le flux de production d'alanine via une transaminase ; R3 représente le flux de production de lactate via la *lactate déshydrogénase (LDH)* et R4, le flux d'entrée dans le cycle de Krebs via l'acétyl coenzyme A. La vitesse spécifique de consommation du glucose, qGlc, est prise comme référence (100%).

La production massive de lactate peut être expliquée par différents phénomènes. Dans un premier temps, la nécessité de rééquilibrer le potentiel redox NAD^+/NADH des cellules. En effet, le NAD^+ est un élément important au bon fonctionnement de la glycolyse et sa régénération a généralement lieu au niveau de la chaîne respiratoire dans la mitochondrie (Sanfeliu *et al.*, 1997) (Figure 8). Cependant, la membrane mitochondriale étant peu perméable à la diffusion du NADH, celui-ci est transporté par des voies anaplérotiques telles que le système malate - aspartate ou malate - citrate (Godia *et al.*, 2006). Une saturation de ces voies peut donc engendrer une forte accumulation de NADH dans le cytoplasme. C'est pourquoi le NAD^+ est régénéré par la LDH (*lactate déshydrogénase)* de façon concomitante à la production de lactate (Figure 7).

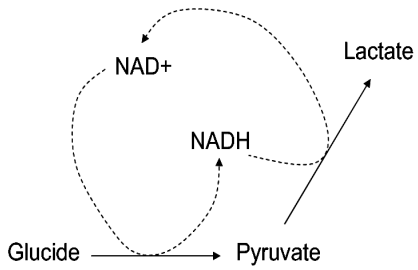


Figure 10. Régénération du NAD^+ par la production de lactate

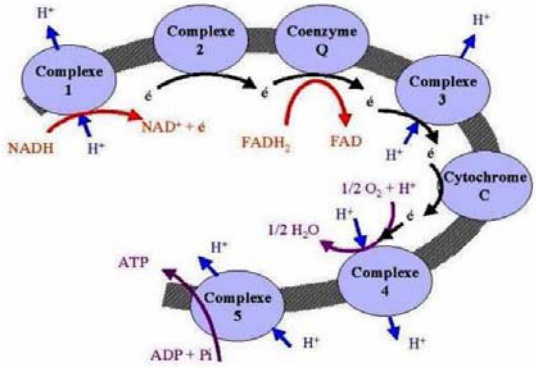


Figure 11. Chaîne respiratoire

D'autre part, les enzymes d'entrée dans le cycle de Krebs, la p*yruvate déshydrogénase (PDH)*, la p*hosphoénol pyruvate carbokinase (PEPCK) et* la *pyruvate carboxylase (PC*), peuvent aussi présenter des déficiences (pas ou peu d'activité dans certaines lignées). Ceci peut être accentué par le fait qu'une compétition directe s'établit entre la *pyruvate déshydrogénas*e, enzyme d'entrée dans le cycle TCA et la *lactate déshydrogénase (LDH)* (Neermann *et al.*, 1996; Benslimane *et al.*, 2005). Ainsi les travaux de Neermann et al., (1996) ont démontré que pour un certain nombre de lignées cellulaires, que ce soit des lignées primaires ou continues telles que les cellules BHK et CHO, les enzymes d'entrée dans le cycle de Krebs sont très peu présentes voire absentes (Figure 12 et Tableau 12).

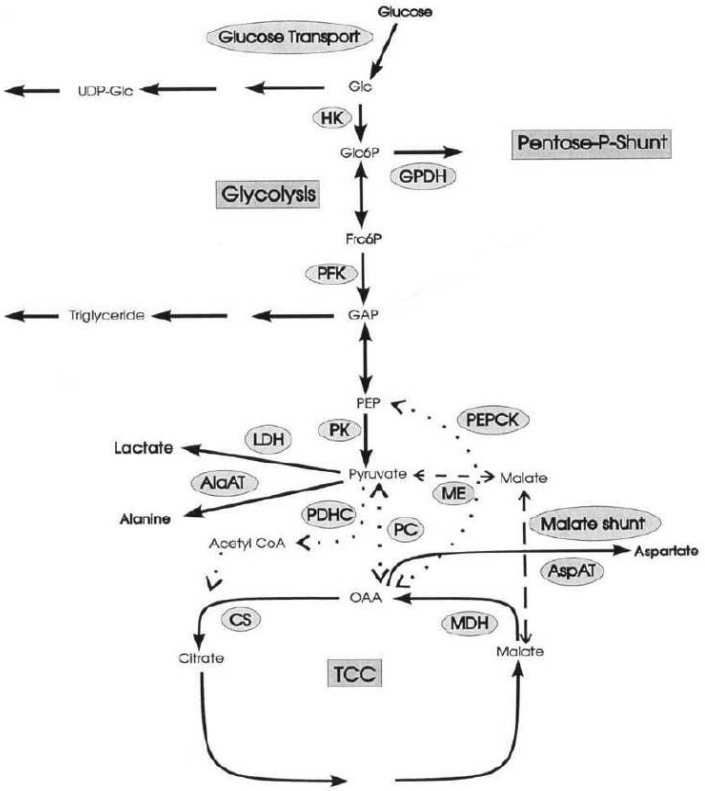


Figure 12. Schéma métabolique proposé par Neermann et al., 1996 pour différentes lignées cellulaires

Hexokinase HK,

Glucose 6 phosphate deshydrogenase GPDH,

Phosphofructokinase PKF,

Pyruvate kinase PK,

Lactate déshydrogénase LDH,

Phosphoenol Pyruvate carbokinase PEPCK,

Pyruvate carboxylase PC,

Complexe pyruvate deshydrogenase PDHC,

Malate déshydrogénase MDH,

Citrate synthase CS,

Malate enzyme ME,

Tableau 12. Activité enzymatique spécifique des enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose pour quelques lignées cellulaires (nmol.s^{-1}. 10^{-6} cell) (Neermann et al., 1996), n.d. correspondant à non détectée.

Cells/enzymes	HK	GPDH	PKF	PK	LDH	PEPCK	PC	PDHC
BHK-21 c13, 2.5% FCS	0.24	0.31	0.81	12.80	19.33	n.d.	n.d.	n.d.
BHK-21 c13, serum-free	0.30	0.45	1.05	22.10	26.20	n.d.	n.d.	n.d.
BHK-21 BN49/90HK-1, 2.5% FCS	0.22	0.25	0.76	14.60	16.80	n.d.	n.d.	n.d.
BHK-21 BN49/90HK-1, serum-free	0.24	0.26	0.82	20.50	22.40	n.d.	n.d.	n.d.
BHK-21 pSVIL2, serum-free	0.31	0.43	1.13	15.10	10.20	—	—	—
BHK BN49/90HK-1, 2.5% FCS chemostate culture, steady state	0.19	0.17	0.45	13.50	13.80	n.d.	n.d.	n.d.
CHO-K1 pMDIIIGPTR, 2.5% FCS	0.22	0.29	0.88	23.30	16.30	—	—	—
CHO-K1 pMDIIIGPTR, serum-free	0.30	0.42	1.24	24.70	17.50	n.d.	n.d.	n.d.
CHO-K1 pMDIIIGPTR, protein-free	0.25	0.27	0.69	15.00	10.60	—	—	—
Hybridoma 187.1, 3% FCS	0.13	0.14	0.61	8.80	10.40	n.d.	n.d.	—
Hybridoma MAX16H5, serum-free	0.12	0.12	0.49	9.20	10.30	—	—	—
Insect Sf-21, serum-free	0.43	0.45	1.23	4.26	5.57	0.10	0.55	act.
Insect Sf-9, serum-free	0.45	0.55	1.42	2.44	4.90	0.11	0.65	act.
Primary WI-38, 5% FCS	0.13	0.23	0.58	13.7	20.60	—	—	—

Il peut aussi être intéressant de constater que les lignées cellulaires continues présentent des caractères communs avec les cellules cancéreuses, notamment au niveau de leur métabolisme glycolytique qui est fortement dérégulé (Shaw 2006; Gillies *et al.,* 2007; Nijsten *et al.,* 2009). Le facteur HIF-1, exprimé dans les cellules cancéreuses, semble être à l'origine de cette dérégulation. Les enzymes de la glycolyse et les protéines de transport du glucose sont sensiblement surexprimées sous l'influence de ce facteur, alors que l'activité de la *pyruvate déshydrogénase*, point d'entrée du cycle de Krebs, est inhibée par HIF-1 (Figure 13).

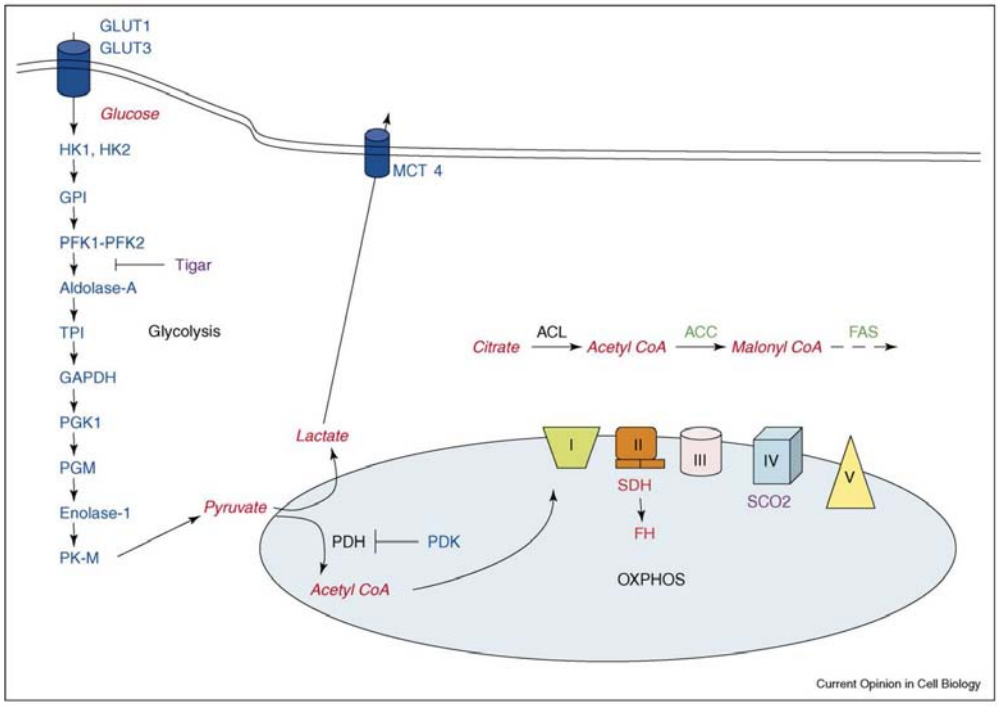


Figure 13. Dérégulation du métabolisme du glucose chez les cellules cancéreuses. Les cibles de HIF-1α sont en bleu et celles de SREBP-1 sont en vert et sont surexprimées dans les tumeurs. Les cibles de p53 sont en violet et sont sous-exprimées dans les tumeurs. HIF active l'expression des enzymes impliquées dans la consommation du glucose et sa conversion en pyruvate, puis en lactate, alors qu'il diminue la phosphorylation oxidative (Shaw, 2006).

L'oxygénation joue aussi un rôle majeur dans la formation de lactate. En effet, lorsque la disponibilité en oxygène n'est pas assez importante, la chaîne respiratoire n'est plus en mesure de réaliser l'oxydation du NADH en NAD^+, et de la même manière que précédemment, la glycolyse n'est plus alimentée en cofacteur. Le métabolisme de la glutamine peut aussi être impliqué dans la saturation du métabolisme carboné central et interférer fortement avec le métabolisme du glucose, notamment au niveau de l'entrée des flux dans le cycle de Krebs. Il peut provoquer une saturation de la chaîne respiratoire par le NADH qu'il génère dans la mitochondrie, ainsi que perturber les flux de malate, qui participe à la voie anaplérotique malate - aspartate. Ceci est discuté dans la partie suivante concernant le métabolisme de la glutamine.

1.4.2. Métabolisme de la glutamine

Depuis maintenant près de 40 ans, la glutamine a été décrite comme étant le second substrat majeur avec le glucose pour les cellules animales (Reitzer *et al.*, 1979). Ce substrat a été largement étudié ces dernières années, compte tenu de son rôle prépondérant dans le métabolisme carboné central des cellules (Christie *et al.*, 1994; Sanfeliu *et al.*, 1997; Vriezen *et al.*, 1997; Paredes *et al.*, 1999; Nadeau *et al.*, 2000; Genzel *et al.*, 2005; Fuchs *et al.*, 2006; Trabelsi *et al.*, 2006).

La glutamine ne possède pas de système de transport qui lui soit spécifique et emprunte généralement les systèmes de transport des autres acides aminés (Hyde *et al.*, 2003). Son métabolisme, la glutaminolyse, approvisionne la cellule en glutamate et aspartate, deux précurseurs indispensables, dont la vitesse de transport à l'intérieur de la cellule serait limitante pour le métabolisme cellulaire. La glutamine et le glutamate sont aussi des précurseurs importants pour la synthèse de bases azotées (purine, pyridine) et de différents autres acides aminés (proline, ornithine…).

Le second rôle majeur de la glutamine est son implication dans l'approvisionnement du cycle TCA et donc dans le métabolisme énergétique de la cellule. Via la synthèse de glutamate par désamination (formation d'une molécule de NH_4^+), la glutamine entre dans le cycle TCA au niveau de l'α-cétoglutarate (αKG). Il existe alors trois voies pour la formation d'α–KG à partir du glutamate :

- une désamination par la *glutamate déshydrogénase, GDH (1)*,
- une transamination par *l'alanine amino transaminase, Ala TA (2)*
- ou une transamination par l' *aspartate amino transférase, Asp TA (3)*.

Ces réactions sont décrites dans la figure 14. Qu'elles aboutissent à la formation d'alanine (voie 2) ou à celle d'aspartate (voie 3), les réactions de transamination sont généralement utilisées par la cellule pour limiter la génération d'ions ammonium ($NH4^+$) co-produits lors des réactions de désamination du glutamate (Sharfstein *et al.*, 1994). Ces réactions de transamination peuvent avoir lieu indifféremment dans la mitochondrie ou dans le cytosol (Godia *et al.*, 2006; Wahl *et al.*, 2008).

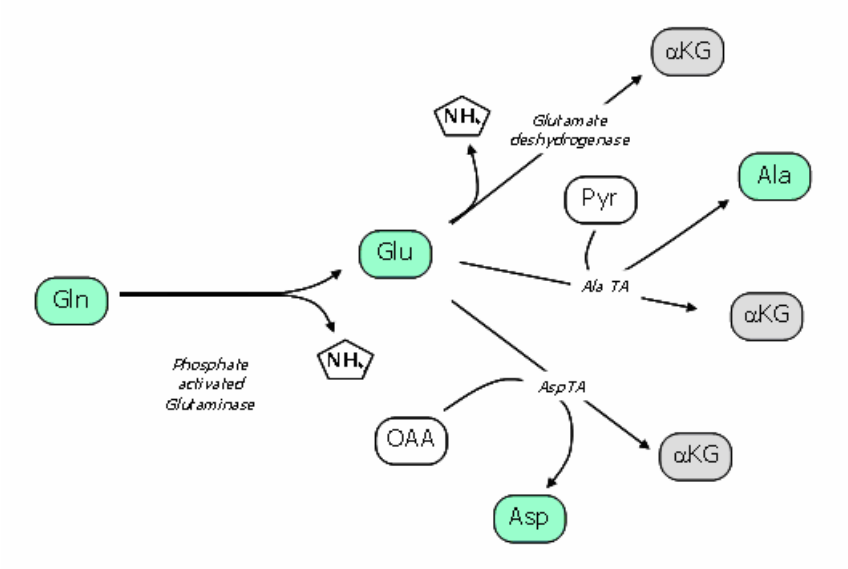


Figure 14. Métabolisme de la glutamine (Glutaminolyse)

La glutamine joue également un rôle important dans la formation de l'oxaloacétate (OAA) et dans l'entretien du cycle TCA. En effet, celui-ci est directement alimenté par la glycolyse grâce à l'entrée d'acétyl-coA (AcCoA), dérivé du pyruvate (Pyr) mitochondrial. Cependant, pour la majorité des lignées cellulaires cultivées en présence d'excès de glucose, l'approvisionnement du cycle TCA en AcCoA est faible. D'autre part, il semblerait que la majeure partie du flux de carbone, une fois entrée dans le cycle, soit exportée hors de la mitochondrie pour la synthèse lipidique *via* le transit du citrate (Mancuso *et al.,* 1994; Sharfstein *et al.,* 1994)(Figure 15). Il est donc nécessaire de disposer d'un apport de carbone supplémentaire au niveau de l'α–KG, *via* la glutamine, pour produire les différents intermédiaires du cycle TCA qui jouent aussi un rôle dans l'anabolisme cellulaire ; par exemple l'oxaloacétate (OAA), le malate ou le citrate.

Par ailleurs, il existe des voies anaplérotiques au niveau du malate qui permettent d'évacuer les intermédiaires en surplus pour ne pas encombrer le cycle de Krebs (Figure 15). Ainsi, le malate peut être transformé en pyruvate par trois mécanismes différents (Sharfstein *et al.,* 1994; Godia *et al.,* 2006; Wahl *et al.,* 2008) :

- A l'intérieur de la mitochondrie, par l'enzyme malique avec production de CO_2 (voie d'oxydation du substrat qui fournit le plus d'énergie avec 27 ATP par molécule de glutamine consommée).
- Après la sortie du malate hors de la mitochondrie par la protéine de transport malate citrate :
  - par l'enzyme malique (*ME*), aussi présente dans le cytosol.
  - par la synthèse d'OAA par la *malate déshydrogénase (MDH)*, transformé ensuite en phosphoénol pyruvate (PEP) par la *phosphoénol pyruvate carbokinase (PEPCK)*. Le PEP qui réintègre ensuite la glycolyse pour la formation de pyruvate.

Ainsi, la métabolisation de la glutamine met en jeu un grand nombre de voies métaboliques qui, par ailleurs, se partagent souvent différents intermédiaires. Ces voies métaboliques sont à la fois mitochondriales et cytosoliques, peuvent s'entrecroiser et emprunter diverses voies enzymatiques. La glutaminolyse est donc très complexe mais surtout très flexible pouvant ainsi s'adapter à des conditions de culture spécifiques (Godia *et al.*, 2006).

Néanmoins, dans le cas de la plupart des lignées cellulaires continues, la glutaminolyse présente aussi une forte dérégulation. En effet, de la même façon que pour le glucose, la glutamine est généralement consommée très rapidement. Ce phénomène est à nouveau lié aux concentrations en glutamine souvent en excès dans les milieux de culture « classiques » par rapport aux besoins cellulaires.

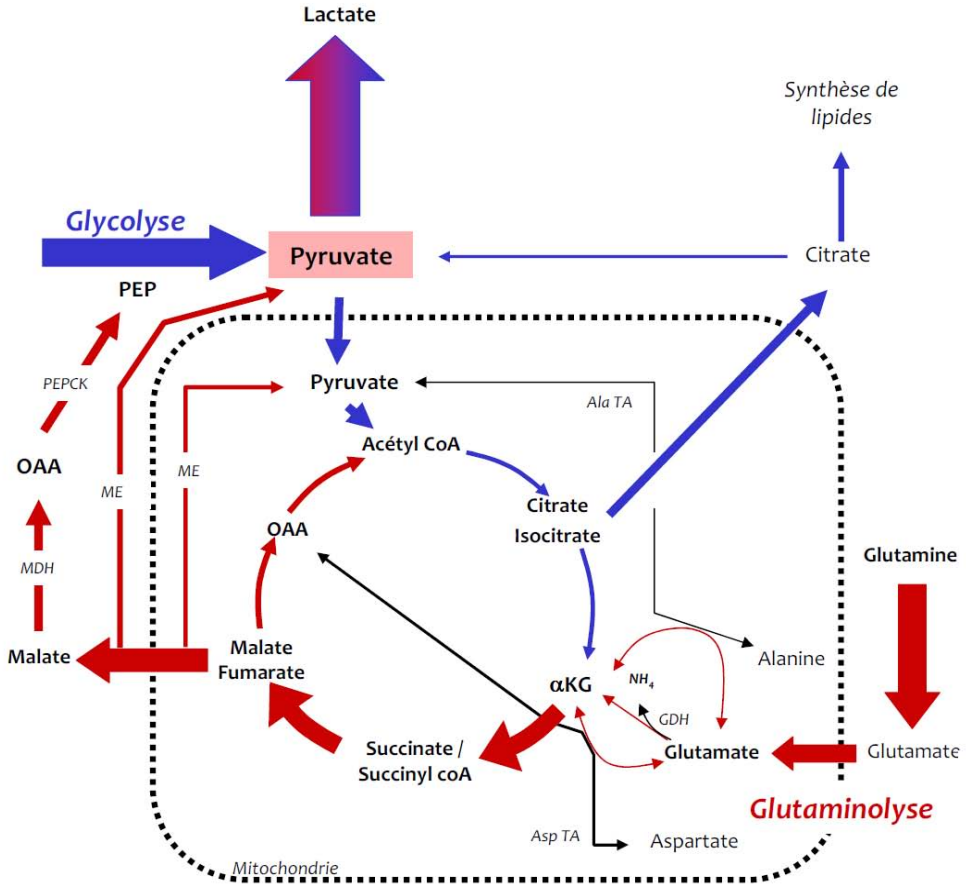


Figure 15. Interdépendance du métabolisme du glucose et de la glutamine. *ME* correspond à *l'enzyme malique*, *PEPCK* à la *phosphoénol pyruvate carbokinase*, *MDH* à la *malate déshydrogénase*, *GDH* à la *glutamate déshydrogénase*, *Ala TA* à l'*alanine transaminase et Asp TA* à l'*aspartate transaminase.* Les intermédiaires PEP et OAA correspondent respectivement au phosphoénol pyruvate et à l'oxaloacétate.

En effet, différent travaux démontrent que lorsque la concentration en glutamine dans les milieux de culture est réduite, sa vitesse spécifique de consommation diminue sans influencer la croissance cellulaire (Mancuso *et al.*, 1994; Sharfstein *et al.*, 1994; Sanfeliu *et al.*, 1997; Vriezen *et al.*, 1997).

Ainsi, pour des cellules d'hybridomes et de myélomes cultivées en système continu, alors que la croissance cellulaire stagne, la consommation spécifique de glutamine a quasiment doublé en présence d'un excès de ce substrat (4 mM) par rapport à une culture en conditions limitantes (0,5 mM de glutamine) (Tableau 13 : Vriezen *et al.*, 1997). Cette dérégulation est généralement accompagnée par l'accumulation importante d'ions ammonium dans le milieu de culture (2 moles d'ions ammonium pour une mole de glutamine consommée).

Tableau 13. Vitesse spécifique de consommation de glutamine (*exprimées en mmol.h^{-1}.10^{-9}cell*) pour les lignées murines d'hybridomes MN12 et de myélomes Sp2/0 en culture en mode continu avec différentes concentrations d'alimentation en glutamine (*exprimées en mM*) (Vriezen *et al.*, 1997). Les cadres correspondant aux vitesses spécifiques de consommations en présence de 4 mM (en bleue) ou 0,5 mM (en rouge) de glutamine.

Cell line	Gln in feed	q_{gln}
MN12	4.03 ± 0.50	−36.5 ± 2.3
	1.88 ± 0.23	−22.3 ± 1.9
	1.00 ± 0.13	−27.6 ± 2.0
	0.50 ± 0.08	−19.7 ± 1.3
SP2/0	4.57 ± 0.60	−36.9 ± 1.0
	2.29 ± 0.29	−20.9 ± 1.0
	0.98 ± 0.12	−19.4 ± 1.7
	0.60 ± 0.08	−21.6 ± 1.4

1.4.3. Métabolisme des acides aminés

Les acides aminés sont aussi une source indispensable à la survie cellulaire, notamment les acides aminés essentiels qui ne peuvent pas être synthétisés par les cellules. Ces acides aminés essentiels sont l'arginine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et la valine. Plusieurs études ont ainsi mis en évidence qu'une déplétion en certains acides aminés déclenche la mort cellulaire (Franěk *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2005). Une synthèse des fonctions attribuées aux acides aminés est présentée dans le tableau 14.

Tableau 14 : Synthèse des fonctions attribuées aux acides aminés (Franěk *et al.*, 1997).

Category																			Reference
Apoptosis-preventing set	Gly	Ala	Ser	Thr	Pro	Asn	Gln	His											This paper
Essential amino acids				Thr			Gln	His	Arg	Lys	Cys	Ile	Leu	Val	Met	Tyr	Phe	Trp	Eagle, 1959
Induction of DNA synthesis							Gln					Ile							Ley and Tobey, 1970
Survival at low density			Ser			Asn	Gln				Cys								Eagle and Piez, 1962
Transport systems:																			
A	Gly	Ala	Ser	Thr	Pro	Asn								Val	Met				Kilberg, 1986
ASC		Ala	Ser								Cys								Christensen *et al.*, 1967
SATT		Ala	Ser	Thr															Shafqat *et al.*, 1993
N						Asn	Gln	His											Kilberg *et al.*, 1980
L												Ile	Leu	Val	Met	Tyr	Phe	Trp	Shotwell *et al.*, 1982

Amino acids identical with the apoptosis-preventing set are underlined.

Il est maintenant établi que le transport des acides aminés est réalisé par des transporteurs actifs généralement avec co-transport d'ions sodium Na+ (Tableau 15). Il faut aussi noter que le transport des acides aminés nécessite, par la suite, un transit important vers l'extérieur de la cellule des ions sodium Na+ accumulés (Hyde et al., 2003; Wahl et al., 2008). Les systèmes de transport identifiés sont généralement spécifiques de certains acides aminés.

Tableau 15. Systèmes de transports spécifiques de chaque acide aminé (Hyde *et al.*, 2003)

(ai) Neutral-amino-acid transporters: sodium-dependent

System	Protein	Gene	Amino acid substrates (one-letter code)	Notes
A	SAT1 SAT2 SAT3	SLC38A1 SLC38A2 SLC38A4	G, A, S, C, Q, N, H, M, T, Me-AIB, P, Y, V G, P, A, S, C, Q, N, H, M, Me-AIB G, P, A, S, C, N, M, H, K, R	Short-chained-neutral-amino-acid transport. Sensitive to low pH. Ubiquitous expression. SAT3 may also function as a Na^+-independent cationic amino acid transporter.
ASC	ASCT1 ASCT2	SLC1A4 SLC1A5	A, S, C A, S, C, T, Q	High-affinity short-chain-amino-acid exchanger. Ubiquitous expression.
B^0	ASCT2	SLC1A5	A, S, C, T, Q, F, W, Y	Broad substrate specificity. Expressed on apical surface of many epithelia. May include novel isoforms of ASCT2 (e.g. a novel gene recently characterized by Pollard et al. [216]).
BETA	GAT1 GAT2 GAT3 BGT1 TAUT	SLC6A1 SLC6A13 SLC6A11 SLC6A12 SLC6A6	GABA GABA, betaine, P, β-A GABA, betaine, taurine GABA, betaine Taurine	Widely expressed Cl^--dependent GABA, betaine and taurine transporters.
Gly	GLYT1 GLYT2	SLC6A9 SLC6A5	G, sarcosine G, sarcosine	Na^+- and Cl^--dependent high-affinity glycine transport. Expressed in brain and some non-neural tissues.
IMINO	–	–	P	Na^+-dependent epithelial proline transporter, inhibited by Me-AIB.
N	SN1 SN2	SLC38A3 SLC38A5	Q, N, H Q, N, H, S, G	Li^+-tolerant transport of Gln, Asn and His. H^+ antiport. Li^+-intolerant variants described
N^m	–	–	Q, N, H	
N^b	–	–	Q, N, H	
PHE	–	–	F, M	Brush-border transporter for Phe and Met
PROT	PROT	SLC6A7	P	Proline transporter in central nervous system.

Tableau 15. (suite)

(aii) Neutral-amino-acid transporters: sodium-independent

System	Protein	Gene	Amino acid substrates	Notes
asc*	Asc1 Asc2	SLC7A10	G, A, S, C, T G, A, S, T	Small neutral AA exchanger.
imino	PAT1/LYAAT1 PAT2/LYAAT2	SLC36A1 SLC36A2	P, G, A, β-A, GABA Me-AIB P, G, A, β-A, GABA Me-AIB	H^+-coupled transport of small neutral amino acids. Inhibited by Me-AIB.
L*	LAT1 LAT2	SLC7A5 SLC7A8	H, M, L, I, V, F, Y, W, Q A, S, C, T, N, Q, H, M, L, I, V, F, Y, W	Ubiquitously expressed exchanger for large hydrophobic amino acids.
T	TAT1	SLC16A10	F, Y, W	Aromatic-amino-acid transporter. H^+/monocarboxylate transporter family – insensitive to pH, however.

(bi) Anionic-amino-acid transporters: sodium-independent

System	Protein	Gene	Amino acid substrates	Notes
X^-_{AG}	EAAT1 EAAT2 EAAT3 EAAT4 EAAT5	SLC1A3 SLC1A2 SLC1A1 SLC1A6 SLC1A7	E, D E, D E, D, C E, D E, D	Widespread Glu and Asp transporter. K^+ antiport. Substrate-dependent uncoupled anion flux. Lack of stereospecificity toward Asp.

(bii) Anionic-amino-acid transporters: sodium-independent

System	Protein	Gene	Amino acid substrates	Notes
x^{-c*}	xCT	SLC7A11	E, Ci	Electroneutral Glu/cystine exchanger.
–	XAT2	–	D, E	Non-functional upon 4F2hc/rbAT heavy-chain co-expression. Predicted to associate with a novel glycoprotein.

(ci) Cationic-amino-acid transporters: sodium-dependent

System	Protein	Gene	Amino acid substrates	Notes
$B^{0,+}$	ATB(0,+)	SLC6A14	K, R, A, S, C, T, N, Q, H, M, I, L, V, F, Y, W	Blastocysts and possibly brush-border membrane. Broad specificity for neutral and cationic amino acids. Accepts BCH.
y^+L^*	y + LAT1 y + LAT2	SLC7A7 SLC7A6	K, R, Q, H, M, L K, R, Q, H, M, L, A, C	Na^+-dependent cationic/neutral-amino-acid exchanger. Electroneutral.

(cii) Cationic-amino-acid transporters: sodium-independent

System	Protein	Gene	Amino acid substrates	Notes
$b^{0,+**}$	b(0,+)AT	SLC7A9	K, R, A, S, C, T, N, Q, H, M, I, L, V, F, Y, W, Ci	Broad-specificity cationic- and neutral-amino-acid exchanger.
y^+	Cat-1 Cat-2 Cat-3 Cat-4	SLC7A1 SLC7A2 SLC7A3 SLC7A4	R, K, H R, K, H R, K Unknown	Cationic-amino-acid (and Na^+-dependent neutral-amino-acid) transport. Variable degree of *trans*-stimulation.

Outre leur participation à l'anabolisme cellulaire *via* la synthèse protéique, les 20 acides aminés sont aussi actifs dans le métabolisme énergétique de la cellule. En effet, on notera tout d'abord que le catabolisme des acides aminés aboutit à un nombre restreint de molécules qui participent, directement ou indirectement, au cycle des acides tricarboxyliques (Figure 16).

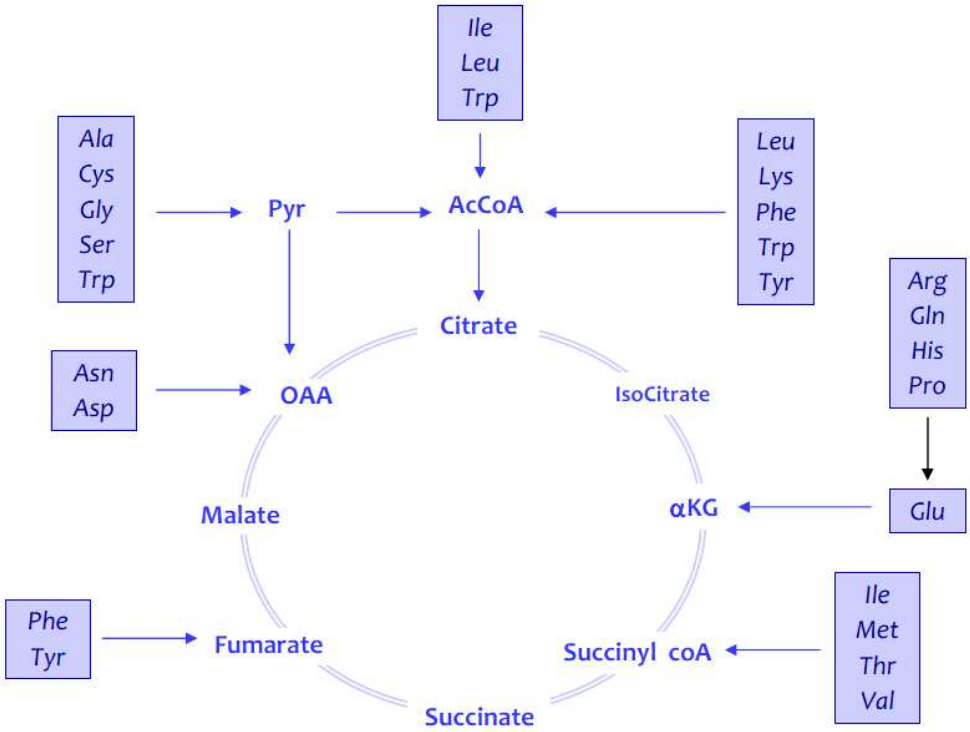


Figure 16. Métabolisme des acides aminés (Godia *et al.*, 2006)

On peut ensuite remarquer que la majorité des acides aminés ont un métabolisme relié à l'α–KG et au glutamate et que ces réactions sont réversibles, ce qui explique la grande flexibilité de leur métabolisme (Figure 17 : Wahl *et al.*, 2008). Ainsi, lorsque le glutamate et l'α-KG intracellulaires se trouvent être en excès, la synthèse d'acides aminés, comme par exemple l'alanine ou l'aspartate, permet d'éviter une saturation du métabolisme carboné central (Godia *et al.*, 2006).

Pourtant, les acides aminés sont préférentiellement consommés pour participer aux réactions de biosynthèse.

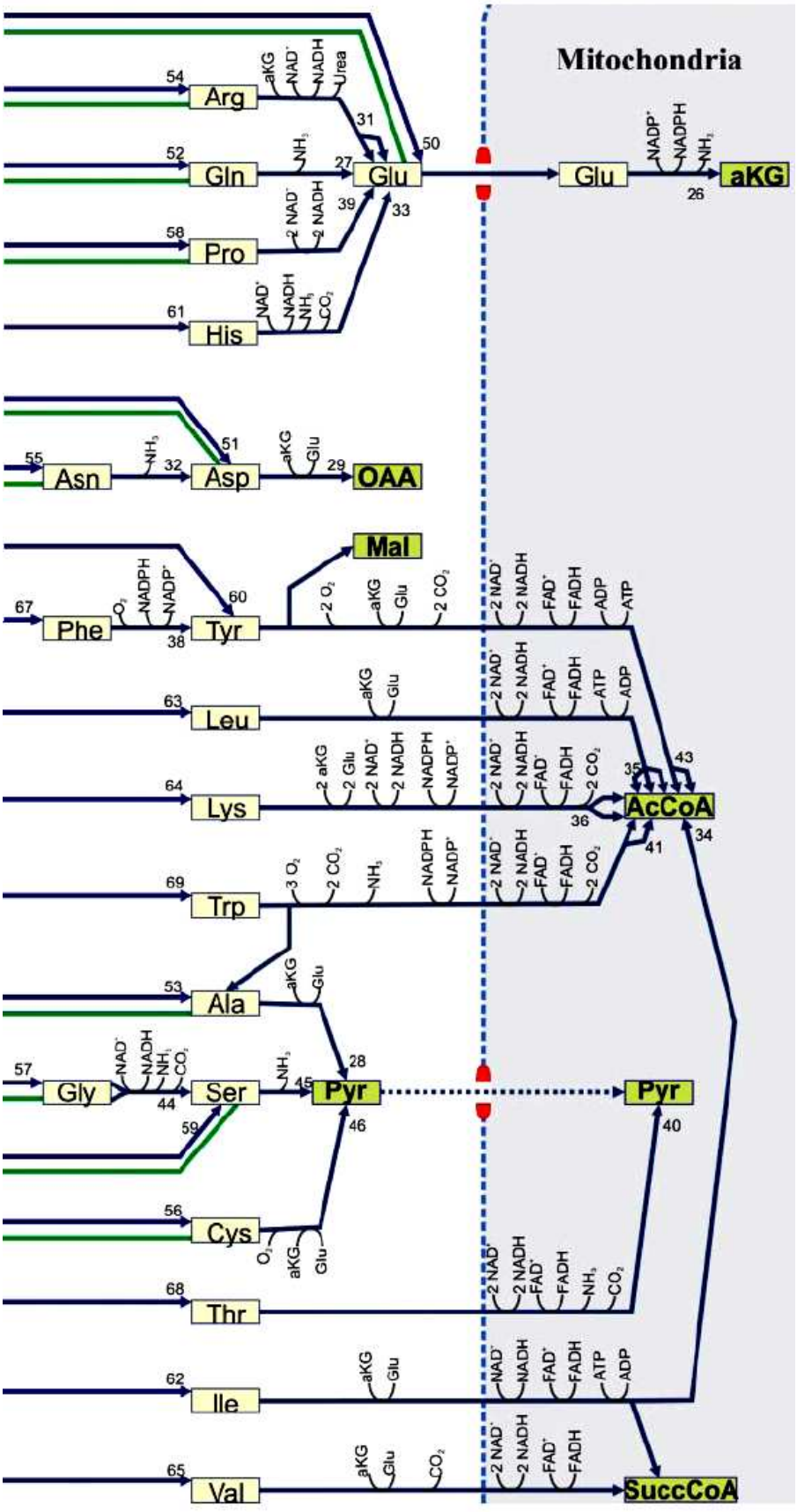


Figure 17. Métabolisme des acides aminés chez la cellule MDCK (Wahl *et al.*, 2008).

1.4.4. Production de lactate et d'ions ammonium

1.4.4.1 Le lactate

Comme nous l'avons vu précédemment, le lactate est un co-produit du métabolisme du glucose, néfaste pour la croissance cellulaire. Il est produit lors d'une saturation et d'un dysfonctionnement du métabolisme carboné central car il permet de régénérer une partie des co-facteurs NAD^+ nécessaires au fonctionnement de la glycolyse. Par ailleurs, la production de lactate dans les cultures cellulaires en bioréacteur nécessite une régulation du pH pour éviter une acidification du milieu de culture qui serait défavorable pour la croissance. Le deuxième effet direct de l'accumulation de lactate dans les milieux de culture est l'augmentation de l'osmolarité du milieu de culture (Ozturk *et al.,* 1992). Dans la littérature, la concentration limite décrite comme délétère pour les cellules est de 20 mM (Hassell *et al.,* 1991; Wentz *et al.,* 1992).

Dans certains cas, la consommation du lactate en fin de culture, est aussi une des particularités du métabolisme de ce co-produit et dépend de la concentration et de la nature du glucide présent dans le milieu de culture (Figure 18 : Altamirano *et al.,* 2006). Il semblerait que ce comportement soit aussi associé à des caractéristiques de cellules cancéreuses (Nijsten *et al.,* 2009). Une étude métabolique concernant des clones de cellules CHO résistantes à l'apoptose à différents niveaux, a aussi montré un profil particulier de consommation du lactate dès les premiers jours de la croissance. Ceci démontre une interconnexion possible entre les mécanismes de l'apoptose et le métabolisme cellulaire (Dorai *et al.,* 2009).

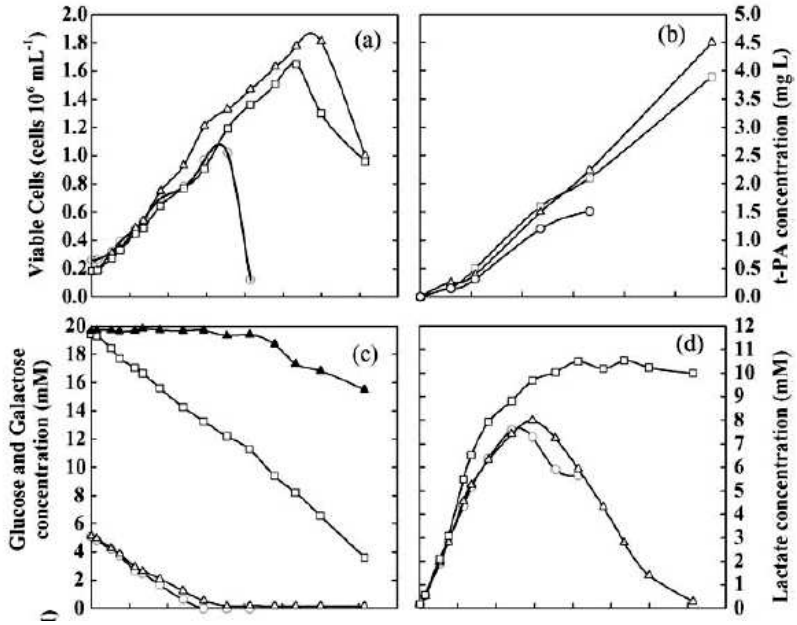


Figure 18. Culture discontinue de cellules CHO à partir de glutamate (6 mM) et de différentes concentrations de glucide : 20mM de glucose (□), 5 mM de glucose (○), 5 mM de glucose (Δ) additionné à 20 mM de galactose (▲). Sont présentées les concentrations de cellules viables (a); de t-PA (b); de glucose et de galactose (c) et de lactate (d) (Altamirano *et al.,* 2006).

1.4.4.2 Les ions ammonium

Les ions ammonium sont des métabolites secondaires issus principalement de la métabolisation de la glutamine. Une partie des ions ammonium accumulés dans le milieu de culture provient de la dégradation spontanée à la chaleur de la glutamine en acide pyrrolidone carboxylique (Genzel *et al.,* 2005). Beaucoup de travaux rapportent leurs effets inhibiteurs sur les cultures de cellules animales à différents niveaux. Des concentrations aussi faibles que 2 à 3 mM peuvent être fortement inhibitrices pour la croissance de la plupart des cellules animales, telles que les cellules MDCK, McCoy, HeLa, BHK (Hassell *et al.,* 1991; Schneider *et al.,* 1996), et plus faiblement inhibitrices dans le cas des cellules Vero, CHO et HEK 293 (Hassell *et al.,* 1991; Xing *et al.,* 2008). Une hypothèse pour expliquer l'inhibition de la croissance cellulaire par les ions ammonium, pourrait être les variations de pH intracellulaire et extracellulaire induites. L'équilibre entre les formes NH_3/NH_4^+ dans le milieu de culture et le transport du NH_3 par diffusion au travers des membranes cellulaires et des organelles peuvent expliquer ces variations de pH. Cette hypothèse est aussi acceptable dans le cas où le pH des milieux de culture est régulé (Doyle *et al.,* 1990; McQueen *et al.,* 1990; Godia *et al.,* 2006).

En ce qui concerne la cellule Vero, Koyama *et al.* (1984, 1989) précisent que les ions ammonium présentent un effet inhibiteur sur la multiplication du virus de l'herpès à une concentration au-delà de 50 mM. Néanmoins, certains travaux ont contribué à la diminution de la production d'ions ammonium dans les milieux de culture, soit par des stratégies de diminution de la concentration de la glutamine en culture continue (Sanfeliu *et al.,* 1997), soit par la substitution de la glutamine avec différents composés moins ammoniagéniques (Christie *et al.,* 1999; Genzel *et al.,* 2005). Ces travaux sont traités plus en détail dans la partie suivante concernant les stratégies de rééquilibrage de la glycolyse et de la glutaminolyse.

1.4.5. Amélioration des performances d'une culture cellulaire par le contrôle du métabolisme cellulaire

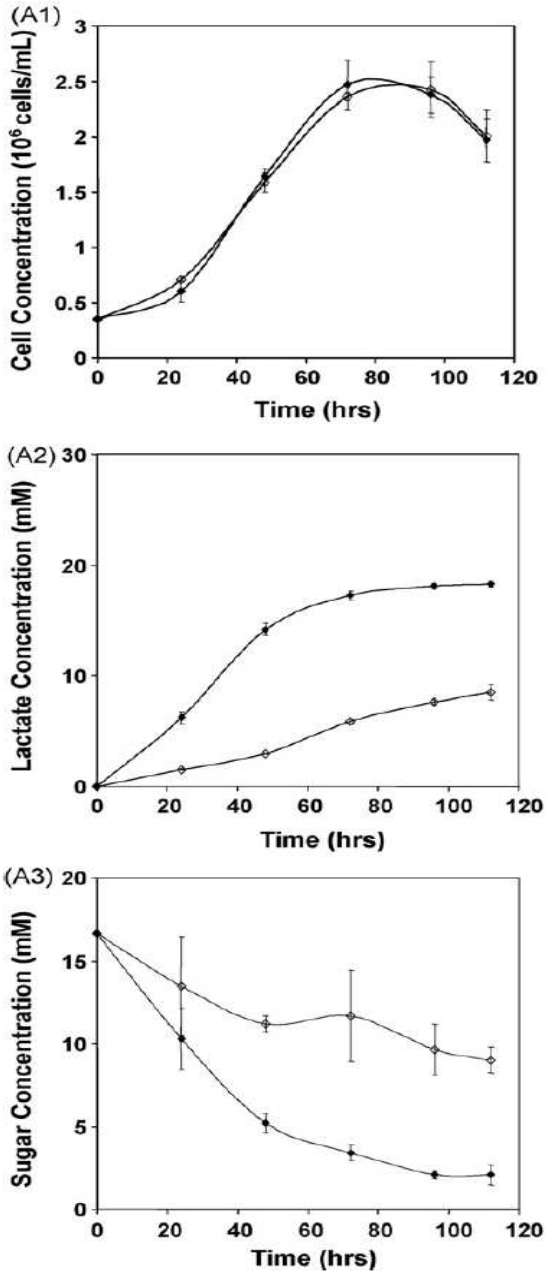
L'amélioration d'un procédé de culture cellulaire peut être envisagée sur le plan du procédé lui-même ou sur celui de la cellule et donc du métabolisme cellulaire. L'amélioration du métabolisme cellulaire consiste le plus souvent à améliorer l'efficacité des voies du métabolisme carboné central afin de pouvoir accélérer ou maintenir la croissance cellulaire, soit en modifiant la composition du milieu de culture, soit en agissant directement sur les voies métaboliques intracellulaires. Dans la partie suivante sont résumés les travaux concernant la glycolyse et la glutaminolyse.

1.4.5.1 Stratégie de rééquilibrage du métabolisme du glucose / lactate

Deux approches majeures sont décrites dans la littérature pour rééquilibrer le métabolisme du glucose et améliorer son implication dans la croissance cellulaire : d'une part, la réduction du flux d'entrée des glucides, et d'autre part, l'amélioration de l'efficacité du métabolisme carboné central, et donc la diminution de la production de lactate. La réduction de l'entrée du glucose peut être envisagée de deux façons différentes.

Dans un premier temps, il est possible de limiter l'apport du glucose en réduisant sa concentration disponible pour les cellules. Il est néanmoins nécessaire d'assurer un apport constant et régulé en glucose pour satisfaire les besoins cellulaires. Cette technique est couramment utilisée par un mode de fonctionnement semi-continu (fed-batch) ou continu (Kohler *et al.,* 1975; Miller *et al.,* 1989; Xie *et al.,* 1994; Zhou *et al.,* 1995; Sanfeliu *et al.,* 1997; Xie *et al.,* 1997; Cruz *et al.,* 1999; Jang *et al.,* 2000; Miller *et al.,* 2000; Trabelsi *et al.,* 2006; Wlaschin *et al.,* 2006; Iwatani *et al.,* 2007).

Dans un deuxième temps, le métabolisme carboné central peut être limité par le flux d'entrée du glucose dans la cellule. En effet, Neerman *et al.,* (1996) ont mené une étude avec différentes lignées cellulaires et ont émis l'hypothèse que l'étape prépondérante de la glycolyse serait le transport du glucose par les hexokinases. Certains travaux se sont donc intéressés à la modification des protéines de transport du glucose. De cette manière, le transport transmembranaire du glucose a été réduit chez les cellules d'hybridomes par l'expression d'un ARN anti-sens de la protéine de transport majoritaire du glucose, Glut 1 (Paredes *et al.,* 1999). Néanmoins, ces travaux, bien que réduisant de 48 % la vitesse spécifique de consommation de glucose, n'ont pas été concluants du fait de la mauvaise stabilité des souches mutantes générées.



Une approche plus intéressante consiste à coupler la diminution du flux de substrat carboné à l'intérieur de la cellule avec une métabolisation plus efficace de celui-ci. Cette approche a été utilisée par Wlaschin *et al.,* (2007) qui ont remplacé chez les cellules CHO le transporteur Glut 1, par le transporteur du fructose, Glut 5. L'intérêt de cette méthodologie est que le transporteur Glut 5, spécifique du transport du fructose, présente une affinité plus faible pour son substrat que le transporteur ubiquitaire du glucose Glut 1. Ainsi, sans modifier les caractéristiques de croissance des cellules CHO, l'apport du substrat carboné à l'intérieur de la cellule est ralenti et l'excrétion du lactate est réduite de moitié (voir Figure 19-A2). Le rendement global de production de lactate par rapport au glucide consommé pour ce clone est lui aussi réduit de 1.1 en culture avec un milieu contenant du glucose à 0.3 en culture avec fructose (Figure 19). Cependant, ces souches cellulaires sont modifiées génétiquement et leur stabilité reste toujours un problème.

Figure 19. Caractéristiques métaboliques et de croissance pour des souches de cellules CHO exprimant Glut 5. Suivi cinétiques de la concentration cellulaire (1), de la formation de lactate (2) et de la consommation de glucides (3) pour le clone 1 (A) cultivé avec 3 $g.l^{-1}$ de glucose (●) ou de fructose (◊) comme seule source de carbone (Wlaschin *et al.,* 2007)

Par contre, cette approche peut être plus intéressante dans le cas de certaines lignées cellulaires, telles que les cellules rénales qui possèdent naturellement le transporteur Glut 5 rendant ainsi plus aisée la substitution du glucose par le fructose sans nécessiter des opérations de génie génétique et induire des problèmes de stabilité de la souche mutante.

Ainsi, une simple substitution du glucose par d'autres sucres métabolisables par la lignée cellulaire cultivée peut aussi être une bonne approche pour réduire le flux d'entrée dans la glycolyse et donc le flux de la glycolyse elle-même.

La substitution du glucose par d'autres sucres a permis, dans certains cas, de réduire la production de lactate et d'aboutir à un métabolisme énergétique plus efficace. Dans le cas du fructose, il a aussi été démontré que la production de lactate est 9 fois moins importante que pour une croissance sur glucose dans le cas de cellules de cœur humain (Eagle *et al.,* 1958). Les sources de carbone envisageables pour substituer le glucose sont présentées dans le tableau 16.

Tableau 16. Effet de la substitution du glucose par d'autres sucres ou métabolites pour différentes lignées cellulaires (Eagle *et al.,* 1958). Les lignées testées sont une lignée HeLa, une lignée KB mais aussi des cellules qui proviennent de foie, d'intestin, de fibroblastes humains et enfin une lignée cellulaire issue de fibroblastes de souris.

	Glucides	**Intermédiaire du métabolisme intracellulaire**	**Autres**
Pas de croissance	lactose, sucrose, D-allose, D-altrose, D-mannitol,	citrate, acétate, fumarate, lactate, malate, phosphoglycerate, pyruvate, succinate	glycérol
Croissance inférieure	cellobiose, melibiose, sorbitol, D-talose, D-xylose, D-ribose		
Croissance comparable	tréhalose, turanose, D-glucose-6-phosphate, D-glucose-1-phosphate, D-fructose, D-galactose, D-mannose		

Ainsi, les glucides qui permettent une croissance similaire à celle obtenue avec le glucose, et dont l'utilisation est la plus répandue, sont le fructose, le galactose et le mannose (Wagner *et al.,* 1991; Mochizuki *et al.,* 1993). Les cellules Vero et MDCK ont ainsi été adaptées en 1985 à une culture sur milieu L15 additionné de fructose ou de galactose (Barngrover *et al.,* 1985). La substitution du glucose par le galactose et le fructose peut aussi avoir un effet positif sur la production de rétrovirus par des cellules Te Fly A7, cellules épithéliales thymiques humaines (Coroadinha *et al.,* 2006).

Mis à part les stratégies préalablement citées pour réduire la production de lactate dans les procédés de culture cellulaire, une autre initiative consiste à agir directement sur l'enzyme qui produit ce métabolite, la *lactate déshydrogénase (LDH)*, ou sur les enzymes d'entrée dans le cycle de Krebs qui présentent de faibles activités. Les travaux portant directement sur la *LDH* traitent, soit, de la construction d'une lignée cellulaire déficiente en *LDH* (Figure 20 : Chen *et al.,* 2001), soit, de l'inhibition du gène de la LDH par des ARN anti-sens (Kim *et al.,* 2007). Ainsi, une lignée LDH-neo21 dérivée d'une lignée d'hybridomes a présenté une diminution de 25 % de la consommation en glucose et de la production de lactate (Figure 20 : Chen *et al.,* 2001), tout en assurant une augmentation de 30 % de la concentration cellulaire finale .

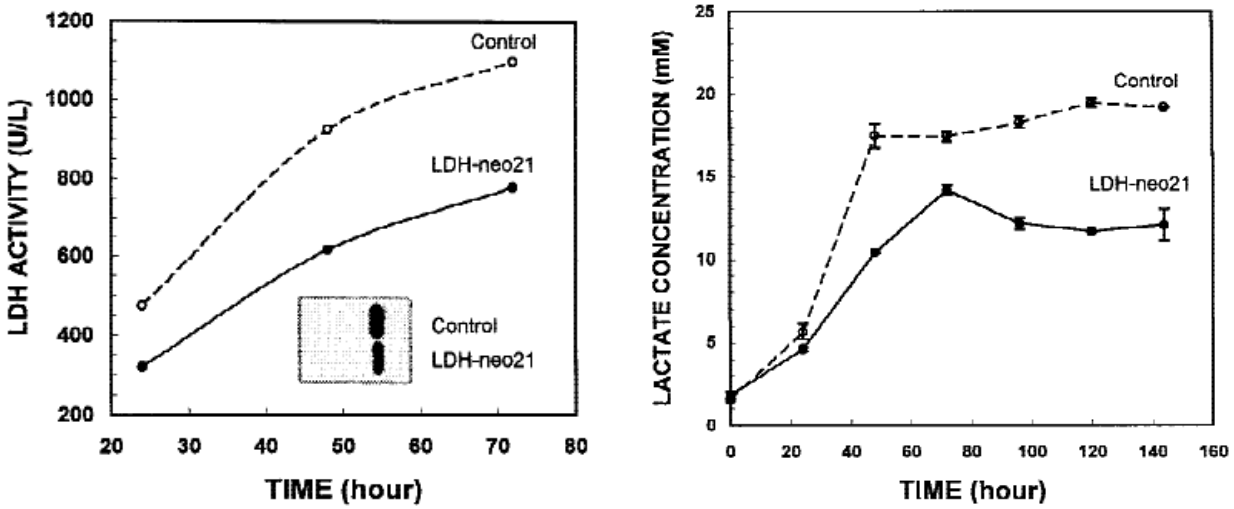


Figure 20. Comparaison de la production de lactate et de l'activité de la *LDH* entre des cellules d'hybridomes et une lignée variante LDH-neo déficiente en *LDH* (Chen *et al.,* 2001)

La deuxième approche, basée sur les enzymes d'entrée du cycle TCA, consiste à réduire la production de lactate suite à une amélioration de l'entrée du carbone dans ce cycle. Les travaux réalisés à partir de cette approche se sont principalement intéressés à la *pyruvate carboxylase* qui transforme le pyruvate en OAA dans le cytoplasme, avant que celui-ci ne soit pris en charge par la voie anaplérotique du malate. Ainsi, cette enzyme a été introduite avec succès chez deux lignées de cellules rénales, les cellules BHK et les cellules HEK 293, et une lignée de cellules d'insectes, les cellules High-five (Irani *et al.,* 2002; Benslimane *et al.,* 2005). Ces travaux ont pu démontrer que la production de lactate était effectivement réduite avec un rendement lactate/glucose diminuant de 1,75 à 1,0 dans le cas des cellules BHK (Irani *et al.,* 2002) et une réduction de la concentration maximale en lactate allant de 40 à 70 % dans le cas des cellules d'insectes (Benslimane *et al.,* 2005).

1.4.5.2 Stratégies de rééquilibrage de la glutaminolyse

Comme dans le cas du métabolisme du glucose, certains travaux se sont aussi intéressés à la compréhension et à la réduction de la dérégulation de la glutaminolyse, avec pour objectifs, d'une part, de limiter la production d'ions ammonium, et, d'autre part, de réguler la consommation de la glutamine, et donc de rééquilibrer le métabolisme carboné central. De la même façon que pour le glucose, un apport réduit et régulé en glutamine peut permettre de rééquilibrer la glutaminolyse. Ainsi, les stratégies d'alimentation en semi-continu ou en continu ont été largement utilisées (Europa *et al.,* 2000; Nadeau *et al.,* 2000; Maranga *et al.,* 2006; Iwatani *et al.,* 2007).

La seconde stratégie consiste à apporter un substrat de substitution de la glutamine permettant un métabolisme cellulaire plus efficace que la glutaminolyse, tout en maintenant ou en améliorant la croissance cellulaire. Ainsi, dans des travaux récents, divers substrats ont été proposés pour remplacer totalement ou partiellement la glutamine dans sont rôle de substrat énergétique. De manière plus synthétique, trois types de substitution de la glutamine peuvent être envisagées.

Le premier type concerne la substitution de la glutamine par d'autres acides aminés capables d'intégrer le cycle des acides tricarboxyliques. Ont été notamment rapportés des essais sur le glutamate et l'asparagine (Christie *et al.,* 1999; Huang *et al.,* 2006)(Figure 21). Le glutamate est attractif car il s'agit du premier intermédiaire de la glutaminolyse. L'asparagine, quant à elle, intègre le cycle TCA au niveau de l'OAA. Dans le cas des cellules BHK, le glutamate seul ne permet pas une bonne croissance cellulaire bien qu'il diminue fortement la production d'ions ammonium (Christie *et al.,* 1999). La substitution de la glutamine par le couple glutamate/asparagine est plus efficace et permet, notamment, de diminuer de 79 % la quantité d'ions ammonium produite par les cellules Vero (Christie *et al.,* 1999; Huang *et al.,* 2006; Huang *et al.,* 2007). Selon les travaux de Huang *et al.* (2007) certaines voies du métabolisme seraient favorisées lors de ce type de substitution, le glutamate étant principalement impliqué dans les voies de transamination plutôt que dans la voie de désamination qui forme l' α–KG (Figure 21).
Par ailleurs, certaines lignées cellulaires, telle que les cellules d'hybridomes, ne sont pas capables de resynthétiser la glutamine à partir du glutamate du fait de l'absence de *glutamine synthétase (GS*) et ne pourront pas croître sur de tels milieux sans être modifiées génétiquement pour exprimer la *GS* (Hassell *et al.,* 1990).

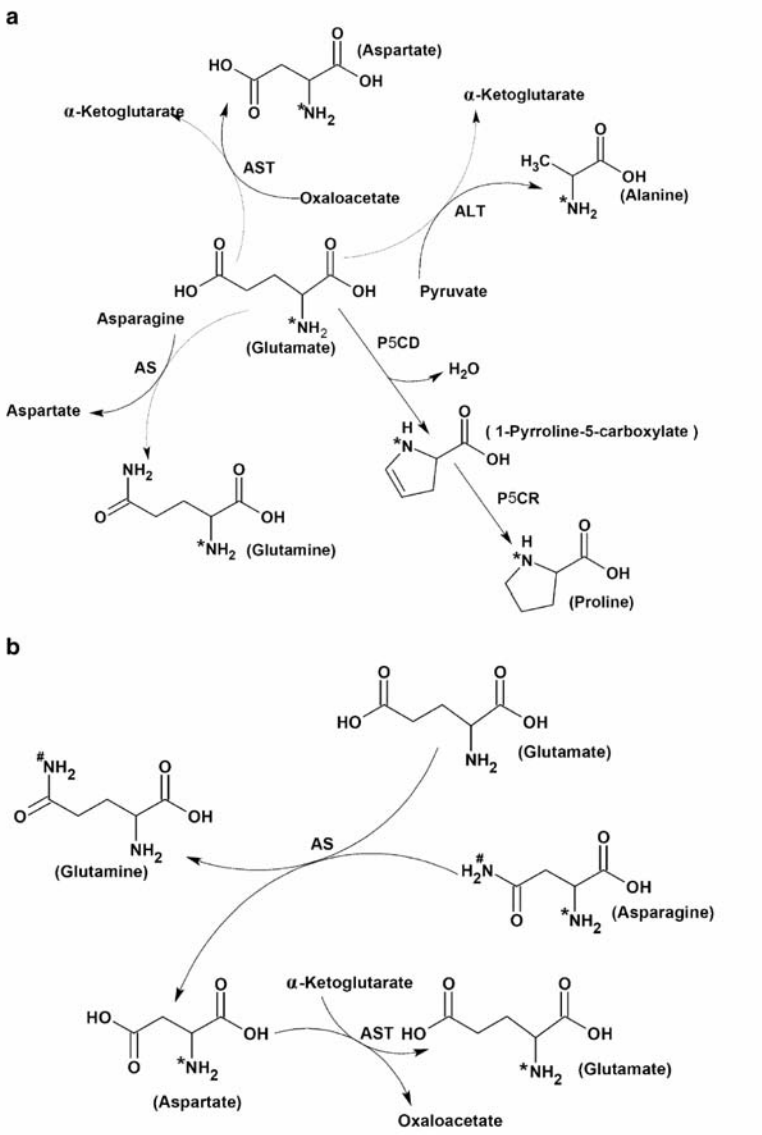


Figure 21. Proposition de voies métaboliques de la cellule Vero pour le glutamate (a) et l'asparagine (b) (Huang *et al.,* 2007).

D'autre part, la glutamine peut être substituée directement par un intermédiaire du cycle TCA. Des essais ont été réalisés en remplaçant la glutamine par du pyruvate ou de l' α-cétoglutarate (Hassell *et al.,* 1990). Ainsi, une concentration de pyruvate 5 fois plus importante que celle de la glutamine permet la croissance de trois lignées cellulaires (MDCK, BHK 21, CHO-K1) sans diminution de leur vitesse spécifique maximale de croissance (Genzel *et al.,* 2005). D'autres travaux récents ont permis de comprendre plus précisément la distribution des flux par analyse de flux métaboliques (MFA) chez les cellules MDCK cultivées dans un milieu GMEM dans lequel le pyruvate est substitué à la glutamine (Sidorenko *et al.,* 2008). Ces travaux ont démontré que, suite à la substitution de la glutamine par le pyruvate, les flux glycolytiques sont diminués de moitié, ce qui limite la production de lactate.

De la même façon, l'entrée du pyruvate étant plus importante dans le cycle TCA, les flux participants au cycle TCA seraient plus équilibrés que lors d'une alimentation en glutamine. Néanmoins, les auteurs relèvent également que le pyruvate issu de la métabolisation du glucose est majoritairement dirigé vers la production de lactate (98,5 % des flux issus de la glycolyse), dans les mêmes proportions que celles observées pour les cultures en présence de glutamine (Sidorenko *et al.,* 2008).

Enfin, étant donné que la glutamine joue un rôle important en tant que constituant protéique et donneur de groupes aminés, et qu'elle stimule la croissance cellulaire, la production virale et la production d'anticorps, une dernière stratégie consiste à remplacer la glutamine par des di-peptides tels que l'alanine-glutamine (Glutamax®) ou la glycyl-glutamine. Les di-peptides sont hydrolysés par des protéases cellulaires exprimées par les cellules en fonction de leurs besoins. De plus, les di-peptides possèdent une meilleure stabilité que la glutamine qui se dégrade spontanément à la chaleur. La concentration en di-peptides requise pour obtenir une croissance similaire est généralement plus importante que celle de la glutamine (Christie *et al.,* 1994, 1999). Un autre intérêt de cette stratégie réside dans la consommation plus progressive de la glutamine libérée, permettant aussi de rééquilibrer le métabolisme du glucose. La présence de di-peptide a permis une production de lactate et d'ions ammonium moindre par les hybridomes (Hassell *et al.,* 1990). De nouveau, ces résultats confirment l'interconnexion des deux métabolismes, glycolyse et glutaminolyse.

Alors que de nombreux travaux ont été publiés sur l'étude du métabolisme de diverses lignées cellulaires industrielles, telles que les cellules CHO ou BHK, peu de données sont disponibles dans le cas des lignées productrices de vaccins, comme les cellules MRC-5, MDCK ou Vero. Les principales informations mettent en avant l'inefficacité du métabolisme carboné central pour l'utilisation des deux sources carbonées majoritaires, le glucose et la glutamine. Diverses stratégies ont proposé d'améliorer séparément le métabolisme de ces deux sources. Par contre, peu de propositions concernent le métabolisme carboné central dans sa globalité, en intégrant les deux voies de la glycolyse et de la glutaminolyse. Une approche globale du métabolisme des cellules Vero, s'appuyant sur les travaux réalisés avec d'autres cellules, pourrait donc permettre de mieux comprendre leur comportement et d'identifier des conditions de culture susceptibles d'améliorer leurs performances.

1.5. L'approche PAT appliquée à la culture de cellules animales

1.5.1. L'approche PAT et la méthodologie QbD

L'initiative PAT (Process Analytical Technology) est relativement récente car elle n'apparaît dans les documents de la FDA qu'à partir de 2002. La FDA définit le PAT comme "a system for designing, analysing and controlling manufacturing through timely measurement (i.e., during processing) of critical parameters, with the goal of ensuring final product quality" (FDA Guidance for Industry, 2004). A ce jour, l'initiative PAT a été développée principalement pour les procédés chimiques et agroalimentaires, même si, dans le cas de certains procédés biochimiques tels que des procédés de fermentation microbienne, cette méthodologie était déjà employée avant qu'elle ne soit baptisée en tant que telle par la FDA. Son application aux productions de molécules pharmaceutiques par des procédés biotechnologiques, et notamment ceux utilisant des cellules animales, n'est que très récente, l'intérêt apporté à cette méthodologie ayant été largement initiée et influencée par les organismes de contrôle (FDA, ORA, ASMAE..). L'approche PAT, dont le principal objectif est d'assurer la qualité finale des produits, apparaît alors comme une nouvelle démarche pour la mise en place et le contrôle de cette qualité. L'initiative PAT est donc intimement liée à la méthodologie QbD (Quality by Design).

La méthodologie QbD permet l'établissement d'un « espace de confiance » (Design Space) qui prend en compte la variabilité et les interactions des différents paramètres opératoires influant sur le procédé et la qualité du produit. L'objectif premier est de déterminer les paramètres critiques du procédé parmi différents paramètres tels que la composition des matières premières, les conditions opératoires du procédé, le cycle de maintenance des machines, etc… Ainsi, l'espace de confiance doit représenter un espace où les modifications opératoires n'auront pas d'influence sur la qualité du produit, et ne nécessiteront pas de déposer de nouveau dossier d'acceptation, comme dans la procédure actuelle. L'espace de confiance a aussi vocation à être élargi en fonction des nouvelles données acquises et en accord avec les organismes de contrôle. La méthodologie QbD s'appuie donc nécessairement sur une grande connaissance et une bonne maîtrise du procédé de production, résultant d'un grand nombre d'informations acquises, soit au cours du procédé par les technologies PAT d'analyse en ligne, soit par des techniques de plans d'expériences (DOE : Design of experiment).

Cette approche satisfait les nouvelles directives des organismes de contrôle en termes de qualité, notamment celles édictées par la FDA concernant le développement pharmaceutique, l'évaluation des risques et le contrôle qualité, décrites dans les documents directeurs, Q8, Q9 et Q10 respectivement.

L'initiative PAT s'appuie sur de nouvelles technologies permettant de réaliser des suivis en temps réel des procédés de production. On distingue parmi les différentes méthodes de suivi, trois modes d'utilisation de ces nouvelles technologies :

- ✓ *l'utilisation* **« *at-line* » *ou* « *hors-ligne* » :** cette catégorie concerne des mesures et des analyses hors ligne d'échantillons prélevés, réalisés par des équipements analytiques spacialement proches du procédé.
- ✓ *l'utilisation* **« *on-line* » :** la mesure est réalisée quasiment en temps réel, et est non invasive. Le capteur / la technologie est implanté en boucle fermée sur le procédé afin de ne pas perturber son évolution.
- ✓ *et l'utilisation* **« *in-line* / *in-situ* » :** la mesure est réalisée en temps réel sans perturber le système étudié, par un capteur / une technologie non invasive, introduit au sein du procédé à étudier.

L'initiative PAT appliquée à la culture cellulaire

Comme pour les procédés chimiques, les objectifs de l'application du PAT dans le cas des procédés de culture de cellules animales sont de plusieurs ordres, i) d'une part, améliorer la connaissance et la compréhension des procédés, de la physiologie et du métabolisme cellulaires, ii) ensuite, de permettre un suivi en-ligne des paramètres clefs du procédé de culture, iii) et enfin de parvenir à prédire, optimiser et contrôler le procédé et son évolution par des outils appropriés en vue d'assurer la qualité finale du produit. Les paramètres des procédés basés sur la culture de cellules animales dont le suivi en ligne peut être essentiel pour la compréhension et l'amélioration du procédé et de la production sont les suivants :

- ✓ la concentration et la viabilité cellulaire,
- ✓ les concentrations des éléments nutritifs,
- ✓ les concentrations des co-produits du métabolisme (ions ammonium, lactate…),
- ✓ l'environnement physico-chimique (hydrodynamique, pH, température, osmolarité, pO_2, pCO_2…),
- ✓ La concentration et la qualité du produit (ex. quantité de virus produit, particules virales vides, particules virales non infectieuses, produits de dégradation …).

Or, à ce jour, seuls les contrôles en ligne du pH, de la température et de la pO_2 sont utilisés en routine dans la plupart des procédés industriels. Les travaux de Lecina *et al.* (2006) illustrent ainsi la mise en œuvre du PAT à partir du suivi en ligne de la vitesse de consommation spécifique d'oxygène de cellules d'insectes Sf-9 en déterminant le moment optimal d'infection, de récolte et de changement de milieu (Figure 22).

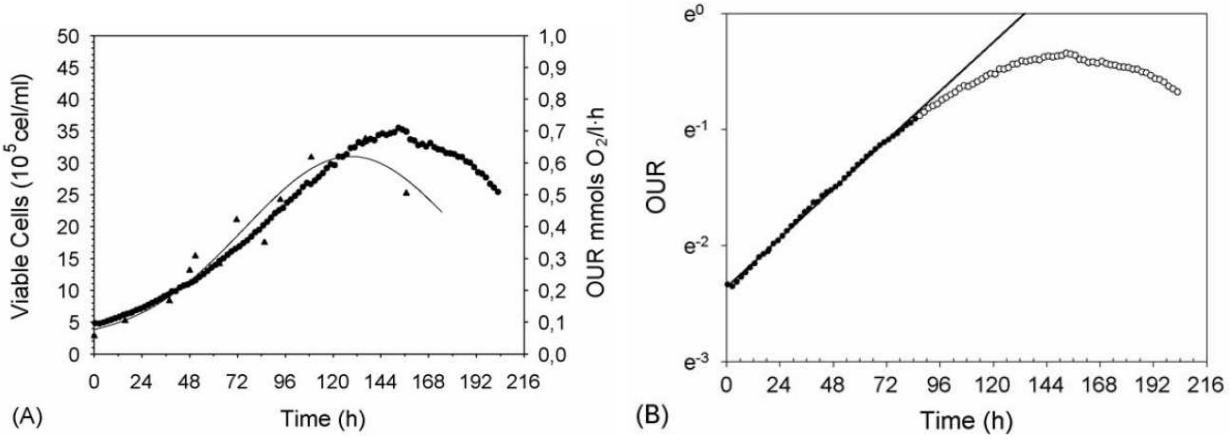


Figure 22. Croissance cellulaire et profil de OUR lors de culture de cellules Sf-9 en mode discontinu (Lecina *et al.,* 2006). (A) mesure on-line de la vitesse de consommation d'oxygène (OUR) (●), concentration cellulaire (▲) ; (B) profil OUR en fonction du temps et son lissage pendant la phase exponentielle (●).

Parmi les paramètres importants pour la compréhension et le contrôle d'un procédé de culture de cellules animales, notre analyse de la littérature sera ciblée sur le suivi en-ligne de la concentration et de la viabilité cellulaires, ainsi que sur celui des éléments nutritifs et co-produits du métabolisme.

1.5.2. Suivi de la concentration et de la viabilité cellulaires

La concentration cellulaire est une variable très importante pour le contrôle des procédés de culture. Elle permet de déterminer les différentes vitesses spécifiques de croissance, mais peut aussi participer dans le cas de production virale, à la détermination de la MOI (multiplicity of infection) et de la TOI (time of infection). Les techniques développées pour le suivi en-ligne de la concentration cellulaire ont dans un premier temps été basées sur des méthodes de quantifications indirectes à partir de données quantifiées en routine dans les procédés de culture, telles que le suivi de la vitesse de consommation d'oxygène ou le suivi hors-ligne de la concentration de glucose consommé (Duval et al., 1990). Cependant, ces techniques s'appuient sur des rendements métaboliques constants, ce qui, d'une part, présente un biais en cas de rendement variables, et, d'autre part, fournit des informations uniquement sur l'état physiologique des cellules et non sur la concentration de cellules viables. Diverses technologies ont été proposées pour contrôler directement en-ligne la concentration cellulaire (Konstantinov et al., 1994 :
Tableau 17 & Figure 23).

Tableau 17. Synthèse des techniques de suivi en-ligne disponibles pour les cellules animales de la concentration cellulaire.

Type de méthode	Méthode	Variable mesurée corrélée à la concentration cellulaire	Application : système de culture et lignée cellulaire	Avantages	Inconvénients	Référence
Méthodes directes basées sur des appareils dédiés	Densitométrie de résonance acoustique (ARD)	Densité du milieu de fermentation	réacteur agité : cellules d'hybridome et cellules humaines de lymphome	stabilité / pas de problèmes d'encrassement	relativement complexe / nécessite un système de filtration / faible sensibilité / affecté par l'état physiologique des cellules	Kilburn *et al.*, 1989
	RMN	niveau de 23Na dans le bioréacteur	réacteur à fibre creuse / cellules d'hybridome	utilisable a très haute densité cellulaire / information sur la viabilité cellulaire / insensible au changement physiologiques	Très complexe à mettre en œuvre / instrumentation coûteuse / faible sensibilité	Mancuso *et al.*, 1994; Bradamante 2004
	Méthode électrochimique	différence de courant entre deux électrodes plongées dans le réacteur	réacteur agité / L-1210 cellule cancéreuse	relativement simple / stérilisation possible/ système plug-in	sans background théorique / réponse devrait dépendre de la physiologie cellulaire	Sakato *et al.*, 1981
	Conductivité	conductivité du milieu de culture	réacteur à fibre creuse / EAT cellules	utilisable à très haute densité cellulaire / logiciels employés simples	faible sensibilité / erreur forte / performance dépende de la physiologie cellulaire	Blute 1988
	Capacitance	capacitance du milieu de culture dans la section Mhz	réacteur agité / cellules d'hybridomes	sonde commercialisées / stérilisation possible / quantifie la concentration de cellules viable / bons résultats en cellules animales	pas utilisable à faible densité cellulaire	Ducommun *et al.*, 2002; Ansorge *et al.*, 2007a
	Fluorescence	intensité de fluorescence du milieu de culture à 460 et 340 nm	réacteur agité / cellules d'hybridomes et de myélomes	sonde commercialisées / stérilisation possible / bonne sensibilité à de faibles concentration / réponse est censée corréler avec la concentration de cellules viables	affecté par de multiples facteurs / difficulté pour interpréter le signal / faible sensibilité à haute concentration / dépend de la physiologie cellulaire	Srivastava *et al.*, 2008
	Absorbance ou dispersion	absorbance ou dispersion de la lumière dans le milieu de culture	réacteur agité/ cellules d'hybridomes	stérilisation possible / technologie robuste / bonne sensibilité / expérience avec les cultures microbiennes	encrassement des surfaces optiques/ affecté par les bulles d'air et par la physiologie cellulaire	Merten *et al.*, 1987; Card *et al.*, 2007
	Imagerie en temps réel	image en deux dimensions	réacteur agité	nouvelle technologie capable de fournir de nombreuses informations	pas de système commercial / coût important / mise en œuvre complexe	*Rudolph et al., 2008 Höpfner et al., 2009*
	analyse de taille des particules	longueur du pulse de lumière généré par une particule réfléchissant un faisceau laser	réacteur agité	sonde plug-in / stérilisation possible / donne des information sur la distribution de taille des cellules / commercialisé	pas d'application à la culture de cellules animales / peu de travaux / précision et fiabilité limitées	
Méthode indirecte basée sur des sondes conventionnelles	estimation à partir de la consommation d'oxygène (OUR)	vitesse de consommation de l'oxygène	réacteur agité et réacteur à fibre creuse/ cellules d'hybridomes, de myélomes et CHO	concept simple et relativement simple à mettre en œuvre	validité limité / est basé sur une consommation d'oxygène constante / OUR estimation peut être difficile et peu précise	Yoon *et al.*, 1994; Kamen *et al.*, 1996
	Evolution de CO_2 (CER)	vitesse d'évolution la concentration en CO_2	réacteur agité/ cellules d'hybridomes	concept simple	estimation du CER difficile / nécessite un spectromètre de masse et implique de forte erreurs	Kamen *et al.*, 1996; Zeiser *et al.*, 2000
	estimation de la production d'ATP (APR)	vitesse de production de l'ATP	réacteur agité / fibroblaste humain	simple/ concept supposé plus précis que celui de l'oxygène	basé sur une production d'ATP constante / nécessite une estimation de l'OUR et LPR	Eyer *et al.*, 1996

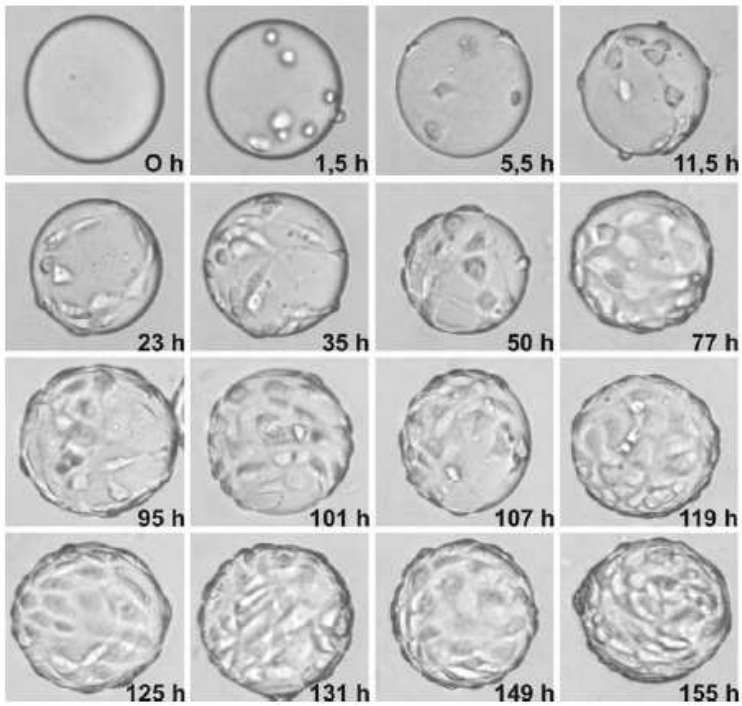


Figure 23. Suivi microscopique en-ligne de cellules adhérentes NIH-3T3 (Höpfner *et al.,* 2009).

Le suivi de la concentration cellulaire par la mesure de capacitance, ou par spectroscopie diélectrique est décrite comme étant la plus fiable actuellement. Elle a surtout été utilisée pour le suivi de la concentration cellulaire de bactéries et de levures (Salter *et al.,* 1990; Soley *et al.,* 2005) et de cellules d'insectes (Zeiser *et al.,* 1999). La mesure de la capacitance peut être influencée par de fortes vitesses d'agitation ou des variations de température et de pH. Cependant, les cultures de cellules animales étant généralement régulées en pH et température, et étant réalisés avec des vitesses d'agitation faibles, cette technique est tout à fait envisageable pour le suivi de la concentration de cellules animales aussi bien en suspension qu'adhérées sur des supports (Olsson *et al.,* 1997; Ducommun *et al.,* 2001; Rhiel *et al.,* 2002b; Carvell *et al.,* 2006).

Principe de la spectroscopie diélectrique

Du point de vue électrique, une suspension cellulaire peut être considérée comme une suspension de condensateurs sphériques contenant chacun un milieu conducteur (cytoplasme), entourés d'une solution conductrice (milieu de culture). Du fait de la membrane cytoplasmique imperméable aux ions, l'application d'un champ électrique à cette suspension va induire une polarisation de ces condensateurs sphériques (Figure 24a). La mesure de cette polarisation donne accès à la permittivité cellulaire, qui peut être directement enregistrée dans le bioréacteur par une sonde stérilisable.

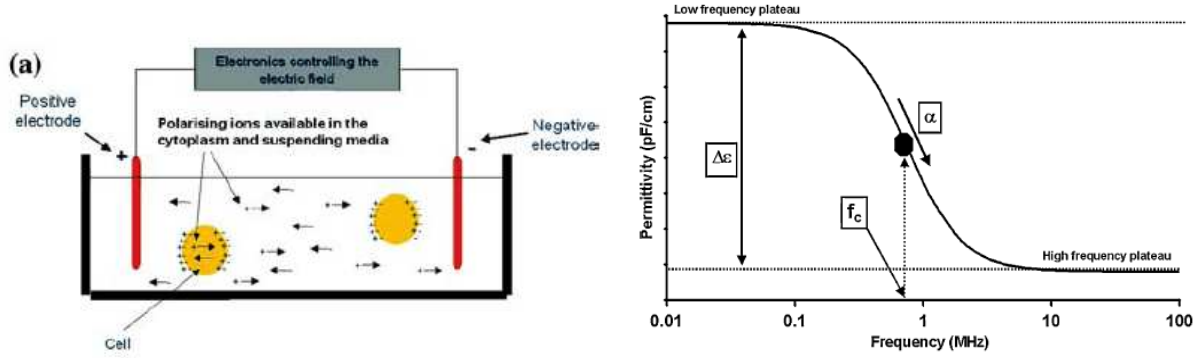


Figure 24. Principe de la spectroscopie diélectrique (a). Evolution de la capacitance d'une suspension cellulaire en fonction de la fréquence de polarisation (b).

Le passage d'une fréquence de 0,1 à 10 MHz provoque une chute de la permittivité induite par la polarisation des membranes, appelée β-dispersion (Figure 24b). Les équations qui représentent cette β-dispersion, ont été établies pour des cellules sphériques et sont présentées ci-dessous (Equation de Schawn : Eq. 1). Elles permettent de relier la permittivité au biovolume cellulaire et d'évaluer la fréquence caractéristique, fc, correspondant au point d'inflexion de la courbe d'évolution de la permittivité, ε, en fonction de la fréquence.

(Eq. 1) $$\varepsilon = \frac{9 \times \mathrm{r} \times \mathrm{P} \times \mathrm{C_M}}{4}$$

(Eq. 2) $$P = \frac{4}{3} \times \pi \times r^3 \times N$$

(Eq. 3) $$fc = \frac{1}{2 \times \pi \times r \times C_M \times \left(\frac{1}{\sigma_c} + \frac{1}{2\,\sigma_m} \right)}$$

ε : *permittivité (F. m^{-1})*
r : *rayon cellulaire (m)*
C_M : *capacitance membranaire (F.m^{-2})*
N : *concentration cellulaire (m^{-3})*
P : *fraction volumique de cellules (biovolume)*
σ_c : *conductivité intracellulaire (mS.cm^{-1})*
σ_m : *conductivité du milieu (mS.cm^{-1})*
fc : *fréquence caractéristique (kHz)*

Elles sont vérifiées uniquement à dans le cas de cellules ayant des membranes intègres, soit les cellules viables (Ducommun *et al.*, 2002; Ansorge *et al.*, 2007a).

Suivi en-ligne de cultures de cellules animales par mesure de capacitance

Quelques travaux rapportent l'utilisation de cette technologie pour quantifier la croissance cellulaire en-ligne (Ducommun *et al.*, 2002; Cannizzaro *et al.*, 2003; Carvell *et al.*, 2006; Ansorge *et al.*, 2007a). La calibration de cette technologie est réalisée par corrélation entre la concentration de cellules et la mesure de capacitance (Figure 25). Certains travaux démontrent également un impact de la mort cellulaire sur la mesure de permittivité. En effet, la concentration cellulaire évaluée par la mesure de permittivité peut être sous-estimée de 15 à 20 % par rapport à la concentration cellulaire réelle, en présence d'une mortalité cellulaire non négligeable. Ceci peut être observé dans la figure 25 lorsque la viabilité chute à 64 % au lieu de 94 % pendant la phase de croissance exponentielle.

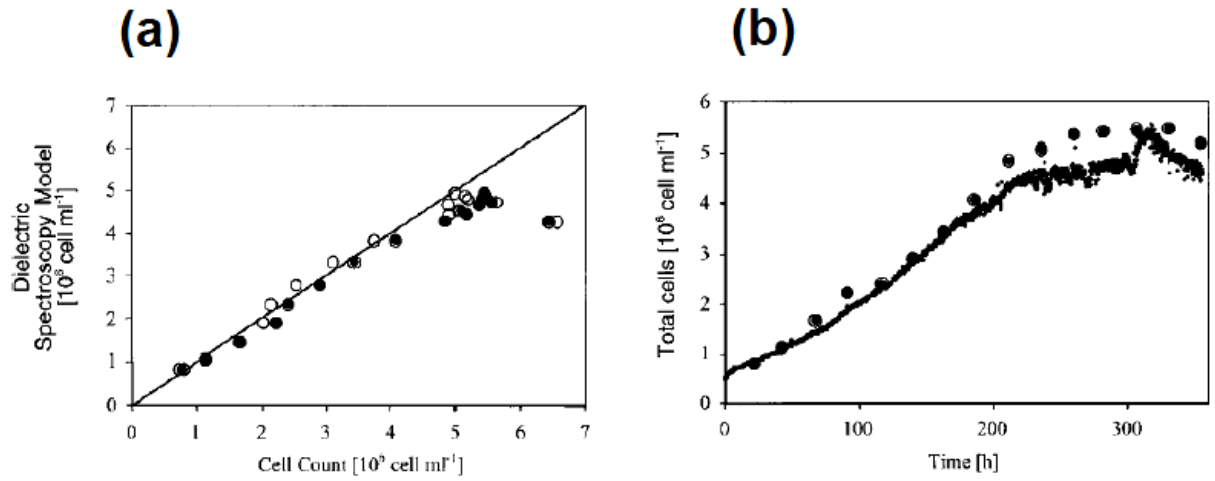


Figure 25. (a) Corrélation entre concentration cellulaire totale de cellules CHO cultivée sur microporteurs macroporeux et mesure de capacitance pour les cellules adhérées (●) et les cellules en suspension (○). (b) Comparaison de la concentration cellulaire comptée manuellement (●) avec la concentration prédite par la mesure de capacitance (··). Ces données proviennent d'une culture continue perfusée de cellules CHO adhérées sur microsupports (Ducommun et al., 2002).

Des travaux plus récents proposent le suivi du biovolume cellulaire au lieu de la concentration cellulaire. Par exemple, Ansorge *et al.* (2007) utilisent le suivi de la permittivité à différentes fréquences pour mettre en évidence une augmentation du biovolume cellulaire de cellules HEK-293 après infection par des adénovirus.

On remarque en effet dans la figure 26, qu'une augmentation de biovolume cellulaire se traduit par un décalage important du signal de permittivité entre les fréquences hautes (4,18 MHz) et basses (0,29 MHz) dans la lignée cellulaire présentant une forte production d'adénovirus et que ce phénomène n'apparaît pas lorsque la production est faible.

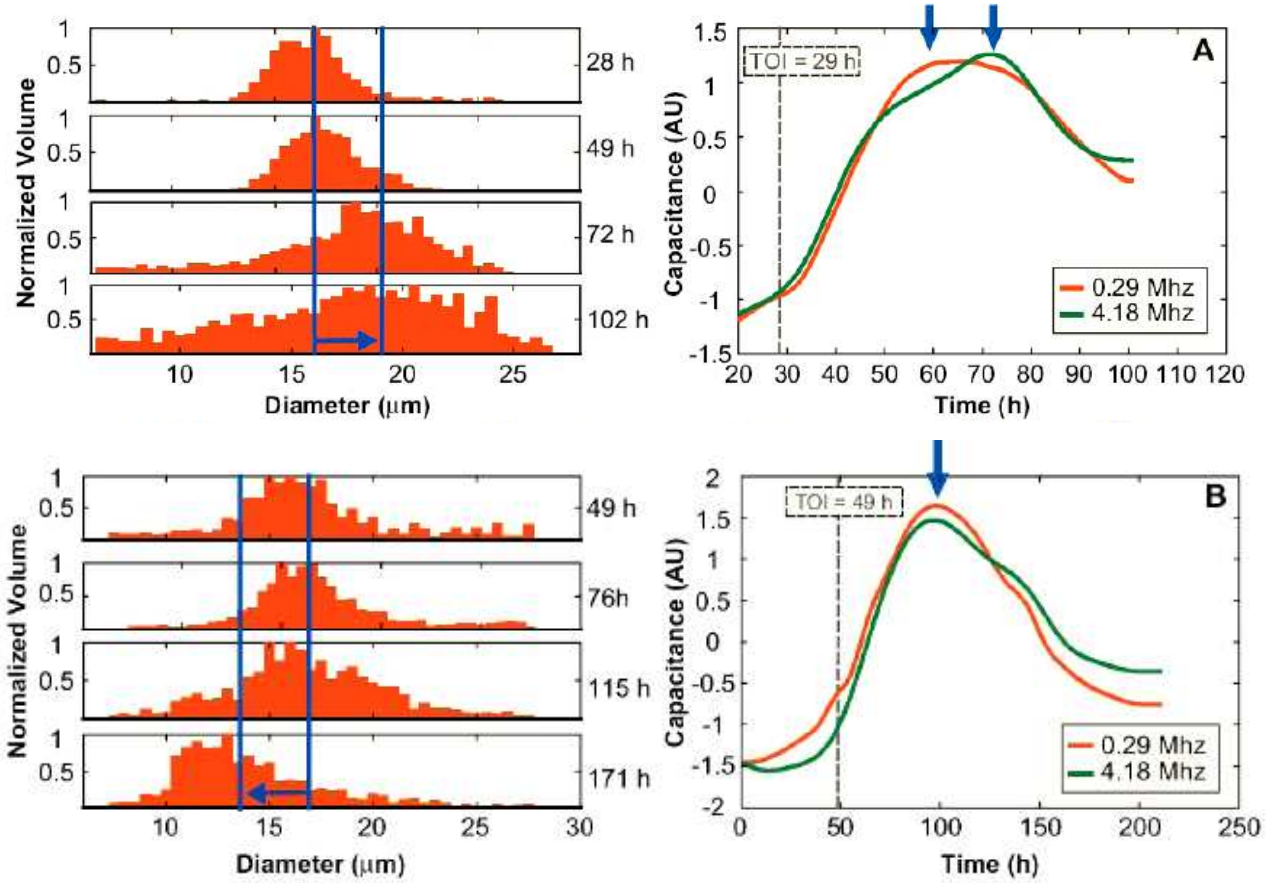


Figure 26. Evolution en cours de culture du diamètre des cellules HEK293 productrices d'adénovirus, dans le cas d'une lignée très productrice (A) ou faiblement productrice (B). Mesures des permittivités (capacitance) pour une fréquence de polarisation haute (4,18 MHz) et basse (0,29 MHz) (Ansorge *et al.*, 2007b).

La spectroscopie diélectrique présente divers atouts pour le suivi en ligne d'un procédé de culture de cellules animales. En effet, elle permet d'avoir accès au biovolume cellulaire et peut donner des indications sur la taille et l'état membranaire des cellules. Par contre, les travaux disponibles concernent pratiquement tous des cellules cutivées en suspension. Par ailleurs, il n'existe pas à ce jour de technologies dédiées au suivi en ligne de la mortalité cellulaire. Il serait ainsi intéressant d'envisager l'intérêt de cette technique dans le cas de cellules Vero cultivées sur microporteurs, que ce soit pour suivre la concentration de cellules adhérées ou la mortalité cellulaire.

1.5.3. Suivi en ligne des composés du milieu de culture

Le suivi en-ligne du métabolisme cellulaire en temps réel peut se révéler d'un grand intérêt pour la mise en œuvre d'un procédé de culture cellulaire. En effet, le suivi de la concentration de certains de éléments clefs du métabolisme cellulaire peut permettre d'améliorer le contrôle de la culture par le calcul des rapports stoechiométriques (Zeng *et al.,* 1998). Cette méthodologie est illustrée par les travaux de Xie *et al.,* (1994 et 1996) portant sur l'optimisation de la formulation d'un milieu, ou du choix d'un mode d'alimentation pour une culture de cellules d'hybridomes CRL-1606.

Cependant, jusqu'à ce jour, le suivi des métabolites est généralement associé à une mesure hors-ligne, que ce soit par des analyses enzymatiques ou par chromatographie liquide haute performance (CLPH). Par ailleurs quelques techniques de mesure *at-line* basées sur des prélèvements stériles d'échantillons filtrés et des analyses automatisées ont aussi été proposées. Pourtant, ces techniques de prélèvement stérile sont souvent limitées par des problèmes de colmatage et de sédimentation, notamment dans le cas de cellules adhérentes sur microsupports. C'est pourquoi, la recherche de nouvelles techniques d'analyse en ligne des métabolites présents dans le surnageant de culture reste d'actualité.

Les outils d'analyses physico-chimiques et plus spécifiquement les méthodes spectroscopiques, telles que la spectroscopie Raman et la spectroscopie infrarouge, sont particulièrement prometteurs. En effet, ils peuvent être implantés *in-situ* dans le réacteur par le biais de sondes stérilisables, et permettent d'acquérir des données en temps réel, de façon non invasive. Ces deux techniques de spectroscopie en particulier présentent des avantages indéniables pour l'approche PAT : rapidité de l'analyse, analyse non destructive, pas de préparation préalable des échantillons, quantité importante de données générées…

D'autres outils de quantification peuvent aussi être envisagés comme la spectroscopie de fluorescence, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ou la spectroscopie de masse associée à une chromatographie liquide (LC-MS/MS). Toutes ces méthodes doivent être couplées à une technique de prélèvement stérile automatisé, et se retrouvent donc être contraintes aux mêmes problèmes que les outils actuels. C'est pourquoi, nous nous intéresserons essentiellement aux techniques de spectroscopie Raman et proche infrarouge (NIR).

1.5.3.1 Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est basée sur un phénomène de dispersion qui a été découvert en 1928 par C.V. Raman et K.S. Krishnan. Il s'agit d'un échange d'énergie entre les molécules et les photons du faisceau d'excitation qui se traduit par la réémission de radiations de différents types et à différentes longueurs d'ondes :

- les radiations élastiques (radiations de Raleigh),
- les radiations inélastiques de haute fréquence (radiations Anti-stokes),
- les radiations inélastiques de basse fréquence (radiations stokes).

Le spectre de Raman présente l'intensité des radiations réémises à la suite d'une excitation lumineuse, en fonction de la longueur d'onde du faisceau d'excitation. Il permet d'établir une « signature » des molécules présentes dans l'échantillon (Figure 27). On peut donc considérer que, dans un milieu complexe tel qu'un échantillon de culture, le spectre ainsi obtenu est une « signature » de toutes les molécules présentes dans l'échantillon au moment de la mesure.

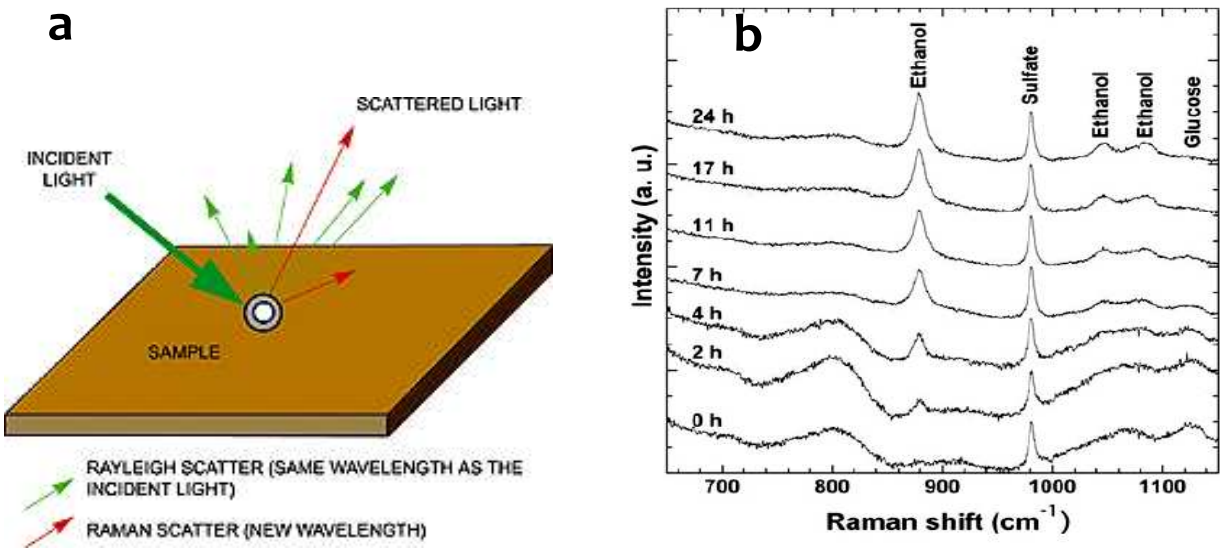


Figure 27. (a) Principe de la spectroscopie Raman. (b) Spectres au cours du temps d'un milieu LFM dans lequel est cultivé la levure *S. cerevisiae* (Picard *et al.*, 2007).

La spectroscopie Raman est principalement utilisée pour suivre des cinétiques de réactions dans des domaines variés tels que la cristallisation de molécules, la formation de polymorphes, l'hydrogénation, la chimie à basse température, etc.… Elle est aussi utilisée en microscopie pour l'imagerie chimique et l'imagerie en profondeur (ex : profil de répartition de principes actifs dans des comprimés), et pour l'identification de produits.

La spectroscopie Raman a montré son potentiel pour l'identification de composés solubles dans divers procédés biotechnologiques. A notre connaissance, aucune étude ne concerne le suivi d'une culture de cellules animales. Son évaluation pourrait être envisagée dans le cas particulier de cultures de cellules Vero.

1.5.3.2 Spectroscopie proche infrarouge (NIR)

La spectroscopie proche infrarouge est une technologie utilisée depuis près de 40 ans pour de diverses applications industrielles, donc bien antérieurement à la définition du PAT par les organismes de régulations.

Principe de la spectroscopie proche infrarouge

La spectroscopie proche infrarouge est une spectroscopie moléculaire d'absorption (Scarff *et al.,* 2006). La gamme des ondes électromagnétiques utilisées pour cette spectroscopie se situe entre 700 - 3000 nm. Elle repose sur des interactions entre la matière et des ondes électromagnétiques et les radiations réémises par la matière sont fonction de la nature des liaisons et de la composition des molécules présentes. Ainsi, les groupements fonctionnels des molécules possèdent des fréquences de vibration caractéristiques dans certaines régions précises du spectre de la lumière. Seules les molécules polaires présentant des liaisons X-H sont capables d'absorber dans le domaine de l'infrarouge. La majorité des molécules biologiques comportant des liaisons C-H, N-H, O-H ou S-H, cette technologie est donc parfaitement applicable à la détection de molécules au cours des bioprocédés (Scarff *et al.,* 2006). Ainsi, de la même façon que pour la spectroscopie Raman, le NIR permet d'obtenir une « signature » moléculaire.

Spectroscopie proche infrarouge dans les bioprocédés

La spectroscopie proche infrarouge a été majoritairement utilisée pour le contrôle qualité de procédés biologiques. Cette technologie est utilisable dans de nombreux domaines, allant de la pharmaceutique à la production de solvants, et de l'industrie agricole aux bioprocédés. Ainsi elle présente des applications similaires à la spectroscopie Raman et peut être utilisée pour étudier l'homogénéité de poudres ou de comprimés, pour déterminer la proportion de solvants ou d'humidité, pour détecter la présence de contaminants, pour identifier des polymorphes ou le degré de cristallisation (Yeung *et al.,* 1999).

Elle a aussi été employée pour le dosage de métabolites en milieu liquide dans différents procédés biotechnologiques et notamment les procédés microbiologiques, tels que la culture de bactéries *E.coli*, de bactéries filamenteuses ou de champignons (Hall *et al.,* 1996; Vaidyanathan *et al.,* 2001; Arnold *et al.,* 2002).

L'utilisation de la spectroscopie proche infrarouge dans les bioprocédés peut être classée en quatre niveaux de complexité, qui tiennent compte de la concentration cellulaire, de la viscosité du milieu de culture ainsi que du mode d'agitation et d'aération (Figure 28 : Scarff *et al.,* 2006).

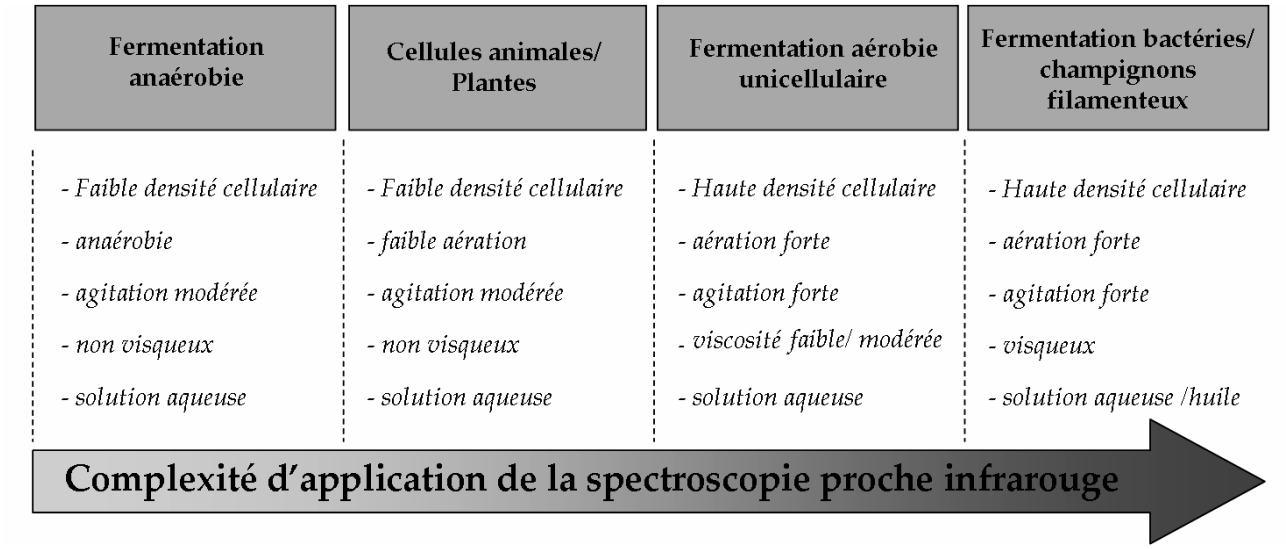


Figure 28. Niveaux de complexité de l'application de la spectroscopie NIR pour divers procédés biochimiques (Scarff *et al.,* 2006).

Les principaux problèmes rencontrés dans les procédés biologiques sont liés à la présence de bulles d'air qui perturbent l'acquisition et la qualité des spectres. C'est pourquoi, la plupart des essais réalisés sur la production d'éthanol par fermentation ont été réalisés *hors-ligne* afin de limiter cet effet de l'aération (Cavinato *et al.,* 1990). Par opposition, les conditions opératoires généralement rencontrées pour la culture de cellules animales (agitation douce, faible aération et milieux homogènes et limpides) peuvent être considérées comme compatibles avec une analyse en ligne par le NIR (Figure 28). Cependant, l'acquisition des spectres étant dépendante de la température, il est nécessaire de thermostater les systèmes d'acquisitions.

Spectroscopie proche infrarouge appliquée aux procédés de culture de cellules animales

La plupart des travaux concernant la culture de cellules animales ont été réalisés par analyse hors ligne (Harthun *et al.,* 1997; McShane *et al.,* 1998; Riley *et al.,* 1998; Riley *et al.,* 1999; Riley *et al.,* 2001; Rhiel *et al.,* 2002a) et quelques études seulement concernent des analyses *in*-situ grâce à l'utilisation d'une sonde stérilisable (Arnold 2003; Roychoudhury *et al.,* 2007).

Une première illustration de l'intérêt de cette technologie est représentée par les travaux de Riley et al. (2001) qui ont réalisé la quantification simultanée de 19 métabolites (sucres, acides aminés, lactate, ions ammoniums) (Tableau 18). Cette étude présente notamment les concentrations en métabolites les plus faibles jusqu'à ce jour (0,2 mM). On notera que la qualité de la quantification est évaluée par l'erreur standard de prédiction, SEP.

Tableau 18. Concentration de différents composés analysés par proche infrarouge dans le milieu DMEM avec ou sans sérum de cheval (10 %) (Riley et al., 2001). Le nombre de facteur PLS est un indicateur de la qualité de la quantification et doit être le plus faible possible.

analyte	concn range (mM)	concn in DMEM (mM)	SEP in serum-free medium (mM)	% error in serum-free medium	no. of PLS factors	SEP in 10% HS medium (mM)	% error in 10% HS medium	no. of PLS factors
ammonia	0–26	0	1.15	4.4	10	1.14	4.4	12
arginine	0–0.6	0.4	0.19	32	8	0.11	19	8
cystine	0–0.6	0.2	0.10	16	10	0.11	18	8
glucose	0–25	25	1.21	4.8	12	0.90	3.6	14
glutamine	0–5.3	4.0	0.45	8.6	10	0.48	9.1	15
glycine	0–1.2	0.4	0.17	15	9	0.14	11	8
histidine	0–0.5	0.2	0.10	20	6	0.07	15	9
isoleucine	0–1.1	0.8	0.21	19	5	0.22	20	9
lactate	0–16	0	0.69	4.3	6	0.88	5.5	11
leucine	0–2.0	0.8	0.16	8.2	12	0.21	10	10
lysine	0–1.0	0.8	0.16	16	14	0.18	18	16
methionine	0–0.6	0.2	0.10	16	6	0.08	14	5
phenylalanine	0–1.0	0.4	0.09	9.3	12	0.09	8.6	14
pyruvate	0–1.5	1.0	0.35	24	7	0.31	21	7
serine	0–0.5	0.4	0.17	34	5	0.18	37	12
threonine	0–1.2	0.8	0.25	21	4	0.21	17	7
tryptophan	0–1.1	0.8	0.26	24	7	0.23	20	13
tyrosine	0–0.7	0.4	0.17	24	10	0.14	20	10
valine	0–1.2	0.9	0.29	24	4	0.27	22	8

Le tableau 19 rassemble l'ensemble des travaux disponibles à ce jour dans la littérature, qui proposent l'utilisation de la spectroscopie proche infrarouge, hors-ligne ou en-ligne, pour les procédés de culture de cellules animales. Il s'agit de 10 travaux réalisés dans 5 équipes différentes, dont 3 ont été réalisés dans une collaboration ou un cadre industriel. Il faut noter que la totalité des études concernent des cultures de cellules en suspension et, qu'aucune application n'est proposée pour des procédés de culture de cellules adhérées sur microporteurs.

Les autres exemples notables de l'utilisation du NIR en culture de cellules animales concernent le suivi en ligne de cinétiques de métabolites au cours d'une culture de cellules CHO–K1 (Arnold et a l., 2003), hors-ligne de cellules du cancer de la prostate PC-3 (Riley *et al.,* 2001), et de cellules d'insectes Sf-9 (Riley *et al.,* 1998 : Figure 29).

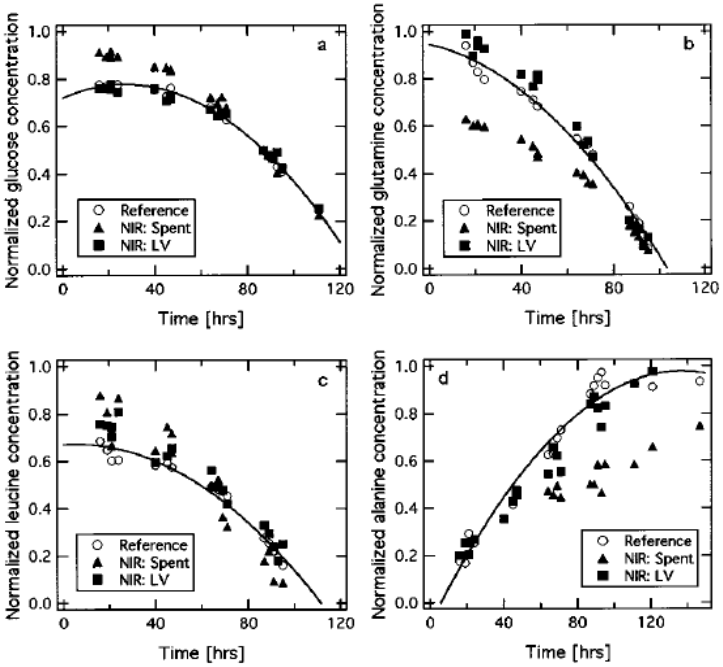


Figure 29. Suivi des concentrations en glucose, glutamine, leucine et alanine par spectroscopie NIR au cours d'une culture de cellules Sf-9 (Riley *et al.*, 1998).

Traitement et exploitation des données NIR

L'extraction des données contenues dans le spectre infrarouge constitue une étape délicate, notamment lors de l'analyse d'un échantillon de culture cellulaire. En effet, un spectre en proche infrarouge est généralement composé de formes spectrales faibles et fortement superposées (Rhiel *et al.*, 2002a : Figure 30). Il est donc indispensable de traiter ces spectres par des méthodes d'analyses chimiométriques basées sur des analyses multi variées, telles que l'analyse en composante principale (ACP) et la méthode des moindres carrés (PLS). Ce traitement permet ainsi d'extraire de façon sélective les informations contenues dans un spectre complexe composé d'un grand nombre de spectres moléculaires superposés (Rhiel *et al.*, 2002a). Ces procédures de traitement sont généralement intégrées dans les logiciels associés à l'appareillage de mesure.

Tableau 19. Travaux concernant l'application du NIR aux procédés de culture de cellules animales

Auteur	Titre	Cellules / solution	Molécules quantifiées	In-situ	Off-line	Trajet optique	Calibration
Riley et al., 1996	Simultaneous measurement of glucose and glutamine in insect cell culture media by near infrared spectroscopy	Echantillon de culture de cellules d'insectes Sf-9	Glc, Gln		●	1,5 mm	"externe"
Riley et al., 1998	Adaptative Calibration Scheme for Quantification of Nutrients and Byproducts in insect Cell Bioreactors by Near-Infrared Spectroscopy	Echantillon de culture de cellules d'insectes Sf-9	Ala, Glc, Leu, Gln		●		"externe"
McShane et al., 1998	Near-Infrared Spectroscopy for Determination of Glucose, Lactate, and Ammonia in Cell Culture Media	Echantillon de culture de Fibroblastes	Glc, Gln, Glu, Lact, NH4+		●		"mixte"
Riley et al., 1999	Rapid Calibration of Near-Infrared Spectroscopic Measurements of Mammalian Cell Cultivations	milieu DMEM	Glc, Gln, Glu, Lact, NH4+		●	1,5 mm	"externe"
Riley et al., 2001	Simultaneous Measurement of 19 Components in Serum-Containing Animal Cell Culture Media by Fourier Transform Near-Infrared Spectroscopy	milieu DMEM	Glc, Gln, Glu, Lact, NH4+, Pyr, 14 AA		●		"externe"
Rhiel *et al.*, 2001	Non destructive near infrared spectroscopic measurement on multiple analytes in undiluted samples of serum-based cell culture media	Echantillon de culture de Cellules PC-3 *(cellules cancéreuses de la prostate)*	Glc, Gln, Lact, NH4+		●	1,5 mm	"externe"
Arnold et al., 2003	In-situ near infrared spectroscopy to monitor key analytes in mammalian cell cultivation	Echantillon de culture de cellules CHO-K1	Glc, Gln, Lact, NH4+	●		1,2 mm	"interne"
Arnold *et al.*, 2004	Pure component selectivity analysis of multivariate calibration model from near-infrared spectra	Components solutions	Glc, Sucrose, Maltose		●	1,5 mm	"externe"
Roychoudhury et al., 2007	Multiplexing fibre optic near infrared (NIR) spectroscopy as an emerging technology to monitor industrial bioprocesses	Echantillon de culture de cellules CHO	Glc, Lact	●		1,5 mm	"interne"
Card et al., 2007	Rapid, Simultaneous Monitoring of Multiple components in Mammalian Cell culture with Near-Infrared Spectroscopy	Echantillon de culture de cellules HEK 293	Glc, Gln, Lact, NH4+	●		1 mm	"interne"

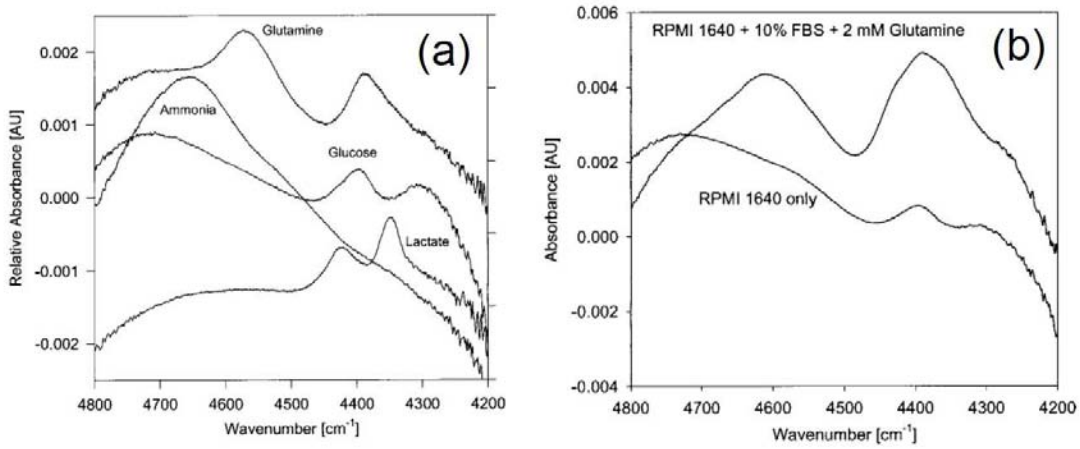


Figure 30. Exemple de spectres proche infrarouge de composés purs (a) et de milieu RPMI et RPMI additionné de sérum et de glutamine (b) d'après Rhiel *et al.*, 2002a.

Par ailleurs, la mise en œuvre de la spectroscopie proche infrarouge pour le suivi de bioprocédés nécessite une calibration qui peut s'avérer longue et délicate. En effet, cette calibration nécessite, non seulement des techniques de référence fiables, généralement réalisées hors-ligne, mais surtout l'obtention d'un grand nombre de données (100 à 200 points minimum) pour aboutir à un modèle suffisamment robuste. Cette calibration est basée sur la corrélation entre les résultats des analyses chimiométriques des spectres NIR et les données obtenues par les méthodes de référence (analyses enzymatiques, HPLC, etc…). Un exemple de calibration de la spectroscopie proche infrarouge pour l'évaluation des concentrations de glucose et de lactate est donné dans la figure 31.

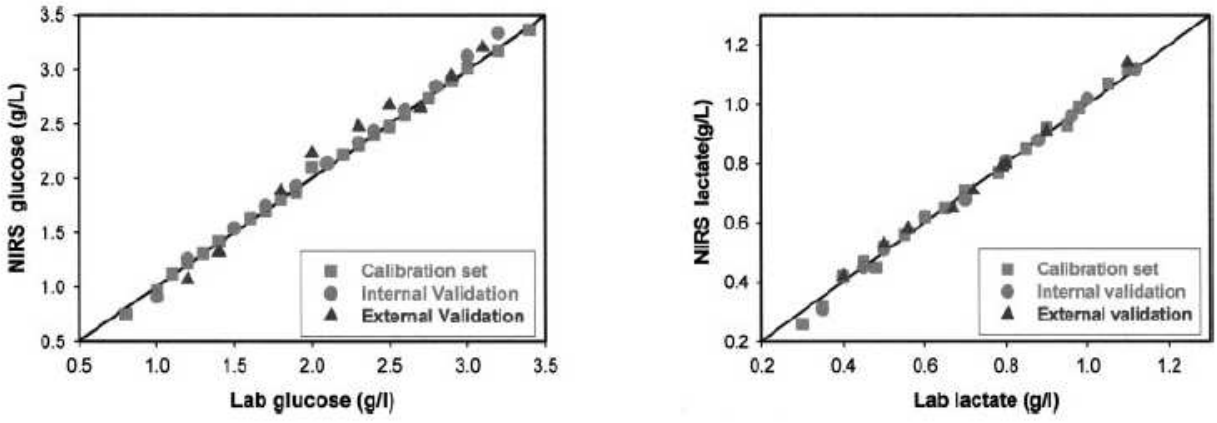


Figure 31. Corrélations entre les analyses NIR et les concentrations de référence pour le glucose (à gauche) et le lactate (à droite) (Arnold *et al.* 2003).

Cependant, cette méthode de calibration doit impérativement être réalisée avec des échantillons dans lesquels les concentrations des métabolites à quantifier ne sont pas corrélées (Riley *et al.*, 1998).

En effet, dans les procédés biologiques, les substrats ou produits quantifiés sont souvent liés par des relations stoechiométriques issues du métabolisme cellulaire (ex. glucose / lactate ; glutamine/ glutamate / ions ammonium). C'est pourquoi, diverses approches de calibration « externe », «interne » et « mixte », ont été utilisées.

- **Calibration « externe »**

La calibration externe est basée sur des échantillons dans lesquels les analytes à doser présentent des concentrations dé corrélées. Pour ce faire, les standards de calibration sont formulés à partir de solutions synthétiques de composition proche des milieux, ou à partir des milieux eux-mêmes. Des quantités connues ou inconnues des analytes étudiés sont ajoutées à ces solutions en suivant généralement une procédure de plan d'expérience (DoE). Cette méthode permet de réduire les effets de multi colinéarité et de créer un modèle indépendant pour chaque molécule quantifiée, aussi appelé modèle analyte-spécifique (Rhiel *et al.,* 2002a). Des régions spectrales d'analyses distinctes peuvent être un bon indicateur de l'indépendance des modèles de calibration pour deux analytes différents (Tableau 17).

Tableau 20. Régions spectrales en nombre d'ondes utilisées pour les calibrations NIR dans le cas du glucose, du lactate, de la glutamine et des ions ammonium.

	Type de calibration	**Glucose**	**Lactate**	**Glutamine**	**Ions ammonium**
		nombre d'onde (cm^{-1})			
Arnold et al., 2003	*interne*	1650 -1750 / 2260-2290	400-2200	1430-1470	2300-2350
Riley et al., 1998	*mixte*	4680-4280		4720-4490	
Rhiel et al., 2002	*externe*	4450-4300	4350-4320	4590-4550	4720-4350
Roychoudhury et al., 2007	*externe*	4497-5450 / 6097-7501	7156-8921		
Card et al., 2007	*interne*	4400-4600 / 5500-10000	4200-4800 / 5477-7500	5700-6200	4400-4650 / 5700-6200

Cette calibration "externe", méthode la plus utilisée dans les travaux de la littérature, est applicable uniquement en *hors-ligne* (Tableau 19). Cependant, en raison de la nature évolutive des bioprocédés, au cours desquels les molécules sont consommées ou produites, elle peut être critiquable et d'utilisation réduite. C'est pourquoi, une calibration « interne » doit être aussi envisagée.

- **Calibration « interne »**

La calibration interne est basée sur un nombre important de standards échantillonnés au cours du procédé de culture. Les échantillons, prélevés simultanément à l'acquisition du spectre NIR de la culture, sont ensuite quantifiés par des méthodes de référence de dosage *hors-ligne*. Par analyse multilinéaire, il est possible de générer un modèle de calibration pour un analyte, voire différents modèles dédiés à différents analytes (Arnold 2003). Cette calibration ne peut pas être analyte - spécifique car elle ne tient pas compte de la multi colinéarité entre les molécules quantifiées. Néanmoins, elle présente les avantages majeurs de simplifier la procédure de calibration et d'être plus flexible. En effet, toute calibration supplémentaire associée à une nouvelle molécule peut être effectuée ultérieurement uniquement en corrélant l'analyse externe de cette molécule avec les spectres proche infrarouge archivés. De plus, chaque nouvelle série d'échantillons générés par de nouvelles cultures peut être intégrée dans la calibration. Cette réactualisation permanente permet ainsi d'améliorer la robustesse de la mesure, argument non négligeable pour une utilisation industrielle (Arnold 2003). Enfin, les variations observées au cours du procédé sont directement prises en compte. En dépit de ces nombreux avantages, cette méthode de calibration « interne », qui semble plus en adéquation avec les approches PAT et QbD, reste très peu utilisée (Arnold 2003; Card *et al.,* 2007).

- **Calibration « mixte »**

La calibration « mixte », prend en compte les spécificités des deux calibrations précédentes. Elle a été initiée par Mc Shane *et al.,* (1998) avec un comparatif de deux types de calibrations. La première méthode était basée sur une calibration externe à partir de mélanges de solutions de glucose, lactate, glutamate, glutamine et ions ammoniums (calibration externe). La deuxième technique, baptisée calibration mixte, utilisait ce pool de solutions comme additifs dans des échantillons extraits de culture de fibroblastes, ensuite utilisés comme standards de calibration (calibration interne + calibration externe). Cette dernière technique a démontré que pour une bonne calibration il était nécessaire d'utiliser des prélèvements provenant de toutes les phases de culture (Riley *et al.,* 1998).

La spectroscopie proche infrarouge a été proposée récemment comme outil du PAT pour le suivi de culture de cellules animales. Néanmoins, à ce jour, aucune étude n'a été présentée avec des cellules adhérentes. Les travaux disponibles ont été principalement orientés sur les méthodes de calibration, sans approfondir l'application de cette technologie à un procédé de culture complet.

Objectifs des travaux

Objectifs des travaux

Le contexte bibliographique de notre étude démontre que peu de données sont disponibles sur la connaissance approfondie des procédés de culture de cellules Vero. Cette lignée cellulaire étant principalement utilisée pour la production de vaccins viraux, les travaux de la littérature ont essentiellement développé les aspects liés à la production virale, en s'intéressant moins à la physiologie de cette cellule. Par ailleurs, l'utilisation de milieux de culture sans sérum a mis en évidence la nécessité de mieux comprendre le métabolisme et les mécanismes de croissance et de mort cellulaires dans ces milieux. De plus, très peu de travaux traitent de la mise en œuvre d'outils de suivi en ligne de la croissance, de la mort ou du métabolisme cellulaires dans le cas des cultures de cellules adhérentes, ou de cellules Vero en particulier.

Ainsi, l'objectif général de nos travaux s'inscrit dans la dynamique générale de la stratégie PAT, en vue d'améliorer la connaissance et la maîtrise des procédés de culture de cellules Vero. Il intègre la compréhension du comportement cellulaire en milieu sans sérum, ainsi que l'évaluation de technologies de suivi en ligne.

Pour réaliser cet objectif, diverses approches complémentaires peuvent être envisagées :

- l'étude de la formulation du milieu de culture sans sérum, en vue d'observer l'impact de ses composés sur les performances du procédé;
- l'approfondissement de la physiologie et du métabolisme de la cellule Vero dans ce milieu, afin d'établir plus précisément ses caractéristiques et ses paramètres cinétiques;
- la mise en place de stratégies telles que la substitution de substrats par diverses autres molécules pour tenter d'améliorer l'efficacité du métabolisme des cellules Vero;
- la modification du mode opératoire du procédé, pour identifier l'intérêt de mises en œuvre telles que la recharge-récolte, le semi-continu ou le perfusé;
- l'amélioration du contrôle en-ligne du procédé par la mise en œuvre d'outils qui ne sont pas classiquement utilisés.

Dans ce contexte très général, nous avons choisi d'organiser nos travaux en quatre parties ciblées sur quelques-unes de ces approches (Figure 30).

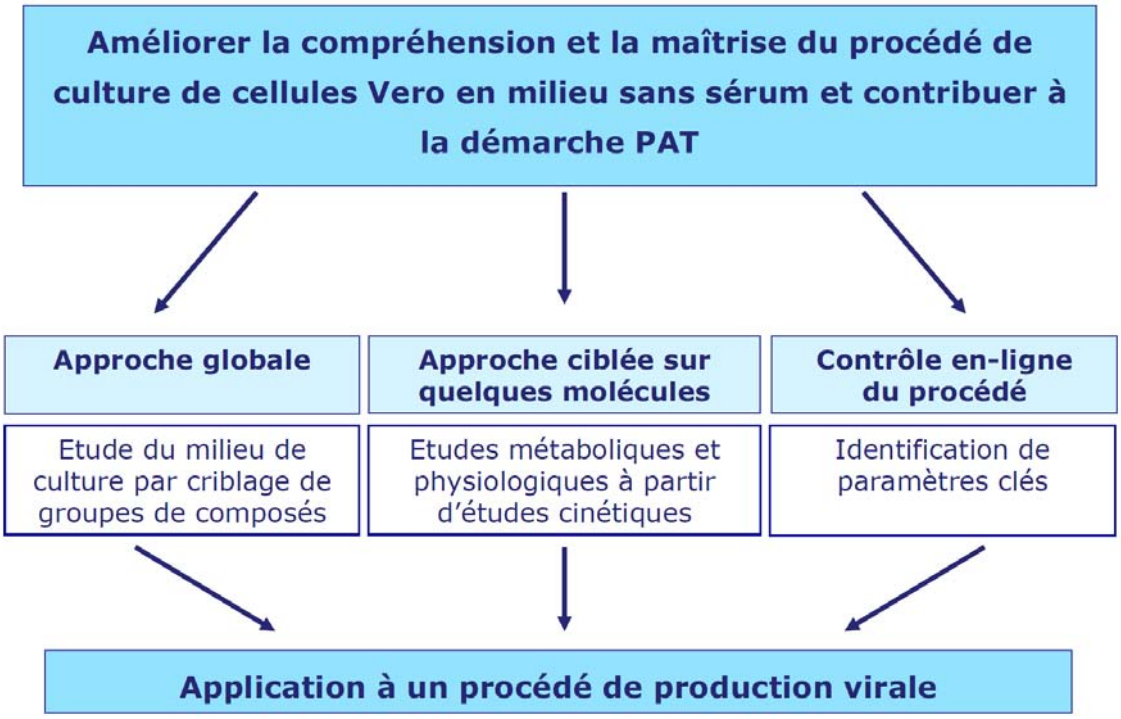


Figure 32. Démarches envisagées pour notre étude

Dans un premier temps, nous proposons une étude du milieu de culture, basée sur une approche globale et utilisant une méthode de criblage à petite échelle, adaptée au cas des cellules adhérentes. L'objectif est d'évaluer l'influence de groupes de composés issus du milieu de culture sans sérum sur la croissance des cellules Vero. En fonction des résultats positifs, négatifs ou neutres mis en évidence, une amélioration ou une simplification rapide du milieu de culture est attendue, après une validation en mode de culture agité.

Dans un second temps, nous développons une approche ciblée sur quelques molécules spécifiques du milieu de culture, afin d'acquérir une meilleure connaissance qualitative et quantitative du comportement des cellules Vero cultivées sur microporteurs en milieu sans sérum. L'analyse cinétique du métabolisme central, de la croissance et de la mort cellulaires dans différentes conditions de culture a pour objectif de mieux évaluer les besoins nutritionnels des cellules Vero afin de proposer des adaptations du milieu de culture, susceptibles d'améliorer l'efficacité du métabolisme carboné central.

Puis, le développement et l'évaluation de nouveaux outils d'analyse en-ligne, implantés sur le bioréacteur et adaptés à un procédé de culture de cellules sur microporteurs, sont proposés dans une troisième partie. Il s'agit d'apporter des éléments de connaissance, à la fois sur les cellules et sur certains composés du milieu, grâce à l'utilisation de capteurs mesurant des propriétés physiques ou chimiques du contenu du bioréacteur.

Enfin, dans une dernière partie, les principales améliorations du procédé de culture sont appliquées dans le cas d'un procédé de production du virus candidat vaccin contre la dengue, dans des conditions proches de celles du procédé industriel, afin de conforter les résultats précédemment focalisés sur le comportement cellulaire.

Matériel & méthodes

MATERIEL & METHODES

1.1. Culture cellulaire et production virale - 87 -
1.1.1. Cellules Vero - 87 -
1.1.2. Milieu de culture - 87 -
1.1.3. Culture des cellules Vero - 87 -
1.1.3.1 Culture en systèmes statiques - 87 -
1.1.3.2 Culture sur microporteurs en systèmes agités - 87 -
1.1.4. Production et récolte virale - 90 -

1.2. Croissance et viabilité cellulaires - 91 -
1.2.1. Observation et numération de cellules adhérées ou en suspension - 91 -
1.2.1.1 Observation microscopique - 91 -
1.2.1.2 Numération manuelle des cellules adhérées aux microporteurs - 91 -
1.2.1.3 Numération manuelle des cellules en suspension - 91 -
1.2.1.4 Numération automatisée en plaques 96-puits - 91 -
1.2.2. Mortalité cellulaire - 93 -
1.2.2.1 Cellules nécrotiques en suspension - 93 -
1.2.2.2 Cellules lysées - 93 -
1.2.2.3 Cellules apoptotiques - 93 -

1.3. Etude du métabolisme cellulaire - 95 -
1.3.1. Métabolites extracellulaires - 95 -
1.3.1.1 Dosages enzymatiques du glucose et du lactate - 95 -
1.3.1.2 Dosage de la glutamine - 95 -
1.3.1.3 Dosage des ions ammoniums - 95 -
1.3.1.4 Dosage des acides aminés - 95 -
1.3.2. Acides organiques intracellulaires - 97 -
1.3.2.1 Extraction des métabolites intracellulaires - 97 -
1.3.2.2 Dosage des acides organiques - 97 -

1.4. Calcul des paramètres cinétiques - 98 -
1.4.1. Paramètres caractéristiques de la croissance cellulaire - 98 -
1.4.2. Paramètres caractéristiques du métabolisme cellulaire - 98 -

1.5. Autres techniques analytiques - 99 -
1.5.1. Mesure en ligne de la capacitance cellulaire - 99 -
1.5.2. analyse des cellules et des surnageants de culture par spectroscopie Raman - 99 -
1.5.3. Analyse hors-ligne et en-ligne du milieu de culture par spectroscopie proche infrarouge - 100 -
1.5.3.1 Modèle de calibration proche infrarouge - 101 -
1.5.3.2 Evaluation de la qualité de prédiction de concentration - 102 -

1.1. Culture cellulaire et production virale

1.1.1. Cellules Vero

La lignée de cellules Vero provient de cellules de rein de singe vert isolées en 1962. Les cellules employées lors de cette étude sont issues d'une banque cellulaire de la société Sanofi Pasteur au passage 139 congelées en milieu sans sérum.

1.1.2. Milieu de culture

Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture confidentiel sans sérum et sans molécule d'origine animale. Il sera nommé par la suite milieu de référence (REF). Ce milieu est complexe et comprend entre autres des peptones, des extraits de levure et de riz et un agent protecteur contre les contraintes de cisaillement. Pour les études métaboliques, une formulation de ce milieu de culture sans glucose ni glutamine a été utilisée. Afin de réaliser les tests de criblage, le milieu de référence a été réparti en 10 groupes de composés qui ont été formulés selon la solubilité des éléments du milieu selon leur solubilité.

1.1.3. Culture des cellules Vero

1.1.3.1 Culture en systèmes statiques

La première étape de propagation cellulaire est réalisée en flacons de culture statique T 175 cm^2 ensemencés avec 45 000 $cell.cm^{-2}$. Les cultures de criblage sont réalisées dans des plaques de culture 96 puits avec un volume de milieu de 200 µl. Ces cultures sont placées dans un incubateur contrôlé à 37 °C et 5 % de CO_2.

1.1.3.2 Culture sur microporteurs en systèmes agités

Culture cellulaire en spinners

Les études métaboliques sont réalisées en spinners de 250 ml (Techné, France). La culture de cellules Vero en système agité implique l'utilisation de porteurs. Les microporteurs Cytodex-1 (GE Healthcare Life Sciences, Angleterre) permettent l'adhésion et la multiplication des cellules à leur surface. Préalablement à l'ensemencement des cultures, les microporteurs sont hydratés et autoclavés dans du PBS (90 mn à 120 °C) à un pH de 7,2. Puis, 24 h avant la culture, les microporteurs sont rincés deux fois dans 150 ml de milieu de culture utilisé pour la croissance cellulaire, préchauffé à 37 °C. Les microporteurs hydratés sont alors placés dans le spinner, en présence de 50 ml de milieu. L'ensemencement des cellules est réalisé à partir de cellules trypsinées ou décongelées, par l'addition du volume de suspension cellulaire adéquat pour atteindre la valeur d'ensemencement choisie.

Le volume de culture est alors complété à 250 ml avec du milieu préchauffé à 37 °C, avant de positionner les spinners dans un incubateur contrôlé à 37 °C et 5 % de CO_2.

Afin de maintenir une agitation douce des microporteurs, la vitesse d'agitation de la table magnétique (Techné MCSD 1045) sur laquelle les spinners sont posés est réglée à 45 rpm durant toute la culture. Les cellules ont été cultivées avec 2,5 $g.l^{-1}$ de microporteurs et ont toujours été ensemencées entre 20 000 ou 25 000 $cell.cm^{-2}$, 1 g de microporteurs hydratés correspondant à 4400 cm^2 de surface disponible. La propagation des cellules pour ensemencer les bioréacteurs a été réalisée selon les mêmes procédures en spinner à 250 et 500 ml.

Culture cellulaire en bioréacteurs

Les cultures en bioréacteurs ont été réalisées dans des réacteurs Pierre Guérin (France) de 2 l de volume utile (Figure 33) ou en réacteur industriel de 3 ou 5 l de volume utile selon l'étude. En plus des ports classiques DN12 pour les sondes pH et pO_2, les réacteurs Pierre Guérin comportent deux ports supplémentaires pour la sonde à capacitance (Fogale Nanotech, France) et la sonde NIR (Thermofisher Scientific, France). Les cultures sont régulées à pH 7,2 et à 37°c avec une concentration en oxygène dissous de 25 % de la saturation en air. Les cultures ont été agitées entre 80 et 100 rpm selon le stade de la culture. La régulation du pH est assurée par de la soude à 0,5 M et du CO_2 injecté dans le ciel du bioréacteur. Le contrôle de l'oxygène dissous est réalisé par un bullage d'oxygène pur dans le fond du bioréacteur. Afin d'éliminer les excédents de CO_2, un balayage d'air est également effectué dans le ciel du réacteur. Deux cannes plongeantes permettent, l'introduction du milieu de culture et des microporteurs ainsi l'ensemencement et le soutirage du PBS pour l'une, et le soutirage du milieu de culture lors de son renouvellement pour l'autre (Figure 33).

Avant l'ensemencement des cellules, le bioréacteur est stérilisé en autoclave avec les sondes plongeant dans 1 l de PBS. Le PBS est ensuite soutiré et remplacé par 1,4 l de milieu de culture stérile contenant les microporteurs préalablement hydratés et rincés. La température est régulée au moins 12 h avant l'ensemencement. L'ensemencement des cellules est alors réalisé en ajoutant 600 ml d'une suspension cellulaire de concentration adéquate pour obtenir une concentration cellulaire initiale de $2,75 \times 10^5$ $cell.ml^{-1}$ soit 25 000 $cell.cm^2$. Pour des raisons de confidentialité la concentration en microporteurs ne sera pas divulguée.

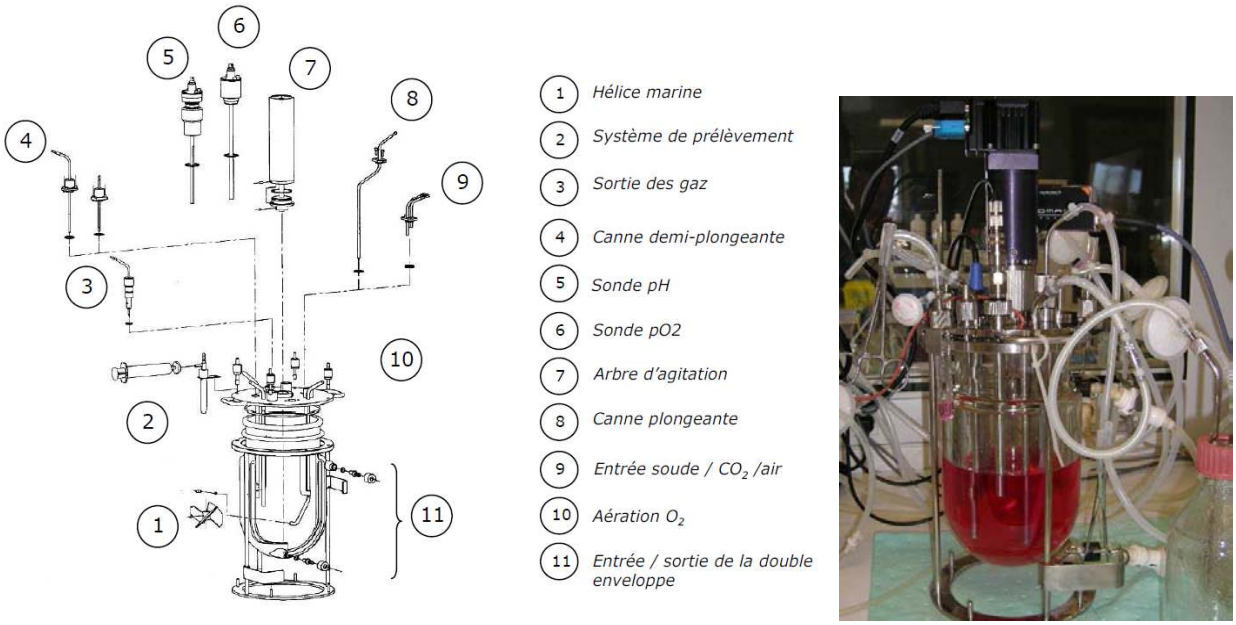


Figure 33. Représentation schématique (à gauche) et Photographie (à droite) d'un bioréacteur Pierre Guérin avec 2l de volume utile.

Des prélèvements de 12 ml sont réalisés deux fois par jour puis répartis comme suit : 4 ml pour la numération cellulaire au cristal violet, 6 ml pour la mesure externe du pH et le dosage des solutés, 1 ml pour la quantification de la mort cellulaire au cytomètre et 1 ml pour l'observation microscopique des cellules.

Trypsination des cellules

Afin d'éviter tout problème de contamination lié à l'utilisation de protéines animales, nous avons utilisé une trypsine recombinante, dont l'action est stoppée par un inhibiteur spécifique. La procédure de trypsination diffère entre la culture statique et la culture sur microporteurs. En mode statique, le tapis cellulaire est lavé deux fois avec du PBS, avant sa mise en contact avec la solution de trypsination. Après 10 min de trypsination à 37 °C, la trypsine est inhibée et les cellules sont collectées dans du milieu frais.

Pour la culture sur microporteurs, la technique de trypsination nécessite une décantation préalable des microporteurs et un soutirage de 80 % du surnageant de culture. Cependant, il s'agit d'un savoir faire clef dans le procédé industriel de culture de cellules Vero sur microporteurs, cette technique ne pourra pas être décrite plus en détail pour des raisons de confidentialité. Néanmoins, nous devons préciser que la suspension cellulaire collectée, utilisée pour les ensemencements ultérieurs, comprend après trypsination des microporteurs usagés.

Renouvellement du milieu de culture

Certaines cultures font l'objet d'un renouvellement de 80 % du volume du milieu de culture, soit, au cours de la phase exponentielle de croissance, soit, juste avant l'infection virale. La procédure de renouvellement de milieu nécessite la décantation préalable des microporteurs pendant 20 mn.

Lors d'une culture en bioréacteur, l'agitation et les régulations de pH, température et pO2 doivent être interrompues. Le surnageant de culture est soutiré à l'aide d'une canne plongeante réglée pour le volume adéquat, ou d'une pipette dans le cas des cultures en spinner. Le volume de culture est ensuite ajusté par du milieu de culture frais, préalablement porté à 37°C. Les régulations des paramètres opératoires sont remises en fonctionnement, en prenant soin de régler transitoirement la régulation de température 1 °C en dessous de la consigne habituelle pour ne pas atteindre lors de la mise en chauffe, une température délétère pour les cellules.

1.1.4. Production et récolte virale

Les productions virales ayant été réalisées sur le site industriel de Sanofi pasteur, certaines données confidentielles ne pourront pas être exposées. Ces productions ont été réalisées en bioréacteur de 3 ou 5 l de volume utile, après propagation des cellules en boîtes statiques ou en spinner. Les cultures ont été ensemencées selon le même protocole que pour les études cinétiques. Après 3 jours de culture, l'agitation est stoppée, 80 % du milieu de culture sont renouvelés, et l'infection par le virus candidat vaccin contre la dengue de sérotype 4 est réalisée. La production virale dure 4 jours post-infection au cours desquels des prélèvements journaliers permettent de suivre l'augmentation du titre viral et de suivre la croissance et le métabolisme cellulaire. La récolte du virus est réalisée 4 jours après l'infection. Le surnageant de culture est ensuite clarifié par filtrations successives. Les différentes analyses du virus sont réalisées par Sanofi pasteur, à partir d'un échantillon congelé à -20 °C en présence ou non de stabilisant.

1.1.5. Titration du virus

Le titre viral a été quantifié par la méthode TICC 50 correspondant au dosage du virus infectieux et décrite par (Schoepp *et al.,* 1984; Xie *et al.,* 2008). L'ARN viral est quantifié par PCR quantitative (Sadon *et al.,* 2008).

1.2. Croissance et viabilité cellulaires

1.2.1. Observation et numération de cellules adhérées ou en suspension

1.2.1.1 Observation microscopique

Une observation des cellules par microscopie optique est réalisée chaque jour, pour les cultures statiques, et lors de chaque prélèvement pour les cultures en mode agité. Celle-ci permet de suivre l'évolution du recouvrement des boîtes ou des microporteurs ainsi que la morphologie cellulaire.

1.2.1.2 Numération manuelle des cellules adhérées aux microporteurs

Les cellules attachées sur les microporteurs sont dénombrées par coloration de leur noyau par le cristal violet selon la méthode de Sandford *et al.,* 1951. Après décantation des microporteurs, le surnageant est éliminé et ceux-ci sont rincés par 10 ml de PBS. Le volume est réajusté à 4 ml par une solution de cristal violet à 0,1 % (Sigma, Etats Unis) et d'acide citrique à 0,1 M pour provoquer la lyse cellulaire. Les noyaux cellulaires sont ensuite comptés sur une cellule de Fuchs-Rosenthal après au moins 1 h d'incubation à 37 °C. Pour les cellules de Fuchs-Rosenthal, le calcul de la concentration cellulaire est défini par l'équation suivante. L'erreur de mesure a été évaluée entre 5 et 10 % sur une moyenne de quatre comptages.

(Eq. 4) $$C = \frac{(N \times 10^3 \times a)}{3{,}2}$$

C : *concentration cellulaire (cell.ml^{-1})*
N: nombres de noyaux comptés
a : facteur de dilution

1.2.1.3 Numération manuelle des cellules en suspension

Le dénombrement des cellules en suspension dans le surnageant de culture ou des cellules trypsinées a été réalisé directement à l'état frais sur une cellule de Thomas. La densité cellulaire correspond à la moyenne de six comptages avec un pourcentage d'erreur variant de 5 à 10 % (Nielson *et al.,* 1991).

(Eq. 5) $$C = (N' \times 10^4 \times a)$$

C : *concentration cellulaire (cell.ml^{-1})*
N: nombres de cellules comptés
a : facteur de dilution

1.2.1.4 Numération automatisée en plaques 96-puits

Le Cellscreen® (Innovatis, Allemagne) a été utilisé pour la numération de cellules en plaques 96-puits. Cet appareil permet de quantifier la densité cellulaire grâce à un analyseur d'image digital à partir de plusieurs images de chaque puits (Figure 34). Les composants de base du système sont : un microscope inversé (IX 50, Olympus) équipé avec un objectif 10 x ou 4 x, une caméra CCD (KPF100, Hitachi) de 1024 x 1024 pixel et un plateau motorisé x-y. Les images enregistrées sont analysées par un logiciel de reconnaissance de forme capable de détecter les cellules dans le puits.

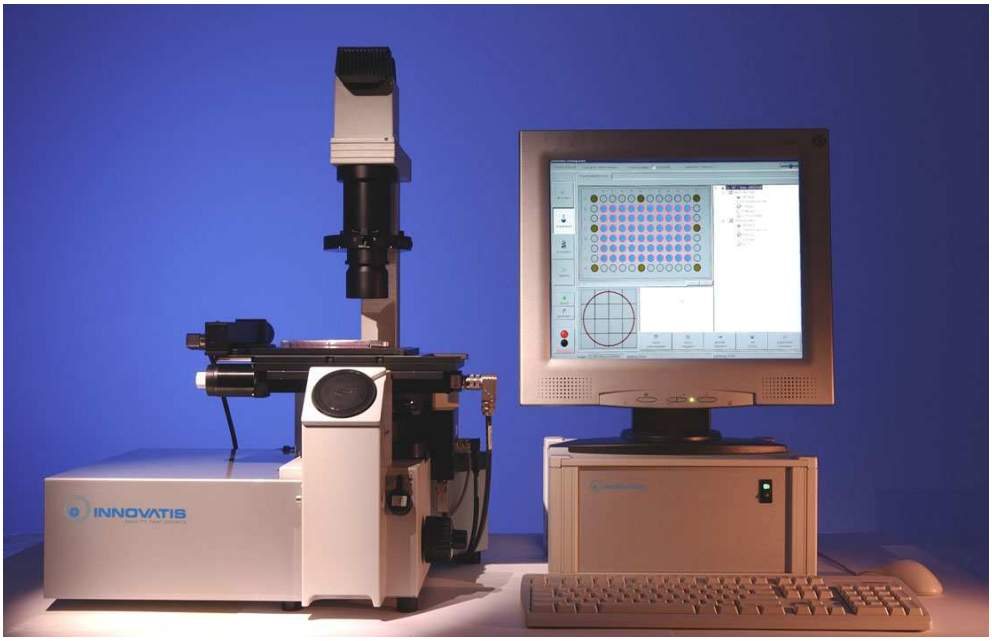


Figure 34. Système Cellscreen®

Cet appareil peut, soit, réaliser une numération des cellules en suspension avec le module PS en générant des données en concentration cellulaire, soit, déterminer un pourcentage de surface de puits occupé avec le module PA dans le cas de cellules adhérentes. La stratégie de reconnaissance est basée sur des paramètres de taille et de circularité des cellules pour le module PS, et sur une analyse des niveaux de gris pour délimiter le tapis cellulaire dans le module PA (Figure 35). De plus, un contrôle visuel a été réalisé à partir des images enregistrées, et les puits traités de façon inappropriée ont été supprimés.

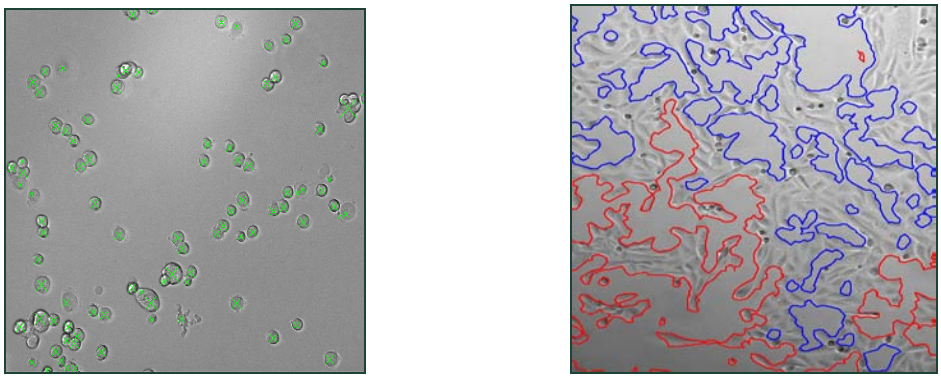


Figure 35. A gauche : numération d'une suspension cellulaire (croix vertes). A droite : détermination de la surface occupée par des cellules adhérées (lignes intérieures bleues, lignes extérieures rouges).

Dans cette étude, le module PS a uniquement été utilisé pour la numération de cellules juste après l'ensemencement ou après la trypsination des puits, alors que le module PA a été utilisé pour suivre la croissance des cellules Vero durant toute la durée de la culture. Chaque condition a été répliquée 8 fois et la déviation standard de l'erreur de numération sur huit puits représente moins de 10 % de la valeur quantifiée.

1.2.2. Mortalité cellulaire

1.2.2.1 Cellules nécrotiques en suspension

Les cellules mortes en suspension dans le surnageant de culture sont dénombrées sur cellule de Thoma par un colorant d'exclusion, le bleu Trypan (Sigma, Etats Unis). Ce colorant, dilué à 10 %, permet de distinguer les cellules mortes (bleues) des cellules vivantes (blanches). Seules les cellules mortes nécrotiques sont colorées du fait de leur membrane cytoplasmique poreuse. Ainsi, par cette méthode, sont quantifiées sans distinction, les cellules nécrotiques et les cellules en nécrose secondaire issues du processus d'apoptose.

1.2.2.2 Cellules lysées

Le dénombrement des cellules lysées est réalisé par une méthode indirecte, le dosage de l'activité LDH libérée dans le surnageant de culture au moment de la lyse. L'activité de la LDH est mesurée par analyse enzymatique (kit LDH PAP ref. LDSL-0420, Ellitech, France) sur un automate *Vitalab Selectra E* (Vital Scientific). Afin de pouvoir en déduire le nombre de cellules lysées, il est nécessaire de déterminer au préalable l'activité LDH intracellulaire par cellule viable. A partir de la méthode développée par Goergen *et al.* (1993), le contenu intracellulaire en LDH a été déterminé pour les cellules Vero à différents temps de la culture correspondant à une viabilité supérieure à 90 %, à partir de 10^5 cellules lysées par une solution de Tween-20 (2%) / PBS. L'activité intracellulaire moyenne de la LDH dans les cellules Vero a été établie de $1{,}38 \times 10^{-6}$ U. 10^{-5} cellules avec une erreur de $0{,}1 \times 10^{-6}$ U.10^{-5} cellules. Le nombre de cellule lysées est alors déduit par la formule suivante.

(Eq. 6) $$C_{lys} = LDH_{surn} / LDH_{intra}$$

avec C_{lys} *: concentration en cellules lysées (cell.ml^{-1}) ;*

LDH_{surn} *: LDH dans le surnageant de culture (U.ml^{-1})*

LDH_{intra} *: LDH par cellules (U.cell^{-1})*

1.2.2.3 Cellules apoptotiques

La caractérisation et la quantification de l'apoptose chez les cellules Vero attachées sur leur support ont été réalisées par le cytomètre Guava Easycyte (Guava Technologies, France). L'acquisition des résultats utilise le module Express Pro, et leur traitement est fait avec le logiciel Cyflogic (CyFlo Ldt, Finlande). Les paramètres de taille et de granulosité cellulaires, FSC et SSC, sont mesurés en mode logarithmique, la population des cellules analysées ayant été définie à partir de cellules témoins viable à 95 %, afin de ne pas tenir compte des débris cellulaires. La concentration cellulaire minimale pour l'analyse est de 10^5 cell.ml^{-1}. La procédure de trypsination est la même que celle employée pour la propagation cellulaire (paragraphe 1.1.3).

La suspension cellulaire est ensuite diluée, pour obtenir une concentration comprise entre 10^4 et 5×10^5 cell.ml^{-1}, puis additionnée de BSA afin d'obtenir une concentration à 2 % de BSA dans l'échantillon. L'addition de BSA permet de saturer les sites non spécifiques de liaison des marqueurs fluorescents. Les phases précoces de l'apoptose cellulaire sont ensuite détectées avec le marquage par l'annexin V de la phosphatidyl-sérine, protéine transloquée à l'extérieur de la membrane cellulaire dans les premières phases de l'apoptose. En revanche, les phases tardives de l'apoptose sont mises en évidence grâce au marqueur 7-AAD, un intercalant de l'ADN qui pénètre dans les cellules lors de la perméabilisation progressive de leur membrane (kit Guava Nexin, ref. , Guava Technologies, France). Le traitement des données donne accès aux différentes fractions de populations cellulaires marquées et donc au pourcentage de cellules apoptotiques et nécrotiques (Figure 36).

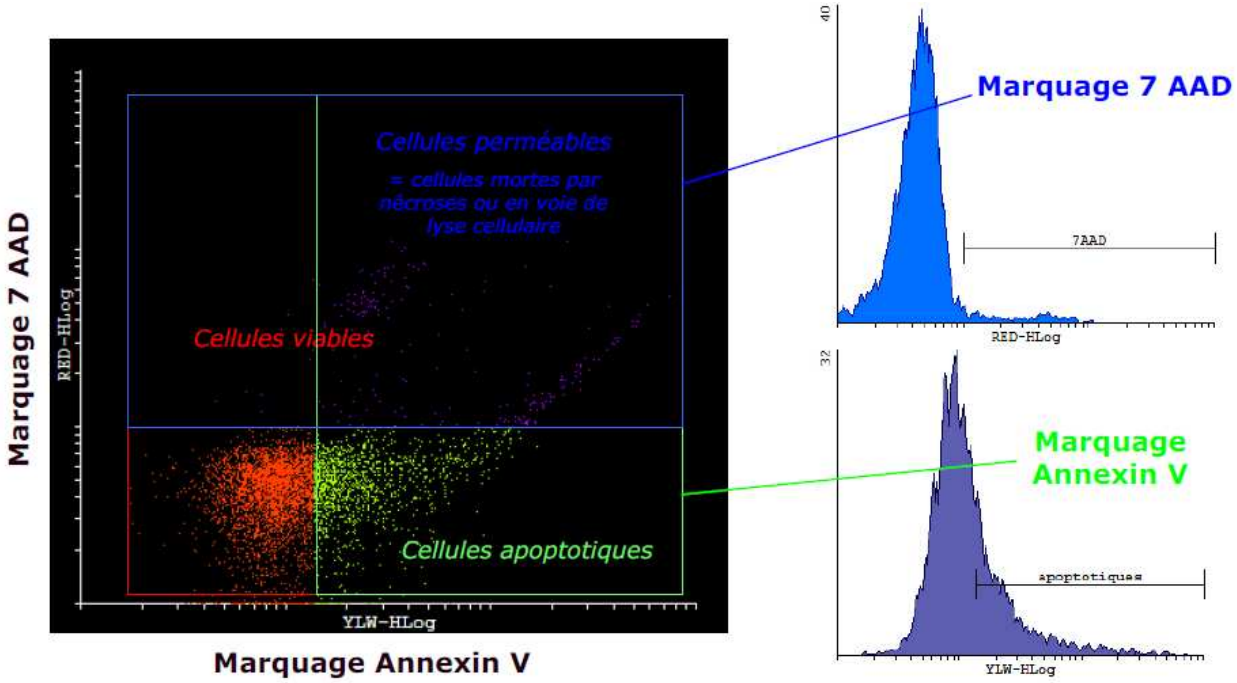


Figure 36. Quantification de l'apoptose cellulaire précoce et tardive par cytométrie

La mise au point de la technique de quantification a été réalisée grace à des témoins où l'induction de l'apoptose et de la nécrose cellulaires a été accomplie respectivement par addition d'actinomycine D et d'azide de sodium. Cette induction a été réalisée sur des tapis cellulaires cultivés dans des conditions standard en plaques 6 puits après 2 jours de culture, en utilisant différentes concentrations d'inducteurs, pendant 2 à 6 h. Les concentrations d'inducteurs étaient de 10, 15, 20 et 25 µM pour l'actinomycine D et de 1 g.l^{-1} pour l'azide de sodium. Comme le phénomène d'apoptose est progressif, toutes ces conditions on été utiles pour mettre en place les limites de marquage.

1.3. Etude du métabolisme cellulaire

1.3.1. Métabolites extracellulaires

1.3.1.1 Dosages enzymatiques du glucose et du lactate

Le dosage du glucose et du lactate a été réalisé par l'automate Vitalab Selectra E préalablement cité, grâce à des kits enzymatiques (Glucose PAP, ref. GPSL 0500, Elitech, France ; Lactate-PAP, ref. 61192, Biomérieux, France). L'erreur de ces dosages a été évaluée à moins de 5 %.

1.3.1.2 Dosage de la glutamine

Le dosage de la glutamine a aussi été réalisé par kit enzymatique, mais en plaque 96 puits avec le spectromètre Multiskan MCC/340 (Titertek Instruments, Etats unis). Ce dosage est basé sur le principe du dosage du glutamate avec une étape préliminaire de transformation de la glutamine en glutamate par l'asparaginase (ref. 102903, Roche, Suisse). Le dosage du glutamate est ensuite réalisé à 492 nm grâce à un kit de dosage (ref. 139092, Roche, France). La concentration en glutamine est déterminée par différence entre le glutamate du surnageant de culture, et l'ensemble « glutamate + glutamine » après transformation par l'asparaginase. L'erreur de mesure a été estimée à 20 %.

1.3.1.3 Dosage des ions ammoniums

Les ions ammonium sont analysés par une électrode à diffusion gazeuse (Orion, Etats Unis). En milieu fortement alcalin, ils sont convertis en NH_3 gazeux. Ainsi, avant chaque mesure, 3 ml d'échantillon de culture sont additionnés de 3 ml de soude à 0,5 N afin que le pH de la solution finale soit proche de 12. L'ammoniaque formée fait alors varier le potentiel de l'électrode par diffusion au travers de la membrane. La loi de Nernst qui régit cette variation de potentiel permet de calculer la concentration d'ions ammonium (Eq. 7). L'étalonnage est réalisé avec des solutions de NH_4Cl de molarité connue allant de 0,5 à 20 mM. L'erreur de dosage pour cette méthode est de 10 %.

Eq. 7 $$E = E_0 - S \times \log[NH_3]$$

E: *potentiel mesuré (mV)*
E_0 : *potentiel de référence (mV)*
S: *pente de la courbe*
$[NH_3]$: *concentration en ammoniac (mM)*

1.3.1.4 Dosage des acides aminés

Les acides aminés et le di-peptide Glutamax (Sigma) ont été quantifiés par HPLC (Shimadzu Corporation) après une dérivatisation à l'ortho-phthalaldéhyde (OPA) réalisée avant l'injection dans la pré-colonne.

La séparation est réalisée à 45 °C par une colonne Shim-pack CLC-ODS en phase inverse (Shimadzu Corporation). La détection est faite par un détecteur à fluorescence à 475 nm. Seule la proline n'est pas quantifiée car elle nécessite une longueur d'onde de détection particulière à 530 nm (Figure 37).

Name	Ret. Time	Area	Area %	Conc.	Units
ASP	4.416	155672	0.637	0.081	mmol/l
GLU	7.332	223944	0.916	0.109	mmol/l
ASN	14.225	506945	2.074	0.262	mmol/l
SER	14.915	166780	0.682	0.428	mmol/l
GLN	17.122	7225551	29.562	3.277	mmol/l
GLY	18.838	191453	0.783	0.089	mmol/l
THR	19.496	144860	0.593	0.692	mmol/l
ARG	24.667	224041	0.917	0.105	mmol/l
ALA	25.391	3802884	15.559	1.542	mmol/l
TYR	30.743	789014	3.228	0.347	mmol/l
HIS	35.269	2400601	9.822	0.953	mmol/l
VAL	36.371	652848	2.671	0.246	mmol/l
MET	37.185	620844	2.540	0.191	mmol/l
TRP	41.275	202304	0.828	0.095	mmol/l
PHE	41.426	2710548	11.090	1.000	mmol/l
ILE	41.998	1144763	4.684	0.451	mmol/l
LEU	43.659	2783295	11.387	1.089	mmol/l
LYS	45.918	495443	2.027	0.804	mmol/l

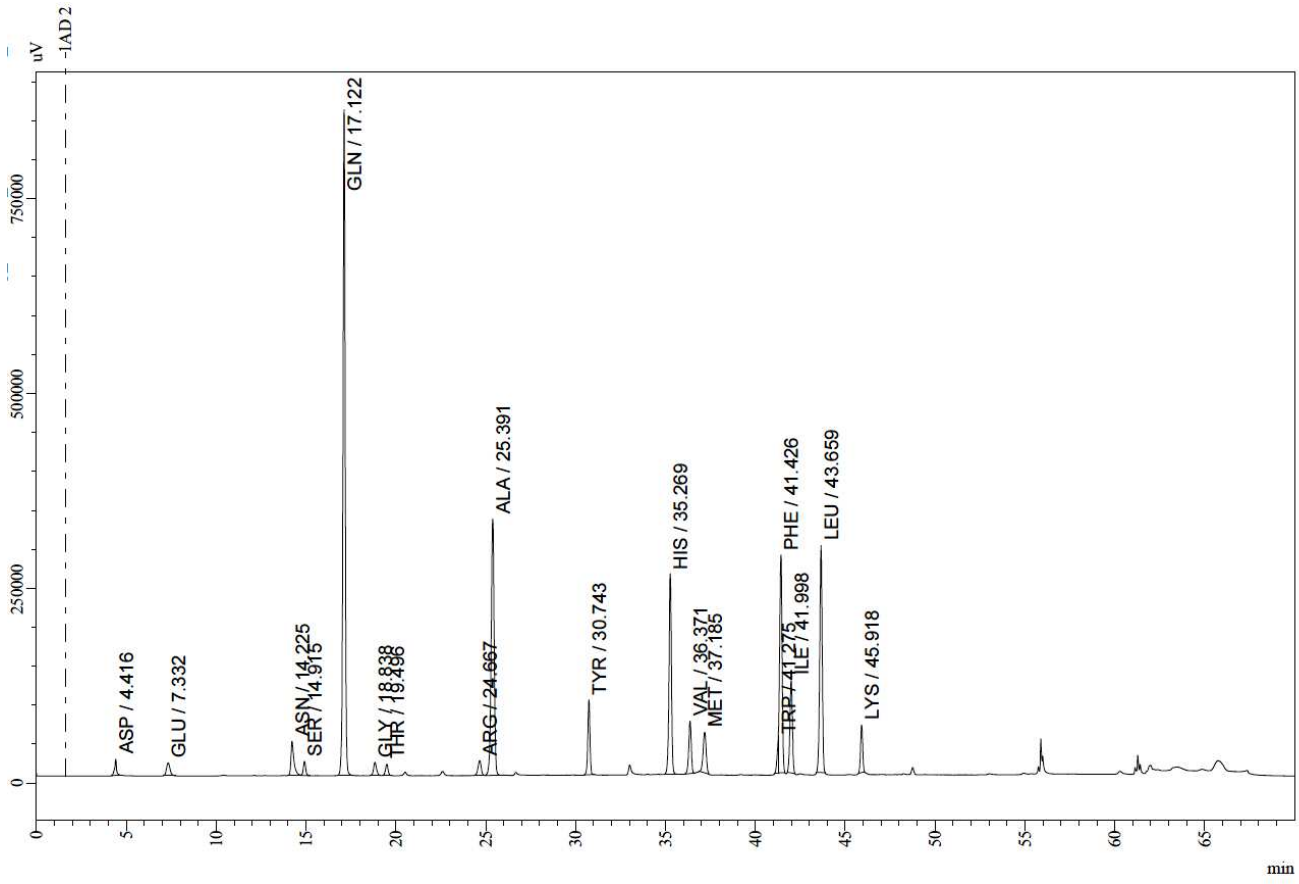


Figure 37. Chromatogramme d'un dosage d'acides aminés dans un surnageant de culture avec les concentrations quantifiées pour chaque acide aminé.

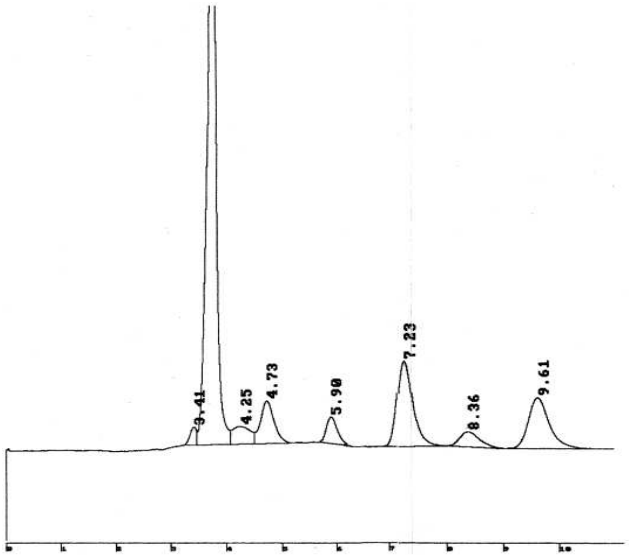
1.3.2. Acides organiques intracellulaires

1.3.2.1 Extraction des métabolites intracellulaires

Une nouvelle technique d'extraction a été développée pour pouvoir quantifier les métabolites intracellulaires de cellules adhérées sur microporteur. Cette technique a été adaptée à partir de deux protocoles utilisés pour des cellules en suspension (Ryll *et al.,* 1991; Lu *et al.,* 2003). L'extraction a été réalisée à partir de 10 ml d'échantillon de culture, comportant au moins 7×10^6 cellules. Toutes les étapes d'extraction ont été réalisées en dessous de 0 °C, les échantillons et les réactifs étant maintenus dans de la glace additionnée de sel ; les étapes de centrifugation ont aussi été réalisées à 0 °C. Après deux étapes successives de décantation puis rinçage des microporteurs avec 10 ml de NaCl 0.9 %, le surnageant est soutiré avec soin pour éviter de prélever des microporteurs. Lors du dernier rinçage, le volume de l'échantillon est ajusté précisément à 1 ml. Les cellules adhérées sur les microporteurs sont ensuite lysées par 200 µl d'acide perchlorique à 0,3 mM, pendant 10 mn avec de brèves étapes de vortex chaque 2 mn. Après une centrifugation de 10 mn à 12 000 g, le surnageant est collecté et neutralisé par 100 µl de KOH à 0,6 mM pendant 5 mn. Suite à une dernière étape de centrifugation de 10 mn à 12 000 g, le surnageant est récupéré et stocké à -80 °C.

1.3.2.2 Dosage des acides organiques

Les acides organiques intracellulaires, tels que le pyruvate, le lactate et le citrate ont été quantifiés par HPLC (Waters, Etats Unis) à 65 °C sur une colonne polypore H (Brownlee Lab.) en utilisant un gradient d'élution isocratique avec d'une solution de 0,04M de H_2SO_4 et un détecteur UV réglé à 210 nm (Figure 38).



NOM	TR	AIRE	CONCENTRATION	UNITE
1	3.41	103277		
2	3.75	4931761		
3	4.25	262975		
CITRATE	4.73	497108	0.09042	G/L
PYRUVATE	5.90	253716	0.01126	G/L
LACTATE	7.23	1065646	0.26863	G/L
7	8.36	249167		
8	9.61	919908		

Figure 38. Chromatogramme d'un dosage d'acides organiques intracellulaires avec les concentrations de citrate, pyruvate et lactate correspondantes.

1.4. Calcul des paramètres cinétiques

Les courbes au cours du temps des données expérimentales sont lissées et interpolées par régression spline grâce au logiciel Kyplot (KyensLab Inc., Japon). Les vitesses spécifiques et les rendements instantanés sont calculés à partir des lissages en utilisant un pas de 1 h.

1.4.1. Paramètres caractéristiques de la croissance cellulaire

La vitesse spécifique maximale de croissance, μ_{max}, est calculée globalement à partir de la pente de l'évolution logarithmique de la concentration de cellules attachées sur le support, X. Les vitesses spécifiques instantanées de croissance sont calculées à chaque instant à partir des courbes expérimentales lissées.

Eq. 8. $\mu_{\max} = \Delta \ln X / \Delta t$ (h^{-1})

Eq. 9. $\mu_{inst} = dX/(dt \times X_i)$ (h^{-1})

Eq. 10. $Tg = \ln(2)/\mu_{\max}$ (h)

1.4.2. Paramètres caractéristiques du métabolisme cellulaire

En réacteur fermé, les vitesses de consommation de substrat, S, et de produit, P, sont décrites par les bilans suivants.

Eq. 11. $r_s = -dS/dt$ ($mM.h^{-1}$)

Eq. 12. $r_p = dP/dt$ ($mM.h^{-1}$)

Les vitesses spécifiques instantanées de consommation de glucose, Glc, et de glutamine, Gln, sont calculés à chaque instant de la culture à partir des courbes expérimentales lissées.

Eq. 13. $q_{Glc} = -dGlc/(dt \times X_i)$ ($mM.h^{-1}.10^{-5}cell$)

Eq. 14. $q_{G\ln} = -dG\ln/(dt \times X_i)$ ($mM.h^{-1}.10^{-5}cell$)

De la même façon, les vitesses spécifiques instantanées de productions de lactate, Lact, et d'ions ammoniums, NH_4^+, sont calculées avec les équations suivantes.

Eq. 15. $q_{Lact} = -dLact/(dt \times X_i)$ ($mM.h^{-1}.10^{-5}cell$)

Eq. 16. $q_{NH4^+} = -dNH_4^+/(dt \times X_i)$ ($mM.h^{-1}.10^{-5}cell$)

Les rendements de produit généré par rapport au substrat, $Y_{P/S}$, et de cellules formées par rapport au substrat consommé, $Y_{X/S}$, sont calculés selon les formules suivantes :

Eq. 17. $Y_{P/S} = (P_i - P_{i-1})/(S_{i-1} - S_i)$ (M/M)

Eq. 18. $Y_{X/S} = (X_i - X_{i-1})/(S_{i-1} - S_i)$ (cell/M)

1.5. Autres techniques analytiques

1.5.1. Mesure en ligne de la capacitance cellulaire

Le suivi en-ligne de la capacitance cellulaire est réalisé par le système Fogale Biomass® (Fogale Nanotech, France). La figure 39 présente l'unité de contrôle et la sonde stérilisable qui peut être implantée dans un port DN12 classique de bioréacteur. Le principe de mesure de cette technique a déjà été détaillé dans la partie 1.5.2 de l'étude bibliographique.

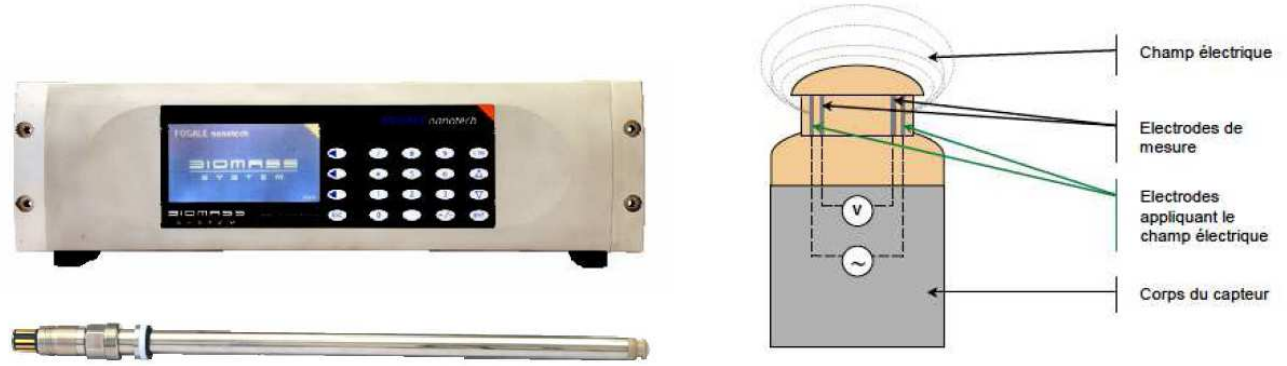


Figure 39. Système Fogale Biomass (unité de contrôle et sonde à gauche, détail de la sonde à droite)

Pour notre étude, la sonde Fogale Biomass a été implantée avant autoclavage sur un port DN12 des réacteurs Pierre Guérin. L'acquisition de la permittivité est démarrée 24 h avant l'ensemencement des cellules afin de stabiliser la ligne de base du milieu et des microporteurs. L'acquisition de la permittivité et de la conductivité de la suspension cellulaire est réalisée toutes les 6 mn. Le scanner de fréquence démarré en même temps que le module Biomass permet l'acquisition à différentes fréquences de la permittivité et du paramètre fc. Les cellules sur les microporteurs sont également comptées hors ligne et analysées par cytométrie afin d'identifier les corrélations entre les mesures en ligne du capteur et les paramètres cellulaires.

1.5.2. Analyse des cellules et des surnageants de culture par spectroscopie Raman

Des acquisitions de spectres Raman des surnageants de culture et de culots cellulaires ont été réalisées par microspectroscopie Raman de façon hors ligne, au Laboratoire de Spectroscopie Biomoléculaire de Reims (UMR MEDyC, CNRS 6237) avec un microscope confocal couplé à un spectromètre Raman LabRam 1 (Horiba Jobin-Yvon) équipé d'un laser (longueur d'onde d'excitation de 785 nm). Une platine motorisée en x-y et un objectif motorisé en z permettent de réaliser des images 3D (x,y,z) (Figure 40).

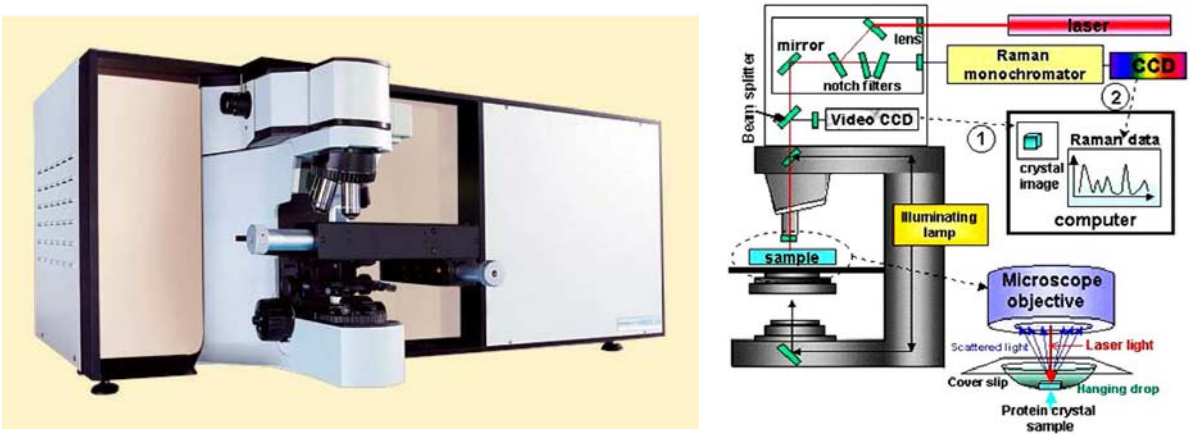


Figure 40. Spectromètre Raman couplé à un microscope (à gauche)**.** Principe de fonctionnement du spectromètre Raman couplé à un microscope (à droite)

L'acquisition des spectres a été réalisée dans la zone de longueur d'onde comprise entre 100 et 3450 cm^{-1}, avec une résolution de 8 cm^{-1}. Pour chaque échantillon, 3 spectres ont été enregistrés puis moyennés. La correction de la ligne de base ainsi que la normalisation du spectre par la bande de l'eau (1640 cm^{-1}), composé majoritaire de ces échantillons, ont ensuite été réalisées.

1.5.3. Analyse hors-ligne et en-ligne du milieu de culture par spectroscopie proche infrarouge

L'acquisition des spectres proche infrarouge (NIR) a été réalisée avec un spectromètre Antaris II (Thermofisher Scientific, France) pour les analyses en-ligne et hors-ligne (Figure 41).



Figure 41. Spectromètre proche infrarouge Thermofisher scientific Antaris II et sonde *in-situ*

Les spectres ont été enregistrés en triplicat dans une zone de longueur d'onde allant de 4 000 à 10 000 cm^{-1}, avec une résolution optique de 8 cm^{-1}, chaque spectre représentant 128 spectres moyennés. Le spectre de l'air a été choisi comme référence.

Les analyses hors-ligne ont été réalisées dans des cuvettes en quartz de 2 mm de trajet optique, sur des échantillons préalablement filtrés. Pour les mesures *in-situ*, une sonde à fibre optique et travaillant en transflectance, a été installée directement au sein du bioréacteur *via* un port classique de diamètre DN12 (Figure 42). Cette sonde, réalisée spécifiquement pour notre étude, présente un trajet optique variable maximal de 20 mm et des trajets optiques réglables de 0,5, 1 et 2 mm. En transflectance, les radiations NIR sont réfléchies par un miroir, ce qui implique de prendre en compte un trajet optique réel doublé au niveau des intensités mesurées. Pour nos travaux, après une étude préliminaire, le trajet optique a été fixé à 1 mm, soit un trajet effectif de 2 mm. De façon simultanée à chaque acquisition de spectres, un prélèvement de 5 ml a été réalisé afin de quantifier les métabolites d'intérêt.

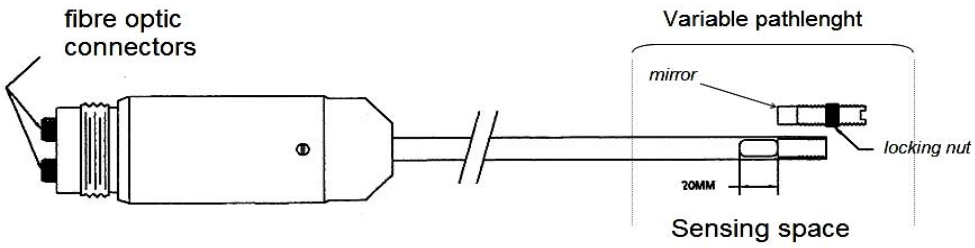


Figure 42. Sonde proche infrarouge à trajet optique variable implantable *in-situ* et stérilisable.

1.5.3.1 Modèle de calibration proche infrarouge

Le traitement des données spectrales a été réalisé par le logiciel TQ Analyst (Thermofisher Scientific, France) sur une gamme spectrale allant de 5 400 à 9 000 cm^{-1}. Ce logiciel combine une analyse en composante principale (ACP), qui permet d'extraire du spectre les tendances majeures sous la forme de composantes principales (Figure 43), et une régression des moindres carrés (PLS), qui permet de corréler une combinaison linéaire de ces composantes principales aux données obtenues par les méthodes de quantification de référence.

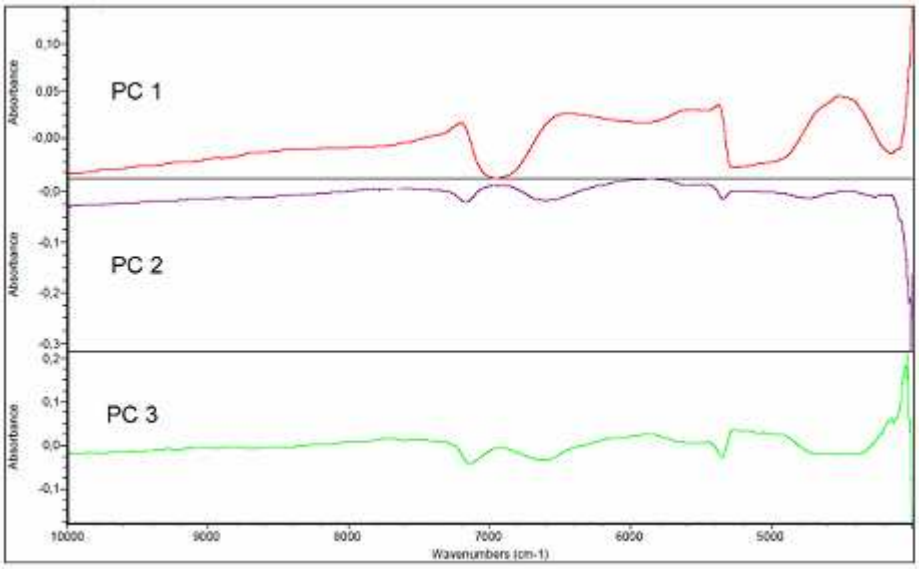


Figure 43. Analyse d'un spectre NIR en composantes principales

Deux calibrations distinctes ont été établies pour le glucose et le lactate, en adaptant pour chaque analyte le domaine spectral et le nombre de composantes principales introduites dans la régression PLS (nombre de facteur PLS). Dans le cas du glucose, la dérivée première des spectres a été réalisée pour déconvoluer les pics superposés, alors que pour le lactate, seul le spectre brut a été employé.

Lors de la calibration, deux traitements successifs ont été mis en œuvre à partir d'une base de données rassemblant les spectres NIR d'échantillons standard de concentrations connues. Dans un premier temps, les corrélations ont été établies entre la concentration du métabolite d'intérêt et les évolutions spectrales extraites de l'analyse PCA et PLS. La qualité de la calibration a été évaluée par le coefficient de corrélation (r^2), et par l'erreur standard définie comme l'erreur moyenne entre les valeurs réelles de concentration et les valeurs calculée selon le modèle linéaire établi (SEC). Dans un second temps, la robustesse de la calibration a été évaluée en réalisant une calibration, appelée validation croisée (cross-validation) pour laquelle 2 échantillons standard sont soustraits aléatoirement de l'analyse PCA/PLS avant la procédure de corrélation. Cette opération est répétée pour tous les standards et permet de déterminer un coefficient de corrélation de la validation (r^2) et une erreur moyenne de cette validation croisée (SECV).

1.5.3.2 Evaluation de la qualité de prédiction de concentration

Les concentrations de lactate et de glucose dans des échantillons inconnus ont été quantifiées à partir des modèles de calibration préétablis. L'erreur standard moyenne entre la concentration réelle de ces échantillons et la concentration calculée à partir des corrélations a permis alors d'évaluer la fiabilité de la méthode par le calcul de l'erreur standard de prédiction, SEP.

Résultats & discussion

Chapitre 1

1. Criblage de groupes de composés d'un milieu de culture sans sérum pour la culture de cellules Vero

CHAPITRE 1

Introduction - 109 -
1.1. Criblage rapide de milieux de culture sans sérum pour des cellules Vero adhérentes par une méthode à petite échelle et non invasive. - 111 -
Conclusion - 127 -

Introduction

Dans ce chapitre, nous développons la première approche, dite "globale", de notre étude de la culture de cellules Vero en milieu sans sérum (Figure 32). L'objectif est d'évaluer si le milieu de culture de référence sans sérum, dans lequel nos cellules sont adaptées, est optimal pour la croissance des cellules Vero. Plus précisément, ces travaux visent à identifier rapidement des effets activateurs ou inhibiteurs de certains groupes de composés sur la croissance des cellules Vero, en vue de proposer une adaptation du milieu aux besoins spécifiques des cellules Vero. Cette première étude permettra d'envisager, par la suite, une étude plus ciblée de l'influence de quelques composés clés sur la croissance et le métabolisme des cellules. Ce chapitre correspond donc à une étape préliminaire de la procédure d'amélioration d'un milieu de culture sans sérum pour la lignée cellulaire Vero cultivée en mode discontinu.

Ce milieu de culture comprend approximativement une centaine de composés, parmi lesquels, des sources de carbone, des acides aminés, des vitamines, des bases azotées, des extraits de plantes et de levures, etc.… Aussi, la démarche adoptée est une approche globale par criblage de différents milieux de culture formulés à partir de groupes de composés issus du milieu de référence, en se basant sur un plan d'expérience. Le milieu de référence, suffisamment dilué pour limiter la croissance des cellules Vero, est additionné des différents groupes de composés. Ainsi, dix groupes sont testés en utilisant un plan factoriel fractionnaire à deux niveaux, ce qui conduit à 32 formulations différentes. Afin de réaliser un suivi cinétique rapide et approprié des cultures dans ces 32 milieux de culture, la mise au point préalable d'un système de criblage est nécessaire.

A l'heure actuelle, les systèmes de cultures les plus adaptés au criblage de milieux sont les plaques 96-puits, car elles permettent de tester un grand nombre de conditions simultanément, tout en étant facile à manipuler et peu coûteuses en comparaison des autres systèmes disponibles (Simcell®, Hexascreen® etc..). Pour pallier les difficultés du suivi de la concentration cellulaire dans les plaques 96-puits, un système d'acquisition automatisé et non invasif a été développé récemment pour les microplaques. En effet, le "Cellscreen®" permet le suivi de la croissance de cellules en suspension ou de cellules adhérentes, grâce à un analyseur d'image digital couplé à une caméra CDD installée sur un microscope inversé.

Les images des puits sont enregistrées puis analysées, soit, par un module PS adapté aux cellules en suspension, qui identifie et dénombre les cellules sur des critères de taille et de circularité, soit, par un module PA adapté aux cellules adhérentes, qui délimite le contour de la surface occupée par les cellules et fournit le pourcentage de surface du puits occupée. Dans le cas de cellules Vero adhérentes, pour permettre le criblage de milieux de culture, il est indispensable de valider initialement cette méthode en déterminant : la concentration cellulaire optimale d'ensemencement, la gamme de validité des numérations réalisées par le Cellscreen, mais aussi les corrélations entre la concentration cellulaire et la surface de puits occupée par les cellules.

Enfin, après le criblage des groupes de composés du milieu, les résultats obtenus à petite échelle avec des cultures statiques doivent être validés en mode de culture agité, dans notre cas en spinners de 250 ml.

Ces travaux sont présentés sous la forme d'un article publié en mai 2009 dans le journal *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

Objectifs scientifiques du chapitre 1

- *Identifier des groupes de composés du milieu de référence, inhibiteurs ou inducteurs de la croissance des cellules Vero, en vue d' améliorer ou simplifier le milieu complexe.*
- *Développer une méthode de criblage à petite échelle, non invasive et rapide, qui soit adaptée à la culture de cellules adhérentes.*
- *Confirmer en mode agité, avec les cellules cultivées sur microporteurs, la validité de la démarche de criblage réalisée à petite échelle.*

1.1. Criblage rapide de milieux de culture sans sérum pour des cellules Vero adhérentes par une méthode à petite échelle et non invasive.

Appl Biochem Biotechnol
DOI 10.1007/s12010-009-8674-0

Rapid Screening of Serum-Free Media for the Growth of Adherent Vero Cells by Using a Small-Scale and Non-invasive Tool

Emma Petiot · Frantz Fournier · Cécile Gény · Hervé Pinton · Annie Marc

Received: 2 February 2009 / Accepted: 18 May 2009
© Humana Press 2009

Abstract The paper proposes a rapid screening method for a first step improvement of an animal component-free medium dedicated to the growth of the anchorage-dependent Vero cell line. A new, rapid, and non-invasive technique is presented to specifically monitor cultures of adherent cells in 96-well plates. The operating conditions of an image analyzer are adapted to take into account the decrease of cell size when the attached cell density increases. An experimental design is carried out to assess the influence of ten component groups in the original medium. Two groups including protein extracts, growth factor, insulin, glucose, and pyruvate show significant positive effects. The groups with vitamins and molecules related to nitrogenous bases display a less pronounced influence. The mixture of amino acids, B_1 vitamin, magnesium sulfate, and sodium phosphate as well as the couple sodium citrate and ferric chloride lead to a downward trend. The screening results are proved to be scalable in stirred cultures with cells on microcarriers. An improved serum-free medium, with some component groups being removed or added, can be rapidly formulated to reach respectively similar or 1.6 times higher cell density than in the original medium. The results from this global approach could be helpful to further focus experiments on identified medium components.

Keywords Adherent Vero cells · Serum-free medium · Small-scale screening · Non-invasive cell counting · Microcarriers

Nomenclature

a_x	Coefficients of the polynomial model (x=1 to 10)
C	Cell concentration (cell ml^{-1})
DoE	Design of experiments
M_R	Reference medium

M_C Complete medium
M_x Screening media formulated for DoE (x=1 to 16)
PA "Cellscreen" device module for adherent cell analysis
PS "Cellscreen" device module for suspension cell analysis
G_x Groups of components present in M_C medium (x=1 to 10)
WS Percentage of well surface covered by Vero cells in the 96-well plates (%)

Introduction

Large-scale mammalian cell cultures are nowadays extensively used for biological productions such as monoclonal antibodies, proteins, or vaccines [1]. The various cell lines cultivated for all these production processes display specific needs in particular for the culture media composition [2]. On the other hand, due to considerations of media safety, variability, and cost, and despite the cell growth stimulation by animal sera or animal-derived substances, serum-free and animal-free culture media have been extensively developed and established for large-scale production for 20 years [1]. While these new medium formulations have been mainly proposed for cultures of suspension cells producing recombinant proteins and antibodies, the challenge seems more complicated for classical processes of vaccine production which involve anchorage-dependent cells such as Vero cells. Additional molecules could then be required to promote cell attachment, cell detachment, cell growth, or virus production [3–5].

Vero cells, derived from African green monkey kidney, are extensively used in the manufacture of human and veterinary vaccines such as rabies, polio, and Japanese encephalitis vaccines [6–9]. Indeed, they have been shown to be good substrates for the propagation of numerous viruses with frequently higher titers than that reached using other type of cells. Existing processes often involve the culture of Vero cells on solid microcarriers in large bioreactors up to 6,000 l. Several works in the literature have proposed the use of serum-free medium for these productions [7, 10, 11], but very few of them focused on fully animal-free process in stirred tank bioreactor [12, 13]. So, the validation of such completely defined media adapted to Vero cells issued from new serum-free master cell banks remains a challenge for running industrial processes or for the ones still under development.

The optimization of serum-free medium formulations is generally time-consuming, and incremental improvements could take several years if studying one-factor-at-a-time effect [13]. Most of the recent media optimization techniques are using design of experiments (DoE) and statistical analysis which provide easier and faster information on medium component effects [14–16]. Nevertheless, these methods often require high number of experiments and, consequently, the availability of easy-to-use, rapid, reproducible and non-invasive culture systems become essential for the optimization of animal cell culture media.

The cell growth data acquisition in a non-invasive way remains one of the main issues to the use of small-scale culture systems for easy and rapid media screening. Presently, most of the classical culture systems require sampling of the culture medium for further cell density evaluation by manual or automatic cell counting [17–19]. Besides, new screening devices have been recently proposed to permit the simultaneous test of numerous culture conditions with on-line cell density quantification by absorbance measurement [20]. But until now, only the "Cellscreen" system, based on cell counting in 96-well plates by optic image analysis, has been proposed to non-invasively monitor the cell growth of both suspension and adherent cells [21]. The only published work about its use to follow adherent cell growth concerns liver progenitor cells (LPC) for medical study purpose [22]. But in this study, the "Cellscreen" was not considered as a medium screening tool coupled to a DoE methodology.

This work aims at proposing a rapid, easy and small-scale protocol to improve a serum-free medium, without any animal products and with a very low protein content, for industrial Vero cell growth on microcarriers in stirred cultures. A procedure based on a screening DoE method is developed to evaluate the influence of various groups of the components which composed the original medium. The operating conditions for a valuable non-invasive monitoring of Vero cell growth by the "Cellscreen" device are carefully examined. Kinetics of Vero cell growth in various media formulations are investigated in well plates. Then, the critical component groups which affect cell growth are identified and the effect trends are used to propose first medium improvement and simplification in stirred culture conditions.

Materials and Methods

Cell Line and Culture Conditions

The industrial Vero cell line used in this study was provided by Sanofi pasteur (Marcy L'Etoile, France) at the passage 140 from a serum-free master cell bank. The confidential serum-free culture medium used was entitled complete medium, M_C. The Vero cells were cultivated at 37°C and 5% CO_2 for either static or agitated cultures, without exceeding the passage 148 to avoid cell variability. Cells were expanded in static culture T-flasks (Fisher Bioblock Scientific, France) with a seeding density of 3.2×10^5 cell ml^{-1}. Culture experiments for "Cellscreen" assays were performed in 96-well plates (Nunc, Rochester NY, USA) seeded with cell densities ranging from 0.08 to 6×10^5 cell ml^{-1} in a volume of 200 µl per well. Cells were all seeded from the exponential growth state of the amplification culture. Each tested condition was performed in eight parallel wells of the same 96-well plate and each experiment (plate) was duplicated. The stirred cultures were performed in spinner flasks (Techne, UK) with a seeding cell density of 2×10^5 cell ml^{-1} and 2.5 g l^{-1} Cytodex 1 microcarriers (GE Healthcare Bioscience-AB, Sweden) in 250 ml working volume. Stirring speed was maintained at 45 rpm by the use of a magnetic stirrer (Techne). Twice a day, 4-ml samples were taken for further analyses. Since the Vero cell adherence, either on well surface or on microcarriers, takes about 4 h at 37°C, 5% CO_2, image acquisition in 96-well plates of attached cells or sampling in spinner flasks were both performed after at least 4 h of culture. Different formulations of serum-free media were used as further described.

Cell Counting

Manual Method

After cell dissociation by trypsinization in T-flasks or well plates, the viable cell density was determined by using Thoma hemacytometer (Preciss, France) and Trypan blue dye exclusion method with 10% accuracy [23]. For the numeration of viable cells attached on microcarriers, samples were washed twice with PBS after microcarrier settling and then treated with Crystal violet (Sigma, France) for at least 1 h at 37°C prior to cell numeration of the released nucleus on Fush-Rosenthal hemacytometer (Preciss, France) with 15% accuracy.

Automatic Cell Counting in 96-Well Plates

The "Cellscreen" system (Innovatis, Germany) was employed for numeration of cell growing in 96-well plates. This device used a digital image analyzer with pattern recognition strategies to

quantify cell density. It was composed of a microscope coupled to a CCD camera recording images of the wells and of a motorized tray on which 96-well plates were automatically moved under the microscope. Images were further analyzed by an image recognition software to detect cells on the well surface [21]. This device could be used either with a PS module to evaluate the concentration of suspension single cells, or with a PA module to determine the percentage of well surface covered by adherent cells (Fig. 1). To remove eventual failure of the software image analysis, "Cellscreen" automatic determination was visually checked by controlling the suspension cell selection or the adherent cell surrounding on recorded images, and inaccurately treated images were further suppressed. The relative standard deviation of the well replicates for each condition (eight wells) always represented less than 10%. In this study, the PS module was used to numerate suspension cells just after seeding time or after well trypsinization, while the PA module was used to monitor the adherent cell growth all over the cultures.

Screening of Serum-Free Medium Components

Reference Medium and Component Groups for Experimental Design

In this work, the improvement of the complete medium, M_C, was based on the study of its composition effect on Vero cell growth. The original complete medium M_C was developed several years ago by Sanofi pasteur to specifically cultivate Vero cells in vaccine production processes, but its formulation was not obtained by a similar screening method. Because of the high number of components in this medium, it was decomposed in ten groups called G_1 to G_{10}, on the basis of component nature or solubility. Due to patent right, the G_{10} group can not be indicated. The composition of other groups was as follows: G_1 (20 free amino acids, vitamin B_1, magnesium sulfate, sodium phosphate); G_2 (vitamins H, B_2, B_9, and molecules related to nitrogenous bases: thymidine, uracil, xanthin, hypoxanthine); G_3 (vitamins B_{12}, B_3, B_7, choline chloride, pyridoxal); G_4 (vitamins B_3, B_6, B_X, putrescin); G_5 (vitamins A, D_2, K_3, linoleic and lipoic acids); G_6 (2 deoxyribose, adenine, adenosine, ethanolamine); G_7 (plant and yeast extracts, recombinant Epidermal Growth Factor (rEGF),

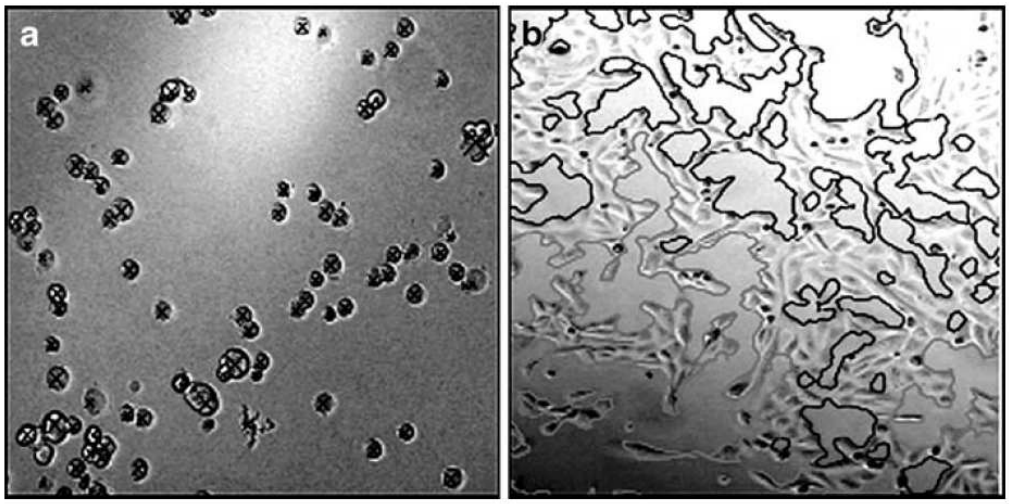


Fig. 1 Cell concentration evaluation by "Cellscreen" analyzer with PS (**a**) or PA (**b**) modules. With the PS module, cell recognition was based on size range and counted cells were marked with *black cross marks*. With the PA module, the percentage of surface covered by cells was visualized with *gray* (occupied zones) and *black lines* (cell-free zones)

insulin); G_8 (sodium citrate, ferric chloride); and G_9 (glucose, pyruvate). Due to their very low concentrations in the M_C medium, trace elements were not included in these groups. To easier screen the effects of the G_x groups on Vero cell growth, a reference medium, M_R, was defined as the lowest concentration of the complete medium, M_C, which permitted cell growth. It was determined by several dilutions (from 1/3 to 1/20) of M_C in a dilution buffer. This dilution buffer was formulated from Hepes, salts (D-calcium pantothenate, $NaHCO_3$, NaCl, $CaCl_2$, KCl, and $MgCl_2$), and vitamin C, at concentrations equivalent to those found in the complete medium. Then, a 1/20 dilution of M_C, which allowed three times lower cell-specific growth rate than in M_C medium without cell detachment, was chosen as the M_R medium.

Fractional Factorial Design

Fractional factorial designs are experimental designs generally dedicated to the first step of the culture medium optimization [24]. They are very useful and efficient in identifying the most important nutrients and interactions between two or more nutrients with relatively few experiments in comparison with the one-factor-at-a-time technique. In our case, a two-level fractional factorial design was implemented as experimental design to study the impact of the G_x groups on the cell growth at high (+1) and low (−1) levels. The low levels corresponded to their concentration in the reference medium, M_R, while the high levels referred to concentrations equivalent to the complete medium, M_C. More precisely, the high levels were attained by enriching the reference medium, M_R, with G_x component groups as defined by the DoE. As a result, the fractional factorial design proposed the formulation of 16 M_x screening media (Table 1).

Table 1 Fractional factorial design for the formulation of the screening M_x media.

Screening media M_x	Groups of medium components, G_x									
	G_1	G_2	G_3	G_4	G_5	G_6	G_7	G_8	G_9	G_{10}
M_1	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+
M_2	+	−	−	−	−	−	−	+	+	+
M_3	−	+	−	−	−	+	+	−	−	+
M_4	+	+	−	−	+	−	−	−	−	+
M_5	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−
M_6	+	−	+	−	−	+	−	−	+	−
M_7	−	+	+	−	−	−	+	+	−	−
M_8	+	+	+	−	+	+	−	+	−	−
M_9	−	−	−	+	+	+	−	+	−	−
M_{10}	+	−	−	+	−	−	+	+	−	−
M_{11}	−	+	−	+	−	+	−	−	+	−
M_{12}	+	+	−	+	+	−	+	−	+	−
M_{13}	−	−	+	+	+	−	−	−	−	+
M_{14}	+	−	+	+	−	+	+	−	−	+
M_{15}	−	+	+	+	−	−	−	+	+	+
M_{16}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

High (+) and low (–) levels for serum-free medium component groups, G_x, correspond respectively to concentration in M_C or M_R media

Analysis of the DoE Results

Experimental results obtained by "Cellscreen" monitoring during the serum-free media screening experiments were treated in two steps. In the first step, for each medium and each culture time, the percentage of well surface covered by the cells (WS, percent) and the cell concentration (C, cell per milliliter) were calculated from the average of data from eight wells. In the second step, these growth parameters were analyzed by the specific experimental design software, MODDE7 (Umetrics, New Jersey, USA). The mathematical model corresponding to this fractional factorial design was a linear combination of the factors, G_x, pondered by their respective coefficients, a_x, which represented their effects on Vero cell growth (Eq. 1). The MODDE7 software also allowed the evaluation of the quality of the mathematical model by the calculation of the regression coefficient of the correlation between calculated and experimental values, r^2.

$$\mathrm{WS} = [G_1] \times a_1 + [G_2] \times a_2 + [G_3] \times a_3 + [G_4] \times a_4 + \cdots\cdots + [G_{10}] \times a_{10} \quad (1)$$

Results and Discussion

Monitoring of Adherent Vero Cell Growth in Serum-Free Media with "Cellscreen" Device

Correlation Between Manual and "Cellscreen" Numeration of Non-attached Vero Cells

The single cell concentrations obtained by automatic measurement with "Cellscreen" PS module were first compared to concentrations obtained by the Trypan blue numeration method. Manual cell numeration was performed just after cell trypsinization from culture flasks, while the "Cellscreen" analysis was realized 10 min after seeding the 96-well plates to allow for complete cell settling. The range of tested cell concentration was from 0.06×10^5 to 8×10^5 cell ml^{-1}. The results presented in Fig. 2 indicated that a linear and accurate correlation could be found between the two numeration methods up to 5×10^5 cell ml^{-1}. Above this value, the cell concentration was underestimated by the image analysis software, when

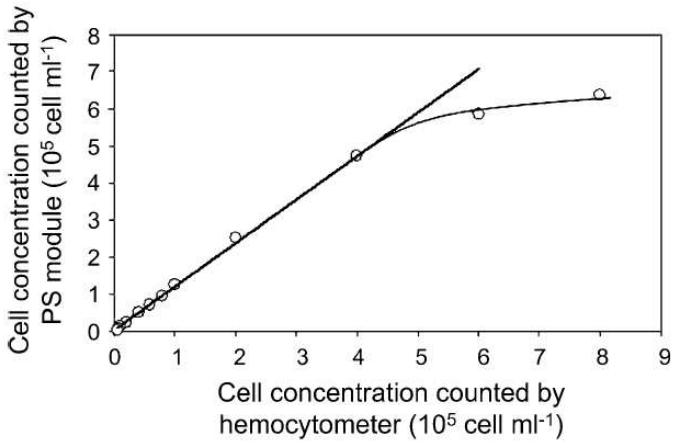


Fig. 2 Correlation between non-attached Vero cell concentrations measured with "Cellscreen" PS module or with manual Trypan blue method. Cells were trypsinized from culture flasks and counted just before (manual) or 10 min after (Cellscreen) seeding in 96-well plates. Each point is the average of eight wells repeated two times

compared to the hemacytometer data. Similar results have been observed with other adherent cells, such as LPC cells [22], and with different suspension cells, such as CHO and K562 human leukemia cells [21]. This effect is most likely due to the superposition of cell layers on the well surface, which are not detectable by the image analyzer. This upper limit of cell density is cell line dependent, while it is two times lower for Vero cells (5×10^5 cell ml^{-1}) than for CHO cells (11×10^5 cell ml^{-1}). Thus, the "Cellscreen" PS module was proved to give similar results than a reference manual method for numeration of non-attached Vero cells below 5×10^5 cell ml^{-1}. It could be used as a reference numeration method for further experiments performed with the PA module dedicated to attached cells.

Relation Between Vero Cell Concentration and Well Surface Covered by the Attached Cells

The concentration of adherent cells growing on surfaces is generally more problematic to acquire directly by image analysis than for suspension cells. The previous correlation between manual and PS module data only characterized the concentration of single suspended cell. Then, to assess the influence of the cell adhesion on the "Cellscreen" performances, cell counting of attached cells, determined with the percentage of the well surface covered by cells, WS, were performed using the "Cellscreen" PA module. A comparison between results from both "Cellscreen" modules was proposed on Fig. 3. In the first experiment (Fig. 3a), cells previously trypsinized from static flasks were seeded in 96-well plates at various concentrations ranging from 0.18 to 5×10^5 cell ml^{-1}. The cell numeration in the well plates was performed with the PS module (*C*, cell per milliliter) just after the cell seeding, and with the PA module (WS, percent) after 4 h of culture necessary to reach the complete cell

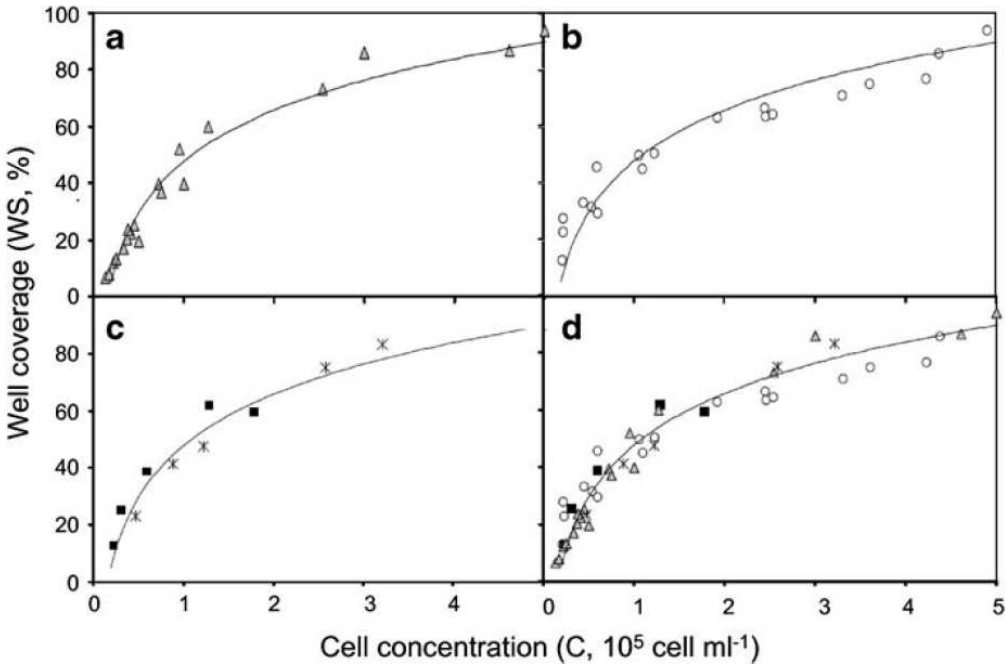


Fig. 3 Correlations between results from PA module (WS) and PS module (cell concentration, just after cell seeding or cell trypsinization). **a** (*gray triangles*) Measurements at seeding time with initial cell density from 0.18 to 5×10^5 cell ml^{-1}; **b** (*white circles*) measurements after 4 days of cultures in well plate seeded at concentrations from 0.08 to 0.75×10^5 cell ml^{-1}; **c** measurements all over two cultures seeded with 0.25 (*black squares*) and 0.5 (*asterisks*)$\times10^5$ cell ml^{-1}; **d** comparison of the three sets of data

adhesion assessed by image checking. Our results pointed out a good logarithmic correlation between well surface covered by cells WS and cell numeration C (r^2=0.98). This correlation suggested that the size of the attached Vero cells was dependent on the cell-seeding concentration. This observation was comparable to the decrease of cell size classically observed in T-culture flasks when the cell density reached confluence. By comparison with LPC cells, Vero cells appeared to be larger as 2×10^5 cell ml^{-1}, respectively, covers 50% and 70% of well surface. Contrary to the logarithmic correlation observed with Vero cells, in the case of LPC cells, a linear correlation was proposed from numerations realized after 12 h of culture [22]. However, the images of LPC cells acquired at that culture time clearly showed a non-complete cell adhesion that could alter the correlation.

Study of the Culture Phase Impact on WS/C Correlation in Well-Plate Culture

Our following objective was to verify if the physiological state of the cells during culture inside the well plates influenced the WS/C correlation previously found (Fig. 3a). That is why, we compared the correlation for (1) just seeded cells (Fig. 3a), (2) cells cultivated for 4 days (Fig. 3b), or (3) cells monitored during complete culture kinetics (Fig. 3c). Cells were all seeded from the exponential growth phase of the amplification culture. As already mentioned, in Fig. 3a, the measurements were made just 4 h after cell seeding with different cell concentrations ranging between 0.18 and 5×10^5 cell ml^{-1}. In Fig. 3b, the measurements were made after 4 days of cell cultures performed in 96-well plates at various cell-seeding concentrations, with a range lower than in Fig. 3a from 0.08 to 0.75×10^5 cell ml^{-1}. WS was measured with PA module, while cell numeration C was assessed with PS module after trypsinization of the entire 96-well plate after 96 h. So, the observed values in Fig. 3b corresponded to cells which have grown in wells during 4 days. The obtained curve was very similar to the one with just seeded cells suggesting that the evolution of the cell size only depended on the cell concentration and not of the cell state at the end of the cultures. To complete this last observation, we followed two culture kinetics using initial cell concentrations of 0.25 and 0.5×10^5 cell ml^{-1}, from the initial time until 4 days (Fig. 3c). WS was monitored by the PA module, while C was numbered each day with PS module on selected wells previously trypsinized. Each culture kinetics contained five experimental points measured at 4, 24, 48, 72, and 96 h. Again, despite the different phases of the cultures, including lag, exponential and stationary ones, the correlation presented a similar profile than in Fig. 3a, b. This was confirmed in Fig. 3d which gathered Fig. 3a–c. Clearly, the percentage of well surface covered by the attached Vero cells only depended on the cell concentration and was not influenced by the cell culture phase. Based on the non-linear observed correlation, it could be assumed that the attached cell size decreased when the cell concentration increased, whatever the culture phase inside the well, while the covered surface per cell decreased. For further screening experiments, a single exponential law, described by Eq. 2, could be used to directly calculate the cell concentration from the measured well surface covered by cells WS (r^2=0.97):

$$C = 0.16 \times e^{(0.038 \times WS)} \quad (2)$$

Influence of the Cell-Seeding Concentration on the Cell Growth Kinetics in Well Plates

For media screening experiments, it was necessary to set the appropriate seeding cell concentration which allowed an observable cell growth while avoiding a rapid saturation of

the well surface. Several cultures in M_C medium were performed in 96-well plates seeded in a range from 0.19 to 6×10^5 cell ml^{-1} (Fig. 4). The kinetic results showed a rapid saturation of the wells for seeding concentrations higher than 0.74×10^5 cell ml^{-1}. Oppositely, a growth lag phase of 24 h was observed with 0.18×10^5 cell ml^{-1} seeding. The best growth curves were obtained between 0.25 and 0.49×10^5 cell ml^{-1} seeding concentrations, and the last one was chosen for further media screening experiments.

Screening of Serum-Free Medium Components Affecting Vero Cell Growth

From the previous results, and particularly the correlation between data of both "Cellscreen" modules, further non-invasive growth monitoring of adherent Vero cells cultivated in 96-well plates in various serum-free media could be realized by only using the PA module. Different G_x groups of components present in the M_C medium were screened, and the experimental data were modeled to evaluate their effects on Vero cell growth.

Experimental Results of the Screening Assays

To be reliable, the procedure of DoE medium optimization should first include a screening of a large number of media component groups, followed by the use of a response surface methodology to evaluate the effects of the most interesting component groups [14]. In this study, the aim was only to propose a rapid pre-screening step by using the "Cellscreen" device to evaluate which main components of the serum-free medium could affect the Vero cell growth. According to the fractional factorial design, 16 M_x media were formulated (Table 1). Cultures were then performed in 96-well plates, in the M_x, M_C, and M_R media, and monitored until 4 days of culture with PA module (Fig. 5, Table 2). Results clearly attested various effects of the media formulations on Vero cell growth. Firstly, trace elements of M_C medium presented an important positive influence, particularly in the last days of culture. Indeed, M_{16} formulation, which contained all the G_x solutions, only differed from the M_C medium composition by the absence of the trace elements. After 4 days of

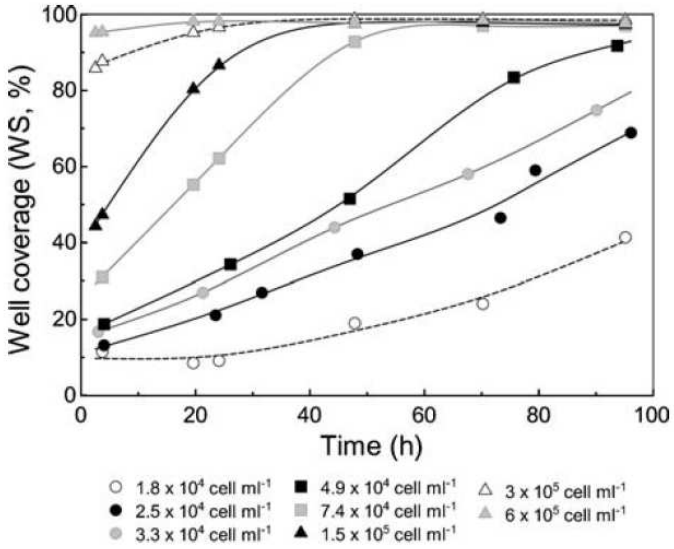


Fig. 4 Vero cell growth kinetics determined with PA module for cultures performed in 96-well plates at different cell-seeding concentrations

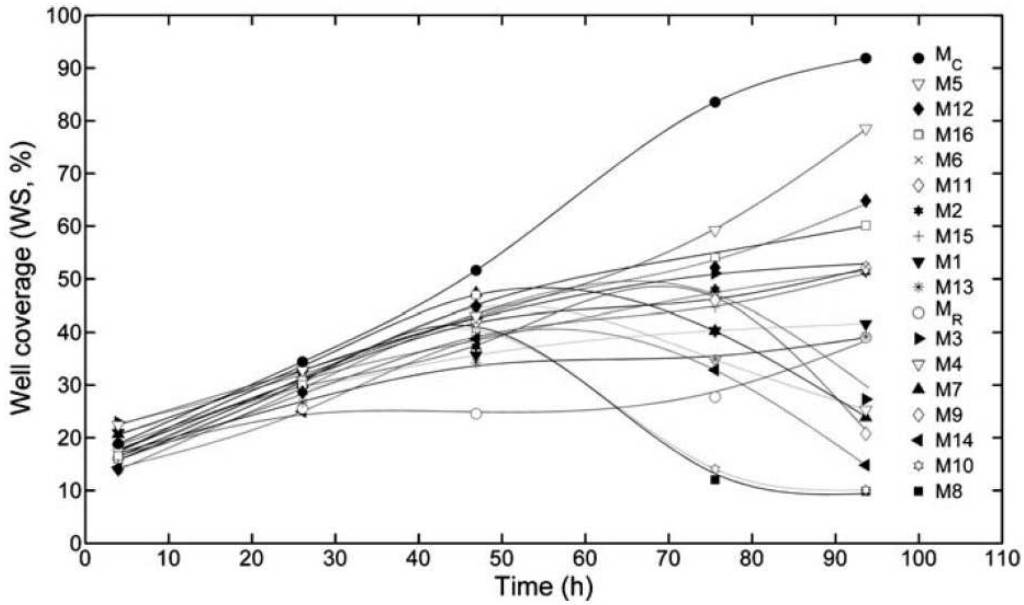


Fig. 5 Growth kinetics of Vero cells monitored with PA module, all over cultures performed in 16 M_x screening media and in M_C and M_R media

Table 2 Experimental design results in well surface occupation (WS, percent) and r^2 correlation coefficient between experimental values and model prediction for different culture times.

	Culture time (h)			
Screening media M_x	4	47	76	94
M_1	20.9	35.6	40.2	41.5
M_2	16.4	37.2	47.9	51.2
M_3	22.9	42.6	51.0	27.2
M_4	18.1	44.4	34.8	25.2
M_5	22.4	42.9	59.2	78.5
M_6	16.7	42.0	51.5	52.3
M_7	20.6	47.3	40.2	23.8
M_8	15.9	42.3	12.0	9.8
M_9	18.4	36.7	47.7	20.7
M_{10}	17.0	40.4	14.0	10.0
M_{11}	17.7	42.0	45.9	52.0
M_{12}	13.9	44.8	52.1	64.8
M_{13}	16.9	34.1	34.9	39.2
M_{14}	14.3	38.7	32.8	14.7
M_{15}	15.8	39.4	44.6	51.1
M_{16}	16.5	46.9	54.0	60.1
M_C	18.8	51.6	83.5	91.8
M_R	16.0	24.5	27.7	39.0
r^2	**0.81**	**0.72**	**0.60**	**0.93**

culture, the percentage of well surface covered by cells reached in M_{16} medium was only 60% of the one observed in M_C medium. This lower performance can be only attributed to the lack of trace elements. Furthermore, the cell growth kinetics seemed to be very similar until 48 h of culture whatever the medium composition. Neither nutrient limitation nor metabolite inhibition may be suspected even in very poor formulations on the basis of growth curve observation. Nevertheless, after 48 h of cell growth, an important influence of the concentration level of some groups of components could be observed on the cell concentration. For example, a decrease of cell concentration appeared in M_8 and M_{10} media, while the cell growth seemed higher in M_5 medium than in the richest M_{16} medium.

Evaluation of the Growth Effects of Various Component Groups of the Serum-Free Medium

To identify the effects on cell growth of the ten G_x groups of medium components, the experimental results obtained at 4, 47, 76, and 94 h of culture were analyzed with MODDE7 software (Table 2). The regression coefficients of the correlation between model and experimental values, r^2, calculated at 4, 47, and 94 h of culture were all above 0.7, a value which corresponded to a strong correlation as specified by Shallamer [25]. The value of 0.6 obtained after 76 h represents a moderate but usable correlation to catch trends of effects. Table 3 gives the a_x coefficients issued from the data modeling (Eq. 1). Each coefficient characterized the respective influence of the level increase of G_x component groups in the M_R reference medium. Significant effects could be pointed out when the absolute values of a_x coefficients were higher than their standard error. Positive a_x value suggests a favorable effect of the G_x group, while a negative value identifies a limiting or inhibiting influence. The effects of the component groups on Vero cells could then be classified with respect to the culture phases. The results at 4 h of culture corresponded to a major impact on cell adhesion and viability. The coefficients calculated at 47 h of culture mainly provided information on the impact on the cell growth. And finally, the effects identified at 76 and 94 h indicated the importance of M_x composition when nutrient limitation appears.

Only the component group G_7 seemed to have a positive effect on cell adhesion during the first hours of culture, while G_1 and G_4 could negatively affect the cell attachment (Table 3). Furthermore, the G_7 and G_4 groups also displayed their respective positive and negative influences on cell growth during the exponential growth phase until 47 h of culture. Furthermore, G_2 group exhibited a high cell growth enhancer effect during this culture phase. After 47 h of culture, some of the cultures appeared to be limited or inhibited. Coefficients a_x calculated during the last culture phase pointed out a negative effect on cell viability of G_1 and G_8 groups from 76 h and of G_6 from 94 h. In contrast, the G_9 and G_5 groups greatly promoted the cell growth during the same period. Obviously, these positive

Table 3 Model coefficients, a_x, and their standard errors for different culture times.

Culture time (h)	a_1	a_2	a_3	a_4	a_5	a_6	a_7	a_8	a_9	a_{10}	Coefficient standard error
4	**−1.7**	−0.1	−0.4	**−1.5**	0.2	0.1	**0.8**	−0.1	−0.2	−0.1	0.5
47	0.6	**2.2**	0.3	**−1**	0.4	0	**1.6**	−0.2	0.4	−0.8	1
76	**−4.2**	0.4	−0.4	−0.6	0.3	0.4	1.4	**−4.3**	**8.2**	1.1	3.7
94	**−2.9**	0.3	2.3	0.2	**3.6**	**−4**	1	**−5.4**	**17.7**	0.1	2.4

Bolded values correspond to significant positive or negative effects of G_x component groups on VERO cell growth

influences observed during the last culture phase could be explained by the remove of nutrient limitations, while the negative effects were essentially related to nutrient limitations or inhibiting factors which accelerated cell death. Some of these observed effects were expected, as for example the positive influence of the group G_9 which contained glucose and pyruvate. Nevertheless, unexpected effects of other component groups, such as G_4 (vitamins B_3, B_6, B_X, putrescin) or G_1 (20 free amino acids, vitamin B_1, magnesium sulfate, sodium phosphate), could be advantageously detected.

Thus, this easy and rapid pre-screening method allowed to early identify five of the G_x mixtures of components present in M_C medium which displayed a major significant effect on Vero cells. The groups G_7 and G_9 both enhanced the cell adhesion and growth. This result confirmed the importance of non-limiting concentrations of rEGF, insulin, protein extracts, and carbohydrate source in the culture medium. Beside, the groups G_1, G_4, and G_8 either inhibited the cell adhesion and growth or increased cell death. It could be assessed, in the first global approach, that the level in the M_C medium of amino acids, magnesium sulfate, sodium phosphate, vitamins B_1, B_3, B_6, B_X, putrescin, sodium citrate, and ferric chloride was overestimated and that diluted concentrations would have to be further considered. Furthermore, the addition of G_3 and G_{10} groups in M_R reference medium did not lead to significant effects during the whole cell growth. Then, the removal of vitamins B_{12}, B_3, B_7, choline chloride, or pyridoxal from the M_C medium formulation could be tested. The other groups of components (G_2, G_5, and G_6) mainly composed of vitamins, molecules related to nitrogenous bases, and fatty acids displayed a low influence on Vero cell growth and could be neglected in further optimization studies.

Interestingly, this screening procedure gave satisfactory qualitative results to catch trends of the G_x groups influence on Vero cell growth and to propose early improvements of the original serum-free medium. Despite the global approach proposed in this work that did not allow to clearly understand the effect of each component, the results also represented a reliable basis for further medium optimization focused on individual selected components of G_x mixtures, based on an integrative application of experimental designs and complementary screening steps [14, 24, 26]. The rapidity and easiness of this medium screening method has to be highlighted in comparison with usual one-factor-at-a-time procedure [27, 28]. Furthermore, the operating conditions required for the use of the "Cellscreen" device to monitor the growth of anchorage-dependent cells in small volumes without any sampling have been precisely studied and validated. Obviously, one of the main advantages of this equipment remained in its capacity to report adherent cell growth data, contrary to the other automatic devices such as, for example, Simcell™ (Bioprocessors Corporation), Hexascreen (Hexascreen Culture Technologies), or Cellstation™ (Fluorometrix Corporation) [27, 29]. For the first time, a rapid first screening of media component effects was proposed with adherent cells cultivated in small-scale culture systems.

Improvement of Serum-Free Medium Formulation for Vero Cells Cultivated on Microcarriers

After the kinetic studies realized in small-scale static culture systems, supplementary cultures were performed in stirred conditions closer to industrial cell processes. Culture kinetics were monitored in 250 ml spinner flasks with cells attached on Cytodex 1 microcarriers with a cell-seeding concentration 5.5 times higher than in 96-well plate experiments. Based on the previous screening results, the further target was to evaluate the impact of the highlighted component groups by increasing their concentration in the

original serum-free medium M_C. With regard to the higher seeding cell density in spinner flask than in well plate, these groups were added at a concentration 5.5 times higher than the one used for the screening tests. For their respective effects as growth enhancer or inhibitor, the groups G_7 and G_1 were chosen for addition in M_C medium. Figure 6 reports the growth kinetics of cultures performed respectively in M_C and in M_C enriched with G_7 or G_1. The addition of G_7 allowed a 1.6 times higher maximal cell concentration than in the initial serum-free medium which confirmed the positive effect of protein extracts, EGF, and insulin in stirred culture conditions with cells attached on microcarriers. The concentration increase of these components in a further optimized medium would benefit from studies based on each independent component. The inhibiting effect of G_1 was also checked as the culture performed in M_C added with G_1 reached a maximal cell concentration two times lower than the one obtained in M_C. Clearly, a deeper understanding of the effect of this group of components has to be completed in future studies dedicated to specific molecules. Moreover, the previous screening experiment demonstrated that the increase of the level of G_3 and G_{10} from M_R to M_C had no consequence on the Vero cell behavior. That is why the suppression of these groups from initial serum-free medium M_C could be envisaged to simplify the medium. Figure 7 gives the results observed with duplicated cultures performed in parallel either in M_C medium or in M_C medium depleted of the G_{10} group. The cell growth on microcarriers was observed to be similar with or without the presence of G_{10} all over the culture.

It is also important to point out that the culture medium modifications did not modify the cell adhesion characteristics, as neither cell detachment nor aggregates were detected as reported by Butler et al. [13]. The maximal specific growth rates observed in M_C or in M_C enriched with the G_7 group were respectively of 0.021 and 0.033 h^{-1}, which are similar or better than literature results [13, 30]. Besides, other studies on serum-free cultures of Vero cells utilized various commercial or home-made media, but did not present detailed screening studies which succeeded in the improvement of their media [11, 12, 31, 32]. The medium used for the master cell bank of our Vero cell line was completely defined and animal component-free and had a very low protein content. The results obtained in this work by only one screening step allowed to propose a medium simplification by removing or diluting some components and to strengthen it by the level increase of some key

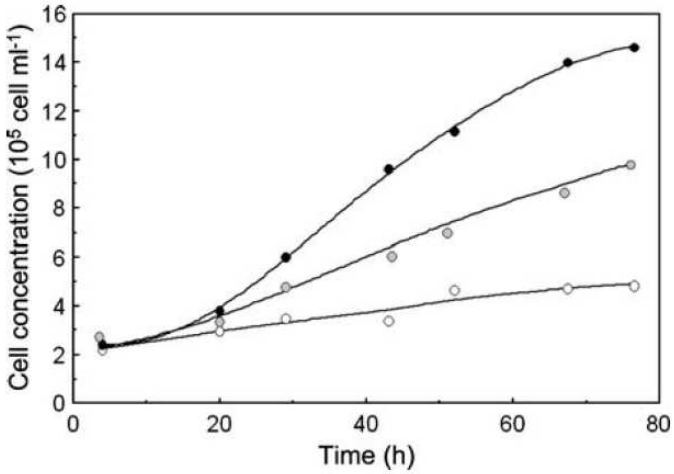


Fig. 6 Growth kinetics of Vero cells cultivated on microcarriers in spinner flasks, in M_C medium (*gray circles*) and in M_C medium supplemented with G_7 (*black circles*) or G_1 groups (*white circles*), 5.5 times concentrated to represent the cell-seeding concentration variation between well plates and spinner flasks

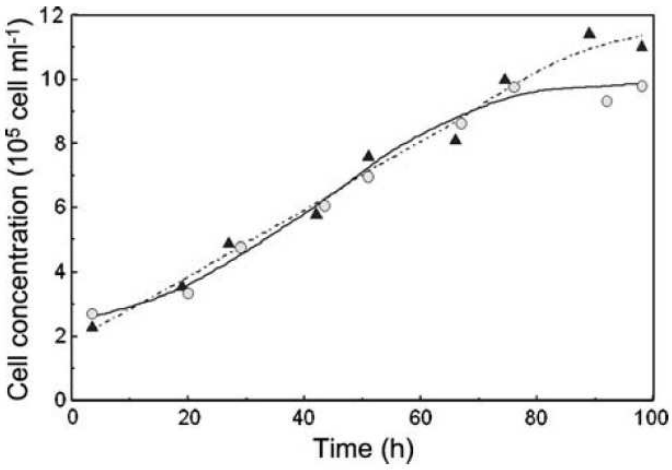


Fig. 7 Growth kinetics of VERO cells cultivated in spinner flasks on microcarriers, in M_C medium (*gray circles*) and in M_C medium without G_{10} component group (*black triangles*)

components. Complementary modifications based on our first step screening results remain to be evaluated, and further medium optimization could then be expected. More widely, the adequacy between "Cellscreen" results and Vero cell growth in stirred cultures was a very promising point for further development of vaccine production processes. The good scalability of the results led to the conclusion that the non-invasive monitoring of adherent Vero cells growth in 96-well plates by using the "Cellscreen" device represents an interesting tool to accelerate and facilitate the formulation and the improvement of a serum-free culture medium for industrial large-scale purposes. The medium decomposition in different component groups was also an interesting technique to rapidly evaluate some medium component impacts on Vero cell growth.

Conclusion

The objective of this work was to validate a method allowing to rapidly observe some global trends of component groups of a serum-free and animal-free culture medium on the growth of the anchorage-dependent Vero industrial cell line. The interest was to propose a first step of simplification and improvement of the medium allowing to increase cell growth. The results could also be useful to suggest further experiments focused on specific components. To achieve the screening experiments in small-scale cultures, the monitoring capabilities of the "Cellscreen" device in the case of adherent cells were first evaluated. Various operating conditions were checked and adapted to successfully non-invasively monitor the Vero cell growth in 96-well plates. A first linear correlation was proposed between manual and automatic counting of the non-attached cells. Then, a logarithmic relation was determined between data from both "Cellscreen" modules respectively dedicated to suspension or adherent cell density. This correlation was found to be reliable for the different phases of the Vero cell culture. The growth monitoring technique was then applied to perform an experimental design experiment to assess the influence of ten groups of components issued from the initial serum-free medium. Interesting results were obtained which pointed out the enhancer, inhibitor, or neutral effect of some component groups on Vero cell growth. The screening results were then successfully extrapolated in stirred cultures with cells attached on microcarriers. The improvement of the initial culture

medium was achieved either by removing some components or increasing the concentration level of others. In conclusion, the combination of an easy-to-use and appropriate screening procedure dedicated to adherent cells led to identify by only one step some medium component groups which have an expected or unexpected effect on adherent Vero cell growth. The composition of the initial serum-free medium could be rapidly improved and additional medium optimization further considered from complementary optimization steps focused on few identified components.

Acknowledgment The authors are grateful to Dr. Isabelle Chevalot (LSGC-CNRS, Nancy) for the help she provided on the use of the "Cellscreen" device.

References

1. Ozturk, S. S., & Hu, W.-S. (2006). *Cell culture technology for pharmaceutical and cellular therapies*. New York: Taylor and Francis.
2. Guan, Y. H., & Kemp, R. B. (1999). *Journal of Biotechnology, 69*, 95–114. doi:10.1016/S0168-1656(99)00007-3.
3. Mendonca, R. Z., Arrozio, S. J., Antoniazzi, M. M., Ferreira, J. M. C., & Pereira, C. A. (2002). *Journal of Biotechnology, 97*, 13–22. doi:10.1016/S0168-1656(02)00048-2.
4. Zhang, J., & Robinson, D. (2005). *Cytotechnology, 48*, 59–74. doi:10.1007/s10616-005-3563-z.
5. Kim, D. Y., Lee, J. C., Chang, H. N., & Oh, D. J. (2006). *Enzyme and Microbial Technology, 39*, 426–433. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.11.047.
6. Sugawara, K., Nishiyama, K., Ishikawa, Y., Abe, M., Sonoda, K., Komatsu, K., et al. (2002). *Biologicals, 30*, 303–314. doi:10.1006/biol.2002.0345.
7. Ozaki, H., Govorkova, E. A., Li, C., Xiong, X., Webster, R. G., & Webby, R. J. (2004). *Journal of Virology, 78*, 1851–1857. doi:10.1128/JVI.78.4.1851-1857.2004.
8. Trabelsi, K., Rourou, S., Loukil, H., Majoul, S., & Kallel, H. (2006). *Journal of Biotechnology, 121*, 261–271. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.07.018.
9. Liu, C.-C., Lian, W.-C., Butler, M., & Wu, S.-C. (2007). *Vaccine, 25*, 19–24. doi:10.1016/j.vaccine.2006.06.083.
10. Trabelsi, K., Rourou, S., Loukil, H., Majoul, S., & Kallel, H. (2005). *Enzyme and Microbial Technology, 36*, 514–519. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.11.008.
11. Frazatti-Gallina, N. M., Mourao-Fuches, R. M., Paoli, R. L., Silva, M. L. N., Miyaki, C., Valentini, E. J. G., et al. (2004). *Vaccine, 23*, 511–517. doi:10.1016/j.vaccine.2004.06.014.
12. Rourou, S., van der Ark, A., van der Velden, T., & Kallel, H. (2007). *Vaccine, 25*, 3879–3889. doi:10.1016/j.vaccine.2007.01.086.
13. Butler, M., Burgener, A., Patrick, M., Berry, M., Moffatt, D., Huzel, N., et al. (2000). *Biotechnology Progress, 16*, 854–858. doi:10.1021/bp000110+.
14. Ren, J., Lin, W.-T., Shen, Y.-J., Wang, J.-F., Luo, X.-C., & Xie, M.-Q. (2008). *Bioresource Technology, 99*, 7923–7927. doi:10.1016/j.biortech.2008.03.027.
15. Franco-Lara, E., Link, H., & Weuster-Botz, D. (2006). *Process Biochemistry, 41*, 2200–2206. doi:10.1016/j.procbio.2006.06.024.
16. Liu, C.-H., Wu, M.-L., & Hwang, S.-M. (2007). *Biochemical Engineering Journal, 33*, 1–9. doi:10.1016/j.bej.2006.08.005.
17. Girard, P., Jordan, M., Tsao, M., & Wurm, F. M. (2001). *Biochemical Engineering Journal, 7*, 117–119. doi:10.1016/S1369-703X(00)00110-8.
18. Cheung, J. O. P., Casals-Pascual, C., Roberts, D. J., & Watt, S. M. (2007). *Journal of Immunological Methods, 319*, 104–117. doi:10.1016/j.jim.2006.11.002.
19. Sander, L., & Harrysson, A. (2007). *Cytotechnology, 54*, 35–48. doi:10.1007/s10616-007-9064-5.
20. Ge, X., Hanson, M., Shen, H., Kostov, Y., Brorson, K. A., Frey, D. D., et al. (2006). *Journal of Biotechnology, 122*, 293–306. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.12.009.
21. Brinkmann, M., Lütkemeyer, D., Gudermann, F., & Lehmann, J. (2002). *Cytotechnology, 38*, 119–127. doi:10.1023/A:1021118501866.
22. Viebahn, C. S., Tirnitz-Parker, J. E. E., Olynyk, J. K., & Yeoh, G. C. T. (2006). *European Journal of Cell Biology, 85*, 1265–1274. doi:10.1016/j.ejcb.2006.08.006.
23. Nielson, L., Smyth, G., & Greenfield, P. (1991). *Biotechnology Progress, 7*, 560–563. doi:10.1021/bp00012a600.

24. Li, C., Bai, J., Cai, Z., & Ouyang, F. (2002). *Journal of Biotechnology, 93*, 27–34. doi:10.1016/S0168-1656(01)00377-7.
25. Shallahamer, C. (2007). *Linear regression modeling* (pp. 199–228). Berkeley: Academic.
26. Yuan, L.-L., Li, Y.-Q., Wang, Y., Zhang, X.-H., & Xu, Y.-Q. (2008). *Journal of Bioscience and Bioengineering, 105*, 232–237. doi:10.1263/jbb.105.232.
27. Kennedy, M., & Krouse, D. (1999). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 23*, 456–475. doi:10.1038/sj.jim.2900755.
28. Genzel, Y., Ritter, J. B., Konig, S., Alt, R., & Reichl, U. (2005). *Biotechnology Progress, 21*, 58–69. doi:10.1021/bp049827d.
29. Betts, J., & Baganz, F. (2006). *Microbial Cell Factories, 5*, 21. doi:10.1186/1475-2859-5-21.
30. Merten, O. W., Kallel, H., Manuguerra, J. C., Tardy-Panit, M., Crainic, R., Delpeyroux, F., et al. (1999). *Cytotechnology, 30*, 191–201. doi:10.1023/A:1008021317639.
31. Quesney, S., Marc, A., Gerdil, C., Gimenez, C., Marvel, J., Richard, Y., et al. (2003). *Cytotechnology, V42*, 1–11. doi:10.1023/A:1026185615650.
32. Merten, O. W., Kierulff, J. V., Castignolles, N., & Perrin, P. (1994). *Cytotechnology, 14*, 47–59. doi:10.1007/BF00772195.

Conclusion

Ce chapitre a proposé le développement d'une méthodologie simple, rapide et opérationnelle pour le criblage de milieux de culture dans le cas de la lignée cellulaire adhérente-dépendante Vero. Pour ce faire, une procédure de criblage à petite échelle a été mise au point pour permettre de simplifier la procédure d'amélioration du milieu de culture sans sérum, sur la base de l'adhérence et de la croissance cellulaire. Les principaux résultats sont synthétisés dans la figure 42.

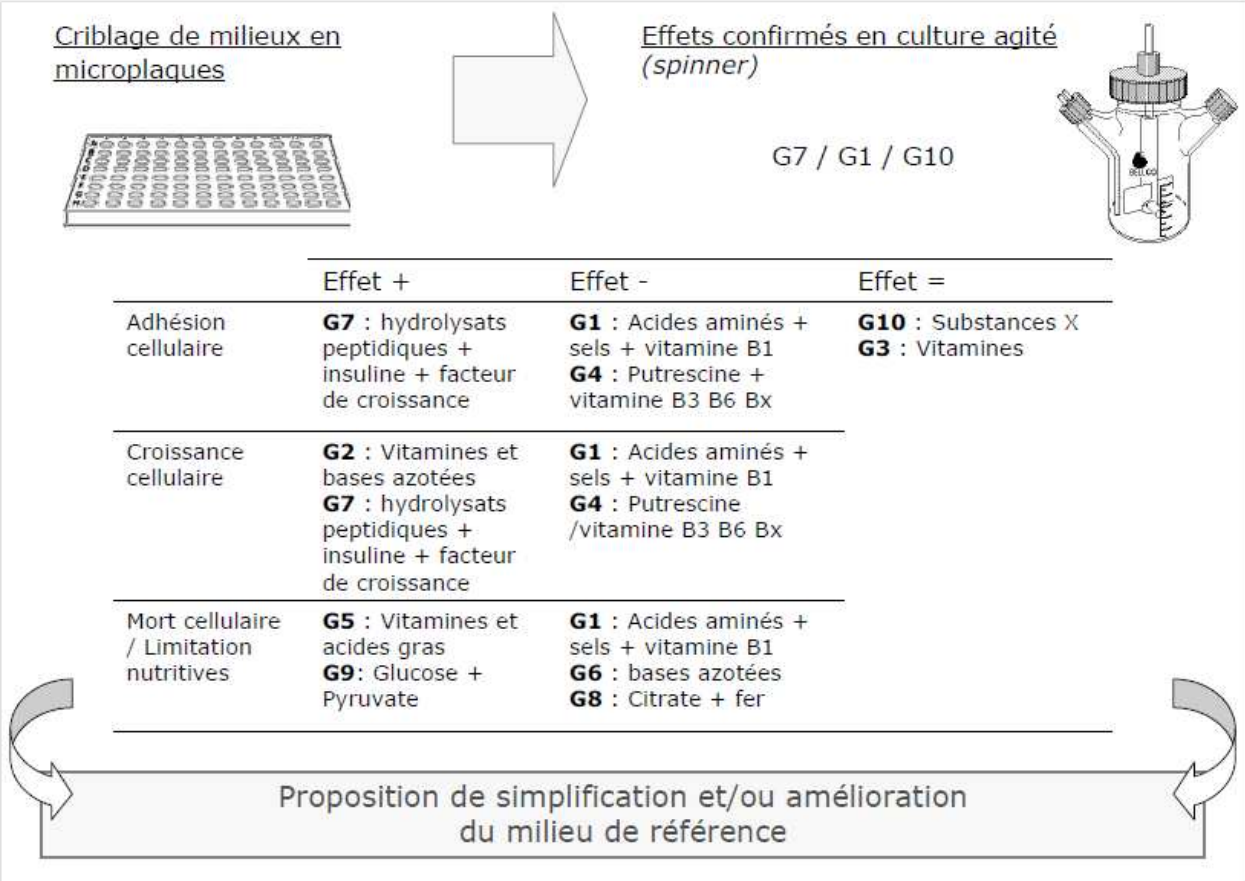


Figure 44. Synthèse des résultats sur l'approche globale du procédé de culture de cellules Vero en milieu sans sérum, basée sur l'étude du milieu de culture par criblage de groupes de composés

Dans un premier temps, nous avons évalué les potentialités de l'outil « Cellscreen® » pour le suivi d'une culture de cellules Vero adhérentes. Ainsi, différentes conditions opératoires ont été testées et adaptées afin de pouvoir réaliser un suivi de la croissance de ces cellules en microplaques 96-puits, de façon non invasive. Nous avons constaté que le module suspension PS était un outil fiable pour la numération de cellules Vero ensemencées dans les puits jusqu'à une concentration de 5×10^5 cell.ml^{-1}.

Nous nous sommes donc ensuite appuyés sur une numération réalisée successivement par le module suspension (PS) et le module adhérent (PA) pour corréler la surface occupée par les cellules Vero adhérées à la concentration cellulaire. La corrélation obtenue a été confirmée pour différentes phases de la croissance des cellules Vero.

Cette technique de suivi de la croissance de cellules adhérentes à petite échelle a ensuite été appliquée à une méthodologie de criblage par plan d'expérience. Elle a permis de mettre en évidence, de façon rapide et fiable, l'impact de 10 groupes de composés issus du milieu de référence et formulés sur la base des propriétés de solubilité de chaque composé. Les solutions présentant un effet bénéfique, néfaste ou neutre sur la croissance des cellules Vero, lors de leur addition dans le milieu dilué 20 fois ont ainsi pu être identifiées (Figure 44). Ainsi, lorsqu'ils sont présents à la concentration du milieu de référence, les extraits et les facteurs de croissance ont montré des effets bénéfiques, de même que l'addition de glucose qui correspond à la levée d'une limitation nutritive. Par contre, à côté de ces effets attendus, cette étude a mis en évidence des effets plus inhabituels, tel que l'impact néfaste sur la croissance du groupe comportant des acides aminés associés à la vitamine B1 et à des sels. Par ailleurs, nous avons pu également identifier les composés ou groupes de composés n'ayant pas d'effet particulier sur la croissance des cellules Vero, qu'ils soient présents à la concentration du milieu de référence ou dilués 20 fois.
Ces simples observations ont permis d'envisager rapidement une amélioration et une simplification du milieu de culture et donc une réduction de son coût. Les résultats du criblage ont été transférés à la culture des cellules Vero sur microporteurs en système de culture agité, plus proche du procédé industriel. L'amélioration du milieu de culture de référence a ainsi pu être réalisée, soit par le retrait, soit par l'augmentation de la concentration de certains composés identifiés lors du criblage.

En conclusion, par une unique étape de criblage en microplaque, nous avons pu identifier les effets de groupes de composés du milieu de référence. Cette première approche a permis d'améliorer rapidement la formulation du milieu de culture afin qu'elle soit plus adaptée à la croissance de cellules Vero en milieu sans sérum.

Ces travaux ouvrent des perspectives intéressantes. Grâce à cette même méthodologie, des études plus précises et ciblées sur les molécules présentes dans les groupes de composés identifiés par l'étude préliminaire, pourraient affiner notre compréhension du comportement spécifique de la cellule Vero dans ce milieu de culture. Cette démarche pourrait aussi être envisagée avantageusement pour l'optimisation de différents milieux avec d'autres lignées cellulaires.

Chapitre 2

2. Etudes cinétiques et métaboliques de culture de cellules Vero en milieu sans sérum

CHAPITRE 2

Introduction - 133 -

2.1. Culture en milieu de référence - 135 -
2.1.1. Croissance cellulaire en milieu de référence - 135 -
2.1.2. Métabolisme cellulaire en milieu de référence - 136 -
2.1.3. Conclusion - 139 -

2.2. Culture de cellules Vero en milieu de référence avec renouvellement du milieu - 140 -
2.2.1. Croissance cellulaire - 140 -
2.2.2. Mort cellulaire - 141 -
2.2.3. Cinétiques métaboliques - 145 -
2.2.4. Conclusion - 146 -

2.3. Influence de la dilution du milieu de référence ou de l'ajout de glutamine dans le milieu de culture - 149 -
2.3.1. Croissance cellulaire - 149 -
2.3.2. Cinétiques métaboliques - 150 -
2.3.3. Conclusion - 151 -

2.4. Etude métabolique et physiologique de la cellule Vero en milieu sans sérum - 153 -
2.4.1. Introduction - 153 -
2.4.2. Caractérisation cinétique du métabolisme de la cellule Vero en procédé de culture sans sérum - 155 -
2.4.3. Contributions de l'article - 180 -

Conclusion - 182 -

Introduction

Le développement d'une stratégie PAT pour un procédé utilisant des cellules animales impose de mieux comprendre le comportement métabolique de la lignée cellulaire. C'est pourquoi, dans ce deuxième chapitre, nous proposons une étude du métabolisme et de la physiologie des cellules Vero, à partir d'études cinétiques de diverses cultures en milieu sans sérum (Figure 32). L'objectif est de proposer des conditions de cultures permettant de possibles améliorations de la croissance et du métabolisme cellulaire dans le procédé industriel.

La mise en œuvre d'un procédé de production virale par cellules animales nécessite de maîtriser la phase d'expansion des cellules en amont de l'infection virale. Comme cela a été mis en évidence dans la revue de bibliographie, en dépit de l'utilisation intensive des cellules Vero pour la production de vaccins, leur physiologie et leur métabolisme ont été peu étudiés, notamment lors de cultures en milieu sans sérum. Les études de criblage de milieux de culture réalisées dans le chapitre précédent ont identifié certains effets non attendus pour différents composés. Une étude approfondie de la physiologie de la cellule Vero en milieu sans sérum s'avère donc indispensable.

C'est pourquoi, dans un premier temps, une étude cinétique de la croissance et de la mort des cellules Vero, ainsi que de la consommation et de la production de métabolites clés, est réalisée dans le milieu de référence sans sérum. Cette étude servira de culture de référence pour la suite des travaux de ce chapitre.

Puis, nous proposons deux stratégies complémentaires pour améliorer le procédé de culture, s'appuyant, soit, sur une modification du procédé en introduisant une opération de recharge-récolte en cours de culture, soit, sur la modification de la composition du milieu de culture.

Ainsi, des cultures seront réalisées en milieu de référence avec une opération de recharge-récolte du milieu après 2 ou 3 jours de culture. Concernant l'influence de la composition du milieu de culture, une culture dans un milieu dilué de moitié est d'abord envisagée pour limiter l'accumulation de produits toxiques pour les cellules. L'ajout de glutamine après 2 jours de culture est aussi testé afin d'éviter une éventuelle limitation nutritive par ce substrat majeur.

A partir de ces études préliminaires, une étude plus approfondie du métabolisme carboné central est proposée. Le métabolisme carboné central comprend le métabolisme du glucose (glycolyse), le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs) et le métabolisme de la glutamine (glutaminolyse). Des stratégies de substitution et/ou de dilution du glucose et de la glutamine sont comparées. L'analyse cinétique de ces cultures repose sur la croissance cellulaire, la consommation de glucose et glutamine, et la production de lactate et de NH_4^+. Des analyses d'acides aminés et de métabolites intracellulaires complètent cette approche. Notre étude s'intéresse aussi succinctement à la production virale dans les formulations de milieu présentant un potentiel intéressant, même si ce dernier aspect est plus détaillé dans le chapitre 4.

Une partie des travaux de ce chapitre est présentée sous la forme d'un projet de publication.

Objectifs scientifiques du chapitre 2

- *Etudier et comprendre le métabolisme carboné central et la physiologie de la cellule Vero au cours de cultures réalisées avec diverses conditions opératoires.*
- *Identifier les paramètres cinétiques caractéristiques de la cellule Vero cultivée dans le milieu de référence.*
- *Evaluer des stratégies d'amélioration de la croissance et du métabolisme des cellules Vero, par recharge-récolte du milieu complet ou par substitution, dilution ou addition de certains éléments nutritifs.*

2.1. Culture en milieu de référence

Des conditions de cultures standardisées sur la base de paramètres de la croissance et du métabolisme cellulaire, on été établies préalablement à ces travaux afin de pouvoir comparer les cultures entre elles (2,5 $g.l^{-1}$ de microporteurs, un passage en boîte statique minimum après décongélation, nombre de passages inférieur à 145).

2.1.1. Croissance cellulaire en milieu de référence

La figure 45 rassemble les résultats de trois cultures réalisées en milieu de référence dans ces conditions. La reproductibilité des résultats étant tout à fait satisfaisante, l'exploitation des données cinétiques des cultures a été réalisée dans les figures **Figure 45** et **Figure 46**. La concentration cellulaire atteint sa valeur maximale entre 90 et 100 h de culture, puis, le déclin de la concentration de cellules viables intervient après 110 h. La vitesse spécifique maximale de croissance, μ_{max}, déterminée globalement à partir de l'évolution logarithmique de la concentration de cellules attachées sur les supports, est de l'ordre de 0,021 h^{-1}. La croissance s'arrête ensuite à 100 h de culture. Cette valeur de μ_{max} est conforme aux valeurs obtenues dans la littérature pour des cellules Vero cultivées en milieu sans sérum, avec 0,025 h^{-1} pour Quesney *et al.* (2003), 0,016 h^{-1} pour Merten *et al.* (1999) et 0,017 h^{-1} pour Rourou *et al.* (2009).

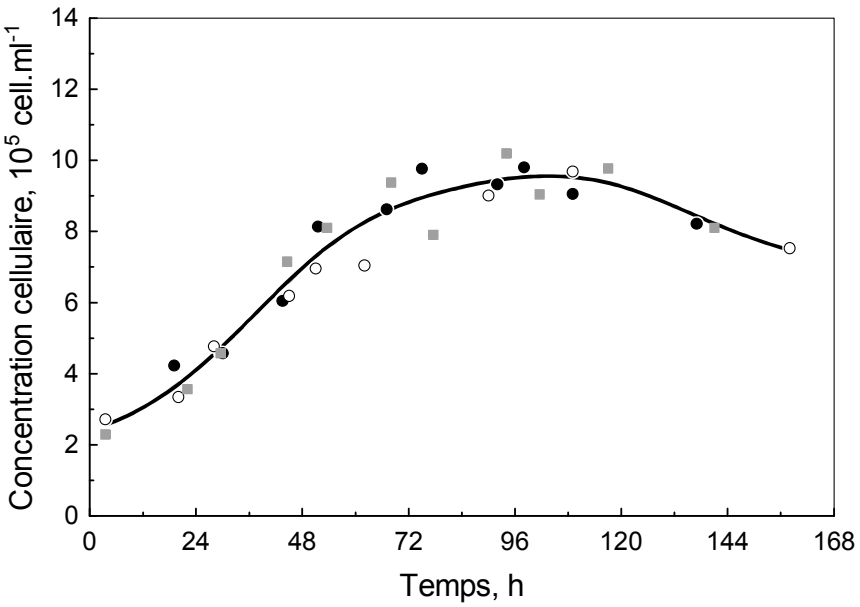


Figure 45. Croissance en spinner de cellules Vero (2,5 $g.l^{-1}$ de MCS) en milieu de référence, chaque symbole correspondant à une culture différente.

2.1.2. Métabolisme cellulaire en milieu de référence

Les cinétiques de consommation des deux principaux substrats, le glucose et la glutamine, et de production de deux principaux métabolites, le lactate et les ions ammoniums, sont exposées dans la figure 46.

Dans un premier temps, on peut remarquer que la concentration en glucose diminue rapidement jusqu'à 72 h de culture. A 72 h de culture, la consommation s'arrête et sa concentration résiduelle stagne jusqu'à la fin de la culture à 8,2 mM, indiquant l'absence de limitation de la culture par ce substrat. La production de lactate, co-produit de la métabolisation du glucose, est assez parallèle à la consommation de glucose, avec une valeur maximale produite après 70 h de 17,5 mM. Les vitesses spécifiques de consommation de glucose et de production de lactate sont maximales avant 20 h de culture et présentent des valeurs relativement élevées par comparaison avec d'autres lignées cellulaires étudiées. En effet pour ces cellules Vero, les valeurs maximales de q_{Glc} et q_{Lact} sont respectivement de 0,065 $\mu mol.h^{-1}.10^{-5}cell$ et 0,1 $\mu mol.h^{-1}.10^{-5}cell$, alors que, pour des cellules CHO (Barbouche 2008), des cellules Sf-9 (Raghunand *et al.,* 1999), ou des cellules d'hybridomes (Godia *et al.,* 2006), les valeurs rapportées de q_{Glc} et q_{Lact} sont 4 à 5 fois plus faibles. Néanmoins, dans le cas de cellules adhérentes rénales, les valeurs rapportées sont plus proches de celles que nous avons obtenues avec un q_{Glc} de 0,075 $\mu mol.h^{-1}.10^{-5}cell$ et un q_{Lact} de 0,16 $\mu mol.h^{-1}.10^{-5}cell$ pour les cellules MDCK (Wahl *et al.,* 2008), un q_{Glc} de 0,11 $\mu mol.h^{-1}.10^{-5}cell$ et un q_{Lact} de 0,18 $\mu mol.h^{-1}.10^{-5}cell$ pour les cellules BHK (Cruz *et al.,* 2000) et un q_{Glc} de 0,045 $\mu mol.h^{-1}.10^{-5}cell$ pour les cellules humaines de tumeur de rein (Wagner *et al.,* 1991).

Cette particularité des cellules rénales (Vero, MDCK) pourrait être expliquée par leur rôle biologique au sein d'un organisme vivant. En effet, les reins ont pour fonction physiologique majeure de réabsorber, avant la formation de l'urine, le glucose et d'autres molécules de petite taille (ex. acides aminés) contenues dans le sang. C'est pourquoi, les cellules rénales sont parmi les seuls types cellulaires, avec les hépatocytes, les cellules pancréatiques β et les cellules basolatérales des membranes intestinales, à posséder les protéines de transport actif SGLT-1 et SGLT-2 mais aussi la protéine Glut 2, une isoforme des transporteurs spécifiques du glucose, qui permet de capter le glucose en très faible quantité mais aussi de transporter, sans limitation de vitesse, le glucose grâce à son Km élevé, de l'ordre de 40 mM (Mueckler 1994).

L'évolution de la concentration en glutamine est aussi très rapide ; elle passe de 4 mM initialement à une valeur nulle en 96 h de culture. On remarquera par ailleurs que sa déplétion complète à 96 h coïncide avec le début du déclin de la concentration cellulaire. La vitesse spécifique de consommation de la glutamine indique une consommation plus progressive que celle du glucose, car q_{Gln} se maintient près de deux jours à une valeur maximale de 0,0075 µmol.h^{-1}.10^{-5}cell. Cette valeur de q_{Gln} semble être , cette fois ci, du même ordre de grandeur que pour les lignées de cellules CHO (0,006 µmol.h^{-1}.10^{-5}cell), MDCK (0,005 µmol.h^{-1}.10^{-5}cell) ou BHK (0,003 µmol.h^{-1}.10^{-5}cell) (Cruz *et al.,* 1999; Barbouche 2008; Wahl *et al.,* 2008). De plus, la production d'ions ammonium semble être corrélée à la consommation de glutamine à partir de 24 h de culture. En effet, elle se stabilise à 1,3 mM après 96 h de culture, moment où apparaît la limitation en glutamine. La vitesse spécifique de production observée est de 0,005 µmol. h^{-1}.10^{-5}cell et est aussi comparable à celle observée pour les cellules MDCK et CHO.

Les rendements globaux, $Y_{Lact/Glc}$ et $Y_{NH4+/Gln}$, sont respectivement de 1,65 et 0,48. Ces valeurs indiquent un métabolisme peu efficace du glucose par les cellules Vero. En effet, pour rappel, la transformation stoechiométrique du glucose en lactate amènerait à un $Y_{Lact/Glc}$ maximal de 2. Il faut toutefois noter que d'autres voies de production du lactate sont envisageables (autres sources de carbone aboutissant à la formation de pyruvate).

Cette valeur de $Y_{Lact/Glc}$ est légèrement plus faible mais du même ordre de grandeur que celles obtenues dans d'autres travaux concernant les cellules Vero cultivées en milieu avec (Quesney *et al.,* 2003 : 1,9) ou sans sérum (Rourou *et al.,* 2007 : 2,0). Par contre, elle est comparable aux valeurs obtenues pour d'autres lignées de cellules rénales telles que les cellules MDCK (Genzel *et al.,* 2004 : 1,65) ou les cellules BHK (Cruz *et al.,* 1999 : 1,4 à 1,6).

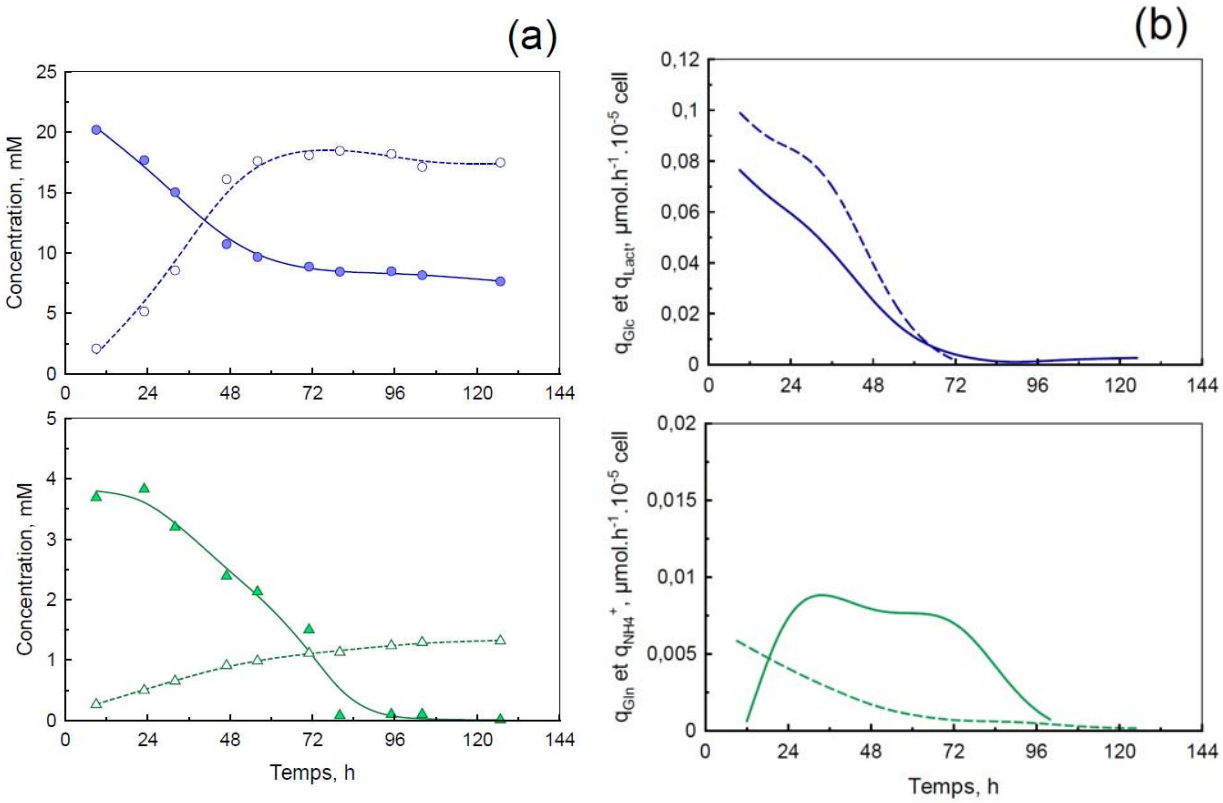
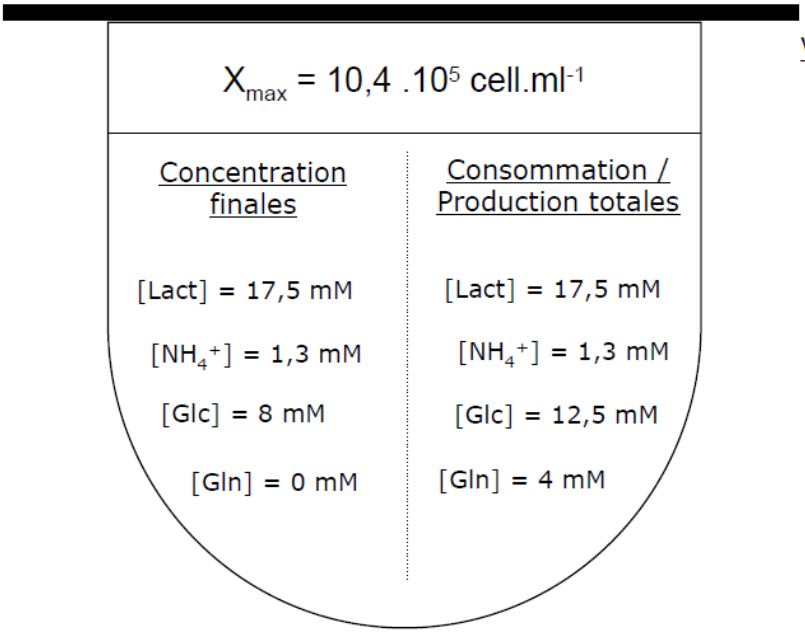


Figure 46. (a) Concentration de glucose (●), lactate (○), glutamine (▲) et ions ammonium (Δ) et (b) vitesses spécifiques respectives de consommation (—) ou de production (---) (culture de la figure 45).

Le rendement $Y_{NH4+/Gln}$ est sensiblement plus faible que celui observé avec d'autres lignées d'origine rénale soit 1,1 pour les cellules BHK et 1,0 pour les cellules MDCK (Cruz *et al.*, 1999; Genzel *et al.*, 2004). Cependant, pour les cellules Vero, les résultats sont assez variables en fonction du milieu de culture utilisé. Ainsi, en milieu de référence sans sérum, Rourou *et al.*, (2007) obtiennent une valeur de 0,2, alors que Quesney *et al.* (2003) indiquent une valeur de 0,6 dans un autre milieu de culture. Dans le cas de culture de cellules Vero en présence de sérum, des valeurs de $Y_{NH4+/Gln}$ variant de 1,0 (Mendonça *et al.*, 1998) à 0,43 (Quesney *et al.*, 2003) ont été rapportées. Il apparaît donc que les rendements $Y_{Lact/Glc}$ et $Y_{NH4+/Gln}$ sont dépendants du milieu de culture employé et peuvent par conséquent être une indication du métabolisme cellulaire dans notre milieu de culture. Ainsi, dans notre cas, nous pouvons notamment en déduire que le métabolisme du glucose est principalement orienté vers la formation de lactate, même si nous convenons que celui-ci peut aussi être formé à partir d'autres sources de carbone.

2.1.3. Conclusion

Cette étude préliminaire a permis, dans un premier temps, de caractériser les paramètres cinétiques de la culture en milieu de référence (X_{max}, μ_{max}, q_{Glc}, q_{Gln}, q_{Lact}, $q_{NH4}+$, $Y_{Lact/Glc}$, $Y_{NH4/Gln}$), résumés dans la figure ci-dessous, et de les comparer à ceux proposés pour d'autres lignées cellulaires.



Vitesses spécifiques maximales

μ_{max} = 0,021 h^{-1}

q_{Glc} = 0,065 $\mu mol.h^{-1}.10^{-5}cell$

q_{Lact} = 0,1 $\mu mol.h^{-1}.10^{-5}cell$

q_{Gln} = 0,0075 $\mu mol.h^{-1}.10^{-5}cell$

q_{NH4}^+ = 0,005 $\mu mol.h^{-1}.10^{-5}cell$

Rendements globaux

$Y_{Lact/Glc}$ = 1,65

$Y_{NH4/Gln}$ = 0,48

Ainsi, de la même façon que pour la plupart des lignées cellulaires, il est apparu que la lignée de cellules Vero consomme le glucose très rapidement et de façon peu efficace. La vitesse de consommation spécifique du glucose est plus rapide que chez la plupart des lignées cellulaires, de la même façon que la production spécifique de lactate associé. En ce qui concerne le métabolisme de la glutamine et la production associée d'ions ammonium, ils sont difficiles à comparer à la littérature car ils semblent très dépendants du milieu de culture employé.

Le milieu de culture de référence sans sérum ne permet pas de maintenir la croissance des cellules Vero au-delà de 3 jours de culture. Simultanément au déclin des cellules, apparaissent une déplétion de la glutamine et une accumulation de lactate proche de 20 mM. Afin de lever ces limitations et/ou inhibitions potentielles, l'analyse d'une stratégie de renouvellement du milieu de culture, à l'instar du procédé industriel, est développée dans le paragraphe suivant.

2.2. Culture de cellules Vero en milieu de référence avec renouvellement du milieu

Des études cinétiques comparatives ont té réalisées en présence ou non d'un renouvellement ponctuel de 80 % du milieu à 48 ou 72 h de culture. Les résultats des cinétiques de croissance cellulaire, de la mort cellulaire et du métabolisme, sont présentés respectivement dans les figures 47, 49 et 50.

2.2.1. Croissance cellulaire

Clairement, le renouvellement du milieu de culture à 48 ou 72 h permet de prolonger la croissance cellulaire avec une vitesse spécifique de croissance qui s'annule respectivement 10 h ou 40 h plus tard que pour la culture sans renouvellement de milieu (Figure 47b). Ainsi, le déclin de la concentration cellulaire apparaît respectivement à 110 h ou 130 h de culture, soit approximativement 60 h après le renouvellement du milieu. La concentration cellulaire maximale est augmentée de 55 %, pour atteindre une valeur de 16,2 × 10^5 cell.ml^{-1} contre 10,4 × 10^5 cell.ml^{-1} sans renouvellement du milieu (Figure 47a). Ces valeurs maximales sont atteintes deux jours après l'opération de renouvellement du milieu de culture soit 1 à 2 jours plus tard que pour la culture de référence. La vitesse spécifique de croissance décroît aussi plus rapidement en absence qu'en présence de renouvellement du milieu de culture et on constate logiquement que la vitesse spécifique maximale de croissance qui intervient avant renouvellement, n'est pas modifiée (Figure 47b).

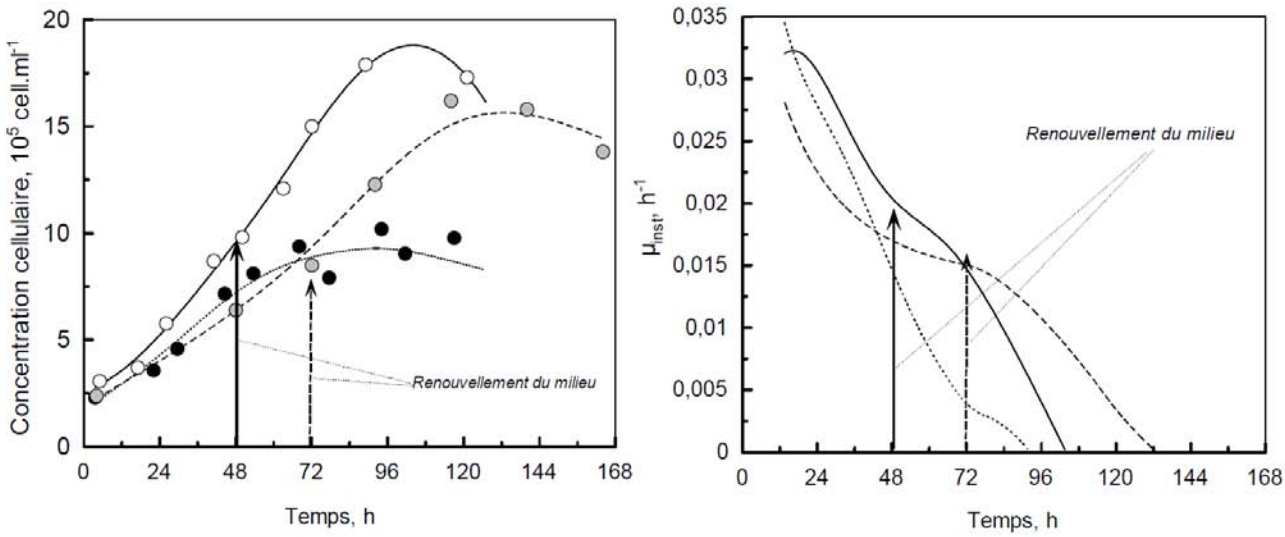


Figure 47. Croissance cellulaire et vitesse spécifique de croissance en spinner en milieu de référence (··●··) et en milieu de référence avec changement de milieu à 48 h (—○—) ou à 72 h (- -●- -) de culture.

2.2.2. Mort cellulaire

La mort cellulaire peut influencer l'évolution de la concentration de cellules vivantes au cours d'une culture. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à ce mécanisme afin de mieux caractériser les différences de comportement entre une culture avec et sans renouvellement du milieu de culture.

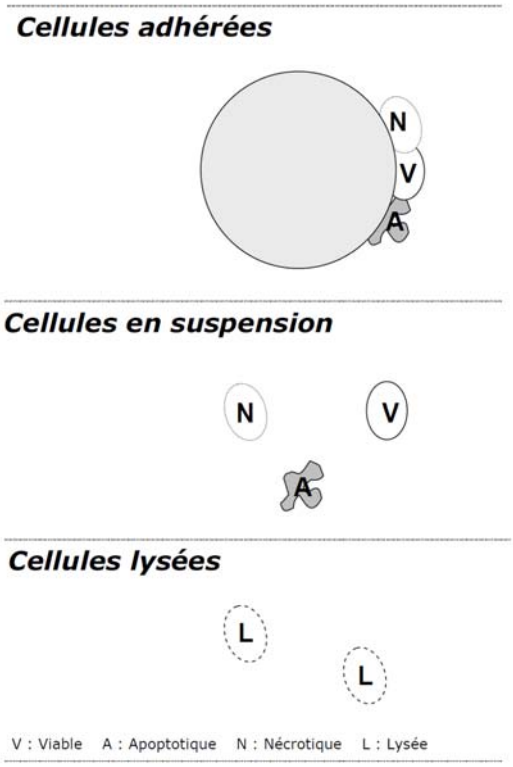


Figure 48. Populations cellulaires potentiellement présentes lors de la culture de cellules adhérentes sur microporteurs en système agité.

Dans le cas de la culture de cellules Vero sur microporteurs, différentes populations cellulaires peuvent être quantifiées, telles que les cellules adhérées, les cellules en suspension et les cellules lysées (Figure 48). Parmi les cellules adhérées et les cellules en suspension, il est possible de distinguer trois sous populations : les cellules viables, les cellules apoptotiques et les cellules nécrotiques. Toutefois, dans nos conditions de culture, très peu de cellules en suspension, détachées des microsupports, ont été dénombrées (moins de 2 % de la concentration cellulaire totale). C'est pourquoi cette population cellulaire ne sera pas prise en compte dans la suite de notre étude.

Les cellules adhérées ont été quantifiées par la méthode du cristal violet. Parmi cette population cellulaire, ont été distinguées par cytométrie et marquage l'annexin V, des cellules apoptotiques et des cellules viables. La fraction de cellules nécrotiques parmi les cellules adhérées a aussi été étudiée par double marquage 7-AAD et annexin V en cytométrie. Cependant, ce marquage ne permet pas de distinguer les cellules nécrotiques « primaires », des cellules nécrotiques secondaires provenant des phases tardives du mécanisme de l'apoptose (voir le paragraphe 1.2 de l'étude bibliographique). Un marquage complémentaire d'exclusion au bleu trypan, nous a permis de statuer sur l'absence de cellules en nécrose « primaire » dans les prélèvements destinés à l'analyse par cytométrie. Enfin, la lyse cellulaire a été quantifiée par dosage de l'enzyme *lactate déshydrogénase, LDH*, dans le surnageant de culture comme indiquée dans la partie matériel et méthodes.

La figure 49 présente les cinétiques d'évolution de ces différentes populations cellulaires pour une culture sans (a, d) et avec renouvellement de milieu à 48 h (b, e) ou à 72 h (c, f) de culture. Dans toutes les cultures, une nette augmentation de la concentration de cellules apoptotiques apparaît après 24 h de culture. Cette augmentation se poursuit progressivement dans le cas d'une culture sans renouvellement de milieu pour atteindre en fin de culture une concentration de $1{,}74 \times 10^{-5}$ cell.ml^{-1} soit 35 % de la population de cellules adhérées. Dans le cas des cultures ayant subi un renouvellement de milieu, la proportion de cellules apoptotiques décroît pendant 24 h après le renouvellement de milieu avant de remonter progressivement. Il est aussi important de constater que le déclin de la concentration de cellules adhérées apparaît lorsque la proportion de cellules viables dans cette population cellulaire atteint environ 65 % (Figure 49 a,d - c,f). Les cinétiques de mort par lyse cellulaire semblent assez similaires, avec des concentrations de cellules lysées au moment du déclin des cellules adhérées respectivement de $2{,}5 \times 10^{5}$ cell.ml^{-1} sans renouvellement, $2{,}0 \times 10^{5}$ cell.ml^{-1} et $2{,}2 \times 10^{5}$ cell.ml^{-1} avec un renouvellement de milieu à 48 h ou à 72 h de culture. Cependant, le pourcentage de cellules lysées est alors de 25 à 50 % plus important dans le cas de la culture de référence (16 % contre 8 ou 12 %).

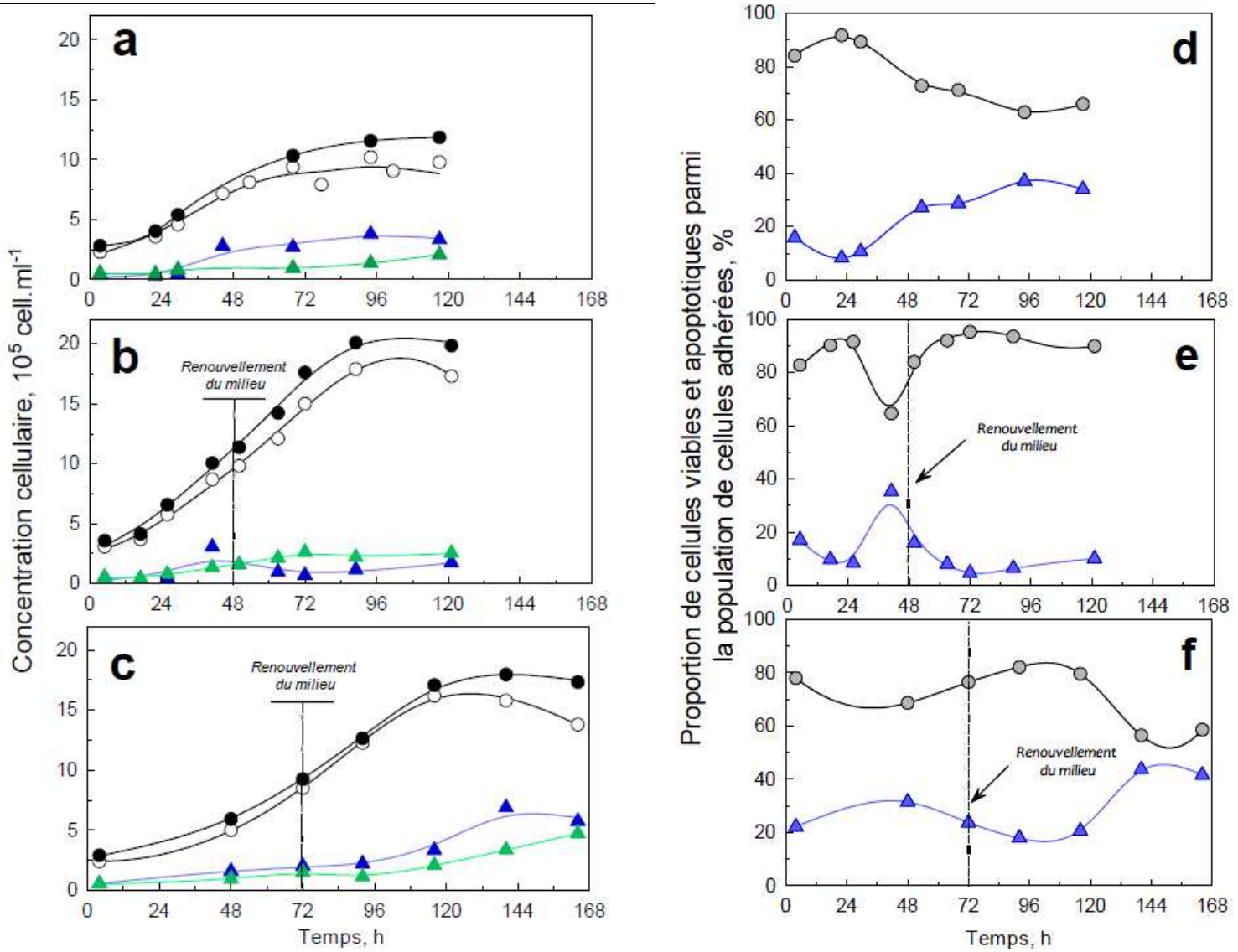


Figure 49. Concentration des populations cellulaires (a, b, c) et proportion de ces populations cellulaires parmi les cellules adhérées (d, e, f) pour une culture en milieu de référence sans renouvellement de milieu (a, d) et avec renouvellement du milieu à 48 h (b, e) et 72 h (c, f). Populations cellulaires : Cellules adhérées (○), cellules viables (●), cellules apoptotiques (▲), cellules lysées (▲), cellules totales (●) (cellules adhérées + cellules lysées).

Ces données nous donnent des indications intéressantes quant à la mortalité des cellules Vero cultivée sur microporteurs dans un milieu sans sérum. En effet, la très faible proportion de cellules détachées dans le surnageant de culture semble être une particularité de cette lignée cellulaire étant donné que d'autres travaux réalisés pour la lignée cellulaire Vero rapportent que la proportion de cellules détachées est de environ 2 % des cellules totales (Quesney *et al.,* 2001). L'absence de cellules nécrotiques « primaires » à la surface des microporteurs, semblent être un caractère spécifique de la lignée cellulaire Vero car ces données sont confirmées par deux autres travaux (Quesney *et al.,* 2001; Mendonca *et al.,* 2002).
L'absence ou le peu de cellules nécrotiques, adhérées ou en suspension, peut être expliquée par une lyse directe des cellules due à des contraintes hydrodynamiques très dommageables pour les membranes cellulaires (Al-Rubeai *et al.,* 1998). En effet, la nécrose intervient lorsque les contraintes hydrodynamiques ne sont pas assez intenses pour engendrer une dégradation complète, alors que, dans le cas de cellules sur microporteurs, les contraintes subies sont plus importantes que dans celui de cellules en suspension (Croughan *et al.,* 2006). De plus, on constate que la lyse cellulaire n'est pas ralentie par le renouvellement de milieu, à 48 ou 72 h, ce qui appuie l'hypothèse de l'influence prépondérante du système de culture lui-même sur l'apparition de ce type de mort cellulaire.

L'apoptose cellulaire est un indicateur important de l'état cellulaire et semble être prépondérante dans le comportement des cellules Vero dans notre milieu de culture. Ce mécanisme de mort cellulaire peut être déclenché par de nombreux stimuli environnementaux, tels que les stress physiques, chimiques, mais il est aussi associé dans différents travaux, à des limitations nutritives. Par ailleurs, l'apparition de cellules apoptotiques est retardée pendant au moins 24 h grâce au renouvellement de 80 % du milieu, indifféremment à 48 ou 72 h de culture. Ce phénomène peut donc aussi être lié à l'élimination de métabolites toxiques produits au cours de la croissance. C'est pourquoi, afin d'approfondir l'impact d'éventuelles limitations nutritives et accumulations de produits toxiques sur la cellule Vero, les cinétiques de consommation de deux substrats majeurs, le glucose et la glutamine, mais aussi leur métabolisation et la formation de produits inhibiteurs de la croissance, le lactate et les ions ammonium, ont été caractérisées dans la partie suivante.

2.2.3. Cinétiques métaboliques

Les cinétiques de consommation de glucose et de glutamine et de production de lactate et d'ions ammonium sont présentées dans la figure 50 en comparant deux cultures sans et avec renouvellement de milieu. Les comportements étant identiques pour les cultures avec renouvellement de milieu à 72 ou 48 h, seule cette dernière culture est présentée. Comme nous l'avons déjà exposé, lors de la culture sans renouvellement de milieu, après 72 h, la glutamine est totalement consommée, le glucose se maintient à environ 8 mM, alors que le lactate atteint une concentration maximale de 17,5 mM. Dans ces conditions, la concentration de cellules attachées se maintient à 9×10^5 cell.ml^{-1} jusqu'à 120 h de culture.

Dans le cas des cultures avec un renouvellement de milieu, la concentration en glucose n'est jamais limitante avec une concentration résiduelle de 6 mM. Ainsi, bien que 80 % de la concentration en lactate produite dans les 48 premières heures de culture soit éliminée lors du renouvellement de milieu, une concentration de 17,5 mM est atteinte en seulement 24 h de culture avant que la consommation de glucose et la production de lactate ne s'arrêtent. Néanmoins, le renouvellement de milieu ne semble pas modifier le rendement $Y_{Lact/Glc}$ de 1,7, valeur très proche de celle obtenue dans la culture sans renouvellement.

La levée de la limitation en glutamine est le deuxième effet majeur du renouvellement du milieu de culture (Figure 50). La production d'ions ammonium est néanmoins plus élevée que dans une culture sans renouvellement de milieu car elle atteint près de 3 mM en fin de culture avec une augmentation transitoire de la vitesse spécifique de production après le renouvellement de milieu (Figure 50). On constate par ailleurs que le renouvellement de milieu semble affecter le rendement $Y_{NH4/Gln}$, qui passe de 0,48 sans renouvellement de milieu à 0,87 avec renouvellement de milieu.

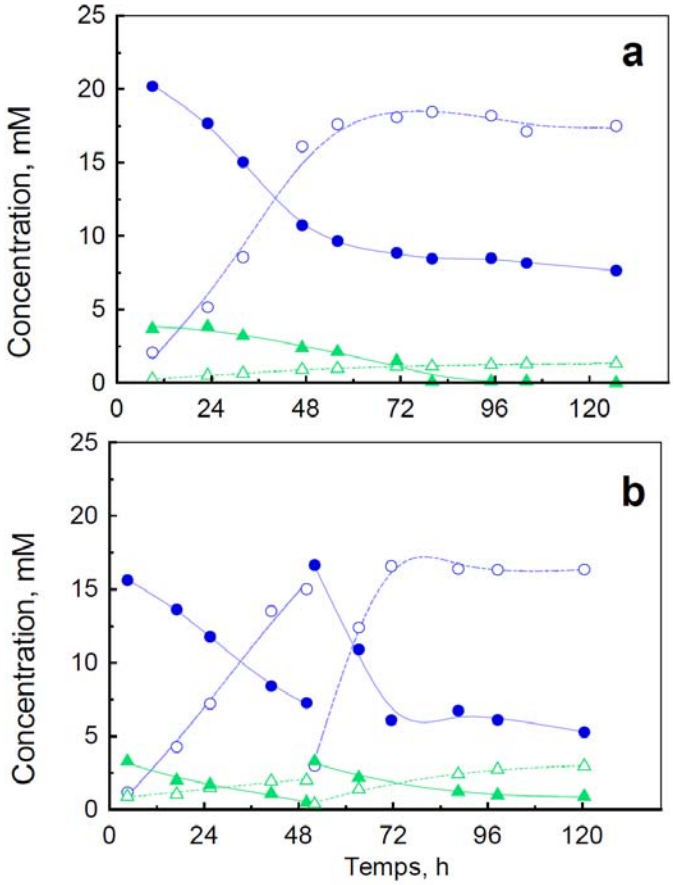
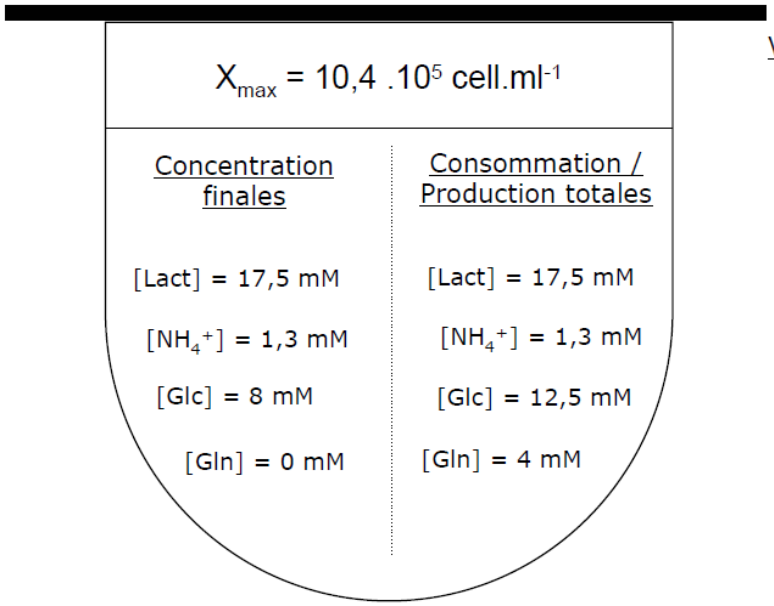


Figure 50. Concentration en glucose (●), lactate (○), glutamine (▲) et ions ammoniums (△) pour une culture sans (a) et avec (b) renouvellement du milieu à 48 h de culture.

2.2.4. Conclusion

Cette étude cinétique comparative de cultures de cellules Vero avec et sans renouvellement du milieu de culture après 2 ou 3 jours de culture, a permis de mettre en évidence l'influence du renouvellement du milieu de culture sur la croissance, la mort et le métabolisme de la cellule Vero (Figure 51). Celui-ci permet d'atteindre une concentration cellulaire plus élevée, en levant la limitation nutritionnelle par la glutamine et en diminuant temporairement la concentration en métabolites potentiellement toxiques. Cependant, cette opération ne semble pas avoir d'impact sur le métabolisme du glucose ni sur la production de lactate. Seul le métabolisme de la glutamine est sensiblement différent avec une augmentation de la production d'ions ammonium par glutamine consommée et une forte accumulation d'ions ammonium.

- **Sans renouvellement de milieu**



Vitesses spécifiques maximales

μ_{max} = 0,021 h^{-1}

q_{Glc} = 0,065 µmol.h^{-1}.10^{-5}cell

q_{Lact} = 0,1 µmol.h^{-1}.10^{-5}cell

q_{Gln} = 0,0075 µmol.h^{-1}.10^{-5}cell

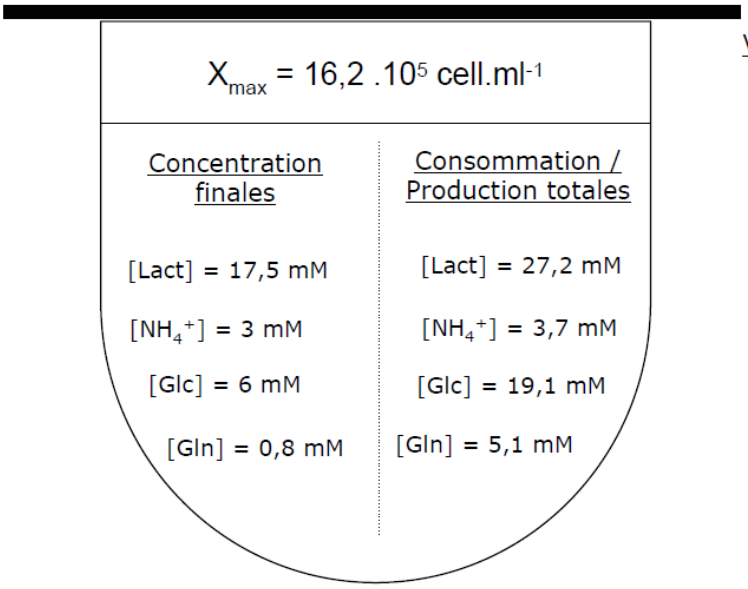
q_{NH4}^+ = 0,005 µmol.h^{-1}.10^{-5}cell

Rendements globaux

$Y_{Lact/Glc}$ = 1,65

$Y_{NH4/Gln}$ = 0,48

- **Avec renouvellement de milieu (80 % du volume) à 48 h de culture**



Vitesses spécifiques maximales

μ_{max} = 0,024 h^{-1}

q_{Glc} = 0,06 µmol.h^{-1}.10^{-5}cell

q_{Lact} = 0,08 µmol.h^{-1}.10^{-5}cell

q_{Gln} = 0,02 µmol.h^{-1}.10^{-5}cell

q_{NH4}^+ = 0,007 µmol.h^{-1}.10^{-5}cell

Rendements globaux

$Y_{Lact/Glc}$ = 1,55

$Y_{NH4/Gln}$ = 0,87

Figure 51. Comparaison des résultats des études cinétiques de cultures de cellules Vero en milieu de référence, sans ou avec une recharge-récolte du milieu de culture.

De plus, la caractérisation des populations cellulaires présentes dans le système de culture a été réalisée, comme illustrée dans figure 51 après 120 h de culture. Aucune cellule en suspension n'est présente dans le surnageant de culture, quelles que soient les conditions opératoires. Le renouvellement de milieu permet de réduire l'apoptose cellulaire, et ce, d'autant plus que l'apport en milieu frais est précoce. Au contraire, la lyse cellulaire est très peu influencée par le changement du milieu. La conséquence est une augmentation de la viabilité cellulaire de 15 à 30 % selon le moment du renouvellement.

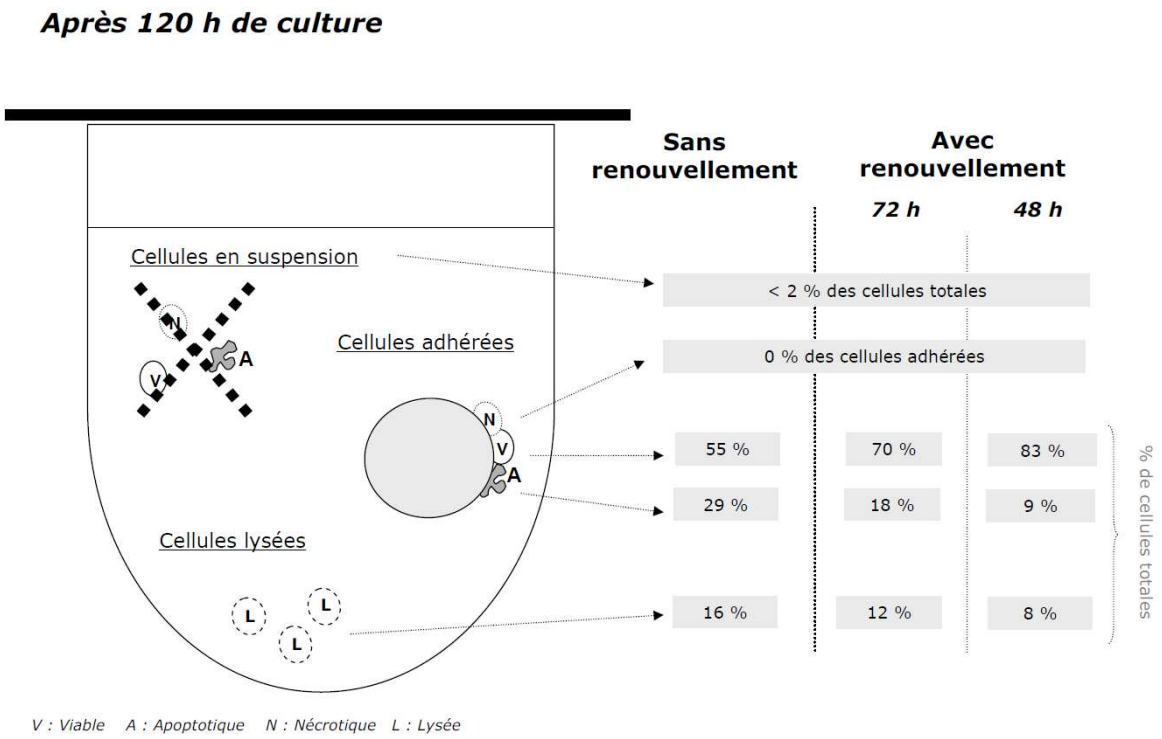


Figure 52. Bilan des populations cellulaires présentes après 120 h de culture, en milieu de référence avec ou sans renouvellement du milieu.

Le renouvellement du milieu en cours de culture est bénéfique pour les cellules Vero en milieu sans sérum, car il permet d'allonger la phase de croissance et d'atteindre une concentration cellulaire maximale plus élevée. Cependant, il ne fait que pallier certaines insuffisances et/ou défauts du milieu de culture sans sérum, sans améliorer l'utilisation des substrats vers la croissance cellulaire. Par ailleurs, il nécessite une opération de soutirage et d'ajout de milieu, avec des risques accrus de contamination. Un autre inconvénient est le coût supplémentaire induit. C'est pourquoi, une stratégie de modification de la composition du milieu va être étudiée dans la prochaine partie.

2.3. Influence de la dilution du milieu de référence ou de l'ajout de glutamine dans le milieu de culture

Dans cette partie, deux stratégies de modification de la composition du milieu de culture ont été étudiées afin d'observer leur impact sur le métabolisme et la croissance cellulaires. La disponibilité des substrats carbonés, glucose et glutamine, a été modifiée, soit, par la dilution du milieu de culture, soit, par l'ajout ponctuel de glutamine.

2.3.1. Croissance cellulaire

Une culture a été réalisée avec ajout de 4 mM de glutamine à 68 h, tandis qu'une autre culture était réalisée en milieu de référence dilué de moitié par du PBS. Les cinétiques de croissance obtenues sont comparées avec des cultures en milieu de référence avec ou sans renouvellement du milieu (figure 53).

L'ajout de 4 mM de glutamine à 68 h de culture permet d'augmenter la concentration cellulaire maximale jusqu'à une valeur de $1{,}49 \times 10^5$ cell.ml^{-1}, soit une augmentation de 46 % par rapport à la culture en milieu de référence, avec une vitesse spécifique maximale de croissance similaire à la culture de référence. Dans le milieu de culture dilué par du PBS, la concentration cellulaire maximale est diminuée de plus de 50 %. Par ailleurs, la concentration cellulaire à 4h de culture est plus faible ($1{,}1 \times 10^5$ cell.ml^{-1}) et une phase de latence de 24 h est observée. Ceci laisserait supposer une adhésion et une revitalisation plus délicates dans le milieu dilué, du fait de la forte diminution des facteurs favorisant l'adhésion et la croissance cellulaire. Cette observation peut être rapprochée de celle réalisée lors du criblage des groupes de composés du milieu de culture (Résultats & Discussion paragraphe 1.1). Dans ce cas, l'ajout du groupe G7, composé de facteurs de croissance, d'insuline et d'extraits peptidiques, favorisait la croissance et l'adhésion cellulaire, lors de cultures en microplaques ou en spinners.

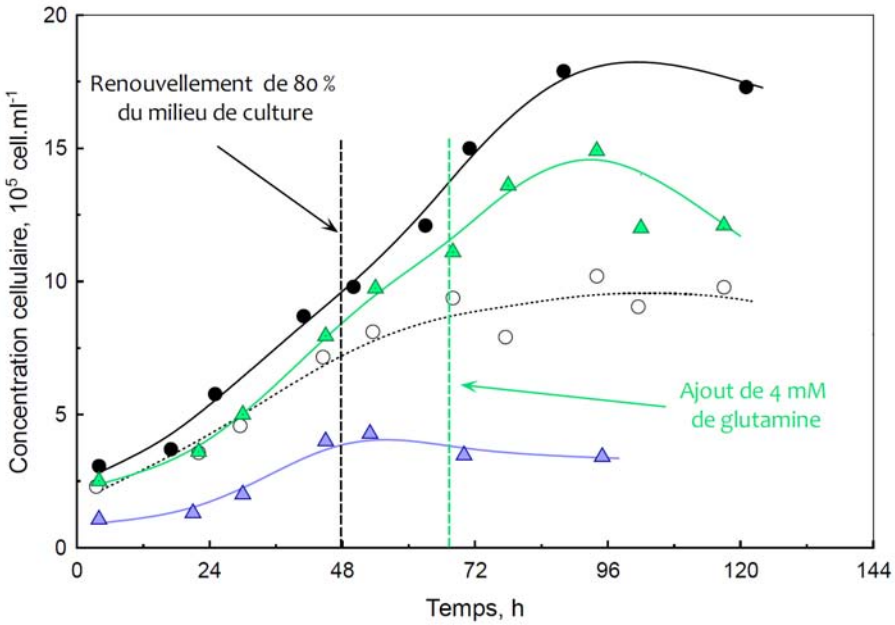


Figure 53. Cinétique de croissance en milieu de référence avec (●) ou sans (○) renouvellement de milieu, en milieu de référence additionné de glutamine à 68 h (▲) et en milieu de référence dilué à 50 % avec du PBS (▲).

2.3.2. Cinétiques métaboliques

L'objectif de ces essais étant aussi d'identifier l'impact de la disponibilité des principaux substrats sur le métabolisme cellulaire, des comparaisons des cinétiques métaboliques ont aussi été réalisées (Figure 54). Au vu des cinétiques de consommation de glucose et glutamine et de production de lactate et des ions ammonium, on constate que la culture en présence de milieu de référence dilué est limitée en glutamine après 48 h de culture au moment où la concentration cellulaire décroît sans qu'une limitation en glucose n'intervienne.

Le rendement $Y_{Lact/Glc}$ est légèrement supérieur à celui de la culture de référence, avec une valeur de 1,83 et une concentration de lactate maximale de 10 mM. Le rendement $Y_{NH4+/Gln,}$ quant à lui, est 3 fois plus important que pour la culture de référence, avec une valeur de 1,66. De plus, la concentration d'ions NH_4^+ continue à augmenter après la déplétion de la glutamine. D'autres sources d'azote, acides aminés et hydrolysats peptiques, présentes dans le milieu de culture sont donc consommées et impliquées dans la production des ions ammonium. Dans le cas de cette culture en milieu dilué, seule la limitation en glutamine peut expliquer la diminution de la croissance, les concentrations maximales en lactate et en ions ammonium étant respectivement inférieures à 10 mM et à 3 mM.

Les cinétiques de la culture avec addition de glutamine à 72 h de culture permettent de confirmer cette hypothèse. Le métabolisme de la glutamine ne semble pas être modifié par rapport à la culture de référence, avec un rendement global $Y_{NH4+/Gln}$ de 0,45, très proche de celui obtenu pour la culture de référence. De la même façon, le métabolisme du glucose n'est pas modifié avec une concentration maximale de lactate de 16 mM, une consommation de 11,6 mM de glucose et un rendement $Y_{Lact/Glc}$ de 1,68.

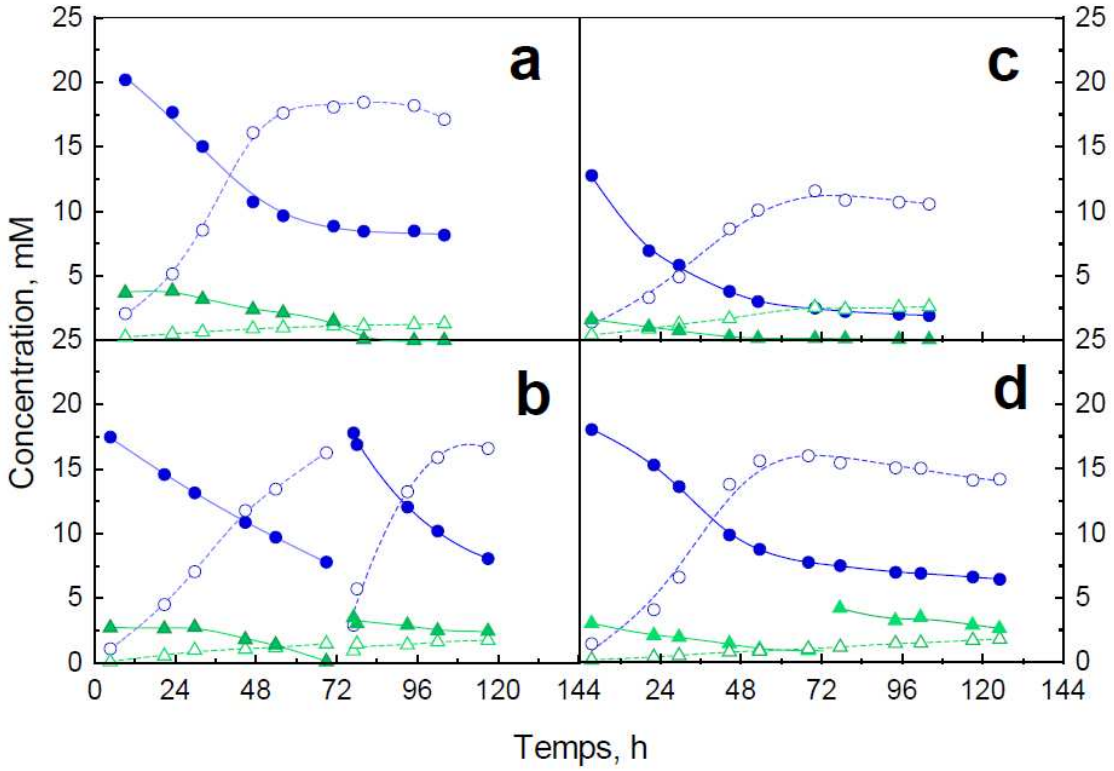


Figure 54. Concentration en glucose (●), lactate (○), glutamine (△) et ions ammoniums (▲) pour une culture en milieu de référence avec (b) ou sans (a) renouvellement de milieu à 48h de culture, en milieu de référence additionné de glutamine après 48h de culture (d) et en milieu de référence dilué 1 : 1 par du PBS (c).

2.3.3. Conclusion

Les caractéristiques cinétiques des cultures en milieu de référence dilué et en milieu de référence additionné de glutamine sont présentées dans la figure 55.

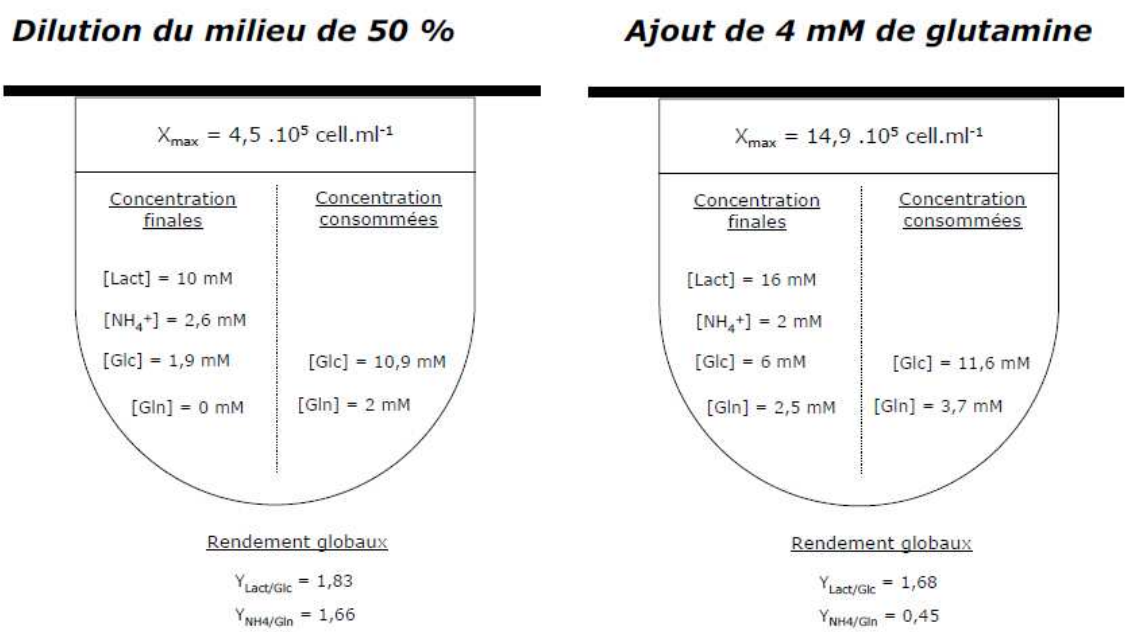


Figure 55. Synthèse des paramètres cinétiques pour une culture en milieu de référence dilué à 50 % et une culture en milieu de référence additionné de glutamine.

Malgré la complexité du milieu de référence, sa dilution est inefficace car elle limite la concentration des cellules même si elle réduit l'accumulation de lactate ou d'ions ammonium. Ces deux cultures confirment, par ailleurs, l'importance de la glutamine. Sa déplétion semble être à l'origine de la limitation de la croissance cellulaire. Le métabolisme du glucose ne paraît pas influencé par l'ajout de glutamine. D'autres acides aminés ou peptides relaient l'absence de glutamine en tant que source azotée. Dans la partie suivante, le métabolisme carboné central de la cellule Vero sera approfondi, avec diverses stratégies de substitution du glucose et de la glutamine.

2.4. Etude métabolique et physiologique de la cellule Vero en milieu sans sérum

2.4.1. Introduction

Comme nous l'avons indiqué dans la revue bibliographique, le métabolisme de la cellule Vero est relativement peu connu, en particulier lors de cultures en milieu sans sérum. Nos résultats précédents ont mis en avant quelques éléments clés de ce métabolisme dans notre milieu de référence. Pour approfondir notre compréhension du comportement des cellules Vero, cette partie propose une caractérisation globale du métabolisme carboné central (glycolyse, glutaminolyse, cycle des acides tricarboxyliques et voies de métabolisation des acides aminés) en milieu sans sérum.

Diverses stratégies de substitution du glucose et de la glutamine sont envisagées. Ainsi, la glycolyse est approvisionnée, soit, par différentes concentrations de glucose, soit, par un glucide différent. Dans le cas de la glutaminolyse, des substituts aux propriétés moins ammoniagéniques sont choisis. L'objectif est d'améliorer la croissance et la concentration cellulaires par rapport à une culture en milieu de référence sans renouvellement de milieu, sans remettre en cause les performances de production virale.

Cette partie est présentée sous la forme d'un manuscrit de publication.

2.4.2. Caractérisation cinétique du métabolisme de la cellule Vero en procédé de culture sans sérum

Kinetic characterization of VERO cell metabolism in a serum-free batch culture process

Emma Petiot[1], Emmanuel Guedon[1], Fabrice Blanchard[1], Cécile Gény [2], Hervé Pinton[2], Annie Marc[1]

1 - Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, UPR CNRS 6811, Nancy-Université, 2 avenue de la Forêt de Haye, F - 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

2 - Sanofi pasteur, 1541 avenue Marcel Mérieux, F - 69280 Marcy L'Etoile, France

Abstract

A global kinetic study of the central metabolism of Vero cells cultivated in a serum-free medium is proposed in the present work. In our serum-free culture, central metabolism including glycolysis, glutaminolysis and tricarboxylic acid cycle (TCA) was demonstrated to be saturated by high flow rates of consumption of the two major substrates, glucose and glutamine. Saturation was highlighted with a energetic metabolism intermediates and amino acids accumulations, a high production of lactate needed to balance the redox pathway, and a low participation of carbon flow to TCA cycle supply. Different culture conditions were set up to reduce the central metabolism saturation and better balance the flow between lactate production and energetic pathways. From these culture conditions, substitutions of glutamine with other carbon sources, which have lower transport rates or shunt the glycolysis pathway as the pyruvate, were successful to better balance the central metabolism, implying an increase of the cell growth with a concomitant decrease of cell death and a better distribution of the carbon flow between TCA cycle and lactate production. We also demonstrated that, glutamine was a major carbon source for TCA cycle supply in Vero cells and that reducing lactate concentration was not necessary to improve efficiency of the Vero cell metabolism. Thus, to adapt the formulation of the medium to the Vero cell needs, it is important to provide carbon substrates inducing a regulated supply of carbon in the TCA cycle either through the glycolysis or through other pathways such as glutaminolysis. Finally, this study allowed to reach a better understanding of the Vero cell behavior in serum-free medium which is a valuable help for the implementation of this cell line in serum-free industrial production processes.

Key words

Vero cells, glycolysis, glutaminolysis, amino acids, intracellular analyses, cell death

Introduction

Production processes of cell-based vaccines are still highly dependant upon the adherent Vero cells. Indeed, Vero cells deriving from African green monkey kidney are used for mass productions of viruses such as reovirus (Butler *et al.,* 2000), japanese encephalitis virus (Wu *et al.,* 2002; Toriniwa *et al.,* 2007), hepatitis A virus (Sun *et al.,* 2004), Chikungunya virus (Tiwari *et al.,* 2009), rabies virus (Frazatti-Gallina *et al.,* 2004; Trabelsi *et al.,* 2006; Rourou *et al.,* 2007; Rourou *et al.,* 2009) and enterovirus (Wu *et al.,* 2004; Liu *et al.,* 2007a). While Vero cells were used in virus production processes since several years, the formulation of specific media without animal origin components to satisfy control and safety requirements, is still under development (Petiot *et al.,* 2009). Media optimization generally requires a high understanding of the cell metabolism, but very few reports focused on the metabolism of Vero cells (Mendonça *et al.,* 1998; Mendonca *et al.,* 2002; Quesney *et al.,* 2003; Huang *et al.,* 2006; Huang *et al.,* 2007). These studies were generally dedicated to one specific part of the central metabolism as reported by Huang et al., (2006) and Huang et al., (2007) who studied glutamine or other ammoniagenic compounds pathways preferentially used in different culture conditions. In addition, it has to be noted that all studies focused on Vero cell metabolism, were carried out in serum containing media, except for a part of the work reported by Quesney *et al*. (2003).

Fortunately, metabolic comprehension of Vero cells can rely on the metabolic study of others animal cells. Indeed, animal cell metabolism was largely studied in the last 30 years, in the case of hybridoma, CHO cells (Mochizuki *et al.,* 1993; Christie *et al.,* 1994; Zupke *et al.,* 1995; Chen *et al.,* 2005), or other adherent cells of kidney origin such as MDCK, BHK and HEK-293 cells (Wentz *et al.,* 1992; Christie *et al.,* 1999; Cruz *et al.,* 1999; Cruz *et al.,* 2000; Sidorenko *et al.,* 2008; Wahl *et al.,* 2008). Such studies generally focused on the metabolism of glucose and glutamine, the two major carbon sources for animal cell cultures. In most of these works, glucose metabolism was reported to be strongly inefficient *in-vitro* with a high consumption of glucose leading to an important production rate of lactate, to the detriment of the tri-carboxylic acid (TCA) cycle supply (Neermann *et al.,* 1996; Cruz *et al.,* 1999), resulting in a low participation to energetic metabolism and in a low cell growth. Besides, this observation was confirmed by metabolic flux analysis (MFA) analysis realized on MDCK cell cultures, demonstrating that up to 99% of the glycolysis-derived pyruvate was metabolized to lactate (Cruz *et al.,* 1999; Sidorenko *et al.,* 2008). This production of lactate, directly formed from pyruvate, is assumed to participate to the oxidation of NADH produced by the glycolysis in the cytosol. Indeed, in the case of a high glycolysis activity, NADH accumulated in the cytosol whereas $NADH/NAD^+$ oxydation in the mitochondria was limited by

diffusion transport of NADH between these cell compartments (Sanfeliu *et al.,* 1997). Moreover, lactate was often described as a cell growth inhibitor for cell cultivated *in-vitro.* As a result, metabolic studies and medium optimization for cell-based processes focused on the reduction of lactate excretion. Continuous cultures or fed-batch strategies are usually carried out to reduce lactate production by cells, because they allow to maintain a low glucose feeding concentration close to the range of 0.2 to 0.8 $g.l^{-1}$ as observed in mammals (Kohler *et al.,* 1975; Miller *et al.,* 1989; Miller *et al.,* 2000; Trabelsi *et al.,* 2006; Wlaschin *et al.,* 2006; Iwatani *et al.,* 2007). Nevertheless, such strategies required a high degree of process control with instrumentation and expertise, which could be limiting for an industrial implementation. Genetic modifications have also been proposed to reduce lactate production by the mean of LDH or glucose transporter gene disruption, using mRNA antisens or siRNA strategies. However such methodologies often led to unstable mutant cell lines (Chen *et al.,* 2001; Kim *et al.,* 2007; Wlaschin *et al.,* 2007).

According to literature, the second most studied metabolic pathway was the glutaminolysis. Indeed, glutamine is the second carbon source for cells growing *in-vitro* because this amino acid is a supplier of the TCA cycle at the α-ketoglutarate branch point, α-KG. The importance of this pathway was stressed by *in-vitro* production of ammonia, which is a by-product mainly resulting of the two step glutamine desamination. Glutamine is firstly desaminated through its transformation in glutamate. Then glutamate can be transformed in α-KG by three different pathways, either by desamination of glutamate, by transamination to alanine with a concomitant consumption of pyruvate or by transamination to aspartate with a concomitant consumption of oxaloacetate, OAA. Ammonia was described to inhibit the cell growth when concentration was as low as 1 mM (Genzel *et al.,* 2004), and for Vero cells, the IC50 (50% decrease in growth) was determined to be 5 mM (Huang *et al.,* 2006). Moreover, ammonia is also known to impact negatively virus production yields as previously reported (Schneider *et al.,* 1996). Therefore, for cell-based production, reduction of ammonia released in the cell culture supernatant was considered as an issue. Several works intended to substitute glutamine by less ammoniagenic compounds such as glutamate, asparagine (Christie *et al.,* 1999; Huang *et al.,* 2006), di-peptides (glycyl-glutamine and alanine-glutamine, Christie *et al.,* 1994) or directly with α-KG (Hassell *et al.,* 1990). These substitutions were proved to clearly reduce the ammonia concentration produced by animal cells. Recently, a new strategy proposed to substitute glutamine by pyruvate (Genzel *et al.,* 2005) in the MDCK cell culture process. In this study, central cell metabolism was investigated though MFA but was mostly based on hypothetical metabolic models (Sidorenko *et al.,* 2008; Wahl *et al.,* 2008). To our knowledge, a complete study describing the central carbon metabolism has never been carried out in Vero cell culture processes.

Metabolism is also related to cell death mechanisms and especially to the induction of necrosis or apoptosis. Indeed, glucose or amino acid depletions have been described to induce cell apoptosis (Al-Rubeai *et al.,* 1998; Simpson *et al.,* 1998). Hybridoma and myeloma cell death have demonstrated that high lactate concentrations could result in a cell necrosis induction (Mercille *et al.,* 1994; Singh *et al.,* 1994; Arden *et al.,* 2004). Finally, Mendonça et al. (2002) showed that apoptosis could be prevented in Vero cell culture feeded with galactose. However, relationship between death of Vero cells and metabolism still has to be characterized in kinetic studies.

As previously reported, Vero cells have been recently adapted to grow in a serum-free medium for vaccine production (Merten *et al.,* 1997; Butler *et al.,* 2000; Quesney *et al.,* 2001; Rourou *et al.,* 2007; Petiot *et al.,* 2009), but Vero cell metabolism remains not well characterized particularly when cultivated in a serum-free medium (Quesney *et al.,* 2003). Since this cell line is of importance for virus production, a metabolic characterization has still to be established. The first objective of this study was to increase knowledges of the central carbon metabolism of Vero cells cultivated in an animal-component free medium. To reach this goal, a global approach based on the kinetic characterization of Vero cell metabolism was carried out, with a particular attention paid to glycolysis and glutaminolysis performances on the cell growth, the cell death and the virus production. This was performed through various culture conditions. Thus, glycolysis was fed with different concentrations and composition in carbohydrates, and in the case of glutaminolysis, glutamine was substituted by low or no ammoniagenic compounds, able to supply the TCA cycle at different branch points. Kinetic studies allowed to conclude on the central metabolism efficiency of Vero cells cultivated in a serum-free medium and to propose culture medium formulation better adaptated to cell needs for further potential industrial virus productions.

Material and Methods

Cell line

Adherent Vero cells were obtained at passage 140 from Sanofi pasteur (Marcy L'Etoile, France). This industrial cell line was isolated from African green monkey kidney in 1962 and was adapted to serum-free culture conditions. Vero cells were grown in a complex serum-free medium including amino acids and peptones. A culture medium formulation called basic medium was realized from this medium deleted from glucose and glutamine. For the reference culture medium, 4 mM of glutamine and 22 mM of glucose were added to the basic medium. For media with carbon source substitutions, formulations were realized by adding fructose, asparagine, pyruvate or glutamax® to the basic medium as precised in the results and discussion part.

Cell culture

The cell adaptation was performed in each medium formulation by three passages for 4 days in 175 cm^2 T-flasks seeded with 3.15 $\times 10^5$ $cell.ml^{-1}$. After cell amplification, batch cultures were realized with cells attached on microcarriers in 250 ml spinner flasks seeded with 2.75 $\times$ 10^5 $cell.ml^{-1}$, inside an incubator controlled at 37 °C and 5 % CO2. For cell numeration, viable cells attached on microcarriers were sampled and washed twice with PBS after microcarrier settling. Samples were then treated with Crystal Violet (Sigma, France) for at least 1 h at 37°C prior numeration of the released nucleus. Numerations were performed on Fush-Rosenthal hemacytometer (Preciss, France).

Cell death quantification

Apoptosis was quantified with a Guava cytometer by the annexin V marquer (Guava technologies) which bounded the phosphatidyl serine proteins translocated at the cell surface at the beginning of the apoptosis process. Lysed cells were detected through LDH released in the cell culture supernatant with an enzymatic kit (LDH PAP, Ellitech) on a Vitalab selectra E enzymatic analyser (Vital Scientific). Thus, the total cell population was described as the addition of lysed cells to adhered cells numbered with Crystal Violet. Previously to lysis quantification, standards were realized with viable cells expanded in T-flasks, and taken from the exponential growth phase with at least 90 % of viability. After a cell lysis procedure described in Goergen et al. (1993), intracellular LDH content of viable Vero cells was determined to be of 1.33 $\times$ 10^{-6} $UI.cell^{-1}$.

Analyses in the culture supernatant

All extracellular analyzes were realized from filtered culture supernatants sampled all over the cell cultures. Glucose, lactate and glutamine concentrations were assayed using enzymatic commercial kits (glucose PAP, Ellitech ; lactate PAP, Biomérieux ; glutamate, R-Biopharm) on a Vitalab selectra E enzymatic analyzer (Vital Scientific) whereas ammonia was quantified with a selective probe (Orion). The amino acid and di-peptide concentrations were measured by HPLC (Shimadzu) with a pre-column derivatization step using ortho-phthalaldehyde (OPA) for fluorescence detection. Separation of the amino acids was conducted in a Shim-pack CLC-ODS reversed-phase partition chromatography column (Shimadzu) at 45°C. Detection was performed through a fluorescence detector set at 475 nm. Pyruvate was quantified by HPLC with the method described below for intracellular organic acids.

Intracellular analyses

A new extraction technique of intracellular metabolites was developed for cells adhered on microcarrier in this study. It has been adapted from two protocols dedicated to suspension cells (Lu et al. 2003; Ryll and Wagner 1991). Samples of 10 ml were taken each day of batch cultures since 48 h of culture, to collect at least 7 $\times$ 10^6 cells. All the extraction steps were realized in ice below 0 °C with cold reagents. The centrifugation steps were performed at 4 °C. Twice, microcarriers with adhered cells were settled for 5 min and washed with 10 ml NaCl 0.9 %. Supernatant was discarded carefully to avoid losing microcarriers and a 1 ml volume remained at the end of the procedure. Cells on microcarriers were then lysed for 10 min with 200 µl of 0.3 mM perchloric acid and briefly vortexed each 2 min. After 10 min centrifugation at 12 000 g, supernatants were collected and neutralized with 100 µl of 0.6 mM KOH for 5 min. After a second centrifugation step of 10 min at 12 000 g, supernatants were collected and frozen at -80°C. Intracellular pyruvate, lactate and citrate were then quantified by HPLC (Waters) with isocratic elution using 0.04 M H2SO4 solution on polypore H column (Brownlee Lab.) at 65 °C with UV detector (210 nm). HPLC measurements were always performed within 48 h after the extraction procedure.

Virus production

Viral production experiments were performed in 5 l bioreactors. Batch cell cultures, seeded with 2.75 × 105 $cell.ml^{-1}$ were infected after 3 days of culture with dengue virus. Viral production was then quantified each days by supernatant cell culture titration of the TCID50 (median tissue culture infective dose) which correspond to a quantification of the infectiosity of the produced virus.

Results and Discussion

Vero cell kinetics in a serum-free medium

In order to characterize the metabolism of Vero cells cultivated in serum-free culture medium, a cell growth and metabolism kinetic study of Vero cells was carried out in a reference serum-free medium in 250 ml spinner flask (figure 1). In this culture condition, Vero cells were able to grow at a maximal specific growth rate of 0.021 h^{-1} and a maximal cell concentration of 9.6 × 10^5 cell.ml^{-1} was reached after 90 h of culture, then the growth stopped. During this culture, cell apoptosis and cell lysis were also quantified, and it should be underlined that the proportion of cell apoptosis increased until 90 h of culture and reached 42 % of the total cell population. However, lysed cells were kept globally constant during the whole culture time with a value between 10 and 15 % of the total cells.

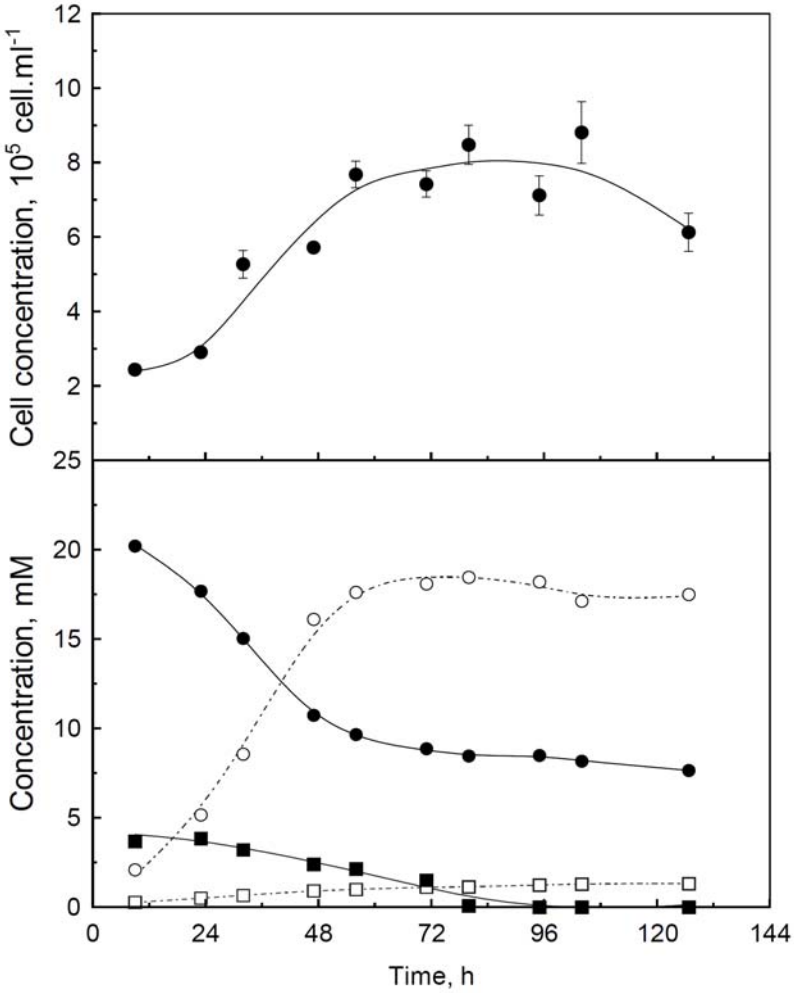


Figure 1 Time courses of Vero cell concentration cultivated in reference medium (●) (upper graph) and of glucose (●), lactate (○), glutamine (■) and ammonium ions (□) (lower graph).

To support the growth of Vero cells, glucose and glutamine were consumed at a specific rates, respectively of 0.05 and 0.009 $\mu M.h^{-1}.10^{-5}$cells. Whereas glutamine was completely exhausted after 90 h of culture, glucose consumption decreased strongly, resulting in a residual glucose concentration of 8.7 mM, remaining almost constant until the end of the culture. The depletion of glutamine from the culture medium coincided with the end of the cell growth, suggesting that this component could be limiting, and high proportion of apoptotic cells was also observed at that time of the culture.

Accumulation of by-products such as lactate or NH_4^+ up to inhibitory concentrations could also explain the end of the growth of Vero cells as already reported (Hassell *et al.,* 1991).

In our case, ammonia accumulated in the medium up to 1.3 mM with a specific production rate of 0.005 $\mu M.h^{-1}.10^{-5}$cell and reached a final yield, $Y_{NH4/Gln}$ of 0.48. However, such accumulation was quite low to inhibit the Vero cell growth (Hassell *et al.,* 1991; Huang *et al.,* 2006). In comparison, lactate accumulated in the medium supernatant at a maximal specific production rate of 0.07 $\mu M.h^{-1}.10^{-5}$cells and reached a final concentration of 18.5 mM when the glucose consumption stopped. Interestingly, Quesney et al. (2003) reported that inhibitory effects of lactate on the growth of Vero cells could appear at a concentration of 20 mM. As a result, a high $Y_{lac/glc}$ of 1.7 was obtained, indicating that most of glucose consumed was converted in lactate. High specific rates of glucose consumption and high $Y_{Lact/glc}$ generally indicate a low efficiency of carbon substrate metabolization by the central cell metabolism. In the case of other kidney cells, such as MDCK and BHK cells, the glucose flow was demonstrated to be mainly directed to lactate production instead of participating to the cell energy metabolism through the TCA cycle (Cruz *et al.,* 1999; Sidorenko *et al.,* 2008). In fact, this metabolic behaviour was already observed for *in-vitro* cultures of most of the continuous cell lines and seems to be a common character of cancerous cells (Gillies *et al.,* 2007).

These kinetic results established with Vero cells cultivated in a reference serum-free medium demonstrated an inefficient central cell metabolism. Indeed, despite their high activity, the metabolic pathways of the two major sources of carbon, glucose and glutamine, did not well participated to the energetic metabolism and the cell growth, whereas by-products, such as NH_4^+ and lactate, were released in the cell culture supernatant. Therefore, Vero cell growth seems to be mainly limited by either the early depletion of glutamine or by high lactate production.

Glycolysis of Vero cells cultivated in a serum-free medium

Because of the high lactate release in the cell culture supernatant, we first focused on the balance of the Vero cell glycolysis. It can be assumed that lower initial concentrations of carbohydrate could affect the glycolysis rate and therefore could alter the distribution of the carbon flow between lactate and the TCA cycle at the pyruvate branch point. The reduction of the initial glucose concentration is justified by the fact that glycaemia in interstitial fluids of mammals, is about 4 times lower than the initial glucose concentration of 22 mM present in most of media dedicated to animal cell cultures. Thus, initial glucose concentration in the reference culture medium was reduced from 22 mM to 5.5 mM and 11 mM. Glycolysis can also be affected by a lower carbohydrate transport rate. In the present case, always in the scope of an industrial use of Vero cells, strategy of glucose substitution by carbohydrates displaying lower transport rates is preferred to genetic transformation of cells (Paredes *et al.,* 1999). So, glucose was substituted by fructose, a homologous carbon energy source well transported by Vero cells since the specific protein carrier of this carbohydrate, Glut 5, is present in kidney cells. The reduced transport rate of fructose is a consequence of a lower affinity of Glut 5 for fructose (Km of 8-18 mM) than Glut 1 for glucose (Km of 1-2 mM), Glut 1 which is the glucose ubiquitous protein carrier present in all the cell line types (Inukai *et al.,* 1995; Darakhshan *et al.,* 1998). Contrary to galactose, an other potent carbon source substitute (Mendonça *et al.,* 1998; Mendonca *et al.,* 2002), fructose is not an animal derivative and can be introduced in animal-free component media.

Reduction of glucose concentration in Vero cell cultures

The effects of reduced concentrations of glucose on kinetics of Vero cells are presented in figure 2 and 3. Growth of cells was similar in media with initial glucose concentration of 22 mM and 11 mM, resulting in similar maximal cell densities of 9.6×10^5 cell.ml^{-1}. However, with an initial glucose concentration of 5.5 mM, the maximal cell density reached only 8.6×10^5 cell.ml^{-1}. In both 5.5 mM and 11 mM glucose conditions, the decrease in viable cell densities coincided with the glucose depletion after 50 h and 90 h of culture respectively. At the same time, a low lactate consumption appeared probably to compensate the depletion of carbohydrate source. The specific consumption rate of glucose, q_{Glc}, and production rate of lactate, q_{Lact}, presented the same pattern for all initial glucose concentrations (figure 3). Nevertheless, for low glucose concentrations, $Y_{Lact/Glc}$ yields were higher than the maximal theoretical stoechiometric value of 2, suggesting that lactate production related to pyruvate formation was not only originated from the glycolysis pathway but also potentially from other metabolic pathways.

Interestingly, in low glucose concentration media a higher production rate of ammonia, q_{NH4+}, and a higher global yield $Y_{NH4+/Gln}$ occurred, despite the similar specific glutamine consumption rates observed in the reference medium (figure 3 and table 1).

Since other ammoniagenic precursors were present in the reference culture medium, especially amino acids or peptides, this increase in ammonia production may result in an increase in the consumption of these compounds, which may also contribute to the non stoechiometric increase of $Y_{Lact/Glc}$. It appeared therefore that the initial glucose concentration did not affect the glycolysis overflow, as observed in the glucose specific consumption rate patterns, as presented in figure 3.

Table 1 Metabolic yields of cells, substrates and products for culture performed with various glucose concentrations (22, 11 and 5.5 mM) and in medium with glucose substituted by 44 mM fructose.

	Glucose			Fructose
	22 mM	11 mM	5.5 mM	44 mM
μ_{max}, h^{-1}	**0.028**	0.030	0.030	0.027
$Y_{Lact/Carbohydrate}$, mol/mol	**1.7**	2.2	2.3	1.1
$Y_{NH4/Gln}$, mol/mol	**0.5**	1	1.2	1.1
$Y_{X/Carbohydrate}$, cell/mol	**0.74**	0.77	0.63	0.71

Glucose substitution by fructose

Growth kinetic of Vero cells and metabolite concentration time courses in culture with glucose substituted by fructose are presented in figure 2. Thus, glucose substitution by fructose resulted in a longer cell growth until 112 h of culture with a similar growth rate and a maximal cell density compared to the reference culture. As expected, glucose substitution by fructose led to a reduced consumption rate of carbohydrate q_{fruc} in the first 24 to 35 h of the culture, which resulted in a reduced production rate of lactate and a lower $Y_{Lact/Fruc}$ yield of 1.1 (figure 3 and table 1). These results suggested that the Vero cell central metabolism was more dedicated to the cell growth in this culture condition. However, ammoniagenic compounds appeared to be more consumed compared to the reference culture, as revealed by an increase of $Y_{NH4/Gln}$ yield from 0.5 to 1.1. Glutamine was probably the main ammoniagenic precursor consumed since q_{Gln} was 3 times higher compared to the one measured in the reference Vero cell culture. Thus, it can be concluded that, contrary to the reduction of glucose availability through lower concentration levels, the reduction of the carbohydrate transport rate, with fructose as a substitute of glucose, allowed to reduce the specific rate of lactate production. Nevertheless, cell growth performances were not improved and the global yield $Y_{X/carbohydrate}$ was similar to the one obtained in the reference culture.

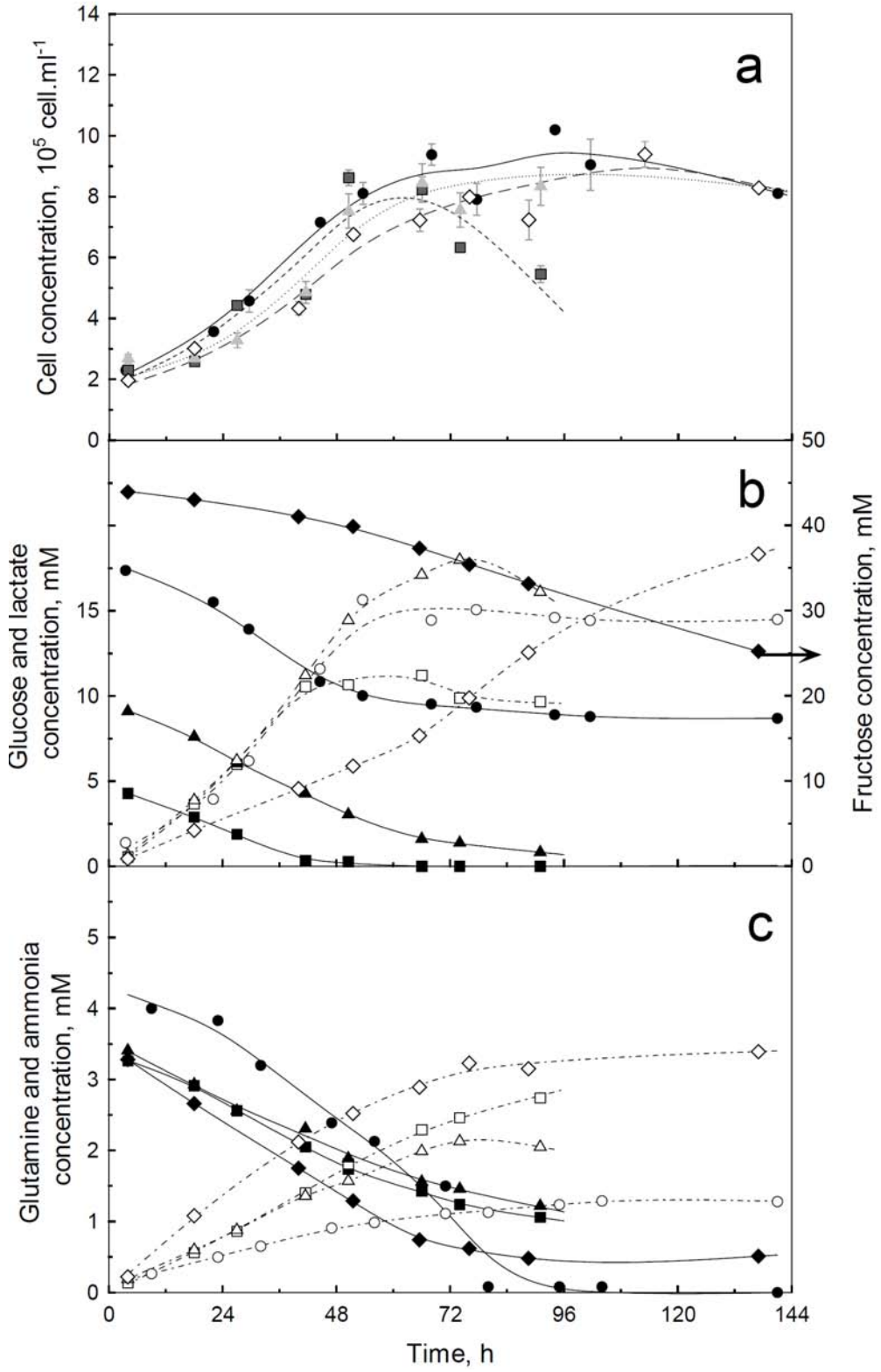


Figure 2 Growth kinetics of Vero cells (a) cultivated in the reference medium (●) (22 mM of glucose), in the reference medium but with reduced glucose concentrations of 5.5 mM (--■--) and 11 mM (·· ▲ ··), and in the reference medium but with glucose substituted with 44 mM of fructose (— ◊ —). Concentrations of metabolites for these culture media are represented with symbols of the same shape as in graph (a) ; (b) glucose or fructose (black symbols) and lactate (white symbols) ; (c) glutamine (black symbols) and ammonia (white symbols).

Glucose substitution by fructose

Growth kinetic of Vero cells and metabolite concentration time courses in culture with glucose substituted by fructose are presented in figure 2. Thus, glucose substitution by fructose resulted in a longer cell growth until 112 h of culture with a similar growth rate and a maximal cell density compared to the reference culture. As expected, glucose substitution by fructose led to a reduced consumption rate of carbohydrate q_{fruc} in the first 24 to 35 h of the culture, which resulted in a reduced production rate of lactate and a lower $Y_{Lact/Fruc}$ yield of 1.1 (figure 3 and table 1). These results suggested that the Vero cell central metabolism was more dedicated to the cell growth in this culture condition. However, ammoniagenic compounds appeared to be more consumed compared to the reference culture, as revealed by an increase of $Y_{NH4/Gln}$ yield from 0.5 to 1.1. Glutamine was probably the main ammoniagenic precursor consumed since q_{Gln} was 3 times higher compared to the one measured in the reference Vero cell culture. Thus, it can be concluded that, contrary to the reduction of glucose availability through lower concentration levels, the reduction of the carbohydrate transport rate, with fructose as a substitute of glucose, allowed to reduce the specific rate of lactate production. Nevertheless, cell growth performances were not improved and the global yield $Y_{X/carbohydrate}$ was similar to the one obtained in the reference culture.

The study of Vero cell glycolysis demonstrated that the reduction of lactate production could not be obtained only by the reduction of the glycolysis flow. Indeed, when carbohydrate availability was reduced, either by reducing glucose concentration or by substituting glucose by fructose, then a higher contribution of glutamine or other nitrogenous nitrogenous sources to supply the TCA cycle was observed.

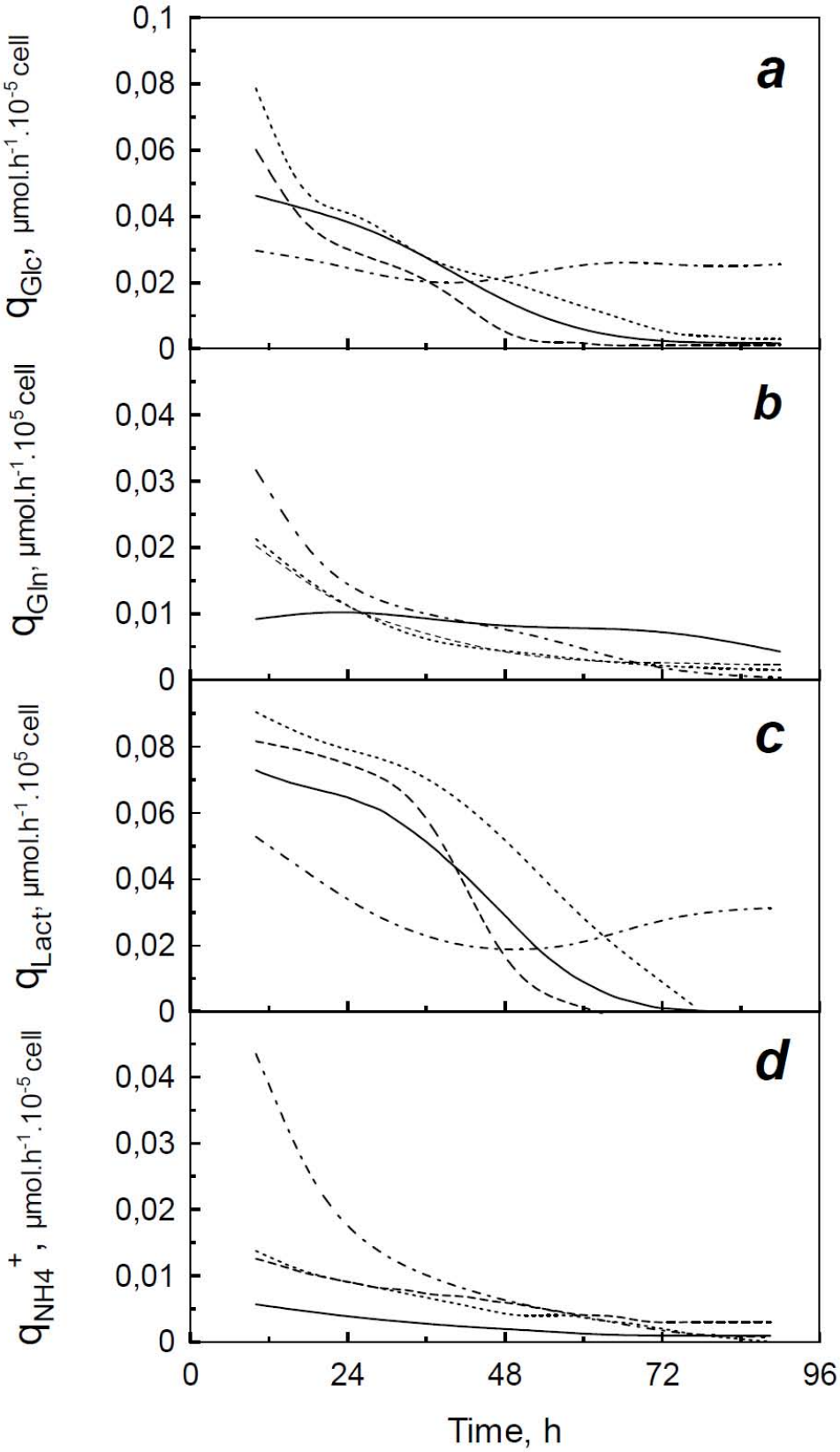


Figure 3 Specific consumption rates of carbohydrate (a) and glutamine (b) and specific production rates of lactate (c) and ammonium ions (d) for cultures performed in the reference medium (—) (22 mM glucose), in the reference medium but with reduced glucose concentrations of 5.5 mM (--) and 11 mM (···), and in the reference medium but with glucose substituted by 44 mM of fructose (-·-·).

Effect of nitrogenous sources on Vero central cell metabolism in serum-free culture medium

Since a strong interdependence between glycolysis and glutaminolysis was observed in Vero cell culture process, glutaminolysis was also investigated to better understand the Vero cell central metabolism in this serum-free medium. Glutamine is one of the main sources of nitrogen for cells and participates in numerous biosynthesis pathways. It is also considered as the second major carbon source for animal cells because it is involved in the energetic metabolism through the replenishment of the TCA cycle via the formation of α-ketoglutarate (α-KG). Thus, glutaminolysis is a key reaction of the central metabolism, and could interfere with various cell mechanisms (Godia *et al.,* 2006). Previous results indicated that the reduction of glycolysis in Vero cells had a great impact on glutaminolysis as shown by an increase in the glutamine consumption or by an increase in the ammonia production. It was also obvious that other pathways were used to supply TCA cycle in carbon intermediates with other origin than glucose or glutamine. To verify these hypotheses, the impact of glutamine or other carbon sources supply on the central metabolism of Vero cells was studied.

Several substitutions of glutamine in the animal-component free medium were performed. Carbon source substitutes were chosen for their different entry point in the TCA cycle. Thus, asparagine or pyruvate were added in the medium to replace glutamine since they could replenish the TCA cycle respectively at the OAA, the α-KG and the Ac-coA levels. As for glycolysis pathway, it was assumed that the glutaminolysis rate could be affected by a lower supply rate of glutamine. So, a di-peptide alanine-glutamine, the glutamax®, was also tested as a substitute to reduce the entry flow of glutamine in Vero cells. Indeed, di-peptides need to be hydrolyzed prior to be metabolized, and, in this specific case, hydrolysis took place directly in the culture medium, because of the release of a peptidase (Christie *et al.,* 1994). Excepted for pyruvate, these substitutes could act as nitrogen sources for cells. It should be noticed that asparagine also presents a lower transport rate than glutamine in Vero cells because of its specific N / B0,+ transport system (Hyde *et al.,* 2003).

Effect of glutamine substitution on the growth and death of Vero cells

For all glutamine substitution conditions, despite similar specific growth rates as reported in the reference culture ranging from 0.019 to 0.025 h^{-1}, the maximal cell density was improved from 20 to 40 % (figure 4) with a maximal cell concentration of 14×10^5 cell.ml^{-1} reached when pyruvate was the substitute.

Since the substitution of glutamine had an effect on the cell concentration, but not on the growth rate of adhered Vero cells, the cell death was investigated during the culture process to verify if such a substitution resulted in a decrease in cell mortality. Therefore, apoptosis and lysis were evaluated in Vero cells cultivated in the various culture conditions (figure 5). In the reference medium, apoptotic cells increased progressively after 40 h of culture, while lysed cell percentage remained constant. The maximal proportion of apoptotic cells was reached after 92 h, coinciding with the maximal cell density and the glutamine depletion. On the contrary, in glutamine-substituted medium, low levels of apoptosis occurred with percentages 4.5 times lower than in the reference medium. Proportion of lysed cells also appeared to be approximately constant during the whole culture time and in the same range as in the reference medium. So, it can be concluded that the increase of maximal cell density obtained for substituted cultures were essentially due to a reduction of apoptosis. In the past decades, substrate depletions in general, and more specifically amino acids deprivations, were demonstrated to have a great impact on the cell death (Franěk *et al.,* 1997; Fuchs *et al.,* 2006).

Virus production in glutamine substituted media

Since glutamine substitutes had a great effect on cell survival, a production process of dengue viruses was carried out to verify the ability of Vero cells to be infected and to produce infectious viral particles in these culture conditions. Indeed, Vero cells are still highly used in industrial vaccine productions and different studies reported a change in culture medium composition before the viral infection and the production phase (Trabelsi *et al.,* 2006; Silva *et al.,* 2008; Toriniwa *et al.,* 2008). So, the cell metabolism and the culture medium composition are very important parameters to achieve high titers and good immunogenicity of the viral particles. Results of viral TCID50 titrations are presented in table 2 and expressed in comparison to the reference culture (%). In this process, final virus titers observed 96 h after the cell infection in glutamine-substituted media, presented no significant differences with the production process performed in the reference medium. However, virus production increased more quickly during the first days post-infection to reach, after 72 h, a significantly higher titer in glutamine-free cultures than in the reference culture. Therefore, the glutamine substitution did not alter the production of dengue virus in serum-free medium allowing to consider that other carbon or ammoniagenic sources, such as those identified as capable to better sustain the cell growth, can be used for virus production. Also, for vaccine industrial production process, these virus production kinetics could be very promising. Indeed, the reduction of the process duration could be envisaged after providing additional quality and stability assays.

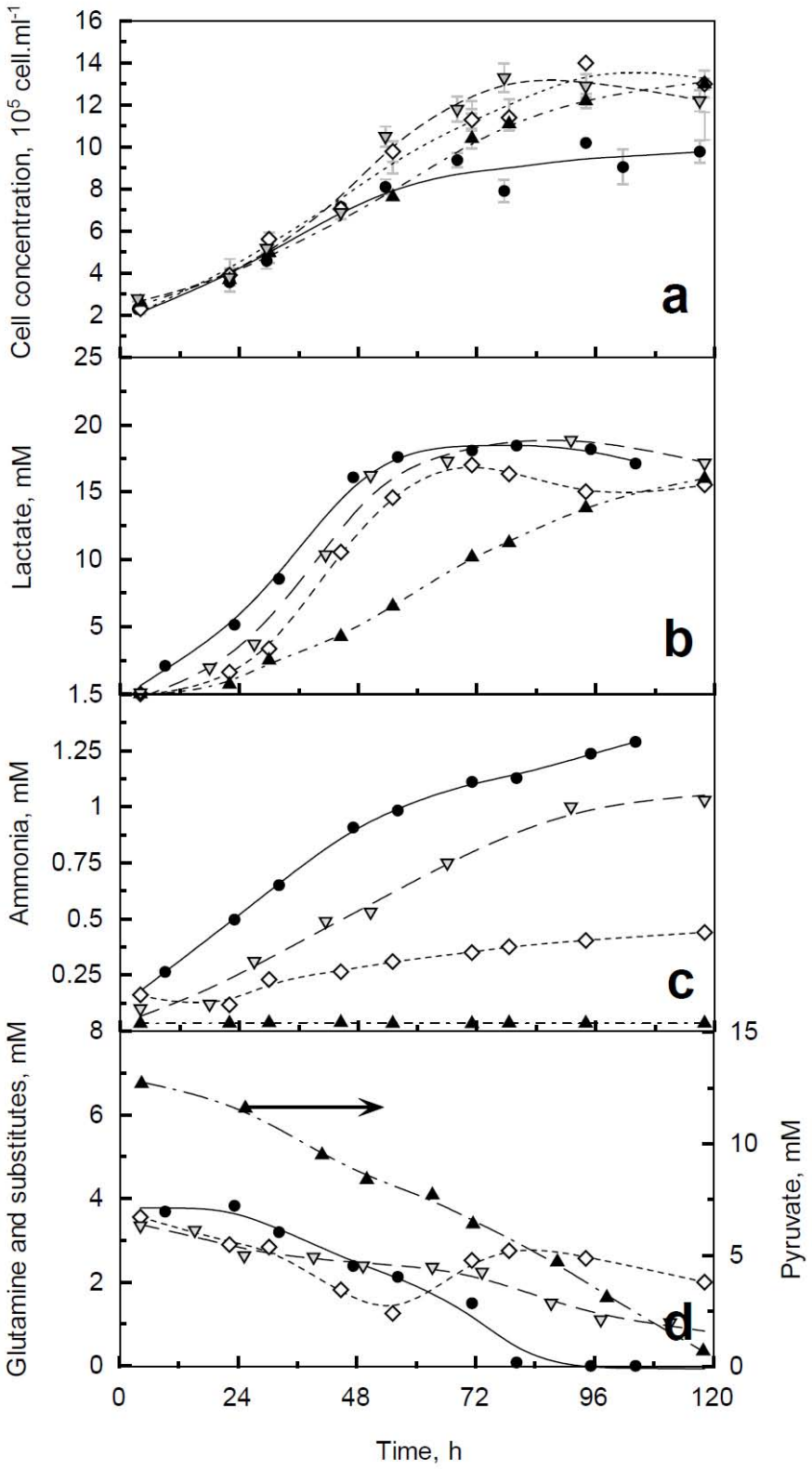


Figure 4 Growth kinetics of Vero cells (a) cultivated in the reference medium (●) (4 mM glutamine) and in the reference medium but with glutamine substituted by 4 mM asparagine (--◊--), by 10 mM pyruvate (-·-▲-·-) and by 4 mM of dipeptide alanine-glutamine (—▼—). Extracellular concentrations of lactate (b), ammonium ions (c), glutamine (d) or glutamine substitutes (d), asparagine, pyruvate and glutamax®. In figures b,c, d, the different curves are represented with the same symbols as for growth curves.

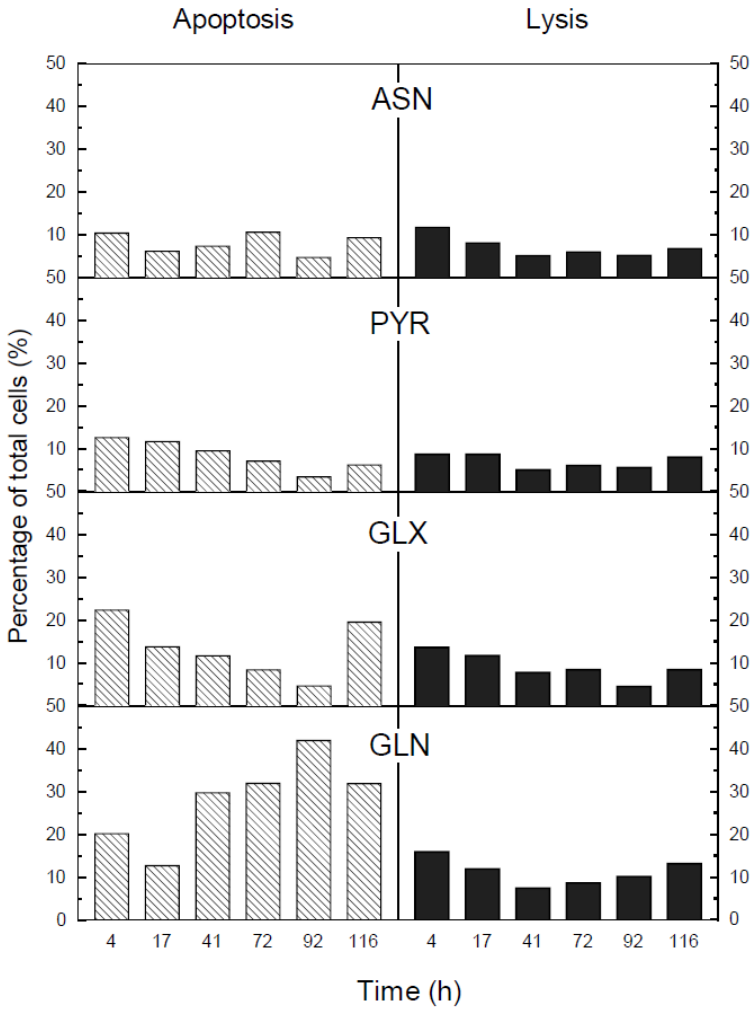


Figure 5 Cell death in culture with medium containing glutamine (GLN) and in media with glutamine substitution by 4 mM asparagine (ASN), by 10 mM pyruvate (PYR) or by 4 mM dipeptide alanine-glutamine (GLX). Apoptosis (shaded blocks) and lysis (black blocks) are presented as percentage of the total cells (adhered added to lysed cells).

Table 2 Production of infectious viral particles in the different media.
***** *infectious titers were quantified through TICC50 method and are presented as a percentage related to the final titer obtained in reference culture.*

Time post infection	*Reference*	*Asparagine*	*Pyruvate*	*Glutamax*
48h	13	25	42	39
72h	110	331	269	417
96h	100 *	155	105	81

Impact of glutamine substitution on central cell metabolism

Following the positive influence of glutamine substitution on cell density and death and on virus production, further kinetic studies were carried out. The impact of glutamine substitution on the glycolysis pathway efficiency was evaluated by quantifying q_{Glc} and $Y_{Lact/Glc}$ (table 3). Firstly, cultures with asparagine or glutamax® showed q_{Glc} patterns very similar compared to culture performed with glutamine. Maximal specific production rates of lactate were similar with values ranging from 0.073 to 0.076 $\mu mol.h^{-1}.10^{-5}$cell although these values were reached 10 h later. In Vero cell culture performed with pyruvate, kinetic analyses suggested that glycolysis flow was reduced. Indeed, q_{Lact} and q_{Glc} rates were found to be lower than in the reference medium (respectively of 25 % and 50 %). However, in all culture conditions, the maximal lactate concentrations were very similar and always close to 20 mM (figure 4, table 2). First experiments with glucose substitution and with reduced glucose concentrations demonstrated a higher activity of glutaminolysis. On the contrary, reduction of the glutamine supply did not induce a higher consumption of glucose or a higher glycolysis flow rate.

Results also indicated that none of the glutamine substitutes were depleted during the first 120 h of the batch culture. Indeed, glutamax® was almost not consumed during the first 72 h of culture while asparagine was consumed similarly to glutamine during the first 48 h with a similar specific rate (0.011 $\mu mol.h^{-1}.10^{-5}$cell for asparagine and 0.009 $\mu mol.h^{-1}.10^{-5}$cell for glutamine) before its concentration increased. Furthermore, ammonia production by Vero cells was reduced in media leading to glutamine substitutes with concentrations at least 2.5 times lower for cultures substituted with asparagine and glutamax® while no ammonia was produced in presence of pyruvate (figure 4 and table 3). This is consistent with glutamine concentrations measured in the culture supernatant, since a production of 0.49 and 1.81 mM glutamine occurred in cultures substituted with asparagine and glutamax®, whereas glutamine was undetectable in culture with pyruvate. It could be hypothesized that this reduction of ammonia accumulation in the culture supernatant is the result of a decrease of the activity of *phosphate activated glutaminase* and *glutamate deshydrogenase* enzymes, two major enzymes participating successively in the desamination of glutamine and glutamate (Huang *et al.*, 2007).

Table 3 Metabolic parameters including specific growth rate, specific consumption rate of glucose and specific production rate of lactate, metabolic yields of lactate or cell produced per glucose or carbon substrates consumed, calculated for cultures performed with different media. Maximal concentration of ammonia and lactate are also presented. ** *"carbone sources" represents glucose added and or glutamine or its substitutes in the different media.*

	Reference	Asparagine	Pyruvate	Glutamax
μ_{max} (h^{-1})	**0.028**	0.025	0.019	0.024
$q_{Glc\ max}$ (µmol. $h^{-1}.10^{-5}$ cell)	**0.046**	0.048	0.035	0.044
$q_{Lact\ max}$ (µmol. $h^{-1}.10^{-5}$ cell)	**0.073**	0.076	0.038	0.076
$[Lactate]_{max}$ (mM)	**18.5**	17.0	16.0	18.9
$[NH4^+]_{max}$ (mM)	**1.29**	0.44	0.03	1.03
$Y_{Lact\ /\ Glc}$ ($mol.mol^{-1}$)	**1.7**	1.7	1.5	1.6
$Y_{X\ /\ Glc}$ (10^8 $cell.mol^{-1}$)	**0.7**	1.1	1.7	1.1
$Y_{Lact\ /\ carbon\ source}$ ($mol.mol^{-1}$) **	**1.2**	1.3	0.8	1.3
$Y_{X\ /\ carbon\ source}$ (10^8 $cell.mol^{-1}$) **	**0.4**	1.0	0.6	0.9

To quantitatively evaluate the efficiency of major carbon substrates to sustain cell growth or lactate production, ratios were calculated between lactate or cells produced and "carbon sources", $Y_{Lact/carbon\ sources}$ and $Y_{X/carbon\ sources}$ (table 3). A higher contribution of the carbon sources to the cell growth in glutamine-substituted culture was revealed. Moreover, their contributions to lactate production were similar or lower than those obtained in reference culture. So it can be hypothesized that the efficiency of central metabolism of Vero cells could be improved by substituting glutamine with other carbon sources entering the TCA cycle at different branch points and inducing, either, a lower glycolysis flow, such as pyruvate, or, a lower glutaminolysis flow, such as asparagine or glutamax®.

While glutamine and glucose are generally considered separately, as nitrogenous and carbon source respectively, we demonstrated in this study that glutamine, or others substitute, acted essentially as a carbon source for Vero cell growth. Indeed, the carbon supply of the TCA cycle appeared to be mainly provided through these substrates instead of through glycolysis-derived pyruvate.

Amino acid metabolism of Vero cells

Amino acid metabolism is directly related to the central metabolism and most of them are derived from a TCA intermediate (Wahl et al. 2008). Consequently, metabolism of amino acids is highly flexible, providing precursors for biosyntheses, and participating to the energetic metabolism. To further describe the metabolic properties of Vero cells cultivated in glutamine-substituted media, amino acid concentrations were assayed in culture supernatant and their production or consumption were evaluated between 4 h of culture and the time for which the maximal cell concentration was reached (figure 6). In a first time, results obtained for reference medium and glutamine-substituted medium with asparagine or dipeptide will be analyzed, and the particular behavior of culture performed in pyruvate medium will be further treated.

Four amino acids were produced in the reference culture medium : glutamate, alanine, phenylalanine and tyrosine, with concentrations 4.7 and 8.8 times higher than their initial concentrations for glutamate and alanine respectively. Since glutamate and alanine could be derived from glutamine degradation, these results clearly confirmed an important activity of the glutaminolysis pathway in glutamine-containing medium. In comparison with glutamine-substituted media, the reference culture indicated a significant lower consumption of amino acids with three exceptions, glutamine, glycine and threonine. Indeed, glutamine and threonine were produced in glutamax® and asparagine media whereas glycine presented a similar consumption pattern. In glutamine-substituted media, the most consumed amino acids were aspartate, asparagine and serine suggesting these amino acids were the preferred nitrogen sources. Moreover, serine was the second amino acid mostly consumed after glutamine in the reference culture medium. All these results converge on the same tendency as observed by Quesney et al. (2003), with depletion of glutamine and serine at the end of Vero cell culture in serum-free medium.

This observation also suggested that in media with lower supply of carbon due to glutamine substitution, Vero cells consumed amino acids to provide TCA cycle intermediates. Indeed, aspartate and asparagine pathways are directly related to OAA through *glutamate amino transferase* transformation and serine is directly connected to pyruvate through its desamination by *serine deshydratase* activity (Wahl *et al.,* 2008). Thus, in reference medium the central metabolism could be saturated by an excess of carbon and nitrogen supply to the TCA cycle contrary to the substituted media.

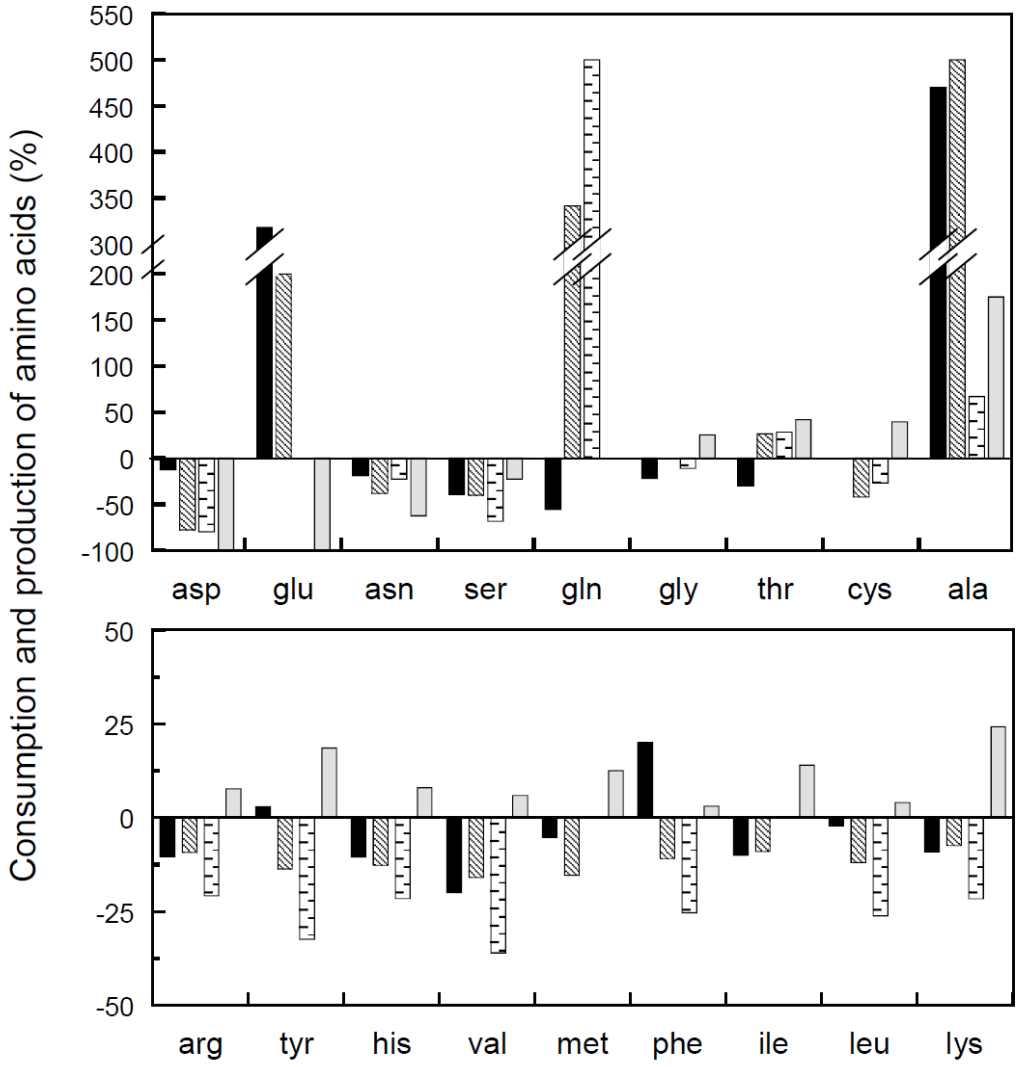


Figure 6 Consumption (negative values) or production (positive values) of amino acids at time of the maximal cell density was reached, presented in percentage of the initial concentration in the glutamine-free culture conditions (glutamax ▨, asparagine ⁙, pyruvate ▭) or glutamine-containing condition (▬).

Pyruvate also presented a strong influence on amino acid metabolism while all the amino acids were produced, excepted for asparagine, aspartate, glutamate and serine. Asparagine was partly consumed whereas aspartate and glutamate were depleted after 120 h of culture. The most produced amino acids were alanine, cysteine, lysine, threonine and tyrosine. Alanine and cysteine were reported to be directly connected to the pyruvate branch point through transaminases with a concomitant consumption of glutamate. Threonine, tyrosine, and lysine biosynthesis are realized either from pyruvate, from intermediates present in the TCA cycle, or from acetyl coA, with a co-oxydation of NADH into NAD^+.

These results were then representative of a saturated central metabolism when cells were cultivated in presence of pyruvate in glutamine-free medium. The particular case of pyruvate substitutes has to be further investigated, while it simultaneously provokes a saturation of the central metabolism and a higher $Y_{X/carbon\ sources}$ cellular yield indicating that the efficiency of central metabolism was improved. Previous results indicated that pyruvate, when added in the medium, had a strong influence on amino acid metabolism of MDCK cells (Genzel *et al.,* 2005).

Intracellular analyzes of lactate, citrate and pyruvate

To further understand Vero cell metabolism, intracellular measurements of lactate, citrate and pyruvate were carried out since these metabolites are located at the crossroad of pathways involved in biosyntheses, cell energy production and redox control.

Results indicated the intracellular accumulation of pyruvate with concentrations 3 to 10 times higher in Vero cells cultivated in the reference medium than in media complemented with asparagine or dipeptide. As an example, after 96 h, intracellular pyruvate accumulated up to 0.27, 0.25 and 2.21 mM in media containing asparagine, glutamax® and glutamine respectively. Such pyruvate accumulation has to be related with lactate accumulation after 96 h of culture since concentrations of 43, 38 and 55 mM were observed for lactate in media supplemented with asparagine, glutamax® and with glutamine respectively. As intracellular concentrations of citrate were comparable in media containing asparagine or glutamax® to the reference culture, it can be hypothesized that the carbon flow was better balanced between TCA and lactate production pathways compared to the reference culture. Indeed, on the contrary to media containing asparagine and glutamax®, in the reference medium, a higher accumulation of pyruvate in reference medium occurred but did not promote an increase in intracellular citrate.

In the reference medium, the massive supply of carbon through both glycolysis and glutaminolysis pathways resulted in high intracellular pyruvate accumulation and, as proposed for hybridoma cells, pyruvate derived from glycolysis participated to balance the redox by the oxydation of the cytosolic accumulated NADH (Sanfeliu *et al.,* 1997). Therefore, pyruvate is mainly transformed into lactate and excreted instead of participating to the Vero cell growth. On the contrary, in glutamine substituted-media, the lower carbon flow rate better participated to the TCA cycle supply, the ammonia production was reduced and carbon sources were not completely depleted at the end of the culture. Consequently, cell apoptosis due to limitation did not occur and the cell yields were increased.

According to amino acid quantification, metabolism of Vero cells in pyruvate-containing medium appeared to be different compared to the other culture conditions. This observation was confirmed by intracellular analyzes of Vero cells cultivated in pyruvate-containing medium (figure 7). In this medium, a high intracellular accumulation of pyruvate was observed in Vero cells until 16 mM at 72 h of culture. Interestingly, a lower accumulation of lactate occurred by comparison with reference medium, while concentration of intracellular citrate was twice higher. Additional intracellular pyruvate provided by the medium could directly be channelized in the TCA cycle, without participating in the regeneration of the glycolysis coenzyme pool. As a consequence, on the contrary to the saturation of the central cell metabolism in the reference medium, the important level of intracellular pyruvate was not converted in lactate but participated to the biosynthesis of amino acids. When glutamine was substituted by pyruvate, glycolysis was shunted resulting in a decrease of both glutaminolysis and glycolysis pathways, and providing a higher maximal cell concentration and a better in cell viability.

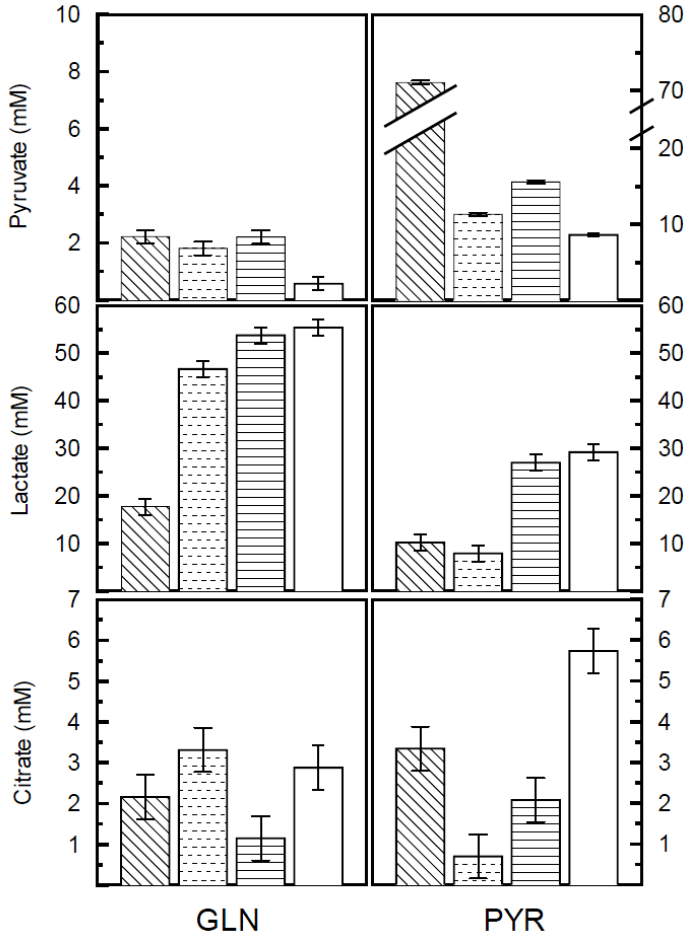


Figure 7 Intracellular concentrations of pyruvate, lactate and citrate for culture with glutamine (GLN) or pyruvate substituted to glutamine (PYR) at different time of the culture (48h ▨, 72h ▤, 96h ▤ and 120h □).

Conclusion

In this study, the first global kinetic characterization of the central metabolism of Vero cells cultivated in serum-free medium was carried out by performing a strategy of substitution of the two major carbon sources, glucose and glutamine.

Through this global kinetic study, we highlighted that Vero central cell metabolism was saturated when cultivated in the serum-free culture medium. Indeed, the high glycolysis and glutaminolysis flow rates resulted from high concentration of glucose and glutamine in the culture medium and consequently led to the intracellular accumulation of intermediates of the energetic metabolism. Furthermore, accumulation of these intermediates, and especially pyruvate, resulted in the formation of different by-products, such as lactate or amino acids (glutamate, alanine). Besides, Vero cells had to maintain activity in their central pathways and they also need to maintain a redox control through regeneration of cofactors such as NADH. Thus, lactate pathway was favoured even if this product reached toxic concentration.

We also demonstrated that glutamine was a major carbon source for TCA cycle supply in Vero cells and that reducing lactate concentration was not necessary to improve efficiency of the Vero cell metabolism and consequently of the cell yields. Indeed, substitution of glutamine by other carbon substrates, which have lower transport rates was benefit for the cell growth. Nevertheless, to adapt the formulation of the medium to the cell needs, it is important to provide carbon substrates inducing a regulated supply of carbon in the TCA cycle either through the glycolysis or through other pathways such as glutaminolysis. These conclusions, based on kinetic results and literature data, have now to be completed and supported with a modelisation work, either through MFA as for MDCK cells (Sidorenko et al., 2008) or through a macroscopic kinetic modelisation.

Finally, the glutamine substitution strategy allowed to obtain better Vero cell yields and cell viability. As a result, a better balanced central metabolism was observed to be benefit for viral production with a potential reduction of the process time and an increase of the obtained titers. As high level of lactate were observed to be excreted in the culture supernatant in most of continuous culture cell lines, characterizing an inefficient central metabolism, the same type of approach could be applied to cell lines involved in other production processes.

Bibliography

Al-Rubeai M, Singh RP. 1998. Apoptosis in cell culture. Current Opinion in Biotechnology 9(2):152-156.

Arden N, Betenbaugh MJ. 2004. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. Trends in Biotechnology 22(4):174-180.

Butler M, Burgener A, Patrick M, Berry M, Moffatt D, Huzel N, Barnabe N, Coombs K. 2000. Application of a Serum-Free Medium for the Growth of Vero Cells and the Production of Reovirus. Biotechnology progress 16(5):854-858.

Chen K, Liu Q, Xie L, Sharp PA, Wang DIC. 2001. Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. Biotechnology & Bioengineering 72(1):55-61.
Chen P, Harcum SW. 2005. Effects of amino acid additions on ammonium stressed CHO cells. Journal of Biotechnology 117(3):277-286.
Christie A, Butler M. 1994. Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase. Journal of Biotechnology 37(3):277-290.
Christie A, Butler M. 1999. The adaptation of bhk cells to a non-ammoniagenic glutamate-based culture medium. Biotechnology and Bioengineering 64(3):298-309.
Cruz HJ, Moreira JL, Carrondo MJT. 1999. Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells. Biotechnology and Bioengineering 66(2):104-113.
Cruz HJ, Moreira JL, Carrondo MJT. 2000. Metabolically optimised BHK cell fed-batch cultures. Journal of Biotechnology 80(2):109-118.
Darakhshan F, Hajduch E, Kristiansen S, Richter EA, Hundal HS. 1998. Biochemical and functional characterization of the GLUT5 fructose transporter in rat skeletal muscle. Biochem. J. 336(2):361-366.
Franěk F, Šrámková K. 1997. Cell suicide in starving hybridoma culture: survival-signal effect of some amino acids. Cytotechnology 23(1):231-239.
Frazatti-Gallina NM, Mourao-Fuches RM, Paoli RL, Silva MLN, Miyaki C, Valentini EJG, Raw I, Higashi HG. 2004. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. Vaccine 23(4):511-517.
Fuchs BC, Bode BP. 2006. Stressing Out Over Survival: Glutamine as an Apoptotic Modulator. Journal of Surgical Research 131(1):26-40.
Genzel Y, Behrendt I, König S, Sann H, Reichl U. 2004. Metabolism of MDCK cells during cell growth and influenza virus production in large-scale microcarrier culture. Vaccine 22(17-18):2202-2208.
Genzel Y, Ritter JB, Konig S, Alt R, Reichl U. 2005. Substitution of Glutamine by Pyruvate To Reduce Ammonia Formation and Growth Inhibition of Mammalian Cells. Biotechnol. Prog. 21(1):58-69.
Gillies R, Gatenby R. 2007. Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis? Journal of Bioenergetics and Biomembranes 39(3):251-257.
Godia F, Cairo JJ, Panesar PS, Kennedy JF. 2006. S.S. Ozturk and W.-S. Hu, Editors, Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA (2006) xiii + 755 pp., £79.20, ISBN 0-8247-5334-8. International Journal of Biological Macromolecules 39(4-5):321-321.
Hassell T, Butler M. 1990. Adaptation to non-ammoniagenic medium and selective substrate feeding lead to enhanced yields in animal cell cultures. J Cell Sci 96(3):501-508.
Hassell T, Gleave S, Butler M. 1991. Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. Applied Biochemistry and Biotechnology 30(1):29-41.
Huang H, Yi X, Zhang Y. 2006. Improvement of Vero cell growth in glutamate-based culture by supplementing ammoniagenic compounds. Process Biochemistry 41(12):2386-2392.
Huang H, Yu Y, Yi X, Zhang Y. 2007. Nitrogen metabolism of asparagine and glutamate in Vero cells studied by 1H/15N NMR spectroscopy. Applied Microbiology and Biotechnology 77(2):427-436.
Hyde R, M Taylor P, S Hundal H. 2003. Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. The biochemical journal 373(1):1-18.
Inukai K, Katagiri H, Takata K, Asano T, Anai M, Ishihara H, Nakazaki M, Kikuchi M, Yazaki Y, Oka Y. 1995. Characterization of rat GLUT5 and functional analysis of chimeric proteins of GLUT1 glucose transporter and GLUT5 fructose transporter. Endocrinology 136(11):4850-4857.
Iwatani S, Van Dien S, Shimbo K, Kubota K, Kageyama N, Iwahata D, Miyano H, Hirayama K, Usuda Y, Shimizu K and others. 2007. Determination of metabolic flux changes during fed-batch cultivation from measurements of intracellular amino acids by LC-MS/MS. Journal of Biotechnology 128(1):93-111.
Kim S, Lee G. 2007. Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. Applied Microbiology and Biotechnology 74(1):152-159.
Kohler G, Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256(5517):495-497.
Liu C-C, Lian W-C, Butler M, Wu S-C. 2007. High immunogenic enterovirus 71 strain and its production using serum-free microcarrier Vero cell culture. Vaccine 25(1):19-24.
Mendonca RZ, Arrozio SJ, Antoniazzi MM, Ferreira JMC, Pereira CA. 2002. Metabolic active-high density VERO cell cultures on microcarriers following apoptosis prevention by galactose/glutamine feeding. Journal of Biotechnology 97(1):13-22.
Mendonça RZ, Pereira CA. 1998. Cell metabolism and medium perfusion in VERO cell cultures on microcarriers in a bioreactor. Bioprocess Engineering 18(3):213-218.
Mercille S, Massie B. 1994. Induction of apoptosis in oxygen-deprived cultures of hybridoma cells. Cytotechnology 15(1-3):117-128.
Merten OW, Wu R, Couvelì E, Crainic R. 1997. Evaluation of the serum-free medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactors. Cytotechnology 25(1-3):35-44.
Miller WM, Blanch HW, Wilke CR. 2000. A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: Effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH. Biotechnology and Bioengineering 67(6):853-871.

Miller WM, Wilke CR, Blanch HW. 1989. Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: I. Glucose pulse and step changes. Biotechnology and Bioengineering 33(4):477-486.
Mochizuki K, Sato S, Kato M, Hashizume S. 1993. Enhanced production of human monoclonal antibodies by the use of fructose in serum-free hybridoma culture media. Cytotechnology 13(3):161-173.
Neermann J, Wagner R. 1996. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. Journal of Cellular Physiology 166(1):152-169.
Paredes C, Prats E, Cairó JJ, Azorín F, Cornudella L, Gòdia F. 1999. Modification of glucose and glutamine metabolism in hybridoma cells through metabolic engineering. Cytotechnology 30(1):85-93.
Petiot E, Fournier F, Gény C, Pinton H, Marc A. 2009. Rapid Screening of Serum-Free Media for the Growth of Adherent Vero Cells by Using a Small-Scale and Non-invasive Tool. Applied Biochemistry and Biotechnology.
Quesney S, Marc A, Gerdil C, Gimenez C, Marvel J, Richard Y, Meignier B. 2003. Kinetics and metabolic specificities of Vero cells in bioreactor cultures with serum-free medium. Cytotechnology V42(1):1-11.
Quesney S, Marvel J, Marc A, Gerdil C, Meignier B. 2001. Characterization of Vero cell growth and death in bioreactor with serum-containing and serum-free media. Cytotechnology 35(2):115-125.
Rourou S, van der Ark A, Majoul S, Trabelsi K, van der Velden T, Kallel H. 2009. A novel animal-component-free medium for rabies virus production in Vero cells grown on Cytodex 1 microcarriers in a stirred bioreactor. Applied Microbiology and Biotechnology.
Rourou S, van der Ark A, van der Velden T, Kallel H. 2007. A microcarrier cell culture process for propagating rabies virus in Vero cells grown in a stirred bioreactor under fully animal component free conditions. Vaccine 25(19):3879-3889.
Sanfeliu A, Paredes C, Cairó JJ, Gòdia F. 1997. Identification of key patterns in the metabolism of hybridoma cells in culture. Enzyme and Microbial Technology 21(6):421-428.
Schneider M, Marison IW, von Stockar U. 1996. The importance of ammonia in mammalian cell culture. Journal of Biotechnology 46:161-185.
Sidorenko Y, Wahl A, Dauner M, Genzel Y, Reichl U. 2008. Comparison of metabolic flux distributions for MDCK cell growth in Glutamine- and Pyruvate-containing media. Biotechnology Progress 24:311-320.
Silva AC, Delgado I, Sousa MFQ, Carrondo MJT, Alves PM. 2008. Scalable culture systems using different cell lines for the production of Peste des Petits ruminants vaccine. Vaccine In Press, Corrected Proof.
Simpson NH, Singh RP, Perani A, Goldenzon C, Al-Rubeai M. 1998. In hybridoma cultures, deprivation of any single amino acid leads to apoptotic death, which is suppressed by the expression of the bcl-2 gene. Biotechnology and Bioengineering 59(1):90-98.
Singh RP, Al-Rubeai M, Gregory CD, Emery AN. 1994. Cell death in bioreactors: A role for apoptosis. Biotechnology and Bioengineering 44(6):720-726.
Sun MB, Jiang YJ, Li WD, Li PZ, Li GL, Jiang SD, Liao GY. 2004. A novel process for production of hepatitis A virus in Vero cells grown on microcarriers in bioreactor. World Journal of Gastroenterology 10(17):2571-2573.
Tiwari M, Parida M, Santhosh SR, Khan M, Dash PK, Rao PVL. 2009. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus. Vaccine 27(18):2513-2522.
Toriniwa H, Komiya T. 2007. Japanese encephalitis virus production in Vero cells with serum-free medium using a novel oscillating bioreactor. Biologicals 35(4):221-226.
Toriniwa H, Komiya T. 2008. Long-term stability of Vero cell-derived inactivated Japanese encephalitis vaccine prepared using serum-free medium. Vaccine 26(29-30):3680-3689.
Trabelsi K, Rourou S, Loukil H, Majoul S, Kallel H. 2006. Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor. Journal of Biotechnology 121(2):261-271.
Wahl A, Sidorenko Y, Dauner M, Genzel Y, Reichl U. 2008. Metabolic flux model for an anchorage-dependent MDCK cell line: Characteristic growth phases and minimum substrate consumption flux distribution. Biotechnology and Bioengineering 101(1):135-152.
Wentz D, Schügerl K. 1992. Influence of lactate, ammonia, and osmotic stress on adherent and suspension BHK cells. Enzyme and Microbial Technology 14(1):68-75.
Wlaschin K, Hu W-S. 2006. Fedbatch Culture and Dynamic Nutrient Feeding. Cell Culture Engineering. p 43-74.
Wlaschin KF, Hu W-S. 2007. Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport. Journal of Biotechnology 131(2):168-176.
Wu S-C, Huang GY-L. 2002. Stationary and Microcarrier Cell Culture Processes for Propagating Japanese Encephalitis Virus. Biotechnology Progress 18(1):124-128.
Wu SC, Liu CC, Lian WC. 2004. Optimization of microcarrier cell culture process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development. Vaccine 22(29-30):3858-3864.
Zupke C, Stephanopoulos G. 1995. Intracellular flux analysis in hybridomas using mass balances and in vitro (13)C nmr. Biotechnology and Bioengineering 45(4):292-303.

2.4.3. Contributions de l'article

Les travaux de cet article présentent une étude métabolique et cinétique approfondie des cellules Vero cultivées en milieu sans sérum. Elle inclut des données sur : la glycolyse, la glutaminolyse, le métabolisme intracellulaire, et la croissance et la mort cellulaires. La description des interactions entre ces mécanismes, basés sur nos résultats et ceux de la littérature, permet de proposer un modèle métabolique de la cellule Vero dans notre milieu de référence sans sérum (Figure 56).

Le flux glycolytique très important induit une forte production de NADH. En effet, la vitesse de consommation du glucose n'est pas limitée en raison des différents transporteurs du glucose présents dans les lignées de cellules rénales. Ce pool important de NADH ne peut être oxydé totalement dans la mitochondrie car son transport par diffusion est limitant. La conversion de pyruvate en lactate permet alors d'oxyder une grande partie du pool de NADH en NAD^+. Ceci expliquerait l'excrétion rapide et importante de lactate. Le flux de carbone issu du glucose qui intègre le cycle de Krebs au niveau de l'acétyl-coA est donc très faible (Neerman *et al.* 1996 ; Belismane *et al*. 2005). Un autre apport de carbone au niveau du cycle de Krebs est alors nécessaire via la glutaminolyse (Drugmand, 2007). Celle-ci ne semble pas limitée par l'entrée de la glutamine dans la cellule et génère des concentrations élevées d'ions ammonium. Ce fonctionnement est caractéristique d'un métabolisme cellulaire fortement dérégulé et les afflux importants de carbone au niveau du cycle de Krebs semblent saturer le métabolisme carboné central. Ce mécanisme a été proposé sans validation expérimentale dans différents travaux, notamment avec des cellules MDCK (Sidorenko *et al.,* 2008). Nos travaux présentent l'avantage de le vérifier par l'observation, d'une part, de l'accumulation du métabolite intracellulaire clé, le pyruvate, et, d'autre part, du métabolisme spécifique des acides aminés, qui sont peu consommés voire même produits dans certains cas.

Des stratégies d'adaptation du milieu permettant de ré-équilibrer le métabolisme cellulaire et de cultiver les cellules Vero sans réapprovisionnement de substrat en cours de culture, ont été proposées. Plus précisément, la substitution du glucose par le fructose, et de la glutamine par du pyruvate, de l'asparagine ou du glutamax® permet une entrée et un flux de carbone intracellulaire mieux régulée. La production de co-produits néfastes pour la croissance diminue, notamment celle des ions ammonium, la mort cellulaire est réduite et la concentration cellulaire maximale augmente sans remise en cause de la production virale.

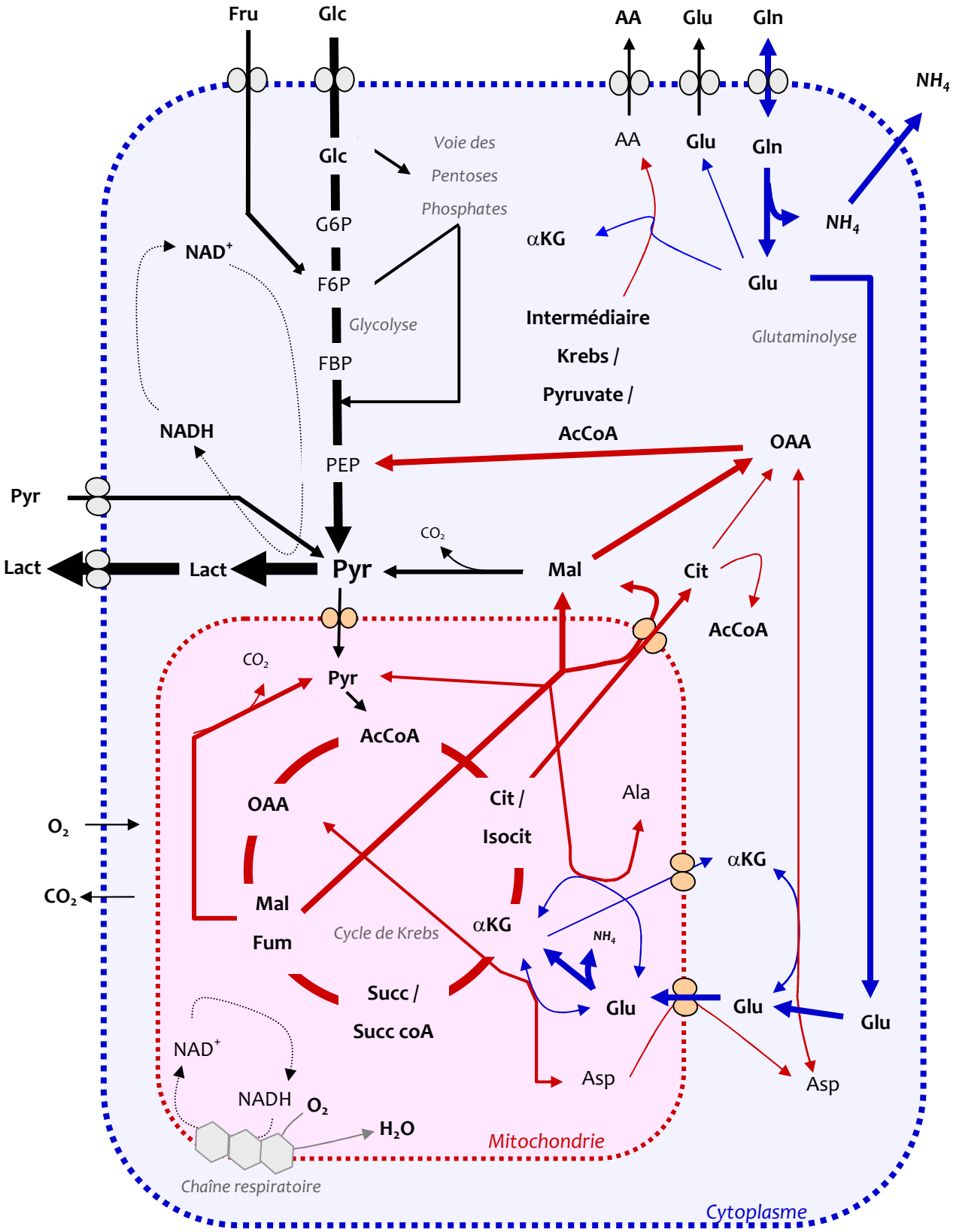


Figure 56. Proposition de schéma métabolique pour la cellule Vero cultivée en milieu de référence sans sérum. Le métabolisme du glucose est défini par les flèches noires, celui de la glutamine en bleue, le métabolisme mithochondrial avec le cycle de Krebs en rouge. Les cycles de régénération des cofacteurs sont représentés en pointillés avec en gris une schématisation de la chaîne respiratoire. La largeur des flèches indique l'importance du flux dans ces voies métaboliques.

Conclusion

Ce chapitre s'est attaché à une étude physiologique et métabolique globale du comportement des cellules Vero dans le milieu de culture de référence. L'approche mise en oeuvre et les principaux résultats sont présentés dans la Figure 57.

A partir de l'étude cinétique d'une culture réalisée dans le milieu de référence, les paramètres cinétiques ont été quantifiés et des hypothèses de limitation ou d'inhibition ont été émises. Puis, diverses stratégies ont été mises en place pour, soit, lever la limitation en éléments nutritifs par l'ajout ponctuel de glutamine après 3 jours de culture ou par le renouvellement total du milieu de culture, soit, réduire l'accumulation de co-produits du métabolisme par la dilution du milieu de culture. Certaines de ces conditions opératoires ont permis une augmentation de la densité cellulaire, sans toutefois ré-équilibrer le métabolisme.

Par ailleurs, des substitutions du glucose et de la glutamine permettant de réduire le transport intracellulaire des substrats carbonés et de réguler l'approvisionnement du métabolisme carboné central par la glycolyse ou la glutaminolyse, ont été évaluées. De cette façon, nous avons établi de nouvelles formulations de milieu de culture favorisant la croissance des cellules Vero et réduisant la mort cellulaire, en utilisant le di-peptide alanine-glutamine (glutamax®), l'asparagine ou le pyruvate en remplacement de la glutamine.

L'ensemble des études cinétiques de cette partie a permis d'acquérir une connaissance détaillée du comportement des cellules Vero en milieu sans sérum et de proposer un schéma métabolique. De plus, le remplacement de la glutamine par d'autres substrats a permis de lever certains effets limitants du milieu sans sérum, et d'atteindre des performances identiques à celles obtenues en milieu de référence avec un changement de milieu pendant la phase de croissance. Ces résultats seront utilisés dans le chapitre 4 pour la mise en œuvre d'un procédé de production virale en bioréacteur.

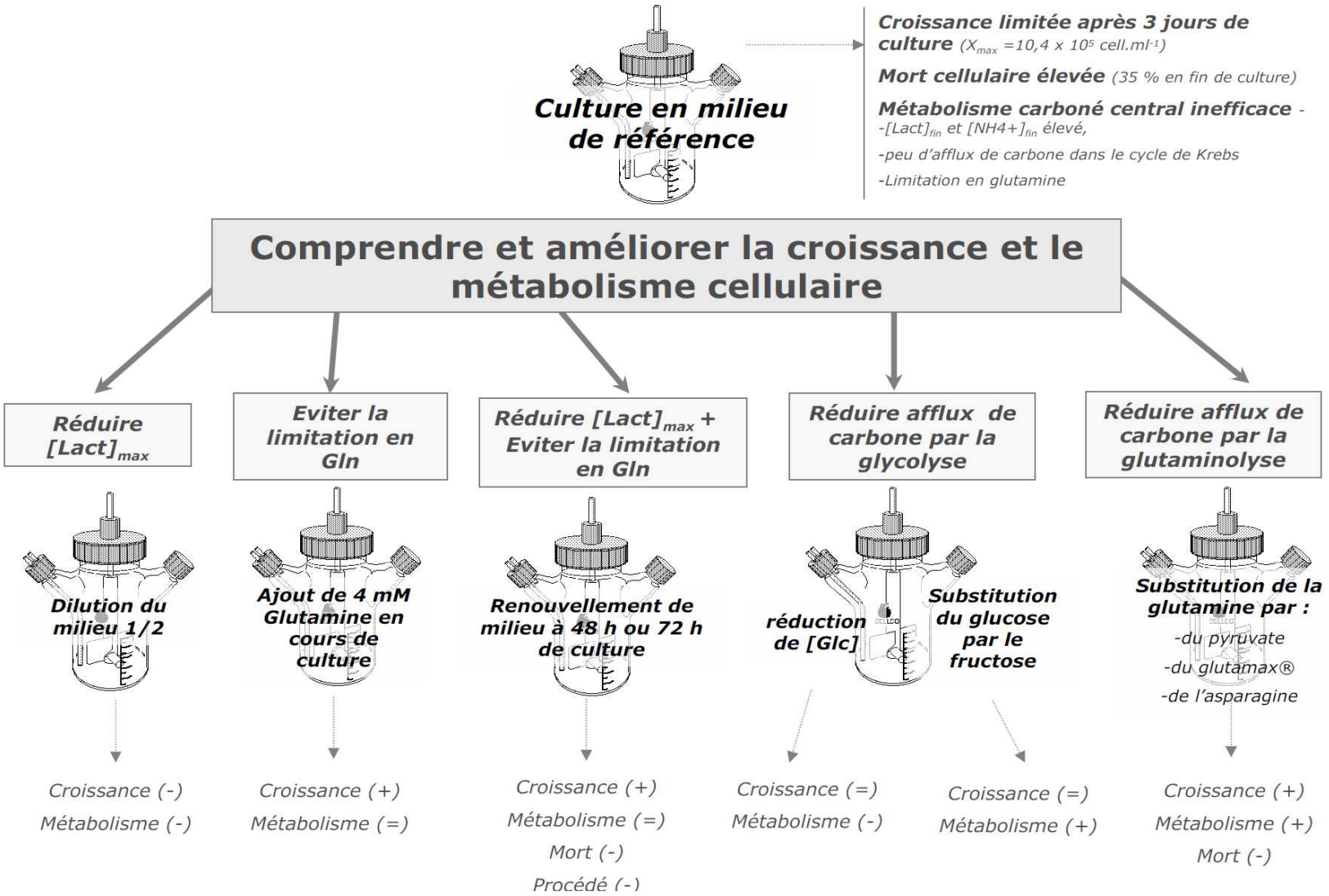


Figure 57. Synthèse des travaux de ce chapitre

Chapitre 3

3. Nouveaux outils de suivi en-ligne pour l'évaluation d'une approche PAT dans le cas de culture de cellules Vero.

CHAPITRE 3

Introduction - 189 -

3.1. Analyse en ligne de la croissance et de la mort de cellules Vero cultivées sur microporteurs - 191 -
3.1.1. Introduction - 191 -
3.1.2. Suivi en ligne de la concentration et de la mort cellulaire pour un procédé de culture de cellules Vero adhérentes - 193 -
3.1.3. Contributions de l'article - 210 -

3.2. Etude préliminaire de l'analyse des cellules Vero et du milieu de culture par microspectroscopie Raman - 211 -
3.2.1. Analyse de cellules Vero en suspension - 212 -
3.2.2. Analyse du surnageant de culture par micro spectroscopie Raman - 215 -

3.3. Analyse en-ligne de métabolites du milieu de culture par spectroscopie proche-Infrarouge - 217 -
3.3.1. Introduction - 217 -
3.3.2. Approche PAT avec le suivi en-ligne d'un procédé de culture de cellules animales par spectroscopie proche infrarouge - 219 -
3.3.3. Contributions de l'article - 234 -

Conclusion - 236 -

Introduction

Les procédés de culture de cellules animales sont de plus en plus utilisés pour l'obtention de produits à visées thérapeutiques, tels que les vaccins viraux ou les protéines recombinantes. L'un des principaux objectifs des approches PAT et QbD, développées et encouragées par les agences de régulations telles que la FDA, est d'améliorer la connaissance et la maîtrise des procédés au travers, en particulier, de la mise en oeuvre d'outils analytiques en-ligne. Or, ces systèmes de suivi en-ligne sont, encore à ce jour, très peu développés pour les procédés utilisant des cellules animales, les paramètres classiquement contrôlés en-ligne étant la température, le pH et l'oxygène dissous. Cependant, le suivi et le contrôle d'autres paramètres, comme la concentration et la viabilité cellulaires, la concentration du produit d'intérêt, ou encore celle des substrats et des co-produits du métabolisme, présentent un intérêt certain, renforcé par les travaux qui mettent de plus en plus en évidence l'évolution du comportement des cellules en bioréacteur.

Dans ce cadre, l'objectif de ce chapitre est d'étudier, dans le cas particulier de cultures de cellules Vero adhérentes-dépendantes, de nouveaux outils d'analyse en ligne permettant des mesures physiques et chimiques globales du milieu de culture. Ainsi, contrairement aux capteurs en-ligne classiquement utilisés, qui sont dédiés à un paramètre bien identifié, les mesures issues de ces outils devront être traitées, calibrées et validées avant d'être reliées à certains paramètres clés du procédé. Cette étude est rendue plus complexe du fait de la présence de microporteurs au sein du bioréacteur qui induisent des morphologies cellulaires différentes de celles des cellules en suspension, et peuvent engendrer des interférences avec les diverses méthodes d'analyse.

Dans un premier temps, le suivi de la concentration et la détection de la viabilité des cellules Vero en cours de culture sont abordés par la mise en œuvre d'un capteur de permittivité. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un pré-projet de publication. Puis, une étude préliminaire de la caractérisation globale des cellules et du milieu de culture par microspectroscopie Raman est présentée. Enfin, le suivi en-ligne par spectroscopie proche infrarouge de certains composés du surnageant de culture est développé sous la forme d'un manuscrit soumis pour publication.

Objectifs scientifiques

- *Implantation de nouveaux outils d'analyse en-ligne, dans le cas particulier de la culture des cellules Vero, cultivées sur microporteurs.*
- *Etude de l'intérêt de ces outils pour la caractérisation des cellules Vero et du milieu de culture, à partir de mesures physiques et chimiques globales du surnageant de culture.*

3.1. Analyse en ligne de la croissance et de la mort de cellules Vero cultivées sur microporteurs

3.1.1. Introduction

Le suivi de l'évolution de la concentration de cellules animales, au cours d'un procédé de production de vaccin viral, est essentiel pour, d'une part, s'assurer du bon déroulement de la culture, et, d'autre part, piloter les étapes d'extrapolation de la propagation cellulaire ou déterminer le moment de l'infection virale. Parmi les technologies de suivi en ligne étudiées ces dernières années, la spectroscopie diélectrique s'est imposée comme l'une des plus attractives. Son principe est basé sur la corrélation qui peut être établie entre la mesure de la permittivité de la suspension cellulaire et l'évolution du biovolume cellulaire. Jusqu'à présent, les travaux publiés sur cette méthode concernent essentiellement le suivi de culture de cellules en suspension. A notre connaissance, aucun article ne rapporte d'étude dans le cas de cellules Vero adhérées sur des microsupports.

En plus de la concentration cellulaire, le suivi en ligne de la viabilité cellulaire apparaît également important pour un meilleur contrôle des procédés de culture de cellules animales. En effet, la littérature de ces dernières années s'est largement intéressée à la caractérisation des processus de mort cellulaire en fonction des paramètres opératoires du procédé. De plus en plus, l'impact de la mort cellulaire sur les performances de productivité et de longévité de la culture est mis en avant. Cependant, aucune méthode en ligne de détection ou de quantification de la mort cellulaire n'a encore été proposée.

C'est pourquoi, dans cette partie, nous nous attachons à l'étude d'un capteur en ligne de la permittivité, non seulement pour le suivi de la concentration des cellules adhérentes Vero, mais également, pour la détection de la mort cellulaire à partir de l'analyse multi-fréquence de la permittivité.

3.1.2. Suivi en ligne de la concentration et de la mort cellulaire pour un procédé de culture de cellules Vero adhérentes

Pré-projet de manuscrit de publication

In-line monitoring of cell density and apoptosis as a PAT strategy for adherent Vero cell process

Emma Petiot[1], Geoffrey Esteban[2], Cécile Gény[3], Hervé Pinton[3], Annie Marc[1]

1 - Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, UPR CNRS 6811, Nancy-Université, 2 avenue de la Forêt de Haye, F - 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

2- FOGALE nanotech, 125 rue de l'Hostelerie, Ville Active Bâtiment A, Parc Acti plus, F -30900 Nîmes, France

3 - Sanofi pasteur, 1541 avenue Marcel Mérieux, F - 69280 Marcy L'Etoile, France

Abstract

Cultures of Vero cells attached on Cytodex microcarriers were monitored by in-line multi-frequency permittivity measurements using the Fogale Biomass System. First, the permittivity was demonstrated to linearly correlate with cell concentrations all over batch cultures performed either with a serum-free culture medium or with the same medium containing glutamax® to replace glutamine. Furthermore, the correlation slope was found to be dependent on the medium with a lower value in presence of glutamax®. When higher cell concentrations were reached by medium renewal, concomitantly to a decrease of Vero cell size induced by microcarrier surface saturation, the linear correlation between cell density and permittivity was no longer valid from about 10^6 cell.ml^{-1}. Elsewhere, the characteristic frequency, f_c, provided additionnal indications on cell physiology. Indeed, for all culture conditions tested, it was observed to be a good indicator of the beginning of massive cell apoptosis when the slope of its evolution became equal to zero. These results demonstrated the interest of permittivity measurements for in-line monitoring of Vero cell growth and in-stitu apoptosis detection, despite the presence of microcarriers and the various operating conditions such as medium feed-harvest or medium formulation.

Key words

Vero cells, microcarrier, in-line monitoring, permittivity, cell density, cell apoptosis

Introduction

In recent years, regulation agencies such as the Food and Drug Administration (FDA) have encouraged, through the "Process Analytical Technology" (PAT) guidance, the development of in-line monitoring of biotechnological processes. One of the main objectives was the in-situ implementation of new analytical techniques to better understand the production processes, to monitor their critical parameters and to ensure the final product quality. Animal cell-based processes for the production of recombinant proteins or viral vaccines are particularly concerned. Among the process parameters, the cell characterization is one of the most challenging to be in-line monitored. Indeed, in the specific case of viral vaccine productions, the cell concentration has to be precisely known to control the time of infection and the multiplicity of infection. Some in-line informations on cell death could be also of interest. Moreover, when the cells are attached on microcarriers, they are often off-line quantified with the time-consuming Crystal Violet method.

Multiple techniques for in-line quantification of animal cell density were proposed over the past thirty years. Indirect techniques use conventional sensors to estimate the cell density from oxygen uptake rate (OUR) (Yoon *et al.,* 1994; Kamen *et al.,* 1996), carbon dioxide evolution rate (CER) (Kamen *et al.,* 1996; Zeiser *et al.,* 2000) or ATP production rate (APR) (Eyer *et al.,* 1996). Nevertheless, they present a limited validity due to the hypothesis of constant OUR, CER or APR, some parameters generally evolving all over the culture. Direct methods with dedicated instruments were also developped, including nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) (Mancuso *et al.,* 1994 ; Bradamante 2004), acoustic resonance densitometry (ARD) (Kilburn *et al.,* 1989), absorbance or scattering (Card *et al.,* 2007), fluorescence (Teixeira *et al.,* 2009), dielectric spectroscopy (Ansorge *et al.,* 2007a) or real-time imaging (Rudolph *et al.,* 2008). Only few of these methods are commercialized and most of them are complicated to use or present a poor sensitivity (Konstantinov *et al.,* 1994). Moreover, to our knowledge, they were developped in the case of suspension cell cultures. Only two teams reported the monitoring of adherent CHO cells or fibroblasts by using dielectric spectroscopy or real-time microscopy (Ducommun *et al*., 2002 ; Rudolph *et al.,* 2008).

Near cell concentration, in-line monitoring of cell growing state, cell death or cell morphology still remains challenging despite the interest of these observations to better understand and control the processes. The cell death has been widely studied, because it may highly influence the final production yield.

Necrosis is generally induced by extrreme culture conditions which damage cell membrane and provoke the cell lysis. On the contrary, apoptosis takes part to the regulatory response of the cells to non lethal external stresses and results in cell membrane reorganization and cell fragmentation in small apoptotic bodies (Al-Rubeai *et al.,* 1998). Unfortunately, to our knowledge, no technique was proposed to in-line detect the animal cell death during bioprocesses. Off-line methods generally focused on the morphological or biochemical characteristics of death cells. For example, membrane porosity was detected through exclusion dye (Shah *et al.,* 2007), DNA fragmentation with electrophoresis techniques (Figueroa *et al.,* 2004; Schulze-Horsel *et al.,* 2009) and caspase activity or phosphatidylserine translocation through flow cytometry (Ishaque *et al.,* 1998; Figueroa *et al.,* 2004; Schulze-Horsel *et al.,* 2009). In industrial environment, the two techniques mostly employed are flow cytometry (Ishaque *et al.,* 1998; Figueroa *et al.,* 2004; Schulze-Horsel *et al.,* 2009) and trypan blue coloration by hemacytometer or automated cell numeration (Szabo *et al.,* 2004; Shah *et al.,* 2007).

Among the analytical techniques proposed for in-line animal cell monitoring, the dielectric spectroscopy was described as a promising method, mainly because it directly evaluates the volume fraction of cells with intact plasma membranes, also called biovolume, in opposition to the other ones based on cell physiological state (Ducommun *et al.,* 2002; Cannizzaro *et al.,* 2003). Moreover, sterilizable permittivity probes are already commercialized. The permittivity measurements could be correlated to the biovolume through an empirical model developped for spherical cells, which allows to calculate the viable cell concentration when cell size is constant (Zeiser *et al.,* 1999). Dielectric spectroscopy was already used for in-situ monitoring of insect cells, such as Sf-9 cells (Zeiser *et al.,* 2000 ; Ansorge *et al.,* 2007a) or High-5 cells (Zeiser *et al.,* 1999 ; Zeiser *et al.,* 2000), and mammalian cells, such as CHO cells (Siano, 1997 ; Ducommun *et al.,* 2001 ; Ducommun *et al.,* 2002; Cannizzaro *et al.,* 2003; Ansorge *et al.,* 2007b) or hybridoma cells (Siano, 1997). It was implemented in batch, fed-batch, and packed bed reactors. In addition to cell numeration, some authors also used this method to monitor baculovirus or protein production (Zeiser *et al.,* 2000; Ansorge *et al.,* 2007a), cell size evolution (Ansorge *et al.,* 2007b) or process evolution (Cannizzaro *et al.,* 2003). Only one group used this method in the specific case of CHO cells cultivated on macroporous and disk carriers (Ducommun *et al.,* 2001; 2002).

At the moment, no papers were dedicated to implement the dielectric spectroscopy in culture processes performed with Vero cell line, despite the fact that Vero cells are one of the main cell line used for the manufacturing of human vaccines (Souza *et al.,* ; Kistner *et al.,* 1998; Wu *et al.,*

2004; Rourou *et al.,* 2007; Toriniwa *et al.,* 2007). Also, none of the litterature studies proposed to settle a realistic in-line quantification or detection technique of animal cell death.

In this work we studied the in-line monitoring of Vero cells through dielectric spectroscopy in the specific case of cells attached on non porous microcarriers and cultivated in serum-free medium. Correlations between measured permittivity and off-line cell numeration were evaluated all over batch cultures. To take into account the influence of medium changes which could punctually occur during vaccine production processes, we performed cultures with different operating conditions including medium feed-harvest during exponential growth phase, and modification of the medium formulation. Moreover, we evaluated the possibility of the in-line detection of cell death during Vero cell culture processes.

Theory

The in-line monitoring of the cell density with the dielectric spectroscopy exploits the cells ability to be polarized by an electrical field. The magnitude of the cell polarization, more specifically of the membrane polarization, is measured as the permittivity (ε). If cells are polarized by increasing frequencies from 0.1 to 10 MHz, a drop of the permittivity is observed. This drop is called the β-dispersion and was described through an empirical model established for spherical cells (equation of Schwan : equation 1). Thus, the β-dispersion depends on the cell concentration, the cell size and the state of cellular membrane (Markx *et al.,* 1999; Ansorge *et al.,* 2007a). The permittivity could be then related to the cell biovolume, defined in the equation 2, and the cell density can be deduced from this biovolume, considering the cells as a spheric structure with a constant radius (equation 3).

$$\varepsilon = 9 \cdot r \cdot P \cdot C_M / 4 \qquad \text{(Eq. 1)}$$

$$P = (4/3) \cdot \pi \cdot r^3 \cdot N \qquad \text{(Eq. 2)}$$

$$N = \varepsilon / (3 \cdot \pi \cdot C_M \cdot r^4) \qquad \text{(Eq. 3)}$$

with :

ε : permittivity ($F.m^{-1}$)

r : cell radius (m)

C_M : cell membrane capacitance ($F.m^{-2}$)

P : volume fraction of the cells (biovolume)

N : cell density (m^{-3})

Furthermore, the β-dispersion can be characterized with different parameters specific of the cell population : the characteristic frequency, f_C, the maximal amplitude of permittivities measured at high (10 MHz) and low frequencies (0.1 MHz), $\Delta\varepsilon$, and the empirical factor, α. The f_c frequency is dependent on the cell size, r, the membrane cell capacitance, C_M, and the conductivities of the

medium, σ_m, and of cellular cytoplasm, σ_i (equation 4). As cellular conductivity is considered as negligible (2-4 $mS.cm^{-1}$) in comparison to the culture medium conductivity generally close to 16 $mS.cm^{-1}$ (Cannizzaro *et al.*, 2003), the equation 4 could be simplified (equation 5).

$$f_c = 1 \ / \ [\ 2 \ . \ \pi \ . \ r \ . \ C_M \ . \ (1/\sigma_i \ + 1/2 \ \sigma_m \ )] \qquad \text{(Eq. 4)}$$

$$f_c = \sigma_i \ / \ (\ 2 \ . \ \pi \ . \ r \ . \ C_M) \qquad \text{(Eq. 5)}$$

with : σ_i : cell intracellular conductivity ($mS.cm^{-1}$)

σ_m : medium conductivity ($mS.cm^{-1}$)

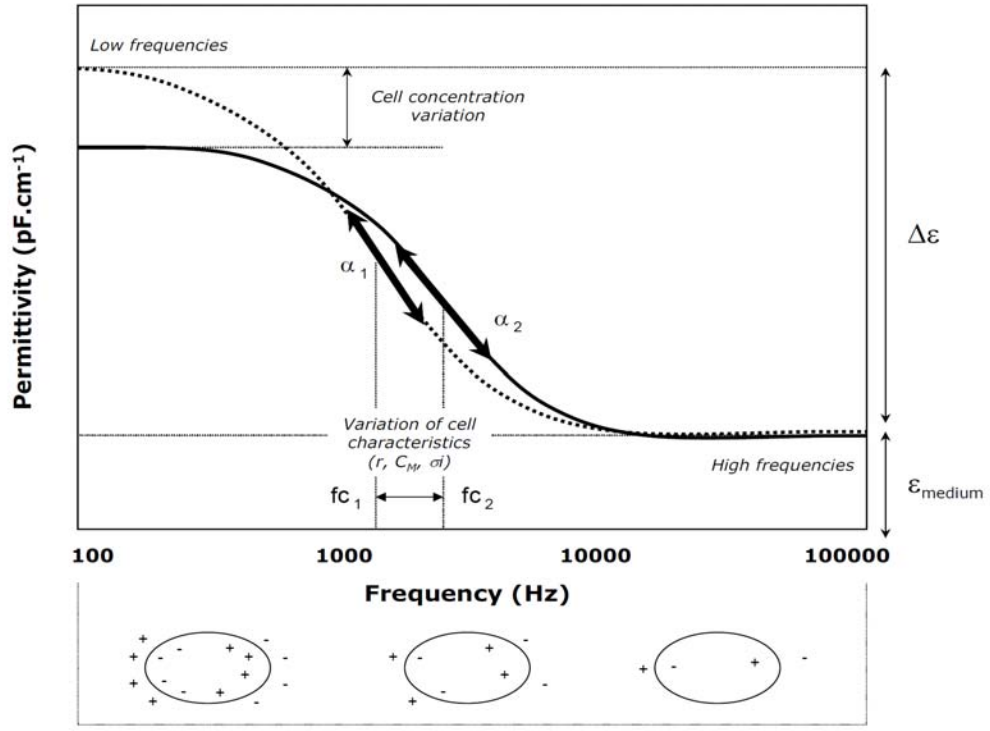


Figure 1. Schematical representation of the β-dispersion of permittivity and cell line characteristic parameters : Δε, fc, α. The influence of a variation of cell characteristics or concentration is presented.

Material and Methods

Cell culture

The Vero cell line was provided by Sanofi pasteur (Marcy L'Etoile, France) and was cultivated in two different serum-free culture media, a reference medium, M_R, and a modified reference medium with glutamine substituted with glutamax® (Sigma, USA). Further details about the referenc culture medium could not be provided for confidentiality reasons. Cells were expanded in 175 cm^2 culture T-flasks (Fisher Bioblock Scientific, France) seeded with 3.2×10^5 $cell.ml^{-1}$, and then in spinner flasks of 250 ml working volume, seeded at 2.75×10^5 $cell.ml^{-1}$ with Cytodex 1 microcarriers (GE Healthcare Bioscicence-AB, Sweden). These cultures were performed inside an incubator at 37 °C and 5 % CO_2 and stirred at 45 rpm (Techne, UK).
For permittivity measurements, an initial cell concentration of 2.75×10^5 $cell.ml^{-1}$ was seeded with microcarriers in a 2 liter bioreactor (Pierre Guérin, France) controled at pH 7.2, 37 °C and stirred at 90 rpm. Dissolved oxygen concentration was set at 25 % of air saturation.

Off-line cell analyses

For the numeration of viable Vero cells attached on microcarriers, settled microcarriers of 4 ml samples were washed twice with PBS and treated with Crystal Violet (Sigma, France) at 37°C for at least 1 h prior numeration of the released nucleus on Fush-Rosenthal hemacytometer (Preciss, France). The apoptotic cell concentration was quantified with a Guava Easycyte cytometer (Guava technologies, US) by using the annexin V marker (Guava technologies Nexin V kit). Twice a day, 1 ml was sampled from cell culture and carefully trypsinized to avoid cell damages. Detached cells were diluted in culture medium to obtain samples containing 1 x 10^4 to 5 × 10^5 cell.ml^{-1}. 2 % BSA were then added to the samples to limit non-specific marking before an half dilution in the annexin-V reagent. After 20 min of incubation at room temperature without light, cells were analyzed and data were processed with the Express Pro software (Guava technologies).

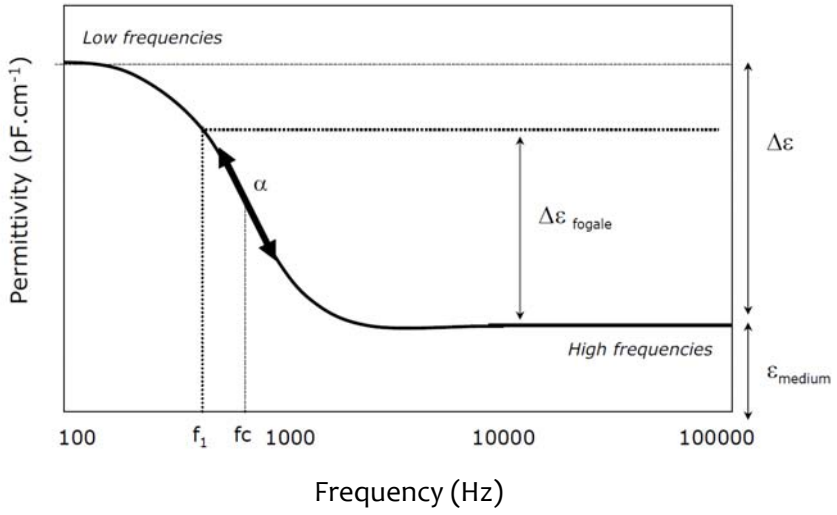


Figure 2. β-dispersion and permittivity measure corresponding to $\Delta\varepsilon_{fogale}$ parameter.

***In-line* permittivity measurements**

Cell culture permittivity was measured by using the sterilizable Fogale Biomass System® (Fogale nanotech, France) implemented in the 2 l bioreactor. The principle of the measure through this equipment was already described by Ansorge *et al.,* 2007a. Briefly, the relative permittivity signal acquired, $\Delta\varepsilon_{fogale}$, is the result of the difference in permittivities measured by a dual frequency method with a high frequency f_2 at 10 MHz and a working frequency f_1. This last frequency is adjustable for any given cell. In the case of the adherent Vero cells, this working frequency f_1 was set at 382 kHz as recommended by the manufacturer. Measurements were performed every 6 min and the permittivity base line was set by measuring the permittivity of the medium added with microcarriers prior to cell seeding in the bioreactor.

An additionnal frequency scan module was provided by Fogale nanotech, allowing to acquire permittivities for 20 frequencies ranging from 300 kHz to 10 MHz. Data processing with the dedicated software to frequency scanning provided the determination of the three specific parameters of the β-dispersion model, $\Delta\varepsilon$, f_c and α.

Results and Discussion

The first part of this study will focus on the application of dielectric spectroscopy to in-line monitor the adhered cell concentration in Vero cell culture processes. Cells were grown on non macroporous microcarriers with various operating conditions. Then, the second part of our study will present a new method to in-line monitor the cell death, mainly apoptosis, from the permittivity measurements.

In-line monitoring of adherent Vero cell concentration

Kinetics of cell cultures and permittivity measurements

Three different cultures were performed with various operating conditions. A first one was realized in a serum-free medium entitled reference medium, M_R. The second culture was also performed in the reference medium M_R, but with an additionnal 80 % renewal of the culture medium after 48 h of culture. Then, a third culture was realized in a modified reference medium, M_M, in which glutamine was substituted with glutamax®, alanine-glutamine peptide. The three Vero cell cultures were in-line monitored with the Fogale Biomass system®. The different cell populations, adhered, necrotic, apoptotic and lysed, were off-line analyzed. The evolutions with time of the cell concentrations and the permittivities are presented in the figure 3.

In the reference medium the Vero cells reached a maximal cell concentration of 8×10^5 cell.ml^{-1} after 72 h of culture (Figure 3a). Then, the following plateau of cell concentration coincided with the beginning of cell lysis. Cell apoptosis increased 24 h later from about 96 h of culture, to reach a maximal concentration of 2.3×10^5 cell.ml^{-1} after 120 h of culture, corresponding to 36 % of the attached cells. The second culture, with a M_R medium renewal during the exponential cell growth phase, presented a higher maximal cell concentration of 20×10^5 cell.ml^{-1} (Figure 3b). In this case, apoptosis was reduced just after medium renewal and the cell apoptotic concentration after 120 h was 10 % of the adhered cells (1.6×10^5 cell.ml^{-1}), before reaching 42 % at 168 h. Cell lysis showed a progressive increase from 72 h of culture to attain a concentration of 8.5×10^5 cell.ml^{-1} at the end of the culture. In the modified medium M_M, the adhered Vero cell reached a higher maximal concentration (12.3×10^5 cell.ml^{-1}) than in the M_R medium without medium renewal (Figure 3c). Moreover, this culture demonstrated a lower cell death in comparison with the batch culture in M_R medium, with only 16 % of apototic cells after 120 h of culture. Clearly, the substitution of glutamine by glutamax® had a positive influence on the Vero cell behaviour. It is important to specify that for all these cultures, no necrotic cells were observed, either in the culture supernatant or on the microcarrier surface.

All the permittivity ($\Delta\varepsilon_{fogale}$) curves presented a profile very similar to adhered cell concentration curves. The maximal permittivities were of 70, 80 and 100 pF.cm^{-1} for cultures performed in M_M, M_R or medium renewal respectively. This was encouraging for further correlations between off-line cell concentrations and in-line probe data.

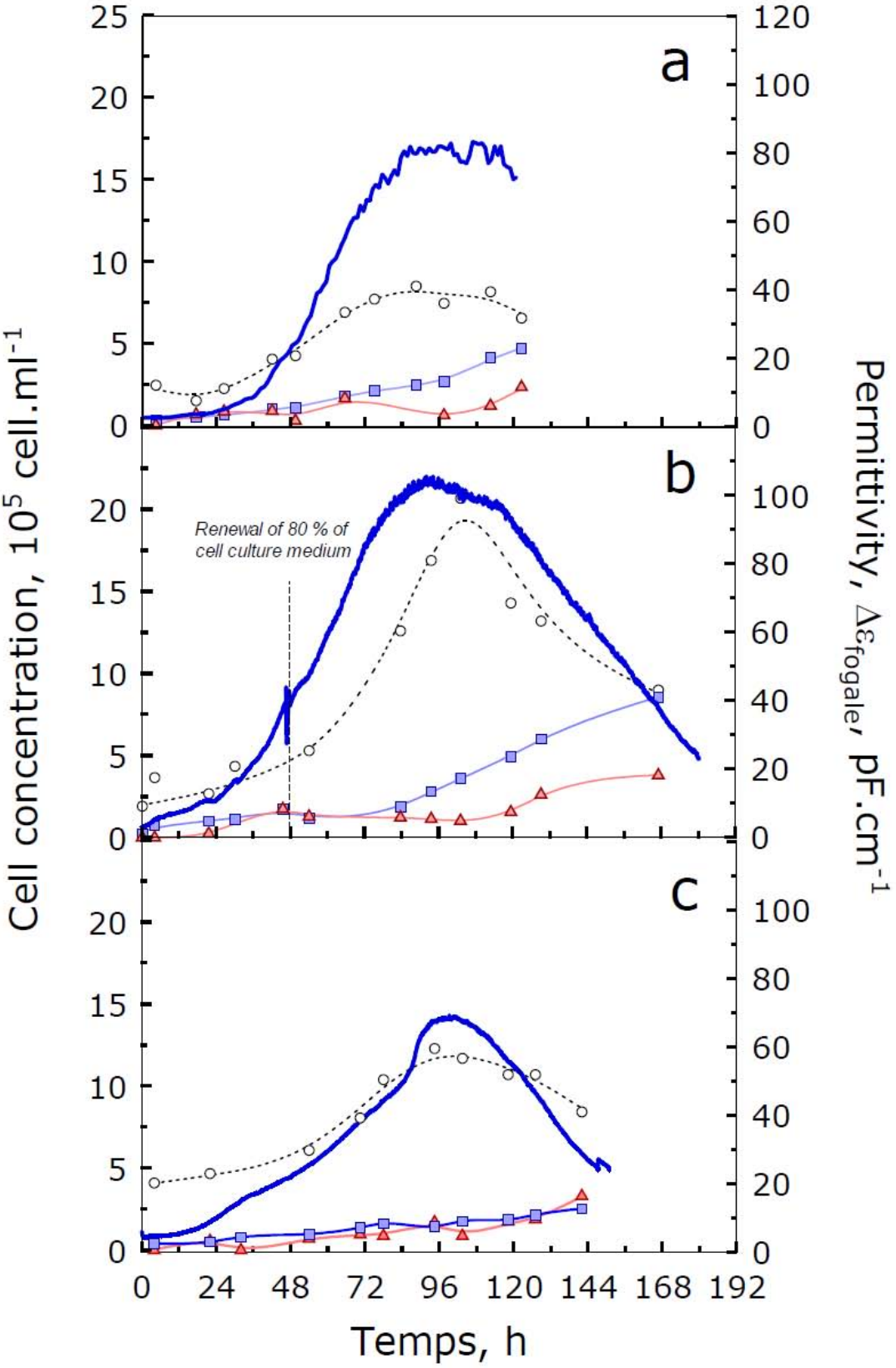


Figure 3. Evolution of the concentrations of viable (○), apoptotic (▲), lysed (■) Vero cells, during batch cultures performed in serum-free medium, with (a) or without (b) medium renewal, and in a glutamax® containing medium (c). In-line permittivity monitoring (▬).

Correlations between cell concentrations and permittivity measurements

Some correlations between the *in-line* permittivity data, $\Delta\varepsilon_{fogale}$, and the attached cell concentration, C, were assayed and are presented in figure 4 for the different cultures.

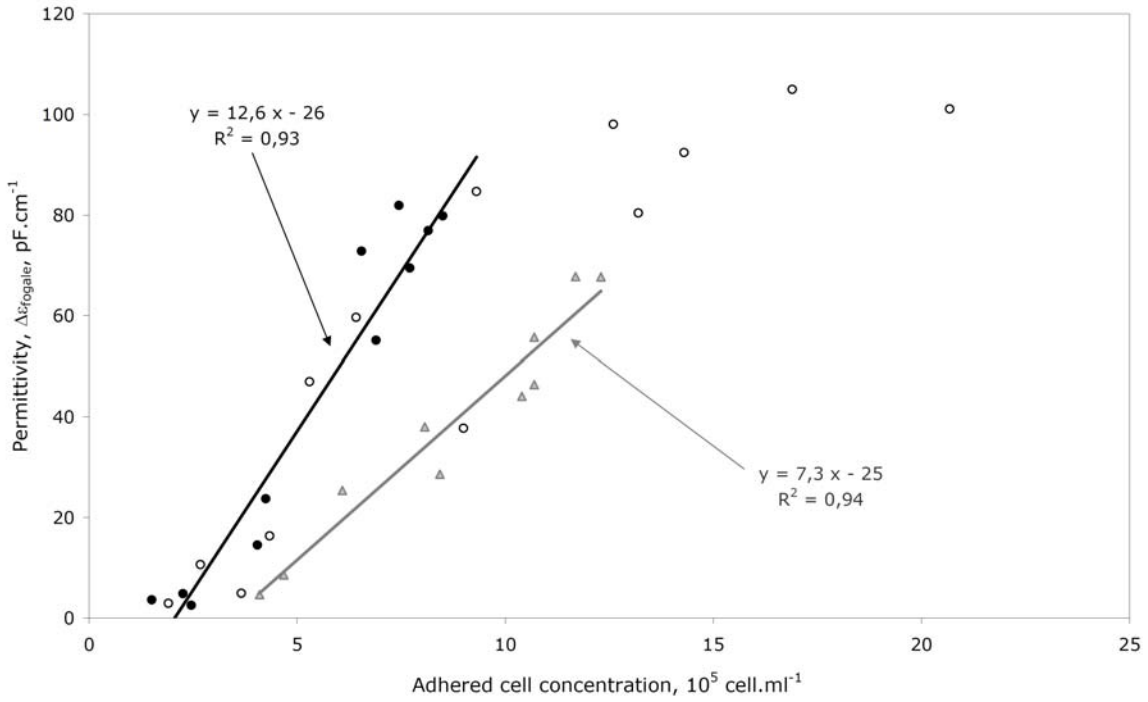


Figure 4. Correlation between relative permittivity, $\Delta\varepsilon_{fogale}$, and cell concentration of Vero cells attached on microcarriers, during cultures performed in reference serum-free medium (●), in reference medium with renewal (○) and in medium with glutamine substituted by glutamax® (▲).

Both cultures performed in the reference serum-free medium, either with or without medium renewal, presented a similar linear correlation providing the cell densities were lower than 10^6 cell.ml^{-1} (equation 6). In the case of the culture performed with glutamine-substituted medium M_M, a linear correlation was observed during the whole culture time despite the presence of dead cells (equation 7)

$$\Delta\varepsilon_{fogale} = 12.6 \times C - 26 \qquad \text{(Eq. 6)}$$

$$\Delta\varepsilon_{fogale} = 7.3 \times C - 26 \qquad \text{(Eq. 7)}$$

However, the slope of the correlation and the permittivity values obtained in this modified medium are lower than in the reference medium. For example, for a same measured permittivity of 40 pF.cm^{-1}, the cell concentration was 8.9×10^5 and 5.7×10^5 cell.ml^{-1} respectively in M_M and M_R medium. These observations pointed out a decrease of each cell permittivity in the modified medium. Regarding the empirical model presented in equation 1, the global permittivity is influenced by cell concentration, cell size and cell membrane capacitance, C_M.

So, as observed in equation 3, the increase of cell concentration for a same permittivity value resulted either from a lower cell radius or a lower cell membrane capacitance. These results clearly pointed out the influence of the culture medium formulation which induced some different cell morphological or physiological characteristics, resulting in variation of permittivity by cell measured. The influence of the culture medium on cell size has already been related for primary rat cells (Conlon et al., 2004). Furthermore, C_M is known to evolve with the structure and thickness of the cell membrane (Santos-Sacchi *et al.,* 2002), which could be affected by medium formulation. However, no conclusion could be made at that stage of the study to discriminate between cell radius or C_M decrease.

As previously exposed, when medium was changed after 48 h of culture, the relative permittivity data $\Delta\varepsilon_{fogale}$ were no longer linearly correlated with the off-line measurements for concentrations higher than 10^6 cell.ml^{-1}. The correlation from equation 6 would lead to underestimated values of cell density. Again, the observed decrease of the specific permittivity per cell could be induced by the reduction of either cell radius or cell membrane capacitance. To better understand this correlation deviation, the Vero cells attached on microcarriers were observed by microscopy to evaluate morphological changes during the cell growth (figure 5). Different morphological phases could be distinguished when Vero cells were cultivated in M_R medium with medium renewal. Just after seeding, cells were distributed on microcarrier surface without large contact area (Figure 5.a). After about 50 h of growth, Vero cells covered the whole microcarrier surface and reached confluency (Figure 5.b). In the late cell growth phase from 70 h of culture, cell tissue remained confluent with an increasing cell density (Figure 5.c-d). This provoked the decrease of cell size, the formation of multilayers and some bead-to-bead adhesions which could affected the cell specific permittivity above 10^6 cell.ml^{-1}. Such a cell size decreasing was already reported by Pons *et al.* (1992) which demonstrated the microcarrier surface saturation at the end of exponential growth phase, by quantitative image analysis of human kidney tumor cells grown on microcarriers. It has also to be noticed that, at that time of the culture, the cell apoptosis was delayed and could not affect the permittivity measurement through cell membrane capacitance modification.

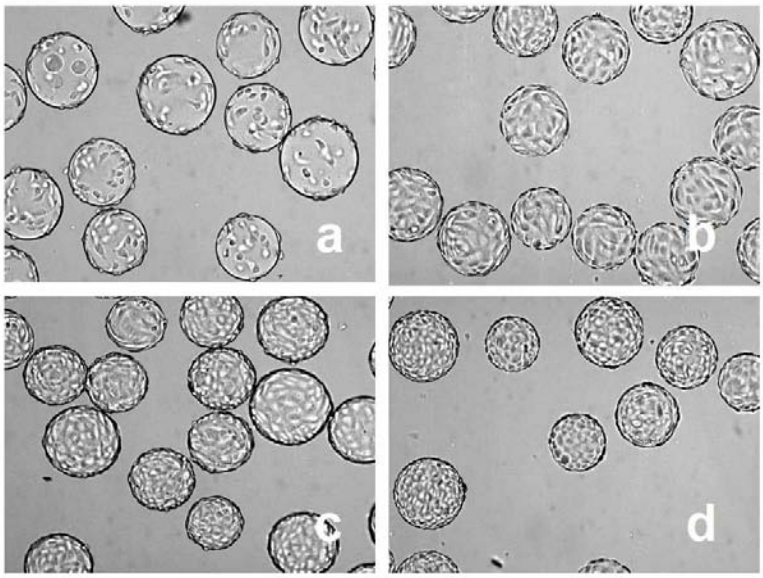


Figure 5. Microscopic observation of cells attached on microcarriers after 4 h (a), 56 h (b), 70 h (c) and 94 h (d) of culture in bioreactor with reference medium renewal.

So, the availability of in-line quantication of Vero cell concentrations higer than 10 × 10^5 cell.ml^{-1} would need additionnal studies. For example, monitoring of the cell size evolution during the whole process would be necessary (Ansorge *et al.,* 2007b). But interestingly, the linear correlations obtained between permittivity and cell density allowed to envisage the in-line quantification of lower Vero cell concentrations by using the Fogale Biomass System®, providing a previous calibration in the operating medium.

In-line monitoring of adhered Vero cell concentration during various batch cultures

Based on the previous correlations, the measured permittivity can be tested for the estimation of the Vero cell concentration. In the figure 6, the cell concentations calculated from dielectric spectroscopy measurements were compared to off-line cell numeration by crystal violet method. The results indicated a very good prediction of the Fogale Biomass system whatever the cell culture medium without medium renewal (figure 6 b,c). Moreover, in these two cases, the cell concentration decrease was also well described through permittivity measurements. When the medium renewal allowed higher cell concentrations, the evaluation of cell density is available only during the exponential growth phase, which could remain of interest when viral cell infection has to be monitored.

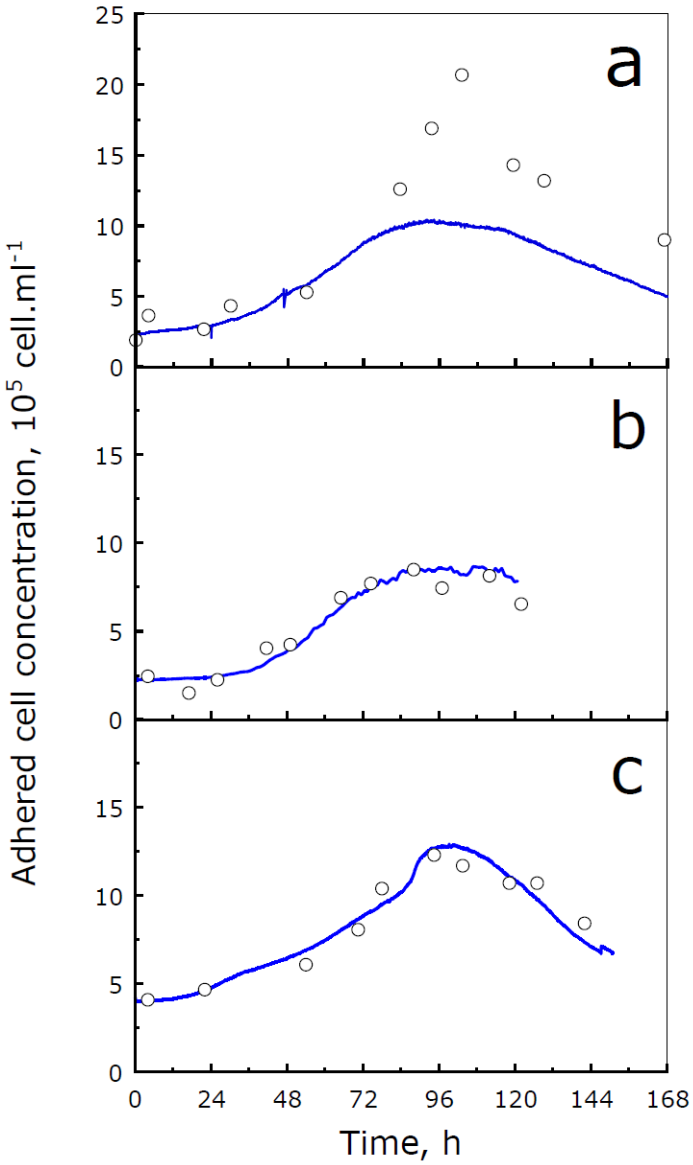


Figure 6. Evoutions of adhered cell concentration off-line measured with Crystal Violet numeration (○) and in-line monitored through permittivity acquisition (▬) for three cultures : in reference medium with (a) or without (b) medium renewal and in modified medium with glutamine substitution by glutamax® (c).

On-line detection of Vero cell death

In animal cell-based production processes, it could be also of interest to follow the evolution of cell death phenomenon in order to better understand the effect of stressing operating conditions or to anticipate some process dysfunctions. The interest of dielectric spectroscopy for in-line Vero cell death monitoring was then eveluated in this part.

Dead cell populations versus permittivity measurements

As described in the first part, no necrotic cells were observed by cytometry either on the microcarriers or in the culture supernatants, whatever the culture conditions. Furthermore, as the membrane of necrotic cells becomes porous, they could not be polarized by the electrical field generated by the Fogale Biomass System®. The cell lysis evaluated by LDH method began to increase after 72 h of culture for all the cultures, but the lysed cells having no more intact membrane could not influence the permittivity data, as confirmed by Cannizzaro et al. (2003). On the contrary, apoptotic cells are splitted in small apoptotic bodies with dislocated nucleus, which could be polarized by the electrical field but are not be numbered by crystal violet technique.

Thus, the observation of cell death with dielectric spectroscopy can only be expected for cell apoptosis observation. Interestingly, the apoptosis monitoring could give a valuable indication to monitor the course of viral infection while several works reported the induction of apoptosis just after virus infection of a cell culture (Chan *et al.,* 2003; Ravindra *et al.,* 2008).

Apoptosis detection through characteristic frequency evolution

The direct measurement of permittivity did not allow to identify the cell death by apoptosis. Indeed, as shown in figure 6 b,c, all attached cells could be monitored even when apoptotic cell appeared during the last phase of the culture process. In fact, the cell density estimation from equation 3 is mainly affected by the cell radius which appeared at a power 4 in the equation. But apoptosis results not only on a reduction of the cell size but also on important modifications of cell membrane capacitance, c_M. Thus, to better take into account the influence of c_M evolution during apoptosis phenomenon, another parameter could be advantageously used. As shown in equation 5, the characteristic frequency of the cell population, f_c, is equivalently influenced by cell radius and c_M. This parameter could be determined by the frequency scanner of Fogale Biomass software on the β-dispersion curve (Figure 1).

In the figure 7, we presented the evolution with time of the f_c parameter in parallel to the apoptosis quantification, in the case of cultures performed in reference medium (figure 7 a), in reference medium with medium renewal after 48 h (figure 7 c) and in modified medium M_M (figure 7 e). The characteristic frequency, f_c, was not presented during the first 24 h because the cell density was too low to provide a reliable signal allowing to determine this parameter. For the three cultures the evolution of characteristic frequency presented two phases. During the cell increase phase, the f_c parameter decreased rapidly. Then, after about 96 h of culture, it evolved in the opposite direction and started to slightly increase. It should also be highlighted from these figures that the time of the change in f_c evolution coincided with an important rise of the apoptosis in the cell cultures. Indeed, at 96 h of culture, the apoptotic cell concentration increased rapidly to reach 2.34×10^5 cell.ml^{-1}, 3.80×10^5 cell.ml^{-1} and 3.3×10^5 cell.ml^{-1}, respectively in M_R medium with or withouth renewal and in M_M medium.

These observations were consistent with morphological characteristics of apoptotic cells. Indeed, the formation of small apoptotic bodies and the membrane reorganisation could highly affect the cell membrane capacitance, C_M, and the cell size included in the f_C determination (equation 5). In the contrary, with CHO cells, Cannizzaro *et al.* (2003) attributed the late f_c increasing to the polarization of smaller intracellular organelles exposed to electrical polarization during cell death. But, this authors did not off-line quantified the cell apoptosis to validate their hypotheses.

As the apoptosis increase coincided with f_c evolution change, the derivative curve of f_c evolution was calculated and plotted against apoptotic cell kinetics in order to precise the relation between f_C evolution with time and apoptosis apparition (figures b, d, f). It could be observed in these figures that the derivative became equal to zero at the same time than the high increase of apoptotic cell concentation. This observation was confirmed whatever the culture media used, and either with or without medium renewal.

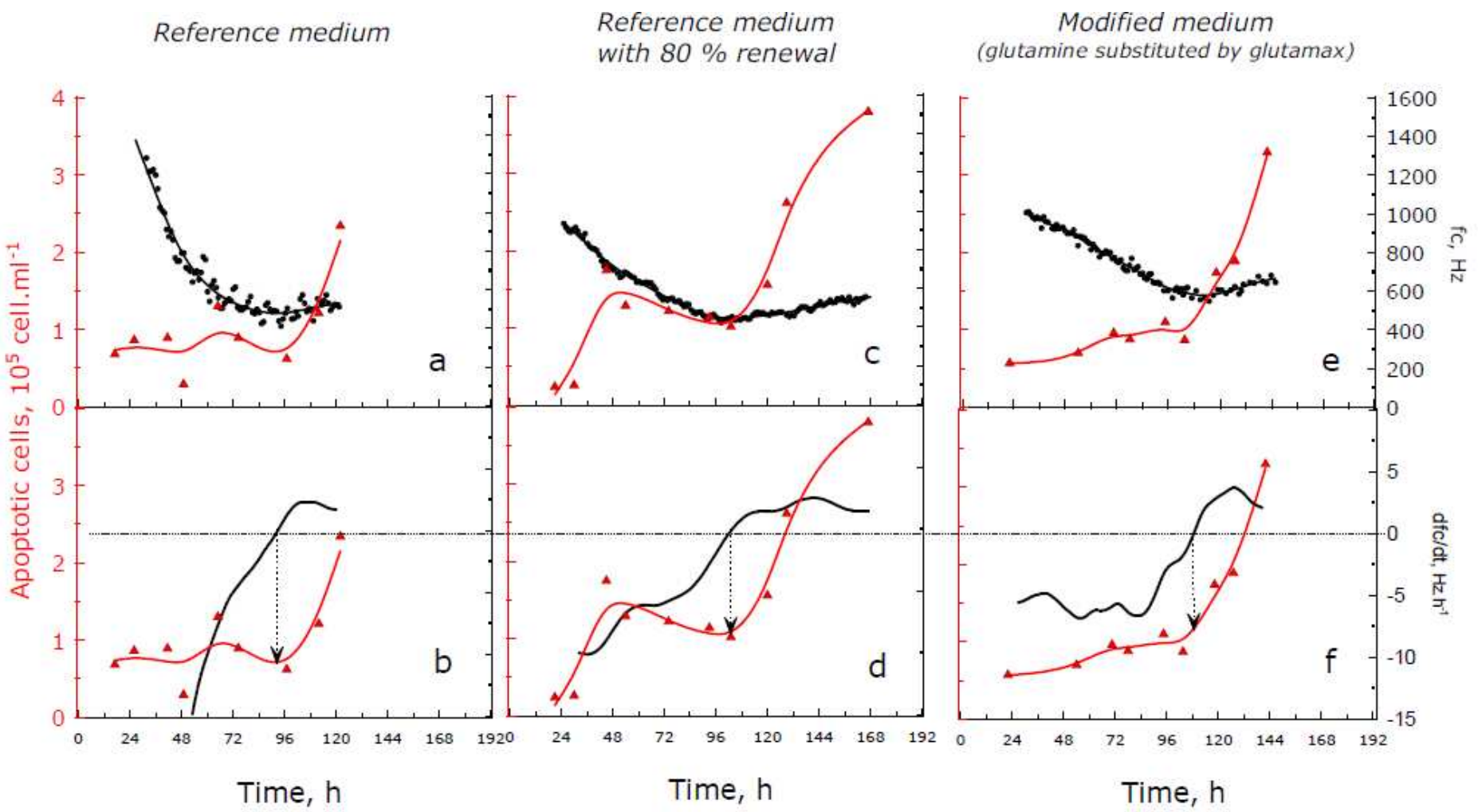


Figure 7. Evolution with time of apoptotic cell concentration (★), characteristic frequency f_c (●) and its derivative curve (▬) for cultures performed in M_R medium with (a,b) or without (c, d) medium renewal and in M_M medium with glutamine substituted by glutamax (e, f).

Conclusion

For the first time, our results reported the capacity of the dielectric spectroscopy Fogale probe for monitoring, without any sampling, the concentrations of Vero cells attached on microcarriers until 10×10^5 cell.ml^{-1} and cultivated in different culture media. They demonstrated that, in the linear range of the obtained correlations, the empirical relation between permittivity and cell density, based on a theoretical background developped for spherical cells and related to cell biovolume, could be favourably employed for adherent-dependant cells growing on non macroporous microcarriers. Thus, dielectric spectroscopy could represent an interesting and reliable tool for the development of a PAT strategy in the case of industrial vaccine processes, in which the cell growth phase is essential to be well controled at critical times of the process, as trypsinization step, or infection procedure.

The second major interest of this work is the cell death detection in bioreactor cultures. Based on our results, for the first time, the in-line detection of the important rise of cell apoptosis during a Vero cell culture process could be envisaged by using the f_c parameter evolution obtained from multifrequency permittivity measurements. This would represent an important information to control efficiency of infection known to provok cell apoptosis, or to detect an eventual failure during the culture process. Indeed, with this additionnal information, easily and quickly obtained without any culture sampling, this equipment could participate to risk strategy mitigation in industrial processes.

Thus, this new application of dielectric spectroscopy for cell culture processes makes it a very promising tool for the development of further PAT strategies.

Bibliography

Al-Rubeai, M. and Singh, R. P. (1998). *"Apoptosis in cell culture." Current Opinion in Biotechnology 9 (2): 152-156.*

Ansorge, S., Esteban, G. and Schmid, G. (2007a). *"On-line monitoring of infected Sf-9 insect cell cultures by scanning permittivity measurements and comparison with off-line biovolume measurements." Cytotechnology 55 (2): 115-124.*

Ansorge, S., Henry, O., Aucoin, M., Voyer, R., Carvell, J. and Kamen, A. (2007b). *Monitoring the cell size distribution of mammalian cell cultures using on-line capacitance measurements ESACT meeting. Dresden.*

Bradamante, S. (2004).*"Simulated weightlessness in the design and exploitation of a NMR-compatible bioreactor." Biotechnology Progress 20 (5): 1454-1459.*

Cannizzaro, C., Gügerli, R., Marison, I. and Stockar, U. v. (2003). *"On-line biomass monitoring of CHO perfusion culture with scanning dielectric spectroscopy." Biotechnology and Bioengineering 84 (5): 597-610.*

Card, C., Hunsaker, B., Smith, T. and Hirsch, J. (2007). *"Rapid, Simultaneous Monitoring of Multiple Components in Mammalian Cell Culture with Near-Infrared Spectroscopy." Thermo Fisher Scientific ApplicationNote: 51449.*

Chan, Y. F. and Abubakar, S. (2003). *"Enterovirus 71 infection induces apoptosis in Vero cells." The Malaysian journal of pathology 25 (1): 29-35.*

Conlon, I., Lloyd, A. and Raff, M. (2004). " *Coordination of cell growth and cell cycle progression in proliferating mammalian cells." Cell Growth : Control of cell size. Hall, M. N., Raff, M. and Thomas, G. Cold Spring Harbor. , Laboratory Press.*

Ducommun, P., Bolzonella, I., Rhiel, M., Pugeaud, P., von Stockar, U. and Marison, I. W. (2001). *"On-line determination of animal cell concentration." Biotechnology and Bioengineering 72 (5): 515-522.*

Ducommun, P., Kadouri, A., von Stockar, U. and Marison, I. W. (2002). *"On-line determination of animal cell concentration in two industrial high-density culture processes by dielectric spectroscopy." Biotechnology and Bioengineering 77 (3): 316-323.*

Eyer, K. and Heinzle, E. (1996). *"On-line estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing and redox potential measurement." Biotechnology and Bioengineering 49 (3): 277-283.*

Figueroa, J. B., Chen, S., Oyler, G., A., Hardwick, J. M. and Betenbaugh, M. J. (2004). *"Aven and Bcl-xL enhance protection against apoptosis for mammalian cells exposed to various culture conditions." Biotechnology and Bioengineering 85 (6): 589-600.*

Ishaque, A. and Al-Rubeai, M. (1998). *"Use of intracellular pH and annexin-V flow cytometric assays to monitor apoptosis and its suppression by bcl-2 over-expression in hybridoma cell culture." Journal of Immunological Methods 221: 43-57.*

Kamen, A., A. , Bédard, C., Tom, R., Perret, S. and Jardin, B. (1996)
"On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures." Biotechnology and Bioengineering 50 (1): 36-48.

Kilburn, D. G., Fitzpatrick, P., Blake-Coleman, B. C., Clarke, D. J. and Griffiths, J. B. (1989). *"On-line monitoring of cell mass in mammalian cell cultures by acoustic densitometry." Biotechnology and Bioengineering 33 (11): 1379-1384.*

Kistner, O., Barrett, P. N., Mundt, W., Reiter, M., Schober-Bendixen, S. and Dorner, F. (1998). *"Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine." Vaccine 16 (9-10): 960-968.*

Konstantinov, K., Chuppa, S., Sajan, E., Tsai, Y., Yoon, S. and Golini, F. (1994). *"Real-time biomass-concentration monitoring in animal-cell cultures." Trends in Biotechnology 12 (8): 324-333.*

Mancuso, A., Sharfstein, S. T., Tucker, S. N., Clark, D. S. and Blanch, H. W. (1994). *"Examination of primary metabolic pathways in a murine hybridoma with carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy." Biotechnology and Bioengineering 44 (5): 563-585.*

Markx, G. H. and Davey, C. L. (1999). *"The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: applications in biotechnology." Enzyme and Microbial Technology 25 (3-5): 161-171.*

Pons, M.-N., Wagner, A., Vivier, H. and Marc, A. (1992). *"Application of quantitative image analysis to a mammalian cell line grown on microcarriers." Biotechnology and Bioengineering 40 (1): 187-193.*

Ravindra, P. V., Tiwari, A. K., Ratta, B., Chaturvedi, U., Palia, S. K., Subudhi, P. K., Kumar, R., Sharma, B., Rai, A. and Chauhan, R. S. (2008). *"Induction of apoptosis in Vero cells by Newcastle disease virus requires viral replication, de-novo protein synthesis and caspase activation." Virus Research 133 (2): 285-290.*

Rourou, S., van der Ark, A., van der Velden, T. and Kallel, H. (2007). *"A microcarrier cell culture process for propagating rabies virus in Vero cells grown in a stirred bioreactor under fully animal component free conditions." Vaccine 25 (19): 3879-3889.*

Rudolph, G., Lindner, P., Gierse, A., Bluma, A., Martinez, G., Hitzmann, B. and Scheper, T. (2008). *"Online monitoring of microcarrier based fibroblast cultivations with in situ microscopy." Biotechnology and Bioengineering 99 (1): 136-145.*

Santos-Sacchi, J. and Navarrete, E. (2002). *"Voltage-dependent changes in specific membrane capacitance caused by prestin, the outer hair cell lateral membrane motor." Pflügers Archiv European Journal of Physiology 444 (1): 99-106.*

Schulze-Horsel, J., Schulze, M., Agalaridis, G., Genzel, Y. and Reichl, U. (2009). *"Infection dynamics and virus-induced apoptosis in cell culture-based influenza vaccine production--Flow cytometry and mathematical modeling." Vaccine 27 (20): 2712-2722.*

Shah, D., Clee, P., Boisen, S. and Al-Rubeai, M. (2007). *NucleoCounter – An Efficient Technique for the Determination of Cell Number and Viability in Animal Cell Culture Processes. Cell Technology for Cell Products: 535-538.*

Siano, S. A. (1997). *"Biomass measurement by inductive permittivity." Biotechnology & Bioengineering 55 (2): 289-304.*

Souza, M. C. O., Freire, M. S., Schulze, E. A., Gaspar, L. P. and Castilho, L. R. *"Production of yellow fever virus in microcarrier-based Vero cell cultures." Vaccine In Press, Corrected Proof.*

Szabo, S., Monroe, S., Fiorino, S., Bitzan, J. and Loper, K. (2004). *"Evaluation of an automated instrument for viability and concentration measurements of cryopreserved hematopoetic cells." Laboratory Hematology 10: 109-111.*

Teixeira, A. P., Portugal, C. A. M., Carinhas, N., Dias, J. M. L., Crespo, J. P., Alves, P. M., Carrondo, M. J. T. and Oliveira, R. (2009). *"In situ 2D fluorometry and chemometric monitoring of mammalian cell cultures." Biotechnology and Bioengineering 102 (4): 1098-1106.*

Toriniwa, H. and Komiya, T. (2007). *"Japanese encephalitis virus production in Vero cells with serum-free medium using a novel oscillating bioreactor." Biologicals 35 (4): 221-226.*

Trabelsi, K., Rourou, S., Loukil, H., Majoul, S. and Kallel, H. (2006). *"Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor." Journal of Biotechnology 121 (2): 261-271.*

Wu, S. C., Liu, C. C. and Lian, W. C. (2004). *"Optimization of microcarrier cell culture process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development." Vaccine 22 (29-30): 3858-3864.*

Yoon, S. J. and Konstantinov, K. B. (1994). *"Continuous, real-time monitoring of the oxygen uptake rate (OUR) in animal cell bioreactors." Biotechnology and Bioengineering 44 (8): 983-990.*

Zeiser, A., Bédard, C., Voyer, R., Jardin, B., Tom, R. and Kamen, A. A. (1999). *"On-line monitoring of the progress of infection in Sf-9 insect cell cultures using relative permittivity measurements." Biotechnology and Bioengineering 63 (1): 122-126.*

Zeiser, A., Elias, C. B., Voyer, R., Jardin, B. and Kamen, A. A. (2000)
"On-Line Monitoring of Physiological Parameters of Insect Cell Cultures during the Growth and Infection Process." Biotechnology Progress 16: 803-808.

3.1.3. Contributions de l'article

Cet article propose, pour la première fois, le suivi en ligne de cultures de cellules Vero adhérées sur microporteurs non poreux par un capteur de permittivité. Différentes cultures ont été suivies : en milieu sans sérum, en milieu sans sérum avec renouvellement de milieu à 48 h de culture, et dans le milieu modifié après substitution de la glutamine par du glutamax®.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence une corrélation linéaire satisfaisante entre les mesures de permittivité et la concentration de cellules adhérées, pour les deux cultures réalisées sans recharge-récolte du milieu. Cette corrélation a été vérifiée pendant toute la durée de la culture, y compris après apparition d'une mortalité cellulaire non négligeable. Par ailleurs, les corrélations mises en évidence sont apparues dépendantes du milieu de culture, avec une pente plus faible dans le cas de la culture en présence de glutamax®, qui pourrait résulter de la plus petite taille des cellules. Ce comportement devra être approfondi afin d'identifier les paramètres cellulaires, rayon ou capacitance membranaire, susceptibles de varier suffisamment entre les deux milieux pour influencer la mesure de la permittivité.

Dans le cas de la culture ayant subi un renouvellement de milieu qui induit une augmentation de la concentration cellulaire, on observe que la permittivité n'est plus corrélée avec la concentration cellulaire au-delà d'une valeur de l'ordre de 10^6 cellules.ml^{-1} atteinte vers 84 h. Cette valeur correspond au moment où les cellules arrivent à confluence sur les microporteurs. A partir de là, les cellules continuent à proliférer mais leur taille se réduit du fait de la saturation des supports et des multi-couches qui commencent à apparaître. Dans ce cas, le biovolume cellulaire estimé à partir de la mesure de permittivité ne peut plus refléter le nombre de cellules.

De plus, l'exploitation de la courbe de β-dispersion, obtenue par analyse multifréquence de l'évolution de la permittivité au cours de la culture, nous a permis de mettre en évidence le fait que la dérivée de la courbe d'évolution de la fréquence caractéristique f_C au cours du temps s'annulle en même temps que l'apparition importante de cellules apoptotiques. Cette constatation s'est révélée vérifiée dans toutes les conditions de culture utilisées, avec ou sans changement de milieu et quelle que soit la composition du milieu. Elle peut provenir de l'influence sur la courbe de β-dispersion du changement morphologique et membranaire des cellules apoptotiques.

Ce résultat permet d'envisager l'utilisation de ce capteur pour la détection de l'apoptose massive dans le cas de cultures de cellules Vero en bioréacteur mais pourrait aussi être appliqué à d'autres lignées cellulaires telles que des cellules cultivées en suspension.

L'analyse en ligne de cellules Vero attachées sur microporteurs a été réalisée en utilisant une sonde de mesure de permittivité. Nous avons montré que, dans deux milieux de culture différents, la concentration de cellules sur support peut être corrélée à la permittivité pendant toutes les phases du procédé. Un changement de milieu à 48 h conduit à une concentration cellulaire plus élevée, une saturation des porteurs, une diminution de la taille cellulaire. Dans ce cas, la concentration des cellules n'est plus corrélée à la permittivité. Un autre résultat original concerne la détection de l'apoptose *via* la fréquence caractéristique f_C de la population cellulaire.

3.2. Etude préliminaire de l'analyse des cellules Vero et du milieu de culture par microspectroscopie Raman

Le développement de la stratégie PAT impose de rechercher de nouveaux outils d'analyse en-ligne du procédé permettant, non seulement, d'identifier spécifiquement un élément du milieu de culture, mais aussi, de suivre l'évolution d'une empreinte globale du contenu du bioréacteur, utile ensuite pour la mise en œuvre d'une procédure d'analyse des risques sur la qualité du produit final. Cette approche est particulièrement essentielle pour des produits à usage thérapeutique. Aussi, les procédés de culture de cellules Vero pour la production vaccinale sont directement concernés par cette démarche.Parmi les méthodes d'analyses envisageables, les techniques de spectroscopie vibrationnelle, telles que la spectroscopie infrarouge ou la spectroscopie Raman, apparaissent comme de bons candidats pour fournir une "signature " du milieu de culture, chaque molécule présente possédant un spectre vibratoire spécifique basé sur sa structure interne.

Aussi, dans cette partie, nous présentons des études préliminaires en spectroscopie Raman pour l'identification de marqueurs de l'état d'avancement de la culture, que ce soit par l'analyse des cellules, ou par celle du surnageant de culture. Les mesures sont réalisées par micro spectroscopie Raman, grâce à un spectromètre Raman couplé à un microscope, appelé LabRam (Jobin-Yvon), au Laboratoire de Spectroscopie Biomoléculaire de Reims (UMR MEDyC, CNRS 6237).

3.2.1. Analyse de cellules Vero en suspension

Pour cette étude préliminaire, des cellules issues d'une culture en boîte statique ont été analysées à deux stades de la culture : en phase exponentielle de croissance (48 h) et en phase de ralentissement (96 h). Les cellules préalablement trypsinées et congelées à -20 °C ont été décongelées juste avant l'analyse. Les spectres Raman, acquis avec des suspensions cellulaires de concentrations identiques, soit 2,5 × 10^6 cell.ml^{-1}, sont présentés dans la figure 58. Ils correspondent à des spectres moyennés et normalisés par rapport au pic de l'eau (1640 cm^{-1}), utilisée comme référence du fait de sa présence très majoritaire.

L'allure des deux spectres est assez similaire pour la plupart des pics. On peut noter cependant certaines zones du spectre présentant des intensités différentes, comme, par exemple, la zone située entre 800 à 900 cm^{-1} ou le pic localisé à 1004 cm^{-1}. Plus spécifiquement, ce dernier pic voit son intensité multipliée par quatre lors du passage de la phase de croissance à la phase de ralentissement de la croissance, en dépit d'une même quantité de cellules. Grâce à des études antérieures sur différents composés cellulaires, certains pics spécifiques de ces spectres peuvent être identifiés. Ainsi, le pic observé à 1004 cm^{-1} a été attribué à la phénylalanine, identifiée comme un marqueur cellulaire potentiel de la présence de protéines (Giepmans *et al.,* 2006; Willets 2009). Par ailleurs, les molécules d'ADN sont généralement identifiées par un pic spécifique à 1120 cm^{-1}, qui correspond au squelette de l'ADN composé d'éléments phosphates. Enfin, le pic à 862 cm^{-1} a été affecté aux liaisons riboses présentes dans l'ADN ou l'ARN, alors que le pic à 830 cm^{-1} correspondrait à un phospho-diester BkB appartenant à l'ADN ou l'ARN (Willets 2009). On pourrait donc envisager que la composition des cellules évolue avec la phase de culture. Nous avons donc bien là un moyen potentiel de détecter et suivre l'état physiologique des cellules.

Ainsi, dans une première approche, la région comprise entre 800 et 900 cm^{-1}, ainsi que le pic à 1003 cm^{-1}, pourraient représenter des marqueurs potentiels de l'état de prolifération des cellules Vero. Des analyses complémentaires tout au long des différentes phases de la culture seraient bien sûr indispensables pour valider cet intérêt potentiel.

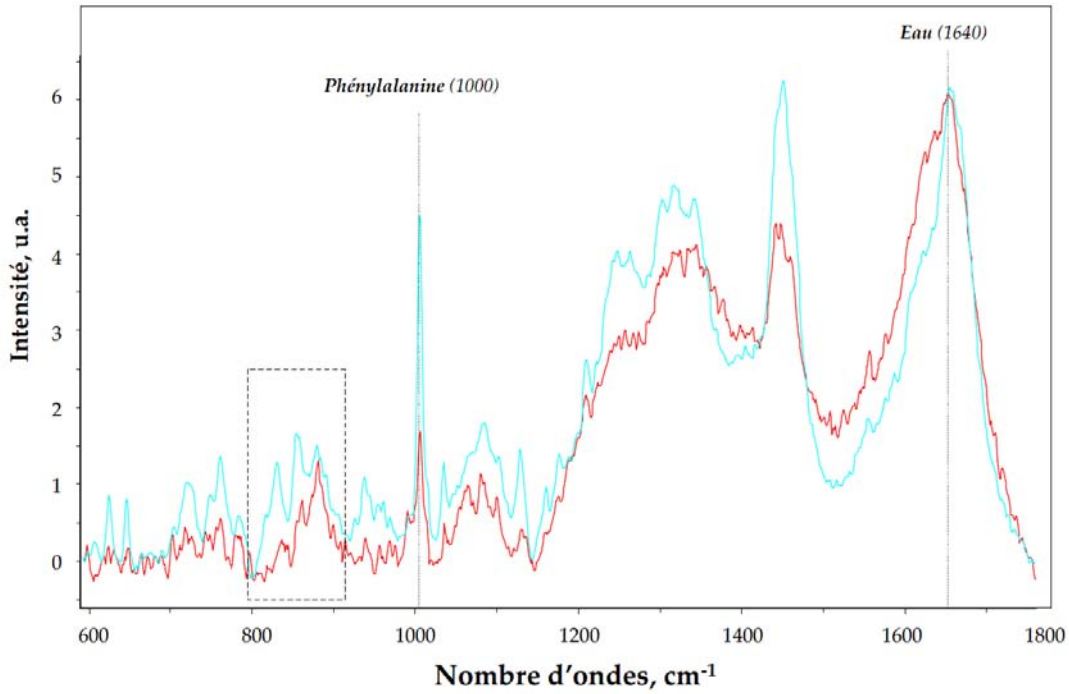


Figure 58 Spectres Raman de suspensions cellulaires décongelées issues d'une culture statique ; en bleu, cellules en fin de croissance (J4), en rouge, cellules en phase exponentielle de croissance (J2).

A côté de l'influence de l'état de prolifération des cellules, l'effet de la concentration cellulaire sur le spectre Raman a également été étudié avec des cellules prélevées au même stade de croissance. Par exemple, la figure 59 présente les spectres, normalisés par le pic de l'eau à 1640 cm^{-1}, de cellules cultivées pendant 96 h, analysées à deux concentrations de 2,5 et 5 × 10^6 $cell.ml^{-1}$. Même si l'allure des spectres est assez semblable, l'intensité de la plupart des pics augmente lorsque la concentration cellulaire est doublée. Toutefois, cette intensité n'est pas systématiquement doublée. Par exemple, l'intensité du pic de la phénylalanine n'est multipliée que par 1,75 alors que celle du pic du ribose est augmentée par un facteur 2,3. Ainsi, l'une des possibilités pour quantifier la concentration cellulaire à partir d'un spectre Raman, pourrait être d'établir des corrélations linéaires spécifiques avec les variations d'intensité de certains pics du spectre pris individuellement.

Toutefois, compte tenu de ces derniers résultats sur l'influence de la concentration cellulaire, pour envisager un suivi de l'état physiologique des cellules en cours de procédé, il sera indispensable de tenir compte également de l'évolution de leur concentration au cours d'une culture discontinue. L'une des alternatives pourrait être alors de caractériser l'état des cellules, non pas sur l'intensité des pics, mais sur le rapport de l'intensité de plusieurs pics. Par exemple, le tableau 21 présente les rapports d'intensités calculés respectivement entre les pics à 830 et 862 cm^{-1} et à 880 et 1004 cm^{-1}.

On remarque que ces rapports sont identiques pour une phase de la culture donnée, quelle que soit la concentration cellulaire mesurée. Ainsi, quand les cellules passent de la phase exponentielle de croissance à la phase de ralentissement, le rapport 830/862 est doublé alors que le rapport 880/1004 est divisé par environ 2.

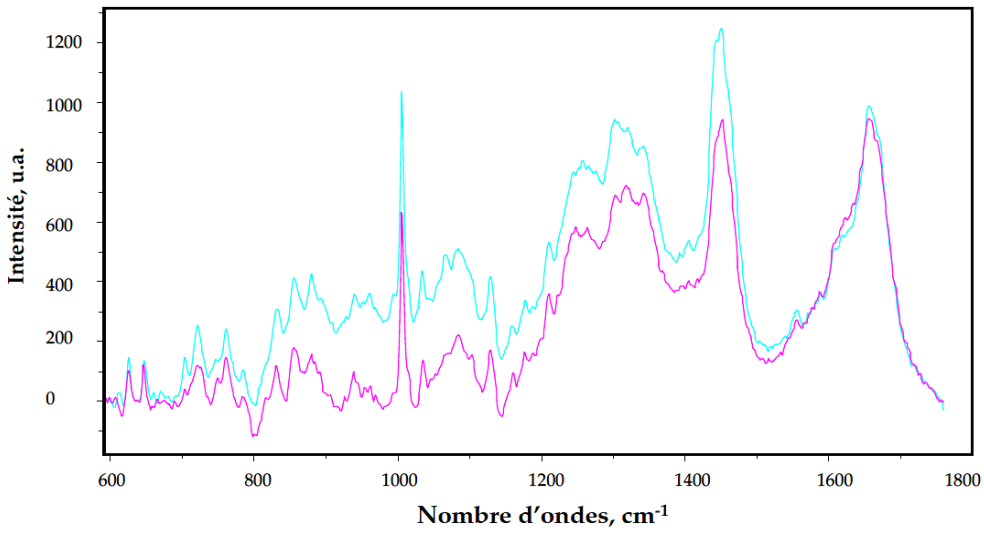


Figure 59 Spectres Raman de suspensions cellulaires à deux concentrations cellulaires différentes (rose : 2,5 × 10^6 cell.ml^{-1} ; bleu : 5 × 10^6 cell.ml^{-1}) prélevées en fin de culture statique (J4).

Tableau 21 Rapport d'intensité de pics de spectres Raman, obtenus avec des cellules prélevées à différents moments de la culture, ou à deux concentrations différentes.

Durée de culture	**Concentration cellulaire, 10^5 cell.ml^{-1}**	**Ratio de pics, cm^{-1}**	
		830/862	**880/1004**
48 h	2,5	0,38	0,82
96 h	2,5	0,76	0,33
	5	0,76	0,40

Ces résultats préliminaires sont encourageants pour approfondir l'utilisation de la spectroscopie Raman comme méthode d'identification de l'état physiologique des cellules. Ces analyses pourraient être transposées à l'échelle du réacteur du fait de la disponibilité de sondes Raman directement implantables dans les bioréacteurs. Cependant, en ce qui concerne les cultures de cellules adhérentes, l'influence éventuelle des microsupports reste à étudier. Dans une premier temps, l'acquisition de spectres Raman avec des suspensions de cellules sur microporteurs prélevées en cours de culture devra être envisagée comme perspective à ces travaux.

3.2.2. Analyse du surnageant de culture par micro spectroscopie Raman

Lorsque l'on envisage de suivre la "signature" d'un procédé, l'évolution du surnageant de culture peut aussi être prise en compte. C'est pourquoi, dans une seconde approche, nous avons évalué l'analyse d'échantillons de culture par spectroscopie Raman. Ainsi, la microspectroscopie Raman a été utilisée pour analyser des surnageants filtrés issus de cultures en spinner de 250 ml réalisées en milieu de référence. Chaque spectre correspond à la moyenne de 5 mn d'acquisition et chaque surnageant de culture a été analysé 2 fois. Dans la figure 60, sont présentés les spectres des deux analyses d'un même surnageant de culture ainsi que le spectre moyen. Le bruit de fond de cette méthode est important, compte tenu des variations observées entre deux spectres du même échantillon. Par ailleurs, lors de ces essais préliminaires, l'intensité du laser d'excitation n'était que de 50 mV, ce qui conduit à une faible intensité des spectres par comparaison avec ceux présentés par Ren *et al.* (2007) obtenus avec un laser de 183 mV.

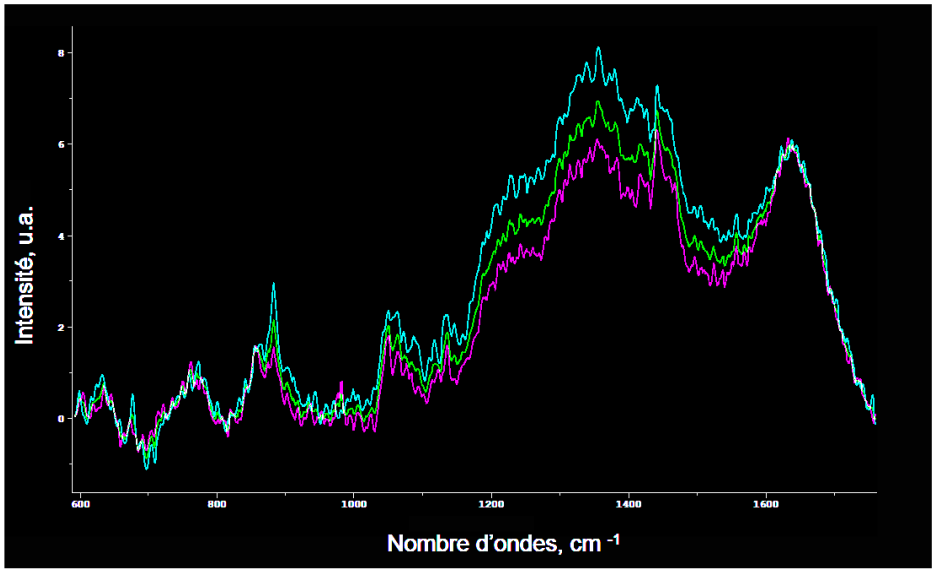


Figure 60 Spectres Raman d'un surnageant d'une culture en milieu de référence prélevé à 27 h de culture. Les spectres rose et bleu correspondent à deux mesures différentes, le spectre vert étant le spectre moyen.

Les spectres acquis sur des échantillons de culture prélevés après 5, 22, 74 et 89 h de culture, sont comparés dans la figure 61. Certains pics peuvent être associés à certains composés, comme le glucose, le lactate ou la glutamine, à partir des données de la littérature (Tableau 22 : Lee *et al.*, 2004). Une augmentation générale de l'intensité des pics du spectre peut être observée en même temps que la durée de la culture.

Cependant, la simple observation du spectre brut ne permet pas de détecter précisément les zones spectrales reflétant l'évolution réelle des substrats et des métabolites. En effet, certaines évolutions d'intensité des pics identifiés ne semblent pas cohérentes avec celles des concentrations mesurées dans le surnageant, comme le pic du glucose à 882 cm^{-1} qui augmente au lieu de diminuer. Il est très probable que plusieurs composés interfèrent à même longueur d'onde, ce qui rend très aléatoire une analyse directe des spectres.

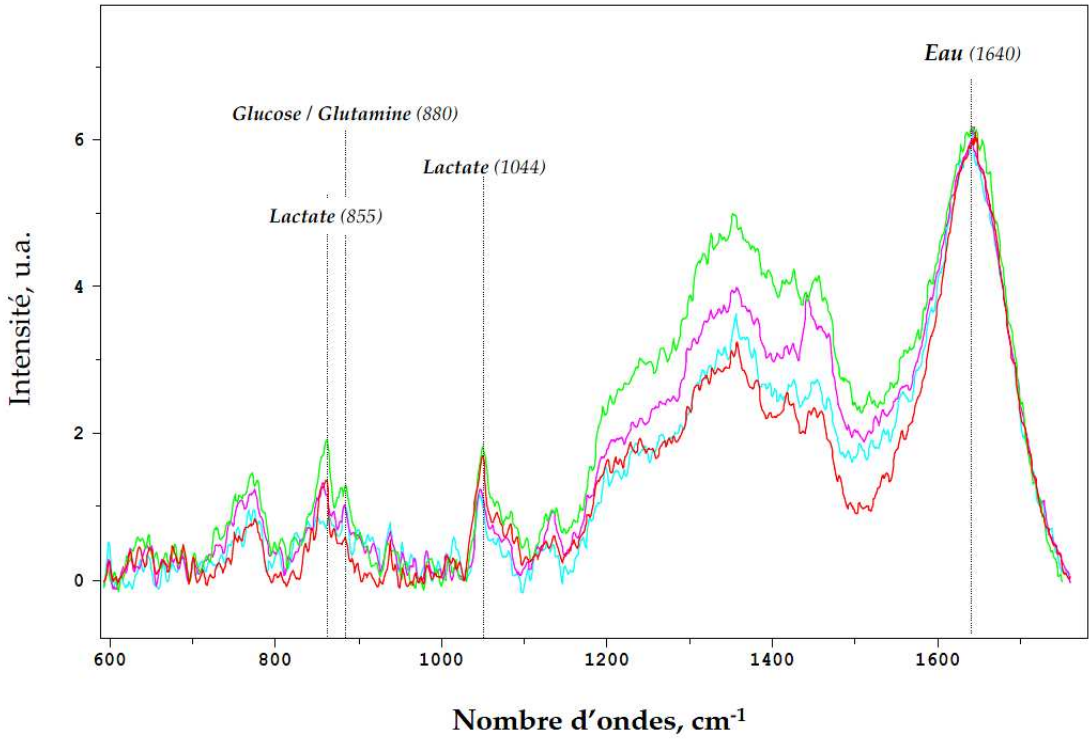


Figure 61 Spectres Raman de surnageants d'une culture de référence respectivement, à 5 h (bleu), 22 h (rose), 74 h (rouge) et 89 h (vert) de culture.

Tableau 22 Nombre d'ondes en cm^{-1} correspondant aux pics observés en spectroscopie Raman pour l'eau, le glucose, le lactate et la glutamine (Lee *et al.*, 2004).

Eau	991 ; 1080 ; 1640
Glucose	880 ; 1072 ; 1128 ; 1267 ; 1334 ; 1370 ; 1464
Lactate	855 ; 930 ; 1044 ; 1420 ; 1457
Glutamine	884 ; 989 ; 1310 ; 1423

C'est pourquoi, ces essais préliminaires devront être prolongés par une exploitation des spectres Raman à l'aide de techniques d'analyse multivariées afin de déterminer plus aisément les zones spectrales représentatives de certains composés du milieu de culture. De plus, l'influence croisée des solutés présents dans les surnageants de culture devra être prise en compte.

Ces résultats préliminaires d'analyse de cultures de cellules Vero par spectroscopie Raman nécessitent d'être complétés avant de conclure sur l'intérêt de cet outil pour le contrôle ou le suivi de culture de cellules animales. Pour la quantification de composés par analyse des surnageants de culture, un traitement des spectres par analyse multivariée est nécessaire. Pour l'analyse des cellules, l'impact de l'état physiologique, de la concentration des cellules, et des microporteurs, doit être approfondi.

3.3. Analyse en-ligne de métabolites du milieu de culture par spectroscopie proche-Infrarouge

3.3.1. Introduction

La spectroscopie proche infrarouge présente des avantages pour le suivi en-ligne de certains paramètres de la culture de cellules animales, dans le cadre du développement d'une stratégie PAT. En effet, un grand nombre de molécules peuvent être détectées simultanément en solution aqueuse, avec une haute fréquence et une grande rapidité d'acquisition des spectres. De plus, cette méthode, qui ne nécessite aucun réactif chimique ni l'utilisation de matériels à usage unique, présente des coûts limités de mise en œuvre et génère peu de déchets.

Dans le domaine des bioprocédés, la spectroscopie proche infrarouge a essentiellement été utilisée pour des procédés microbiens. Cependant, bien que les procédés de culture de cellules animales soient plus compatibles avec cette technologie, ces dernières années, sa mise en œuvre concerne très peu d'articles et est généralement appliqué de façon hors-ligne à des cultures de cellules en suspension. La plupart sont focalisés sur l'analyse des principaux solutés du milieu de culture, comme le glucose, le lactate, la glutamine ou les ions ammonium (McShane *et al.,* 1998; Riley *et al.,* 1999; Rhiel *et al.,* 2002a). Les méthodes d'analyses multi-variées et de calibration sont plus spécifiquement étudiées. Seules deux publications se sont intéressées à la mise en œuvre en

ligne de cette technique pour la cultures de cellules CHO, aucune ne rapportant le cas particulier de cellules adhérentes-dépendantes (Arnold 2003; Roychoudhury *et al.*, 2007).

C'est pourquoi, nous proposons dans cette partie, d'évaluer le potentiel de la spectroscopie proche-infrarouge pour l'analyse *in-situ* de cultures de cellules Vero sur microporteurs, en focalisant nos études sur la quantification du glucose et du lactate, métabolites présentant les plus fortes variations de concentration dans notre milieu de culture. Il s'agit en effet des solutés les plus aisément quantifiables de part leurs concentrations élevées dans les surnageants de culture (gamme de 0 à 25 mM généralement). Une première étape de calibration hors-ligne de la méthode NIR est proposée à partir d'échantillons de cultures réalisées en spinner et de leur analyse en parallèle par les techniques classiques. Dans une seconde étape, la mise en œuvre de l'analyse est étudiée grâce à une sonde stérilisable implantée *in-situ* sur des bioréacteurs. Une attention particulière est apportée à l'influence de la présence de microporteurs ainsi qu'à celle de conditions opératoires proches de celles du procédé industriel. Ces travaux sont présentés sous la forme d'un manuscrit soumis pour publication au journal *Process Biochemistry*.

3.3.2. Approche PAT avec le suivi en-ligne d'un procédé de culture de cellules animales par spectroscopie proche infrarouge

PAT for adherent animal cell processes using *in-situ* near infrared spectroscopy

Emma Petiot[1], Thierry Magadoux[2], Cécile Gény[2], Hervé Pinton[2], Annie Marc[1]

1 - Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, UPR CNRS 6811, Nancy-Université,

2 avenue de la Forêt de Haye, F - 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

2 - Sanofi pasteur, 1541 avenue Marcel Mérieux, F - 69280 Marcy L'Etoile, France

Abstract

Near infrared spectroscopy (NIRS) was used as a new and reliable PAT tool to further improve the understanding of adherent cell culture, and to control feeding strategies or troubleshooting during industrial processes. Indeed, *in-situ* NIRS quantification of medium components was applied, for the first time, to culture processes with cells attached on microcarriers. The potentiality of NIRS was first investigated with Vero cells cultivated in a serum-free medium using calibration based on off-line analyses. Then, *in-situ* NIRS calibration was performed by using a sterilizable probe inside the bioreactor in order to take into account the presence of microcarriers in the sensing space. Thereafter, a reliable and accurate NIRS quantification technique was developed for glucose and lactate, with a maximal standard error of calibration of 0.32 $g.l^{-1}$ and 0.27 $g.l^{-1}$ respectively. The robustness of the method was evaluated by NIRS calibration in different operating culture conditions close to industrial processes, such as microcarrier concentration, cell seeding state variations induced by scale-up, or, brutal analyte concentration increase due to feed-harvest strategies. Based on the calibration procedure including these various operating conditions, the concentrations of unknown samples were predicted with an accuracy of 0.47 $g.l^{-1}$ for glucose and 0.32 $g.l^{-1}$ for lactate.

Introduction

Since several years, the Process Analytical Technology (PAT) approach was largely encouraged by regulation agencies for pharmaceutical industry, and, more recently, for biotechnological therapeutic production using animal cells. Indeed, large-scale mammalian cell culture processes using serum-free culture media are extensively used for biological productions such as monoclonal antibodies, proteins or vaccines [1]. According to the FDA (Food and Drug Administration) guidance in 2004 (www.fda.gov/cder/ops/PAT.htm), the main purpose of the PAT initiative is to improve the *in-situ* process monitoring in order to allow a better design, analysis and control of biological manufacturing through timely measurements. These new PAT developments are expected to facilitate the process understanding, improve its efficiency, optimize the culture, develop risk-mitigation strategies, and ensure the final product quality [2].

To reach these PAT goals, it is necessary to have appropriate tools for *in-situ* monitoring of the time course of process key parameters [3]. Today, only pH, temperature, pO_2 and cell density values can be monitored using *in-situ* probes implemented inside bioreactors [4, 5]. To increase knowledges on cell metabolism and physiology, soluble components of culture supernatants, such as nutrients, products or metabolism by-products, remain generally off-line quantified in filtrated samples by the use of various methods such as enzymatic analysis or liquid chromatography [6, 7]. However, these procedures may induce contamination risks and are often expensive and time-consuming. Most of the time, the *in-situ* available tools, i.e. automated metabolite analysers, are dependent on sterile automated sampling also potentially restricted by clogging or settling problems. Therefore, the need of new PAT equipment for on-line measurement of medium component levels is still topical. Some process analytical devices, such as sophisticated *in-situ* spectroscopic techniques, could appear as an alternative to this lack of *in-situ* PAT tools.

NIR spectroscopy (NIRS) which is an absorption spectroscopy based on the radiation interactions with molecular bounds, provides spectrum representative of the "signature" of all components present in the analyzed solution. This technique displays numerous advantages in comparison to classical analytical methods. Firstly, a large number of molecules can be rapidly detected simultaneously inside an aqueous sample with a high frequency of spectra acquisition. Secondly, this method does not need neither chemical reagents nor disposable materials, resulting in reduced cost, maintenance and wastes. Lastly, NIRS have been recently implemented *in-situ* in the bioreactors through sterilizable probe. As a result, the contamination risks are reduced because no sampling is necessary.

In the field of biological processes, NIRS was mainly used for bacterial culture processes [8-12] in the last decade, but also for large-scale cultures of microalgae [13] and mycelium biomass monitoring [14]. In the case of mammalian cell culture processes, NIRS application remains difficult to achieve mainly because culture media are often very complex, performed either with suspension or adherent cells, and concentration of soluble components are usually lower compared to microorganism culture media. However, with low gaz phases resulting from low aerations and agitations, and non-viscous culture media, mammalian cell cultures could take advantages from NIRS analyte quantification [10]. Until now, few reports described the analysis of soluble components in animal cell culture supernatants by using the NIRS tool. Most of them are centred on the analysis of soluble molecules such as glucose, lactate, glutamine and ammonium ions [15, 16] which are related to the energetic metabolism of cells, and only few described amino acid or protein analysis using such a method [17, 18].

When using spectroscopy methods, particular care must be taken of the calibration procedure which requires appropriate multivariate chemometric analyses. Different calibration procedures were proposed in literature in the case of animal cell processes. The most frequent strategy consist in the formulation of standard mixtures close to basic medium composition, supplemented with known analyte concentrations in order to generate specific NIRS calibration for each analyte [18-21]. In another approach, the calibration model is based on samples from cell bioreactor cultures in order to take into account the changes in supernatant composition during a whole culture process [16]. A third calibration method is based on the analysis of cell culture samples spiked with random analyte concentrations. In this case, it is possible to evaluate the effects of both supernatant changes during the process and of each individual component on NIRS quantification [15, 22]. It is important to highlight that most of these calibrations were based on off-line acquisitions of NIR spectra in quartz cuvettes. Furthermore, all these previous studies were performed with CHO and insect cells only cultivated in suspension mode, whereas similar work dealing with adherent cells was never reported. But, it can be assumed that off-line calibration procedures previously described for suspension cells could not be suitable to integrate the microcarrier effect on NIR spectra acquisition, and thus on calibration model. Additionnaly, previous works never took into account the influence of industrial process scale-up conditions, such as cell trypsinization steps, variation of microcarrier concentration or medium feed-harvest, often encountered in large-scale processes of adherent cell culture. Up to now, only two studies dealt with *in-situ* NIRS evaluation during animal cell processes.

A first study focused on the impact of standard number introduced in the calibration procedure for CHO cell cultures [16]. The second study reported by Roydchoury et *al.* (2007) dealt with the NIRS equipement variability on the calibration model during CHO cell cultures, by using 6 multiplexed *in-situ* NIRS systems [21].

In the present work, we proposed to evaluate the NIRS capabilities as an *in-situ* PAT tool to monitor bioreactor culture processes performed with Vero cells cultivated on microcarriers. Such Vero cells, derived from african green monkey kidney, are considered as essential for the manufacture of various human and veterinary vaccines [23-25]. In existing processes, culture of Vero cells on microcarriers are carried out in large-scale bioreactors up to six thousand litres. Despite the important insight on the Vero cell mass culture, the on-line control as well as a better understanding of the cell behaviour in new culture media remain a challenge for actual industrial processes or for the ones still under development [26]. In this study, we focused on the NIRS quantification of glucose and lactate which represent two important molecules of the Vero cell metabolism. A first calibration step was carried out with supernatants from spinner flask cultures, with or without microcarriers. Then, an innovative calibration procedure, specific to adherent cells cultivated on microcarriers in bioreactors, was developed with *in-situ* NIRS measurements through a fibre optic probe. This procedure integrated some of industrial operating conditions used for adherent cell culture processes, such as different feeding strategies, cell trypsinization, microcarrier and analyte concentrations. Based on calibration models, the capacity of *in-situ* NIRS measurements to predict the time course of glucose and lactate concentrations was assessed all over a bioreactor culture.

Materials and Methods

Cell culture

Cell line and culture medium

The Vero cell line used in this study was isolated from African green monkey kidney. The industrial cell line was provided by Sanofi Pasteur (Marcy L'Etoile, France) and was adapted in a home-made serum-free culture medium. All cultures were performed in this reference medium, except when precised in the result part.

Culture systems

For off-line NIRS analyses, Vero cells were first expanded in static 175 cm^2 culture T-flasks (Fisher Bioblock Scientific, France) seeded with 3.15×10^5 $cell.ml^{-1}$. Then 2.75×10^5 $cell.ml^{-1}$ were seeded in spinner flasks (250 mL working volume, 45 rpm) with Cytodex 1 microcarriers (GE Healthcare Bioscience-AB, Sweden). For *in-situ* studies, cultures were performed with two concentrations of Cytodex 1 microcarriers in a 2 liter bioreactor (Pierre Guérin, France) controlled at pH 7.2, 37°C and with agitation rate of 90 rpm. Oxygen concentration was set at 25% of air saturation. Seeding cells for bioreactor cultures (2.75×10^5 $cell.ml^{-1}$) were previously expanded either from static culture in 1720 cm^2 Hyperflasks® (Corning incorporated, USA) seeded with 3.15×10^5 $cell.ml^{-1}$, from 500 ml spinner flasks or from a bioreactor culture. Cultures in T-flasks, Hyperflasks® or spinner flasks were performed in an incubator at 37°C and 5% CO_2.

Reference analyses

Cell counting

For the numeration of viable cells attached on microcarriers, samples were washed twice with PBS after microcarrier settling and then treated with Crystal Violet (Sigma, France) for at least 1 h at 37°C prior numeration of the released nucleus. Numeration were performed on Fush-Rosenthal hemacytometer (Preciss, France) with 15% accuracy.

Glucose and lactate assays

For reference data, the concentrations of glucose and lactate in filtered cell culture supernatants were quantified by using the Vitalab selectra E enzymatic analyser (Vital Scientific, The Netherlands). All analyses were carried out in triplicate.

Near infrared spectroscopy analyses

NIR spectra acquisition

Spectra acquisition was performed with the Antaris II spectrophotometer (Thermofisher Scientific, France) for both off-line and *in-situ* analyses. Spectra were collected in triplicate with a 8 cm^{-1} optical resolution, each spectra representing 128 co-added scans with air spectrum as the reference. The spectral range used was from 4 000 to 10 000 cm^{-1}. Off-line NIRS analyses were realized in quartz cuvettes of 2 mm optical path from filtered supernatants of spinner flask cultures. *In-situ* measurements in bioreactor cultures were performed by using a transflectance fibre optic probe with variable optical path. The maximal pathlenght of the probe was 20 mm, and NIRS radiations reflected by a mirror covered twice the fixed optical path (Figure 1). For this study, the pathlenght was fixed at 1 mm leading to an effective optical path of 2 mm. The probe was directly connected to the bioreactor by using classical 12 mm diameter port and was steam sterilized prior the cell seeding. For each acquired NIR spectrum, reference analyses were done in supernatant sampled at the same culture time.

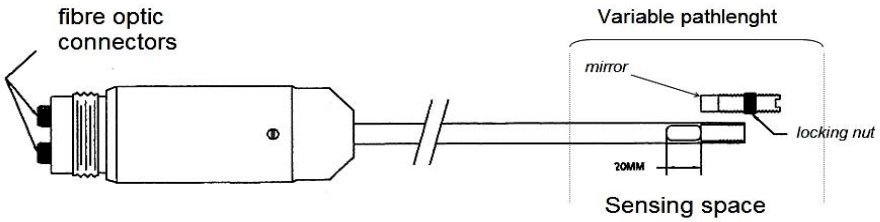


Figure 1 Sterilizable transflectance NIR probe with a variable pathlenght.

Development of NIRS calibration models

Spectra processing was performed on the spectral range from 5 400 to 9 000 cm^{-1} with the TQ Analyst software (Thermofisher Scientific, France) allowing to perform both principal component analysis (PCA) and partial least square (PLS) regression [3]. Distinct NIRS calibration models were established for glucose and lactate, by using spectral range and a number of PLS factors specific and optimal for each analyte. The first derivative of the spectra was used for lactate to deconvolute the overlapping peaks of raw spectra and to resolve any baseline drift. No mathematic treatment was needed for glucose, except for the baseline spectra correction. Two data processing steps were performed to establish the calibration models. For the first calibration step, the data set was composed of all samples, while for the cross-validation step, all samples were used as standards, except for two samples randomly chosen by the data treatment software. This second process was repeated to determine the standard error average of all the cross-validation correlation. The quality of the final calibration models were then evaluated with several parameters : the two correlation coefficients (r^2) between concentrations from NIRS analyses and concentrations measured with enzymatic assays, calculated for both calibration and cross-validation data processing, the standard error of calibration between these values (SEC), and the standard error of cross-validation (SECV).

Prediction quality of glucose and lactate concentration from NIRS analyses

Glucose and lactate concentrations were also directly evaluated from a set of samples which were not previously used in the calibration procedure. Standard errors measured for these samples correspond to the quantification errors of unknown samples. In this case, the prediction quality of NIRS analyses was quantified by the standard error of prediction (SEP).

Results and Discussion

Off-line NIRS analyses of Vero cell culture supernatants

Off-line analysis of filtered culture supernatants

The analyte concentrations in animal cell culture processes are generally lower than in bacterial fermentations. As an example, in Vero cell culture, the usual maximal concentrations were of 4 $g.l^{-1}$ and 2.2 $g.l^{-1}$ for glucose and lactate respectively. Considering these relative low values, the capability of NIR spectroscopy to monitor glucose and lactate concentrations was evaluated in supernatants of Vero cell cultures performed in spinner flasks and in serum-free medium. To take into account the variation with time of the medium composition, samples were harvested every 10-14 hours all over the batch cultures allowing to scan a large range of glucose and lactate concentrations [19]. Furthermore, cultures were performed with various initial compositions of the culture medium; two cultures were carried out with the reference medium (16 samples), one culture was performed using the reference medium half diluted with PBS buffer (9 samples), and one culture with the reference medium, but containing 1$g.l^{-1}$ glucose instead of 4 $g.l^{-1}$ (8 samples). Samples were filtered with a membrane (2 µm cut off) to eliminate microcarriers and cellular debris. Spectra of filtered supernatants were acquired in triplicate in 2 mm optical path quartz cuvettes, while glucose and lactate concentrations were quantified with enzymatic methods.

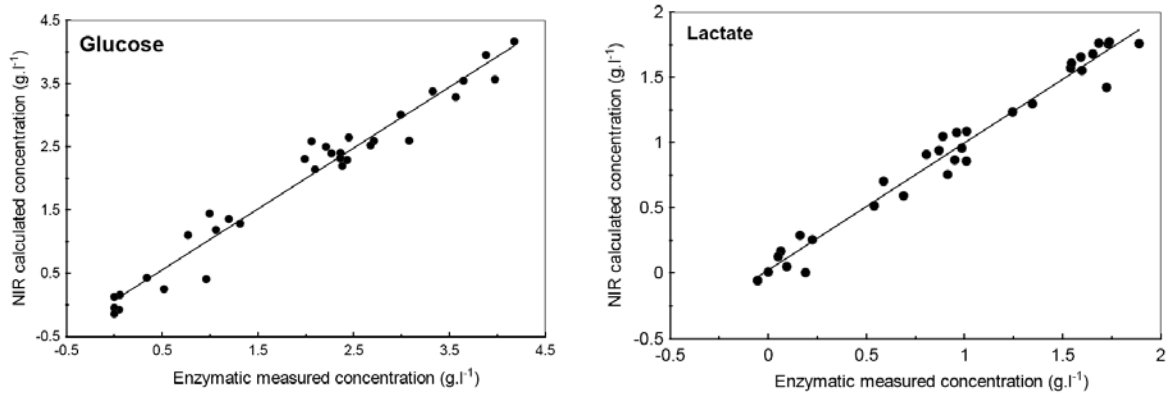


Figure 2 Correlations between glucose and lactate concentrations measured with off-line NIRS in quartz cuvettes and with reference enzymatic methods.

Correlations obtained between concentrations from enzymatic measurements and NIRS determinations acquired from 33 samples are presented in Figure 2.

For both glucose and lactate, a good linear correlation was obtained with high correlation coefficients either for calibration and cross-validation as shown in Table 1 (respectively 0.98 and 0.97 for glucose, and, 0.99 and 0.96 for lactate). Additionally, standard errors of calibration (SEC) and cross-validation (SECV) represented less than 7.5 % of the maximal analyte concentrations in the culture medium (0.29 $g.l^{-1}$ and 0.16 $g.l^{-1}$ respectively for glucose and lactate SECV). Interestingly, correlation coefficients obtained with Vero cell cultures were comparable to those calculated with prostate cancer (PC-3) cell cultures [22]. Furthermore, since a large range of analyte concentrations occur all over the cultures, our calibration models could be considered as representative of real culture conditions in batch culture. The number of PLS factors involved in the calibration model (4 and 6 respectively for glucose and lactate) were also in the same range, in agreement with values reported in studies in which spectra were acquired in free-cell samples or in synthetic solutions (4 to 8 for Riley *et al.,* (1997) and 3 to 10 for Rhiel *et al.* (2002)) [15, 27]. In addition, the PLS number is considered as an additional indicator of the calibration model quality. Indeed, a too high value is over fitting of the model data, contrary to a low value that indicates an inadequate modeling [3, 16, 17]. The SEC values obtained in this work for glucose and lactate were twice higher than those obtained with suspension cultures of PC-3 cells [27]. This is probably due to the fact that the number of samples used for our calibration was twice lower (33 instead of 66 samples for PC-3 cells). Indeed, Arnold et al. (2003) reported a reduction of the SEC value with the increase of the sample number involved in the calibration processing. Our results also pointed out the NIRS calibration for glucose and lactate quantification was suitable even with a different medium composition as used for the spinner flask cultures.

Table 1 Calibration results for off-line glucose and lactate quantification in 33 filtered culture samples. NIR spectra were acquired in quartz cuvettes between 5430 and 6400 cm^{-1}. Error percentages for SEC and SECV was based on the maximal concentrations in the culture medium.

	PLS Factors	Calibration			Cross-Validation		
		r^2	SEC ($g.l^{-1}$)	SEC (%)	r^2	SECV ($g.l^{-1}$)	SECV (%)
Glucose	4	0.98	0.24	6.0	0.97	0.29	7.3
Lactate	6	0.99	0.10	4.5	0.96	0.16	7.3

Off-line analysis of samples containing microcarriers

In stirred cell cultures performed with adherent cells, the presence of microcarriers in the NIRS probe sensing space could modify the real optical pathlenght and so interfere with the spectra quality and intensity. To evaluate this effect, microcarriers were added to culture supernatants before the NIR spectra acquisition in quartz cuvettes.

These microcarriers were proceed in samples taken from spinner flask cultures and displayed cells attached on their surface. Comparison of spectra recorded with or without microcarrier addition demonstrated similar profiles (data not shown). A small gap was observed between the two spectra and corresponded to the variation of the optical pathlenght. Nevertheless, for off-line analyses, spectra were acquired with samples in static cuvettes, and the settled beads could induced a higher microcarrier concentration in the NIRS sensing space than the one in agitated cultures. On the contrary, for *in-situ* analyses in stirred culture systems as bioreactors, microcarriers are maintained in suspension by the agitation rate, resulting in a relative homogeneity of their concentration. To better take into account the absorbance intensity variation due to microcarriers in the sensing space, further calibrations were then performed directly in the bioreactor vessel, by using an *in-situ* NIRS probe.

In-situ NIRS monitoring of Vero cell cultures in bioreactor

In-situ NIRS calibration in bioreactor with Vero cells cultivated on microcarriers

In previous experiments, only small-scale batch cultures were carried out for the off-line NIRS calibration procedure. Indeed, this operating mode displayed progressive variations of analyte concentrations, with no brutal magnitude, and a constant microcarrier concentration. Nevertheless, to develop the *in-situ* calibration models with culture conditions closer to high scale processes, additionnal aspects had to be addressed. First, industrial processes often use various feeding strategies, such as punctual medium feed-harvest with microcarrier settling, or fed-batch mode. As a consequence, the settled microcarriers are resuspended by the fresh medium addition and the analyte concentrations could change dramatically in a few minutes. In the specific case of adherent cell culture, the process scale-up implies to detach the cells from microcarriers by trypsinization. This step could result in a variability of the physiological state of seeded cells, depending of the trypsinization performances or the cell propagation protocols, as well as in an accumulation of used microcarriers which could significantly modify the total microcarrier concentration in the culture medium.

To cope with these variability sources, *in-situ* NIRS calibrations of metabolite quantifications were performed all over bioreactor cultures with Vero cells attached on microcarriers, using various microcarrier concentration, cell propagation protocol or medium feed-harvest. A first batch reactor was seeded with cells trypsinized from a static Hyperflask® culture.

After 3 days of culture, 80 % of the used medium was replaced by a fresh medium and the culture was still prolonged during 2 additional days. A second batch culture was seeded with cells trypsinized at the end of the previous culture and was run during 4 days without medium feed-harvest. Due to the used microcarriers added at the same time than the seeded cells in the second batch, this culture was performed with a microcarrier concentration 1.7 time higher than in the first one. Culture supernatants were sampled all over the process while medium NIR spectra were *in-situ* acquired at the same time. Kinetic results of cell growth, glucose consumption and lactate production are presented in figure 3. During the batch 1, the cell concentration increased until 4.5×10^5 cell.ml^{-1} after 3 days of culture. In the same time, the glucose was consumed and the lactate accumulated. After medium replacement, the cell growth continued and reached a maximal cell density of 9.6×10^5 cell.ml^{-1} at the end. The cell behaviour in batch 2 was quite similar at the beginning of the culture, but the maximal cell density stabilized at about 6.2×10^5 cell.ml^{-1}. After cell density stabilization, glucose consumption continued until to be exhausted, leading to uncorrelated glucose and lactate concentrations during the last phase of this culture.

In order to evaluate the influence of the process operating conditions on the calibration quality, distinct calibrations were performed for each culture. Calibration parameters are given in table 2. Compared to preliminary off-line experiments, similar linear calibrations were obtained between enzymatic and *in-situ* NIRS measurements of glucose and lactate concentrations with correlation coefficients of calibration and cross-validation higher than 0.95 and 0.85 respectively. Results were even better for glucose since a maximal SEC value of 0.14 g.l^{-1}, against 0.24 g.l^{-1} after off-line calibration, was obtained. The calibration with data of the first batch allowed to reach SEC and SECV values about two times lower than those observed with the second batch, even if they remained in the same magnitude. This could result from the higher sample number taken in the batch 1 [16], or from the different microcarrier concentrations. Besides, the parameter values of our calibrations performed with adherent Vero cell cultures were quite comparable to those reported by Arnold *et al.* (2003) in the case of cultures with single suspension CHO cells. Our numbers of PLS factors were observed to be higher for *in-situ* (6 to 10) than for off-line (4 to 6) calibrations.

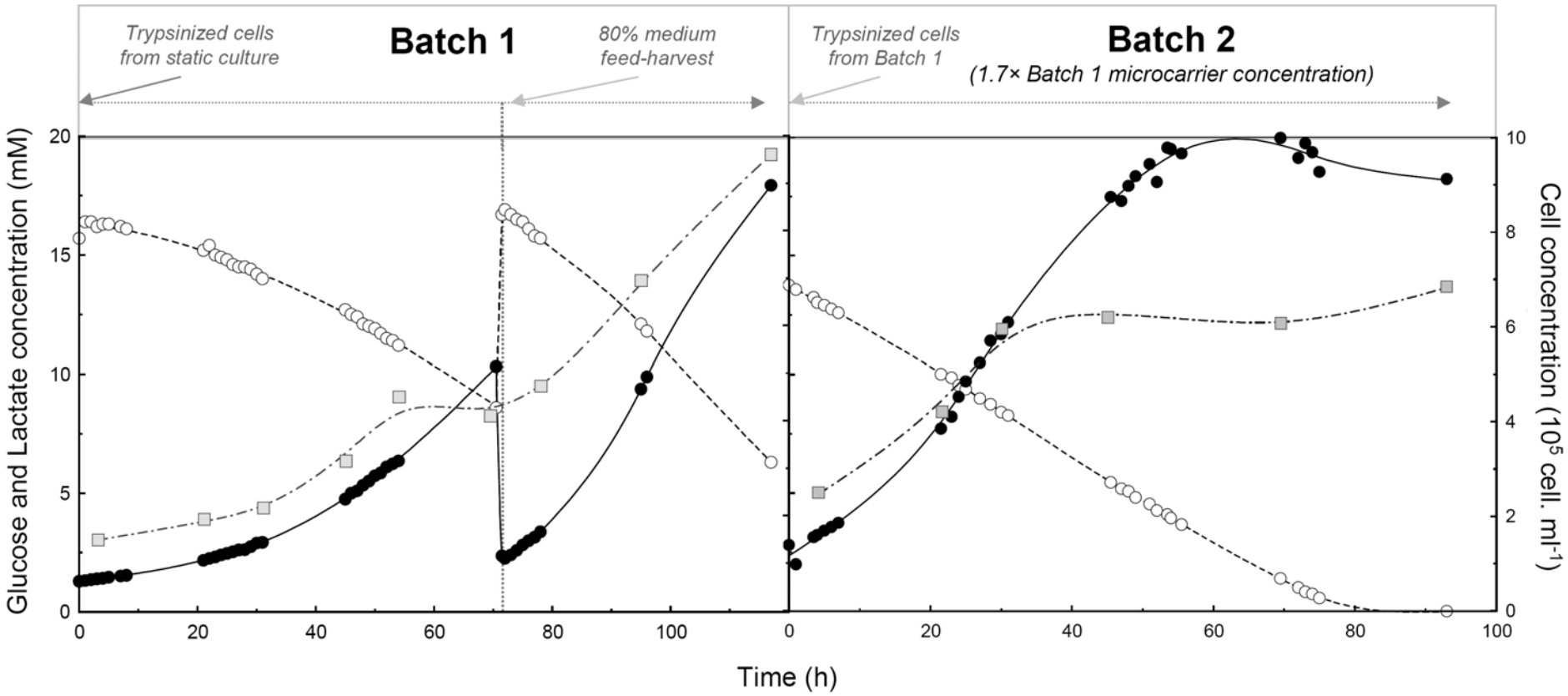


Figure 3 Kinetics of cell growth (■), glucose consumption (○) and lactate production (●) all over two successive batch cultures of Vero cells in bioreactor. Batch 1 : cells from static culture. Batch 2 : cells trypsinized from Batch 1 microcarriers. Glucose and lactate concentrations were obtained by enzymatic assays.

Table 2 *In-situ* calibration results for glucose and lactate quantification all over Batch 1 (41 standards) and Batch 2 (29 standards) cultures. NIR spectra were acquired through a transflectance probe immerged in the bioreactor.

		Spectral range (cm^{-1})	PLS Factors	Calibration			Cross-Validation		
				r^2	*SEC* ($g.l^{-1}$)	*SEC (%)*	r^2	*SECV* ($g.l^{-1}$)	*SECV (%)*
Batch 1	Glucose	4308-4784 5418-6513	9	0.99	0.07	1.8	0.88	0.22	5.5
	Lactate	4346-4755 5349-6452 7504-8775	6	0.96	0.09	4.1	0.91	0.13	5.9
Batch 2	Glucose	4308-4784 5418-6513	10	0.98	0.14	3.5	0.86	0.42	10.5
	Lactate	4346-4755 5349-6452 7504-8775	6	0.97	0.15	6.8	0.93	0.22	10.0

These differences could result from the presence of cells and microcarriers in the optical path when spectra were *in-situ* acquired. Indeed, cells and microcarrier components could react with NIR radiation and interfere with the detection of the soluble molecules. Similar number of PLS factors, between 8 and 10, were also obtained by Arnold *et al.* (2003) for NIRS *in-situ* monitoring of a fed-batch culture of suspension CHO cells. In their process, the increase of the suspension cell density during the culture could highly influence the NIR spectra while the insoluble phase was composed by cells only. This effect is expected to be less pronounced with microcarrier cultures where the change of the solid phase proportion from the beginning to the end of culture is negligible. Then, our results demonstrated a good quality of *in-situ* NIRS calibration for glucose and lactate determination whatever the operating conditions of bioreactor cultures, close to industrial adherent cell process. Furthermore, the calibration quality could be step by step improved by all NIRS monitoring results from future cultures.

In-situ NIRS calibration with uncorrelated concentrations of glucose and lactate

In mammalian cell culture, glucose consumption is generally coupled to lactate production since an important part of glucose is converted into this metabolite via the glycolysis. A high degree of collinearity between lactate and glucose concentrations in the culture supernatant can then occur, as shown in previous batch cultures (Figure 4). It could be highly mistaken to assume that PCA analysis can separately quantify the glucose and lactate concentrations, while NIRS calibrations are based on the detection of changes in the spectra. To solve this question, several studies reported off-line NIRS calibrations with mixtures containing uncorrelated concentrations of the studied analytes.

The mixtures were generally formulated by Design of Experiments in which analytes were dissolved directly in water [21], in buffer close to medium composition [20], or in filtrated culture supernatants [15, 19, 22]. Nevertheless, these methods could not be applied directly to cultures performed with cells attached on microcarriers. Indeed, as previously explained, the NIRS calibration required *in-situ* measurements to assure microcarrier homogeneity by medium agitation rate.

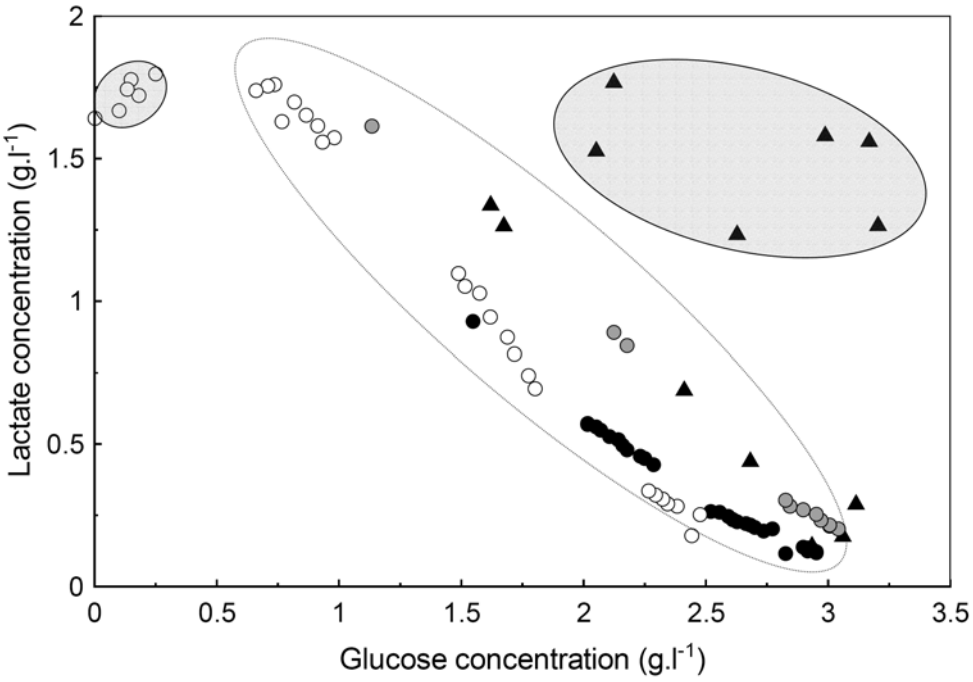


Figure 4 Glucose and lactate concentrations measured by enzymatic methods in bioreactor cultures ; batch 1 (○), batch 2 before (●) and after (●) medium exchange, batch 3 (▲). Linearly correlated concentrations are circled in white whereas uncorrelated data are circled in grey.

Therefore, it was necessary to artificially create uncorrelated analyte concentrations inside the bioreactor to validate the NIRS calibration for glucose and lactate quantification in the case of adherent Vero cell culture process. A third batch culture was then performed with punctual and separate additions of known amount of glucose and lactate after the medium feed-harvest at the second day of culture and was seeded with cells trypsinized from a spinner flask culture. The figure 4 reports the concentrations of lactate and glucose assayed enzymatically in the three bioreactor cultures. The white zone clearly indicates the strong linear correlation between the two analytes, observed in routinely cultures. On the contrary, the grey zones point out uncorrelated data generated, either at the end of the second batch, or by punctual analyte additions in the third batch.

The *in-situ* NIRS spectra acquired for these uncorrelated points could then be integrated in a global calibration which will avoid any artefact due to metabolic correlations. The calibration model obtained with this global calibration procedure was very satisfying as shown in table 3. The values of calibration correlation coefficients were still higher than 0.90 for both glucose and lactate. Even if these values were slightly lower in comparison to previous calibration without uncoupled concentrations (Table 2), they remained in the range reported in other studies performed with *in-situ* probes but for suspension cell cultures [21]. The SEC and SECV values weakly increased in comparison to results obtained for batch 1 and 2, but they never exceeded 15 % of the maximal concentration range. Based on these results, and considering that the quality of the global calibration could still be improved by cumulating further data, NIRS could be considered as an interesting tool to *in-situ* monitor Vero adherent cell process as well as already demonstrated for suspension cell processes.

Table 3 Global calibration results of i*n-situ* glucose and lactate NIRS quantification from bioreactor cultures with Vero cells on microcarriers (82 standards).

	Spectral range (cm^{-1})	Calibration			Cross-Validation		
		r^2	SEC ($g.l^{-1}$)	SEC (%)	r^2	SECV ($g.l^{-1}$)	SECV (%)
Glucose	4308-4784 5418-6513	0.93	0.32	8.0	0.85	0.47	11.8
Lactate	4346-4755 5349-6452 7504-8775	0.90	0.27	12.3	0.84	0.33	15.0

Prediction of analyte concentrations by using in-situ NIRS monitoring of Vero cell process

The last step to validate the NIRS method for adherent cell cultures was to evaluate its prediction accuracy for glucose and lactate quantification all over the cultures. Culture samples randomly chosen among three batch cultures performed with various operating conditions, and, which were not previously introduced in the calibration procedure were analysed. The glucose and lactate concentrations in these samples were quantified directly from the NIR spectra by using the global calibration previoulsy established. The prediction accuracy of the estimated values was then evaluated on the basis of the Standard Error of Prediction (SEP) for each analyte and by comparison to the reference data. Despite the important variations of the culture conditions, such as medium feed-harvest, microcarrier concentration or punctual addition of glucose and lactate for concentration decorrelation, the obtained SEP values were quite satisfactory.

Indeed, they were of 0.47 and 0.32 $g.l^{-1}$ for glucose and lactate respectively, while SEC values calculated during the calibration procedure were 0.32 and 0.27$g.l^{-1}$. In the figure 5, kinetics of glucose and lactate concentrations were quantified in the case of a batch culture of Vero cells attached on microcarriers, and calibration data from *in-situ* NIRS spectroscopy were reported in comparison to enzymatic analyses. The time course of both analytes was correctly monitored for the whole range of concentration considered (from 0.1 to 2.7 $g.l^{-1}$). While no study already presented *in-situ* data acquisition for concentration below 0.3 $g.l^{-1}$ and 1 $g.l^{-1}$ for glucose and lactate respectively, this work demonstrated that NIRS can be used to evaluate low glucose concentration in feed-batch cultures [16, 21, 28]. These results were particularly interesting because, not only they are useful to monitor conventional Vero cell culture processes but also because the *in-situ* NIRS tool could be dedicated to the control of unusual concentrations and to the development of risk-mitigation strategies in the specific case of adherent cell cultures.

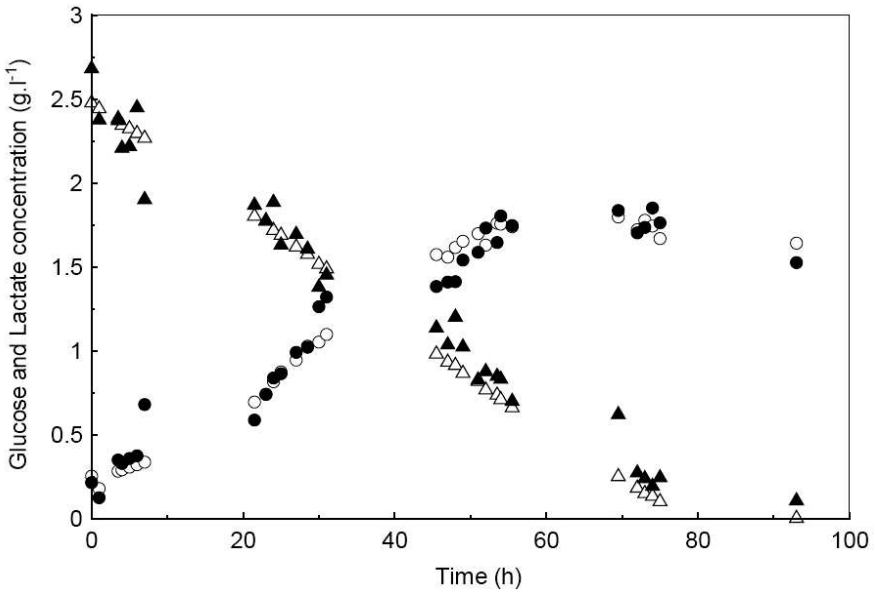


Figure 5 Time course of glucose (triangles) and lactate (circles) concentrations all over a batch culture in bioreactor. Concentrations were measured off-line by enzymatic assays (○, Δ) or obtained from *in-situ* NIR spectroscopy measurements (●, ▲).

Conclusion

Our results demonstrated, for the first time, a new PAT technique using NIRS fibre optic probe, to *in-situ* monitor the concentration of key analytes, such as glucose and lactate, during bioreactor culture processes performed with Vero cells attached on microcarriers.

This tool was able to *in-situ* predict the analyte concentrations with a good accuracy in the concentration ranges routinely observed in culture supernatant. It was also found reliable in various operating conditions and useful for industrial scale-up. As a consequence, NIRS *in-situ* measurements of glucose and lactate concentrations could be implemented as a new PAT tool during adherent cell culture processes. Other operating and cost advantages of *in-situ* NIRS can be pointed out such as rapid analysis for real-time industrial process control, the absence of chemical wastes, no requirement of disposable materials, and the low maintenance. Further potential developments of this multivariate analysis tool can also be considered, as, for example, the monitoring of the cell viability by measuring some specific intracellular factors released in the culture medium, the pH measurement, other medium component concentrations or the product itself. NIRS technique development would give important additional informations on the animal cell culture process, and could contribute to the PAT initiative requirements. Therefore, NIRS could become an essential PAT tool for controlling the animal cell culture processes to predict the product level before purification, to analyze trouble shootings, or to set up some continuous feeding strategies.

Acknowledgements

The authors are really grateful to Patrick Bernard-Moulin from Thermofisher Scientific, for the help he provided on the use of the NIR equipment and for some data treatments. They also want to thank Emmanuel Guedon for his help in manuscript writing.

References

[1] Ozturk SS, Hu W-S. Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellular Therapies. New York: Taylor & Francis; 2006.
[2] Mandenius C-F, Graumann K, Schultz TW, Premstaller A, Olsson I-M, Petiot E, Clemens C, Welin M. Quality by design (QbD) for biotechnology-related pharmaceuticals. Biotechnol J 2009; 4: 600.
[3] Teixeira AP, Oliveira R, Alves PM, Carrondo MJT. Advances in on-line monitoring and control of mammalian cell cultures: Supporting the PAT initiative. Biotechnol Adv 2009; In Press, Corrected Proof:
[4] Ansorge S, Esteban G, Schmid G. On-line monitoring of infected Sf-9 insect cell cultures by scanning permittivity measurements and comparison with off-line biovolume measurements. Cytotechnology 2007; 55: 115-124.
[5] Rudolph G, Lindner P, Gierse A, Bluma A, Martinez G, Hitzmann B, Scheper T. Online monitoring of microcarrier based fibroblast cultivations with in situ microscopy. Biotechnol Bioeng 2008; 99: 136-145.
[6] Larson TM, Gawlitzek M, Evans H, Albers U, Cacia J. Chemometric evaluation of on-line high-pressure liquid chromatography in mammalian cell cultures: Analysis of amino acids and glucose. Biotechnol Bioeng 2002; 77: 553-563.
[7] Ozturk SS, Thrift JC, Blackie JD, Naveh D. Real-time monitoring and control of glucose and lactate concentrations in a mammalian cell perfusion reactor. Biotechnol Bioeng 1997; 53: 372-378.
[8] Navrátil M, Norberg A, Lembrén L, Mandenius C-F. On-line multi-analyzer monitoring of biomass, glucose and acetate for growth rate control of a Vibrio cholerae fed-batch cultivation. J Biotechnol 2005; 115: 67-79.

[9] Arnold SA, Gaensakoo R, Harvey LM, McNeil B. Use of at-line and in-situ near-infrared spectroscopy to monitor biomass in an industrial fed-batch Escherichia coli process. Biotechnol Bioeng 2002; 80: 405-413.
[10] Scarff M, Arnold SA, Harvey LM, McNeil B. Near infrared spectroscopy for bioprocess monitoring and control : Current status and future trends. Crit Rev Biotechnol 2006; 26: 17-39.
[11] Zhang L, Small GW, Arnold MA. Multivariate Calibration Standardization across Instruments for the Determination of Glucose by Fourier Transform Near-Infrared Spectrometry. Anal Chem 2003; 75: 5905-5915.
[12] Tosi S, Rossi M, Tamburini E, Vaccari G, Amaretti A, Matteuzzi D. Assessment of In-Line Near-Infrared Spectroscopy for Continuous Monitoring of Fermentation Processes. Biotechnol Prog 2003; 19: 1816-1821.
[13] Sandnes JM, Ringstad T, Wenner D, Heyerdahl PH, Kallqvist T, Gislerod HR. Real-time monitoring and automatic density control of large-scale microalgal cultures using near infrared (NIR) optical density sensors. J Biotechnol 2006; 122: 209-215.
[14] Vaidyanathan S, Harvey LM, McNeil B. Deconvolution of near-infrared spectral information for monitoring mycelial biomass and other key analytes in a submerged fungal bioprocess. Anal Chim Acta 2001; 428: 41-59.
[15] Riley MR, Rhiel M, Zhou X, Arnold MA, Murhammer DW. Simultaneous measurement of glucose and glutamine in insect cell culture media by near infrared spectroscopy. Biotechnol Bioeng 1997; 55: 11-15.
[16] Arnold SA, Crowley, J. , Woods, N. , Harvey, L. M. , McNeil, B. . In-situ near infrared spectroscopy to monitor key analytes in mammalian cell cultivation. Biotechnol Bioeng 2003; 84: 13-19.
[17] Harthun S, Matischak K, Friedl P. Determination of Recombinant Protein in Animal Cell Culture Supernatant by Near-Infrared Spectroscopy. Anal Biochem 1997; 251: 73-78.
[18] Riley MR, Crider HM, Nite ME, Garcia RA, Woo J, Wegge RM. Simultaneous Measurement of 19 Components in Serum-Containing Animal Cell Culture Media by Fourier Transform Near-Infrared Spectroscopy. Biotechnol Prog 2001; 17: 376-378.
[19] Riley MR, Arnold MA, Murhammer DW, Walls EL, DelaCruz N. Adaptive Calibration Scheme for Quantification of Nutrients and Byproducts in Insect Cell Bioreactors by Near-Infrared Spectroscopy. Biotechnol Prog 1998; 14: 527-533.
[20] Riley MR, Okeson CD, Frazier BL. Rapid Calibration of Near-Infrared Spectroscopic Measurements of Mammalian Cell Cultivations. Biotechnol Prog 1999; 15: 1133-1141.
[21] Roychoudhury P, O'Kennedy R, McNeil B, Harvey LM. Multiplexing fibre optic near infrared (NIR) spectroscopy as an emerging technology to monitor industrial bioprocesses. Anal Chim Acta 2007; 590: 110-117.
[22] Rhiel M, Cohen MB, Murhammer DW, Arnold MA. Nondestructive near-infrared spectroscopic measurement of multiple analytes in undiluted samples of serum-based cell culture media. Biotechnol Bioeng 2002; 77: 73-82.
[23] Liu C-C, Lian W-C, Butler M, Wu S-C. High immunogenic enterovirus 71 strain and its production using serum-free microcarrier Vero cell culture. Vaccine 2007; 25: 19-24.
[24] Rourou S, van der Ark A, van der Velden T, Kallel H. A microcarrier cell culture process for propagating rabies virus in Vero cells grown in a stirred bioreactor under fully animal component free conditions. Vaccine 2007; 25: 3879-3889.
[25] Toriniwa H, Komiya T. Long-term stability of Vero cell-derived inactivated Japanese encephalitis vaccine prepared using serum-free medium. Vaccine 2008; 26: 3680-3689.
[26] Petiot E, Fournier F, Gény C, Pinton H, Marc A. Rapid Screening of Serum-Free Media for the Growth of Adherent Vero Cells by Using a Small-Scale and Non-invasive Tool. Appl Biochem Biotechnol 2009;
[27] Rhiel M, Ducommun P, Bolzonella I, Marison I, von Stockar U. Real-time in situ monitoring of freely suspended and immobilized cell cultures based on mid-infrared spectroscopic measurements. Biotechnol Bioeng 2002; 77: 174-185.
[28] Kennedy M, Krouse D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. J Ind Microbiol Biotechnol 1999; 23: 456-475.

3.3.3. Contributions de l'article

L'intérêt du NIR a tout d'abord été démontré à partir de calibrations hors-ligne avec des échantillons filtrés de surnageants de cultures en milieu sans sérum. Des corrélations linéaires ont été mises en évidence pour le glucose et le lactate, entre les données spectroscopiques traitées par analyses multi-variées et les méthodes d'analyses enzymatiques classiquement utilisées, dans une gamme de concentration communément observée dans les procédés de culture de cellules animales.

De façon plus intéressante, ces résultats ont été confirmés lors d'analyses *in-situ* à l'aide d'une sonde stérilisable implantée dans le bioréacteur. Dans ce cas, la calibration a abouti à des erreurs maximales respectives de 0,32 et 0,27 $g.l^{-1}$ pour le glucose et le lactate. De plus, la robustesse de la méthode a été testée en prenant en compte dans les corrélations générées l'impact de conditions opératoires rencontrées dans le procédé industriel, telles que : la concentration de microporteurs, la méthode de propagation des cellules avant ensemencement, la trypsination des cellules au cours de l'extrapolation, ou la variation brutale des concentrations liée à une étape de recharge-récolte du milieu. La procédure de calibration intégrant tous ces éléments conduits à une bonne prédiction des concentrations de glucose et de lactate avec une précision respective de 0,47 et 0,32 $g.l^{-1}$.

Nos résultats démontrent, pour la première fois, l'intérêt d'utiliser la spectroscopie proche infrarouge comme nouvel outil de la stratégie PAT dans le cas de procédés de culture de cellules Vero sur microporteurs. Cette technique peut être envisagée, non seulement, pour quantifier certains composants clés du surnageant de culture, mais aussi, pour contrôler les procédures de renouvellement de milieu de culture ou détecter des dysfonctionnements du procédé.

Ainsi, la spectroscopie proche infrarouge apparaît comme une technologie très prometteuse pour contribuer de façon significative à la mise en place de la stratégie PAT dans les procédés de cultures de cellules animales sur supports. De plus, d'autres développements potentiels sont envisageable, tels que, par exemple, l'analyse en ligne du produit d'intérêt, protéine recombinante ou virion, l'aide à l'analyse des risques grâce au suivi de l'empreinte métabolique au cours du procédé, ou encore le pilotage de l'alimentation du réacteur en mode semi-continu ou continu.

Conclusion

Il apparaît que les nouvelles technologies dédiées au suivi en-ligne de procédé de culture de cellules animales sont généralement développées pour des lignées cellulaires en suspension. En effet, la présence de microporteurs ou les caractéristiques propres des cellules adhérentes complexifient généralement la mise au point de ces techniques d'analyses. Cependant, de nombreux procédés dédiés à la production de vaccins viraux sont basés sur la culture de lignées de cellules adhérentes, et sont particulièrement sensibles en terme de qualité et de contrôle des procédés. C'est pourquoi, dans ce chapitre, nous avons évalué et développé plusieurs outils d'analyse en-ligne d'un procédé de culture de cellules Vero adhérentes. La synthèse de nos résultats est présentée dans la figure 62.

Dans un premier temps, nous avons mesuré, par spectroscopie diélectrique en-ligne, la concentration des cellules Vero attachées sur support. La concentration cellulaire a été corrélée à la permittivité dans le cas de cultures effectuées dans deux milieux de composition différente. De plus, dans le cas d'une culture avec un renouvellement de milieu, la corrélation n'est plus validée à partir d'environ 10^6 cell.ml^{-1}, du fait de la saturation des microporteurs et d'une diminution de la taille cellulaire. Une détection en-ligne de la mort cellulaire par apoptose au cours du procédé de culture a aussi été mise en évidence à partir de l'évolution de la fréquence caractéristique, fc, de la courbe d'analyse multifréquence de la permittivité.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à des technologies de spectroscopie permettant de réaliser une empreinte des composants de la culture. Dans le cas de la spectroscopie Raman, des analyses préliminaires ont été réalisées hors-ligne. D'après les premiers résultats, une analyse multi variée est nécessaire pour extraire les informations sur les molécules présentes dans le surnageant de culture. L'analyse des cellules elles-mêmes semble plus prometteuse et certains marqueurs potentiels de l'état cellulaire, comme la phénylalanine, ont été identifiés. Néanmoins, cette technologie nécessite encore des développements importants pour envisager son implantation *in-situ* dans un bioréacteur.

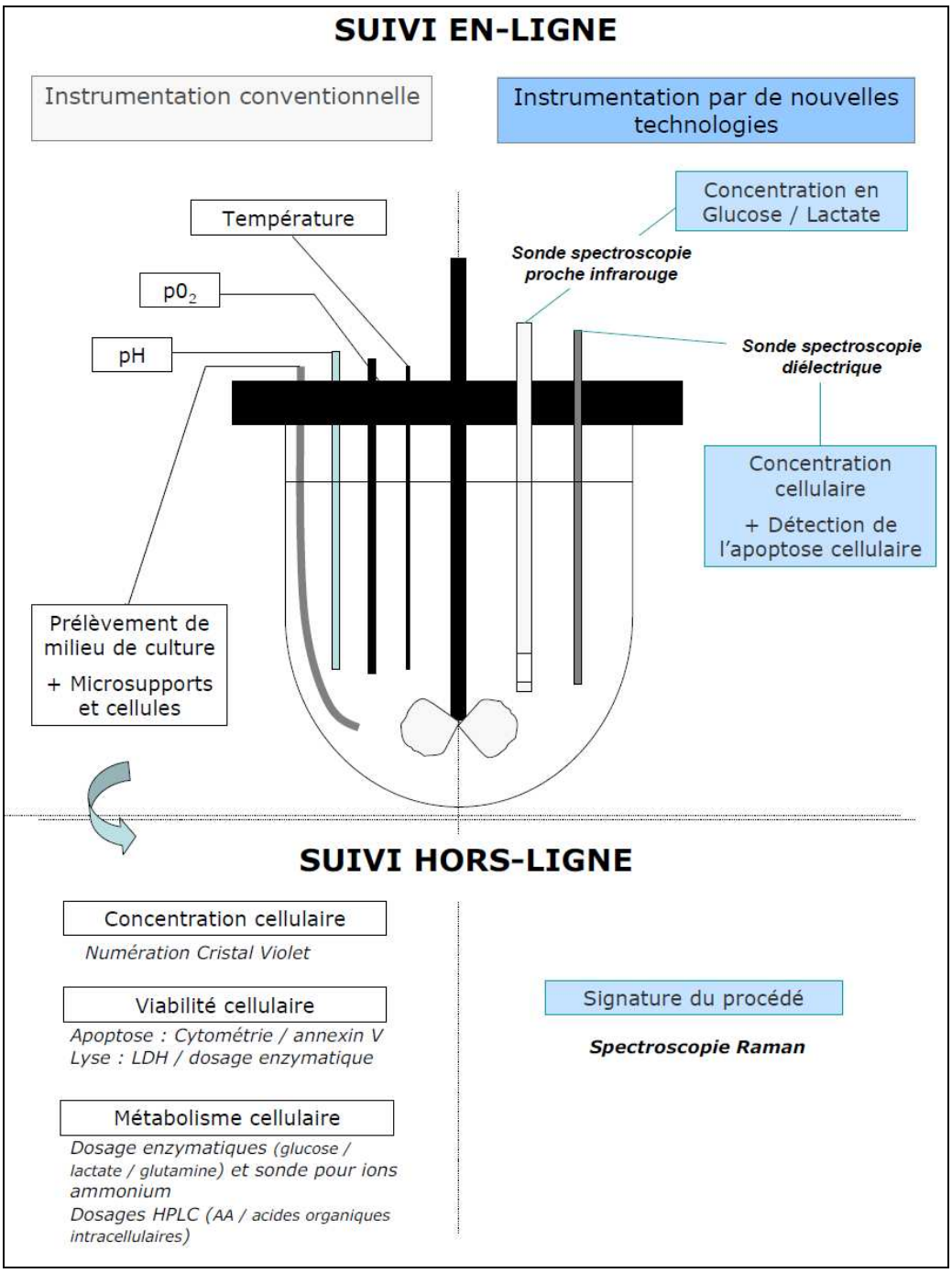


Figure 62. Synthèse des paramètres analysables hors-ligne et en ligne. Les nouvelles technologies développées pour le suivi d'un procédé de culture de cellules Vero adhérentes en bioréacteur sont présentées en bleue (la spectroscopie diélectrique, la spectroscopie Raman et la spectroscopie proche infrarouge).

La spectroscopie proche infrarouge a démontré un potentiel plus intéressant. Nous avons mis au point une technique de suivi *in-situ* du glucose et du lactate, dans les gammes de concentration couramment usitées dans les procédés de culture de cellules Vero.

Au cours de diverses cultures réalisées dans des conditions opératoires variées, les caractéristiques d'une culture de cellules adhérentes sur microporteurs ont été prises en compte. Elles concernent, par exemple, l'hétérogénéité de la culture liée à la présence des microsupports, différentes conditions d'extrapolation d'un procédé de production, ou une calibration intégrant une décorrélation entre certains métabolites. Cette méthodologie a pu être adaptée uniquement au suivi en-ligne de deux principaux métabolites pour la cellule, le glucose et le lactate, présents en quantité relativement importante dans les milieux de culture, comparativement aux autres composés. Néanmoins, il serait maintenant interessant d'évaluer et d'appliquer cette méthodologie aux autres composés et notamment, la glutamine et les ions ammonium, qui sont aussi, comme nous avons pu le démontrer dans partie précédente, des composés importants pour la croissance et le métabolisme des cellules Vero.

La spectroscopie di-électrique et la spectroscopie proche infrarouge représentent des outils de suivis en-ligne intéressants pour le développement d'une stratégie PAT. Elles permettent d'envisager, au cours du procédé de culture, l'analyse de la densité cellulaire, de l'apoptose cellulaire et de divers composés du milieu de culture. Pour la première fois, leur utilisation a été démontrée dans le cas de cultures de cellules Vero cultivées sur microporteurs.

Chapitre 4

4. Culture des cellules Vero en bioréacteur et production virale

CHAPITRE 4

Introduction - 243 -

4.1. Etudes cinétiques de cultures de cellules Vero à l'échelle du bioréacteur - 244 -
4.1.1. Cinétiques en milieu de référence avec renouvellement de milieu - 244 -
4.1.2. Cinétiques comparées en milieu de référence et en milieu « Glutamax® » avec ou sans renouvellement du milieu de culture - 248 -

4.2. Influence du milieu de culture sur la production virale en bioréacteur - 251 -
4.2.1. Phase de croissance cellulaire - 252 -
4.2.2. Phase de production virale - 256 -

4.3. Impact de la substitution de la glutamine sur l'extrapolation du procédé - 261 -
4.3.1. Croissance cellulaire et production virale en milieu de référence et en présence de glutamax® - 261 -
4.3.2. Influence du milieu de culture sur l'étape de trypsination - 264 -

Conclusion - 267 -

Introduction

Pour compléter la démarche d'amélioration et de maîtrise du procédé de culture de cellules Vero en milieu sans sérum, et dans le contexte du développement d'une stratégie PAT, ce chapitre étudie la mise en œuvre de cultures en bioréacteurs dans des conditions plus proches de celles du procédé industriel, en incluant, en particulier, une phase de production virale (figure 30).

Tout d'abord, pour simuler une phase d'expansion cellulaire et vérifier l'extrapolation de nos résultats, le comportement cinétique des cellules Vero cultivées en spinner et en réacteur est étudié, dans le milieu de référence et en présence d'un renouvellement de milieu à 48 h de culture. Puis, une culture en réacteur sans changement de milieu mais en présence de glutamax® est comparée à deux cultures en milieu de référence.

Dans la partie suivante, des productions du vaccin chimère de la dengue sont réalisées en bioréacteurs selon un protocole proche de celui du procédé industriel, avec un changement du milieu de culture au moment de l'infection virale. Les cinétiques observées dans différents milieux de culture contenant des substituts de glutamine sont comparées à celles d'une culture de référence dont le milieu subit un changement supplémentaire 2 jours après l'infection.

Enfin, une dernière série d'expériences se propose de simuler plusieurs phases successives de culture, incluant l'expansion cellulaire, la trypsination et la production virale. Dans ce cas, les performances en milieu contenant du glutamax® sont comparées à celles observées en milieu de référence.

Objectifs scientifiques du chapitre 4

- *Réaliser, en bioréacteurs et dans différents milieux de culture, des études cinétiques des cellules Vero.*
- *Etudier l'impact de différents milieux de culture sur la production du vaccin prototype contra la dengue.*
- *Etudier l'influence d'une modification du milieu de culture sur l'extrapolation du procédé.*

4.1. Etudes cinétiques de cultures de cellules Vero à l'échelle du bioréacteur

4.1.1. Cinétiques en milieu de référence avec renouvellement de milieu

Dans un premier temps, l'objectif de ce chapitre a été de comparer les résultats obtenus en spinner de 250 ml avec des cultures réalisées en bioréacteur de 2 l. Les cinétiques de croissance, et de mort cellulaires, de consommation et de production de métabolites sont présentées dans le cas d'une culture avec un renouvellement du milieu à 48 h de culture pendant la première phase du procédé (Figure 63).

Les cinétiques de croissance en spinner et en bioréacteur sont très similaires avec une concentration maximale autour de 18 × 10^5 cell.ml^{-1}. De la même façon, la vitesse spécifique de croissance est relativement similaire entre les deux systèmes de culture avec un μ_{max} de 0,024 h^{-1} en spinner contre 0,026 h^{-1} en bioréacteur (Figure 64).

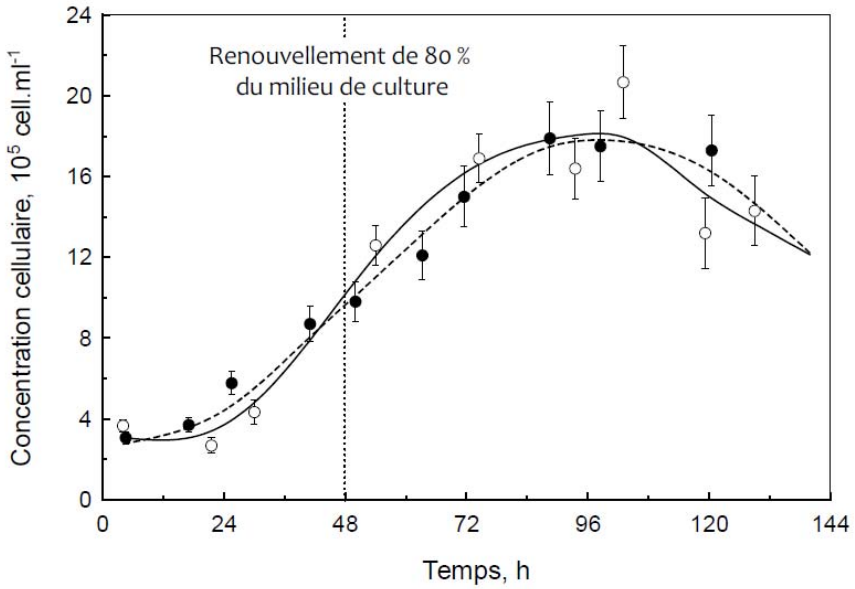


Figure 63. Comparaison de la croissance des cellules Vero en spinner (●) et en bioréacteur de 2 l (○) dans le milieu référence avec renouvellement de 80 % du milieu à 48 h.

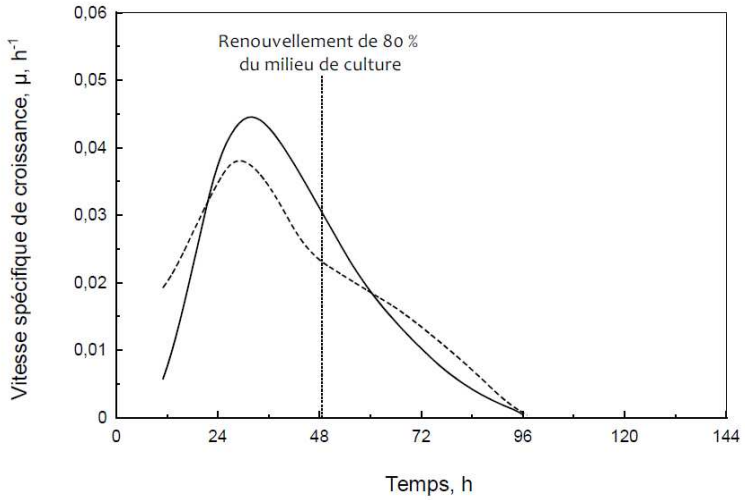


Figure 64. Vitesse spécifique de croissance cellulaire instantanée au cours des cultures réalisées en spinner (- - -) et en bioréacteur de 2 l (—) dans le milieu référence avec une renouvellement de 80 % du milieu à 48 h de culture.

Un métabolisme un peu différent a cependant été observé lors de la culture en bioréacteur par rapport aux résultats obtenus en spinner (Figure 65). En effet, le glucose est complètement consommé après 96 h de culture, ce qui n'est pas le cas lors de la culture en spinner. Pourtant, la concentration en lactate atteinte en fin de culture est identique pour les deux systèmes de culture. Néanmoins, on remarque que la production de lactate est plus rapide dans les premières 48 h pour la culture en spinner que pour la culture en réacteur. Ceci implique une production totale de 23 mM et 29 mM respectivement en bioréacteur et en spinner. L'évolution instantanée des rendements lactate/glucose, $Y_{Lact/Glc}$, indique un changement de métabolisme après le renouvellement du milieu dans le cas de la culture en bioréacteur. En effet, alors que la culture en spinner présente un rendement constant tout au long de la culture de 1,65 environ, la culture en bioréacteur présente un rendement qui évolue de 1,2 en début de culture, à 1,88 après 48 h, puis diminue jusqu'à 1,2 à nouveau, ce qui donne un rendement global de 1,45.

Cette différence de métabolisme avec un rendement de production de lactate légèrement plus faible peut être attribué à l'absence de régulation de deux paramètres prépondérants (pH et taux d'O_2 dissous) lors des cultures en spinner. En ce qui concerne l'oxygénation, lorsque les cellules sont en hypoxie, la chaîne respiratoire mitochondriale n'est plus alimentée suffisamment en oxygène, élément réducteur indispensable à son bon fonctionnement. Dans ce cas, les cellules orientent préférentiellement leur métabolisme vers d'autres voies de production d'énergie, comme par exemple, la voie de production de lactate.

On peut donc envisager que les cultures en spinner présentent des concentrations en oxygène dissous moins importantes voire limitantes par rapport aux conditions en bioréacteur où la pO_2 est

maintenue à 25 % de la saturation en air durant toute la culture. Ceci implique aussi que la voie d'oxydation du NADH cytoplasmique est plus rapidement saturée en spinner, ce qui peut amener une réduction ou un arrêt de la consommation de glucose, alors que celui-ci est épuisé dans le système de culture le mieux oxygéné, le bioréacteur.

Par ailleurs, il a aussi été démontré dans la littérature que l'acidification du milieu de culture était néfaste pour la croissance cellulaire. Or, dans les cultures en spinner, le pH mesuré atteint une valeur de 6,60 unités en fin de culture, alors que, la valeur de consigne en bioréacteur est maintenue à 7,2 unités, l'acidification du milieu de culture en spinner étant principalement due à la production de lactate.

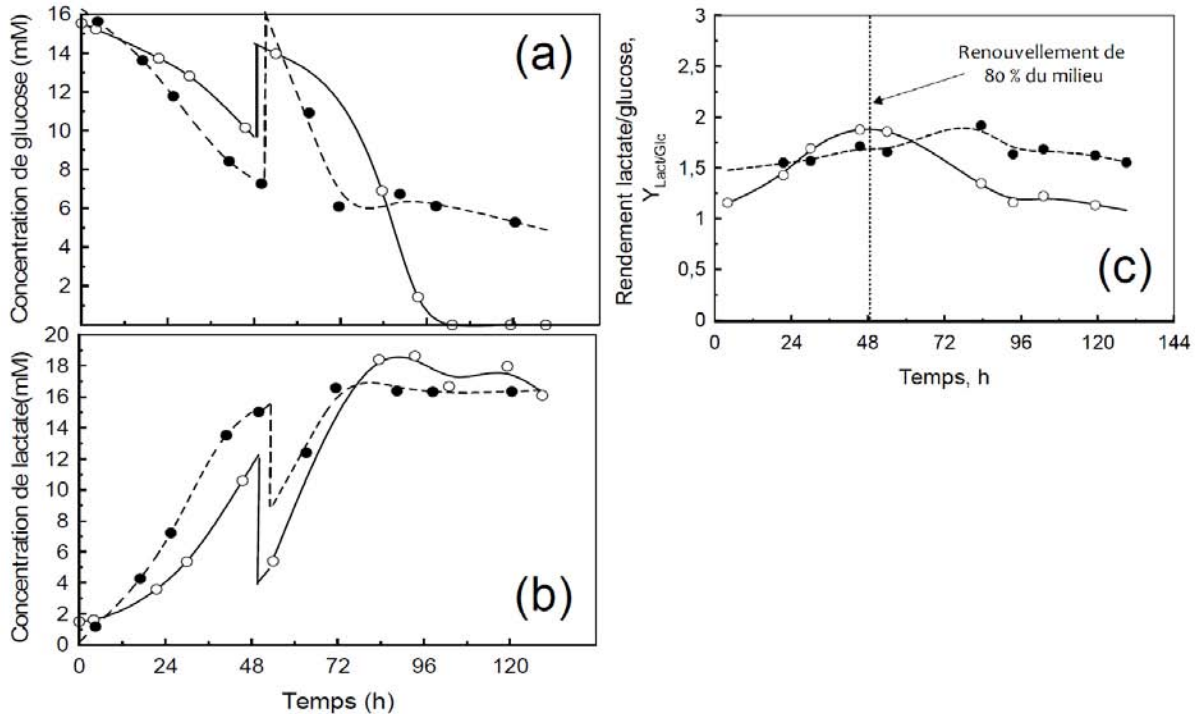


Figure 65. Cinétiques de consommation de glucose (a), de production de lactate (b) et rendement lactate/glucose instantané (c) pour une culture en milieu référence avec renouvellement de 80 % du milieu à 48 h en spinner (●) et en bioréacteur de 2 l (○).

Les cinétiques de mort cellulaire par apoptose et par lyse cellulaire, ont été comparées pour les cultures en spinner et en bioréacteur dans la figure 66. Les profils d'apoptose semblent assez similaires. Une diminution de l'apoptose est observée après le renouvellement du milieu, ce qui corrobore l'importance de certains éléments nutritifs et de l'élimination des coproduits métaboliques toxiques pour la viabilité cellulaire. Dans le cas de la lyse cellulaire, la proportion de cellules lysées en spinner reste relativement constante et toujours inférieure à 15 % des cellules totales, alors que la lyse semble être plus prononcée en réacteur avec une valeur moyenne de l'ordre de 20 % de cellules lysées.

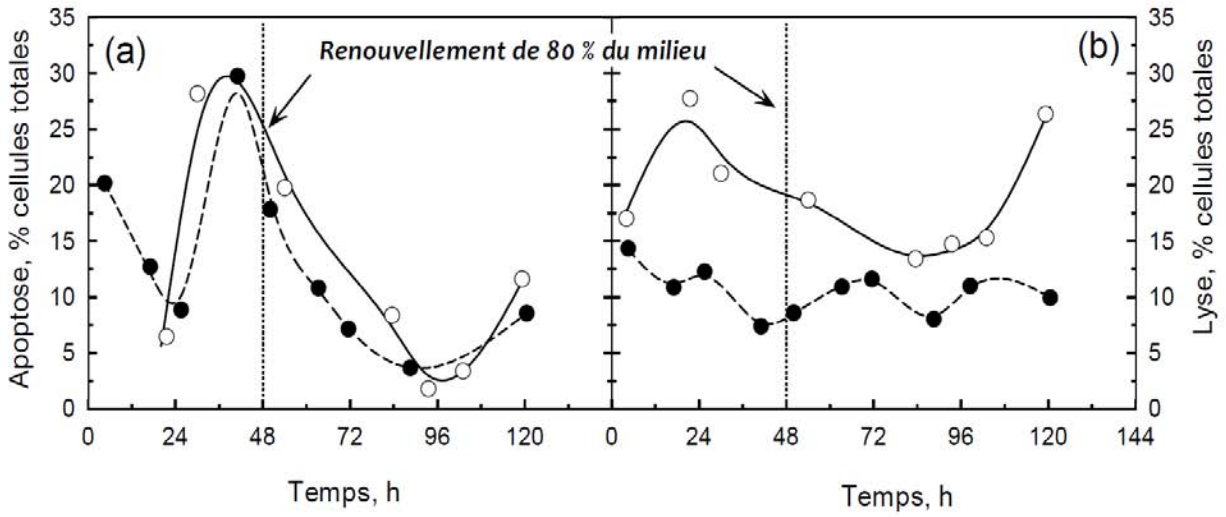


Figure 66. Cinétiques d'apparition de l'apoptose (a) ou de la lyse (b) cellulaires en spinner de 250 ml (●) et en bioréacteur de 2 l (○) en présence de milieu référence avec renouvellement du milieu à 48 h de culture.

Cet effet est largement documenté dans la littérature. Les cellules en bioréacteur, notamment les cellules adhérées à des microporteurs, sont soumises à des contraintes hydrodynamiques plus importantes que lors de cultures en spinner (Gregoriades *et al.,* 2000; Pellegrini 2008). Celles-ci résultent, premièrement, d'une augmentation de la vitesse d'agitation (45 rpm en spinner contre 100 rpm en bioréacteur) qui implique une augmentation de l'énergie dissipée, deuxièmement de la nature des modules d'agitation eux-mêmes, et enfin, de l'oxygénation par bullage mis en œuvre en réacteur. En effet, des travaux réalisés en colonne à bulle indiquent que l'éclatement des bulles à la surface du réacteur semble être la cause majeure de la mortalité cellulaire. L'adsorption des cellules à la surface des bulles durant leur ascension est influencée par le flux de gaz utilisé et par la présence de surfactant (Oh *et al.,* 1992). C'est pourquoi, des agents de protection tels que le Pluronic F-68®, sont souvent préconisés lors des cultures réalisées en bioréacteurs. Ceci a été confirmé dans le cas des cellules Vero par des travaux récents réalisés en bioréacteurs (Rourou *et al.,* 2009), dans lesquels une croissance cellulaire en milieu sans sérum n'a pu être atteinte qu'en présence d'une unique aération de surface. Il a aussi été démontré que l'apoptose et la nécrose étaient accentuées même en présence de contraintes hydrodynamiques modérées (Al-Rubeai *et al.,* 1995; Mollet *et al.,* 2007), et un mécanisme de lyse directe a été proposé dans le cas où les cellules subissent des contraintes très élevées (Al-Rubeai *et al.,* 1998). Dans notre cas, étant donné que seule la lyse est plus importante en bioréacteur, nous pouvons supposé que des contraintes hydrodynamiques accrues dans ce système de culture induisent une augmentation de la mort cellulaire par lyse directe.

La comparaison de deux cultures en spinner et bioréacteur, dans le milieu de référence avec renouvellement du milieu après 2 jours, a montré certaines différences physiologiques et métaboliques liées potentiellement au contrôle du pH et de l'O_2 dissous ou à l'agitation. Néanmoins, les tendances observées en spinner apparaissent extrapolables à l'échelle du bioréacteur. Cette étude est prolongée dans la partie suivante par la comparaison avec une culture en présence de glutamax®.

4.1.2. Cinétiques comparées en milieu de référence et en milieu « Glutamax® » avec ou sans renouvellement du milieu de culture

Afin d'étudier la pertinence des résultats obtenus en spinner pour la mise en œuvre d'un procédé à l'échelle industrielle, une condition de culture parmi celle testée préalablement en spinner a été sélectionnée pour être mise en œuvre en bioréacteur de 2 l. Lors des essais de substitution de la glutamine en spinner, l'utilisation du di-peptide alanine-glutamine (Glutamax®) a démontré de bonnes performances par rapport au milieu de référence. Les cinétiques de cultures en bioréacteur en milieu de référence, avec ou sans renouvellement du milieu et en milieu « glutamax® » sans renouvellement du milieu, sont comparées dans la figure 67.

Comme lors des cultures en spinner, l'augmentation cellulaire dans le milieu de référence ne se maintient pas au-delà de 72 h de culture lorsque le milieu n'est pas renouvelé, et la concentration cellulaire maximale atteinte est diminuée de 60 %, soit $8,5 \times 10^5$ cell.ml^{-1} contre $20,7 \times 10^5$ cell.ml^{-1} en milieu de référence avec renouvellement du milieu après 48 h de culture. En ce qui concerne la culture en milieu sans glutamine substituée par du Glutamax®, la concentration maximale de cellules adhérées est plus élevée que pour la culture en milieu de référence sans renouvellement du milieu ($12,3 \times 10^5$ cell.ml^{-1} au lieu de $8,5 \times 10^5$ cell.ml^{-1}).

La comparaison des concentrations cellulaires maximales et de leur temps d'apparition dans les cultures en milieu de référence avec et sans renouvellement de milieu et dans la culture « Glutamax® » ont été comparées dans le tableau 23.

Tableau 23. Comparaison des paramètres cinétiques de culture en milieu de référence avec ou sans renouvellement de milieu et en milieu avec « glutamax® ». Concentration cellulaire maximale, X_{max}, et temps d'apparition de cette concentration, t_{max}.

		Bioréacteur		**Spinner**	
		X_{max}, (10^5cell.ml^{-1})	t_{max} (h)	X_{max}, (10^5cell.ml^{-1})	t_{max} (h)
Milieu de référence	*sans renouvellement du milieu*	8,5	100	9,5	100
	avec renouvellement du milieu	20,7	100	18,4	98
Milieu "Glutamax®"	*sans renouvellement du milieu*	12,3	95	12,9	96

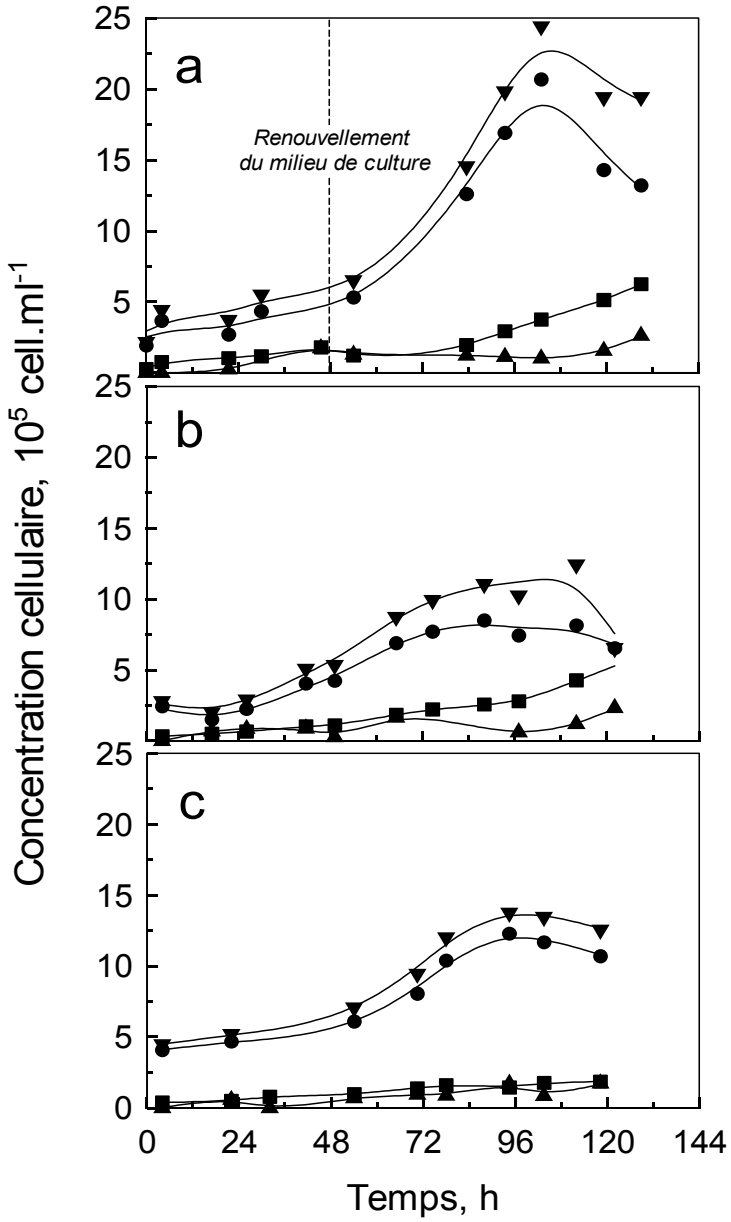


Figure 67. Cinétique de croissance et de mort cellulaire en milieu de référence avec renouvellement de milieu à 48 h (a) et sans renouvellement de milieu (b), et en milieu « glutamax® » (c). Cellules adhérées (●), cellules lysées (■), cellules apoptotiques (▲), et cellules totales (▼, cellules adhérées + cellules lysées).

La proportion de cellules apoptotiques est aussi plus importante dans la culture n'ayant pas subi de renouvellement de milieu et peut atteindre près de 25 % de la population cellulaire après 72 h de culture au lieu de 10 % (Tableau 23). La substitution de la glutamine par le di-peptide alanine-glutamine a aussi permis de limiter la mort cellulaire par apoptose étant donné que la proportion de cellules apoptotiques après 72 h de culture est de 9 % au lieu de 24 % dans le cas de la culture de référence (Tableau 23).

Tableau 24. Mort cellulaire après 72 et 96 h de culture pour les trois conditions opératoires. Les valeurs en pourcentage correspondent au % de cellules totales, soit cellules adhérées + cellules lysées.

	Milieu de référence								**Milieu « Glutamax® »**			
	sans renouvellement du milieu				*avec renouvellement du milieu à 48 h*				*sans renouvellement du milieu*			
	Apoptose		*Lyse*		*Apoptose*		*Lyse*		*Apoptose*		*Lyse*	
	%	*10^5 cell/ml*	*%*	*10^5 cell/ml*	*%*	*10^5 cell/ml*	*%*	*10^5 cell/ml*	*%*	*10^5 cell/ml*	*%*	*10^5 cell/ml*
72 h	**24**	1,65	**22**	2,22	**10**	1,2	**13**	1,9	**9**	0,9	**15**	1,38
96 h	**14**	1,04	**27**	2,80	**5**	1	**15**	2,9	**14**	1,7	**11**	1,45

Globalement la proportion de cellules mortes totales, apoptotiques et lysées, est relativement constante entre 72 et 96 h pour les différentes cultures. Elle représente près de 45 % pour la culture en milieu de référence sans renouvellement alors que cette proportion est de 20 % à 25 % pour les cultures avec renouvellement et en « Glutamax® ». Ces résultats confirment donc que la substitution du milieu de référence par le milieu « Glutamax® » limites la mort cellulaire de la manière similaire au renouvellement du milieu de culture.

Au niveau métabolique, on constate que le glucose est totalement consommé pour toutes les cultures en bioréacteur contrairement aux cultures réalisées en spinner (Tableau 25). La production de lactate est plus élevée en présence de glutamax® ce qui n'était pas le cas pour les cultures en spinner. Ainsi, le rendement $Y_{Lact/Glc}$ est semblable pour les deux cultures en milieu de référence mais légèrement plus élevé avec une valeur de 1,85 dans le cas de la culture avec glutamax®. Enfin, de la même façon que pour les cultures en spinner, l'utilisation du dipeptide à l'échelle du bioréacteur présente l'intérêt de réduire la production d'ions ammonium. Néanmoins, afin d'expliquer et valider la différence observée entre la culture avec glutamine et celle avec la substitution de la glutamine par le glutamax®, ces expériences devront être répétées.

Tableau 25. Paramètres métaboliques pour trois cultures en bioréacteur : rendement lactate/glucose, $Y_{Lact/Glc}$, concentrations totales consommées et produites totales de glucose, lactate et ions ammonium.

	Milieu de référence		***Milieu « Glutamax® »***
	sans renouvellement du milieu	*avec renouvellement du milieu*	*sans renouvellement du milieu*
$Y_{Lact/Glc}$	1,40	1, 45	1,85
[Glucose] *mM*	22	22,3	19,7
[Lactate] *mM*	19,9	27,7	36,7
$[NH_4^+]$ *mM*	3,7	3,3	2,7

L'utilisation en bioréacteur d'un milieu de culture sans glutamine additionné de « glutamax® » permet d'atteindre une concentration cellulaire maximale supérieure à celle obtenue dans le milieu de référence, même si elle reste plus faible que celle atteinte par renouvellement de milieu après 48 h de culture. Néanmoins, elle permet de limiter l'apoptose cellulaire, ainsi que l'accumulation d'ions ammoniums.

Compte tenu des résultats encourageants observés en bioréacteur lors de la substitution de la glutamine par le glutamax®, l'étape suivante consiste à étudier l'impact du remplacement de la glutamine par divers substituts sur la croissance des cellules Vero en bioréacteurs ainsi que sur la production et la qualité de particules virales du candidat vaccin.

4.2. Influence du milieu de culture sur la production virale en bioréacteur

Sur la base des résultats précédemment acquis à l'échelle du spinner et du bioréacteur, trois milieux de culture ont été choisis dans lesquels la glutamine a été substituée par l'asparagine (4 mM), le glutamax® (4 mM) ou le pyruvate (10 mM), pour la mise en œuvre d'une production virale en bioréacteur selon le schéma général de la figure 68. Il s'agit de réaliser la production du candidat vaccin vivant atténué Chimerivax pour le sérotype 4 de la dengue. Ces cultures ont été comparées à une culture réalisée en milieu de référence avec 4 mM de glutamine. Afin de rester le plus proche possible du procédé industriel, les milieux ont été renouvelés au moment de l'infection virale, après 72 h de culture. De plus, le milieu de référence a été renouvelé après 120 h de culture, soit 48 h après l'infection virale, alors que les autres conditions de culture ont conservé le même milieu jusqu'à la fin du procédé. Cette culture sera notre référence pour les essais de production virale.

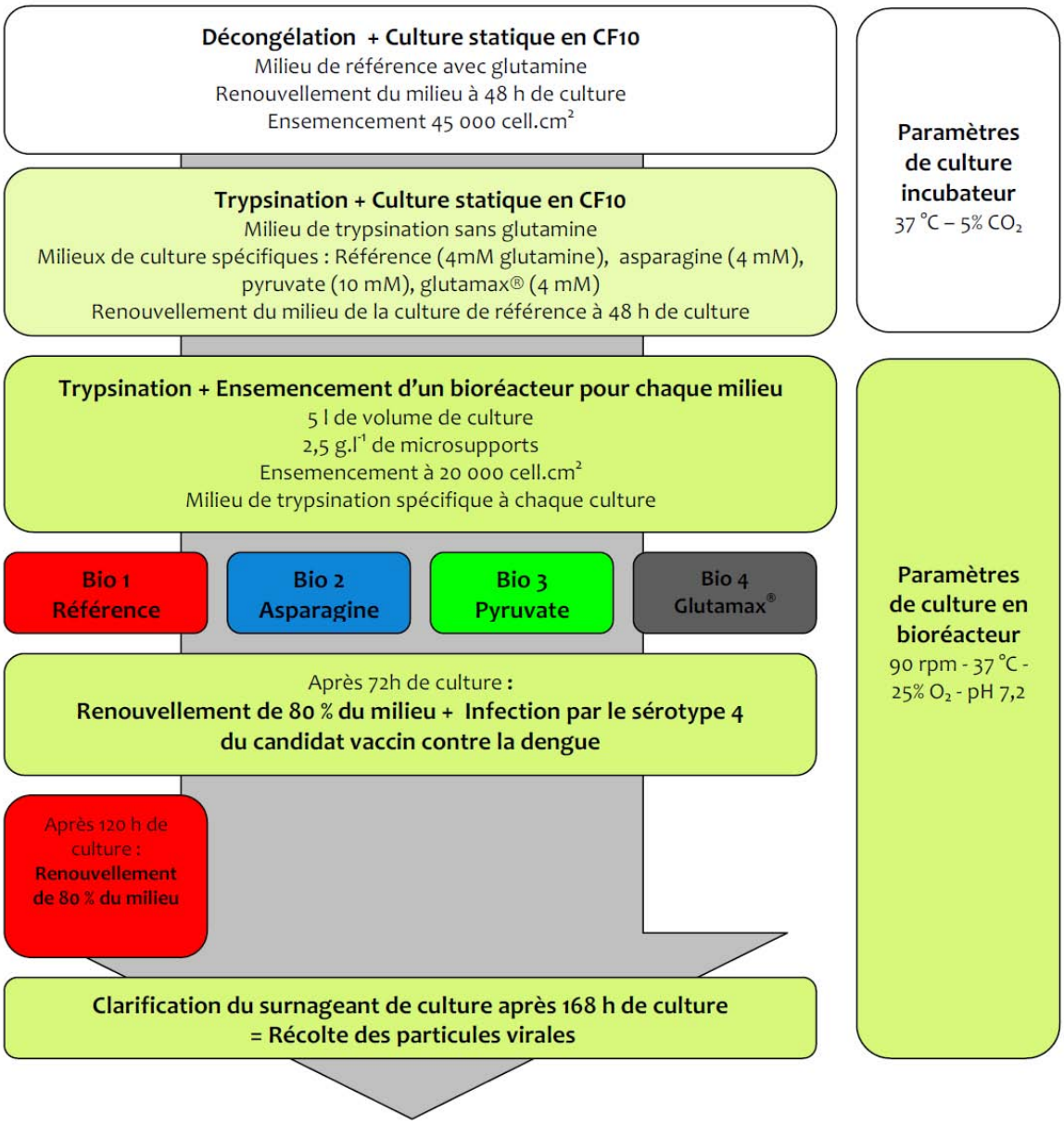


Figure 68. Schéma général du procédé de production virale avec différents milieux de culture. Les conditions de culture ont été choisies pour être le plus proche des conditions du procédé industriel.

4.2.1. Phase de croissance cellulaire

Les cellules Vero ayant subi une adaptation en culture statique durant 4 jours dans les différents milieux de culture, ont été ensemencées en bioréacteur dans un volume utile de 5 l à $2{,}75 \times 10^5$ cell.ml^{-1} avec 2,5 g.l^{-1} de microporteurs. Les différentes cultures ont subi un renouvellement de 80 % du milieu à 72 h de culture juste avant l'infection, par le virus candidat vaccin contre la dengue. La récolte virale a été réalisée après 168 h de culture, soit 96 h post-infection. La figure 69 présente l'évolution des concentrations cellulaires au cours des cultures.

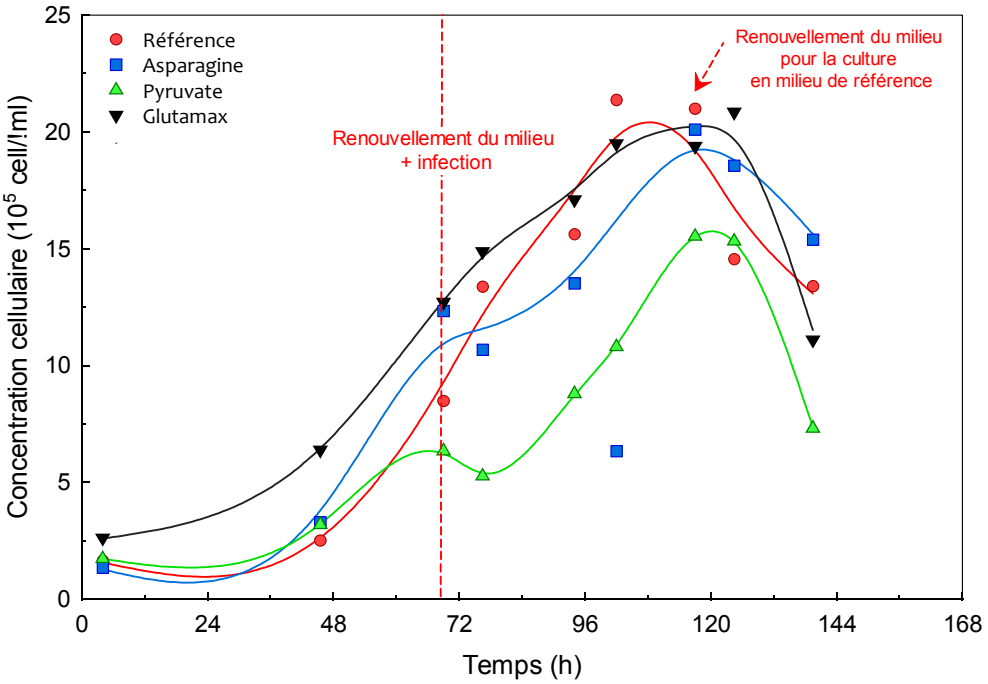


Figure 69. Cinétiques de croissance cellulaire au cours du procédé de production virale dans le milieu de référence (●) et les milieux de culture avec substitution de la glutamine par 4 mM d'asparagine (■), 10 mM de pyruvate (▲) ou 4 mM de glutamax® (▼).

Les cultures en présence de glutamax® et d'asparagine atteignent, après 120 h de culture, une concentration cellulaire maximale similaire à celle de la culture de référence proche de 20 × 10^5 cell.ml^{-1}, alors que la culture avec le pyruvate atteint une concentration maximale plus faible de 15,5 × 10^5 cell.ml^{-1}. Cependant, lors du renouvellement de milieu avant infection, la concentration cellulaire diminue pour cette culture. Ceci pourrait s'expliquer, soit, par un soutirage d'une partie des microsupports lors de cette opération, lié à une mauvaise décantation des supports, soit, par un effet néfaste de l'opération de renouvellement du milieu sur les cellules cultivées en milieu avec pyruvate. Hormis pour ce milieu de culture, le renouvellement des milieux de cultures juste avant l'infection implique, pour les cultures réalisées dans les milieux où la glutamine est substituée, une augmentation de la concentration cellulaire maximale de approximativement 30 % par rapport aux résultats obtenus en spinner (20 × 10^5 cell.ml^{-1} au lieu de 14 × 10^5 cell.ml^{-1} en spinner). Par ailleurs, le dosage de la LDH du surnageant de culture au cours du procédé nous permet d'affirmer qu'une lyse massive apparaît pour toutes les cultures aux environs de 120 h de culture, soit 48 h après l'infection virale (augmentation de 4 % à 10 % de lyse en 15 h de culture). Les analyses d'apoptose n'ont pas pu être réalisées sur ces cultures. Cependant, il serait intéressant de les réaliser lors de futurs essais pour caractériser le mécanisme de mort des cellules Vero après l'infection virale. En effet, dans d'autres travaux, il a été montré que le mécanisme d'apoptose après infection par le vaccin prototype contre la dengue était spécifique de la lignée cellulaire infectée (Sakoonwatanyoo *et al.*, 2006).

De la même façon que précédement, lors de ces cultures, le glucose est épuisé pour toutes les cultures, à partir de 120 h de culture pour les milieux de référence et avec « Glutamax® », et à partir de 140 h pour les cultures en présence de pyruvate et d'asparagine. Par ailleurs, les concentrations de lactate dans le surnageant de culture à 120 h, c'est à dire avant le déclin cellulaire provoqué par une lyse massive, sont très élevées pour les cultures en présence de glutamine, d'asparagine et de glutamax. Ces concentrations sont de 30 % supérieures aux valeurs obtenues en spinner. Cette hausse peut s'expliquer, d'une part, par l'augmentation de la concentration cellulaire maximale atteinte, favorisée par le renouvellement de milieu avant l'infection virale, d'autre part, par la concentration de glucose consommée plus importante que pour les cultures en spinner.

La figure 70 qui présente les vitesses spécifiques de consommation de glucose et de production de lactate nous permet d'observer des différences significatives dans le métabolisme. Ainsi, dans la première phase de culture avant l'infection virale, on observe une vitesse spécifique de consommation de glucose similaire dans le cas de la culture en présence d'asparagine par rapport à la culture de référence. Cependant, elle est réduite de 50 % pour la culture en présence de glutamax®, et de 80 % en présence de pyruvate. Ces tendances pour cette première phase de croissance sont identiques pour la vitesse de production de lactate.

A partir de l'infection virale et jusqu'à 120 h de culture, bien que toutes les cultures aient subi un renouvellement de 80 % de leur milieu de culture, les vitesses spécifiques de consommation de glucose et de production de lactate présentent des profils différents de ceux observés dans la première phase de culture. Les vitesses spécifiques q_{Glc} et q_{Lact} sont alors plus faibles que avant l'infection virale mais aussi assez similaire entre les différents milieux. En revanche à partir de 120 h de culture, lorsqu'à lieu le second renouvellement de milieu de la culture de référence, q_{Glc} et q_{Lact} augmentent légèrement pour cette culture, de même que pour celle en présence de pyruvate.
Ceci peut s'expliquer par le fait que la production virale détourne généralement la machinerie cellulaire, c'est pourquoi, quel que soit le milieu, le métabolisme observé est très semblable.

Les rendements globaux $Y_{Lact/Glc}$ et $Y_{NH4/Gln}$ ont été calculés et sont présentés dans le tableau 26 avec les concentrations maximales atteintes avant la lyse et les concentrations produites totales en lactate et ions ammoniums.

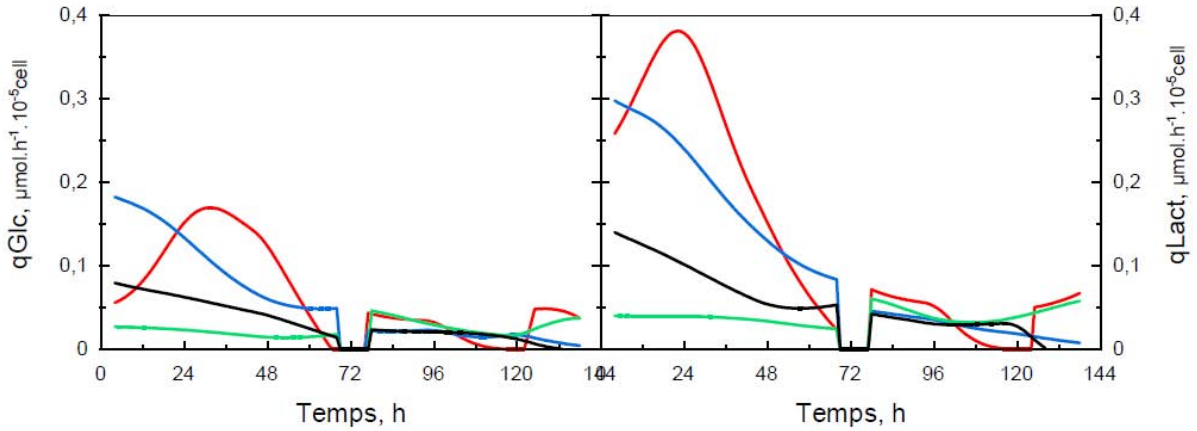


Figure 70. Vitesse spécifique de consommation de glucose (à gauche) et de production de lactate (à droite) pour les 4 cultures, milieu de référence (—), milieu avec asparagine (—), milieu avec pyruvate (—) et milieu avec glutamax® (—).

Pour les cultures avec substitution de la glutamine, les rendements sont sensiblement égaux. Pour tous les milieux de culture où la glutamine a été substituée, la concentration en ions ammonium est diminuée par rapport à la concentration de référence, avec une réduction de 40 % pour la culture avec le glutamax® ou l'asparagine, et de 100 % pour la culture en pyruvate. Ces données corroborent les observations faites lors des cultures en spinners. Cette diminution de la concentration en ions ammonium est un élément majeur pour promouvoir la substitution de la glutamine par ces autres substrats, étant donné qu'il a été montré que les ions ammonium pouvaient avoir un effet inhibiteur sur la production virale.

Nous pouvons aussi constater que le métabolisme est mieux orienté vers la croissance cellulaire pour les cultures réalisées dans les milieux où la glutamine a été substituée grâce aux valeurs un peu plus élevées du rendement $Y_{x/Glc}$ (tableau 26).

Tableau 26 . Paramètres métaboliques pour les cultures de production virale. Rendement lactate/glucose, $Y_{Lact/Glc}$ et, ammonium/glutamine, $Y_{NH4/Gln}$ et cellules/glucose, $Y_{x/Glc}$. Concentrations atteintes à 120 h de culture (f) en lactate et ions ammonium, ainsi que concentrations produites totales sur toute la durée de la culture (p).

	Référence	Asparagine	Pyruvate	Glutamax®
$Y_{Lact/Glc}$ (mol/mol)	1,67	1,72	1,68	1,57
$Y_{NH4/Gln}$ (mol/mol)	0,79	nd	nd	nd
$Y_{X/Glc}$ (10^8 cell/mol)	0,69	0,73	0,83	0,71
$[Lactate]_f$ (mM)	36	32	22	37
$[NH_4^+]_f$ (mM)	2,7	1,0	0	1,1
$[Lactate]_p$ (mM)	91	63	42	53
$[NH_4^+]_p$ (mM)	7	2,9	0,1	3,6

Un changement du métabolisme de la cellule Vero cultivée en réacteur industriel est induit par la substitution de la glutamine. Cependant, au vu des profils des vitesses spécifiques de consommation de glucose et de production de lactate, ces différences semblent réduites après l'infection virale. La production virale dans ces différents milieux doit maintenant être étudiée.

4.2.2. Phase de production virale

Le virus produit est dédié à la production d'un candidat vaccin vivant contre la dengue. C'est pourquoi, au cours de la phase de production, la cinétique de production du virus infectieux a été quantifiée par méthode DICC50. Les titres de particules infectieuses dans les surnageants de cultures sont exprimés par rapport à la concentration en particules infectieuses atteinte en fin de production virale lors de la culture de référence (Tableau 27).

Dans un premier temps, 24 h après l'infection virale on observe une forte diminution de la concentration en particules virales infectieuses dans le surnageant de culture qui atteint un niveau indétectable par la technique DICC50. Cette phase correspond à la phase d'éclipse du virus durant laquelle les constituants du virus sont synthétisés (réplication du génome et synthèse des protéines virales). Ensuite, intervient la phase de production virale proprement dite jusqu'à 96 h après l'infection (168 h de culture) durant laquelle le titre infectieux augmente rapidement. Puis une légère diminution apparaît. On constate que l'accumulation de virus est fortement accentuée dans les milieux où la glutamine a été substituée, puisque une élévation du titre infectieux de 169 % à 317 % est observée selon les cas. Pour ces cultures aussi, on observe que le titre viral de ces cultures diminue en fin de culture (entre 72 et 96 h post-infection) pour rejoindre celui de la culture de référence. Cette diminution doit cependant être interprétée avec précaution, en raison de la non répétition de ces essais. L'une des hypothèses pour expliquer cette diminution serait une perte de stabilité des virions produits en absence de glutamine. Des productions virales de confirmation dans ces mêmes milieux, ainsi que des tests de stabilité au cours de la cinétique de production virale, devraient être envisagés pour clarifier ce point.

Tableau 27. Evolution des titres de particules virale infectieuses produites dans quatre conditions de cultures, exprimées en pourcentage par rapport au titre de particules virales infectieuses atteint à 168 h de culture pour la culture de référence. Les titres infectieux sont quantifiés par la méthode DICC50. Les cases grisées correspondent aux valeurs significativement différentes de la valeur obtenue pour la culture de référence.

	Titre de particules virales infectieuses par rapport à la référence (%)				
Temps après infection	**Référence**	**Asparagine**	**Pyruvate**	**Glutamax**	**Erreur**
15 min	0,035	0,054	0,031	0,058	+/- 0,018
24h	0	0	0	0	
48h	13	25	42	39	+/- 13
72h	110	331	269	417	+/- 120
96h	**100**	155	105	81	+/- 47
Rendement $Y_{virus\ infect/X}$	**100**	**250**	**356**	**543**	

Le rendement de particules virales infectieuses par cellule sur la globalité du procédé de production, a été quantifié à la fin du procédé de production par un ratio entre les particules infectieuses produites à 96 h post-infection, V_{t96hpi}, (soit V_{t96hpi}-V_{to}) et la concentration de cellules maximales produites (X_{max}-X_{to}). Ce paramètre normalisé par rapport à la culture de référence, indique que la productivité des cellules Vero augmente dans les milieux où la glutamine est substituée par rapport la culture en milieu de référence, de 150 %, 256 % et 443 %, respectivement pour la culture en pyruvate, la culture en glutamax® et la culture en asparagine (Tableau 27). On peut donc avancer l'hypothèse que la meilleure efficacité du métabolisme carboné central permet aussi d'améliorer la productivité de virions infectieux.

Les titres infectieux ont à nouveau été quantifiés après clarification du surnageant de culture par filtration membranaire afin de statuer sur une éventuelle dégradation des particules virales au cours de cette étape. De plus, les particules virales totales ont été quantifiées par qPCR sur la base théorique de contenu en ARN d'une particule virale. Cette donnée permet de déduire la proportion de particules non infectieuses présentes dans la récolte, ces particules non infectieuses pouvant être incomplètes ou dégradées. Les particules non infectieuses peuvent aussi provenir d'une mauvaise conformation des protéines d'enveloppe qui participent au mécanisme d'infection virale. Dans le cas présent, les titres obtenus après clarification sont comparables, avec des variations allant de 7 % à 15 % par rapport à ceux quantifiés avant clarification. Néanmoins, la concentration de particules virales totales quantifiée par qPCR est entre 1500 et 3000 fois plus importante que la concentration en particules infectieuses, ce qui indique que les particules virales produites sont en grande majorité des particules virales non infectieuses.

Afin de comparer les différentes conditions de culture sur ce critère, le ratio génomique, qui correspond au rapport entre les particules totales et les particules infectieuses, a été calculé et rapporté à 100 % pour la culture de référence. Ce ratio, toujours supérieur dans le cas des cultures où la glutamine est substituée, laisse supposer une proportion de particules non infectieuses accrue en absence de glutamine. Cette donnée ayant été uniquement obtenue après la clarification, il serait intéressant, par la suite, de suivre l'évolution de ce ratio tout au long de la production virale. Ceci permettrait de déterminer si ce ratio est une caractéristique fixe de la production de ce virus par les cellules Vero, ou si certaines phases du procédé accélèrent la production de particules non infectieuses, comme lors d'une limitation nutritive, ou du détachement et de la lyse cellulaire.

Tableau 28. Particules virales totales, quantifiées par qPCR, et infectieuses quantifiées par la méthode DICC50, dans la récolte filtrée. Ratio génomique correspondant au ratio entre les particules infectieuses et les particules totales. Les valeurs sont rapportées à la culture en milieu de référence qui représente 100 %.

	Titre de particules virales par rapport à la référence (%)			
Récolte clarifiée	**Référence**	**Asparagine**	**Pyruvate**	**Glutamax**
Particules infectieuses	**100**	123	83	69
Particules totales	**100**	182	115	151
Ratio génomique	**100**	148	138	219

Ainsi, ces résultats sont encourageants, puisque le titre de particules virales infectieuses en milieu sans glutamine est identique à celui de la culture de référence. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour valider la qualité du produit final. En effet, lors de la production de vaccins vivants, comme c'est le cas ici, seules les particules infectieuses sont prises en compte pour la formulation des doses de vaccin. Par contre, lors de l'injection du vaccin à un patient, les particules non infectieuses peuvent interférer avec le mécanisme d'immunité des particules virales infectieuses, voire potentiellement participer à l'immunogénicité du futur vaccin (Liu *et al.,* 2007a). En effet, un cycle de formation de particules virales infectieuses comprend : l'entrée du virus dans la cellule, la réplication intracellulaire puis l'assemblage et la libération des particules virales. Selon Seregin *et al.* (2006), la production de virus inactivés induit une interruption du cycle au niveau de la première phase, alors que dans le cas d'un virus vivant atténué, le cycle est affecté au niveau de la réplication, sans empêcher la libération d'une particule virale infectieuse mais atténuée. Cependant, on peut aussi envisager que le cycle soit interrompu au niveau de la phase d'assemblage et de libération des particules virales et former des particules virales incomplètes ou non assemblées et donc non infectieuses.

Pourtant, l'immunogénicité potentielle de ces particules doit aussi être prise en compte. En effet, il a été démontré pour le virus West Nile, aussi de la famille des flavivirus, que des particules non infectieuses altérées au niveau de leur assemblage présentaient la même immunogénicité que la souche sauvage du virus West Nile correspondante (Seregin *et al.,* 2006). C'est pourquoi, la proportion de particules virales non infectieuses doit être prise en compte lors de l'évaluation de la qualité du produit final pour une production vaccinale. De plus, afin de mieux appréhender les raisons de la formation de ces particules non infectieuses, il serait intéressant de réaliser des caractérisations complémentaires, telles que des observations par microscopie électronique ou des analyses de la structure protéique de ces particules (Schnitzer *et al.,* 1979).

Par ailleurs, la lyse cellulaire peut aussi être un critère pour évaluer la qualité de la production virale. L'observation microscopique des prélèvements réalisés en fin de culture, avant la clarification, ne permet pas d'identifier de différence claire entre les cultures (Figure 71). Par contre, l'attaque virale peut être caractérisée à 168 h de culture et après clarification du surnageant de culture, grâce à quatre autres paramètres : le nombre de cellules présentes dans le surnageant de culture, le nombre de cellules lysées évaluées par dosage de la LDH, la quantité de protéines totales après clarification, et, enfin, la présence d'ADN de cellules Vero dans le surnageant de culture évaluée par PCR quantitative. Il faut noter par ailleurs que la proportion de cellule lysées et en suspension dans toutes les cultures est de l'ordre de 5 % des cellules totales avant l'infection virale.

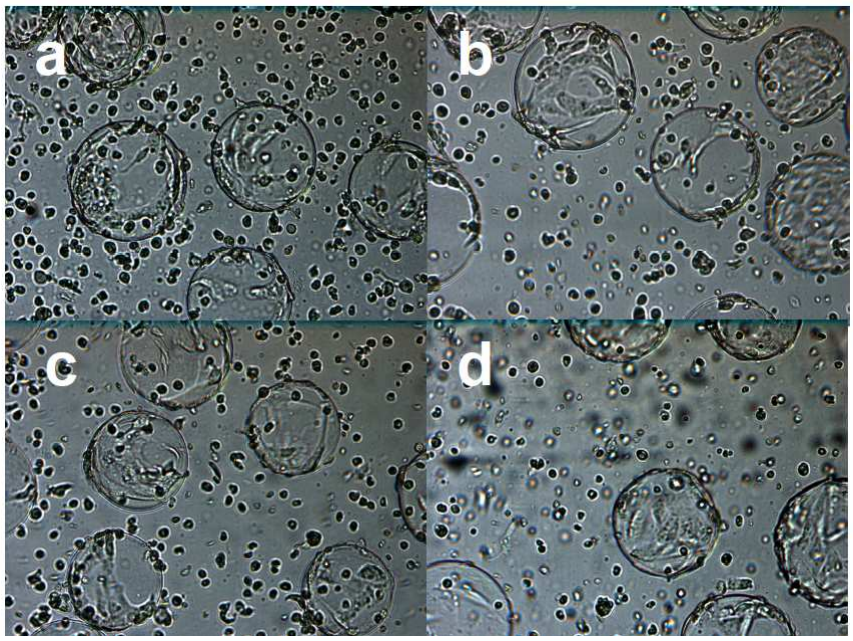


Figure 71. Observation microscopique d'un prélèvement à 168 h de culture pour le milieu de référence (a), le milieu avec asparagine (b), le milieu avec pyruvate (c) et le milieu avec glutamax® (d).

La culture de référence et la culture avec glutamax® présentent globalement les valeurs les plus élevées pour tous ces paramètres, avec des concentrations de cellules en suspension supérieures à $4{,}2 \times 10^5$ cell.ml^{-1} et de cellules lysées supérieures à $5{,}3 \times 10^5$ cell.ml^{-1}. Au contraire, la culture en pyruvate présente les concentrations les plus faibles, que ce soit pour les cellules en suspension et lysées, ou pour les données concernant le dosage des protéines totales et de l'ADN de cellules Vero après clarification. On remarquera cependant que, en accord avec l'étude de Liu *et al.* (2007) concernant les entérovirus EV71, notre culture avec l'asparagine présentant le plus faible taux de cellules détachées et lysées (29 % des cellules totales) correspond à celle qui aboutit au rendement de production virale, $Y_{Virus/X}$, le plus élevé (tableaux 26 et 28).

Tableau 29. Influence du milieu de culture sur l'attaque virale pour les quatre milieux de cultures.

		Référence	Asparagine	Pyruvate	Glutamax
Avant la clarification à 96 h post-infection	***Cellules en suspension*** *(% de cellules totales)*	18	10	19	27
	Cellules lysées *(% de cellules totales)*	23	19	28	25
	Cellules lysées + suspension *(% de cellules totales)*	41	29	47	52
Après la clarification	***ADN cellules Vero*** *(µg.ml^{-1})*	0,35	0,40	0,09	0,23
	Protéines totales *(µg.ml^{-1})*	**105**	93	63	123

La quantité d'ADN de cellules Vero et de protéines dans le surnageant représentent des critères de qualité supplémentaires pour le suivi du bon déroulement du procédé de production du vaccin, depuis l'étape de clarification jusqu'à la répartition des doses de vaccins. En effet, bien que ces éléments ne soient plus considérés comme tumorigènes, la règlementation impose, par exemple, une quantité maximale de 10 ng d'ADN cellulaire par dose de vaccin injectable (Barrett *et al.,* 2009). Ces règlementations ne sont pas aussi strictes dans le cas de vaccins oraux tels que le vaccin contre la poliomyélite (OPV). Dans notre cas, nous constatons que les concentrations en ADN Vero sont comparables aux valeurs généralement obtenues dans le cadre de productions antérieures de ce vaccin prototype à l'échelle industrielle. Seules, les données de protéines totales sont un peu plus élevées que les valeurs habituelles, ce qui peut être expliqué par l'absence d'un module de filtration supplémentaire généralement présent en amont des filtres de clarification au cours du procédé industriel.

La culture des cellules Vero en bioréacteur en présence de substituts de la glutamine permet, sauf avec le pyruvate, l'obtention de concentrations cellulaires maximales similaires à celle du procédé en milieu de référence avec un changement de milieu supplémentaire à 120 h de culture. Ces milieux ne compromettent pas la production de virions infectieux. Par contre, la proportion de particules virales non infectieuses est supérieure dans la récolte virale filtrée. L'intérêt de ces formulations au niveau industriel doit être validé par des essais complémentaires et par l'analyse de la stabilité et des propriétés immunogéniques des virions produits.

4.3. Impact de la substitution de la glutamine sur l'extrapolation du procédé

La possibilité d'une modification du milieu de culture a été préalablement appliquée pour la phase de croissance cellulaire et la production virale. Dans cette partie, nous nous proposons d'étudier un procédé comportant une ou plusieurs phases de montée en échelle. De plus, chaque étape d'extrapolation nécessitera la mise en œuvre d'une trypsination des cellules. L'impact de la substitution de la glutamine sur cette étape délicate sera aussi envisagé.

4.3.1. Croissance cellulaire et production virale en milieu de référence et en présence de glutamax®

Afin de simuler une phase d'expansion cellulaire, une culture en milieu avec glutamax® a été réalisée en bioréacteur, avec un volume de culture de 2,5 l et 2 $g.l^{-1}$ de microsupports. Elle a été ensuite trypsinée pour ensemencer un volume de culture de 3 l avec 2,5 $g.l^{-1}$ de microsupports (voir le schéma ci-dessous). Parallèlement, une culture en milieu de référence a été réalisée comme témoin selon les mêmes procédures, avec cependant deux renouvellements de milieu supplémentaires.

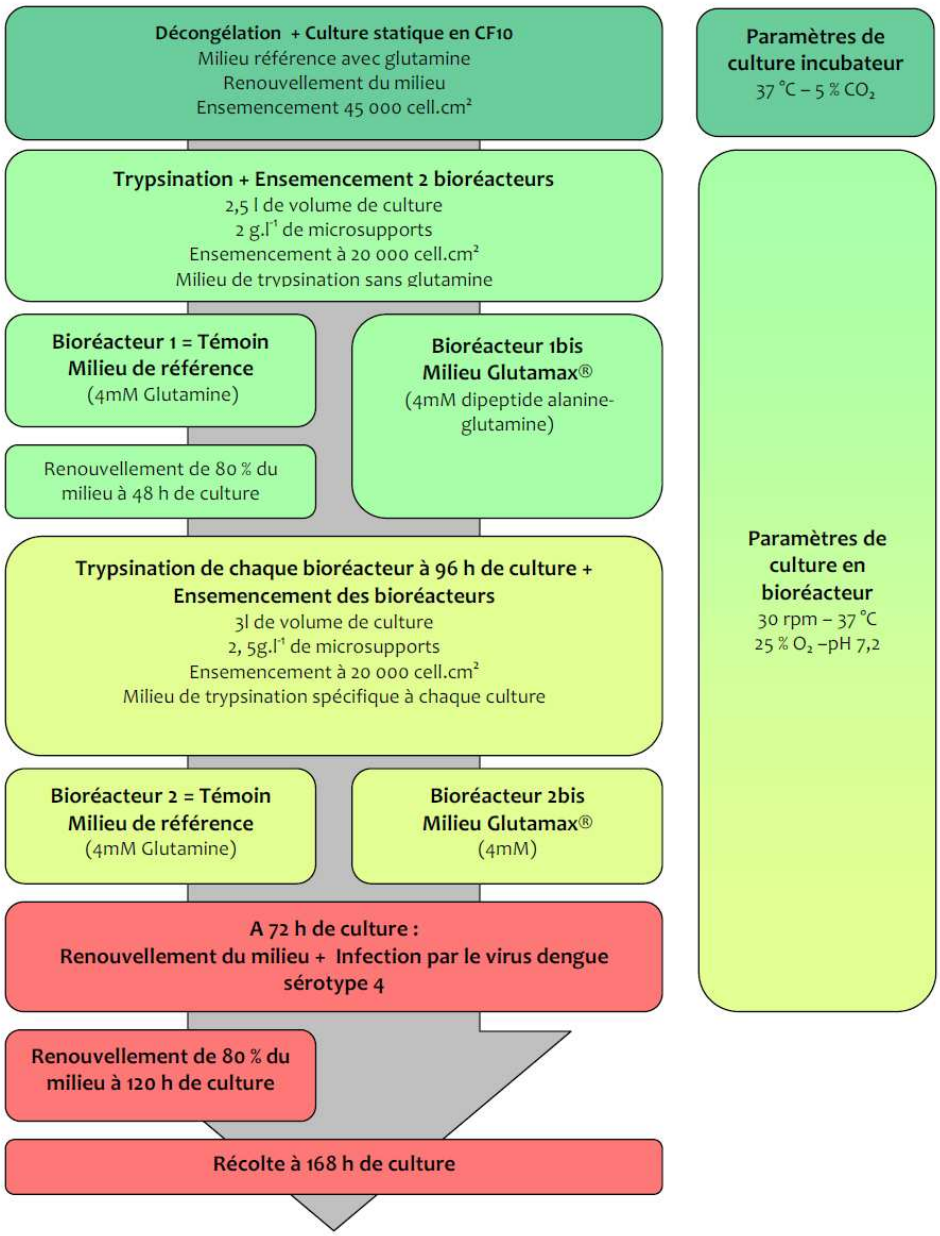


Figure 72. Procédé de production virale avec deux phases d'expansion cellulaire en bioréacteur dans le milieu de référence (3 renouvellements de milieu) et le milieu « Glutamax® » (1 renouvellement de milieu).

La première étape en mode discontinu a été réalisée pendant quatre jours avec un ensemencement de 2,75 × 10^5 cell.ml^{-1}. Par comparaison à la culture en milieu de référence avec renouvellement de milieu, la culture en présence de glutamax® sans renouvellement de milieu présente une croissance et une concentration cellulaire maximale similaire, respectivement de 18,2 × 10^5 cell.ml^{-1} et 19,1 × 10^5 cell.ml^{-1} (Figure 73). La deuxième phase discontinue a été ensemencée après 96 h à partir des cultures précédentes afin de mimer un changement d'échelle industriel. La phase de croissance cellulaire pour cette deuxième série a été poursuivie pendant 3 jours sans changement de milieu de culture. Les concentrations cellulaires atteintes après 72 h de culture, soit 168 h totales, sont similaires autour de 12 × 10^5 cell.ml^{-1}.

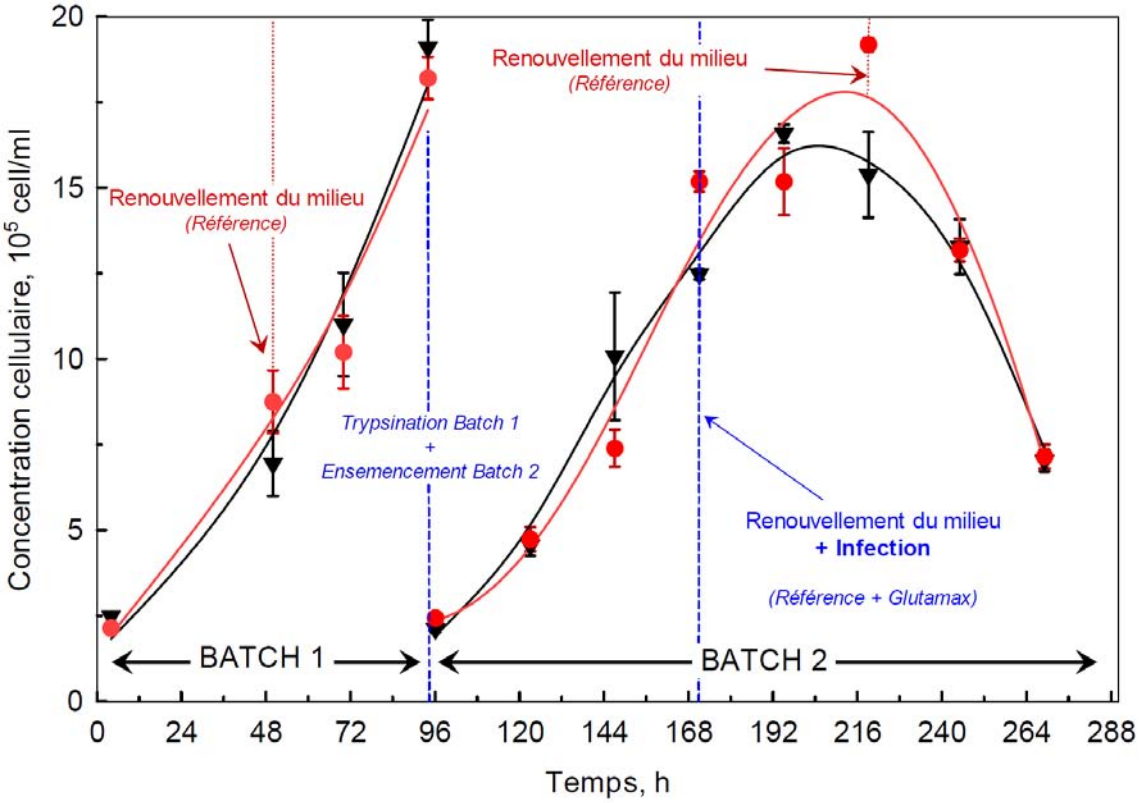


Figure 73. Cinétiques de croissance en bioréacteur au cours d'un procédé de production virale comportant deux phases d'expansion cellulaire, dans le milieu de référence avec 4 mM de glutamine (●) et dans le milieu « Glutamax® » (▼).

Après 72 h de culture, dans la deuxième phase les milieux ont été renouvelés dans les deux réacteurs avant l'infection par le la souche vaccinale et la production virale a ensuite été réalisée sur 4 jours. La cinétique de production virale, présentée dans le tableau 30, a été réalisée par titrage DICC50 sur les surnageants de culture à 48 h, 72 h et 96 h de culture post-infection. Dans le cas de ces cultures, les titres infectieux obtenus en fin de production virale sont plus élevés que ceux obtenus dans la partie précédente. On constate aussi que la production de particules infectieuses est doublée dans le cas de la culture en présence de glutamax® par rapport à la culture de référence, valeur augmentée par rapport à la production réalisée dans un procédé ne comprenant qu'une simple expansion cellulaire préalable à la production virale, contre deux phases d'expansion dans le cas présent.

Tableau 30. Titre viral de particules infectieuses (DICC50/ml) au cours d'un procédé de production virale comportant deux phases d'expansion cellulaire, dans le milieu de référence et le milieu « Glutamax® ». Les valeurs sont présentées en rapport à la concentration en particules infectieuses atteinte en fin de production virale pour le milieu de référence.

	Titre de particules virales infectieuses par rapport à la référence (%)	
Temps après infection	**Référence**	**Glutamax**
48 h	60	28
72 h	148	38
96 h	**100**	224
Récolte clarifiée	**100**	240
$\mathbf{Y_{Virus/X}}$	100	261

Ces résultats sont encourageants pour l'amélioration éventuelle des procédés existants car ils démontrent que la substitution de la glutamine ne réduit pas la production virale et peut même l'augmenter de façon significative tout en limitant le nombre de renouvellement de milieu dans le réacteur. Bien entendu, ces résultats sont à reproduire par de nouveaux essais afin de confirmer ces tendances, et des analyses complémentaires sont nécessaires pour évaluer la stabilité, la qualité et les propriétés vaccinales des virions produits dans ce procédé basé sur un formulation de milieu de référence où la glutamine est substitué par du glutamax®.

4.3.2. Influence du milieu de culture sur l'étape de trypsination

La maîtrise de l'étape de trypsination est essentielle dans un procédé de culture de cellules adhérentes car elle conditionne l'efficacité de l'extrapolation cellulaire. C'est pourquoi, l'étude de l'impact de la modification du milieu de culture sur cette étape a été mise en oeuvre. Au cours du procédé présenté dans la figure 73, le rendement de trypsination entre les étapes 1 et 2 était de 48 % en présence de glutamax® au lieu de 79 % dans le milieu de référence. Ces résultats ont été vérifiés lors de cultures en spinner. Avec des procédures de trypsination et un durée d'incubation de la trypsine à 37 °C identiques, la trypsination de cellules Vero en présence de glutamax® présente également de moins bonnes performances en spinner, ceci indépendamment du moment choisi au cours de la culture pour réaliser la trypsination.

Compte tenu de ces résultats indiquant un décollement des cellules peu efficace en présence de glutamax®, une étude plus approfondie a été réalisée pour améliorer son efficacité. Ainsi, à partir de cultures en boîtes statiques de 25 cm^2, plusieurs solutions de trypsination possédant des pouvoirs chélateurs variés ont été utilisées pour trypsiner les cellules Vero après 48 h de culture (Tableau 31). De plus, l'inhibition potentielle de la trypsine recombinante, soit, par la présence de glutamax®, soit, par d'autres molécules excrétées en cours de culture, a également été évaluée par un rinçage préalable du tapis cellulaire avec du PBS ou une solution au pouvoir chélateur contenant du citrate.

Tableau 31. Essais de trypsination cellulaire avec différentes conditions opératoires.

	Rinçage	**Solution de trypsination**	**Durée de trypsination (mn)**	**Viabilité cellulaire post trypsination (%)**
Milieu de Référence	Non	Citrate (25 mM)	6,5	93
	Non	Citrate (50 mM)	2,5	85
	Non	EDTA	2,5	78
	PBS	Citrate (25 mM)	4	97
	Citrate (25 mM)	Citrate (25 mM)	4	86
Milieu Glutamax®	Non	Citrate (25 mM)	10	75
	Non	Citrate (50 mM)	5,5	20
	Non	EDTA	5,5	67
	PBS	Citrate (25 mM)	4	95
	Citrate (25 mM)	Citrate (25 mM)	4	87

Contrairement au milieu de référence, dans le cas du milieu « Glutamax® », les meilleures conditions de trypsination ont été observées lorsque le tapis cellulaire était rincé avant la trypsination, indépendamment du pouvoir chélateur de la solution de rinçage. Ainsi, les moins bonnes performances de trypsination dans les cultures en bioréacteur, en présence de glutamax®, sont probablement liées à la présence d'inhibiteurs de la trypsine dans le milieu de culture à 96 h de culture. Afin de déterminer si le di-peptide alanine-glutamine (glutamax®) est lui-même inhibiteur de la trypsination, celui-ci a été rajouté à la solution de trypsination dans une expérience complémentaire sans observer d'effet. Ainsi, l'addition de glutamax® n'est pas à l'origine de l'inhibition de la trypsine recombinante.

Une autre hypothèse serait que les cellules Vero ont une matrice extracellulaire particulière lorsqu'elles sont cultivées en milieu « Glutamax® ». Cette hypothèse pourrait notamment être rapprochés des résultats obtenus dans le chapitre précédent avec la sonde Fogale (Résultats et discussion 3.1.2). En effet, nous avons pu constater que la capacitance des cellules Vero était plus faible dans le milieu « Glutamax® » que dans le milieu de référence, avec une augmentation potentielle de la capacitance membranaire, C_M.

Une procédure de trypsination, précédée du rinçage des cellules avec du PBS, a donc été évaluée avec des cellules adhérées sur des microporteurs lors d'un nouveau procédé d'expansion cellulaire en milieu « Glutamax® ». Dans ces conditions, le rendement de trypsination était de 72 % à 80 % au lieu de 48 % sans rinçage des cellules. Il est intéressant de remarquer que cette procédure permet alors d'atteindre le même rendement de trypsination qu'en milieu de référence. Cependant, cette procédure risque de complexifier le procédé, et d'autres stratégies doivent être approfondies.

Dans le cas de la mise en œuvre d'un procédé comportant plusieurs phases de montée en échelle, l'utilisation du glutamax® permet l'obtention de performances intéressantes, tant en croissance cellulaire qu'en production virale. Cette stratégie pourrait supprimer 2 des 3 changements de milieux effectués au cours de la culture de référence.

Conclusion

Ce chapitre s'est attaché à l'étude de cultures en bioréacteurs avec le souci de se rapprocher des procédures du procédé industriel. La synthèse des résultats est présentée dans la figure 83.

La comparaison de deux expansions cellulaires en bioréacteur et en spinner, avec changement du milieu après 48 h de culture, montre une croissance et des concentrations cellulaires maximales identiques dans les deux systèmes de culture à l'échelle du laboratoire. L'importance de l'apoptose cellulaire n'est pas modifiée, alors que la lyse est un peu plus élevée probablement en raison des contraintes de cisaillement liées au mode d'agitation. Le rendement de lactate produit par glucose consommé est sensiblement plus faible en réacteur, et pourrait être expliqué par un meilleur contrôle du pH et de la pO_2. De plus, l'utilisation d'un milieu dans lequel la glutamine est substituée par du glutamax® permet l'obtention de performances supérieures à celles observées en milieu de référence sans changement de milieu, sans toutefois atteindre le niveau de la culture avec recharge-récolte du milieu.

Le procédé de production virale a été mis en œuvre dans un réacteur de culture industriel en présence des différents milieux contenant des substituts de la glutamine qui avaient montré des performances intéressantes lors des cultures en spinners. Des croissances et productions virales similaires à la culture de référence ont été observées en présence d'asparagine ou de glutamax®, avec des performances plus faibles en présence de pyruvate. Ainsi, la substitution de la glutamine ne compromet pas la production de particules virales infectieuses par la souche vaccinale, même si la proportion de particules virales non infectieuses est supérieure dans la récolte virale filtrée. De plus, ces milieux permettent de supprimer le renouvellement de milieu réalisé 48 h après l'infection virale dans le cas de la culture de référence. Ces résultats sont à compléter par des études de l'impact de ces milieux sur la cinétique de production des particules non infectieuses en cours de procédé ainsi que sur la stabilité et les propriétés immunogéniques des virions produits.

Pour simuler la suite des étapes du procédé, deux cultures en milieu de référence et en milieu avec glutamax® ont été comparées en intégrant deux phases successives d'expansion cellulaire et une phase de production virale. Avec une croissance similaire à la culture de référence sur les deux phases d'expansion cellulaire et un titre viral peu, voire pas affecté, la mise au point d'un procédé de production en présence de glutamax® est donc tout à fait envisageable. De plus, l'étape de trypsination a été adaptée pour permettre des rendements de récupération cellulaire identiques.

En outre, ce milieu modifié présente l'avantage d'éviter les deux renouvellements de milieu intervenant pendant la première phase d'expansion cellulaire et deux jours après l'infection virale dans le cas de la culture de référence. Ceci correspond à une utilisation de milieu de culture réduite de 5 à 3 volumes de bioréacteur. La limitation des risques de contamination liés aux opérations d'introduction ou de soutirage du milieu de culture peut être aussi un atout.

En conclusion, ce chapitre démontre la bonne capacité de transfert à l'échelle du bioréacteur des résultats obtenus précédemment en spinners. Divers modes opératoires ont été mis en œuvre pour simuler les phases d'expansion cellulaire et de production virale. La substitution de la glutamine par du glutamax® apparaît comme une stratégie intéressante qui réduit la complexité du procédé et son coût, sans remettre en cause les concentrations cellulaires maximales ni la production virale. Il serait maintenant intéressant de valider les résultats obtenus sur une phase de culture avec la subtitution par l'asparagine sur deux phases de cultures de la même façon que pour le glutamax®. Une caractérisation plus fine des particules virales produites reste néanmoins à réaliser. Ces résultats contribuent, par les informations qu'ils apportent et les applications au procédé, au développement d'une stratégie PAT.

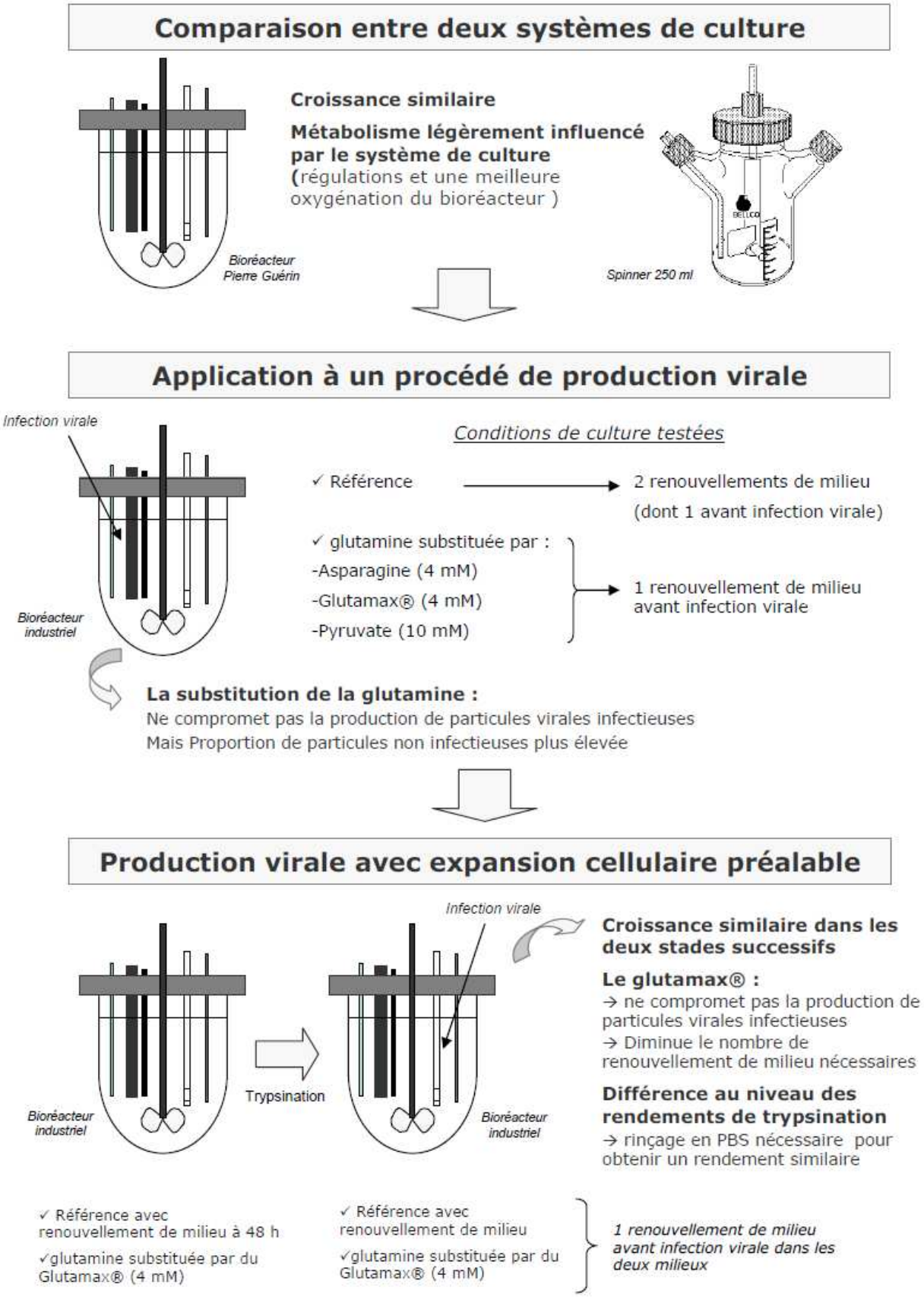


Figure 74. Synthèse des résultats d'extrapolation de la culture des cellules Vero et de la production virale

Conclusion générale & perspectives

Conclusion générale

L'objectif de ce travail était de contribuer au développement d'une stratégie PAT, au travers de l'amélioration de la compréhension et de la maîtrise du procédé de culture de cellules Vero. Cette lignée cellulaire, dédiée à la production de vaccins viraux, a été cultivée sur microporteurs dans un milieu sans sérum de référence. Après une étude globale du milieu de culture par criblage à petite échelle, des études cinétiques et métaboliques plus approfondies ont été réalisées en spinners. Puis, plusieurs techniques d'analyse ont été évaluées pour leur potentiel à suivre en-ligne le procédé de culture étudié. Enfin, des études en bioréacteurs dans des conditions plus proches de celles d'un procédé industriel ont été réalisées. Les principales contributions de nos travaux, rassemblées dans la Figure 75, vont tout d'abord être résumées ci-dessous, avant de proposer différentes perspectives visant à confirmer, compléter et élargir notre démarche.

Criblage de groupes de composés du milieu de référence

Le suivi de la croissance de cellules adhérentes est possible par l'analyse d'image de microplaques.
Le Cellscreen®, dédié à l'acquisition de la concentration de cellules en suspension (module PS) et de la surface occupée par des cellules adhérentes (module PA), a été adapté au cas spécifique des cellules adhérentes Vero. Une corrélation a été établie entre la surface occupée par les cellules et la concentration cellulaire déterminée par le module PS, elle-même corrélée à la concentration de cellules adhérentes.

Le criblage de milieux de culture en microplaques permet d'identifier rapidement l'impact de groupes de composés.
Le suivi de la croissance des cellules Vero en microplaques a été appliqué à une méthodologie de criblage par plan d'expériences. L'impact de 10 groupes de composés, issus du milieu de référence et ajoutés dans le milieu de référence dilué 20 fois a été étudié. De façon rapide et fiable, des effets bénéfiques, néfastes ou neutres sur la croissance des cellules Vero ont été mis en évidence. Les effets remarquables sont, notamment, l'amélioration de la croissance en présence d'un mélange d'hydrolysats peptidiques et de facteurs de croissance, ou l'impact néfaste des acides aminés associés à la vitamine B1 et à des sels. Nous avons également identifié des groupes de composés n'ayant pas d'effet particulier sur la croissance de la cellule Vero.

Les effets observés en microplaques sont transposables en système de culture agité.

Certains des effets observés en plaque 96-puits ont été confirmés en système de culture en mode agité lors de cultures en spinners de 250 ml avec les cellules adhérées sur des microporteurs. L'extrapolation des résultats du criblage a donc été vérifiée.

A partir du criblage, le milieu de culture de référence peut être rapidement simplifié et amélioré.

Le couplage de l'analyse des cellules par le Cellscreen® avec une méthodologie de criblage a permis, après identification des effets de groupes de composés sur la croissance des cellules Vero, de proposer une amélioration ou une simplification du milieu de culture, en supprimant ou en rajoutant dans le milieu certains des groupes de composés.

Etude cinétique de la culture de cellules Vero en milieu sans sérum

Dans le milieu de référence sans sérum, le métabolisme carboné central de la cellule Vero est peu orienté vers la croissance.

Une approche ciblée sur quelques molécules spécifiques du milieu de culture (glucose, glutamine, acides aminés, lactate, ions ammonium) nous a permis d'acquérir une meilleure connaissance qualitative et quantitative du comportement des cellules Vero cultivées sur microporteurs en milieu sans sérum. Nous avons caractérisé de façon cinétique une culture en milieu de référence en ce qui concerne la croissance, la mort et le métabolisme cellulaires. Nous avons ainsi montré que la croissance des cellules Vero est limitée en milieu de référence, soit, par une déplétion de la glutamine en cours de culture, soit, par une accumulation importante de lactate. Nous avons pu aussi percevoir que, dans le milieu de référence, les deux substrats carbonés majeurs, glucose et glutamine, étaient principalement convertis en métabolites toxiques pour la croissance avec de forts rendements. Le métabolisme de la cellule Vero est donc peu efficace dans ce milieu de culture.

La saturation du métabolisme carboné central des cellules Vero est induite par une forte accumulation de pyruvate intracellulaire.

L'analyse cinétique détaillée de la croissance, du métabolisme intra- et extra-cellulaire a permis de conclure à une saturation du métabolisme carboné central lors de la mise en culture de cellules Vero dans le milieu de référence. Cette saturation a été observée premièrement par une forte production de lactate, ainsi que par l'accumulation d'acides aminés tels que le glutamate et l'alanine dans le surnageant de culture, mais aussi directement par la mise en évidence d'une forte concentration intracellulaire de pyruvate au cours de la culture.

Le renouvellement du milieu ou l'ajout ponctuel de glutamine améliorent la croissance des cellules sans ré-équilibrer le métabolisme carboné.

Nous avons montré par l'étude cinétique de la croissance cellulaire au cours de cultures réalisées, soit, avec un renouvellement de milieu à 48 ou 72 h, soit, avec un ajout de glutamine, que la concentration cellulaire maximale atteinte est augmentée de plus de 50 %. Cependant, l'efficacité du métabolisme cellulaire n'est pas améliorée par ces stratégies car la production de métabolites potentiellement toxiques pour la croissance n'est pas réduite et peut même être augmentée.

Un flux de carbone réduit par la substitution du glucose et de la glutamine permet d'améliorer le métabolisme carboné central.

Des stratégies d'adaptation du milieu de culture permettant de ré-équilibrer le métabolisme cellulaire par un apport ralenti en substrats carbonés ont été développées. Pour ce faire, la substitution du glucose par le fructose et la substitution de la glutamine par le glutamax®, l'asparagine et le pyruvate, ont été envisagées. Dans le cas de la culture avec fructose, malgré une croissance cellulaire identique et une participation plus élevée de la glutamine au métabolisme énergétique, l'utilisation du carbone est améliorée. Grâce à la stratégie de substitution de la glutamine, nous sommes parvenus à limiter la saturation du métabolisme cellulaire, soit, par un approvisionnement plus ralenti du métabolisme carboné central (glutamax®, asparagine), soit par une alimentation directe du cycle de Krebs en court-circuitant la glycolyse (pyruvate). Les cultures réalisées avec substitution de la glutamine ont présenté, en plus d'un métabolisme plus équilibré, des croissances cellulaires améliorées et une réduction de la mort par apoptose.

Développement et évaluation de nouveaux outils d'analyse en ligne

Suite à la meilleure compréhension du comportement des cellules Vero, la démarche PAT a été élargie à la mise en oeuvre et à l'évaluation de nouveaux outils d'analyse en-ligne implantés sur le bioréacteur. L'adaptation de ces outils aux cellules Vero a nécessité la prise en compte des particularités d'une culture de cellules adhérentes-dépendantes, telles que la présence de microporteurs et les caractéristiques morphologiques des cellules. Les spectroscopies diélectrique, Raman et Proche Infrarouge, ont été choisies pour cette étude sur la base de leur potentiel et de la possibilité d'adaptation à une culture de cellules adhérentes.

- **Spectroscopie diélectrique**

Le suivi en-ligne de la concentration de cellules Vero sur microporteurs est possible par mesure de la permittivité.

Le suivi de la concentration cellulaire jusqu'à une concentration maximale de 10^6 cell.ml^{-1} a pu être mis au point par mesure de la permittivité dans le réacteur de culture. En effet, la permittivité donne une information sur le biovolume cellulaire, transposable à la densité cellulaire uniquement dans le cas où la taille cellulaire est constante.

La modification ou le renouvellement du milieu peuvent influencer l'estimation de la concentration cellulaire, en particulier quand la taille cellulaire évolue.

La permittivité mesurée pour des concentrations similaires de cellules Vero est réduite en milieu contenant du glutamax par rapport à celle mesurée dans le milieu de référence. La taille et la capacitance membranaire des cellules peuvent être responsable de la réduction de la permittivité par cellule lors du changement de milieu. Lorsque le milieu est renouvelé en cours de phase exponentielle de croissance, l'augmentation de la concentration cellulaire au-delà de 10^6 cell.ml^{-1} implique une saturation de la surface des microporteurs et une réduction de la taille cellulaire. La mesure de permittivité ne permet plus alors le suivi de la concentration des cellules adhérentes.

L'augmentation rapide de l'apoptose cellulaire peut être détectée en ligne par spectroscopie diélectrique.

Une analyse multifréquence nous a permis de détecter le moment de l'accélération de l'apoptose cellulaire en fin de culture, grâce au suivi de l'évolution de la fréquence caractéristique de la population cellulaire, f_c. Ainsi, l'annulation de la dérivée de l'évolution de ce paramètre correspond au moment de la forte augmentation des cellules apoptotiques. Ce résultat a été vérifié pour toutes les conditions de culture testées.

- **Spectroscopie Raman**

Des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer l'intérêt de la spectroscopie Raman dans le suivi en-ligne de procédés de culture de cellules animales.

La spectroscopie Raman a été évaluée pour le suivi de l'évolution de la culture, afin de s'inscrire dans une démarche "qualité " par l'acquisition d'une "signature" du contenu du réacteur. Aucune information caractéristique n'a pu être identifiée à partir des données obtenues sur le milieu de culture. Par contre, de façon prometteuse, nous avons identifié différents marqueurs de la phase de croissance cellulaire à partir des spectres Raman, tels que le pic de phénylalanine ou le ratio des pics situés dans la région de 830 à 1004 cm^{-1}.

- **Spectroscopie Proche Infrarouge**

L'analyse en ligne du glucose et du lactate par spectroscopie proche infrarouge a été étudiée pour la première fois avec des cellules Vero.

La calibration de la spectroscopie proche infrarouge a été mise en œuvre pour la quantification du glucose et du lactate dans différentes conditions de cultures, en tenant compte de l'évolution du milieu « matrice » au cours du temps, ainsi que des potentielles corrélations entre les métabolites quantifiés. Cette calibration de la spectroscopie proche infrarouge nous a permis de quantifier de façon fiable et robuste les concentrations de glucose et de lactate au cours d'un procédé de culture de cellules Vero adhérentes avec des précisions de mesure de l'ordre de 0,3 à 0,4 $g.l^{-1}$.

Les caractéristiques propres aux cellules adhérentes sur microsupports doivent être prises en compte lors de la calibration de la méthode en bioréacteur

Nous avons développé une technique de calibration de la spectroscopie proche infrarouge, dédiée à une culture de cellules adhérentes Vero. Elle prend en compte les paramètres spécifiques d'un procédé de culture de cellule adhérentes, susceptibles d'influencer la calibration comme, la présence de microporteurs, l'opération de recharge-récolte, l'étape de trypsination, la variation de la concentration en microporteurs. Pour ce faire, cette calibration a été réalisée directement dans le bioréacteur, soit, par des échantillons prélevés en cours de culture, soit, par des conditions standards mise en œuvre spécifiquement pour la calibration.

La spectroscopie diélectrique et la spectroscopie proche infrarouge sont deux outils intéressants pour le développement d'une stratégie PAT.

Ces technologies permettent d'envisager le suivi en-ligne, au cours du procédé de culture, de la densité cellulaire, de l'apoptose cellulaire et de divers composés du milieu de culture. Pour la première fois, leur utilisation a été montrée dans le cas de cultures de cellules Vero cultivées sur microporteurs. Elles peuvent aussi participer à des stratégies de limitation des risques dans les procédés de production industriels basés sur la croissance de cellules Vero.

Cultures en bioréacteurs et application à une production virale

Afin de conclure notre démarche et de poursuivre dans une dynamique PAT, les principales améliorations du procédé de culture ont été appliquées à un procédé de production de vaccin prototype contre la dengue par des cellules Vero.

Les tendances observées pour les cultures en spinners ont été confirmées en bioréacteurs.
Les tendances cinétiques concernant la croissance, la mort et le métabolisme cellulaires observées en spinner, système de culture non régulé, ont été confirmées en bioréacteur dans lesquels le pH et pO_2 sont contrôlés. Par exemple, des concentrations cellulaires maximales similaires ont été atteintes.

La substitution de la glutamine par diverses molécules, en bioréacteurs industriels, permet une croissance cellulaire identique sans compromettre la production de particules virales infectieuses.
Dans le cas de cultures en réacteurs industriels, la croissance cellulaire dans les milieux avec glutamine substituée, sauf pour le pyruvate, est identique à celle observée en milieu de référence. De plus, le titre infectieux est similaire, voire augmenté, lors de la substitution de la glutamine. Néanmoins, cette substitution induit l'augmentation de la proportion de particules non infectieuses présentes dans le surnageant de culture clarifié par rapport à la culture en milieu de référence.

L'utilisation du glutamax® limite les renouvellements de milieu pendant l'expansion cellulaire et la production virale.
Ces nouvelles formulations de milieu avec substitution de la glutamine ont aussi été mises en œuvre lors d'une production en deux phases mimant l'extrapolation industrielle et comprenant une phase d'expansion cellulaire et une phase de production virale après trypsination et ensemencement d'un nouveau réacteur. Les résultats préliminaires réalisés pour la culture en présence de « Glutamax® » sont encourageants, avec une croissance et un titre viral infectieux similaires à la culture de référence. De plus, la substitution de la glutamine a permis de réduire le nombre de renouvellements de milieu, limitant ainsi les opérations à réaliser en cours de procédé et réduisant significativement la quantité de milieu utilisée.

Un procédé de culture mieux compris, mieux contrôlé …

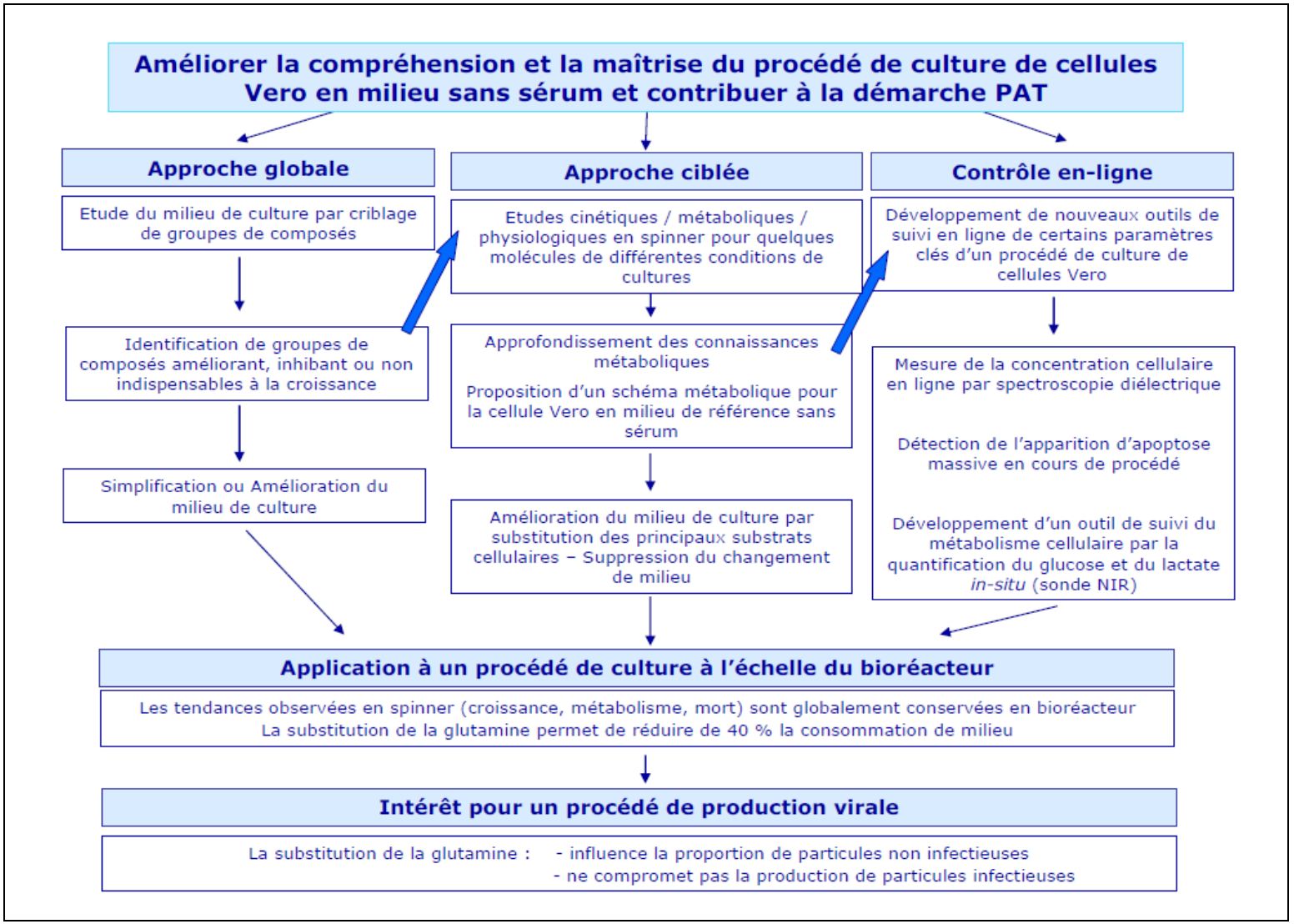


Figure 75. Synthèse des conclusions obtenues au cours de ces travaux de thèse

Perspectives

Nos travaux ont conduit à l'amélioration d'un procédé de culture de cellules Vero par la sélection de formulations de milieux plus spécifiques aux besoins de ces cellules, basées sur la substitution des deux sources de carbone, glucose et glutamine. L'amélioration de ce milieu de culture pourrait être prolongée en considérant d'autres éléments du milieu. La méthode de criblage établie dans cette étude avec le Cellscreen® peut se révéler intéressante pour une future optimisation du milieu de culture, sur la base de composés ayant présenté un intérêt, tels que l'insuline, l'EGF et les hydrolysats peptidiques. Il serait par ailleurs intéressant de s'attarder sur l'impact de tels composés vis-à-vis de l'état métabolique et physiologique des cellules Vero en culture.

Cette étude a aussi apporté une meilleure compréhension de la physiologie des cellules Vero cultivées en milieu sans sérum, notamment par des analyses cinétiques détaillées de la croissance, du métabolisme et de la mort cellulaires. Néanmoins, une modélisation macroscopique du comportement des cellules Vero, prenant en compte l'influence de l'afflux de carbone aux carrefours métaboliques identifiés comme prépondérants (ex. pyruvate), confirmerait et appuierait notre analyse des mécanismes métaboliques mis en jeu dans les différents milieux que nous avons testés. D'autre part, une analyse des flux métaboliques, MFA, pourrait aussi être une méthode pertinente pour compléter ces travaux.

Des améliorations du procédé de production virale par des cellules Vero ont été proposées. Cependant, il serait important de comprendre plus précisément l'influence de l'environnement cellulaire et du milieu de culture sur la qualité de la production virale. En effet, cette étude devrait être complétée par un suivi cinétique de la proportion de particules virales infectieuses/non infectieuses. Ceci permettrait de déterminer la phase impliquée dans l'augmentation de cette proportion en milieu sans glutamine (croissance, lyse cellulaire ou clarification). D'autre part, s'il s'avère que cette proportion est conservée durant toute la phase de production virale, il serait alors important d'étudier l'évolution du métabolisme intracellulaire avant et après infection virale afin de mieux identifier les besoins cellulaires au cours de la phase de production et de proposer une formulation de milieu mieux adaptée.

Le développement de technologies pour le suivi en ligne de la concentration de cellules, de glucose et de lactate, ainsi que la détection de l'augmentation de l'apoptose cellulaire en fin de culture, est un élément majeur pour la mise en œuvre du PAT dans les procédés de culture de cellules animales. Cependant, le suivi de nombreux autres paramètres n'est toujours pas accessible par des mesures en ligne.

Ainsi, la concentration de produits formés, que ce soit des protéines recombinantes ou des virus (particules virales infectieuses et non infectieuses) serait un élément prépondérant pour la maîtrise des procédés de production. De la même façon, nous avons montré que l'absence de glutamine pouvait avoir un impact important sur la croissance des cellules Vero et que la consommation ou la production d'acides aminés pouvait être un indicateur de l'état métabolique des cellules. Ces composés peuvent donc aussi être des éléments importants à quantifier en ligne pour contrôler l'évolution d'un procédé. Au vu des résultats obtenus pour le glucose et le lactate, la spectroscopie proche infrarouge est une technologie très prometteuse pour ce type d'application. Une autre application cruciale serait de pouvoir piloter l'alimentation d'un réacteur de culture grâce à la mesure des concentrations de substrats en temps réel par la spectroscopie proche infrarouge, dans le cadre de productions basées sur des procédés semi-continus.

Le suivi de la croissance cellulaire, via la quantification des cellules adhérées en ligne, est aussi un élément prépondérant pour le contrôle du procédé de culture. La spectroscopie diélectrique a été adaptée à la culture de cellules Vero. Cependant, elle est limitée par la variation de taille des cellules en cours de procédé, non pris en compte par le modèle de la permittivité basé sur des cellules sphériques. Afin de poursuivre ce travail, il serait intéressant, de mesurer l'évolution de la taille cellulaire en cours de culture par des méthodes externes telles que la cytométrie, afin de pouvoir identifier précisément son impact sur la permittivité. De plus, afin de mieux décrire l'évolution de la population cellulaire à la surface des microsupports, un modèle spécifique des cellules adhérées sur supports doit être établi pour modéliser l'évolution de la permittivité. Cette technologie présente aussi d'autres potentialités dans le cadre de cultures de cellules Vero. Ainsi, il serait envisageable de déterminer l'impact de l'infection et de la production virale sur le signal de permittivité mesuré, et, par la suite, de se servir de cette technologie pour déterminer le moment d'infection optimal et de récolte, la qualité de la récolte ou la concentration de virus produit. Ainsi, les outils que nous avons développés peuvent être appliqués en temps qu'élément de diagnostic dans une stratégie de prévention des risques notamment pour permettre la prise de décision lors d'une production.

Dans l'idéal, il s'agirait de pouvoir suivre la production grâce à des capteurs en ligne et de déterminer si son évolution est satisfaisante et en adéquation avec une « signature » pré-établie du procédé. C'est pourquoi, l'acquisition d'une « empreinte » du procédé de culture par spectroscopie Raman présente un intérêt. Néanmoins, cette technologie nécessite encore d'être développée par la mise en place d'analyse chimiométrique des spectres des surnageants et des études plus poussées de l'impact des microsupports sur les spectres. Par ailleurs, il faut noter que la spectroscopie proche infrarouge peut aussi être mise en œuvre pour réaliser une « empreinte » spectroscopique d'un procédé de culture classique.

Ainsi, nos travaux apportent une contribution importante pour la compréhension des procédés de culture de cellules Vero en milieu sans sérum. Ils ouvrent néanmoins un large champ d'investigations quant à l'application de ces résultats pour les procédés de culture basés sur la lignée Vero. Le développement de la stratégie PAT pour les procédés de culture de cellules animales est encore très récent. C'est pourquoi, malgré les avancées proposées ici pour les cellules Vero adhérentes, il reste nécessaire d'apporter des connaissances supplémentaires quant à son comportement physiologique et métabolique. A terme, pourrait ainsi être envisagée la mise en œuvre de procédés de production par la cellule Vero cultivée sans sérum, de façon plus optimisée, maîtrisée et contrôlée…

Bibliographie

A

Al-Rubeai, M. and Singh, R. P. (1998)
"Apoptosis in cell culture." *Current Opinion in Biotechnology* 9 (2): 152-156.

Al-Rubeai, M., Singh, R. P., Goldman, M. H. and Emery, A. N. (1995)
"Death mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation." *Biotechnology and Bioengineering* 45 (6): 463-472.

Altamirano, C., Illanes, A., Becerra, S., Cairó, J. J. and Gòdia, F. (2006)
"Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose." *Journal of Biotechnology* 125 (4): 547-556.

Ansorge, S., Esteban, G. and Schmid, G. (2007a)
"On-line monitoring of infected Sf-9 insect cell cultures by scanning permittivity measurements and comparison with off-line biovolume measurements." *Cytotechnology* 55 (2): 115-124.

Ansorge, S., Henry, O., Aucoin, M., Voyer, R., Carvell, J. and Kamen, A. (2007b).
Monitoring the cell size distribution of mammalian cell cultures using on-line capacitance measurements ESACT meeting. Dresden.

Apt, D., Raviprakash, K., Brinkman, A., Semyonov, A., Yang, S., Skinner, C., Diehl, L., Lyons, R., Porter, K. and Punnonen, J. (2006)
"Tetravalent neutralizing antibody response against four dengue serotypes by a single chimeric dengue envelope antigen." *Vaccine* 24 (3): 335-344.

Arden, N. and Betenbaugh, M. J. (2004)
"Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition." *Trends in Biotechnology* 22 (4): 174-180.

Arden, N. and Betenbaugh, M. J. (2006)
"Regulating apoptosis in mammalian cell cultures." *Cytotechnology* 50 (1): 77-92.

Arnold, S. A., Crowley, J. , Woods, N. , Harvey, L. M. , McNeil, B. (2003)
"In-situ near infrared spectroscopy to monitor key analytes in mammalian cell cultivation." *Biotechnology and Bioengineering* 84 (1): 13-19.

Arnold, S. A., Gaensakoo, R., Harvey, L. M. and McNeil, B. (2002)
"Use of at-line and *in-situ* near-infrared spectroscopy to monitor biomass in an industrial fed-batch *Escherichia coli* process." *Biotechnology and Bioengineering* 80 (4): 405-413.

B

Barbouche, N. (2008)
"Réponse biologique de cellules animales à des contraintes hydrodynamiques : simulation numérique, expérimentation et modélisation en bioréacteurs de laboratoire." *PHD. INPL. Procédés Biotechnologiques et alimentaires*: 349.

Barngrover, D., Thomas, J. and Thilly, W. G. (1985)
"High density mammalian cell growth in Leibovitz bicarbonate-free medium: effects of fructose and galactose on culture biochemistry." *Journal of cell science* 78 (1): 173-189.

Barrett, P. N., Mundt, W., Kistner, O. and Howard, M. K. (2009)
"Vero cell platform in vaccine production: Moving towards cell culture-based viral vaccines." *Expert Review of Vaccines* 8 (5): 607-618.

Benslimane, C., Elias, C. B., Hawari, J. and Kamen, A. (2005)
"Insights into the central metabolism of Spodoptera frugiperda (Sf-9) and Trichoplusia ni BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5) insect cells by radiolabeling studies." *Biotechnology Progress* 21 (1): 78-86.

Bente, D. A., Melkus, M. W., Garcia, J. V. and Rico-Hesse, R. (2005).
Dengue Fever in Humanized NOD/SCID Mice. **79:** 13797-13799.

Blute, T. (1988)
"Cell density measurements in hollow fiber bioreactors." *Biotechnology Progress* 4 (4): 202-209.

Bradamante, S. (2004)
"Simulated weightlessness in the design and exploitation of a NMR-compatible bioreactor." *Biotechnology Progress* 20 (5): 1454-1459.

Butler, M., Burgener, A., Patrick, M., Berry, M., Moffatt, D., Huzel, N., Barnabe, N. and Coombs, K. (2000)
"Application of a Serum-Free Medium for the Growth of Vero Cells and the Production of Reovirus." *Biotechnology Progress* 16 (5): 854-858.

Butler, M., Huzel, N., Barnabé, N., Gray, T. and Bajno, L. (1999)
"Linoleic acid improves the robustness of cells in agitated cultures." *Cytotechnology* 30 (1): 27-36.

C

Cannizzaro, C., Gügerli, R., Marison, I. and Stockar, U. v. (2003)
"On-line biomass monitoring of CHO perfusion culture with scanning dielectric spectroscopy." *Biotechnology and Bioengineering* 84 (5): 597-610.

Card, C., Hunsaker, B., Smith, T. and Hirsch, J. (2007)
"Rapid, Simultaneous Monitoring of Multiple Components in Mammalian Cell Culture with Near-Infrared Spectroscopy." *Thermo Fisher Scientific* Application Note: 51449.

Carvell, J. and Dowd, J. (2006)
"On-line Measurements and Control of Viable Cell Density in Cell Culture Manufacturing Processes using Radio-frequency Impedance." *Cytotechnology* 50 (1): 35-48.

Castle, P. and Robertson, J. S. (1998)
"Animal Sera, Animal Sera Derivatives and Substitutes Used in the Manufacture of Pharmaceuticals." *Biologicals* 26 (4): 365-368.

Cavinato, A. G., Mayes, D. M., Ge, Z. and Callis, J. B. (1990)
"Noninvasive method for monitoring ethanol in fermentation processes using fiber-optic near-infrared spectroscopy." *Analytical chemistry* 62 (18): 1977-1982.

Chan, Y. F. and Abubakar, S. (2003)
"Enterovirus 71 infection induces apoptosis in Vero cells." *The Malaysian journal of pathology* 25 (1): 29-35.

Chaturvedi , U. C., Shrivastava, R. and Nagar, R. (2005)
"Dengue vaccines: problems and prospects.
." *The Indian Journal Medecal Research* 121 (5): 639-52.

Chen, K., Liu , Q., Xie, L., Sharp, P. A. and Wang, D. I. C. (2001)
"Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production." *Biotechnology & Bioengineering* 72 (1): 55-61.

Chen, P. and Harcum, S. W. (2005)
"Effects of amino acid additions on ammonium stressed CHO cells." *Journal of Biotechnology* 117 (3): 277-286.

Chen, Y., Maguire, Hileman, R., Fromm, J., Esko, J., Linhardt, R. and Marks, R. (1997)
"Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate." *Nature medicine* 3 (8): 866-71.

Chen, Y., Maguire, T. and Marks, R. M. (1996)
"Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells." *Journal of Virology* 70 (12): 8765-8772.

Cheung, J. O. P., Casals-Pascual, C., Roberts, D. J. and Watt, S. M. (2007)
"A small-scale serum-free liquid cell culture model of erythropoiesis to assess the effects of exogenous factors." *Journal of Immunological Methods* 319 (1-2): 104-117.

Chisti, Y. (2000)
"Animal-cell damage in sparged bioreactors." *Trends in Biotechnology* 18 (10): 420-432.

Christie, A. and Butler, M. (1994)
"Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase." *Journal of Biotechnology* 37 (3): 277-290.

Christie, A. and Butler, M. (1999)
"The adaptation of bhk cells to a non-ammoniagenic glutamate-based culture medium." *Biotechnology and Bioengineering* 64 (3): 298-309.

Chung, J. D., Zabel, C., Sinskey, A. J. and Stephanopoulos, G. (1997)
"Extension of Sp2/0 hybridoma cell viability through interleukin-6 supplementation." *Biotechnology and Bioengineering* 55 (2): 439-446.

Coroadinha, A. S., Ribeiro, J. and Carrondo, M.J.T. (2006)
"Effect of medium sugar source on the production of retroviral vectors for gene therapy." *Biotechnology and Bioengineering* 94 (1): 24-36.

Croughan, M. S., Hamel, J.-F. and Wang, D., I. C. (2006)
"Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures." *Biotechnology and Bioengineering* 95 (2): 295-305.

Cruz, H. J., Moreira, J. L. and Carrondo, M. J. T. (1999)
"Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells." *Biotechnology and Bioengineering* 66 (2): 104-113.

Cruz, H. J., Moreira, J. L. and Carrondo, M. J. T. (2000)
"Metabolically optimised BHK cell fed-batch cultures." *Journal of Biotechnology* 80 (2): 109-118.

D

Darakhshan, F., Hajduch, E., Kristiansen, S., Richter, E. A. and Hundal, H. S. (1998)
"Biochemical and functional characterization of the GLUT5 fructose transporter in rat skeletal muscle." *Biochemitry Journal.* 336 (2): 361-366.

De Meerschman, F., Rettignera, C., Focant, C., Boreux, R., Pinset, C., Leclipteux, T. and Losson, B. (2002)
"Use of a serum-free medium to produce in *vitro Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii tachyzoites* on vero cells." *Veterinary Research* 33 (2): 159-168.

Dorai, H., Kyung, Y. S., Ellis, D., Kinney, C., Lin, C., Jan, D., Moore, G. and J. Betenbaugh, M. (2009)
"Expression of anti-apoptosis genes alters lactate metabolism of Chinese Hamster Ovary cells in culture." *Biotechnology and Bioengineering* 103 (3): 592-608.

Doverskog, M., Ljunggren, J., Ohman, L. and Haggstrom, L. (1997)
"Physiology of cultured animal cells." *Journal of Biotechnology* 59 (1-2): 103-115.

Doyle, C. and Butler, M. (1990)
"The effect of pH on the toxicity of ammonia to a murine hybridoma." *Journal of Biotechnology* 15 (1-2): 91-100.

Drugmand, J.-C. (2007)
"Characterization of insect cell lines is required for appropriate industrial processes : case of study of high-five cells for recombinant protein production." PhD. Université catholique de Louvain. Institut des sciences de la vie: 228.

Ducommun, P., Bolzonella, I., Rhiel, M., Pugeaud, P., von Stockar, U. and Marison, I. W. (2001)
"On-line determination of animal cell concentration." *Biotechnology and Bioengineering* 72 (5): 515-522.

Ducommun, P., Kadouri, A., von Stockar, U. and Marison, I. W. (2002)
"On-line determination of animal cell concentration in two industrial high-density culture processes by dielectric spectroscopy." *Biotechnology and Bioengineering* 77 (3): 316-323.

Duval, D., Demangel, C., Geahel, I., Blondeau, K. and Marcadet, A. (1990)
"Comparison of various methods for monitoring hybridoma cell proliferation." *Journal of Immunological Methods* 134 (2): 177-185.

E

Eagle, H., Barban, S., Levy, M. and Schulze, H. O. (1958)
"The Utilization of Carbohydrates by Human Cell Cultures." *Journal of Biological Chemistry* 233 (3): 551-558.

Europa, A. F., Gambhir, A., Fu, P.-C. and Hu, W.-S. (2000)
"Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells." *Biotechnology and Bioengineering* 67 (1): 25-34.

Eyer, K. and Heinzle, E. (1996)
"On-line estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing and redox potential measurement." *Biotechnology and Bioengineering* 49 (3): 277-283.

F *comme fin, enfin ...*

Franco-Lara, E., Link, H. and Weuster-Botz, D. (2006)
"Evaluation of artificial neural networks for modelling and optimization of medium composition with a genetic algorithm." *Process Biochemistry* 41 (10): 2200-2206.

Franěk, F. and Šrámková, K. (1997)
"Cell suicide in starving hybridoma culture: survival-signal effect of some amino acids." *Cytotechnology* 23 (1): 231-239.

Frazatti-Gallina, N. M., Mourao-Fuches, R. M., Paoli, R. L., Silva, M. L. N., Miyaki, C., Valentini, E. J. G., Raw, I. and Higashi, H. G. (2004)
"Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium." *Vaccine* 23 (4): 511-517.

Fuchs, B. C. and Bode, B. P. (2006)
"Stressing Out Over Survival: Glutamine as an Apoptotic Modulator." *Journal of Surgical Research* 131 (1): 26-40.

G

Genzel, Y., Behrendt, I., König, S., Sann, H. and Reichl, U. (2004)
"Metabolism of MDCK cells during cell growth and influenza virus production in large-scale microcarrier culture." *Vaccine* 22 (17-18): 2202-2208.

Genzel, Y., Ritter, J. B., Konig, S., Alt, R. and Reichl, U. (2005)
"Substitution of Glutamine by Pyruvate To Reduce Ammonia Formation and Growth Inhibition of Mammalian Cells." *Biotechnology Progress* 21 (1): 58-69.

Germi, R., Crance, J.-M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W. H., Zarski, J.-P. and Drouet, E. (2002)
"Heparan Sulfate-Mediated Binding of Infectious Dengue Virus Type 2 and Yellow Fever Virus." *Virology* 292 (1): 162-168.

Giepmans, B. N. G., Adams, S. R., Ellisman, M. H. and Tsien, R. Y. (2006)
"The fluorescent toolbox for assessing protein location and function." *Science* 312 (5771): 217-224.

Gillies, R. and Gatenby, R. (2007)
"Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis?" *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 39 (3): 251-257.

Girard, P., Jordan, M., Tsao, M. and Wurm, F. M. (2001)
"Small-scale bioreactor system for process development and optimization." *Biochemical Engineering Journal* 7 (2): 117-119.

Godia, F., Cairo, J. J., Panesar, P. S. and Kennedy, J. F. (2006)
"S.S. Ozturk and W.-S. Hu, Editors, Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA (2006)." *International Journal of Biological Macromolecules* 39 (4-5): 321-321.

Gregoriades, N., Clay, J., Ma, N., Koelling, K. and Chalmers, J., J. (2000)
"Cell damage of microcarrier cultures as a function of local energy dissipation created by a rapid extensional flow." *Biotechnology and Bioengineering* 69 (2): 171-182.

Guirakhoo, F., Pugachev, K., Zhang, Z., Myers, G., Levenbook, I., Draper, K., Lang, J., Ocran, S., Mitchell, F., Parsons, M., Brown, N., Brandler, S., Fournier, C., Barrere, B., Rizvi, F., Travassos, A., Nichols, R., Trent, D. and Monath, T. (2004).
Safety and Efficacy of Chimeric Yellow Fever-Dengue Virus Tetravalent Vaccine Formulations in Nonhuman Primates. **78:** 4761-4775.

Guirakhoo, F., Morrison R., Forrat, K., McCarthy, R., Nichols, S., Yoksan, X., Duan, T. H., Ermak, N., Kanesa-thasan, P., Bedford, J., Lang, Quentin-Millet, M.-J., and Monath, T. P. (2006)
"Live Attenuated Chimeric Yellow Fever Dengue Type 2 (ChimeriVax™-DEN2) Vaccine: Phase I Clinical Trial for Safety and Immunogenicity: Effect of Yellow Fever Pre-immunity in Induction of Cross Neutralizing Antibody Responses to All." *Human Vaccines* 2 (2): 60 - 67

Guirakhoo, F., Weltzin, R., Chambers, T. J., Zhang, Z. X., Soike, K., Ratterree, M., Arroyo, J., Georgakopoulos, K., Catalan, J. and Monath, T. P. (2000).
Recombinant Chimeric Yellow Fever-Dengue Type 2 Virus Is Immunogenic and Protective in Nonhuman Primates. **74:** 5477-5485.

Guzman, M. G. (2002)
"Dengue : an update." *The Lancet Infectious Diseases* 2 (1): 9.

H

Hall, J. W., McNeil, B., Rollins, M. J., Draper, I., Thompson, B. G. and Macaloney, G. (1996)
"Near-Infrared Spectroscopic Determination of Acetate, Ammonium, Biomass, and Glycerol in an Industrial Escherichia coli Fermentation." *Applied Spectroscopy* 50: 102-108.

Harthun, S., Matischak, K. and Friedl, P. (1997)
"Determination of Recombinant Protein in Animal Cell Culture Supernatant by Near-Infrared Spectroscopy." *Analytical Biochemistry* 251 (1): 73-78.

Hassell, T. and Butler, M. (1990)
"Adaptation to non-ammoniagenic medium and selective substrate feeding lead to enhanced yields in animal cell cultures." *J Cell Sci* 96 (3): 501-508.

Hassell, T., Gleave, S. and Butler, M. (1991)
"Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 30 (1): 29-41.

Hellung-Larsen, P., Assaad, F., Pankratova, S., Saietz, B. L. and Skovgaard, L. T. (2000)
"Effects of Pluronic F-68 on Tetrahymena cells: protection against chemical and physical stress and prolongation of survival under toxic conditions." *Journal of Biotechnology* 76 (2-3): 185-195.

Hemp, T. and Temessou, R. (1999)
Study of M. Mouse and D. Duck cells to propose a new medium formulation to create talking animals. *Picsou magasine* 146 : 179-289.

Höpfner, T., Bluma, A., Rudolph, G., Lindner, P. and Scheper, T. (2009)
"A review of non-invasive optical-based image analysis systems
for continuous bioprocess monitoring." *Bioprocess Biosystem Engineering*.

Hu, W., Rathman, J., J. and Chalmers, J., J. (2008)
"An investigation of small-molecule surfactants to potentially replace pluronic F-68 for reducing bubble-associated cell damage." *Biotechnology and Bioengineering* 101 (1): 119-127.

Huang, H., Yi, X. and Zhang, Y. (2006)
"Improvement of Vero cell growth in glutamate-based culture by supplementing ammoniagenic compounds." *Process Biochemistry* 41 (12): 2386-2392.

Huang, H., Yu, Y., Yi, X. and Zhang, Y. (2007)
"Nitrogen metabolism of asparagine and glutamate in Vero cells studied by 1H/15N NMR spectroscopy." *Applied Microbiology and Biotechnology* 77 (2): 427-436.

Hyde, R., M Taylor, P. and S Hundal, H. (2003)
"Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells." *The biochemical journal* 373 (1): 1-18.

I

Inukai, K., Katagiri, H., Takata, K., Asano, T., Anai, M., Ishihara, H., Nakazaki, M., Kikuchi, M., Yazaki, Y. and Oka, Y. (1995)
"Characterization of rat GLUT5 and functional analysis of chimeric proteins of GLUT1 glucose transporter and GLUT5 fructose transporter." *Endocrinology* 136 (11): 4850-4857.

Irani, N., Beccaria, A. J. and Wagner, R. (2002)
"Expression of recombinant cytoplasmic yeast pyruvate carboxylase for the improvement of the production of human erythropoietin by recombinant BHK-21 cells." *Journal of Biotechnology* 93 (3): 269-282.

Iwatani, S., Van Dien, S., Shimbo, K., Kubota, K., Kageyama, N., Iwahata, D., Miyano, H., Hirayama, K., Usuda, Y., Shimizu, K. and Matsui, K. (2007)
"Determination of metabolic flux changes during fed-batch cultivation from measurements of intracellular amino acids by LC-MS/MS." *Journal of Biotechnology* 128 (1): 93-111.

J

Jang, J. D. and Barford, J. P. (2000)
"An unstructured kinetic model of macromolecular metabolism in batch and fed-batch cultures of hybridoma cells producing monoclonal antibody." *Biochemical Engineering Journal* 4 (2): 153-168.

K

Kamen, A., A. , Bédard, C., Tom, R., Perret, S. and Jardin, B. (1996)
"On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures." *Biotechnology and Bioengineering* 50 (1): 36-48.

Keane, J., T., Ryan, D. and Gray, P., P. (2003)
"Effect of shear stress on expression of a recombinant protein by Chinese hamster ovary cells." *Biotechnology and Bioengineering* 81 (2): 211-220.

Keenan, J., Pearson, D. and Clynes, M. (2006)
"The role of recombinant proteins in the development of serum-free media." *Cytotechnology* 50: 49-56.

Kilburn, D. G., Fitzpatrick, P., Blake-Coleman, B. C., Clarke, D. J. and Griffiths, J. B. (1989)
"On-line monitoring of cell mass in mammalian cell cultures by acoustic densitometry." *Biotechnology and Bioengineering* 33 (11): 1379-1384.

Kim, D. Y., Lee, J. C., Chang, H. N. and Oh, D. J. (2006)
"Development of serum-free media for a recombinant CHO cell line producing recombinant antibody." *Enzyme and Microbial Technology* 39 (3): 426-433.

Kim, S. and Lee, G. (2007)
"Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin." *Applied Microbiology and Biotechnology* 74 (1): 152-159.

Kistner, O., Barrett, P. N., Mundt, W., Reiter, M., Schober-Bendixen, S. and Dorner, F. (1998)
"Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine." *Vaccine* 16 (9-10): 960-968.

Kohler, G. and Milstein, C. (1975)
"Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* 256 (5517): 495-497.

Kolell, K., Padilla-Zamudio, J., Schuchhardt, B., Gilliland, S., McNorton, S., Dalton, B., Luo, S. and Etchberger, K. (2007)
Virus Production in Vero Cells Using a Serum-free Medium. *Cell Technology for Cell Products*: 583-585.

Konstantinov, K., Chuppa, S., Sajan, E., Tsai, Y., Yoon, S. and Golini, F. (1994)
"Real-time biomass-concentration monitoring in animal-cell cultures." *Trends in Biotechnology* 12 (8): 324-333.

Kretzmer, G. (2002)
"Industrial processes with animal cells." *Applied Microbiology and Biotechnology* 59 (2): 135-142.

L

Lecina, M., Soley, A., Gracia, J., Espunya, E., Lazaro, B., Cairo, J. J. and Godia, F. (2006)
"Application of on-line OUR measurements to detect actions points to improve baculovirus-insect cell cultures in bioreactors." *Journal of Biotechnology* 125 (3): 385-394.

Lee, H. L. T., Boccazzi, P., Gorret, N., Ram, R. J. and Sinskey, A. J. (2004)
"In situ bioprocess monitoring of Escherichia coli bioreactions using Raman spectroscopy." *Vibrational Spectroscopy* 35 (1-2): 131-137.

Legazpi, L., Laca, A. and Díaz, M. (2009)
"Kinetic analysis of hybridoma cells viability under mechanical shear stress with and without serum protection." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32 (6): 717-722.

Liu, C.-C., Lian, W.-C., Butler, M. and Wu, S.-C. (2007a)
"High immunogenic enterovirus 71 strain and its production using serum-free microcarrier Vero cell culture." *Vaccine* 25 (1): 19-24.

Liu, C.-H., Wu, M.-L. and Hwang, S.-M. (2007b)
"Optimization of serum free medium for cord blood mesenchymal stem cells." *Biochemical Engineering Journal* 33 (1): 1-9.

Lu, S., Sun, X., Shi, C. and Zhang, Y. (2003)
"Determination of tricarboxylic acid cycle acids and other related substances in cultured mammalian cells by gradient ion-exchange chromatography with suppressed conductivity detection." *Journal of Chromatography A* 1012: 161-168.

M

Mancuso, A., Sharfstein, S. T., Tucker, S. N., Clark, D. S. and Blanch, H. W. (1994)
"Examination of primary metabolic pathways in a murine hybridoma with carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy." *Biotechnology and Bioengineering* 44 (5): 563-585.

Maranga, L. and Goochee, C. F. (2006)
"Metabolism of PER.C6^{TM} cells cultivated under fed-batch conditions at low glucose and glutamine levels." *Biotechnology and Bioengineering* 94 (1): 139-150.

Martens, D. E., Beuvery, E. C., Gooijer, C. D. D. and Tramper, J. (1992)
"Effect of serum concentration on hybridoma viable cell density and production of monoclonal antibodies in cstrs and on shear sensitivity in air-lift loop reactors." *Biotechnology and Bioengineering* 39 (9): 891-897.

Martinez-Barragan, J. d. J. and del Angel, R. M. (2001).
Identification of a Putative Coreceptor on Vero Cells That Participates in Dengue 4 Virus Infection. **75:** 7818-7827.

McBride, W. J. H. and Bielefeldt-Ohmann, H. (2000)
"Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology." *Microbes and Infection* 2 (9): 1041-1050.

McQueen, A. and Bailey, J. E. (1990)
"Effect of ammonium ion and extracellular pH on hybridoma cell metabolism and antibody production." *Biotechnology and Bioengineering* 35 (11): 1067-1077.

McShane, M. J. and Cote, G. L. (1998)
"Near-Infrared Spectroscopy for Determination of Glucose, Lactate, and Ammonia in Cell Culture Media." *Applied Spectroscopy* 52: 1073-1078.

Mendonca, R. Z., Arrozio, S. J., Antoniazzi, M. M., Ferreira, J. M. C. and Pereira, C. A. (2002)
"Metabolic active-high density VERO cell cultures on microcarriers following apoptosis prevention by galactose/glutamine feeding." *Journal of Biotechnology* 97 (1): 13-22.

Mendonça, R. Z. and Pereira, C. A. (1998)
"Cell metabolism and medium perfusion in VERO cell cultures on microcarriers in a bioreactor." *Bioprocess Engineering* 18 (3): 213-218.

Mendonça, R. Z., Prado, J. C. M. and Pereira, C. A. (1999)
"Attachment, spreading and growth of VERO cells on microcarriers for the optimization of large scale cultures." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 20 (6): 565-571.

Mercille, S. and Massie, B. (1994)
"Induction of apoptosis in oxygen-deprived cultures of hybridoma cells." *Cytotechnology* 15 (1-3): 117-128.

Merten, O. W. (2000)
"Editorial: Safety for vaccine(e)s." *Cytotechnology* 34 (3): 181-183.

Merten, O. W. (2006)
"Introduction to animal cell culture technology - Past, present and future." *Cytotechnology* 50 (1-3): 1-7.

Merten, O. W., Kierulff, J. V., Castignolles, N. and Perrin, P. (1994)
"Evaluation of the new serum-free medium(MDSS2) for the production of different biologicals: Use of various cell lines." *Cytotechnology* 14 (1): 47-59.

Merten, O. W., Palfi, G. E., StaÌˆheli, J. and Steiner, J. (1987)
"Invasive infrared sensor for the determination of the cell number in a continuous fermentation of hybridomas." *Developments in biological standardization* 66: 357-360.

Merten, O. W., Wu, R., CouveÌ, E. and Crainic, R. (1997)
"Evaluation of the serum-free medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactors." *Cytotechnology* 25 (1-3): 35-44.

Miller, W. M., Blanch, H. W. and Wilke, C. R. (2000)
"A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: Effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH." *Biotechnology and Bioengineering* 67 (6): 853-871.

Miller, W. M., Wilke, C. R. and Blanch, H. W. (1989)
"Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: I. Glucose pulse and step changes." *Biotechnology and Bioengineering* 33 (4): 477-486.

Mochizuki, K., Sato, S., Kato, M. and Hashizume, S. (1993)
"Enhanced production of human monoclonal antibodies by the use of fructose in serum-free hybridoma culture media." *Cytotechnology* 13 (3): 161-173.

Modis , Y., Ogata, S., Clements, D. and Harrison C., S. (2004)
"Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *to search. vol (pages ????)*"

Mollet, M., Godoy-Silva, R., Berdugo, C. and Chalmers, J. J. (2007)
"Acute hydrodynamic forces and apoptosis: A complex question." *Biotechnology and Bioengineering* 98 (4): 772-788.

Monath, T. P., Guirakhoo, F., Nichols, R., Yoksan, S., Schrader, R., Murphy, C., Blum, P., Woodward, S., McCarthy, K., Mathis, D., Johnson, C. and Bedford, P. (2003)
"Chimeric live, attenuated vaccine against Japanese encephalitis (ChimeriVax-JE): phase 2 clinical trials for safety and immunogenicity, effect of vaccine dose and schedule, and memory response to challenge with inactivated Japanese encephalitis antigen." *The Journal of infectious diseases.* 188 (8): 1213-30.

Monath, T. P., McCarthy, K., Bedford, P., Johnson, C. T., Nichols, R., Yoksan, S., Marchesani, R., Knauber, M., Wells, K. H., Arroyo, J. and Guirakhoo, F. (2002)
"Clinical proof of principle for ChimeriVax(TM): recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections." *Vaccine* 20 (7-8): 1004-1018.

Montagnon, J., Nicolas, A., Fanget, B. and Peyron, L. (1981)
"Comparison of sensitivity of VERO cell line versus primary monkey kidney cells in the detection of residual live polio virus during and after inactivation." *Developments in biological standardization* 47: 151-156.

Montagnon, J., Vincent-Falquet, J. and Saluzzo, J. (1999)
"Experience with Vero cells at Pasteur Mérieux Connaught." *Developments in biological standardization* 98: 137-140.

Morris, A., E. and Schmid, J. (2000)
"Effects of Insulin and LongR^3 on Serum-Free Chinese Hamster Ovary Cell Cultures Expressing Two Recombinant Proteins." *Biotechnology Progress* 16 (5): 693-697.

Mueckler, M. (1994)
"Facilitative glucose transporters." *European Journal of Biochemistry* 219 (3): 713-725.

Murhammer, D. W. and Goochee, C. F. (1990)
"Structural features of nonionic polyglycol polymer molecules responsible for the protective effect in sparged animal cell bioreactors." *Biotechnology Progress* 6 (2): 142-148.

N

Nadeau, I., Sabatié, J., Koehl, M., Perrier, M. and Kamen, A. (2000)
"Human 293 Cell Metabolism in Low Glutamine-Supplied Culture: Interpretation of Metabolic Changes through Metabolic Flux Analysis." *Metabolic Engineering* 2 (4): 277-292.

Nahapetian, A. T., Thomas, J. N. and Thilly, W. G. (1986)
"Optimization of environment for high density Vero cell culture: effect of dissolved oxygen and nutrient supply on cell growth and changes in metabolites." *Journal of cell science* 81: 65-103.

Neermann, J. and Wagner, R. (1996)
"Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells." *Journal of Cellular Physiology* 166 (1): 152-169.

Nielson, L., Smyth, G. and Greenfield, P. (1991)
"Hemacytometer Cell Count Distributions: Implications of Non-Poisson Behavior." *Biotechnology Progress* 7 (6): 560-563.

Nijsten, M. W. N. and van Dam, G. M. (2009)
"Hypothesis: Using the Warburg effect against cancer by reducing glucose and providing lactate." *Medical Hypotheses* 73 (1): 48-51.

O

Octavio, T. R. and Mutharasan, R. (1992)
"Effect of Serum on the Plasma Membrane Fluidity of Hybridomas: An Insight into Its Shear Protective Mechanism." *Biotechnology Progress* 8 (1): 40-50.

Oh, S. K. W., Nienow, A. W., Al-Rubeai, M. and Emery, A. N. (1992)
"Further studies of the culture of mouse hybridomas in an agitated bioreactor with and without continuous sparging." *Journal of Biotechnology* 22 (3): 245-270.

Olson, A. L. and Pessin, J. E. (1996)
"Structure, Function, and Regulation of the Mammalian Facilitative Glucose Transporter Gene Family." *Annual Review of Nutrition* 16 (1): 235-256.

Olsson, L. and Nielsen, J. (1997)
"On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations." *Trends in Biotechnology* 15: 517-522.

Ozturk, S. S., Riley, M. R. and Palsson, B. O. (1992)
"Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production." *Biotechnology and Bioengineering* 39 (4): 418-431.

P

Palomares, L. A., González, M. and Ramírez, O. T. (2000)
"Evidence of Pluronic F-68 direct interaction with insect cells: impact on shear protection, recombinant protein, and baculovirus production." *Enzyme and Microbial Technology* 26 (5-6): 324-331.

Paredes, C., Prats, E., Cairó, J. J., Azorín, F., Cornudella, L. and Gòdia, F. (1999)
"Modification of glucose and glutamine metabolism in hybridoma cells through metabolic engineering." *Cytotechnology* 30 (1): 85-93.

Pattnaik, P., Babu, J. P., Verma, S. K., Tak, V. and Rao, P. V. L. (2006)
"Bacterially expressed and refolded envelope protein (domain III) of dengue virus type-4 binds heparan sulfate." *Journal of Chromatography B* In Press, Corrected Proof.

Pellegrini (2008)
Mechanism of cell proliferation and cell death in animal cell culture in-vitro, Routledge, 2008.

Petiot, E., Fournier, F., Gény, C., Pinton, H. and Marc, A. (2009)
"Rapid Screening of Serum-Free Media for the Growth of Adherent Vero Cells by Using a Small-Scale and Non-invasive Tool." *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

Picard, A., Daniel, I., Montagnac, G. and Oger, P. (2007)
"In situ monitoring by quantitative Raman spectroscopy of alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* under high pressure." *Extremophiles* 11 (3): 445-452.

Q

Quesney, S., Marc, A., Gerdil, C., Gimenez, C., Marvel, J., Richard, Y. and Meignier, B. (2003)
"Kinetics and metabolic specificities of Vero cells in bioreactor cultures with serum-free medium." *Cytotechnology* V42 (1): 1-11.

Quesney, S., Marvel, J., Marc, A., Gerdil, C. and Meignier, B. (2001)
"Characterization of Vero cell growth and death in bioreactor with serum-containing and serum-free media." *Cytotechnology* 35 (2): 115-125.

R

Raghunand, N. and Dale, B. (1999)
"Alteration of glucose consumption kinetics with progression of baculovirus infection in Spodoptera frugiperda cells." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 80 (3): 231-242.

Ravindra, P. V., Tiwari, A. K., Ratta, B., Chaturvedi, U., Palia, S. K., Subudhi, P. K., Kumar, R., Sharma, B., Rai, A. and Chauhan, R. S. (2008)
"Induction of apoptosis in Vero cells by Newcastle disease virus requires viral replication, de-novo protein synthesis and caspase activation." *Virus Research* 133 (2): 285-290.

Reitzer, L. J., Wice, B. M. and Kennell, D. (1979)
"Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells." *J. Biol. Chem.* 254 (8): 2669-2676.

Ren, J., Lin, W.-T., Shen, Y.-J., Wang, J.-F., Luo, X.-C. and Xie, M.-Q. (2008)
"Optimization of fermentation media for nitrite oxidizing bacteria using sequential statistical design." *Bioresource Technology* 99 (17): 7923-7927.

Ren, L., Yang, R., Guo, L., Qu, J., Wang, J. and Hung, T. (2005)
"Apoptosis induced by the SARS-associated coronavirus in vero cells is replication-dependent and involves caspase." *DNA and Cell Biology* 24 (8): 496-502.

Ren, X., Yin, J. and Li, G. (2006)
"Cell apoptosis should be negative in viral infection." *Medical Hypotheses* 67 (3): 675-676.

Rhiel, M., Cohen, M. B., Murhammer, D. W. and Arnold, M. A. (2002a)
"Nondestructive near-infrared spectroscopic measurement of multiple analytes in undiluted samples of serum-based cell culture media." *Biotechnology and Bioengineering* 77 (1): 73-82.

Rhiel, M., Ducommun, P., Bolzonella, I., Marison, I. and von Stockar, U. (2002b)
"Real-time in situ monitoring of freely suspended and immobilized cell cultures based on mid-infrared spectroscopic measurements." *Biotechnology and Bioengineering* 77 (2): 174-185.

Riley, M. R., Arnold, M. A., Murhammer, D. W., Walls, E. L. and DelaCruz, N. (1998)
"Adaptive Calibration Scheme for Quantification of Nutrients and Byproducts in Insect Cell Bioreactors by Near-Infrared Spectroscopy." *Biotechnology Progress* 14 (3): 527-533.

Riley, M. R., Crider, H. M., Nite, M. E., Garcia, R. A., Woo, J. and Wegge, R. M. (2001)
"Simultaneous Measurement of 19 Components in Serum-Containing Animal Cell Culture Media by Fourier Transform Near-Infrared Spectroscopy." *Biotechnology Progress* 17 (2): 376-378.

Riley, M. R., Okeson, C. D. and Frazier, B. L. (1999)
"Rapid Calibration of Near-Infrared Spectroscopic Measurements of Mammalian Cell Cultivations." *Biotechnology Progress* 15 (6): 1133-1141.

Rothman and Alan, L. (2004).
Dengue: Defining protective versus pathologic immunity. **113:** 946-951.

Rourou, S., van der Ark, A., Majoul, S., Trabelsi, K., van der Velden, T. and Kallel, H. (2009)
"A novel animal-component-free medium for rabies virus production in Vero cells grown on Cytodex 1 microcarriers in a stirred bioreactor." *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Rourou, S., van der Ark, A., van der Velden, T. and Kallel, H. (2007)
"A microcarrier cell culture process for propagating rabies virus in Vero cells grown in a stirred bioreactor under fully animal component free conditions." *Vaccine* 25 (19): 3879-3889.

Roychoudhury, P., O'Kennedy, R., McNeil, B. and Harvey, L. M. (2007)
"Multiplexing fibre optic near infrared (NIR) spectroscopy as an emerging technology to monitor industrial bioprocesses." *Analytica Chimica Acta* 590 (1): 110-117.

Rudolph, G., Lindner, P., Gierse, A., Bluma, A., Martinez, G., Hitzmann, B. and Scheper, T. (2008)
"Online monitoring of microcarrier based fibroblast cultivations with in situ microscopy." *Biotechnology and Bioengineering* 99 (1): 136-145.

Ryll, T. and Wagner, R. (1991)
"Improved ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the quantification of a wide variety of nucleotides and sugar-nucleotides in animal cells." *Journal of chromatography* 570 (1): 77-88.

S

Sadon, N., Delers, A., Jarman, R. G., Klungthong, C., Nisalak, A., Gibbons, R. V. and Vassilev, V. (2008)
"A new quantitative RT-PCR method for sensitive detection of dengue virus in serum samples." *Journal of Virological Methods* 153 (1): 1-6.

Saito, M., Haruyama, C., Ohba, H., Makino, S. and Matumoto, M. (1981)
"Recovery of cell-free varicella virus from Vero cells." *Archives of Virology* 68 (1): 59-63.

Sakato, K., Tanaka, H. and Samejima, H. (1981)
"Electrochemical measurements of cell populations." *Annals of the New York Academy of Sciences* 369 (2): 321-334.

Sakoonwatanyoo, P., Boonsanay, V. and Smith, D. R. (2006)
"Growth and Production of the Dengue Virus in C6/36 Cells and Identification of a Laminin-Binding Protein as a Candidate Serotype 3 and 4 Receptor Protein." *Intervirology* 49 (3): 161-172.

Salter, G. J., Kell, D. B., Ash, L. A., Adams, J. M., Brown, A. J. and James, R. (1990)
"Hydrodynamic deposition: A novel method of cell immobilization." *Enzyme and Microbial Technology* 12 (6): 419-430.

Sander, L. and Harrysson, A. (2007)
"Using cell size kinetics to determine optimal harvest time for Spodoptera frugiperda and Trichoplusia ni BTI-TN-5B1-4 cells infected with a baculovirus expression vector system expressing enhanced green fluorescent protein." *Cytotechnology* 54 (1): 35-48.

Sandford, K., Earle, W., Evans, V., Waltz, H. and Shannon, J. (1951)
"The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei." *Journal of the National Cancer Institute* 11 (4): 773-795.

Sanfeliu, A., Paredes, C., Cairó, J. J. and Gòdia, F. (1997)
"Identification of key patterns in the metabolism of hybridoma cells in culture." *Enzyme and Microbial Technology* 21 (6): 421-428.

Sauerwald, T. M., Figueroa, B. J., Hardwick, J. M., Oyler, G., A. and Betenbaugh, M., J. (2006)
"Combining caspase and mitochondrial dysfunction inhibitors of apoptosis to limit cell death in mammalian cell cultures." *Biotechnology and Bioengineering* 94 (2): 362-372.

Scarff, M., Arnold, S. A., Harvey, L. M. and McNeil, B. (2006)
"Near infrared spectroscopy for bioprocess monitoring and control : Current status and future trends." *Critical reviews in biotechnology* 26: 17-39.

Schneider, M., Marison, I. W. and von Stockar, U. (1996)
"The importance of ammonia in mammalian cell culture." *Journal of Biotechnology* 46: 161-185.

Schnitzer, T. J., Dickson, C. and Weiss, R. A. (1979)
"Morphological and biochemical characterization of viral particles produced by the tsO45 mutant of vesicular stomatitis virus at restrictive temperature." *Journal of Virology* 29 (1): 185-195.

Schoepp, R. J. and Beaty, B. J. (1984)
"Titration of dengue viruses by immunofluorescence in microtiter plates." *Journal of Clinical Microbiology* 20 (5): 1017-1019.

Schulze-Horsel, J., Schulze, M., Agalaridis, G., Genzel, Y. and Reichl, U. (2009)
"Infection dynamics and virus-induced apoptosis in cell culture-based influenza vaccine production--Flow cytometry and mathematical modeling." *Vaccine* 27 (20): 2712-2722.

Seregin, A., Nistler, R., Borisevich, V., Yamshchikov, G., Chaporgina, E., Kwok, C. W. and Yamshchikov, V. (2006)
"Immunogenicity of West Nile virus infectious DNA and its noninfectious derivatives." *Virology* 356 (1-2): 115-125.

Sharfstein, S. T., Tucker, S. N., Mancuso, A., Blanch, H. W. and Clark, D. S. (1994)
"Quantitative in vivo nuclear magnetic resonance studies of hybridoma metabolism." *Biotechnology and Bioengineering* 43 (11): 1059-1074.

Shaw, R. J. (2006)
"Glucose metabolism and cancer." *Current Opinion in Cell Biology* 18 (6): 598-608.

Sidorenko, Y., Wahl, A., Dauner, M., Genzel, Y. and Reichl, U. (2008)
"Comparison of metabolic flux distributions for MDCK cell growth in Glutamine- and Pyruvate-containing media." *Biotechnology Progress* 24: 311-320.

Silva, A. C., Delgado, I., Sousa, M. F. Q., Carrondo, M. J. T. and Alves, P. M. (2008)
"Scalable culture systems using different cell lines for the production of Peste des Petits ruminants vaccine." *Vaccine* In Press, Corrected Proof.

Simpson, N. H., Singh, R. P., Perani, A., Goldenzon, C. and Al-Rubeai, M. (1998)
"In hybridoma cultures, deprivation of any single amino acid leads to apoptotic death, which is suppressed by the expression of the bcl-2 gene." *Biotechnology and Bioengineering* 59 (1): 90-98.

Singh, R. P. and Al-Rubeai, M. (2001)
Apoptosis and Bioprocess Technology. *Advances in Biochemical Engineering*. Scheper, T., Springer. 62: 267-275.

Singh, R. P., Al-Rubeai, M., Gregory, C. D. and Emery, A. N. (1994)
"Cell death in bioreactors: A role for apoptosis." *Biotechnology and Bioengineering* 44 (6): 720-726.

Sobczuk, T., Camacho, F., Grima, E. and Chisti, Y. (2006)
"Effects of agitation on the microalgae Phaeodactylum tricornutum and Porphyridium cruentum." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 28 (4): 243-250.

Soley, A., Lecina, M., Gamez, X., Cairo, J. J., Riu, P., Rosell, X., Bragos, R. and Godia, F. (2005)
"On-line monitoring of yeast cell growth by impedance spectroscopy." *Journal of Biotechnology* 118 (4): 398-405.

Souza, M., Freire, M. and Castilho, L. (2007)
Cultivation of Vero Cells on Microporous and Macroporous Microcarriers. *Cell Technology for Cell Products*. Smith, R. Harrogate, UK 753-755.

Srivastava, S., Harsh, S. and Srivastava, A. K. (2008)
"Use of NADH fluorescence measurement for on-line biomass estimation and characterization of metabolic status in bioreactor cultivation of plant cells for azadirachtin (a biopesticide) production." *Process Biochemistry* 43 (10): 1121-1123.

Stuart Wood, I. and Trayhurn, P. (2003)
"Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins." *British Journal of Nutrition* 89: 3-9.

Sugawara, K., Nishiyama, K., Ishikawa, Y., Abe, M., Sonoda, K., Komatsu, K., Horikawa, Y., Takeda, K., Honda, T., Kuzuhara, S., Kino, Y., Mizokami, H., Mizuno, K., Oka, T. and Honda, K. (2002)
"Development of Vero Cell-Derived Inactivated Japanese Encephalitis Vaccine." *Biologicals* 30 (4): 303-314.

Sun, M. B., Jiang, Y. J., Li, W. D., Li, P. Z., Li, G. L., Jiang, S. D. and Liao, G. Y. (2004)
"A novel process for production of hepatitis A virus in Vero cells grown on microcarriers in bioreactor." *World Journal of Gastroenterology* 10 (17): 2571-2573.

T

Tarone, G., Galettop, G., Pratt, M. and Comoglio, P. (1982)
"Cell surface molecules and fibronectin-mediated cell adhesion : effect of proteolytic digestion of membrane proteins." *Journal of Cell biology* 94: 179-186.

Tharmalingam, T., Ghebeh, H., Wuerz, T. and Butler, M. (2008)
"Pluronic Enhances the Robustness and Reduces the Cell Attachment of Mammalian Cells." *Molecular Biotechnology* 39 (2): 167-177.

Tina, M. S., George, A. O. and Michael, J. B. (2003)
"Study of caspase inhibitors for limiting death in mammalian cell culture." *Biotechnology and Bioengineering* 81 (3): 329-340.

Tiwari, M., Parida, M., Santhosh, S. R., Khan, M., Dash, P. K. and Rao, P. V. L. (2009)
"Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus." *Vaccine* 27 (18): 2513-2522.

Toriniwa, H. and Komiya, T. (2007)
"Japanese encephalitis virus production in Vero cells with serum-free medium using a novel oscillating bioreactor." *Biologicals* 35 (4): 221-226.

Toriniwa, H. and Komiya, T. (2008)
"Long-term stability of Vero cell-derived inactivated Japanese encephalitis vaccine prepared using serum-free medium." *Vaccine* 26 (29-30): 3680-3689.

Trabelsi, K., Rourou, S., Loukil, H., Majoul, S. and Kallel, H. (2005)
"Comparison of various culture modes for the production of rabies virus by Vero cells grown on microcarriers in a 2-l bioreactor." *Enzyme and Microbial Technology* 36 (4): 514-519.

Trabelsi, K., Rourou, S., Loukil, H., Majoul, S. and Kallel, H. (2006)
"Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor." *Journal of Biotechnology* 121 (2): 261-271.

Tsutsumi, R., Fujisaki, S., Shozushima, M., Saito, K. and Sato, S. (2006)
"Anoikis-resistant MDCK cells carrying susceptibilities to TNF-α and verotoxin that are suitable for influenza virus cultivation." *Cytotechnology* 52 (2): 71-85.

V

Vaidyanathan, S., Harvey, L. M. and McNeil, B. (2001)
"Deconvolution of near-infrared spectral information for monitoring mycelial biomass and other key analytes in a submerged fungal bioprocess." *Analytica Chimica Acta* 428 (1): 41-59.

Valentinis, B., Reiss, K. and Baserga, R. (1998)
"Insulin-like growth factor-I-mediated survival from Anoikis: Role of cell aggregation and focal adhesion kinase." *Journal of Cellular Physiology* 176 (3): 648-657.

Van Der Pol, L. A., Paijens, I. and Tramper, B. J. (1995)
"Dextran as protectant against damage caused by sparging for hybridoma cells in a bubble column." *Journal of Biotechnology* 43 (2): 103-110.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutellingsperger, C. (1995)
"A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." *Journal of Immunological Methods* 184 (1): 39-51.

Vriezen, N., Karel, B. R., Luyben, C. A. M. and van Dijken, J. P. (1997)
"Effects of glutamine supply on growth and metabolism of mammalian cells in chemostat culture." *Biotechnology and Bioengineering* 54 (3): 272-286.

W

Wagner, A., Marc, A., Engasser, J. M. and Einsele, A. (1991)
"Growth and metabolism of human tumor kidney cells on galactose and glucose." *Cytotechnology* 7 (1): 7-13.

Wahl, A., Sidorenko, Y., Dauner, M., Genzel, Y. and Reichl, U. (2008)
"Metabolic flux model for an anchorage-dependent MDCK cell line: Characteristic growth phases and minimum substrate consumption flux distribution." *Biotechnology and Bioengineering* 101 (1): 135-152.

Wentz, D. and Schügerl, K. (1992)
"Influence of lactate, ammonia, and osmotic stress on adherent and suspension BHK cells." *Enzyme and Microbial Technology* 14 (1): 68-75.

White, L. and Ades, E. (1990)
"Growth of Vero E-6 cells on microcarriers in a cell bioreactor." *Journal of clinical microbiology* 28 (2): 283 - 286.

Willets, K. (2009)
"Surface-enhanced Raman scattering (SERS) for probing internal cellular structure and dynamics." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394 (1): 85-94.

Wlaschin, K. and Hu, W.-S. (2006)
Fedbatch Culture and Dynamic Nutrient Feeding. *Cell Culture Engineering*: 43-74.

Wlaschin, K. F. and Hu, W.-S. (2007)
"Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport." *Journal of Biotechnology* 131 (2): 168-176.

Wu, S.-C. and Huang, G. Y.-L. (2000)
"Hydrodynamic shear forces increase japanese encephalitis virus production from microcarrier-grown Vero cells." *Bioprocess Engineering* 23: 229-233.

Wu, S.-C. and Huang, G. Y.-L. (2002)
"Stationary and Microcarrier Cell Culture Processes for Propagating Japanese Encephalitis Virus." *Biotechnology Progress* 18 (1): 124-128.

Wu, S. C., Liu, C. C. and Lian, W. C. (2004)
"Optimization of microcarrier cell culture process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development." *Vaccine* 22 (29-30): 3858-3864.

X

Xie, L. and Wang, D. I. C. (1994)
"Applications of improved stoichiometric model in medium design and fed-batch cultivation of animal cells in bioreactor." *Cytotechnology* 15 (1): 17-29.

Xie, L. and Wang, D. I. C. (1997)
"Integrated approaches to the design of media and feeding strategies for fed-batch cultures of animal cells." *Trends in Biotechnology* 15 (3): 109-113.

Xie, Y.-W., Chan, P., K. S. , Szeto, C. K., Kwok, S. Y., Chu, I., M. T. , Chu, S., S. L. , Cheung, J., L. K. , Wong, S. W., Ali, M., B. and Wong, B.-L. (2008)
"Clearance of dengue virus in the plasma-derived therapeutic proteins." *Transfusion* 48 (7): 1342-1347.

Xing, Z., Li, Z., Chow, W. and Lee, S. S. (2008)
"Identifying inhibitory threshold values of repressing metabolites in CHO cell culture using multivariate analysis methods." *Biotechnology Progress* 24 (3): 675-683.

Y

Yelian, F. D., Edgeworth, N. A., Dong, L. J., Chung, A. E. and Armant, D. R. (1993)
"Recombinant entactin promotes mouse primary trophoblast cell adhesion and migration through the Arg-Gly-Asp (RGD) recognition sequence [published erratum appears in J Cell Biol 1993 Jul;122(1):279]." *J. Cell Biol.* 121 (4): 923-929.

Yeung, K. S. Y., Hoare, M., Thornhill, N. F., Williams, T. and Vaghjiani, J. D. (1999)
"Near-infrared spectroscopy for bioprocess monitoring and control." *Biotechnology and Bioengineering* 63 (6): 684-693.

Yoon, S. J. and Konstantinov, K. B. (1994)
"Continuous, real-time monitoring of the oxygen uptake rate (OUR) in animal cell bioreactors." *Biotechnology and Bioengineering* 44 (8): 983-990.

Z

Zanghi, J. A., Fussenegger, M. and Bailey, J. E. (1999)
"Serum protects protein-free competent Chinese hamster ovary cells against apoptosis induced by nutrient deprivation in batch culture." *Biotechnology and Bioengineering* 64 (1): 108-119.

Zanghi, J. A., Renner, W. A., Bailey, J. E. and Fussenegger, M. (2000)
"The Growth Factor Inhibitor Suramin Reduces Apoptosis and Cell Aggregation in Protein-Free CHO Cell Batch Cultures." *Biotechnology Progress* 16 (3): 319-325.

Zeiser, A., Bédard, C., Voyer, R., Jardin, B., Tom, R. and Kamen, A. A. (1999)
"On-line monitoring of the progress of infection in Sf-9 insect cell cultures using relative permittivity measurements." *Biotechnology and Bioengineering* 63 (1): 122-126.

Zeiser, A., Elias, C. B., Voyer, R., Jardin, B. and Kamen, A. A. (2000)
"On-Line Monitoring of Physiological Parameters of Insect Cell Cultures during the Growth and Infection Process." *Biotechnology Progress* 16: 803-808.

Zeng, A. P., Hu, W. S. and Deckwer, W. D. (1998)
"Variation of Stoichiometric Ratios and Their Correlation for Monitoring and Control of Animal Cell Cultures." *Biotechnology Progress* 14 (3): 434-441.

Zhang, J. and Robinson, D. (2005)
"Development of Animal-free, Protein-Free and Chemically-Defined Media for NS0 Cell Culture." *Cytotechnology* 48 (1): 59-74.

Zhou, W., Rehm, J. and Hu, W.-S. (1995)
"High viable cell concentration fed-batch cultures of hybridoma cells through on-line nutrient feeding." *Biotechnology and Bioengineering* 46 (6): 579-587.

Zupke, C. and Stephanopoulos, G. (1995)
"Intracellular flux analysis in hybridomas using mass balances and in vitro (13)C NMR." *Biotechnology and Bioengineering* 45 (4): 292-303.

• • •

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

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

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur Otto MERTEN, Responsable Développement, Généthon, Evry

Monsieur Amine KAMEN, Professeur, Institut de Recherche en Biotechnologie, CNRC, Montréal, Québec

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

Madame PETIOT Emma

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

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

"Procédés de cultures de cellules VERO en milieu sans sérum : contributions au développement d'une stratégie PAT"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **« Procédés Biotechnologiques et Alimentaires »**

Fait à Vandoeuvre, le 30 octobre 2009
Le Président de l'I.N.P.L.,
F. LAURENT

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

Procédés de cultures de cellules Vero en milieu sans sérum : contributions au développement d'une stratégie PAT

Ce travail apporte une contribution au développement de la stratégie PAT pour les procédés de culture de cellules animales. Il propose l'amélioration de la compréhension et de la maîtrise de la culture de cellules Vero, dédiées à la production de vaccins viraux, et cultivées sur microporteurs dans un milieu sans sérum. Une première partie a permis de cribler les effets de certains groupes de composés du milieu de culture par le suivi de la croissance en microplaques. Puis, des études cinétiques et métaboliques plus approfondies, réalisées en spinners, ont montré que le métabolisme carboné des cellules Vero est saturé par l'accumulation intracellulaire de pyruvate et qu'il est peu orienté vers la croissance. Alors que le renouvellement du milieu ou l'ajout ponctuel de glutamine amélioraient la croissance cellulaire sans ré-équilibrer le métabolisme, la substitution du glucose et de la glutamine a permis de réduire l'apoptose et d'améliorer les performances métaboliques et de croissance.
Par ailleurs, les spectroscopies diélectrique et proche-infrarouge ont été évaluées pour le contrôle en-ligne du procédé, en prenant en compte les particularités des cellules adhérentes. Nous avons montré leur capacité à évaluer les concentrations de cellules, de composés du milieu, et à détecter l'apoptose. Enfin, les principales améliorations par substitution de la glutamine ont été appliquées en bioréacteurs, à la production d'un vaccin prototype contre la dengue, dans des conditions proches de celles d'un procédé industriel. Ceci a permis de limiter les renouvellements de milieu pendant l'expansion cellulaire, sans compromettre la production de particules virales infectieuses.

Mots clés : procédé de culture de cellules animales, cellules Vero adhérentes, milieu sans sérum, stratégie PAT, spectroscopies en-ligne, métabolisme et mort cellulaires.

Vero cell culture processes in serum-free medium : contributions to the development of a PAT strategy

This work contributes to the development of the PAT strategy for animal cell culture processes. The aim of this study was to improve the understanding and the control of Vero cell culture, dedicated to the production of viral vaccines, and grown on microcarriers in serum-free medium. An initial study was performed to screen the effects of certain groups of compounds of the culture medium, by the cell growth monitoring in microplates. Then, kinetic and metabolic studies conducted in spinners flasks allowed to go further and to show that the Vero cell metabolism is saturated through the pyruvate intracellular accumulation and that it is not oriented toward growth. While media renewal or punctual addition of glutamine improve the cell growth without improving the metabolism balance, the substitution of glucose and glutamine allowed to reduce apoptosis and to improve growth and metabolic performances.
Furthermore, dielectric and near-infrared spectroscopies have been evaluated for the in-line process monitoring, taking into account the particularities of adherent cells. We have demonstrated their ability to quantify cell concentrations, medium component concentrations, and to detect apoptosis. Finally, major improvements by substitution of glutamine have been applied to bioreactor culture to produce a dengue vaccine prototype, with culture conditions close to industrial process. In these cases, medium renewal during the cell expansion was removed without compromising the production of infectious viral particles.

Key words : animal cell culture process, Vero adherent cells, serum-free medium, PAT strategy, in-line spectroscopies, cell metabolism, cell death.