

Titre: Cinétique de croissance et de production d'une culture en cuvée de cellules d'hybridomes dans un médium à basse teneur en sérum de foetus bovin
Title:

Auteur: Marie-France Pépin
Author:

Date: 1989

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Pépin, M.-F. (1989). Cinétique de croissance et de production d'une culture en cuvée de cellules d'hybridomes dans un médium à basse teneur en sérum de foetus bovin [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/58269/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/58269/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche:
Advisors:

Programme: Non spécifié
Program:

23 J. 167

UNIVERSITE DE MONTREAL

CINETIQUE DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION
D'UNE CULTURE EN CUVÉE DE CELLULES D'HYBRIDOMES
DANS UN MEDIUM A BASSE TENEUR EN SERUM DE FOETUS BOVIN

par

Marie-France PEPIN
DEPARTEMENT DE GENIE CHIMIQUE
ECOLE POLYTECHNIQUE

MEMOIRE PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION
DU GRADE DE MAITRE EN SCIENCES APPLIQUEES (M.Sc.A.)

Avril 1989

© Marie-France Pépin, 1989

National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Canadian Theses Service Service des thèses canadiennes

Ottawa, Canada
K1A 0N4

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-50223-1

UNIVERSITE DE MONTREAL

ECOLE POLYTECHNIQUE

Ce mémoire intitulé:

CINETIQUE DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION
D'UNE CULTURE EN CUVÉE DE CELLULES D'HYBRIDOMES
DANS UN MEDIUM A BASSE TENEUR EN SERUM DE FOETUS BOVIN

présenté par: Marie-France Pépin

en vue de l'obtention du grade de: M.Sc.A.

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de:

M. Gérald André	Ph.D.
M. Claude Chavarie	Ph.D., directeur de recherche
M. Raymond Mayer	M.Sc.A., président-rapporteur

Ce mémoire a été réalisé sous la direction
du professeur Claude Chavarie et la
coordination du Dr. Juliana Ramsay.

SOMMAIRE

Le développement de procédés économiquement viables pour la production in vitro d'anticorps monoclonaux issus de la culture de cellules de mammifères nécessite la formulation de milieux de culture définis et la compréhension et la modélisation des cinétiques de croissance et de production.

Deux lignées cellulaires, propriétés de ChemBioMed Ltd., ont été l'objet de cette étude. Les cellules initialement maintenues dans un milieu supplémenté de 10% FBS ont été soumises à un processus de sevrage du sérum dans deux milieux de base. Il a été possible de sevrer les cellules de la lignée CBM-P2-B jusqu'à 0,5% FBS ouvrant ainsi la voie à la formulation d'un milieu sans sérum. La comparaison des performances des cultures effectuées dans le DMEM et dans le RPMI 1640 permet de conclure que le DMEM constitue un meilleur milieu de base. Au cours du processus de sevrage, le taux de croissance spécifique est associé à la concentration de sérum dans une relation de type Monod avec $K_m = 2,5\%$ Fbs et $\mu_{max} = 0,035 \text{ h}^{-1}$. Une adaptation progressive des cellules aux faibles concentrations de sérum supplémentées a cependant été observée provoquant une diminution de la

valeur de K_m .

Les cellules ont été cultivées avec succès dans un bioréacteur Celligen_{md} (New-Brunswick Scientific Co.). La concentration cellulaire, les concentrations de glucose, de glutamine, d'acide lactique, d'ammoniaque, d'oxygène dissous ainsi que le pH et la concentration d'anticorps ont été mesurés à divers moments de la culture. L'analyse de l'évolution de ces paramètres a permis d'établir que dans les conditions dans lesquelles les cultures en bioréacteur ont été effectuées la glutamine constitue le facteur limitant la croissance. Il est apparu que l'évolution de la concentration d'anticorps peut être bien représentée par un modèle de production non-associée à la croissance. Pour une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A effectuée dans le DMEM supplémenté de 1% de sérum, un taux de croissance spécifique de $0,054 \text{ h}^{-1}$, une concentration maximale de cellules viables de $13,5 \times 10^8$ cellules/L et une production d'anticorps de 75 mg/L ont été observés. Les coefficients de rendement apparents en biomasse, $Y'_{X/Gln}$ et $Y'_{X/Glc}$, et en produits, $Y_{Amm/Gln}$ et $Y_{Lac/Glc}$, ont été évalués. Un modèle simplifié de croissance et de production est proposé.

ABSTRACT

Development of an economical bioprocess for the production of monoclonal antibodies requires the selection of a suitable basal medium, the weaning of cells from high concentrations of serum supplemented to the culture medium, an evaluation of the cell growth capacity in bioreactors and the determination of critical parameters in terms of growth kinetics and antibody production.

It appears that for the CBM-P2 cell line used, DMEM is the best basal medium. For CBM-P2-A cell cultures in 100mL spinners flasks, specific growth rate varied in a Monod fashion with the initial serum level (3-10%) yielding $K_m = 2,5\%$ FBS and $\mu_{max} = 0,035 \text{ h}^{-1}$. However, the mean specific growth rate tend to increase as time allow cells to adapt to low serum concentrations. Cells of the CBM-P2-B cell line were successfully weaned to 0,5% FBS.

Free cell cultures were performed in the Celligen Bioreactor (New-Brunswick Scientific Co.). With CBM-P2-B cell line cultures in DMEM supplemented with 1% FBS, a growth rate of $0,054 \text{ h}^{-1}$, a maximum viable cell density of $13,5 \times 10^8$ cells/L and a production of 75 mg/L

of antibody were achieved. Growth seems to be limited by glutamine. Antibody production fits with non growth-associated model. Kinetic parameters of a simple Monod-like model of growth and production were evaluated.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr. Claude Chavarie, pour l'optimisme sans borne qu'il a conservé tout au long du projet, ainsi que Dr. Juliana Ramsay pour avoir tenté patiemment de nous transmettre les connaissances du monde vivant essentielles à l'ingénieur chimiste impliqué en biotechnologie et pour avoir, par sa seule présence, imposé le travail ardu, la patience et la conscience de l'extrême complexité des systèmes biologiques.

Auprès de ces deux personnes, plusieurs autres ont gravité tant à Polytechnique qu'à l'Institut de recherche en biotechnologie (IRB, CNRC, Montréal). Merci au Dr. Jean Archambault, pour avoir tant insisté sur la nécessité d'aborder tous les problèmes rencontrés du point de vue de l'applicabilité technique et du développement technologique; au Dr. Gérald André, pour avoir apporté une vision globale des concepts liés à l'analyse des systèmes biologiques, pour son esprit positif et sa disponibilité; au Dr. Michel Perrier, pour son souci constant de la représentativité des interprétations avancées et, qui plus est, des conclusions formulées; et au Dr. Bruce Ramsay pour avoir partagé sa vaste connaissance des microorga-

nismes et avoir ainsi contribué à l'analyse des résultats. J'espère au terme de cette maîtrise avoir concilié ces points de vue, quelquefois divergents, et les avoir intégrés dans un comportement scientifiquement rigoureux tout en contribuant au développement du groupe de culture de cellules animales à Polytechnique et à l'IRB.

Mes camarades de travail, tant les étudiants des cycles supérieurs impliqués dans ce projet de recherche - Michèle de Tremblay et Sylvain Mercille - que les personnes associées au groupe de culture de cellules animales à l'IRB - Johanne Côté et Mark Johnson - m'ont été d'un grand support. Certes nous aurons partagé la fatigue, les doléances de toute sorte, les remises en question mais aussi la quête du savoir et l'enthousiasme. Merci à Mark et à Johanne pour leur amitié. J'espère qu'ils auront bien senti la mienne en retour.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers les femmes qui m'entourent et qui comme moi tentent de concilier carrière professionnelle et responsabilités sociales. Elles m'auront permis d'aménager mon horaire de façon à peu près satisfaisante pour moi, ma fille, l'équipe et les cellules. Je veux nommer expressément ma mère, Mance Houle, ainsi que Lucie Demers et Lyne Héroux

sans lesquelles je n'aurais pu accomplir ce travail. Un grand merci aussi à Lizanne Pépin pour le raffinement des illustrations. Nous sommes toutefois toutes conscientes que ce sera l'histoire de nos vies.

Au cours de ces deux ans, j'ai eu le plaisir et la fierté de voir grandir ma fille avec une relative sérénité et une tranquille indépendance que je ne peux qu'encourager. Elle a su compenser la fréquente absence de sa mère en tirant parti de la famille élargie qui l'entoure. Remercier mon amour d'avoir été là me semble un peu indécent. Disons que je le remercie d'avoir patienté si longtemps et si souvent. Ce qui n'est pas dans sa nature...

Les travaux sous-jacents à ce mémoire ont été rendus possibles grâce à l'appui financier de Conseil national de la recherche du Canada au projet et à l'implication de ChemBioMed Ltd. Ma participation à ce projet a été financée par le département de génie chimique de l'École Polytechnique de Montréal et par la contribution du gouvernement du Québec à travers son Fonds F.C.A.R.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE		iii
REMERCIEMENTS		ix
LISTE DES FIGURES		xvii
LISTE DES TABLEAUX		xxiv
NOMENCLATURE		xxviii
Chapitre I	INTRODUCTION	1
Chapitre II	REVUE DE LA LITTERATURE	5
II.1	LES ANTICORPS MONOCLONAUX	5
II.2	LES MILIEUX DE CULTURE	11
II.2.1	Les milieux de base	11
II.2.2	La supplémentation des milieux	18
II.2.3	Conditions environnementales	20
II.3	CINÉTIQUE ET MODÉLISATION	23
II.3.1	Croissance cellulaire et production d'anticorps	25
II.3.1.a	Production d'anticorps	25
II.3.1.b	Effet des nutriments sur la croissance cellulaire	27
II.3.1.c	Effet des toxines sur la croissance	30

II.3.2	La modélisation des cultures en cuvée	33
II.3.2.a	Croissance	36
II.3.2.b	Production	44
II.3.3	Modélisation de la cinétique de croissance et de production d'anticorps monoclonaux	48
Chapitre III	MATÉRIEL ET MÉTHODES	55
III.1	CULTURE DE CELLULES	55
III.1.1	Lignées cellulaires	55
III.1.2	Entretien des lignées cellulaires	55
III.1.3	Préparation des inocula	56
III.1.4	Préservation à moyen terme des lignées	56
III.2	MATÉRIEL	59
III.3	PROTOCOLES ANALYTIQUES	60
III.3.1	Compte cellulaire	60
III.3.2	Quantification de l'anticorps monoclonal	61
III.3.3	Analyses sur HPLC	64
III.3.4	Quantification de l'ammoniaque	65
III.4	ÉVALUATION DES MILIEUX DE BASE	66
III.4.1	Adaptation des cellules aux milieux de culture de base et aux	

		xiv
	concentrations réduites de sérum	66
	III.4.2 Croissance et production	67
III.5	CULTURE EN BIORÉACTEUR	69
III.6	CALCULS	75
	III.6.1 Comparaison des milieux de culture	75
	III.6.2 Modélisation	77
Chapitre IV	RÉSULTATS ET ANALYSE	80
IV.1	COMPTES CELLULAIRES	80
IV.2	ÉVALUATION DES MILIEUX DE BASE (DMEM, RPMI, IMDM)	82
	IV.2.1 Adaptation des cellules à de faibles concentrations de sérum dans le DMEM et le RPMI 1640	82
	IV.2.2 Performance comparée du DMEM et du RPMI	82
	IV.2.3 Performance comparée du DMEM et de l'IMDM	85
IV.3	EFFET DE LA CONCENTRATION DE SÉRUM SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE ET LA PRODUCTION D'ANTICORPS	89
IV.4	AMELIORATION PROGRESSIVE DE LA CROISSANCE ET DE LA PRODUCTION	92
IV.5	CULTURE EN BIORÉACTEUR	94

IV.5.1	Comportement des cultures	94
IV.5.2	Croissance cellulaire	106
IV.5.3	Assimilation de substrat et production de toxines	110
IV.5.4	Production d'anticorps	113
IV.5.5	Exploration de l'effet de la con- centration d'oxygène dissous et du pH sur la croissance et la produc- tion	113
IV.6	MODÉLISATION DE LA CINÉTIQUE DE CROIS- SANCE ET DE PRODUCTION DE CULTURES EN CUVÉE	121
IV.6.1	Cinétique de production	124
IV.6.2	Coefficients de rendement et taux de croissance spécifique	128
IV.6.3	Modèle	138
Chapitre V	CONCLUSIONS	145
	BIBLIOGRAPHIE	151
Annexe A	COURBES ÉVOLUTIVES DES CULTURES EN BIORÉACTEUR	160

Annexe B	DONNÉES EXPÉRIMENTALES DES CULTURES EN BIORÉACTEUR	173
Annexe C	ÉVALUATION DES TAUX SPÉCIFIQUES DE CROISSANCE, D'ASSIMILATION ET DE PRODUCTION - Dérivation des courbes de croissance et essai d'évaluation des paramètres corrélant les taux spécifiques	185

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 Représentation schématique d'une molécule type d'anticorps 6
- Figure 2 Technique de clonage pour la production d'anticorps uniformes 8
- Figure 3 Voies métaboliques d'assimilation de la glutamine et du glucose et d'excrétion de l'ammoniaque et de l'acide lactique 29
- Figure 4 Estimation du temps de latence, t_L , à partir d'une représentation graphique de $\ln(X/X_0)$ en fonction du temps, t 38
- Figure 5 Schéma de classification de paires de nutriments 43
- Figure 6 Représentation schématique des relations entre les taux spécifiques d'un bioprocédé pour une production associée à la croissance (I), non-associée à la croissance (II), et mixte (III). (Adapté de Blakebrough, 1967). 46
- Figure 7 Représentation schématique de la relation entre le taux spécifique de production, q_p , et le taux de croissance pour une production associée à la croissance (I), non-associée à la croissance (II), mixte (III)

et dans le cas d'une relation négative (IV)	47
Figure 8 Systèmes de culture de cellules animales (A) flacon en T, (B) bouteille roulante, (C) flacon agité	57
Figure 9 Bioréacteur utilisé	70
Figure 10 Schéma du système d'agitation et d'aération du bioréacteur	71
Figure 11 Deux conformations du système de mélange utilisé: (A) "Cell Lift Impeller"; (B) agitateur à hélices double et une turbine Rushton à six pales	74
Figure 12 Comparaison des courbes de croissance et des concentrations d'anticorps monoclonaux produits par la lignée CBM-P2-B dans les milieux de base DMEM et IMDM supplémentés de 0,5 et 1% de sérum	87
Figure 13 Dépendance du taux de croissance de la lignée CBM-P2-A sur la concentration de sérum	90
Figure 14 Dépendance du taux de croissance de la lignée CBM-P2-B sur la concentration de sérum	91
Figure 15 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-A cultivées en cuvée dans le Celligen dans le RPMI 1640 supplémenté de 3% FBS	99

- Figure 16 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-A cultivées en cuvée dans le Celligen dans le DMEM supplémenté de 3% FBS 100
- Figure 17 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-B cultivées en cuvée dans le Celligen dans le DMEM supplémenté de 1% FBS, agitation fournie par le "Cell Lift Impeller".
Expérience A 103
- Figure 18 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-B cultivées en cuvée dans le Celligen dans le DMEM supplémenté de 1% FBS, agitation fournie par le "Cell Lift Impeller".
Expérience B 103
- Figure 19 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-B cultivées en cuvée dans le Celligen dans le DMEM supplémenté de 1% FBS, agitation fournie par l'agitateur à hélices.
Expérience C 104
- Figure 20 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-B cultivées en cuvée dans le Celligen dans le IMDM supplémenté de 1% FBS, agitation fournie par l'agitateur à hélices 105
- Figure 21 Concentration de cellules viables et de cellules mortes en fonction du temps: (a)
Evolution de X_v et X_d pour la culture DMEM

1%-A (b) Evolution de X_d pour toutes les cultures de la lignée CBM-P2-B	108
Figure 22 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-A cultivées en cuvée dans le Celligen dans le RPMI 1640 supplémenté de 10% FBS	112
Figure 23 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-A cultivées en cuvée dans le Celligen avec contrôle du pH et de l'oxygène dissous dans le DMEM supplémenté de 10% FBS	116
Figure 24 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-A cultivées en cuvée dans le Celligen dans le DMEM supplémenté de 10% FBS sans contrôle du pH et de la DO	117
Figure 25 Relation entre A_{mc} et $\sum X_{v,i} \Delta t_i$ pour les cultures DMEM 1%-A, -B, -C et IMDM 1%	126
Figure 26 Comparaison des courbes représentant AMC en fonction de $\sum X_{v,i} \Delta t_i$ entre la lignée CBM-P2-A cultivée dans le DMEM + 3%FBS et la lignée CBM-P2-B cultivée dans le DMEM + 1%FBS	127
Figure 27 Evaluation des coefficients de rendement $Y_{Amm/Gln}$ et $Y_{Lac/Glc}$	130
Figure 28 Evaluation des coefficients de rendement $Y_{Xv/Gln}$ et $Y_{Xv/Glc}$	131
Figure 29 Courbes de croissance simulées pour les	

cultures en bioréacteur DMEM 1%-A et 1%-B	141
Figure A1 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le RPMI 1640 + 3%FBS	162
Figure A2 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le RPMI 1640 + 5%FBS	163
Figure A3 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le RPMI 1640 + 10%FBS	164
Figure A4 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le DMEM + 3%FBS	165
Figure A5 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le DMEM + 10%FBS	166
Figure A6 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le DMEM + 10%FBS, avec contrôle de pH à 7,2 et de la DO à 60%	167
Figure A7 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-B, dans le Celligen, dans le RPMI 1640 + 1%FBS	168
Figure A8 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-B, dans le	

Celligen, dans le DMEM + 1%FBS (expérience A)	169
Figure A9 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-B, dans le Celligen, dans le DMEM + 1%FBS (expérience B)	170
Figure A10 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-B, dans le Celligen, dans le DMEM + 1%FBS (expérience C), avec hélices et turbine	171
Figure A11 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-B, dans le Celligen, dans le IMDM + 1%FBS, avec hélices et turbine	172
Figure C1 Approximation polynomiale des courbes des croissance de la culture DMEM 1%A	186
Figure C2 Comparaison des taux spécifiques de croissance obtenus selon la technique d'évaluation de la dérivée utilisée	187
Figure C3 Évolution des taux spécifiques de croissance, d'assimilation et de production d'une culture en bioréacteur dans le DMEM 1%A et 1%B évalués d'après les pentes des courbes lissant les points expérimentaux	189
Figure C4 Évolution des taux spécifiques de crois-	

sance, d'assimilation et de production de la culture en bioréacteur DMEM 1%A, évalués après dérivation d'une approximation polynomiale des courbes expérimentales

191

Figure C5 Relation entre q_{Amc} et μ selon deux techniques d'évaluation de $dAmc/dt$, de dX/dt et de X_v pour la culture DMEM 1%A

192

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Composition des milieux de base utilisés	16
Tableau 2	Variables et taux d'un procédé en cuvée	35
Tableau 3	Modèles et expressions cinétiques pour la culture en cuvée	51
Tableau 4	Conditions expérimentales des cultures en bioréacteur	76
Tableau 5	Effet de l'identité de l'expérimentateur et de l'échantillonnage sur l'acuité des comptes de cellules viables et totales provenant d'un flacon agité	81
Tableau 6	Comparaison des taux de croissance apparents observés dans des cultures de CBM-P2-A en flacons agités dans le DMEM et le RPMI 1640 pour des concentrations de sérum variant de 2 à 10% (v/v)	84
Tableau 7	Comparaison de la concentration maximale de cellules viables, des taux de croissance et de la concentration d'anticorps monoclonaux pour les cultures de la lignée CBM-P2-A en bioréacteur	85
Tableau 8	Comparaison de la concentration maximale de cellules viables et de la concentration finale d'anticorps monoclonaux pour des	

	cultures de CBM-P2-B en flacons agités dans le DMEM et le RPMI 1640 pour des concentrations de sérum de 1 et 5% (v/v)	86
Tableau 9	Comparaison des taux de croissance spécifiques apparents, de la densité cellulaire maximale et de la concentration finale d'anticorps observés dans des cultures de CBM-P2-B en flacons agités dans le DMEM et l'IMDM pour des concentrations de sérum de 0,5% et de 1% v/v	88
Tableau 10	Concentrations maximales de cellules viables et d'anticorps monoclonaux atteintes en flacons agités à 0,5% et 1% FBS dans le DMEM	93
Tableau 11	Paramètres cinétiques des cultures en bioréacteurs des cellules de la lignée CBM-P2-A	95
Tableau 12	Paramètres cinétiques des cultures en bioréacteurs des cellules de la lignée CBM-P2-B	96
Tableau 13	Coefficients de rendement des cultures en bioréacteur de la lignée CBM-P2-B	132
Tableau B1	Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le RPMI 1640 + 3%FBS	174

Tableau B2 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le RPMI 1640 + 5%FBS	175
Tableau B3 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le RPMI 1640 + 10%FBS	176
Tableau B4 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le DMEM + 3%FBS	177
Tableau B5 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le DMEM + 10%FBS	178
Tableau B6 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le DMEM + 10%FBS, avec contrôle de pH à 7,2 et de la DO à 60%	179
Tableau B7 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-B, dans le Celligen, dans le RPMI 1640 + 1%FBS	180
Tableau B8 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-B, dans le Celligen, dans le DMEM + 1%FBS (expérience A)	181
Tableau B9 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-B, dans le	

	Celligen, dans le DMEM + 1%FBS (expérience B)	182
Tableau B10	Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-B, dans le Celligen, dans le DMEM + 1%FBS (expérience C), avec hélices et turbine	183
Tableau B11	Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-B, dans le Celligen, dans le IMDM + 1%FBS, avec hélices et turbine	184

NOMENCLATURE

[Amm]	Concentration d'ammoniaque, mM
DO	Oxygène dissous, % relativement à la saturation de l'eau à 37°C
[Glc]	Concentration de glucose, mM
[Gln]	Concentration de glutamine, mM
k_{Amc}	Constante de production d'anticorps, mg/10 ⁸ cellules viables/h
k_d	Taux spécifique de mortalité, h ⁻¹
K_S	Constante de saturation (Modèle de Monod), mM
$K_{I,p}$	Constante d'inhibition d'un produit, mM
$K_{I,s}$	Constante d'inhibition d'un substrat, mM
[Lac]	Concentration d'acide lactique, mM
m_S	Coefficient de maintenance relatif à un substrat, mmole/cellules viables*h
OTR	Taux de transfert d'oxygène, mmole/L/h
OUR	Taux d'assimilation de l'oxygène, mmole/L/h
P	Produit, mM ou mg/L
q_{Amm}	Taux spécifique de production de l'ammoniaque, mmole/cellules viables/h
q_{Glc}	Taux spécifique d'assimilation du glucose, mmole/cellules viables/h
q_{Gln}	Taux spécifique d'assimilation de la glutamine, mmole/cellules viables/h

q_{Lac}	Taux spécifique de production d'acide lactique, mmole/cellules viables/h
q_{O_2}	Taux spécifique d'assimilation de l'oxygène, mmole/cellules viables/h
q_p	Taux spécifique de production du produit, mg/cellules viables/h
r_s	Taux d'assimilation d'un substrat, mM/h
r_x	Taux de croissance cellulaire, cellules viables/L*h
S	Substrat, mM
t	Temps, h
t_L	Durée de la période de latence, h
X	Concentration cellulaire totale, cellules/L
X_{max}	Concentration cellulaire totale atteinte, cellules/L
X_v	Concentration cellulaire viable, cellules viables/L
$X_{v,max}$	Concentration cellulaire viable maximale, cellules viables/L
$X_{v,0}$	Concentration cellulaire viable à l'inoculation, cellules viables/L
X_0	Concentration cellulaire totale à l'inoculation, cellules /L
$Y'_{x/s}$	Coefficient de rendement en biomasse apparent, cellules viables/mmmole

xxx

$Y_{p/x}$ Coefficient de rendement en produit, mg/cellules
viables

μ Taux spécifique de croissance des cellules, h^{-1}

Chapitre I INTRODUCTION

La demande croissante pour les produits issus de la culture de cellules de mammifères, tels les anticorps monoclonaux et les facteurs de croissance, a entraîné un développement intensif des activités de recherche dans ce domaine. L'objectif majeur de ces activités est de mettre au point des techniques de culture qui rendent possible la commercialisation des produits. Parallèlement à l'établissement de lignées cellulaires plus résistantes et productives et à la mise au point de bioréacteurs spécifiquement destinés à la culture de cellules, des efforts importants sont consentis à la formulation de milieux de culture chimiquement définis et à la modélisation des cinétiques de croissance et de production des cellules. Ces deux aspects figurent parmi les objectifs principaux du projet de recherche dans le cadre duquel s'inscrit ce mémoire de maîtrise.

Ce projet vise, ultimement, le développement d'un procédé de culture en suspension de cellules animales en vue de la production d'anticorps monoclonaux. La mise au point d'un tel procédé repose sur:

- une bonne connaissance des lignées cellulaires d'intérêt en termes de besoins nutritionnels et environ-

nementaux (carbohydrates, acides aminés, vitamines, facteurs de croissance, pH, O₂, osmolarité), cinétique de croissance et de production (taux spécifiques de croissance, d'assimilation et de production) et sur les effets inhibiteurs et toxiques de certains métabolites dont les principaux identifiés sont l'acide lactique et l'ammoniaque.

- la modélisation de la cinétique de croissance et de production des cellules
- la formulation d'un milieu de culture chimiquement défini qui facilite la purification du produit et élimine la présence de substances non définies d'origine animale
- la mise au point d'un réacteur dont la capacité de mélange et d'aération suffise aux cellules
- le choix d'un mode de culture qui optimise la production
- la formulation et la mise en oeuvre de stratégies de contrôle du pH, de l'alimentation en gaz et en divers nutriments, de la collecte de l'effluent avec ou sans les cellules.

Le projet en est un de collaboration entre partenaires industriel, gouvernemental et universitaires. Il a été initié par ChemBioMed Ltd., une compagnie albertaine sise à Edmonton. Celle-ci est entre autres impliquée dans la

production de trousse de diagnostics et de détermination de groupe sanguin. Les lignées cellulaires utilisées sont sa propriété. Elle finance, en partie, le projet de recherche appuyée en cela par le Conseil national de recherche du Canada (CNRC). Les deux universités impliquées sont l'université de Calgary (UC) et l'École Polytechnique de Montréal (Poly). Dans ce contexte, deux équipes de recherche issues de l'École Polytechnique et de l'Institut de recherche en biotechnologies (CNRC, Montréal) d'une part et de l'université de Calgary et de ChemBioMed Ltd. d'autre part, ont uni leurs efforts.

Au cours de la phase I du projet de recherche qui aura duré douze mois, les travaux des équipes ont été concentrés sur le choix d'un milieu de base efficace, le sevrage des cellules dans un milieu de base supplémenté d'une quantité minimale de sérum de fœtus bovin, l'évaluation de la capacité de divers suppléments de favoriser la croissance en remplacement du sérum, la culture en cuvée en bioréacteur de petite échelle (1,5 L) et l'évaluation préliminaire de paramètres cinétiques.

La partie des travaux rapportés dans ce mémoire a principalement trait au sevrage progressif des cellules dans un milieu de base à faible concentration de sérum et

à la culture en bioréacteur. Les objectifs visés sont plus précisément reliés:

- au choix d'un milieu de base,
- à l'adaptation des cellules à une faible concentration de sérum,
- à l'évaluation préliminaire de paramètres cinétiques représentant la croissance et la production.

Le mémoire inclut une revue de la littérature scientifique sur la culture de cellules hybridomes et la production d'anticorps monoclonaux en général, sur les milieux de culture ainsi que sur divers aspects de la cinétique et de la modélisation. L'analyse des données recueillies conformément aux méthodes décrites au chapitre III est présentée au chapitre IV. Elle permet la discussion sur l'évaluation des milieux de base, le processus de sevrage ainsi que sur la croissance des cellules et la production d'anticorps.

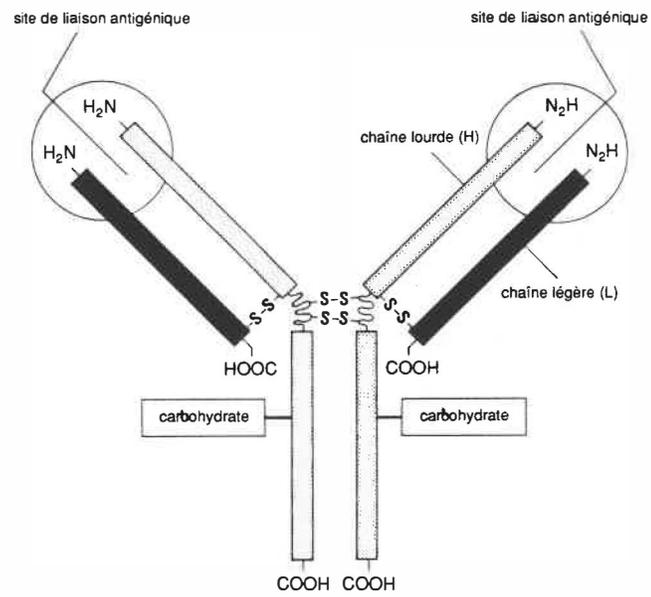
Chapitre II REVUE DE LA LITTERATURE

II.1 LES ANTICORPS MONOCLONAUX

Les anticorps sont produits chez les mammifères par des cellules du système immunitaire, les lymphocytes B, dont c'est la seule fonction connue. Ce sont des protéines existant sous des millions de formes, chacune possédant un site unique de liaison à un antigène. L'unicité de cette liaison procure aux anticorps une spécificité qui leur permet d'induire une réponse immunitaire dirigée et efficace. Les anticorps constituent 20% du poids des protéines contenues dans le plasma sanguin.

Les molécules d'anticorps sont composées de deux paires de chaînes polypeptidiques, l'une dite légère, L, comprenant 220 acides aminés, l'autre dite lourde, H, comprenant 440 acides aminés (Alberts et al., 1983). Les molécules les plus simples d'anticorps ont une forme en Y comportant deux sites de liaisons antigéniques identiques (figure 1). Les molécules ont la possibilité de tisser des liens entrecroisés avec des molécules d'antigènes formant ainsi des complexes immunitaires. L'effet

Figure 1 Représentation schématique d'une molécule type d'anticorps



protecteur des anticorps n'est cependant pas seulement dû à leur capacité de se lier aux antigènes. Ils sont aussi impliqués dans une série d'activités biologiques par l'entremise du fragment constant (la portion centrale de la molécule). Ainsi des molécules possédant le même site antigénique peuvent avoir une conformation différente de leur queue leur attribuant des propriétés différentes du point de vue fonctionnel.

Pour circonvier aux problèmes occasionnés par l'hétérogénéité des préparations d'anticorps extraits des plasmas sanguins, une technique de clonage permettant l'obtention d'anticorps uniformes a été mise au point en 1975 (Kohler et Milstein, 1975). Cette technique est schématisée à la figure 2. Elle consiste à fusionner une cellule lymphocyte B sécrétrice d'un anticorps unique avec une cellule issue d'une lignée tumorale de lymphocyte B. De ces cellules hybrides sont sélectionnées celles ayant la capacité de produire un anticorps particulier et la possibilité de se reproduire en culture. Des clones uniques de ces hybridomes sont maintenus en culture. Ils deviennent ainsi une source permanente et stable d'anticorps monoclonaux.

Les applications envisagées pour les anticorps

Figure 2 Technique de clonage pour la production d'anticorps uniformes

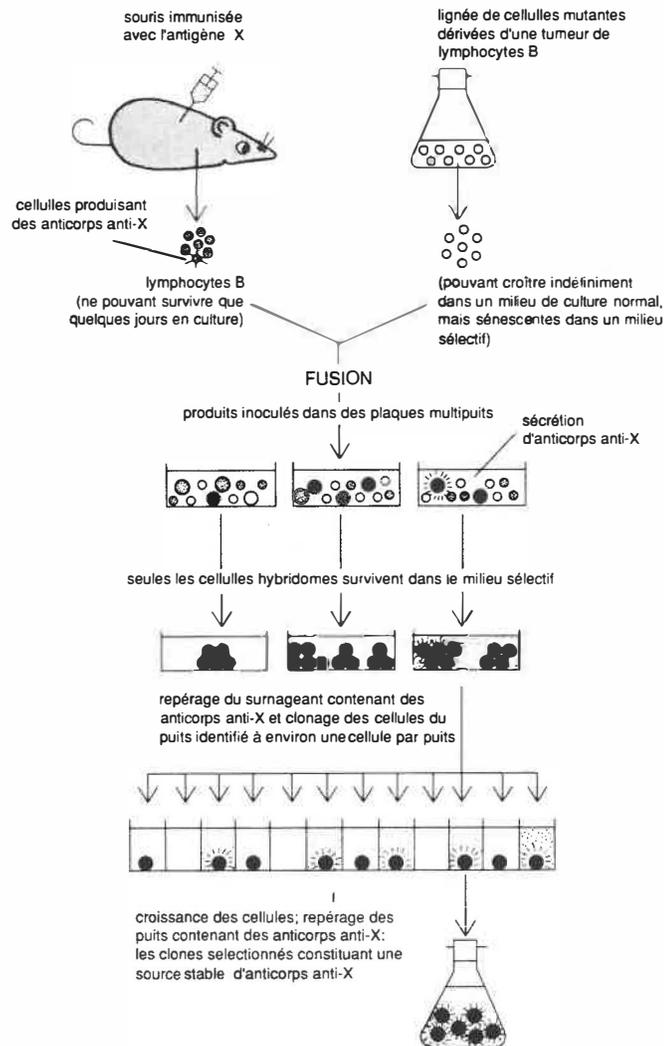


Diagramme de préparation d'hybridomes sécrétant des anticorps monoclonaux homogènes dirigés contre un antigène particulier. Le médium de croissance utilisé contient un inhibiteur qui entrave la voie normale de synthèse des nucléotides. Les cellules pour survivre doivent donc utiliser une autre voie métabolique pour synthétiser les acides nucléiques nécessaires à leur survie. Comme le mécanisme est déficient chez les cellules mutantes et que les lymphocytes B normales ne peuvent survivre longtemps en culture, seules les cellules hybrides survivent. Les cellules sécrétrices peuvent par la suite être sélectionnées par clonage.

monoclonaux sont nombreuses. Il existe un intérêt économique pour leur utilisation comme antidotes, antibiotiques viral et bactérien, agents marqueurs et réactifs pour la détermination des groupes sanguins (Hyclone, 1986). L'essor récent de ces applications presse le développement de procédés de production à grande échelle.

Par le passé, les anticorps monoclonaux étaient produits "in vivo". Pour ce faire, des cellules hybridomes sont injectées intrapéritonéalement dans des souris, à raison d'approximativement 2×10^6 cellules par souris. Suite à l'injection, une tumeur ascitique se développe. Les sérosités produites dans les épanchements abdominaux des souris sont drainées et mises en commun (Reading, 1982). Le mélange est centrifugé et le surnageant est soumis à une purification plus poussée. L'ajout de sulfate d'ammonium provoque la précipitation de l'anticorps qui sera par la suite séparé, redissous et soumis à d'autres étapes de purification. Ce processus est coûteux tant en matières premières qu'en main-d'oeuvre et requiert un grand nombre de souris. De plus, les solutions d'anticorps monoclonaux issues d'ascites contiennent d'autres protéines produites par les souris qui compromettent l'obtention d'un haut degré de pureté.

Afin de minimiser les coûts et de tenter d'éliminer les problèmes liés à la pureté des produits obtenus, plusieurs techniques de culture "in vitro" sont maintenant utilisées. Ces techniques comprennent la culture stationnaire en flacons, la culture en bouteille roulante et en flacons agités ainsi qu'une variété de bioréacteurs (opérés en cuvée, en continu, en fed batch ou en perfusion) allant du réservoir agité, aux fibres creuses, aux gaso-syphons et aux lits fluidisés (Freshney, 1986; Thilly, 1985). Les configurations employées diffèrent selon que les cellules ont conservé ou non, leur besoin d'un support d'adhésion. La culture à grande échelle appuyée d'un contrôle du procédé permet la réduction des coûts associés à la main d'oeuvre. Les milieux de culture utilisés conventionnellement réduisent le nombre d'étapes de purification du produit nécessaires. Cependant, les concentrations d'anticorps produits in vitro sont cent fois plus faibles que celles soutirées des fluides ascitiques (Altshuler et Belfort, 1986). De plus, l'utilisation de sérum pour compléter les milieux de culture ne permet pas d'éliminer tous les problèmes relatifs à la pureté des anticorps obtenus notamment lorsque des applications thérapeutiques sont envisagées.

II.2 LES MILIEUX DE CULTURE

Les cellules de mammifères sont cultivées "in vitro" dans un milieu de base composé de sels, de carbohydrates, d'acides aminés, de vitamines et de métaux en trace, habituellement supplémenté de 10 à 20% de sérum.

II.2.1 Les milieux de base

Les besoins nutritifs des cellules diffèrent d'une lignée cellulaire à l'autre selon l'origine animale, la nature du tissu duquel elle a été prélevée et le degré de transformation et d'adaptation qu'elle a atteint. La composition chimique des milieux de base comprend des acides aminés, des carbohydrates, des lipides, des vitamines, des éléments en trace ainsi que des ions. Tous les milieux contiennent les acides aminés essentiels identifiés par Eagle (1955). Des acides aminés non essentiels y sont aussi ajoutés. La nature des acides aminés inclus dans les milieux et leur quantité résultent en des taux d'utilisation variés. L'utilisation de la glutamine est toujours élevée. La leucine, l'isoleucine, la lysine, la thréonine, la valine, la tyrosine, la méthionine, l'hystidine et la phénylalanine disparaissent aussi rapidement (Thilly, 1985). Une limitation en acides

aminés a un effet négatif sur la densité cellulaire maximale. Des travaux récents (Reitzer et al., 1979) mettent en évidence l'utilisation de la glutamine comme source importante d'énergie et de carbone.

Les cultures de cellules peuvent être entretenues et croître dans des milieux contenant diverses sources de carbohydrates. Les carbohydrates les plus efficaces sont les di-, tri- et polysaccharides composés de monomères de glucose. Certains carbohydrates nécessitent la présence d'acide pyruvique dans le milieu pour pouvoir soutenir la croissance. La capacité des cellules d'utiliser certaines sources de carbone dépend probablement de la nature et de la concentration des enzymes présents dans le sérum supplémenté au milieu. Le glucose est le carbohydrate le plus généralement utilisé. Son taux d'utilisation varie selon la lignée cellulaire ainsi que la concentration initiale (Immamura et al., 1982). Freshney (1986) rapporte des taux d'utilisation variant de 0,9 à 4,7 mM/10⁸ cellules/h.

La nécessité de la présence de lipides dans les milieux de culture de cellules est l'objet de controverse (Thilly, 1985). Le sérum sanguin est une excellente source de lipides et les cellules incorporent ces lipides

à leur bagage préférablement à l'alternative de les produire elles-même. Il a été montré que plusieurs lipides tels le cholestérol, l'acide linoléïque, l'acide oléïque ainsi que certains phospholipides stimulent la croissance de plusieurs lignées cellulaires. L'observation de cet effet dépend évidemment des concentrations de sérum utilisées.

En plus des vitamines du groupe B, les milieux complexes conçus pour la culture à concentration de sérum réduite ou nulle comprennent généralement de l'acide ascorbique et de la biotine. Cette dernière a une fonction importante dans la biosynthèse des lipides essentiels à la constitution des membranes. Une limitation en vitamines a un effet plus marqué sur la croissance que sur la densité maximale atteinte (Freshney, 1986).

Les concentrations optimales des éléments se retrouvant par ailleurs en trace dans le milieu naturel des cellules sont difficiles à établir. De plus, la contamination possible des éléments nutritifs ajoutés à un milieu de culture rend difficile la quantification ou l'évaluation des effets synergétiques possibles. La liste des éléments essentiels ou potentiellement bénéfiques regroupe le cobalt, le cuivre, le fer, l'iode, le

manganèse, le molybdène, le zinc, le sélénium, le fluor et l'étain. En présence de sérum, même en faible concentration, l'ajout de minéraux n'est généralement pas nécessaire. Les milieux de base n'en contiennent généralement pas.

Les ions essentiels à la croissance sont Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_2^- , PO_4^{4-} et HCO_3^- . Ils contribuent majoritairement à l'osmolarité du milieu. Les ions phosphates présents fournissent aux milieux une certaine capacité tampon. Celle-ci doit cependant être augmentée par l'ajout de bicarbonate (NaHCO_3) en équilibre avec du CO_2 présent dans les gaz d'aération. Les concentrations de NaHCO_3 utilisées varient de 14 à 44 mM sous une atmosphère de 2 à 10% CO_2 selon la concentration de bicarbonate dans le milieu. De l'HEPES est aussi couramment utilisée à des concentrations de 20mM.

Maurer (Freshney, 1986) rapporte que les formulations disponibles commercialement les plus fréquemment utilisées pour la culture de lignées établies avec de faibles concentrations de sérum ou sans sérum sont les suivantes:

- avec supplémentation de sérum ou de protéines-Modified Eagle Medium (MEM), Dulbecco Modification of Eagle Medium (DMEM), MEM, McCoy's 5A et RPMI 1640;

- avec supplémentation d'hormones ou de protéines purifiées - F10, Ham's F12, DMEM.

Aussi ChemBioMed a-t-elle choisi de tester les milieux DMEM et RPMI 1640 (équipe Poly-IRB) et les milieux DMEM et McCoy's 5A (équipe UC-CBM). Low et Arbour (1985) rapportent cependant avoir obtenu de meilleurs résultats en termes de croissance et de production d'anticorps monoclonaux avec l'IMDM (Iscove modification of Dulbecco's medium) qu'avec le DMEM ou le RPMI 1640. De plus, pour la même lignée cellulaire, le RPMI 1640 n'a pas permis le maintien à long terme de la production d'anticorps.

Les constituants des milieux DMEM, RPMI 1640, McCoy's 5A, et IMDM sont listés au tableau 1. De façon générale, le McCoy's 5A et le Ham's F12 sont plus riches en acides aminés et en vitamines. Les concentrations de nutriments du DMEM et de l'IMDM sont plus élevées que celles des autres milieux, ils sont les seuls à contenir de l'acide pyruvique et la concentration de glutamine y est près de deux fois plus élevée que dans les autres milieux. Ces deux milieux diffèrent par le système tampon utilisé (bicarbonate pour le DMEM, et HEPES pour l'IMDM) et par la présence de potassium, de sélénium, d'alanine et d'acide glutamique dans l'IMDM. L'osmolarité de tous ces milieux varie de 276 ± 5 (IMDM) à 331 ± 5

Tableau 1 Composition des milieux de base utilisés

COMPOSES*	DMEM	RFMI	ISCOVE	McCoy
Sels inorganiques				
Nitrate de calcium 4H ₂ O		0.100		
Chlorure de calcium 2H ₂ O	0.265		0.219	0.133
Nitrate ferrique 9H ₂ O	0.0001			
Sulfate de magnesium (anhydre)	0.100	0.04884	0.100	0.100
Chlorure de potassium	0.400	0.400	0.330	0.400
Nitrate de potassium			0.000076	
Chlorure de sodium	6.400	6.000	4.505	6.460
Phosphate de sodium monobasique (anhydre)	0.109	0.800	0.109	0.504
Selenite de sodium			0.0000173	
Acides aminés				
L-alanine			0.025	0.0139
L-Arginine (free base)		0.200		
L-Arginine HCl	0.084		0.084	0.0421
L-Asparagine (anhydre)		0.050		0.045
L-Asparagine H ₂ O			0.0284	
Acide L-aspartique			0.030	0.01997
L-Cysteine		0.020		0.0315
L-Cystine 2HCl	0.0626	0.0652	0.09124	
Acide L-glutamique		0.020	0.075	0.0221
L-Glutamine	0.524	0.300	0.524	0.2192
Glycine	0.030	0.010	0.030	0.0075
L-Hystidine (Free Base)		0.015		
L-Hystidine HCl H ₂ O	0.042		0.042	0.02096
L-Hydroxiproline		0.020		0.0197
L-Isoleucine	0.105	0.050	0.105	0.0394
L-Leucemine	0.105	0.050	0.105	0.0394
L-Lysine HCl	0.146	0.040	0.146	0.0365
L-Methionine	0.030	0.015	0.030	0.0149
L-Phenylalanine	0.066	0.015	0.066	0.0165
L-Proline		0.020	0.040	0.0173
L-Serine	0.042	0.030	0.042	0.0263
L-Threonine	0.095	0.020	0.095	0.0179
L-Tryptophane	0.016	0.005	0.016	0.0031
L-Tyrosine (disodique)	0.10379	0.02883	0.10379	0.0261
L-Valine	0.094	0.020	0.094	0.0176

* Concentrations exprimées en g/L

Tableau 1 Composition des milieux de base utilisés

COMPOSES*	DMEM	RPMI	ISCOVE	McCoy
Vitamines				
Acide ascorbique				0.0005
Acide p-aminobenzoïque				0.001
D-biotine		0.0002	0.000013	0.0002
Choline Chloride	0.004	0.003	0.004	0.005
Acide folique	0.004	0.001	0.004	0.010
Myo-Inositol	0.0072	0.035	0.0072	0.036
Niacinamide	0.004	0.001	0.004	0.0005
Acide nicotinique				0.0005
Acide p-amino-Benzoïque		0.001		
Acide D-Pantothenique (Calcium)	0.004	0.00025	0.004	0.0002
Pyridoxine HCl	0.004	0.001	0.004	0.0005
Riboflavine	0.0004	0.0002	0.0004	0.0002
Thiamine HCl	0.004	0.001	0.004	0.0002
Vitamine B12		0.000005	0.000013	0.002
Bacto Peptone				0.600
Autres				
D-Glucose	4.500	2.000	4.500	3.000
Glutathione reduite		0.100		0.0005
HEPES			5.958	
Phenol rouge (Sodium)	0.0159	0.0053	0.0159	0.011
Acide Pyruvique (Sodium)	0.110		0.110	
Bicarbonate de soude	3.700	2.000	3.024	2.200
Spécifications				
pH (25°C, sans bicarbonate)	6.3 0.3	8.2 0.3	4.9 0.3	5.2 0.3
pH (25°C, avec bicarbonate)	7.8 0.3	8.2 0.3	7.0 0.3	7.1 0.3
Osmolarite [μ Osm/kg H ₂ O] (sans bicarbonate)	255 5%	237 5%	225 5%	256 5%
Osmolarite [μ Osm/kg H ₂ O] (avec bicarbonate)	331 5%	278 5%	276 5%	298 5%

* Concentrations exprimées en g/L

mOsm/kg H₂O (DMEM). Barnes et Sato (1980a) ont employé avec succès un mélange 1:1 de DMEM et Ham's F12 comme milieu de base pour leur formulation de milieu sans sérum.

II.2.2 La supplémentation des milieux

Le sérum généralement utilisé est le sérum de foetus bovin (FBS). Selon les disponibilités, les coûts et les besoins nutritifs spécifiques d'une lignée cellulaire, du sérum d'origine bovine ou chevaline est aussi utilisé, bien que dans une moindre mesure. Le sérum sanguin est constitué d'un mélange de plusieurs biomolécules dont les différentes activités promouvoient ou inhibent la croissance des cellules dans des rapports déterminés par les besoins physiologiques. Il fournit des facteurs hormonaux stimulant la prolifération des cellules ainsi que diverses fonctions, des protéines de transport, des minéraux, des lipides ainsi que des facteurs permettant l'adhésion et la propagation des cellules. Il est reconnu inhiber l'action des protéases dans les milieux (Griffiths, 1987) et ainsi diminuer la dégradation des anticorps monoclonaux produits.

Plusieurs travaux de recherche sont effectués depuis plusieurs années afin de réduire la concentration

de sérum dans les milieux de culture. Ces travaux sont motivés par des besoins liés à la recherche sur l'action des éléments nutritifs et des facteurs de croissance sur la survie et la prolifération de cellules différenciées d'une part, et pour des raisons économiques liées à l'utilisation de culture de cellules animales comme vecteur de production de biomolécules, d'autre part (Barnes et Sato, 1980b). L'utilisation de milieux à faible teneur ou sans sérum permet cependant de réduire les principaux désavantages liés au sérum et ainsi:

- éviter les différences de composition de sérum d'un lot à l'autre suivant l'âge, le sexe, la santé et l'histoire nutritionnelle du donneur;
- réduire les risques de contamination par les virus, spores, mycoplasmes ou drogues;
- faciliter la purification;
- se départir de la cytotoxicité de certains de ses constituants;
- et, possiblement, réduire les coûts.

De plus, l'environnement physiologique naturel des cellules peut être localement très différent de celui créé par le sérum. Celui-ci peut s'avérer déficient et il est envisageable d'obtenir une meilleure croissance en dosant les facteurs de croissance supplémentés. Le sérum peut contenir divers inhibiteurs, des toxines d'origine

bactérienne, des lipides et possiblement, des enzymes qui peuvent initier la production de toxines. En contrepartie, la qualité et la reproductibilité des milieux chimiquement définis dépendent du niveau de purification des produits chimiques et de la qualité de l'eau utilisée (Rothblat et Christofalo, 1972).

II.2.3 • Conditions environnementales

Les conditions de culture doivent être adéquates et sont réflétées par l'osmolarité, le pH, le pO_2 , la température et la viscosité du milieu.

La température optimale pour les cellules de mammifères est de $36.5^{\circ}C$. Les cellules peuvent tolérer une chute de température: elles peuvent survivre quelques jours à $4^{\circ}C$ et peuvent être congelées jusqu'à $-196^{\circ}C$. Elles tolèrent cependant mal d'être exposées à des températures de $2^{\circ}C$ supérieures à la normale et meurent rapidement à $40^{\circ}C$.

La réponse de diverses lignées aux autres conditions environnementales varie énormément. Ainsi les conditions optimales d'opération relativement au pH et à l'oxygène dissous (DO) doivent être déterminées expérimen-

talement. Birch et Edwards (1980) ont étudié l'effet du pH sur des cultures de cellules de mammifère. Ils ont pu montrer que le taux de croissance est maximal à l'intérieur d'une plage de pH variant de 7,0 à 7,6. Par contre, la densité maximale de cellules observée était plus fortement influencée par le pH et était optimale à pH 7,4. La consommation de glucose, elle, était relativement constante entre pH 6,8 et pH 7,6 mais chutait rapidement sous pH 6,8. Selon Glacken et al. (1986), l'ajout de 10 mM de chlorure d'ammonium à du DMEM équilibré avec 10% CO₂ ne provoque pas de variation de pH et l'acide lactique est le seul acide titrable produit par les cellules.

•Le maintien d'une concentration optimale d'oxygène dissous dans le milieu de culture est un objectif important. En effet, l'oxygène est un élément nutritif essentiel. Comme récepteur d'électron, l'oxygène sert d'élément moteur pour la production d'énergie par l'entremise des réactions d'oxydation-phosphorilation (Thilly, 1985). L'effet de la DO sur la croissance et la production des cellules a fait l'objet de plusieurs études dont les résultats ne sont pas toujours cohérents. †Balin et al. (1976) ont montré que le taux spécifique de croissance, μ , pour des cultures maintenues à 30% de saturation en oxygène est supérieur à ceux observés avec

des DO inférieures à 6%. Boraston et al. (1984) ont effectué des cultures en cuvée d'hybridomes et ont étudié l'effet de la DO sur une plage étendue. Ils concluent que la variation de la DO n'a que peu d'effet sur le taux de croissance et que la densité de cellules viables atteinte, X_v , est maximale lorsque l'oxygène dissous est de 8% et minimale lorsque l'oxygène dissous est de 60%. Reuveny et al. (1986) ont comparé deux cultures en cuvée avec un contrôle d'oxygène dissous fixé à 25 et 60% de saturation. Bien que X_{max} et μ aient été plus élevés à 60%, la viabilité des cellules dans la période de déclin et la quantité d'anticorps produits sont plus importantes à 25% d'oxygène dissous. L'environnement changeant des cultures en cuvée et le peu de données disponibles rendent difficile l'interprétation des quelques résultats rapportés. Dans une étude effectuée en chemostat, Miller et al. (1987) ont observé que $X_{v,max}$ augmente lorsque la DO diminue jusqu'à une valeur critique de 0,5%. Ainsi, une concentration d'oxygène dissous de 0,5% constitue, pour leur culture, un optimum pour la croissance alors qu'une concentration de 50% semble être un optimum pour la production d'anticorps. Ils ont aussi remarqué que le taux d'utilisation d'oxygène (OUR) ne varie pas lorsque la DO est supérieure à 10%. La source de carbone utilisée ainsi que sa concentration affecte cependant le taux

d'utilisation d'oxygène (Thilly, 1985).

La sensibilité des cellules au cisaillement dont elles font l'objet dans les bioréacteurs varie. Elle est influencée par la conformation du système d'agitation utilisé ainsi que par la composition du milieu. La viscosité du milieu est due à la présence de protéines dans le sérum supplémenté. Typiquement, la viscosité d'un milieu contenant 5% FBS est de 1 mPa sec. Dans les cultures sans sérum, une variété de produits sont ajoutés pour leur effet protecteur. La nature de cet effet n'est pas encore bien comprise. En plus de l'augmentation de viscosité qu'elles provoquent, ces substances semblent contribuer à la résistance mécanique des cellules elles-mêmes. Plusieurs de ces substances agissent comme transporteur ou comme agent chélatant des substances nutritives. Ces adjuvants moléculaires peuvent être des protéines extraites du sérum, comme l'albumine, ou des polymères synthétiques tels le Pluronic F-68, le polyvinylpyrrolidone (PVP), le dextran, le méthylcellulose (CMC) et le méthocel (Rothblat et Christofalo, 1972).

II.3 CINÉTIQUE ET MODÉLISATION

Pour produire de grandes quantités d'anticorps

monoclonaux, il est nécessaire d'opérer les bioréacteurs dans des conditions optimales. Dans cette optique, une meilleure connaissance de la croissance cellulaire et de la production d'anticorps est primordiale. La littérature scientifique regorge d'informations dans ce domaine. Elles sont cependant souvent éparses et les résultats publiés varient suivant la lignée cellulaire. Aussi est-il nécessaire de déterminer la cinétique de croissance et de production et de définir les conditions optimales d'opération pour chacune des lignées cellulaires d'intérêt.

Le développement de modèles cinétiques représentant la culture de cellules animales constituent un défi important. Les effets des limitations en substrat sont compliquées par le fait que les nutriments sont partiellement substituables selon les conditions. C'est le cas du glucose et de la glutamine dont les taux d'oxydation varient avec le ratio de leurs concentrations respectives (Glacken et al., 1986; Hu et al., 1987). La production d'anticorps monoclonaux n'est pas encore bien comprise. Ainsi les relations entre la production, la croissance, la population cellulaire et les composés chimiques présents dans le milieu ne sont pas clairement établis. Par exemple, Birch et al. (1984) rapportent que 50% des

anticorps sont produits après la phase de croissance, alors que Luan et al. (1987) ont observé une production d'anticorps proportionnelle à la densité cellulaire.

Comme pour la cinétique microbienne, les modèles non structurés les plus fréquemment utilisés pour représenter les cultures de cellules animales s'apparentent à ceux de la cinétique enzymatique. Les modèles proposés sont généralement des systèmes d'équations différentielles couplées, elles-mêmes constituées d'un arrangement adéquat de termes du 1^{er} ordre de type Monod.

II.3.1 Croissance cellulaire et production d'anticorps

II.3.1.a Production d'anticorps

L'incertitude entourant la cinétique de production entrave actuellement la mise à l'échelle des procédés de production (Batt et Compala, 1987; Lavery et al., 1985; Low et Arbour, 1985). Merten et al. (1985) affirment qu'en termes de production, la performance des cultures de cellules d'hybridomes dépend de la densité cellulaire atteinte, de la composition du milieu de culture et de la nature de l'hybridome probablement déterminé par le degré de différenciation atteint par les

lymphocytes B avant la fusion.

Comme Birch et al. (1984), Reuveny et al. (1985) rapportent qu'une partie des anticorps produits dans leurs cultures en cuvée le sont après la phase exponentielle. Certains auteurs ont observé une production d'anticorps proportionnelle à la densité de cellules viables (Luan et al., 1987; Renard et al., 1988). D'autres rapportent avoir constaté un taux de production d'anticorps proportionnel au taux de croissance (Taya et al., 1986). De cultures effectuées en chemostat, Birch et al. (1984) ont trouvé que le taux de croissance n'affectait pas la production d'anticorps dans des conditions limitatives en oxygène ou en glutamine. Pour leur part, Miller et al. (1986) ont observé qu'une limitation en glucose et en glutamine provoque une diminution du taux de croissance accompagnée d'une hausse du taux de production d'anticorps.

Merten (1985) a suggéré qu'une inhibition rétroactive affecte la production d'anticorps chez les lignées d'hybridomes montrant une faible productivité. Selon sa classification, ces hybridomes sont caractérisés par un taux de sécrétion initial élevé suivi d'une chute et d'une stabilisation du taux de sécrétion.

Glacken (1987) a évalué l'effet de divers paramètres tels la croissance, la densité cellulaire, les concentrations de sérum, de glucose, de glutamine, d'acide lactique et d'ammoniaque dans le milieu de culture, sur la production d'anticorps. Il a conclu de ces expérimentations que seule la concentration de l'acide lactique dans le milieu affecte significativement le taux de production d'anticorps.

II.3.1.b Effet des nutriments sur la croissance cellulaire

Les deux substrats les plus importants dans les cultures de cellules animales sont le glucose et la glutamine. Leurs taux d'utilisation sont les plus élevés. Bien que certains autres acides aminés soient consommés, tous les auteurs font l'hypothèse qu'ils sont présents dans des quantités suffisantes dans les milieux de culture et qu'ainsi aucun n'est un substrat limitant. On peut imaginer qu'il sera important de vérifier cette hypothèse dans le cas d'opération à haute densité cellulaire.

Le glucose et la glutamine sont reconnus avoir un effet complémentaire. Le glucose fournit les riboses nécessaires aux cellules alors que la glutamine comble un

besoin en acides aminés comme l'illustre le schéma de la figure 3. Tous deux constituent une source d'énergie et de carbone importante. Baltzis et Fredrickson (1988) soulignent le fait que dans les systèmes où deux composés sont potentiellement limitants, le taux de rendement sur chacun des nutriments, $Y_{X/S}$, dépend de l'identité du substrat limitant. En accord avec cette observation générale, les taux de rendement observés au cours de cultures de cellules animales varient. Les travaux de Hu et al. (1987) ont permis d'établir qu'une diminution de la concentration en glucose, $[Glc]$, provoque une augmentation du taux d'utilisation de la glutamine, q_{Gln} , ainsi qu'une diminution du taux d'utilisation du glucose, q_{Glc} . Similairement, Miller et al. (1987) ont montré dans une culture en chemostat qu'une augmentation de la concentration en glutamine, $[Gln]$, résulte en une augmentation des taux d'assimilation de la glutamine, q_{Gln} , et de l'oxygène, q_{O_2} , et en une diminution du taux d'assimilation du glucose, q_{Glc} . Ainsi, il est généralement observé que le taux d'assimilation d'oxygène,

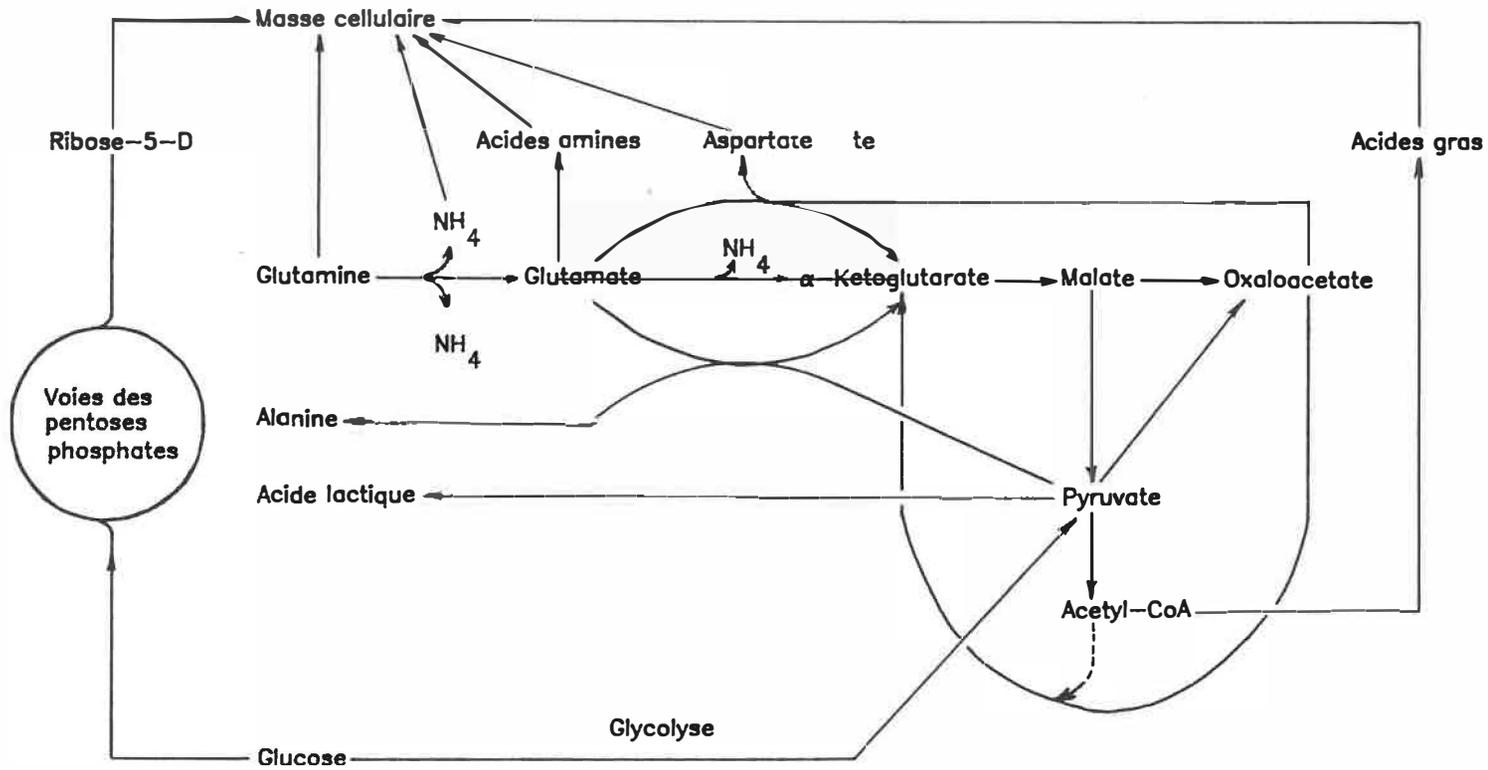
$$OUR = K_L a ([O_2]^* - [O_2]) - d[O_2]/dt \quad (1)$$

$$OUR = OTR - d[O_2]/dt \quad (2)$$

est plus élevé lorsque la concentration en glucose est réduite. Un ajout de glucose à la culture provoque une diminution immédiate de l'OUR (Frame et Hu, 1985).

Figure 3 Voies métaboliques d'assimilation de la glutamine et du glucose et d'excrétion de l'ammoniaque et de l'acide lactique

adapté de Glacken, 1988



Glacken et al. (1986) soulignent qu'une concentration élevée de glucose déplace le métabolisme du glucose du cycle du pentose phosphate au cycle de la glycolyse aérobie. Ils notent aussi qu'une diminution du taux d'assimilation du glucose, généralement associée à une faible concentration de glutamine, stimule la respiration et l'oxydation de la glutamine vers le CO_2 .

II.3.1.c Effet des toxines sur la croissance

Un fort pourcentage de glucose est converti en acide lactique par le biais du métabolisme glycolitique. Pour les cellules HeLa, on relate que 80% du glucose est transformé en acide lactique de même que 13% de la glutamine (Glacken et al., 1986). Outre son effet sur le pH du milieu, l'acide lactique a un effet inhibiteur reconnu. Le sous-produit toxique issue de l'assimilation de la glutamine est l'ammoniaque. Selon la voie utilisée, l'assimilation d'une molécule de glutamine produit entre une et deux molécules d'ammoniaque. Une dégradation spontanée, non catalysée enzymatiquement, de la glutamine provoque aussi la formation d'ammoniaque suivant une cinétique du premier ordre (Tritsch et Moore, 1962):

$$\frac{d [\text{Gln}]}{dt} = - k [\text{Gln}] \quad (3)$$

avec k de l'ordre de $0,0048 \text{ h}^{-1}$ à $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Glacken, 1987).

L'accumulation de ces métabolites est généralement identifiée être la première cause de mortalité. Les concentrations en acide lactique et en ammoniacque présentes en fin de culture en cuvée atteignent des niveaux de 40 mM et 4 mM respectivement dans le DMEM. Thorpe et al. (1987) ont montré que des concentrations de toxines plus faibles que celles mesurées en fin de culture ont un effet inhibiteur sur la croissance des cellules hybridomes. Les produits testés étaient l'ammoniacque, le lactate et le peroxyde. Les concentrations variaient de 4 à 10 mM pour l'acide lactique et l'ammoniacque, et de $0,0088$ à $8,8 \text{ mM}$ pour le peroxyde. De plus, ils ont investigué la possibilité que les cellules produisent d'autres toxines non identifiées en testant l'effet de 10% (v/v) d'un milieu préalablement conditionné par des cellules. Des concentrations de 4 mM d'acide lactique, de 4 mM d'ammoniacque, de $0,088 \text{ mM}$ de peroxyde ainsi que le milieu conditionné ont montré un effet négatif sur la croissance. Reuveny et al. (1986) ont observé des effets toxiques à 28 mM d'acide lactique et 2 mM d'ammoniacque. Suite à une expérimentation basée sur un plan factoriel,

Glacken (1987) a pu démontrer que l'accumulation d'ammoniaque a un effet plus marqué sur la croissance que l'acide lactique.

Les cellules tumorales sont aussi reconnues avoir de faibles concentrations d'enzymes permettant d'éliminer les effets toxiques de l'oxygène. Cette carence résulte en des concentrations de superoxyde (O_2^-) qui inhibent des enzymes importants pour l'oxydation du glucose et portent atteinte aux lipides des membranes que la cellule doit alors réparer en utilisant entre autres l'acétyl-Co-A au détriment du cycle de Kreb (Glacken, 1988).

On constate donc que les stratégies d'alimentation appliquées dans le but d'optimiser la production d'anticorps dépendent de la connaissance que l'on a du système. Les conditions du milieu doivent être telles que:

- l'oxygène soit disponible en quantité suffisante, mais en concentration assez faible pour éviter les effets toxiques. En contrepartie, l'effet de la concentration d'oxygène sur la production d'anticorps devrait être explorée.

- les concentrations d'ammoniaque dans le milieu soient

faibles. Ceci peut être obtenu par dilution dans une opération en continu au prix d'une dilution du produit. Une plus faible concentration de glutamine dans le bioréacteur permet d'atteindre cet objectif au prix d'une augmentation de la glycolyse productrice d'acide lactique et, possiblement, d'une diminution du taux de croissance.

- s'il s'avère exact que l'acide lactique a un effet négatif sur la production d'anticorps associable à une inhibition, il faut tenter de limiter le métabolisme de la glycolyse pour l'assimilation du glucose.

Glacken, dans un article publié en 1988, ébauche quelques stratégies intéressantes dont l'étude dépasse cependant le cadre de ce travail.

II.3.2 La modélisation des cultures en cuvée

L'opération en cuvée ou semi-continue des bioréacteurs prédomine encore l'industrie. De plus, les cultures en cuvée amorcent les procédés en continu. Les paramètres cinétiques de ces cultures servent généralement de premiers estimés pour la modélisation de d'autres procédés. Leur importance est donc considérable.

La principale caractéristique des procédés en cuvée est l'évolution dans le temps de toutes les variables du procédé. Ceci définit le comportement d'un réacteur dont les paramètres sont quantifiés par des gradients. Les variables du procédé sont des concentrations, toutes caractérisées par un taux spécifique par rapport à la biomasse. Les taux volumétriques, eux, sont utilisés dans les équations de bilan. Ces variables et les taux qui y sont associés sont la base des modèles. Le tableau 2 résume les expressions de ces variables et les définitions de ces taux.

Les équations de taux peuvent être obtenues à partir des résultats expérimentaux en utilisant soit des techniques de différenciation, soit des techniques d'intégration.

Les méthodes d'intégration sont souvent utilisées dans les laboratoires de microbiologie pour évaluer les taux de croissance. En intégrant l'équation de taux pour la croissance on obtient:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (4)$$

Tableau 2 Variables et taux d'un bioprocédé en cuvée

Variable	Concentration	Taux volumétrique	Taux spécifique
Biomasse	X cellules/L	$r_x = \frac{dX}{dt}$ cellules/L.h	$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$ h ⁻¹
Substrat	S mM	$r_s = \frac{dS}{dt}$ mM/h	$q_s = \frac{-1}{X} \frac{dS}{dt}$ mmole/cellule.h
Produit	P mg/L	$r_p = \frac{dP}{dt}$ mg/L.h	$q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$ mg/cellule.h

$$\bar{\mu} = \frac{1}{t_2 - t_1} \int_{t_1}^{t_2} \mu dt = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} = \frac{\ln X}{t} \quad (5)$$

que l'on peut évaluer par régression linéaire à partir des données expérimentales. Dans la mesure où les conditions expérimentales sont telles que le changement de concentration du substrat est minime devant la concentration de biomasse, il est possible de déterminer μ en fonction de la concentration de substrat initial, S_0 . Ainsi si $dx/dt \gg ds/dt$, alors $S \sim S_0$ et $\mu \sim \mu(S_0)$.

L'utilisation de méthode de différenciation requiert l'évaluation de la dérivée des courbes de croissance à l'aide de méthodes graphiques ou numériques. L'avantage de cette méthode réside dans la quantité d'information pouvant être obtenue d'une culture. Elle requiert cependant un échantillonnage régulier à des intervalles de temps qui permettent de représenter adéquatement l'aspect dynamique.

II.3.2.a Croissance

La cinétique de la croissance microbienne est encore dominée par des expressions de termes du premier ordre de type Monod.

$$\mu = \mu(S) = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad (6)$$

Plusieurs autres modèles sont rapportés dans la littérature. Cependant, Boyle et Berthouex (1974) concluent d'une étude comparative que les performances de ces modèles ne peuvent être distinguées étant donné le large intervalle de confiance affectant les données expérimentales.

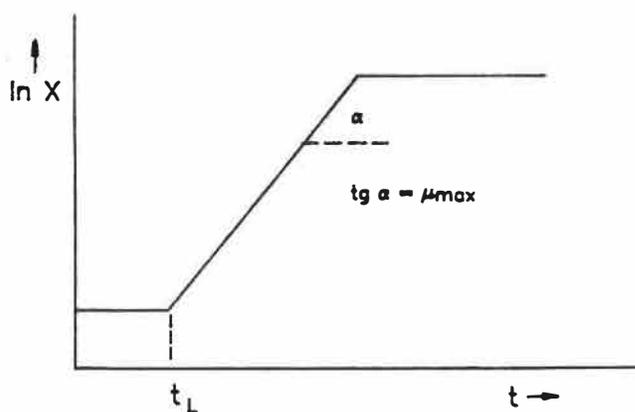
Une phase de latence peut généralement être observée avant la phase de croissance exponentielle. Au cours de cette période, le taux de croissance augmente lentement et le taux de mortalité peut être élevé. Cette période est la conséquence d'une faible densité ou d'une faible viabilité de l'inoculum, ainsi que de l'histoire de celui-ci en termes de phase de croissance et de composition du milieu (substrats, toxines, pH). La durée de la phase de latence, t_L , est définie comme suit

$$t_L = t - \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \frac{X}{X_0} \quad (7)$$

et peut être estimée graphiquement tel qu'illustré à la figure 4. L'intégration du temps de latence comme paramètre d'une expression cinétique de type Monod donne

$$\mu(S, t) = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} (1 - \exp(-t/t_L)) \quad (8)$$

Figure 4 Estimation du temps de latence, t_L , à partir d'une représentation graphique de $\ln(X/X_0)$ en fonction du temps, t



Certains auteurs ont exprimé t_L en fonction de la concentration initiale moyenne de substrat ou de la densité de l'inoculum (Moser, 1985).

L'inhibition par le substrat est modélisé comme suit

$$\mu = \mu_{\max} \frac{1}{1 + K_S/S + S^2/K_I} \quad (9)$$

où K_I est la constante d'inhibition du substrat. L'équation (9) se réduit à

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S + S^2/K_{I,S}} \sim \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_{I,S}}{K_{I,S} + S} \quad (10)$$

lorsque $K_{I,S} \gg K_S$.

Similairement, plusieurs produits du métabolisme affectent la croissance. C'est le cas de l'ammoniaque et de l'acide lactique dans la culture des cellules de mammifère. Lorsqu'une concentration de produit, P , inhibe totalement la croissance, μ dépend de P selon une courbe hyperbolique ou sigmoïdale. Le modèle de plus couramment utilisé (Moser, 1985) est le suivant

$$\mu(S,P) = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_{I,P}}{K_{I,P} + P} \quad (11)$$

Lorsque les procédés ont un long temps de résidence comme c'est le cas des biotraitements de pollution, ou que le produit d'intérêt est un métabolite secondaire sécrété après la phase de croissance, il est important d'inclure le taux de mortalité spécifique, k_d . Dans ce cas, les équations de taux deviennent

$$r_x = (\mu - k_d) X \quad (12)$$

$$-r_s = \frac{1}{Y_{x/s}} \mu X + m_s X$$

où k_d est le taux spécifique de mortalité, $Y_{x/s}$ le coefficient de rendement en biomasse et m_s le coefficient de maintenance. k_d et m_s ne sont généralement pas considérés constants. Toutefois, on assimile m_s à $m_{s,max}$ atteint dans la phase de croissance malgré le fait que $m_s=0$ lorsque $\mu=0$ dans la phase stationnaire. m_s et $Y_{x/s}$ sont évalués graphiquement à partir d'une représentation du taux spécifique d'assimilation du substrat, q_s , en fonction du taux spécifique de croissance, μ , puisque

$$q_s = r_s/X = \frac{\mu}{Y_{x/s}} + m_s \quad (13)$$

Le taux de mortalité, tout comme le taux de croissance, peut varier selon les conditions prévalant dans la culture. En culture de cellules où les données expérimentales peuvent être exploitées en termes de viabilité des cellules, la majorité des auteurs qui ont tenté de modéliser ces résultats ont opté pour un modèle de type Monod similaire à celui développé pour la croissance. Ainsi, ils expriment k_d en fonction des substrats et des produits toxiques selon

$$k_d = k_{d,max} \frac{K_{d,s}}{K_{d,s} + S} \frac{P}{K_{d,p} + P} \quad (14)$$

Si plus d'un substrat doit être considéré, qu'il soit utilisé séquentiellement ou simultanément, ou si les voies métaboliques utilisées varient au cours de la culture le modèle présenté plus haut doit être modifié. Les bioprocédés aérobies constituent un exemple de choix. En effet, quel que soit le substrat utilisé par les cellules, l'oxygène peut limiter la croissance. Le taux d'utilisation d'oxygène, OUR, est limité par le taux de transfert d'oxygène, OTR, qui est quantifié par l'entree du coefficient de transfert d'oxygène, $K_L a$

$$\text{OUR} = K_L a ([O_2]^* - [O_2]) - d[O_2]/dt \quad (1)$$

$$\text{OUR} = \text{OTR} - d[O_2]/dt \quad (2)$$

$$\frac{d[O_2]}{dt} = \text{OTR} - \frac{1}{Y_{X/O}} \mu(S,O) X \quad (15)$$

La double limitation de la croissance est représentée par

$$\mu(S,O) = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{[O_2]}{K_O + [O_2]} \quad (16)$$

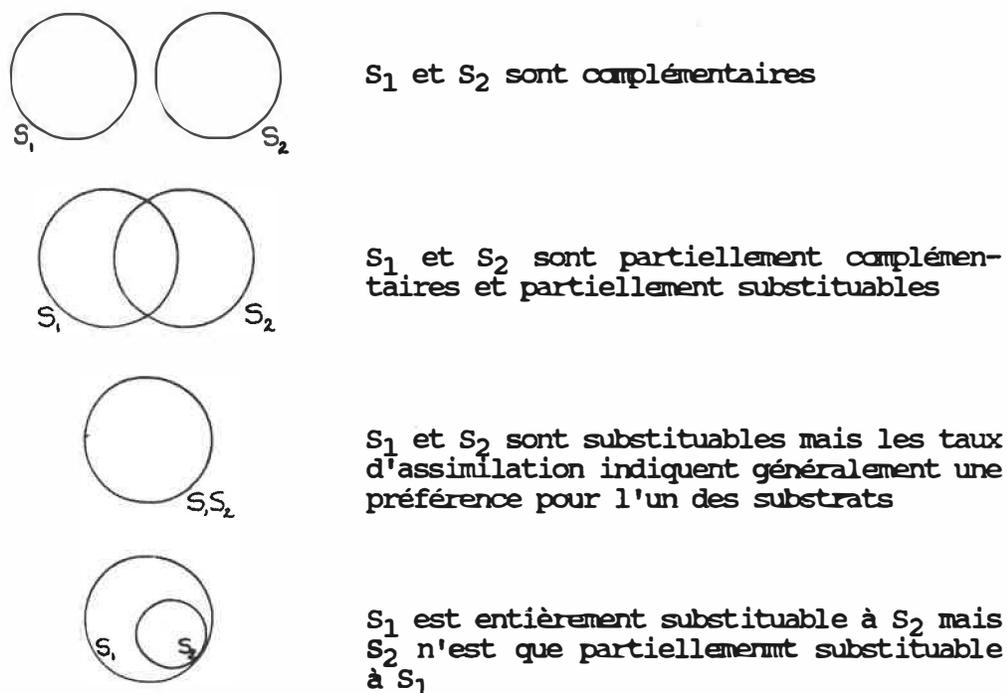
la complexité des milieux de culture tant au niveau des substrats que des intermédiaires des métabolismes que sont par exemple les vitamines et les acides aminés, fait en sorte que les cellules adaptent leurs utilisations de substrats, et les synthèses enzymatiques qui leur sont associées, au fur et à mesure des disponibilités et des besoins. Diverses situations en découlent. L'utilisation

des substrats peut être simultanée ou séquentielle avec la possibilité d'un chevauchement transitoire. L'utilisation différente de substrats multiples peut être abordée par le biais d'une classification des substrats selon leur caractère complémentaire ou substituable. Baltzis et Fredrickson (1988) présentent une classification schématisée à la figure 5. La glutamine et le glucose dans la culture de cellules de mammifère sont un exemple de substrats partiellement substituables. Malheureusement, peu de travaux sur ces types de substrats sont rapportés. Les modèles publiés représentent des cultures effectuées sur des substrats entièrement complémentaires ou entièrement substituables utilisés de façon simultanée ou séquentielle selon le cas. Le taux de croissance de cultures effectuées sur des substrats multiples utilisés séquentiellement est décrit par un équation générale de la forme

$$\mu(S_1, S_2) = \mu(S_1) + \mu(S_2) \cdot f \quad (17)$$

où f représente la répression catabolique de l'utilisation du second substrat qui, selon les auteurs, sera fonction de S_1 , S_2 , du temps, t , ou de la longueur de la période intermédiaire, $t_{L,2}$ entre l'utilisation de S_1 et S_2 : $t_{L,2}$. Il s'avère que l'utilisation simultanée de substrats soit plus difficile à décrire mathématiquement. La région délimitée par les plages de concentration où deux ou

Figure 5 Schéma de classification de paires de nutriments



plusieurs substrats sont limitants est très petite. Néanmoins, les modèles doivent considérer dans une seule équation toutes les limitations afin de tenter d'englober un changement dans l'identité du ou des substrats limitants au cours de la culture. Dans un effort de généralisation, Tsao et al. (Moser, 1985) ont distingué les substrats promouvant la croissance, S_C , des substrats essentiels à la croissance, S_E . Cette distinction les a menés à la formulation mathématique suivante:

$$\mu(S_C, S_E) = \left[\mu_{\max,0} + \sum_i \mu_{\max,i} \frac{S_{C,i}}{K_{SC,i} + S_{C,i}} \right] \prod_j \frac{S_{E,j}}{K_{SE,j} + S_{E,j}} \quad (18)$$

L'effet des substances promotrices est modélisé par l'addition à μ_{\max} d'une somme de termes de Monod. Ainsi, si aucune de ces substances n'est présente, $\mu_{\max,0}$ est toujours possible. La limitation par différents substrats essentiels est considérée dans les termes multipliant μ_{\max} . Cette approche peut être appliquée au système glucose-oxygène décrit plus haut pour obtenir l'équation (15). Les modèles les plus simples sont bâtis en multipliant ainsi les termes de limitation de chacun des substrats

$$\mu(S_j) = \mu_{\max} \prod_i \frac{S_i}{K_i + S_i} \prod_j \frac{K_{I,j}}{K_{I,j} + P_j} \quad (19)$$

considérant que la composition du milieu de culture est d'ores et déjà optimale.

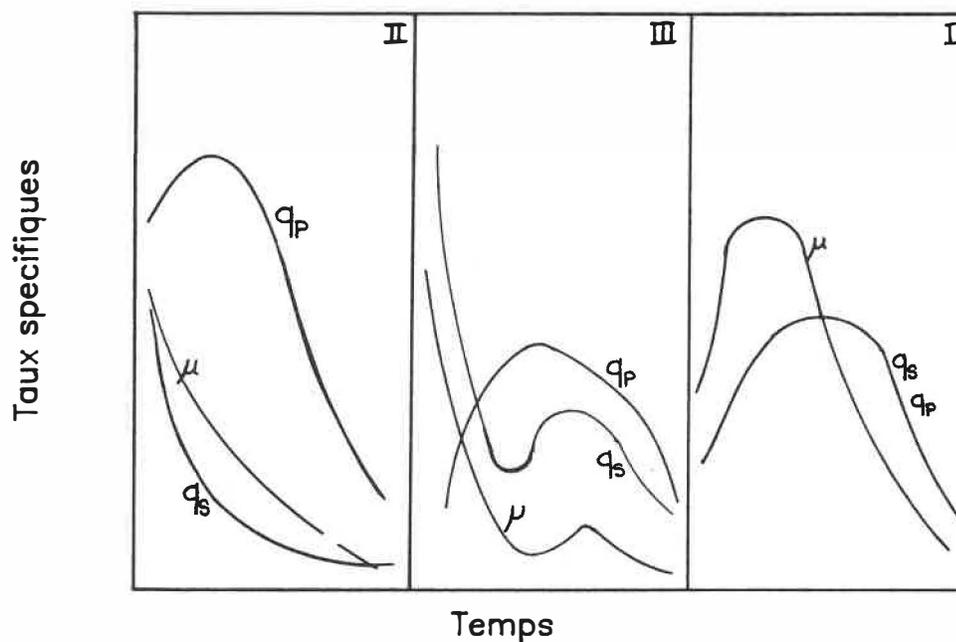
II.3.2.b Production

Comme la présence de cellules est une condition nécessaire à la synthèse d'un produit d'intérêt, la production devrait pouvoir être mise en relation avec la croissance ou avec la densité cellulaire. En termes de production, Luedeking (Blakebrough, 1967) réduit les processus de fermentation à trois types:

- production associée à la croissance où le produit est le résultat du métabolisme énergétique primaire, la fermentation alcoolique en étant une illustration, ou un métabolite intermédiaire comme les vitamines et les acides aminés;
- production non-associée à la croissance où le produit est synthétisé indépendamment par les cellules. La production d'antibiotiques en fournit des exemples.
- production mixte où le produit est l'aboutissement de réactions complexes indirectement liées au métabolisme primaire et est généralement le résultat d'un métabolisme anormal induit par des manipulations génétiques. La production d'acides lactique et citrique et de certains acides aminés appartiendraient à cette catégorie.

Une représentation simultanée de l'évolution des taux spécifiques de croissance, d'assimilation de substrat et de production (figure 6) permet de distinguer ces trois classes de produits. D'une façon plus directement appréciable, une représentation graphique de q_p en fonction de μ aura selon le type de production, l'allure des courbes présentées à la figure 7. La production associée à la croissance est quantifiée par la relation

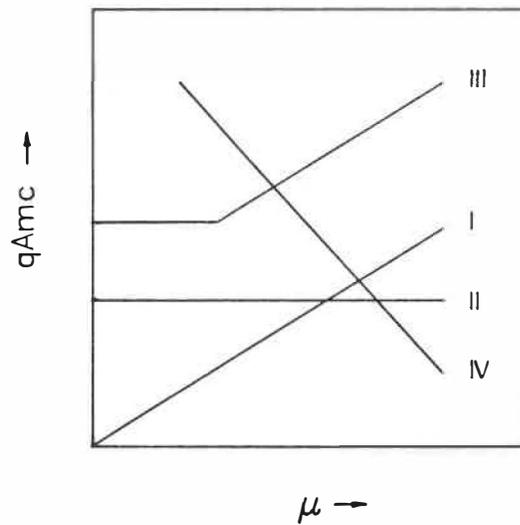
Figure 6 Représentation schématique des relations entre les taux spécifiques d'un bioprocédé pour une production associée à la croissance (I), non-associée à la croissance (II), et mixte (III). (Adapté de Blakebrough, 1967).



$$q_p = \frac{Y_{p/s}}{Y_{x/s}} \mu = Y_{p/x} \mu \quad (20)$$

La production non-associée à la croissance est plus difficile à représenter. Les cas d'une dépendance de la production sur la biomasse est représenté par

Figure 7 Représentation schématique de la relation entre le taux spécifique de production, q_p , et le taux de croissance pour une production associée à la croissance (I), non-associée à la croissance (II), mixte (III) et dans le cas d'une relation négative (IV)



$$r_p = \frac{dP}{dt} = k_p X \quad (21)$$

Plusieurs autres équations ont été développées pour divers procédés. Entre autres, celle de Leudeking-Piret (Bailey

et Ollis, 1986):

$$q_p = Y_{p/x} \mu + k_p \quad (22)$$

à laquelle Constantinides et al. (Moser, 1985) ont ajouté un terme tenant compte d'une dégradation du produit. La cinétique considérée est du premier ordre telle qu'observée dans la production de pénicilline

$$r_p = Y_{p/x} \mu X + k_p X - k_{p,d} P \quad (23)$$

Plusieurs auteurs ont tenté d'introduire une certaine dépendance sur le temps en considérant l'âge moyen des cellules ou un concept de temps de maturation, t_m (Moser, 1985). Dans ce dernier cas, Brown et Vass proposent:

$$q_p \Big|_t = Y_{p/x} \mu \Big|_{t-t_m} \quad (24)$$

$$P \Big|_t = Y_{p/x} X \Big|_{t-t_m} \quad (25)$$

Rowley et Pirt ont observé une corrélation négative entre q_p et μ qu'ils ont exprimée mathématiquement

$$q_p = q_{p,max} - Y_{p/x} \mu \quad (26)$$

II.3.3 Modélisation de la cinétique de croissance et de production d'anticorps monoclonaux

Plusieurs chercheurs ont contribué à la modélisation des cultures de cellules de mammifère et, particulièrement, des cultures libres d'hybridomes. La majorité ont opté pour des modèles non-structurés dominés

par la cinétique de Monod. Compte tenu de l'effet inhibiteur des métabolites et de la présence d'au moins deux substrats potentiellement limitants, le modèle retenu pour la croissance à la forme générale

$$\mu = \mu_{\max} \prod_i \frac{S_i}{K_i + S_i} \prod_j \frac{K_{I,j}}{K_{I,j} + S_{I,j}} \quad (27)$$

Peu d'auteurs ont incorporé le terme représentant la latence. Lorsque les méthodes expérimentales permettent de différencier les cellules viables des cellules mortes, l'expression

$$k_d = k_{d,\max} \prod_i \frac{S_i}{K_{D,i} + S_i} \prod_j \frac{K_{D,I,j}}{K_{D,I,j} + S_{I,j}} \quad (28)$$

est généralement utilisée pour rendre compte du taux de mortalité. Les taux spécifiques d'utilisation de substrat sont mis en relation avec la croissance selon un modèle de maintenance,

$$q_s = \frac{1}{Y_{X/S}} \mu + m_s \quad (29)$$

alors que les taux de production d'acide lactique et d'ammoniaque sont directement associés au taux d'utilisation du substrat correspondant

$$q_p = \frac{q_s}{Y_{P/S}} \quad (30)$$

La modélisation de la production est dominée par l'équation de Leudeking-Piret:

$$q_p = Y_{p/x} \mu + k_p \quad (22)$$

bien que plusieurs auteurs aient utilisé avec succès d'autres relations similaires à celles décrites plus haut. Le tableau 3 présente les modèles mis au point par Bree et Dhurjati (1988), Dallili et Ollis (1988), Miller et al. (1988), et Glacken (1988). Certains d'entre eux comportent des termes impliquant un taux de dilution. Dans ces cas, l'évaluation des paramètres des modèles a été effectuée en analysant la réponse à une perturbation d'une culture en continu. Lorsque des cultures en cuvée ont été utilisées, les paramètres μ_{max} , K , $Y_{x/s}$ et m_s ont été évalués expérimentalement. Plus particulièrement, Glacken et al. (1988) ont évalué l'effet de diverses variables sur la croissance et la production d'anticorps monoclonaux au moyen d'un plan factoriel. Ils ont effectué des cultures stationnaires inoculées à faible densité et ont analysé les taux spécifiques initiaux obtenus selon les concentrations de substrat et de toxines ajoutées au milieu. Bree et Dhurjati (1988) n'ont pas explicité leur méthode d'évaluation de paramètres.

Tableau 3 Modèles et expressions cinétiques pour la culture en cuvée

Bree, Dhurjati (1988)

Modèle dynamique

$$\frac{dX_v}{dt} = (\mu - k_d) X_v$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu X_v$$

$$\frac{dGlc}{dt} = - q_{Glc} X_v$$

$$\frac{dGln}{dt} = - q_{Gln} X_v - \frac{q_{Mab} X_v}{Y_{Mab/Gln}} - \frac{q_{Amm} X_v}{Y_{Amm/Gln}}$$

$$\frac{dLac}{dt} = q_{Lac} X_v$$

$$\frac{dAmm}{dt} = q_{Amm} X_v$$

$$\frac{dAMC}{dt} = q_{AMC} X_v$$

Expressions cinétiques

$$\mu = \mu_{max} \frac{Gln}{K_{Gln} + Gln} \frac{K_{Lac}}{K_{Lac} + Lac} \frac{K_{Amm}}{K_{Amm} + Amm}$$

$$k_d = k_{d,max} \frac{Gln}{K_{d,Gln} + Gln} \frac{K_{d,Lac}}{K_{d,Lac} + Lac} \frac{K_{d,Amm}}{K_{d,Amm} + Amm}$$

$$q_{Glc} = \frac{\mu}{Y_{X/Glc}} + m_{Glc}$$

$$q_{Gln} = \frac{\mu}{Y_{X/Gln}}$$

$$q_{Lac} = \frac{q_{Glc}}{Y_{Glc/Lac}}$$

$$q_{Amm} = \frac{q_{Gln}}{Y_{Gln/Amm}}$$

$$q_{AMC} = k_{AMC} \frac{K_{Gln,AMC}}{K_{Gln,AMC} + Gln} \frac{X}{K_{X/AMC} + X}$$

Tableau 3 Modèles et expressions cinétiques pour la culture en cuvée

Dalili, Ollis (1988)

Modèle dynamique

$$\frac{dX_v}{dt} \sim \mu X_v$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu X_v$$

Expressions cinétiques

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[\text{Serum}]}{K_S + [\text{Serum}]}$$

$$\frac{dAmc}{dt} = m X_v$$

Tableau 3 Modèles et expressions cinétiques pour la culture en cuvée

Miller et al (1988)

Modèle dynamique

Expressions cinétiques

$$\frac{dx_v}{dt} = (\mu - k_d - D) x_v$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{\text{Glc}}{K_{\text{Glc}} + \text{Glc}} \frac{\text{Gln}}{K_{\text{Gln}} + \text{Gln}} \frac{K_{\text{Lac}}}{K_{\text{Lac}} + \text{Lac}} \frac{K_{\text{Amm}}}{K_{\text{Amm}} + \text{Amm}}$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu x_v - D x$$

$$\frac{d\text{Glc}}{dt} = -q_{\text{Glc}} x_v + D(\text{Glc}_f - \text{Glc})$$

$$q_{\text{Glc}} = \frac{\mu}{Y_{x/\text{Glc}}} + m_{\text{Glc}} - \frac{q_{\text{Lac}}}{Y_{\text{Lac},\text{Glc}}}$$

$$\frac{d\text{Gln}}{dt} = -q_{\text{Gln}} x_v + D(\text{Gln}_f - \text{Gln})$$

$$q_{\text{Gln}} = \frac{\mu}{Y_{x/\text{Gln}}} + m_{\text{Gln}}$$

$$\frac{dO_2}{dt} = -q_{O_2} x_v + K_1 a (O_2^* - O_2)$$

$$q_{O_2} = q_{\text{Gln}} Y_{O_2/\text{Gln}} + q_{\text{Glc}} Y_{O_2/\text{Glc}} + m_{O_2}$$

$$\frac{d\text{AMC}}{dt} = q_{\text{AMC}} x_v + D \text{AMC}$$

$$q_{\text{AMC}} = \alpha \mu + \beta$$

Tableau 3

Modèles et expressions cinétiques pour la culture en cuvée

Glacken (1987)

Modèle dynamique

Expressions cinétiques

$$X_v = \alpha X \quad \alpha = 46,2 \quad -46 + 1,12 \exp(-0,019/) \quad \mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S X^{-\beta} + S} \frac{Gln}{K_{Gln} + Gln} \frac{K_{Lac}}{K_{Lac} + Lac^2} \frac{K_{Amm}}{K_{Amm} + Amm^2}$$

$$\frac{dX}{dt} \sim \mu X$$

$$\frac{dGln}{dt} = - q_{Gln} X_v - k Gln$$

$$q_{Gln} = \frac{1}{2} \left| \frac{\mu}{Y_{X/Gln}} + m_{Gln} - q_{Amm} \right|$$

$$\frac{dLac}{dt} = q_{Lac} X_v$$

$$q_{Lac} = Y_{Lac/Glc} q_{Glc} + Y_{Lac/Gln} q_{Gln}$$

$$\frac{dAmm}{dt} = q_{Amm} X_v + k Gln$$

$$\frac{dAmc}{dt} = q_{Amc} X_v = q_{Amc} \alpha X$$

$$q_{Amc} = \frac{A + B Lac}{C + Lac} \quad \text{et } q_{Amc} = \text{constante}$$

Chapitre III MATÉRIEL ET MÉTHODES

III.1 CULTURE DE CELLULES

III.1.1 Lignées cellulaires

Les deux lignées utilisées sont des hybridomes souris-souris produisant un anticorps monoclonal. Les études comparatives de milieux et le sevrage des cellules effectués au cours des premiers mois du projet ont été menées sur des hybridomes identifiés CBM-P2-A. Ces hybridomes ont montré une faible capacité de production d'anticorps. Ainsi, pour la deuxième partie du projet, une autre lignée cellulaire provenant de la même lignée parentale que la première a été utilisée. Cette lignée, identifiée CBM-P2-B, a montré une capacité de croissance et de production supérieure à P2-A.

III.1.2 Entretien des lignées cellulaires

Les cellules sont cultivées selon des techniques standard reconnues (Freshney, 1986). Les lignées cellulaires sont maintenues en culture dans des flacons pour culture de tissus de 25 cm² de surface (Falcon 3013, Becton Dickinson & Co., NJ) dans un incubateur à 37°C.

L'atmosphère est saturée en eau et contient 7% de CO₂. Les concentrations cellulaires sont maintenues entre 1 et 14 x 10⁸ cellules viables/L par passages successifs dans du milieu de culture frais. Ceci exige habituellement un entretien de routine tous les deux à trois jours.

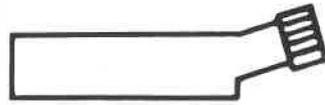
III.1.3 Préparation des inocula

Généralement, les inocula des expériences en flacons agités ou en bioréacteurs étaient préparés de façon à obtenir des cellules en phase exponentielle de croissance et à une densité de 6 à 8 x 10⁸ cellules viables/L. Le volume des inocula est augmenté de 10 mL à 1 L suite à des passages successifs dans des flacons de 25, 75, 250 cm² puis dans des bouteilles roulantes de 250 cm² (Falcon 3027, Becton dickinson & Co., NJ) ou dans les flacons agités de 100 à 500 mL de volume utile (Belco, Vineland, NJ) (figure 8).

III.1.4 Préservation à moyen terme des lignées

Pour se prémunir contre d'éventuels problèmes de contamination une réserve de cellules congelées est conservée à -80°C ainsi que dans l'azote liquide. Le protocole de congélation utilisé comprend les étapes suivantes:

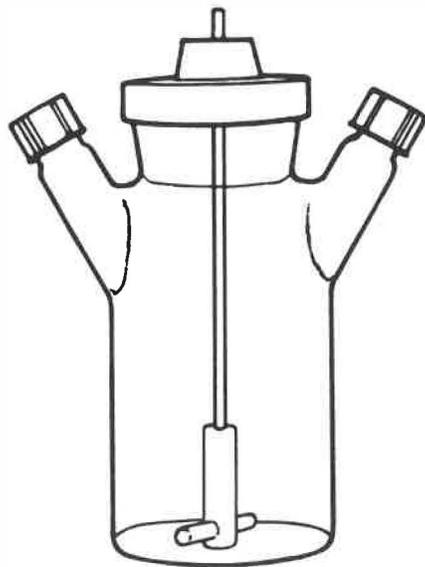
Figure 8 Systèmes de culture de cellules animales (A) flacon en T, (B) bouteille roulante, (C) flacon agité



(A)



(B)



(C)

- Centrifugation à 200 g pour 10 minutes de cellules en phase de croissance, à une densité de 6 à 7 x 10⁸ cellules viables/L;
- Après avoir disposé du surnageant, re-suspension des cellules dans une solution de 10% DMSO (Sigma Chemical Co., St Louis MO, n^o cat.: D2650) dans du sérum de foetus bovin (FBS) (Bockneck Labs., Canada, n^o lot: SF6516) à une concentration de 5 à 6 x 10⁹ cellules viables/L;
- Congélation graduelle d'aliquots de 1 à 5 mL jusqu'à -80°C suivi d'un transfert de certains aliquots dans l'azote liquide.

La décongélation des cellules est effectuée selon les étapes suivantes:

- Décongélation rapide de l'aliquot dans un bain thermostaté à 37°C;
- Transfert dans un tube à centrifugation de 15 mL;
- Addition de 15 mL du milieu de culture adéquat;
- Centrifugation de la suspension de cellules à 200 g pendant 10 minutes;
- Après avoir disposé du surnageant, re-suspension du culot contenant les cellules dans 10 mL de milieu de culture;
- Transfert dans un flacon de culture.

III.2 MATÉRIEL

Tous les milieux de base en poudre utilisés proviennent de Sigma Chemical Co., St Louis, MO. Le milieu en poudre est dissous dans une quantité adéquate d'eau fraîchement déionisée (résistivité ~ 11). L'ajout de bicarbonate de soude (Sigma Chemical Co., n° cat.: S5761) assure la stabilité de l'équilibre acide-base. La concentration de glucose dans les milieux est ajusté à 4,5 g/L (Sigma Chemical Co., n° cat.: G6138). Les concentrations finales de glucose, glutamine et de bicarbonate de soude sont les suivantes:

	glucose		glutamine		NaHCO ₃
	g/L	mM	g/L	mM	g/L
DMEM (D2902)	4,5	25	0,584	3,58	3,7
REMI 1640 (R6503)	4,5	25	0,300	1,84	2,0

Le pH des milieux est ajusté à 7,0 par addition de HCl 5N. Les milieux sont stérilisés par filtration (0,22 μ m Millipak-40 Filter, Millipore Corp., Bedford, MA, n° cat.: MPGL04SH2). La stérilité d'échantillons pris au début et à la fin de la filtration est testée sur des gels d'agar (Frappier Diagnostique, Laval, QC, n° cat.: 1572). Les bouteilles contenant le milieu stérile (500 mL) sont entreposées dans le noir à 4°C.

0,03 mg/mL de sulfate de gentamicine (Sigma Chemical Co., n° cat.: g3632) a été ajouté comme antibiotique dans les cultures visant le sevrage des cellules du sérum. L'expérience accrue des expérimentateurs et l'application de protocoles stricts de manipulation des cellules ont permis d'éliminer cette précaution excluant ainsi de possibles effets négatifs sur la croissance.

Le sérum de foetus bovin (FBS) est conservé à -80°C . Avant son utilisation, les enzymes qu'il contient sont désactivées par chauffage du sérum à 56°C pendant 30 minutes. Suite à l'inactivation, le sérum est conservé dans le noir à 4°C . Un volume approprié de sérum est ajouté au milieu de culture lors de la première utilisation d'une bouteille de milieu. Aucun des milieux supplémentés en sérum n'est conservé plus de deux semaines.

III.3 PROTOCOLES ANALYTIQUES

III.3.1 Compte cellulaire

Les cellules viables et totales ont été comptées par inspection visuelle à l'aide d'un microscope à inversion

de phase. Les échantillons ont été préalablement colorés afin de distinguer les cellules viables, les cellules mortes et les débris. A cet effet, l'efficacité de l'érythrosine B et du Trypan bleu a été investiguée. Le Trypan bleu (0,4% Sigma Chemical Co., n° cat.: T9520) était dilué 1:10 dans une solution saline tamponnée (PBS) (Sigma Chemical Co., n° cat.: P8033). 100 mg d'érythrosine B (Sigma Chemical Co., n° cat.: E7505) étaient dilués dans 100 mL de PBS. Le pH de la solution était ajusté à 7,2. Une dilution 1:1 de l'échantillon avec l'un ou l'autre des colorants était introduit dans un hématimètre. Après comparaison des deux colorants, l'érythrosine B s'est révélée permettre de distinguer plus aisément les cellules des débris. De plus les effets tératogènes et carcinogènes de l'érythrosine B sont reconnus être moindres que ceux du Trypan bleu. Pour ces deux raisons, l'utilisation de l'érythrosine B a été préférée.

III.3.2 Quantification de l'anticorps monoclonal

Un protocole standard de quantification d'anticorps - Enzyme Link Immuno Sorbant Assay: ELISA - a été utilisé. Des plaques à 96 puits, en polystyrène (Linbro Titertek, Flow Laboratories, n° cat.: 76-381-04)

sont d'abord enduites d'une solution de 0,5 g/mL d'antigène (ChemBioMed Ltd.) dans du PBS + 10^{-4} M Thimerosal (Sigma Chemical Co., n° cat.: T5125) à raison de 100 μ L par puits. Une fois emballées de façon à réduire l'évaporation de la solution et le séchage des parois, ces plaques sont incubées à la température ambiante pour une douzaine d'heures puis entreposées à 4°C.

Au moment de l'analyse, la courbe standard est obtenue de la dilution d'un standard purifié de l'anticorps d'intérêt (3 mg/mL; ChemBioMed Ltd., lot AY3-178) dans une plage de concentration de 25 à 400 mg/L. Trois différentes dilutions des échantillons sont aussi préparées. Le diluant utilisé est composé de PBS + 1% (m/v) BSA (Bovine Sérum Albumin; Sigma Chemical Co., n° cat.: A7030) + 1% (v/v) Tween 20 (Biorad, Mississauga, ON, n° cat.: 170-6531) + 10^{-4} M Thimerosal.

La solution d'antigène est aspirée des plaques. Celles-ci sont rincées trois fois avec 200 μ L/puits d'une solution de lavage composée de PBS + 0,1% (v/v) Tween 20 + 10^{-4} M Thimerosal. 100 μ L/puits de chacun des échantillons ou standards sont disposés sur les plaques en groupe de six puits adjacents. Les plaques sont couvertes et

incubées durant une heure. Elles sont par la suite vidées rapidement et rincées trois fois avec la solution de lavage.

Un anticorps de chèvre conjugué à une peroxydase du raifort et dirigé contre les anticorps de souris (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, n^o cat.: 172-1011) est dilué 1:8000. 100 μ L de cette solution est déversée dans chaque puits. Les plaques sont couvertes, incubées pour une heure à 37 °C, vidées et rincées trois fois avec la solution de lavage.

Une solution de 3 mg/mL d'o-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma Chemical Co., n^o cat: P1526) et de 0,33 μ L/mL H₂O₂ dans une solution tampon d'acide citrique (pH 5,5) est préparée immédiatement avant son usage. La solution est répartie dans les puits à raison de 100 μ L par puits. Les plaques sont alors incubées dans le noir à température ambiante pour sept (7) à douze (12) minutes. Subséquemment, la réaction sera arrêtée par addition de 100 μ L/puits de HCl 1M. L'absorbance des plaques est ensuite lue à 490-492 nm. La concentration d'anticorps est calculée par comparaison avec les lectures obtenues pour la courbe standard.

III.3.3 Analyses sur HPLC

Les concentrations de glucose, glutamine et d'acide lactique ont été déterminées par chromatographie liquide (HPLC). Une colonne Aminex HPX-87C (Bio-Rad Laboratories, n° cat: 125-0095) couplée à une précolonne Carbo-C (Bio-Rad Laboratories, n° cat: 125-0128) a été utilisée. La colonne était maintenue à 80 °C et le débit de la phase mobile fixé à 1,0 mL/min. De l'eau et une solution de 0,005M CaSO₄ (Canlab, Travenol Inc., n° cat:4300-500) sont les deux phases mobiles utilisées. Dans les deux cas, l'eau utilisée étaient distillée, déionisée et filtrée à 0.2 µm. La présence des composés a été détectée au moyen d'un détecteur à indice de réfraction (Waters 410 ou Waters R401 Différential Refractometer) ou d'un détecteur spectrophotométrique (Waters Lambda Max, modèle 481). La quantification a été effectuée à l'aide de l'intégrateur SP4270 de Spectra Physics ou du système de contrôle et d'acquisition de données de Waters (Waters 840 Data and Chromatography Control System).

Le temps de rétention du glucose était de 6,5 minutes avec l'eau agissant comme phase mobile. L'acide lactique et la glutamine avaient des temps de rétention de

13,5 et 19,5 minutes respectivement avec la solution de sulfate de calcium comme phase mobile. Les deux colonnes ont été régénérées périodiquement avec une solution 0,1M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Fisher Scientific, n° cat:C190-500).

III.3.4 Quantification de l'ammoniaque

La concentration de $\text{NH}_3\text{-NH}_4^+$ dans le milieu a été déterminée par la réaction de Berthelot. Cette technique est basée sur la formation d'une coloration bleue proportionnelle à la concentration d'ion ammonium présent.

Des solutions standard de NH_4^+ couvrant une plage de 0,5 à 15 mg/L ont été préparées avec du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. 0,1 mL de cette solution standard ou 0,1 mL d'un échantillon de culture préalablement centrifugé et filtré est mélangé à 2 mL d'une solution de 10 g/l de phénol et 50 mg/L nitropusside de soude. Par la suite 2 mL d'une solution contenant 20 mL d'une solution de NaOCl (6,5% Cl_2 disponible), 90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 6 g NaOH dans 1000 mL d'eau distillée sont ajoutés au premier mélange avant une incubation de 30 minutes à 37°C. Après refroidissement à la température de la pièce, l'absorbance des échantillons a été mesurée à une longueur d'onde de 620 nm.

III.4 ÉVALUATION DES MILIEUX DE BASE

III.4.1 Adaptation des cellules aux milieux de culture de base et aux concentrations réduites de sérum

Quelques méthodes différentes permettent d'adapter des cellules à une concentration réduite de sérum et, ultimement, à des milieux sans sérum. Certains chercheurs préconisent l'adaptation graduelle des cellules dans un système opéré en continu (Brown, 1987), alors que d'autres préfèrent réduire la concentration de sérum au cours de passage de cultures stationnaires en flacons (Baker et al., 1985). Lorsque le sevrage complet du sérum est visé, certains préconisent l'ajout de suppléments tels, principalement, l'insuline et la transférine en proportion inverse de la quantité de sérum supplémenté au cours du sevrage (Brown, 1987).

Le sevrage des cellules a été effectué en culture stationnaire dans des flacons en T. L'observation de taux de croissance et de densité cellulaire comparables ainsi que d'une viabilité excédent 75% ont été les critères utilisés pour procéder à un changement de concentration de sérum. Les concentrations de sérum ont été diminuées de 10% à 5, 3, 2, 1 et 0,5% successivement

selon l'adaptabilité des cellules.

Les cellules de la lignée CBM-P2-A ont été reçues congelées. Elles avaient, originalement, été cultivées dans du DMEM + 10% (v/v) de sérum de foetus bovin (FBS). Les cultures ont été transférées dans le DMEM + 5% FBS et cultivées jusqu'à ce que le taux de croissance et la densité cellulaire se comparent à ceux obtenus dans le DMEM + 10% FBS. Cela a nécessité environ cinq passages. Les cellules ont par la suite été passées à 3 et 2% de sérum. Les cellules de la lignée CBM-P2-B ont été reçues en culture. Elles avaient déjà subi le processus de sevrage jusqu'à 1% FBS. Au cours d'une période de recouvrement, il a été observé que le taux de croissance et la densité cellulaire maximale augmentaient. L'utilisation de plus en plus répandue de l'IMDM a stimulé la réalisation de quelques expériences comparatives entre le DMEM et l'IMDM. Aussi les cellules CBM-P2-B ont-elles été adaptées au RPMI et à l'IMDM. Les cellules ont été passées avec succès à 0,5% de sérum sans ajout d'autre supplément dans le DMEM et dans l'IMDM.

III.4.2 Croissance et production

Pour déterminer la capacité des deux milieux

étudiés à supporter la croissance en présence de faibles quantités de sérum mais aussi en présence du stress mécanique infligé par l'action de mélange nécessaire à la culture en bioréacteur, des cultures en cuvée ont été effectuées dans des flacons agités d'un volume utile de 100 mL. Ces manipulations ont été effectuées lorsque les cellules sevrées ont montré un taux de croissance comparable à celles cultivées avec 10% FBS. Les flacons ont été inoculés en duplicata à une densité de 2 à 3 x 10⁸ cellules viables/L dans le milieu approprié. Les flacons étaient incubés à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 7% de CO₂. La vitesse d'agitation était de 100 rpm. Le compte cellulaire et la viabilité sont été déterminés au moins deux fois par jour de la façon décrite à la section II.3.1. Des échantillons de 1 mL ont été pris en fin de culture afin de permettre la mesure des anticorps produits. Ces échantillons étaient centrifugés et 10 µL d'une solution 10⁻⁴M de Thimerosal étaient ajoutés au surnageant avant l'entreposage à 4°C. Les inocula provenaient de culture stationnaire. Le fait que les milieux et les inocula diffèrent et que les inocula n'aient pas été centrifugés de façon à se départir des toxines (acide lactique et ammoniac) avec le surnageant commandent la prudence quant à l'interprétation des résultats.

III.5 CULTURE EN BIORÉACTEUR

Le développement d'un procédé de culture à grande échelle est l'un des objectifs principaux du projet de recherche. Dans ce contexte, il a semblé important, dans un premier temps, de vérifier si les taux de croissance et la production d'anticorps observés dans des flacons agités sont comparables à ceux que l'on peut observer dans des cultures en cuvée d'un volume plus important dans un bioréacteur de type réservoir agité.

Ces études en bioréacteur ont été faites dans un réacteur Celligen_{md} (New-Brunswick Scientific, NJ) de 1,5 L ayant 1,3 L de volume utile (figure 9). Ce réacteur est muni d'un agitateur magnétique conçu par New-Brunswick Scientific: le "Cell Lift impeller" dont une représentation schématique est reproduite à la figure 10. La géométrie de l'agitateur et le type d'écoulement induit minimisent le cisaillement subi par les cellules. La circulation du fluide est obtenue par la différence de pression entre la masse de la cuvée et l'intérieur de l'arbre de rotation: la faible pression dans la section interne de l'arbre entraînant le fluide vers le haut. Les gaz sont introduits dans le réacteur par un tube perforé situé entre l'arbre et la cage d'aération. L'aération est

Figure 9 Bioréacteur utilisé

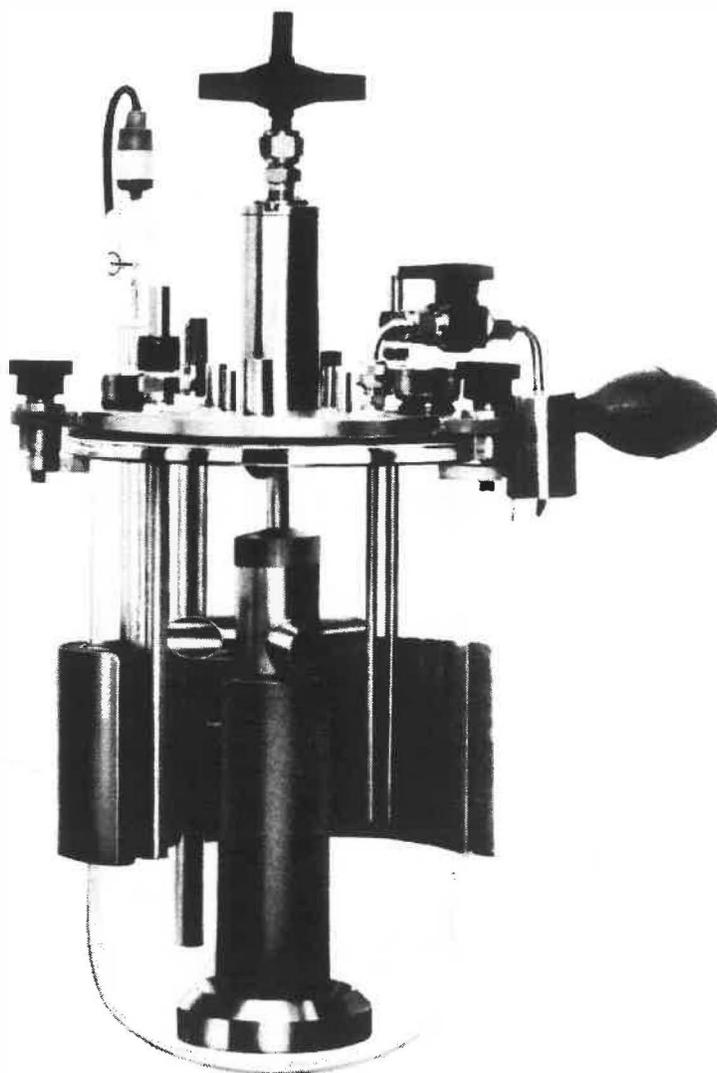
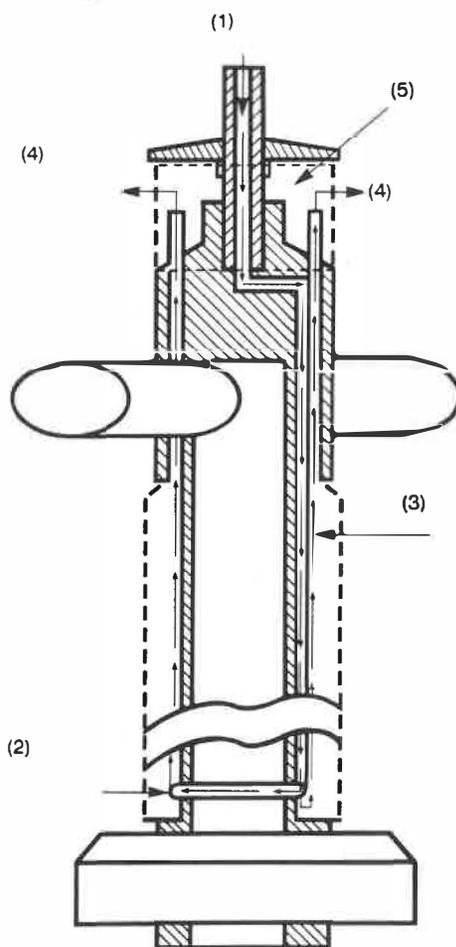


Figure 10 Schéma du système d'agitation et d'aération du bioréacteur Celligen (New-Brunswick Scientific)



- (1) Entrée des gaz d'aération
- (2) Passage du milieu dans la chambre d'aération
- (3) Percolation des bulles de gaz à travers le milieu
- (4) Sortie du mélange gaz fluide à travers un treillis de 0,74 m
- (5) Chambre anti-mousse

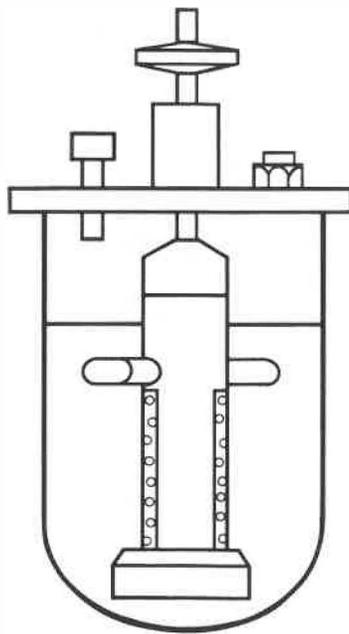
donc obtenue par barbotage à travers le milieu de culture présent dans la cage d'aération alors que les cellules sont retenues à l'extérieur par un écran perforé de 0,74 μm . Les bulles gazeuses s'élèvent dans la cage d'aération pour ensuite s'épuiser dans la tête du bioréacteur à travers une chambre anti-mousse. Ainsi le contenu du réacteur devrait être bien agité sans cisaillement excessif et les gaz introduits dans le réacteur devraient permettre un contrôle efficace de l'oxygénation et du pH sans formation de mousse. La température, la vitesse de rotation du dispositif de mélange, la concentration en oxygène dissous (DO) et le pH sont contrôlés par un microprocesseur. Le pH et l'oxygène dissous sont ajustés par le contrôle de l'admission des gaz à l'entrée: air, O_2 , CO_2 et N_2 . Un système d'échantillonnage permet d'effectuer le suivi de la culture.

Une étude sur le transfert d'oxygène (André et al., 1989) a cependant montré que la perte de charge provoquée par la chambre anti-mousse impose une augmentation de la pression dans la cage d'aération. La pression élevée empêche la pénétration du fluide dans la cage réduisant ainsi la surface de contact gaz-liquide et, conséquemment, le transfert de masse espéré. A un débit gazeux de 1 vvm, le coefficient de transfert

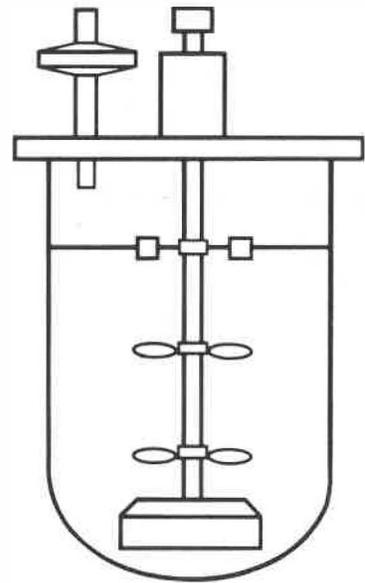
d'oxygène ($K_L a$) est comparable à celui mesuré en aération de surface avec le même type d'agitation.

Plusieurs expériences ont été effectuées dans les bioréacteurs. Celles rapportées ici n'englobent que les cultures en cuvée et seront analysées dans la perspective du choix d'un milieu de culture et de la modélisation de la cinétique de croissance et de production. Des cultures dans le RPMI 1640 et le DMEM ont été effectuées à diverses concentrations de sérum pour la lignée CBM-P2-A. La lignée CBM-P2-B a été cultivée dans le bioréacteur dans les milieux RPMI 1640, DMEM et IMDM avec 1% de sérum. A l'exception d'une expérience comparative, le pH et l'oxygène dissous n'ont pas été contrôlés. Les cultures étaient aérées avec un mélange 7% CO_2 :93% air (Air Liquide, Montréal, QC). Un débitmètre massique contrôlait le débit gazeux. La concentration de cellules, d'anticorps monoclonaux, de glucose, de glutamine, d'acide lactique et d'ammoniaque ont été mesurées pour la plupart des échantillons recueillis. Afin d'augmenter le transfert d'oxygène dans la culture, le bioréacteur a aussi été opéré avec un agitateur à hélice double et une turbine Rushton à six pales à l'interface gaz-liquide (figure 11).

Figure 11 Deux conformations du système de mélange utilisé: (A) "Cell Lift Impeller"; (B) agitateur à hélices double et une turbine Rushton à six pales



(A)



(B)

Les inocula ont été préparés dans des flacons agités ou dans des bouteilles roulantes. Leur densité variait entre 3 et 5×10^5 cellules viables/mL suite à une dilution dans du milieu frais dans une proportion de 3:10 ou à une centrifugation à 200g, 10 minutes, suivie d'une re-suspension dans du milieu frais. Le tableau 4 résume les conditions expérimentales en termes d'agitation, de contrôle de pH et de DO, de milieu de culture, d'utilisation d'antibiotiques et des caractéristiques de l'inoculum.

III.6 CALCULS

III.6.1 Comparaison des milieux de culture

La comparaison des milieux de culture a été faite sur la base de la concentration maximale de cellules viables atteinte, $X_{v,max}$, de la concentration d'anticorps mesurée en fin de culture, A_{mc} , et d'un taux de croissance spécifique apparent défini comme suit:

$$\mu_{app,v} = \frac{1}{X_v} \frac{dX_v}{dt} = \frac{d(\ln X_v)}{dt} \quad (31)$$

Tableau 4 Conditions expérimentales des cultures en bioréacteur

Lignée	Milieu de base	Serum % v/v	Date	Antibiotiques	Inoculum ₁	Consignes DO pH	Agitateur	Débit gazeux
CBMP2A	DMEM	10	30/09/87	oui	f 3:10	-- --	Celligen, 30 RPM	1 vvm
CBMP2A	DMEM	10	14/10/87	oui	f 3:10	50 7.2	Celligen, 40 RPM	0,77vvm
CBMP2A	DMEM	10	14/10/87	oui	f 3:10	-- --	Celligen, 40 RPM	0,77vvm
CBMP2A	DMEM	3	21/01/88	non	f 3:10	-- --	Celligen, 40 RPM	0,77vvm
CBMP2A	RFMI	10	06/01/88	non	f 3:10	-- --	Celligen, 40 RPM	0,77vvm
CBMP2A	RFMI	5	22/05/88	non	b G	-- --	Celligen, 40 RPM	0,77vvm
CBMP2A	RFMI	3	11/06/88	non	b G	-- --	Celligen, 40 RPM	0,77vvm
CBMP2B	DMEM	1(A)	08/05/88	non	b G	-- --	Celligen, 55 RPM	0,77vvm
CBMP2B	DMEM	1(B)	15/05/88	non	b G	-- --	Celligen, 55 RPM	0,77vvm
CBMP2B	DMEM	1(C)	06/06/88	non	b G	-- --	Turbine et hélices	0.23vvm
CBMP2B	RFMI	1	21/05/88	non	b G	-- --	Celligen, 40 RPM	0,77vvm
CBMP2B	IMDM	1	16/06/88	non	b G	-- --	Turbine et hélices	0.08vvm

III.6.2 Modélisation

L'effort de modélisation s'appuie sur l'évaluation expérimentale des taux spécifiques de croissance et de mortalité et des taux volumétriques d'assimilation et de production.

Les définitions des taux spécifiques de croissance, μ , et de mortalité, k_d , sont basées sur les relations suivantes:

$$X = X_v + X_d \quad (32)$$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{dX_v}{dt} + \frac{dX_d}{dt} \quad (33)$$

En supposant que les cellules viables ne sont pas celles qui sont sujettes au bris des membranes cellulaires et à la dislocation du tissu cellulaire qui s'en suit, la variation du nombre de cellules viables est causée par la division cellulaire (représentée par μ) ainsi que par la mortalité (représentée par k_d). La variation du nombre de cellules mortes est alors causée par la mortalité des cellules viables (k_d) et le bris des cellules mortes (représenté par k_b). Ainsi les taux volumétriques d'apparition des cellules viables et mortes s'expriment de la façon suivante:

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu X_v - k_d X_v = (\mu - k_d) X_v \quad (34)$$

$$\frac{dX_d}{dt} = k_d X_v - k_b X_d \quad (35)$$

et de l'équation (33) on obtient

$$\frac{dX}{dt} = \mu X_v - k_d X_v + k_d X_v - k_b X_d$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X_v - k_b X_d \quad (36)$$

Dans la phase de déclin, l'hypothèse la plus largement posée est celle qui suppose une croissance nulle. Ainsi on a :

$$\text{pour } (dX/dt) < 0 \quad \mu = 0 \quad (37)$$

$$\frac{dX_v}{dt} = -k_d X_v \quad (38)$$

qui impose une décroissance exponentielle de la population cellulaire et que $(dX/dt) = -k_b X_d$ où k_b représente le bris des cellules mortes.

La détermination expérimentale des taux spécifiques implique l'évaluation de taux volumétriques qui correspondent à l'évolution de la population dans le temps. En pratique, le problème posé est celui de

l'évaluation de la dérivée des courbes de croissance , de production et d'assimilation. Cette évaluation nécessite la modélisation des courbes basées sur les mesures expérimentales disponibles. La conformation des systèmes d'aération et de mélange du bioréacteur utilisé permet de retirer un volume limité pour la prise d'échantillonnage. Ceci compromet la prise d'échantillonnage séquentielle et limite l'utilisation de certains outils mathématiques disponibles. L'échantillonnage a été concentré dans les phases de croissance exponentielle et stationnaire.

Chapitre IV RÉSULTATS ET ANALYSE

IV.1 COMPTES CELLULAIRES

Des échantillons d'une culture en flacons agités contenant 6.8×10^5 cellules/mL et ayant une viabilité de 90% ont été utilisés afin de déterminer la source principale des écarts observés dans les comptes cellulaires et de quantifier ces derniers. Les écarts types des comptes de cellules viables et totales pour un même échantillon déjà introduit dans l'hématimètre étaient de 1 et 2% respectivement. Par contre, lorsque trois échantillons différents de la même culture étaient traités et comptés par chacun des expérimentateurs, les écarts types évalués sur six comptes variaient de 5 à 10% pour le nombre de cellules viables et totales tel que rapporté au tableau 5. Les écarts types des résultats obtenus par tous les membres du groupe étaient de 11,4% pour les cellules viables et de 13,2% pour les cellules totales. De ces résultats, on conclut que la principale source d'erreur sur la densité cellulaire est la technique d'échantillonnage plutôt que le compte lui-même. La durée des cultures et la fréquence d'échantillonnage nécessitant souvent que plus d'une personne soit impliquée dans la prise de données, les protocoles d'échantillonnage

Tableau 5 Effet de l'identité de l'expérimentateur et de l'échantillonnage sur l'acuité des comptes de cellules viables et totales provenant d'un flacon agité

Expérimentateur	Cellules viables x 10 ⁵ /mL	Cellules totales x 10 ⁵ /mL
1	7,7 ± 0,5 (6,9%)*	8,8 ± 0,6 (6,7%)
2	6,4 ± 0,3 (4,9%)	7,0 ± 0,3 (4,7%)
3	6,4 ± 0,7 (10%)	7,1 ± 0,7 (9,7%)
tous	6,83 ± 0,7 (11%)	7,7 ± 1,0 (13%)

* Trois échantillons pour chacun des individus, concentration cellulaire évaluée dans 2 X 10⁻⁴ mL.

utilisés ont dû être standardisés à travers l'équipe. La non homogénéité des cultures en flacons agités exige cependant que les résultats obtenus soient interprétés avec réserve.

IV.2 ÉVALUATION DES MILIEUX DE BASE (DMEM, RPMI, IMDM)

IV.2.1 Adaptation des cellules à de faibles concentrations de sérum dans le DMEM et le RPMI 1640

La lignée cellulaire CBM-P2-A, originalement maintenue dans le DMEM supplémenté de 10% v/v de sérum a été sevrée dans le RPMI 1640 lors de passages successifs. Les cellules ont démontré une capacité d'adaptation assez rapide au nouvel environnement chimique imposé. De même, le sevrage des cellules à de faibles concentrations de sérum a pu être réalisé rapidement. La quantité de sérum ajoutée au milieu de culture a été réduite successivement de 10 à 5, 3 et 2% v/v tous les trois ou quatre passages. Nonobstant la quantité de sérum utilisée, la viabilité des cellules cultivées dans le RPMI est demeurée difficile à maintenir au dessus de 70% sans un apport journalier de milieu frais.

IV.2.2 Performance comparée du DMEM et du RPMI

Les taux de croissance spécifiques moyens (μ_v) observés lors d'études cinétiques effectuées dans les flacons agités immédiatement après le sevrage sont

comparables pour les faibles concentrations de sérum (tableau 6). Les taux de croissance pour les cultures en RPMI ne varient pas entre 3 et 10% FBS alors que les taux de croissance évoluent avec la quantité de sérum présente dans le milieu pour les cultures effectuées dans le DMEM. La constance des taux de croissance pour les cultures en RPMI entre 3 et 10% FBS est indicatrice d'une limitation de la croissance inhérente au milieu de culture lui-même. Les taux de croissance ainsi que la densité cellulaire et la concentration d'anticorps maximale, atteintes lors de cultures dans le Celligen_{md} de cellules de la lignée CBM-P2-A sont présentés au tableau 7. Les taux de croissance obtenus dans le bioréacteur sont plus élevés que ceux obtenus dans les flacons agités (tableau 6). Par contre, la concentration finale d'anticorps est comparable. C'est donc dire qu'à prime abord, la production d'anticorps n'est pas uniquement associée à la croissance. La concentration de glucose présente dans les deux milieux ayant été ajustée à 25 mM, la différence fondamentale entre ceux-ci réside dans la faible concentration de glutamine du RPMI, 1,8 mM, par rapport au DMEM, 4,0 mM. La faible croissance pourrait donc résulter d'une limitation en glutamine.

La lignée cellulaire CBM-P2-B sevrée et

Tableau 6 Comparaison des taux de croissance apparents observés dans des cultures de CBM-P2-A en flacons agités dans le DMEM et le RPMI 1640 pour des concentrations de sérum variant de 2 à 10% (v/v)

Concentration de sérum % v/v	$\mu_{app,v} *$	
	DMEM	RPMI
10	0,035**	0,021
5	0,025	0,022
3	0,021	0,020
2	0,009	0,010

$$* \quad \mu_{app,v} = \frac{1}{x_v} \frac{dx_v}{dt} = \frac{\ln x_{v2} - \ln x_{v1}}{t_2 - t_1}$$

** Inocula dilués de 1/3 à 1/4

maintenue dans le DMEM supplémenté de 1% de sérum par ChemBioMed a été passée dans le RPMI et l'IMDM. Une comparaison des concentrations maximales de cellules

Tableau 7 Comparaison de la concentration maximale de cellules viables, des taux de croissance et de la concentration d'anticorps monoclonaux pour les cultures de la lignée CBM-P2-A en bioréacteur

Milieu	DMEM	DMEM	DMEM	RPMI	RPMI	RPMI
Conc. sérum	3%	10%	10% ^c	3%	5%	10%
Agitation	Celligen					
Contrôle pH et DO	sans	sans	avec	sans	sans	sans
μ_v	0,037	0,059	0,051	0,051	0,045	0,044
$A_{mC_{max}}$	26	32	20	11	25	21
X_{max}	14,9	19,0	15,1	6,0	8,8	7,0

viables observées et d'anticorps monoclonaux mesurés lors de culture en flacon agité (tableau 8) porte à conclure que le RPMI ne supporte bien ni la croissance ni la production d'anticorps.

IV.2.3 Performance comparée du DMEM et de l'IMDM

La lignée cellulaire CBM-P2-B maintenue dans le DMEM + 1% FBS a par la suite été transférée dans l'IMDM + 1% FBS. Après deux passages, la concentration de sérum a été diminuée à 0,5%. Parallèlement, la

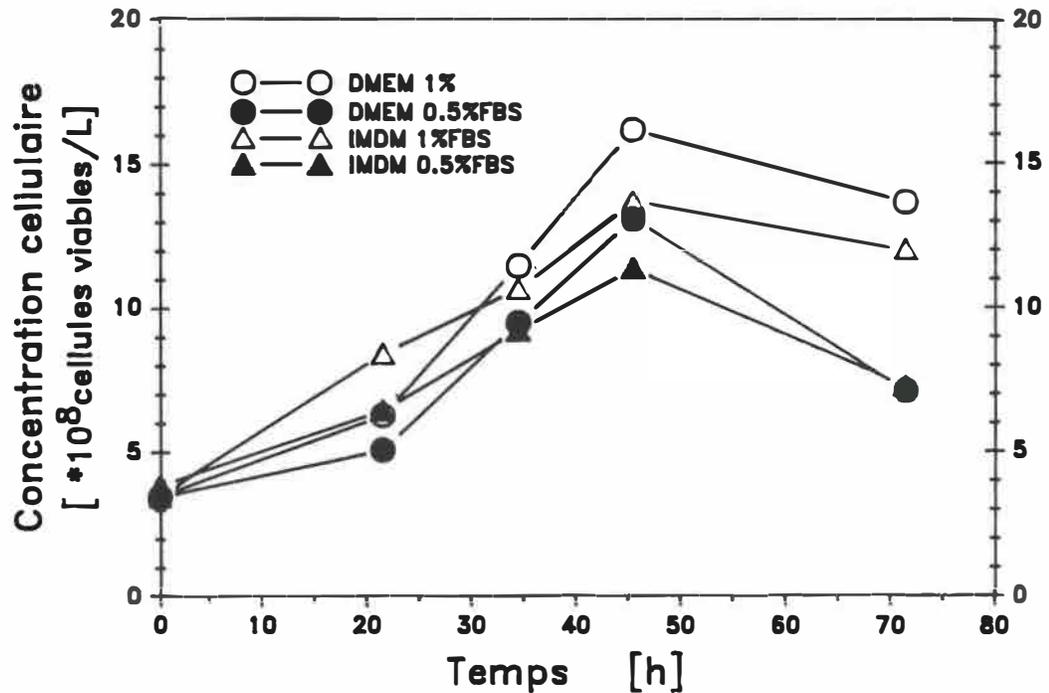
Tableau 8 Comparaison de la concentration maximale de cellules viables et de la concentration finale d'anticorps monoclonaux pour des cultures de CBM-P2-B en flacons agités dans le DMEM et le RPMI 1640 pour des concentrations de sérum de 1 et 5% (v/v)

Concentration de sérum % v/v	DMEM		RPMI	
	$X_{v,max}$ ($\times 10^8$) (cellules/L)	Amc mg/L	$X_{v,max}$ ($\times 10^8$) (cellules/L)	Amc mg/L
5	22,2*	69	10,3	30
1	6,4	64	9,0	23

concentration de sérum des cultures maintenues dans le DMEM a été diminuée à 0,5% lors d'une culture en flacon agité. Ces cellules ont par la suite été maintenues en culture stationnaire.

Les courbes de croissance obtenues lors d'une culture en cuvée en flacon agité sont présentées à la figure 12. Les données rapportées représentent la moyenne de deux échantillons prélevés dans chacun des duplicata.

Figure 12 Comparaison des courbes de croissance et des concentrations d'anticorps monoclonaux produits par la lignée CBM-P2-B dans les milieux de base DMEM et IMDM supplémentés de 0,5 et 1% de sérum



Les paramètres relatant la croissance cellulaire et la production d'anticorps (tableau 9) illustrent le fait que l'utilisation de l'IMDM n'a pas d'effet avantageux sur la croissance ni sur la production. Les taux de croissance spécifiques moyens varient de 0.020 à 0.024 h^{-1} pour l'IMDM et sont de $0,040 \text{ h}^{-1}$ pour le DMEM, étayant ainsi la supériorité du DMEM dans les conditions de l'expérience.

Tableau 9 Comparaison des taux de croissance spécifiques apparents, de la densité cellulaire maximale et de la concentration finale d'anticorps observés dans des cultures de CBM-P2-B en flacons agités dans le DMEM et l'IMDM pour des concentrations de sérum de 0,5% et de 1% v/v

Concentration de sérum [% v/v]	DMEM		IMDM	
	1 %	0,5 %	1 %	0,5 %
$\mu_{app,v}^*$ [h ⁻¹]	0,040	0,040	0,020	0,024
$X_{v,max}$ [10 ⁸ cellules viables/L]	16,2	13,1	13,7	11,3
[Anc] [mg/L]	75	54	62	54

* Inocula centrifugés

La production d'anticorps ne permet pas de départager aussi clairement les deux milieux, surtout à faible concentration de sérum. Le prix associé à l'utilisation de l'IMDM, ou de tout autre milieu tamponné avec de l'HEPES, ne justifie pas son utilisation lorsque le milieu est supplémenté de sérum. Le niveau de sensibilité des cultures aux variations de pH dans des milieux sans sérum demeurant inconnu, les milieux de base tamponnés avec de

l'HEPES ne devraient pas être rejetés à priori lors de la mise au point de ces milieux. D'ailleurs plusieurs milieux sans sérum décrits dans la littérature, utilisent des milieux de base tamponnés à l'HEPES (Brown, 1986; Kovar et Frantizek, 1986; Low et Arbour, 1985).

IV.3 EFFET DE LA CONCENTRATION DE SÉRUM SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE ET LA PRODUCTION D'ANTICORPS

L'influence de la concentration de sérum sur la croissance peut être étudiée sur la base des études comparatives menées avec la lignée CBM-P2-A. Un graphique des taux de croissance spécifiques observés (μ_v) en fonction de la concentration de sérum dans le milieu de culture (figure 13) suggère une association suivant une cinétique de Monod. La même tendance peut être observée à partir des résultats obtenus à ChemBioMed (Lamontagne et al., 1988) avec la lignée CBM-P2-B (figure 14). Dans le DMEM, en considérant $\mu_{\max}/2 = \mu(10\%)/2$ on obtient que la concentration de sérum correspondante au taux de moitié, K_s , est de l'ordre de 2,5% v/v. L'inhibition de la croissance en RPMI causée par une limitation en glutamine ne permet pas d'obtenir un estimé valable de K_s .

Figure 13 Dépendance du taux de croissance de la lignée CBM-P2-A sur la concentration de sérum

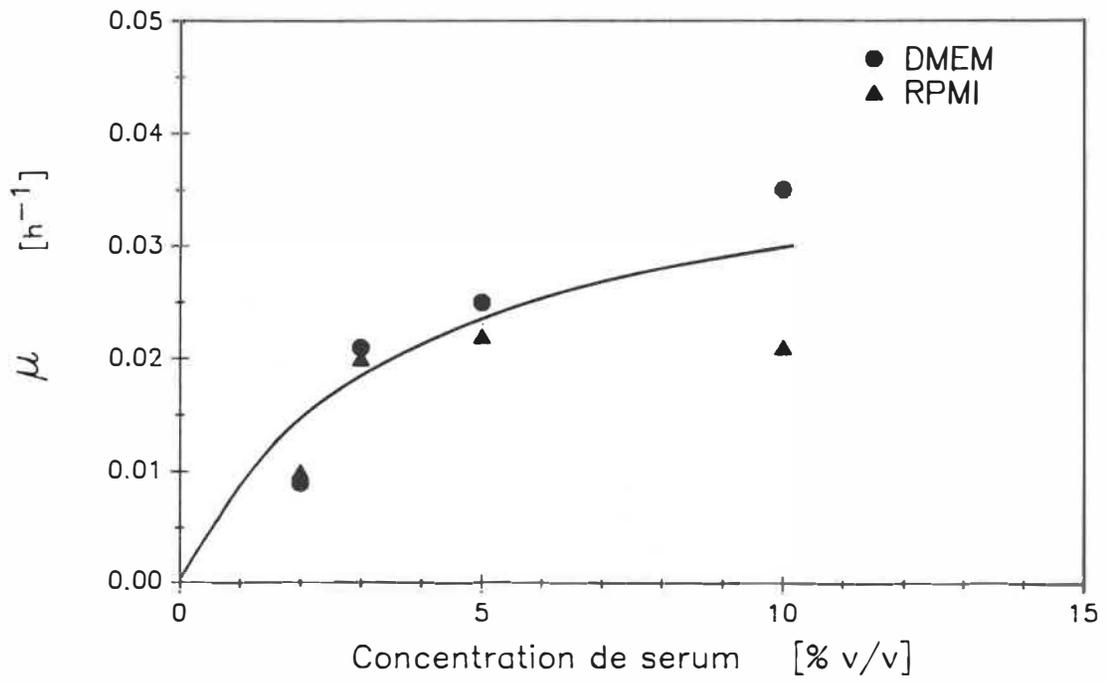
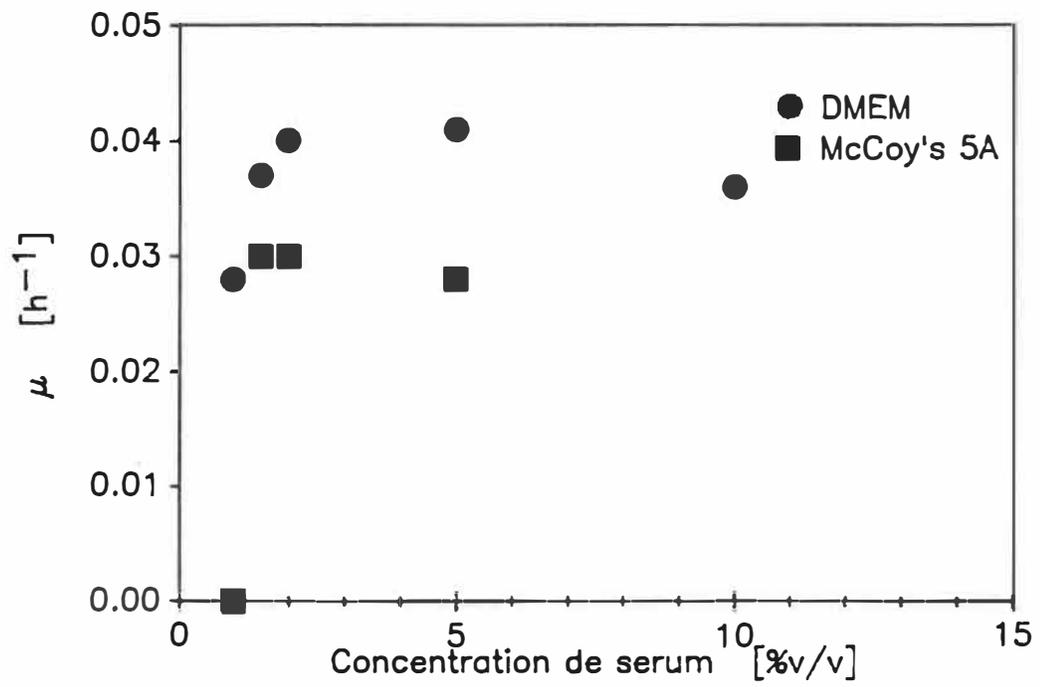


Figure 14 Dépendance du taux de croissance de la lignée CBM-P2-B sur la concentration de sérum d'après les résultats obtenus par ChemBioMed Ltd



IV.4 AMÉLIORATION PROGRESSIVE DE LA CROISSANCE ET DE LA PRODUCTION

La concentration maximale de cellules viables observée dans le DMEM + 1% FBS au cours de la manipulation comparative présentée au tableau 8 semble anormalement basse. Il a été possible d'obtenir de façon répétée des concentrations maximales de l'ordre de 10^9 cellules viables/L au cours de d'autres expériences. Ces résultats, issus d'expériences distinctes, avec des inocula bâtis à partir des cellules maintenues en culture à 1% et à 0,5% FBS sont présentés au tableau 10. L'évolution de X_{\max} et de $\mu_{\text{app},v}$ dans le temps suggère une adaptation progressive des cellules. La sélection de cellules possédant un nombre plus élevé de récepteurs membranaires facilitant le transport des facteurs de croissance au cours des passages successifs peut expliquer cette amélioration de la croissance.

Les résultats présentés au tableau 10 permettent aussi de constater que les cellules prélevées au cours d'une culture soumise à une agitation mécanique ont par la suite montré des taux de croissance ainsi qu'une concentration maximale de cellules viables plus avantageux. Bien que l'observation faite plus haut puisse aussi

Tableau 10 Concentrations maximales de cellules viables et d'anticorps monoclonaux atteintes en flacons agités à 0,5% et 1% FBS dans le DMEM

Date	[Sérum] % v/v	$X_{v,max}$ ($\times 10^8$) (cellules/L)	[Amc] (mg/L)	μ_{app} (h^{-1})
24.01.88	1	9,6	—	—
03.02.88	1	6,15	64	0,022
05.04.88	1	7,1	—	0,010
12.04.88	0,5	6,3	—	0,018
18.04.88	1	7,07	54	—
18.04.88*	0,5	9,4	53	—
18.05.88*	0,5	11,5	65	0,023
02.06.88**	1	16,3	74	0,037
02.06.88**	1	16,0	74	0,039
02.06.88**	0,5	13,4	54	0,034
02.06.88**	0,5	12,7	—	0,030

* inoculés à partir de cellules maintenues en flacons agités dans le DMEM + 1% FBS, centrifugées à 200 g, 10 minutes.

** cellules prélevées à la fin de la phase exponentielle de la culture en flacon agité du 18.05.88 et maintenues dans le DMEM 0,5% et 1% FBS depuis.

expliquer ces résultats, il demeure que le maintien des lignées cellulaires en culture agitée plutôt qu'en culture stationnaire devrait permettre la sélection d'une lignée plus résistante au stress mécanique et ainsi mieux adaptée à la culture en bioréacteur.

IV.5 CULTURE EN BIORÉACTEUR

La culture en bioréacteur de 1,5 L a été choisie comme système modèle duquel divers aspects caractérisant la cinétique de croissance et de production des cellules sont abordés plus bas.

IV.5.1 Comportement des cultures

Des résumés des variables mesurées et de quelques paramètres estimés pour les cultures en bioréacteur de 1,5 L sont présentés aux tableaux 11 et 12 pour les lignées CBM-P2-A et P2-B respectivement. Les courbes de croissance de toutes les cultures effectuées dans le bioréacteur sont présentées à l'annexe A. Les tableaux des résultats des comptes cellulaires et des analyses effectuées ayant permis de tracer ces courbes peuvent être consultés à l'annexe B. Les données expérimentales utilisées pour l'évaluation des taux de croissance

Tableau 11 Paramètres cinétiques des cultures en bioréacteurs des cellules de la lignée CHM-P2-A

Milieu	DMEM	DMEM	DMEM	RFMI	RFMI	RFMI
Conc. sérum	3%	10%	10% ^c	3%	5%	10%
Agitation	Celligen					
Contrôle pH et DO	sans	sans	avec	sans	sans	sans
μ_v	0,037	0,059	0,051	0,026	0,045	0,044
r^2	0,92	0,86	0,84	0,88	0,97	0,99
$A_{mc_{max}}$	26	32	20	11	25	21
X_{max}	14,9	19,0	15,1	6,0	8,8	7,0
X_{max}/X_0	7,8	3,3	2,6	2,3	3,0	3,7
X_0	1,9	5,8	5,8	2,6	2,9	1,9
Glc_{min}	9,8	4,5	5,0	n.d.	18	n.d.
Gln_{min}	—	—	—	—	—	—
Lac_{max}	30	41	39	12	18	14
$A_{mm_{max}}$	4,3	3,7	3,6	n.d.	2,6	2,5
X_v/ Glc	1,2	0,78	0,57	n.d.	1,1	n.d.
X_v/ Gln	3,2	3,6	2,7	2,4	3,3	5,1
Lac/ X_v	1,9	3,1	3,8	2,6	2,5	2,3
A_{mm}/ X_v	0,26	0,21	0,29	n.d.	0,4	0,35

Unités: densité cellulaire: 10^8 cellules viables/L;
 μ : h^{-1} ;
 A_{mc} : mg/L;
 Glc , Gln , Lac , A_{mm} : mM.

Tableau 12 Paramètres cinétiques des cultures en bioréacteurs des cellules de la lignée CBM-P2-B

Milieu Conc. sérum	RPMI 1%	DMEM 1% A	DMEM 1% B	DMEM 1% C	ISCOVE 1%
Agitation	-----Celligen-----			-----Turbinas-----	
Contrôle pH et DO	sans	sans	sans	sans	sans
μ_v	0,015	0,044	0,054	0,054	0,042
r^2	(0,99)	(0,94)	(0,97)	(0,90)	(0,98)
$A_{mc_{max}}$	25	59	75	67	54
X_{max}	6,4	11,3	13,5	17,8	16
X_{max}/X_0	1,8	3,1	3,5	6,5	11
X_0	3,5	2,75	3,8	3,6	1,4
Glc_{min}	19	13,3	7,5	7,4	8,2
Gln_{min}	---	---	---	---	---
Lac_{max}	17	35	33	29	31
Amn_{max}	3,2	4,8	4,4	3,8	4,0
X_v / Glc	0,49	0,60	0,53	1,1	0,95
X_v / Gln	1,3	2,1	2,6	4,9	3,6
Lac / X_v	5,4	4,1	3,4	1,5	2,1
Amn / X_v	1,0	0,53	0,41	0,19	0,27

Unités: densité cellulaire: 10^8 cellules viables/L;
 μ : h^{-1} ;
 A_{mc} : mg/L;
Glc, Gln, Lac, Amn: mM.

spécifiques y sont identifiés. Une comparaison des paramètres des cultures effectuées dans le RPMI et le DMEM présentés au tableau 11 permet de faire les observations suivantes compte tenu des conditions expérimentales résumées plus haut au tableau 4:

- Les taux de croissance spécifiques moyens observés dans le RPMI sont moins élevés que tous ceux obtenus dans le DMEM et sont affectés par la concentration de sérum du milieu.
- Les concentrations maximales de cellules viables atteintes dans le réacteur varient de 6 à 9×10^8 cellules/L pour le RPMI et de 15 à 19×10^8 cellules/L pour le DMEM. De façon générale, le RPMI supporte moins bien la croissance.
- La glutamine a été épuisée dans toutes les cultures effectuées dans le RPMI. Les 1,8 mM de glutamine avaient toutes été assimilées lorsque la quantité de cellules viables a atteint son maximum. En contrepartie, environ 2,5 mM d'ammoniaque ont été produites pour les concentrations de sérum de 5 et 10%. Similairement, dans les cultures effectuées dans le DMEM la glutamine présente au début de la culture a été assimilée. Les concentrations d'ammoniaque atteignent dans ces cas 3,6 mM (avec 10% FBS) et 4,3 mM (avec 3% FBS). Ces concentrations représentent

près du double des concentrations mesurées en fin de culture dans le RPMI, renforçant ainsi l'hypothèse que pour les cultures en RPMI, la glutamine constitue l'élément limitant et la toxicité de l'ammoniaque n'est pas la cause première de l'arrêt de la croissance.

- Les concentrations d'anticorps monoclonaux mesurées en fin de culture dans le DMEM atteignent près du double de celles obtenues dans le RPMI, ceci dans les réacteurs opérés sans contrôle d'oxygène dissous et de pH.

Des exemples des courbes de croissance obtenues en utilisant le DMEM + 3% FBS et le RPMI 1640 + 3% FBS sont présentés aux figures 15 et 16. On peut y remarquer que la production d'anticorps monoclonaux ne se poursuit pas de façon aussi rapide au delà de la période de croissance des cellules. On observe aussi que la concentration en oxygène dissous de ces deux cultures n'a pas baissé sous 20% de saturation par rapport à l'eau.

Les cellules de la lignée CBM-P2-B adaptées au DMEM, à l'IMDM et au RPMI supplémentés de 1% de FBS ont aussi été cultivées dans le Celligen sans contrôle de pH et de DO. La qualité de cette lignée cellulaire en termes

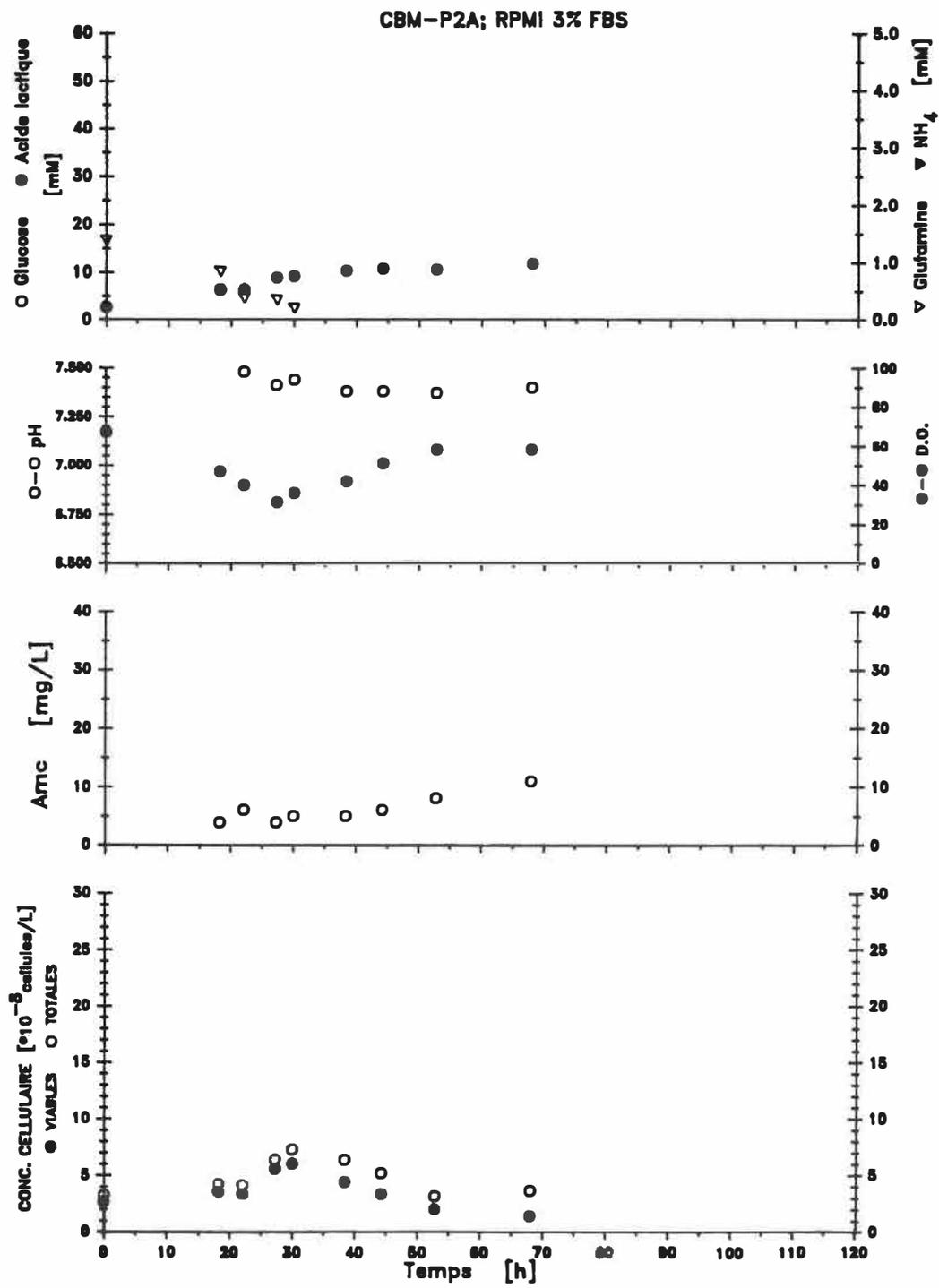


Figure 15 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-A cultivées en cuvée dans le Celligen dans le RPMI 1640 supplémenté de 3% FBS

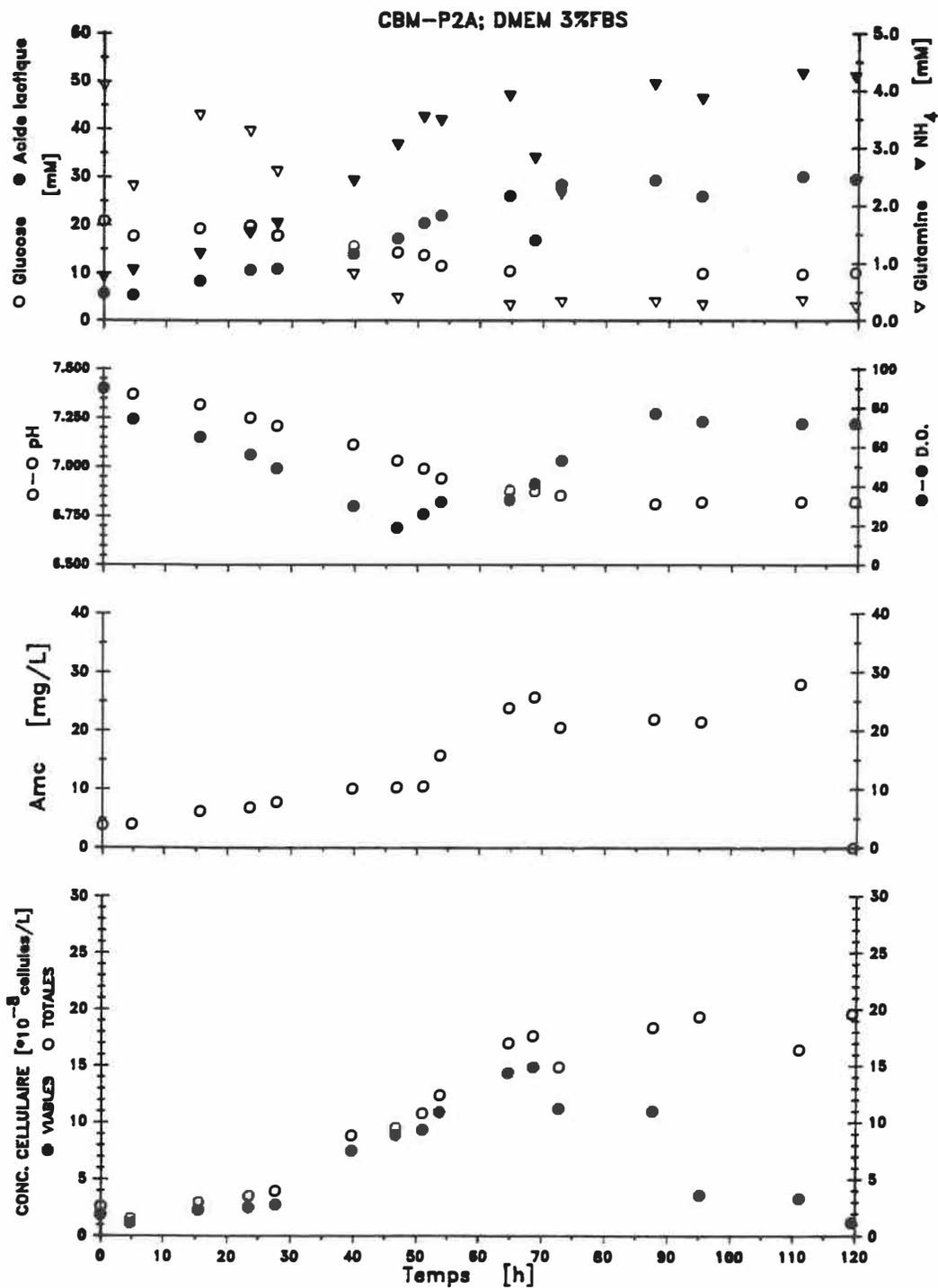


Figure 16 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-A cultivées en cuvée dans le Celligen dans le DMEM supplémenté de 3% FBS

de production et de croissance procure à l'analyse des données recueillies un intérêt plus marqué. Deux dispositifs de mélange et d'aération ont été utilisés: le "Cell Lift Impeller" de New-Brunswick pour la culture effectuée dans le RPMI ainsi que deux cultures dans le DMEM (notées A et B); et un agitateur à hélice double surmonté d'une turbine Rushton pour une troisième culture dans le DMEM (notée C) et une culture dans l'IMDM. Plusieurs paramètres mesurés lors de ces cultures sont résumés au tableau 12, présenté plus haut. Les courbes d'évolution des cultures sont présentées aux figures 17 à 20 à l'exception de la culture en RPMI qui peut être consultée à l'annexe B.

Ces cultures confirment la supériorité du DMEM comme milieu de base. La population maximale de cellules viables, $X_{v,max}$, n'a atteint que $6,4 \times 10^8$ cellules/L dans le RPMI comparativement à plus de 10^9 cellules/L dans le DMEM (tableau 12). Les proportions d'anticorps monoclonaux produits sont les mêmes que pour la lignée CBM-P2-A: les concentrations mesurées dans le DMEM sont de l'ordre de 60 mg/L, alors que celles obtenues dans le RPMI n'atteignent que 25 mg/L. Les densités cellulaires atteintes dans les cuvées DMEM 1% C et IMDM sont légèrement supérieures à celles atteintes dans les cuvées DMEM

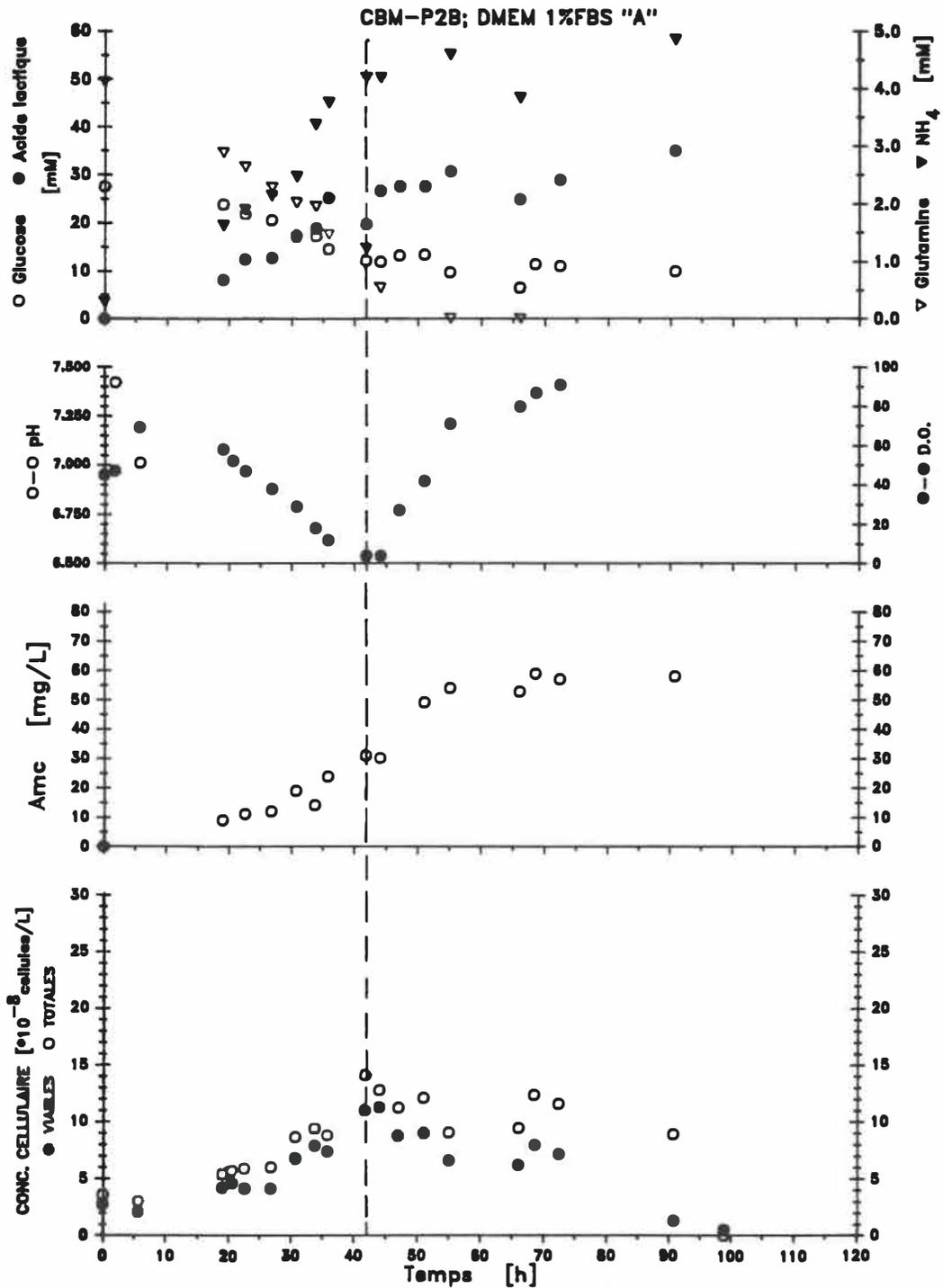


Figure 17 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-B cultivées en cuvée dans le Celligen dans le DMEM supplémenté de 1% FBS, agitation fournie par le "Cell Lift Impeller". Expérience A

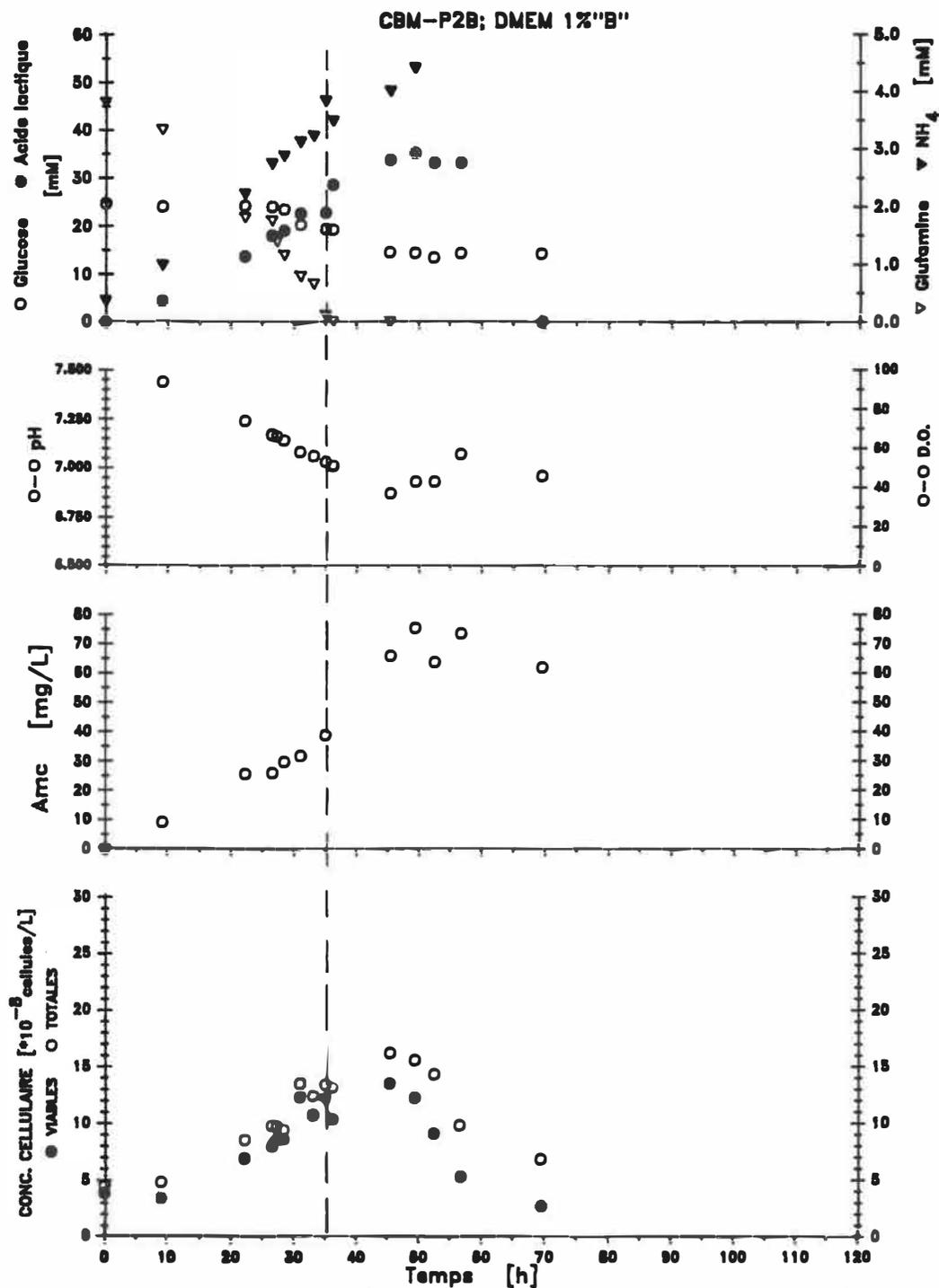


Figure 18 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-B cultivées en cuvée dans le Celligen dans le DMEM supplémenté de 1% FBS, agitation fournie par le "Cell Lift Impeller". Expérience B

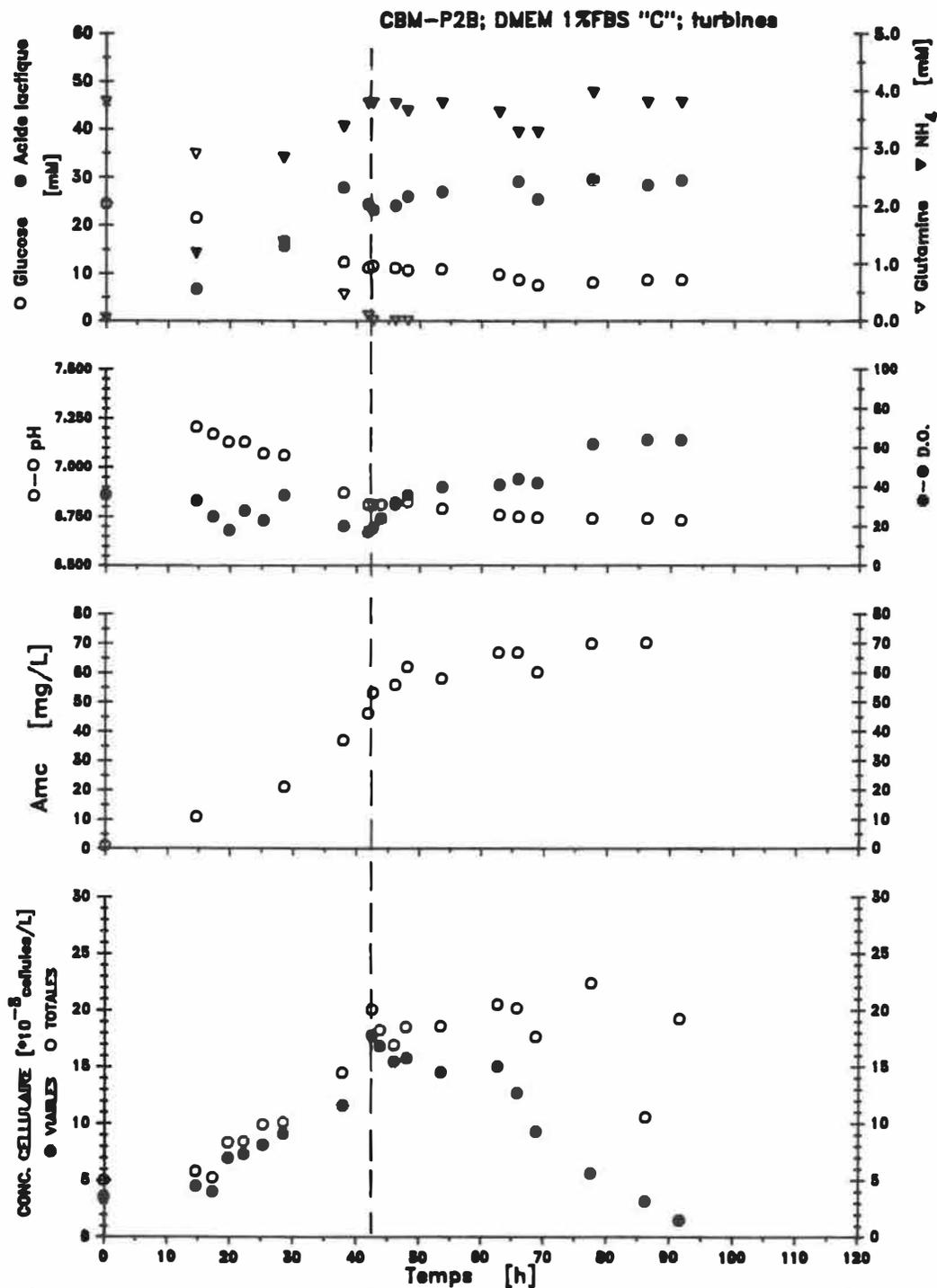


Figure 19 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-B cultivées en cuvée dans le Celligen dans le DMEM supplémenté de 1% FBS, agitation fournie par l'agitateur à hélices. Expérience C

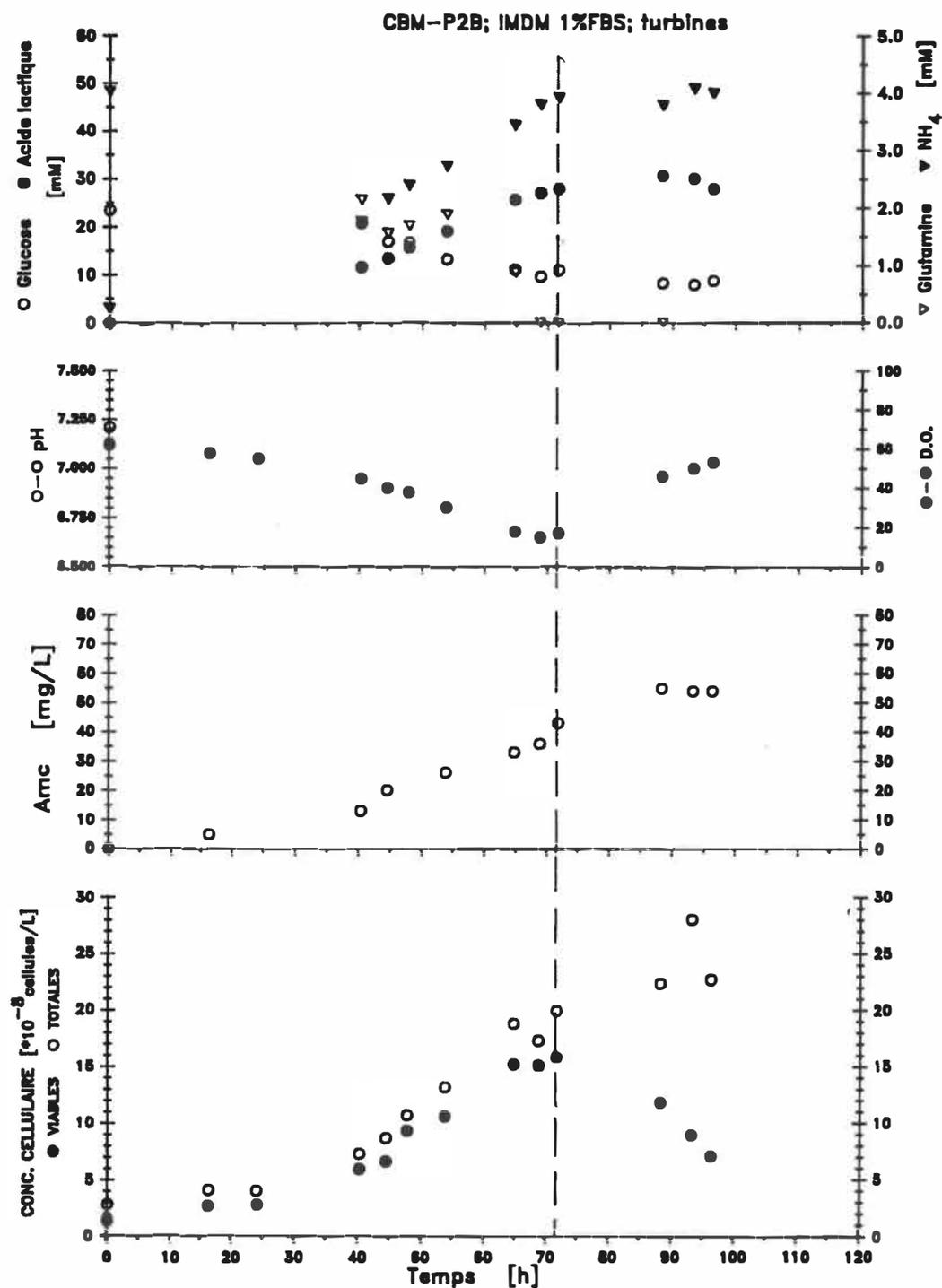


Figure 20 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-B cultivées en curvée dans le Celligen dans le IMDM supplémenté de 1% FBS, agitation fournie par l'agitateur à hélices

1%A et B. Il est à remarquer que malgré la forte agitation mécanique subie par les cellules, les concentrations totales des cellules demeurent élevées, même après le déclin des cellules viables. Par contre, les quantités d'anticorps produits fluctuent entre 54 mg/L et 67 mg/L et de la même façon pour les deux séries d'expériences. Ces résultats confirment ceux obtenus en flacons agités relativement à l'absence d'avantages relatifs à l'utilisation de l'Hepes comme tampon. L'absence de mesure de pH ne permet pas d'apprécier les qualités de cette solution tampon. L'observation du changement de coloration du milieu au cours de la culture permet cependant d'affirmer que le pH du milieu n'a pas été maintenu à 7,2.

IV.5.2 Croissance cellulaire

L'examen des courbes de croissance permet de constater deux comportements importants relativement à la représentation mathématique de la croissance:

- la concentration totale de cellules tend à demeurer stable après que $X_{v,max}$ ait été observé, et
- la concentration de cellules mortes est relativement constante au cours de la phase exponentielle de croissance.

Ce que confirme une représentation graphique de X_d et X_v en fonction du temps (figure 21) où l'on peut constater que dX_v/dt est beaucoup plus important que dX_d/dt .

Ces deux constats ont des implications importantes sur la modélisation de la croissance et la mortalité des cellules. On a défini plus haut

$$\frac{dX_v}{dt} = (\mu - k_d) X_v \quad (34)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X_v - k_b X_d \quad (35)$$

sous l'hypothèse que les cellules viables ne font pas l'objet de bris. Or, le fait que la concentration totale de cellules soit normalement stable après $X_{v,max}$ implique que

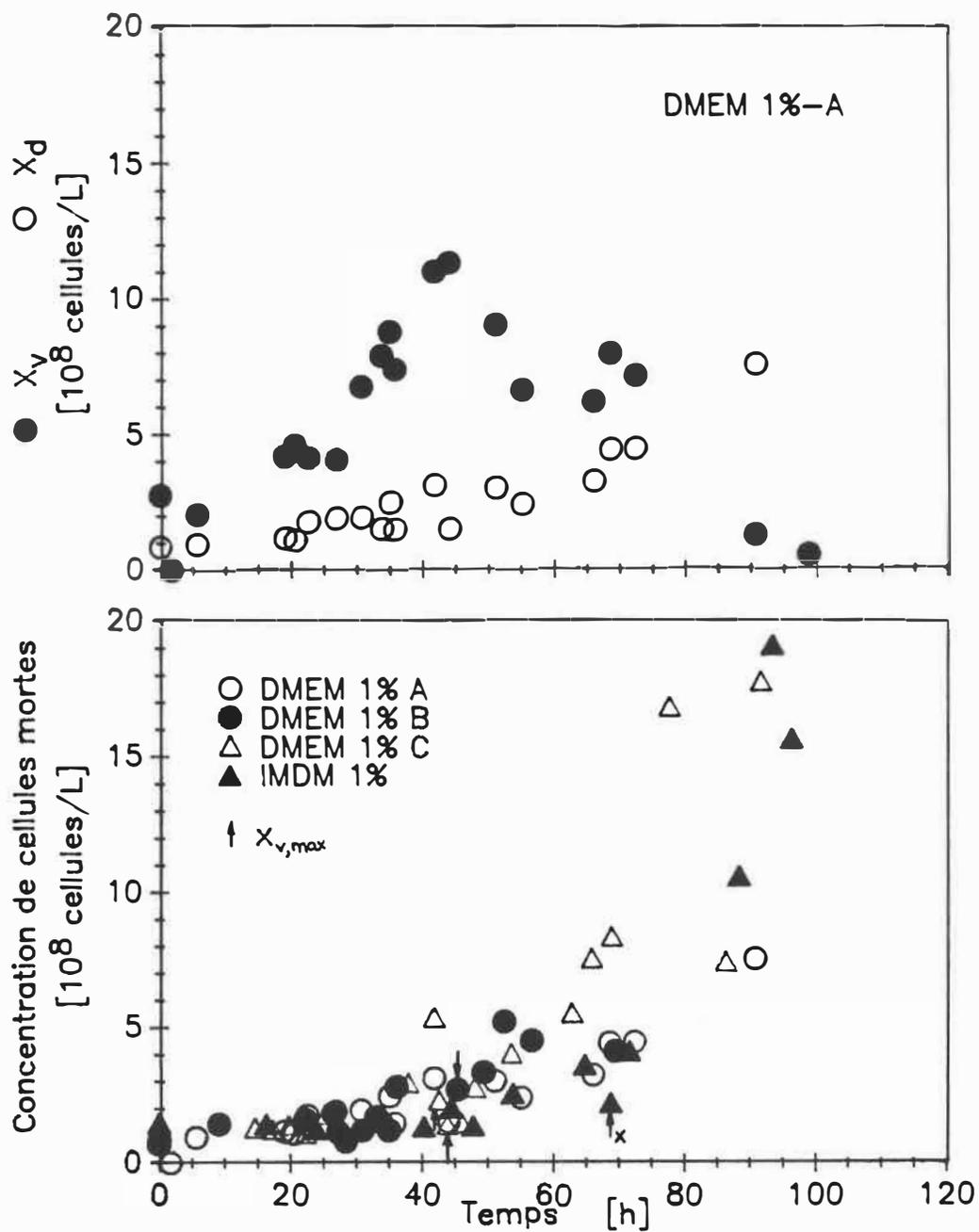
$$\frac{dX}{dt} \sim 0$$

au cours de cette période. Dans ces conditions, l'équation (35) est réduite à

$$\mu X_v \sim k_b X_d \quad (39)$$

comme μ et k_b devraient être indépendants, l'hypothèse d'avoir $\mu \sim 0$ et $k_b \sim 0$ est vraisemblable. Les conditions qui font en sorte que le bris des cellules n'est pas significatif en fin de culture devrait prévaloir tout au

Figure 21 Concentration de cellules viables et de cellules mortes en fonction du temps: (a) Evolution de X_v et X_d pour la culture DMEM 1%-A (b) Evolution de X_d pour toutes les cultures de la lignée CBM-P2-B



long de celle-ci. En effet, l'environnement chimique est plus agressant en fin de culture (DO, pH, concentrations d'acide lactique, d'ammoniaque et, potentiellement, d'autres toxines non identifiées) alors que l'action mécanique subie par les cellules est constante. Les cultures soumises à la forte agitation mécanique créée par l'utilisation d'hélices n'ont pas non plus subi de dommages particuliers. Ceci implique que l'hypothèse posée pour soutenir l'équation (35) est valable et que de façon générale on a

$$\frac{dX_v}{dt} = (\mu - k_d) X_v \quad (34)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X_v \quad (40)$$

De plus, comme la concentration de cellules mortes demeure relativement constante au cours de la phase exponentielle de croissance, il s'ensuit que $k_d \sim 0$ lorsque $dX_v/dt > 0$ et qu'au cours de cette période

$$\frac{dX}{dt} = \mu X_v \sim \frac{dX_v}{dt}$$

Ainsi

$$\mu \sim \frac{1}{X_v} \frac{dX_v}{dt} \quad (41)$$

constitue une définition acceptable de taux spécifique de croissance. Devant la difficulté que représente l'évalua-

tion de la dérivée des courbes de croissance, cette définition permet d'estimer un taux de croissance spécifique moyen

$$\bar{\mu}_v = \frac{1}{t_2 - t_1} \int_{t_1}^{t_2} \mu_v dt = \frac{\ln X_{v2} - \ln X_{v1}}{t_2 - t_1} = \frac{\ln X_v}{t} \quad (42)$$

assimilable au $\mu_{app,v}$ défini plus haut et peut être utilisé pour estimer d'autres paramètres autrement difficiles à obtenir sans un effort expérimental important. Les taux de croissance spécifiques moyens évalués pour toutes les cultures en bioréacteur sont rapportés plus haut aux tableaux 11 et 12 avec le coefficient de corrélation de la droite de régression ainsi que le nombre de degrés de liberté. Les comptes cellulaires ayant servis à leur évaluation sont identifiés à l'annexe B.

IV.5.3 Assimilation de substrat et production de toxines

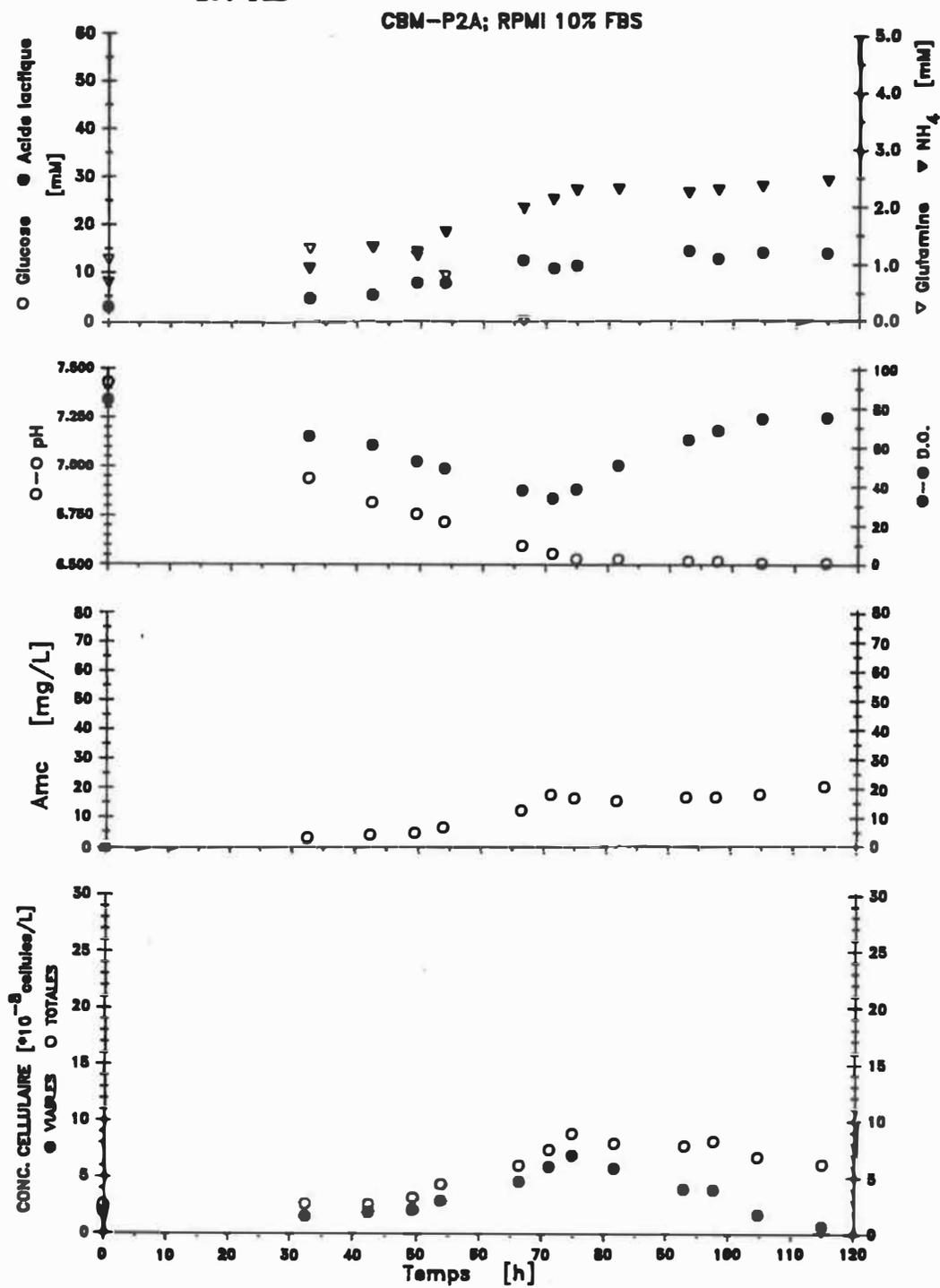
Les causes d'arrêt de croissance généralement identifiées regroupent une limitation en glutamine, et des intoxications liées aux concentrations d'ammoniaque et d'acide lactique dans le milieu.

L'identification du moment où la concentration maximale de cellules viable est atteinte sur les courbes

de croissance des cultures effectuées dans les bioréacteurs permet de visualiser le synchronisme entre la concentration maximale de cellules viables et la limitation en glutamine. Parallèlement, les concentrations d'ammoniaque atteignent de 4,0 à 4,5 mM dans les cultures effectuées dans le DMEM et l'IMDM (figures 17 à 20) alors que les concentrations d'acide lactique s'élèvent entre 25 et 35 mM.

Les cultures effectuées dans le RPMI avec une concentration initiale de glutamine réduite à 1,8 mM permettent cependant de distinguer les effets toxiques de l'acide lactique et de l'ammoniaque, de celui de l'épuisement de la glutamine. Par exemple, dans la culture illustrée à la figure 22 (CBM-P2-A, RPMI 10%FBS), les concentrations d'acide lactique et d'ammoniaque atteignent respectivement 12 et 2,3 mM alors que la glutamine atteint les limites de détection. Au cours de cette culture, la concentration en oxygène dissous par rapport à la saturation de l'eau a été de 34%. Ainsi, jamais l'oxygène n'a été un élément limitant. L'épuisement de la glutamine du milieu est donc la cause première d'arrêt de la croissance dans ce cas.

Figure 22 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-A cultivées en curvée dans le Celligen dans le RPMI 1640 supplémenté de 10% FBS



IV.5.4 Production d'anticorps

La concentration d'anticorps mesurée dans le milieu continue souvent à augmenter après que la concentration maximale de cellules viables soit atteinte et que la croissance soit nulle. Ainsi pour les cuvées effectuées avec la lignée CBM-P2-B, déjà présentées aux figures 17 à 20, entre 0 et 48% des anticorps sont produits après que $X_{v,max}$ soit atteint. La production d'anticorps cesse systématiquement une vingtaine d'heures après que la concentration minimale de glutamine soit atteinte. Ces observations suggèrent que les limitations de la croissance et de la production sont toutes deux liées à la glutamine. La présence des autres sources d'azote que sont l'ammoniaque et les autres acides aminés ne semble pas suffire au maintien de la production.

IV.5.5 Exploration de l'effet de la concentration d'oxygène dissous et du pH sur la croissance et la production

La concentration d'oxygène dissous dans le milieu est un bon indicateur de l'activité métabolique. La courbe de croissance DMEM 1%A présentée à la figure 17 en est une bonne illustration. L'arrêt de la croissance

est accompagné d'une remontée rapide de la concentration d'oxygène dissous provoquée par une diminution du taux d'utilisation d'oxygène (OUR). Dans le cas particulier de cette culture, la concentration de cellules viables plafonne avant que la glutamine ne soit épuisée. Une limitation en oxygène pourrait dans ce cas être la cause de l'arrêt de la croissance. Dans le cas des cultures DMEM 1%C et IMDM 1% (figures 19 et 20), l'emploi de l'agitateur à hélices a permis d'augmenter le transfert de masse et de maintenir la concentration d'oxygène dissous au-dessus de 20% avec un débit d'air de trois à dix fois inférieur à celui utilisé avec le "Cell Lift Impeller" du Celligen. Dans ces cas, l'arrêt de la croissance coïncide avec l'épuisement de la glutamine. On ne peut affirmer que la forte agitation induite par ce type de mélangeur ait provoqué une différence notable de comportement entre ces cultures et les cuvées DMEM 1%A et B.

Bien que ChemBioMed, motivée par la nécessité de minimiser les difficultés d'opération, ait imposé l'opération des bioréacteurs sans contrôle de DO et de pH, une expérience comparative a été menée avec la lignée CBM-P2-A dans le DMEM supplémenté de 10% FBS. Le même inoculum, contenant $5,8 \times 10^8$ cellules viables/L a été utilisé pour les deux cultures. L'une a été effectuée

sans contrôle de DO et de pH, alors que pour la seconde, les consignes de pH et de DO au contrôleur du Celligen_{md} ont été fixées à 7,2 et 60% respectivement. Les figures 23 et 24, reproduisant les courbes de croissance obtenues, ainsi que, plus succinctement, les résultats rapportés au tableau 11, permettent de constater les différences de comportement des deux cultures. Les taux de croissance obtenus sont comparables. Cependant les ratios $X_{V,max}/X_{V,0}$ sont de 2,6 pour les cultures dont les paramètres environnementaux sont contrôlés et de 3,3 pour celle sur laquelle aucun contrôle de pH et de DO n'est exercé. Du point de vue production, la concentration d'anticorps monoclonaux est de 20 mg/L dans le premier, alors qu'elle atteint 32 mg/L dans le second. Il semble donc que le maintien de la DO à un niveau élevé n'a pas eu d'effet bénéfique. Les concentrations d'oxygène dissous stimulant la croissance telles que rapportées dans la littérature varient selon les auteurs. Certains ont constaté une augmentation du taux de croissance à faible concentration d'oxygène dissous (0,5% pour Miller et al., 1987 et 8% pour Boraston et al., 1984) alors que d'autres ont plutôt observé ce phénomène dans une plage de concentration plus élevée (30% pour Balin et al., 1976, et 60% pour Reuveny et al., 1986). Si l'on peut d'une part questionner la comparabilité de tous ces résultats

Figure 23 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-A cultivées en curvée dans le Celligen avec contrôle du pH et de l'oxygène dissous dans le DMEM supplémenté de 10% FBS
CBM-P2A; DMEM 10%FBS; avec contrôle

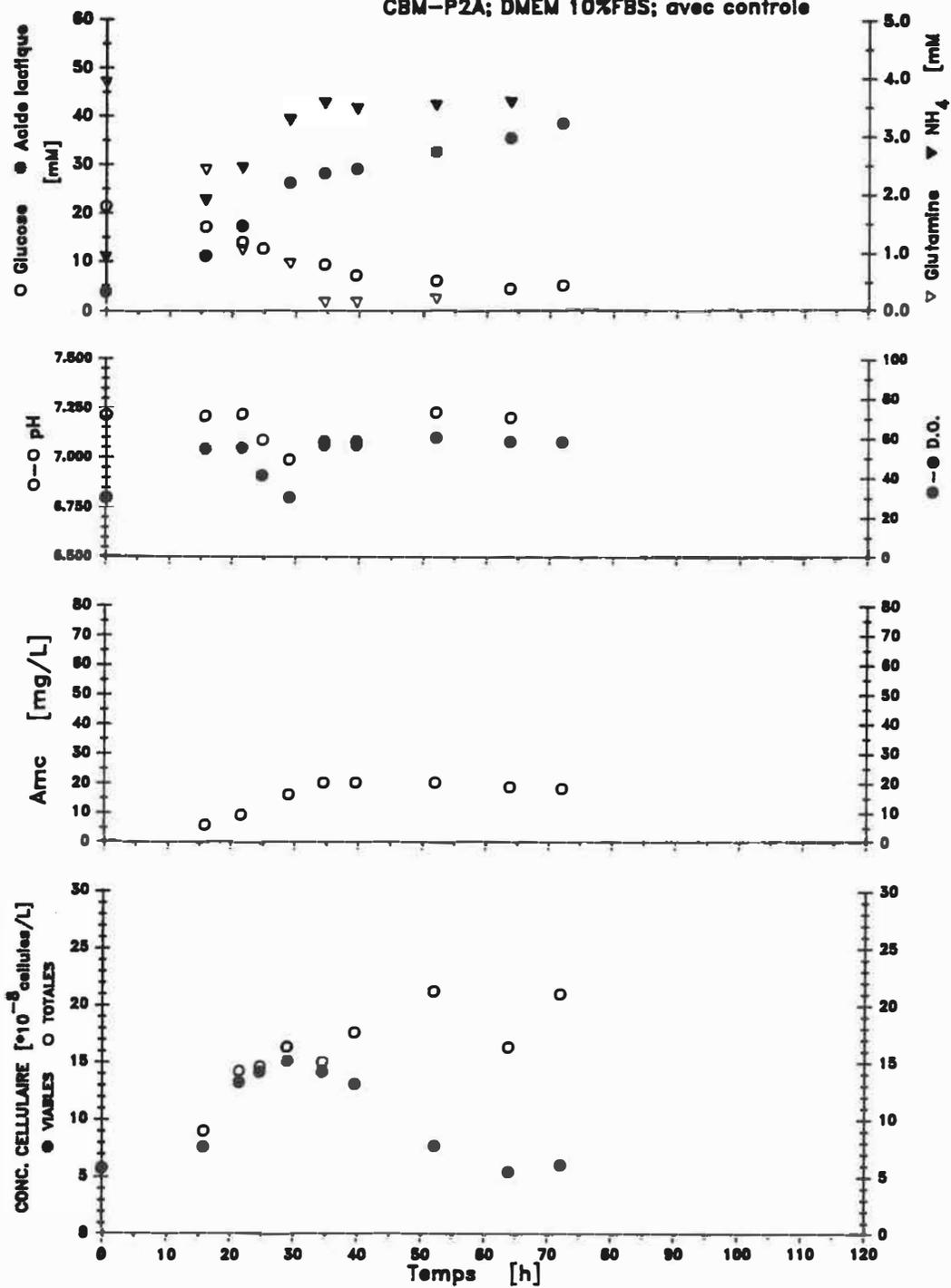
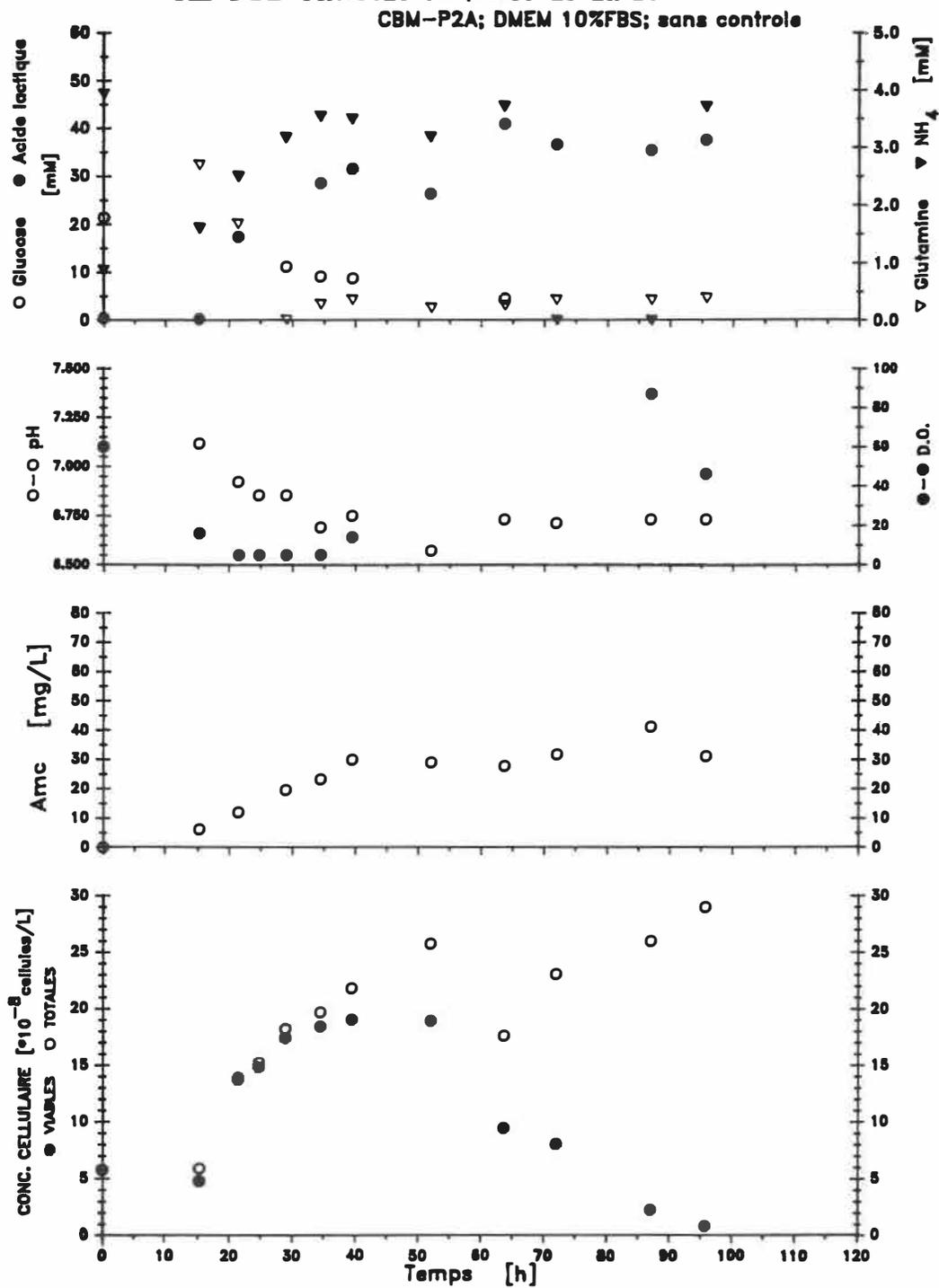


Figure 24 Courbe de croissance des cellules CBM-P2-A cultivées en curvée dans le Celligen dans le DMEM supplémenté de 10% FBS sans contrôle du pH et de la DO



relativement aux techniques de calibration des sondes utilisées, on remarque d'autre part que tous ces auteurs rapportent que les concentrations d'oxygène dissous stimulant la croissance ne sont pas les mêmes que les concentrations permettant d'augmenter la production d'anticorps monoclonaux.

La culture effectuée sans contrôle de DO et de pH, dont les résultats sont illustrés à la figure 24, semble subir une limitation d'oxygène autour de la vingtième heure. Ceci est accompagné d'une inflexion de la courbe de croissance. La concentration en oxygène dissous augmente par la suite vers la quarantième heure, moment où le nombre de cellules viables plafonne à 19×10^8 cellules/L. La culture effectuée avec contrôle de DO et de pH affiche cependant le même comportement relativement à la courbe de croissance. Or, bien que le système d'aération du bioréacteur n'ait pas été en mesure de compenser complètement la demande en oxygène, la concentration d'oxygène dissous y est demeurée plus élevée que 30%. Il ne semble donc pas que dans ces cultures en cuvée où les densités cellulaires sont demeurées inférieures à 20×10^8 cellules viables/L, l'oxygène soit un élément limitant. La diminution des taux de croissance spécifiques peut être le résultat de l'effet conjugué de

l'augmentation des concentrations d'acide lactique et d'ammoniaque et de la diminution importante de la concentration de glutamine dans le milieu. Par contre, dans la culture sans contrôle de DO à faible concentration d'oxygène dissous, la densité cellulaire atteinte est de 25% plus élevée que dans la culture avec contrôle, la quantité d'anticorps produits est de 60% supérieure. Il est donc possible que l'oxygène dissous, à des concentrations de 30%, ait un effet inhibiteur sur la croissance ainsi que sur la production. De plus, le nombre de cellules viables est demeuré élevé entre la trentième et la cinquantième heure. Malgré ce fait, la production d'anticorps n'a pas été poursuivie au delà de la quarantième heure de culture. On remarque que les courbes d'assimilation du glucose et de la glutamine sont similaires pour les deux types d'opération. L'arrêt de la production correspond au moment où la concentration en glutamine est stabilisée à environ 0,25 mM, et où les concentrations d'acide lactique et d'ammoniaque atteignent respectivement 45 mM et 3,5 mM. On ne peut donc conclure formellement sur la cause de l'arrêt de production d'anticorps monoclonaux. Ce peut être comme pour la croissance une conséquence de l'accumulation de toxines, dont l'ammoniaque ou l'acide lactique, ou d'une limitation en glutamine.

L'optimisation de la concentration d'oxygène dissous pour la production d'anticorps monoclonaux mériterait un traitement particulier. Il est impossible, sur la base de l'unique expérience rapportée ici, de conclure formellement.

L'examen de la figure 23 permet de constater que le contrôleur du Celligen n'a pu compenser la demande élevée en oxygène de la phase exponentielle de croissance. L'oxygène dissous a diminué jusqu'à 30% de la saturation, il semble de plus que ce soit l'arrêt de la croissance qui ait permis au système de rétablir la DO au niveau de la consigne. On observe ici un effet de la déficience du système d'aération du milieu décrit plus haut que l'injection d'oxygène pur dans le réacteur n'a pu compenser. Sur la même figure, la courbe représentant l'évolution du pH illustre une autre limitation du bioréacteur utilisé. Le maintien de l'oxygène dissous à la valeur de la consigne constitue la priorité d'action du contrôleur. Comme il s'avère que l'ouverture des vannes d'oxygène et de CO₂ est commandée par le même signal, l'action du contrôleur résulte en une injection de CO₂ provoquant une chute du pH. Malgré la faible densité cellulaire atteinte et les quantités relativement faibles d'acide lactique larguées par les cellules, il est

impossible dans ces conditions de maintenir le pH à 7,2 sans un ajout de bicarbonate ou d'une autre base tolérée par les cellules dans le milieu.

IV.6 MODÉLISATION DE LA CINÉTIQUE DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DE CULTURES EN CUVÉE

Des informations pertinentes ont été tirées des données recueillies lors des cultures en bioréacteur. Celles-ci pourront être mises à profit pour estimer quelques paramètres important de modèles de croissance et de production.

La production d'anticorps constitue l'un des aspects les plus importants de l'effort de modélisation. Le modèle le plus souvent utilisé est celui de Leudeking-Piret:

$$q_{Amc} = Y_{Amc}/X \mu + k_{Amc} \quad (22)$$

L'évaluation de Y_{Amc}/X et de k_{Amc} nécessite l'évaluation du taux spécifique de production d'anticorps

$$q_{Amc} = \frac{1}{X_v} \frac{dAmc}{dt} \quad (43)$$

et du taux de croissance

$$\frac{dX}{dt} = \mu X_v \quad (40)$$

Similairement, l'évaluation des divers coefficients de rendement peut être faite à partir d'évaluation des $d[\text{Substrats}]/dt$.

L'estimé de la dérivée de courbes expérimentales pour lesquelles l'échantillonnage n'a pas été séquentiel et le nombre d'échantillons recueillis réduit, ne permet pas d'évaluer adéquatement les taux volumétriques de croissance, d'assimilation et de production. L'allure de la dérivée dépend de la technique utilisée et les corrélations entre les taux spécifiques s'en trouvent biaisés. Il a été vérifié qu'il n'est pas possible d'apprécier graphiquement le type de métabolite que sont les anticorps monoclonaux produits par cette lignée cellulaire en évaluant les dérivées des courbes expérimentales (Annexe C). Dans les cultures effectuées dans des systèmes agités, toutes les concentrations de substrats et de produits varient dans le temps et influencent la réponse des cellules. Un inoculum d'une densité de $0,5 \times 10^8$ cellules viables/L s'est avéré être le minimum vital pour la survie des cultures en flacon agité. Aussi la densité minimale des inocula des cultures en bioréacteurs a été de $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ cellules viables/L. Cette concentration cellulaire est d'un ordre de grandeur plus élevé que

celui qui rend possible une détermination adéquate du compte cellulaire avec les techniques utilisées et l'évaluation des taux dits initiaux de croissance, d'assimilation et de production. Une telle évaluation permettrait de dissocier l'effet de chacun des substrats ou des toxines en faisant varier la concentration initiale de chacun d'eux séparément et, du même coup, de réduire le nombre de paramètres à la suite d'une analyse statistique. De plus, la modélisation de la croissance et de la mortalité par des modèles de type Monod implique l'estimation de paramètres non linéaire introduisant une difficulté supplémentaire. Johnson et Berthouex (1975) ont montré que les paramètres μ_{\max} et K de l'équation (27)

$$\mu = \mu_{\max} \prod_i \frac{S_i}{K_i + S_i} \prod_j \frac{K_{I,j}}{K_{I,j} + S_{I,j}} \quad (27)$$

sont linéairement dépendants. Le système à résoudre peut comporter plusieurs optima locaux et les constantes K peuvent ne pas avoir de signification physique. Dans ces conditions, on a intérêt, lors de l'opération d'un bioréacteur en cuvée avec une lignée cellulaire dont la cinétique de croissance n'est pas déjà bien caractérisée à utiliser un modèle simplifié mais adéquat.

IV.6.1 Cinétique de production

Les données disponibles ne permettent pas d'établir formellement si la production d'anticorps monoclonaux par cette lignée est associée ou non à la croissance. Il a été observé plus haut qu'une partie non négligeable de la production a lieu après la phase de croissance. En faisant, sur la base de cette observation, l'hypothèse qu'une partie de la production n'est pas associée à la croissance, l'expression

$$q_{Amc} = y_{Amc}/X \mu + k_{Amc} \quad (22)$$

est réduite à

$$q_{Amc} = k_{Amc} \quad (44)$$

considérant que $\mu = \mu_v$. Sous une forme dérivée l'équation devient

$$\frac{d_{Amc}}{dt} = k_{Amc} X_v \quad (45)$$

Il est possible de s'affranchir de la limitation qu'impose la représentation des dérivées en évaluant la forme intégrée de l'équation (45). En posant dans un premier temps l'hypothèse que $k_{Amc} \neq f(t)$, on a

$$Amc = k_{Amc} \int X_v dt \quad (46)$$

$$Amc = k_{Amc} \sum X_{v,i} \Delta t_i \quad (47)$$

La sommation des $X_{v,i} \Delta t_i$ est évaluable par la méthode des

trapèzes appliquée entre chaque point expérimental. Les résultats de ces évaluations sont représentés à la figure 25. On y constate

- qu'en début de culture k_{AMC} est constant,
- que k_{AMC} est sensiblement le même pour toutes les cultures effectuées dans le DMEM, mais plus faible dans l'IMDM, et
- que la production d'anticorps est plus faible en fin de culture.

Appliquant le même traitement aux résultats obtenus avec la lignée CBM-P2-A, les résultats obtenus sont similaires et peuvent être observés à la figure 26. Dans les cultures où la composition chimique du milieu évolue avec la culture, ce comportement est un indice d'une limitation de la production en fin de culture.

Une régression linéaire effectuée sur les données relatives aux trois cultures effectuées dans le DMEM 1% pour la portion des courbes où $\sum X_{v,i} \Delta t_i$ est évaluée pour t compris entre 0 et $t\{([Gln] = 0) + 20 \text{ heures}\}$ $k_p = 0,17 \pm 0,005$ avec un coefficient de régression $r^2 = 0,936$.

Figure 25 Relation entre A_{mc} et $\sum X_{v,i} \Delta t_i$ pour les cultures DMEM 1% -A, -B, -C et IMDM 1%

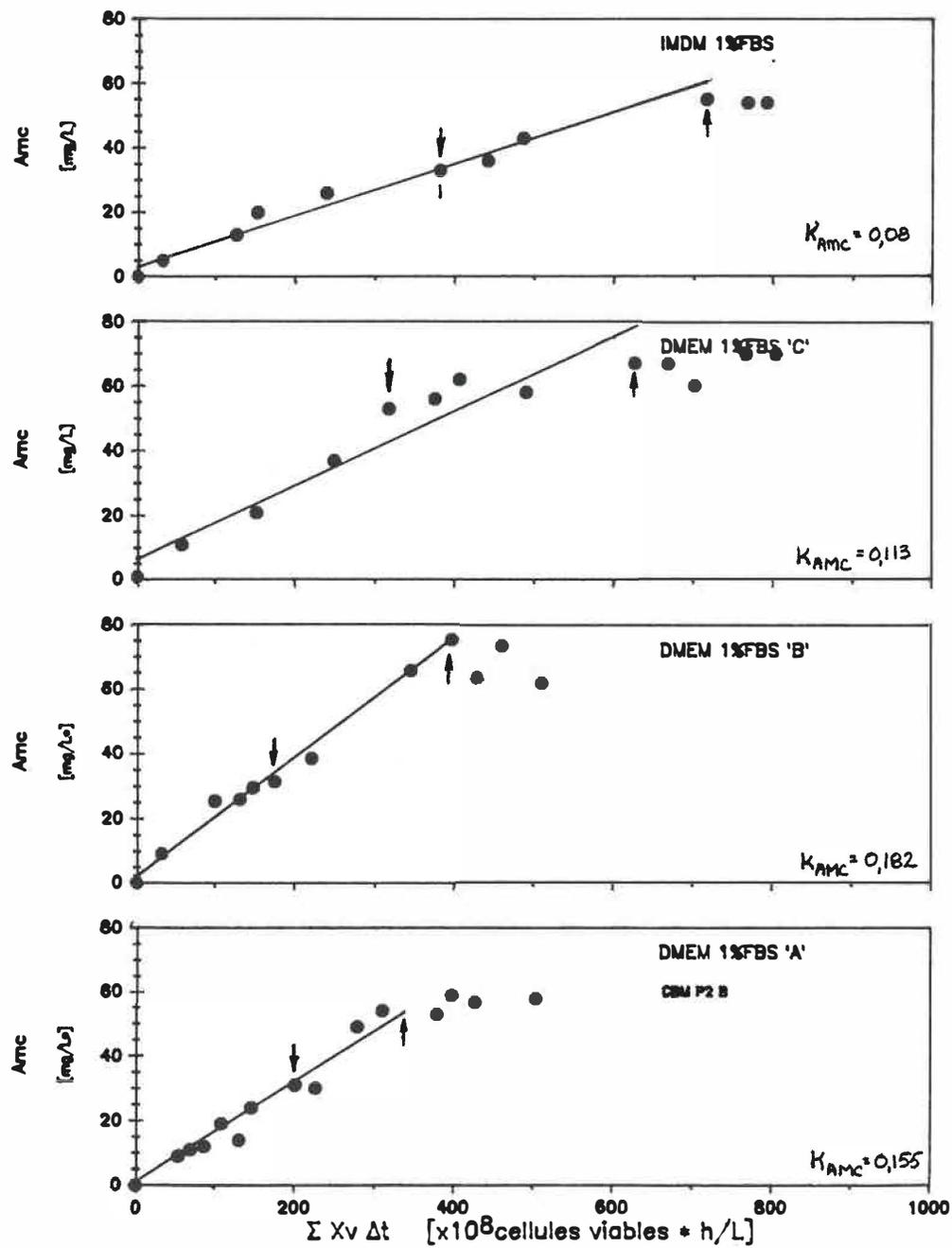
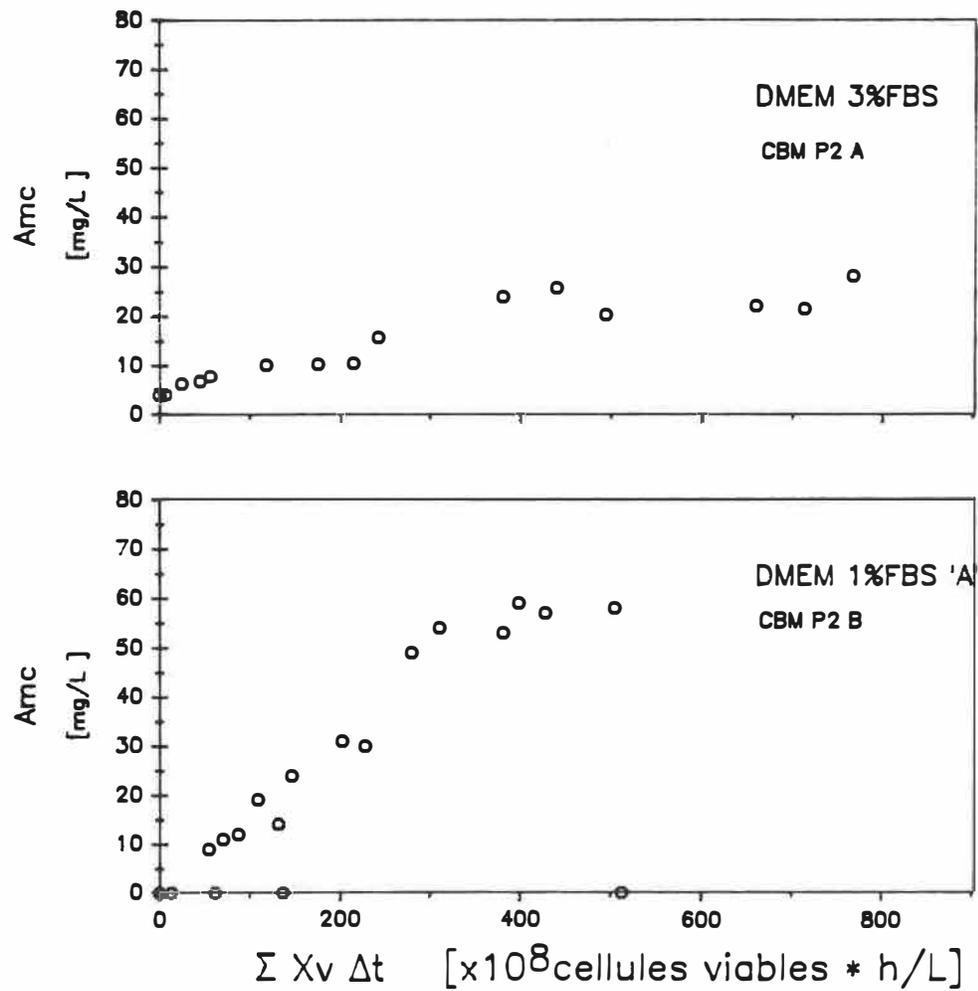


Figure 26 Comparaison des courbes représentant AMC en fonction de $\sum X_{v,i} \Delta t_i$ entre la lignée CBM-P2-A cultivée dans le DMEM + 3%FBS et la lignée CBM-P2-B cultivée dans le DMEM + 1%FBS



IV.6.2 Coefficients de rendement et taux de croissance spécifique

Les expressions cinétiques usuelles des taux d'assimilation de substrats et de production de toxines sont les suivantes

$$q_{S,i} = \frac{1}{Y_{X/S}} \mu + m_S = \frac{1}{Y'_{X/S}} \mu \quad (13)$$

$$q_p = Y_{p/s} q_s \quad (50)$$

Assimilant μ à μ_v et multipliant les deux équations par X_v , les taux volumétriques deviennent

$$\frac{dS_i}{dt} = \frac{-1}{Y'_{X/S}} \frac{dX_v}{dt} \quad (51)$$

$$\frac{dP_i}{dt} = -Y_{p/s} \frac{dS_i}{dt} \quad (52)$$

Intégrant, on obtient

$$(S_i - S_{i,0}) = \frac{-1}{Y'_{X/S}} (X_i - X_{i,0}) \quad (53)$$

$$(P_i - P_{i,0}) = -Y_{p/s} (S_i - S_{i,0}) \quad (54)$$

qui deviennent

$$S_i = \frac{-1}{Y'_{X/S}} X_i + \left| \frac{X_{i,0}}{Y'_{X/S}} + S_{i,0} \right| \quad (55)$$

$$P_i = -Y_{p/s} S_i + (Y_{p/s} S_{i,0} + P_{i,0}) \quad (56)$$

La limitation de la croissance est ici analysée sous son aspect stoechiométrique plutôt que cinétique. Pour les quatre cultures de la lignée CBM-P2-B, des graphiques de la concentration cellulaire en fonction des concentrations de glutamine et de glucose et de la concentration de toxines en fonction du substrats qui y est associé sont présentés aux figures 27 et 28. A leur examen, on conclut qu'il existe une relation linéaire entre [Amm] et [Gln] et entre [Lac] et [Glc]. Les coefficients de régression correspondant sont listés au tableau 13. On constate de plus qu'il est possible d'obtenir un estimé des $Y'_{x/s}$. Pour toutes les cultures, il existe une telle limitation stoechiométrique de la croissance par la glutamine. On remarque que dans le cas des cultures DMEM 1%-C et IMDM 1%, où la concentration de l'oxygène dissous est demeurée plus élevée que 15% de saturation par rapport à l'air dans l'eau, les coefficients de rendement des cellules sur les substrats sont plus élevés. Pour les cultures DMEM 1%-A et -B, le coefficient de rendement moyen $Y'_{Xv/Gln}$ est égal à $2,6 \times 10^8$ cellules viables/mmmole Gln. L'estimé moyen du coefficient $Y'_{Xv/Glc}$ est de $0,56 \times 10^8$ cellules viables/mmmole Glc. Les coefficients $Y_{Amm/Gln}$ et $Y_{Lac/Glc}$ prennent respectivement les valeurs moyennes de 0,93 mmmole Amm/mmmole Gln et 1,65 mmmole Lac/mmmole Gln.

Figure 27 Evaluation des coefficients de rendement $Y_{Amm/Gln}$ et $Y_{Lac/Glc}$

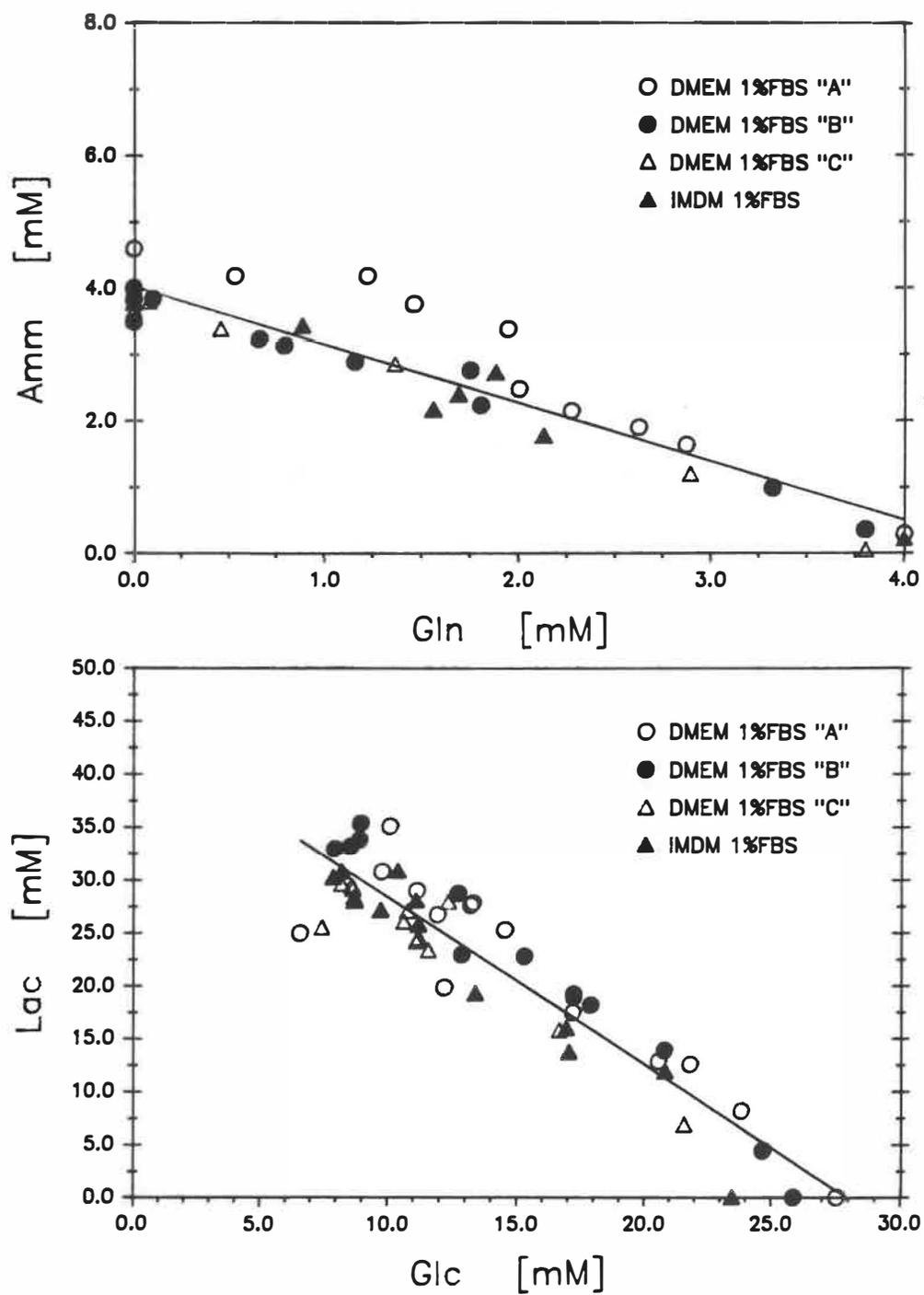


Figure 28 Evaluation des coefficients de rendement $Y_{XV/Gln}$ et $Y_{XV/Glc}$

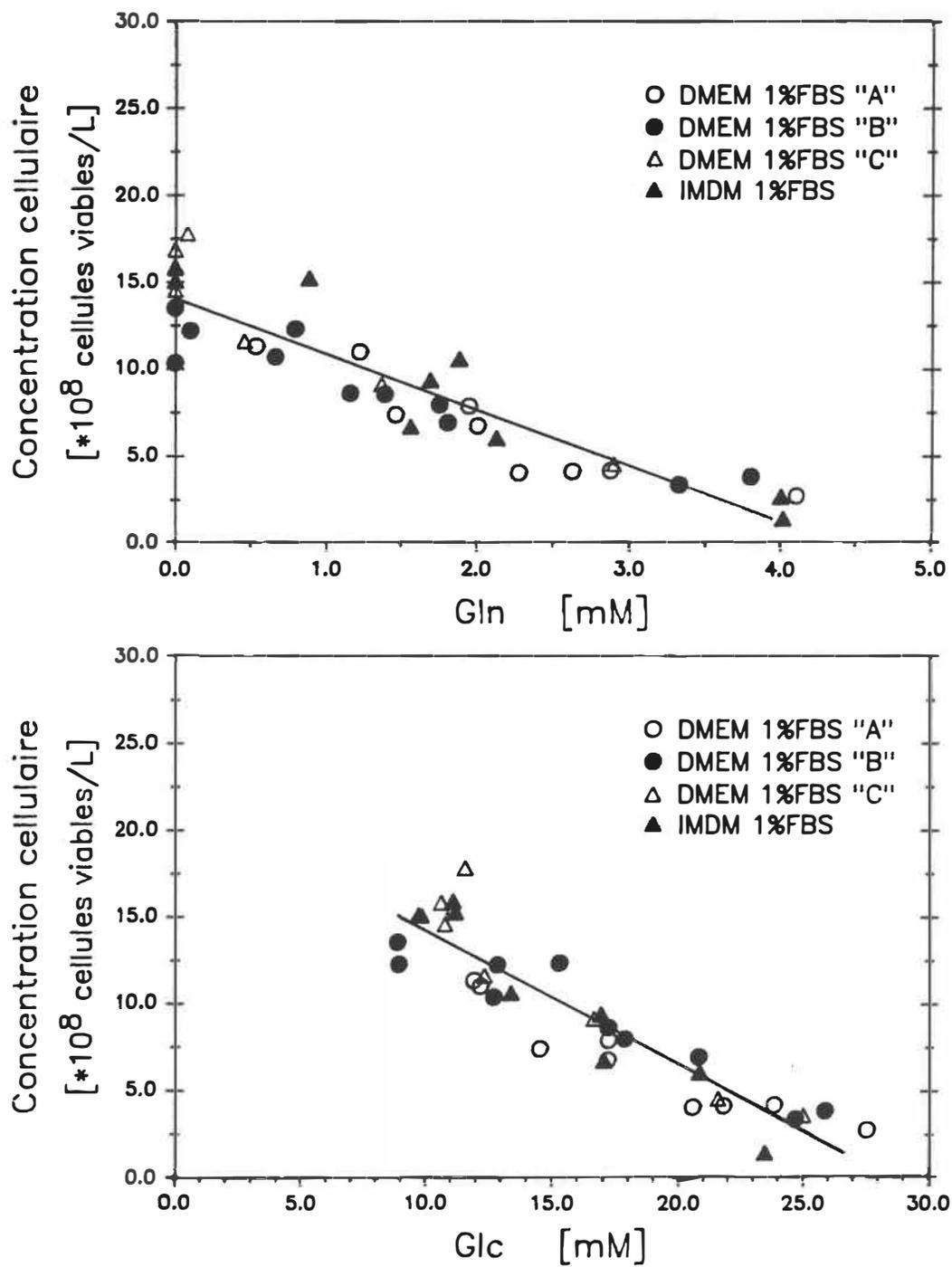


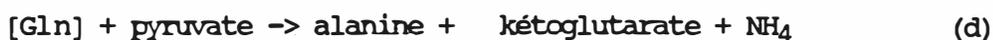
Tableau 13 Coefficients de rendement des cultures en bioréacteur de la lignée CBM-P2-B

	DMEM			IMDM	Toutes les cultures
	1%-A	1%-B	1%-C		
$Y_{Xv/Gln}$ [x 10 ⁸ cellules viables/mmole]	2,7 (r ² =0,91)	2,5 (0,94)	4,1 (0,94)	3,5 (0,94)	3,2 (0,92)
$Y_{Xv/Glc}$ [x 10 ⁸ cellules viables/mmole]	0,55 (0,92)	0,58 (0,94)	0,89 (0,95)	1,01 (0,95)	0,77 (0,92)
$Y_{Amn/Gln}$ [mmole/mmole]	1,0 (0,92)	0,87 (0,98)	0,95 (0,99)	0,89 (0,98)	0,86 (0,95)
$Y_{Lac/Glc}$ [mmole/mmole]	1,5 (0,91)	1,8 (0,99)	1,5 (0,94)	1,8 (0,97)	1,6 (0,94)

Le métabolisme de la glutamine est versatile. La glutamine peut être complètement oxydée en CO₂ avec un dégagement de cinq molécules de CO₂ si le pyruvate produit est réintroduit dans le cycle de Kreb via l'acétyl-CoA (figure 3). Elle peut aussi être partiellement oxydée en acide lactique ou en alanine qui sont excrétés, ou en aspartate introduit dans la synthèse du matériel cellulaire. La production d'aspartate et d'alanine donne

lieu au dégagement d'une molécule d'ammoniaque alors que la production d'acide lactique et l'oxydation complète en dégagent deux. L'ammoniaque peut lui-même être intégré dans la masse cellulaire en fournissant un radical aminé.

Ainsi on aura globalement (Glacken, 1987):



Le coefficient de rendement observé, $Y_{\text{Amm}/\text{Gln}} = 0,93$, approche la stoechiométrie des réactions (b) et (d). Il indique de plus qu'une partie de l'ammoniaque produit est introduit dans la masse cellulaire. Un suivi des concentrations d'aspartate et d'alanine dans le milieu pourrait corroborer cette hypothèse.

Le glucose est utilisé via la glycolyse ou la voie des pentoses-phosphates (Reitzer et al., 1979) produisant de l'acide lactique et du CO_2 . Le coefficient de rendement observé, $Y_{\text{Lac}/\text{Glc}} = 1,65$, indique qu'environ 82% du glucose consommé est transformé en acide lactique via la glycolyse.

Les estimés de paramètres cinétiques obtenus

précédemment réduisent le nombre de paramètres du modèle global à évaluer. Disposant d'un estimé pour les $Y'_{X/S}$ et $Y_{P/S}$, les deux expressions cinétiques restant à caractériser sont celles décrivant μ et k_d :

$$\mu = \mu_{\max} \prod_i \frac{S_i}{K_i + S_i} \prod_j \frac{K_{I,j}}{K_{I,j} + S_{I,j}} \quad (27)$$

$$k_d = k_{d,\max} \prod_i \frac{S_i}{K_{D,i} + S_i} \prod_j \frac{K_{D,I,j}}{K_{D,I,j} + S_{I,j}} \quad (28)$$

Si aucun travail préliminaire n'a été effectué afin de réduire le nombre de variables incluses dans ces expressions, il faut estimer cinq paramètres pour deux expressions non linéaires:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{\text{Glc}}{K_{\text{Glc}} + \text{Glc}} \frac{\text{Gln}}{K_{\text{Gln}} + \text{Gln}} \frac{K_{\text{Lac}}}{K_{\text{Lac}} + \text{Lac}} \frac{K_{\text{Amm}}}{K_{\text{Amm}} + \text{Amm}} \quad (57)$$

$$k_d = k_{d,\max} \frac{K_{d,\text{Glc}}}{K_{d,\text{Glc}} + \text{Glc}} \frac{K_{d,\text{Gln}}}{K_{d,\text{Gln}} + \text{Gln}} \frac{\text{Lac}}{K_{d,\text{Lac}} + \text{Lac}} \frac{\text{Amm}}{K_{d,\text{Amm}} + \text{Amm}} \quad (58)$$

Glacken (1987) a cependant montré pour un hybridome souris-souris que μ est principalement fonction des concentrations de sérum, de glutamine et d'ammoniaque. Il n'a pas interprété ses résultats en termes de viabilité et définit

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (59)$$

Bree et al. (1988) ont modélisé le taux de mortalité. Ils retiennent l'expression:

$$k_d = k_{d,max} \frac{K_{d,Gln}}{K_{d,Gln} + Gln} \frac{Lac}{K_{d,Lac} + Lac} \frac{Amm}{K_{d,Amm} + Amm} \quad (60)$$

Les valeurs que ces auteurs ont trouvées aux paramètres des expressions de leur modèle, présenté globalement au tableau 3, sont résumées au tableau 14. On y remarque que les valeurs des $Y_{X/S}$ et $Y_{P/S}$ que nous avons obtenus bien que systématiquement plus faibles, sont d'un ordre de grandeur comparable à celles rapportées. Lorsqu'elles s'appliquent au modèle considéré la valeur de k_{Amc} est similaire. Les techniques d'évaluation ainsi que les conditions opératoires utilisées par ces auteurs diffèrent. Entre autres, Bree et al. ont évalué μ_{max} , m_{Glc} , K_{Glc} , k_{Amm} , K_{Lac} , $Y_{X/Glc}$, $Y_{X/Gln}$, $Y_{Amm/Gln}$ et $Y_{Lac/Glc}$ expérimentalement; $K_{d,Amm}$ et $K_{d,Lac}$ ont été choisis suite à une revue de littérature; $K_{d,Gln}$ et $K_{d,Glc}$ ont été choisis petits et k_d et K_{XI} ont été ajustés sur les données expérimentales. La méthode utilisée pour évaluer les K_i et y_i n'est pas explicitée. Glacken et al. (1988) ont évalué les coefficients de leur modèle à partir de résultats issus de cultures stationnaires inoculées à faible densité avec diverses concentration des composés d'intérêt. Miller et al. (1988) ont estimé les valeurs des paramètres au moyen de cultures en continu.

Tableau 14 Comparaison des coefficients de quelques modèles de croissance

Coefficients	Bree	Dalili	Glacken	Miller	Pépin
μ_{\max} (h^{-1})	0,125	0,92	0,055	0,063	0,049
K_{Glc} (mM)	—	—	—	0,15	—
K_{Gln} (mM)	0,8	—	0,15	0,15	—
K_{Lac} (mM)	8	—	—	140	—
K_{Amm} (mM)	1,05	—	26	20	—
K_{FBS} (%)	—	1,59	1,6	—	—
$k_{d,\max}$ (h^{-1})	0,083	—	—	—	—
$K_{d,Gln}$ (mM)	0,0005	—	—	—	—
$K_{d,Lac}$ (mM)	15	—	—	—	—
$K_{d,Amm}$ (mM)	1,44	—	—	—	—
$Y_{X/Glc}$ (10^8 cellules/mM)	2,9	—	—	—	0,55
m_{Glc} (mMole/ 10^8 cellules*h)	—	—	—	0,12	—
$Y_{X/Gln}$ (10^8 cellules/mM)	9,4	—	—	6,3	2,7
m_{Gln} (mMole/ 10^8 cellules*h)	—	—	—	—	—
$Y_{Lac/Glc}$ (mM/mM)	0,33	—	—	1,6 à 2,12	1,65
$Y_{Amm/Gln}$ (mM/mM)	0,66	—	—	0,42 à 0,66	0,93
q_{Amm} (mMole/ 10^8 cellules*h)	—	—	0,005	—	—
q_{Gln} (mMole/ 10^8 cellules*h)	—	—	0,007	—	—
k_{Amc} (mg/ 10^8 cellules*h)	0,625*	—	0,17	—	0,165
$Y_{Amc/FBS}$ (mg/L*%)	—	4,6	—	—	—
$Y_{Xv/FBS}$ (10^8 cellules/L*%) 0,01	X	0,75	—	—	—
* $q_p = 0,625 \frac{0,01}{0,01 + Gln} \frac{X}{100 + X} \sim 0,16$ à $[Gln]_{\min}$ et X_{\max}					

Il n'est pas souhaitable d'estimer ces coefficients sur la base de données recueillies lors de cultures en cuvée. Il est reconnu que dans ce mode opératoire, le système d'équation à résoudre comporte plusieurs optimum locaux et que μ_{\max} et K_i , tout comme k_d et $K_{d,i}$ sont linéairement dépendant. Ainsi les paramètres estimés suite à des expériences apparemment effectuées dans des conditions similaires diffèrent beaucoup (Homberg, 1982). L'apparente acuité du modèle obtenu est trompeuse puisque les intervalles de confiance des paramètres estimés sont tellement grands que la valeur numérique qui leur est allouée n'a pas de signification physique (Nihtila et Virkkunen, 1977). Aussi n'avons nous pas tenté de déterminer les K_i et $K_{d,i}$. Les valeurs de μ et k_d ont été assimilées à $\bar{\mu}$ et \bar{k}_d .

Les taux de croissance spécifiques moyens définis par l'équation

$$\bar{\mu}_v = \frac{1}{t_2 - t_1} \int_{t_1}^{t_2} \mu_v dt = \frac{\ln X_{v2} - \ln X_{v1}}{t_2 - t_1} = \frac{\Delta \ln X_v}{\Delta t} \quad (42)$$

ont été évalué et sont présentés plus haut au tableau 12. Un temps de latence a été estimé à 12 heures sur la base de représentations de $\ln X_v$ en fonction du temps. Les taux de mortalité observés lorsque $\mu = 0$ et que

$$\frac{dX_v}{dt} = -k_d X_v \quad (38)$$

varient de 0,01 à 0,08 dans les cultures en bioréacteur analysées ici. Ces fluctuations sont en grande partie attribuables aux variations dans le compte cellulaire selon l'expérimentateur.

IV.6.3 Modèle

Les observations et évaluations faites plus haut peuvent être résumées comme suit

- la croissance est nulle de 0 à 8 heures après que la glutamine ait été entièrement utilisée;
- la production d'anticorps cesse de 0 à 20 heures après que la glutamine ait été entièrement utilisée;
- pour les duplicata que constituent les cultures DMEM 1%-A et -B, en l'absence de contrôle d'oxygène et de pH, les valeurs des coefficients des expressions cinétiques ont été évaluées être

$$t_L = 12 \text{ h}$$

$$\mu_v = 0,049 \text{ h}^{-1}$$

$$k_d \sim 0,05 \text{ h}^{-1}$$

$$Y_{X/Gln} = 2,7 \times 10^8 \text{ cellules viables/mmole}$$

$$Y_{X/Glc} = 0,55 \times 10^8 \text{ cellules viables/mmole}$$

$$Y_{Amm/Gln} = 0,93 \text{ mmole/mmole}$$

$$Y_{\text{Lac/Glc}} = 1,65 \text{ mmole/mmole}$$

Un modèle de croissance simplifié où la principale hypothèse est que μ varie peu avec les S_i et P_i est le suivant:

lorsque $[\text{Gln}] > 0$

$$\mu_v = \bar{\mu}_v (1 - \exp(-t/t_L)) \quad (61)$$

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu_v X_v \quad (41)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_v X_v \quad (40)$$

$$\frac{d\text{Glc}}{dt} = \frac{\mu}{Y_{X/\text{Glc}}} X_v \quad (62)$$

$$\frac{d\text{Gln}}{dt} = \frac{\mu}{Y_{X/\text{Gln}}} X_v \quad (63)$$

$$\frac{d\text{Lac}}{dt} = Y_{\text{Lac/Glc}} \frac{d\text{Glc}}{dt} \quad (64)$$

$$\frac{d\text{Amm}}{dt} = Y_{\text{Amm/Gln}} \frac{d\text{Gln}}{dt} \quad (65)$$

lorsque $[\text{Gln}] = 0$

$$\frac{dX_v}{dt} = -k_d X_v \quad (66)$$

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad (67)$$

$$\frac{dGlc}{dt} = \frac{dLac}{dt} = \frac{dGln}{dt} = \frac{dAmm}{dt} = 0 \quad (68)$$

lorsque $t_0 \leq t \leq \{t([Gln] = 0) + 20 \text{ heures}\}$

$$\frac{d_{Amc}}{dt} = k_{Amc} X_v \quad (45)$$

lorsque $t > \{t([Gln] = 0) + 20 \text{ heures}\}$

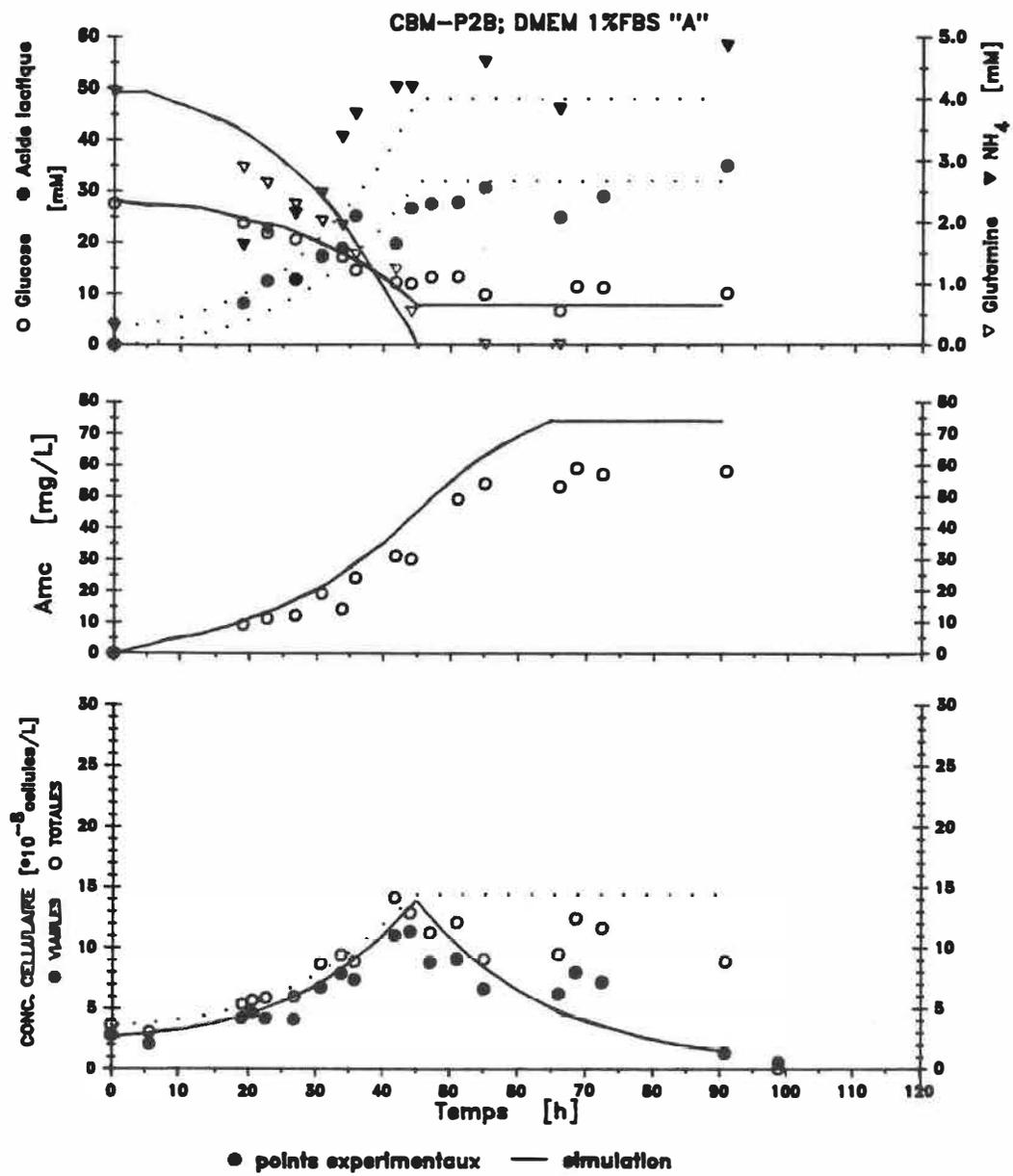
$$\frac{d_{Amc}}{dt} = 0 \quad (69)$$

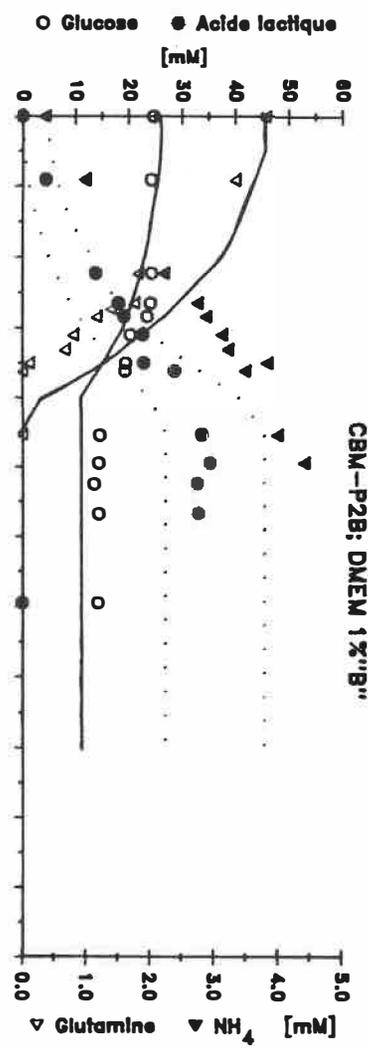
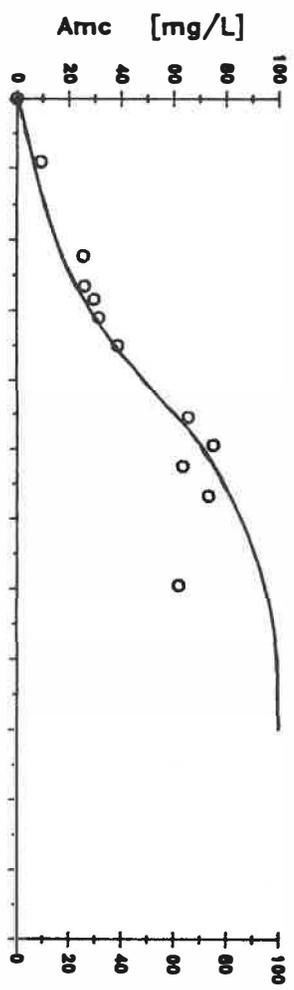
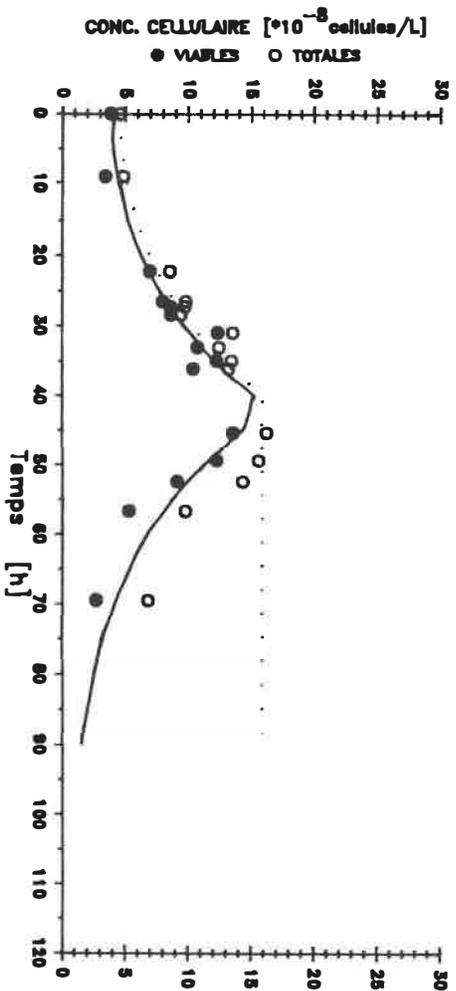
La figure 29 reproduit les courbes expérimentales DMEM 1%-A et -B présentées aux figures 17 et 18 augmentées du résultat de la solution du système d'équations décrit plus haut par la méthode de Runge-Kutta (formule de Kutta). On y constate que le modèle permet

- de représenter adéquatement la croissance;
- de prévoir la durée d'une culture en cuvée pour une lignée cellulaire dans des conditions définies;
- d'apprécier la productivité d'anticorps (mg/L/h).

Les paramètres critiques sont sans contredit $Y_{X/Gln}$, μ_v , t_L et k_{Amc} puisqu'il n'a pas été possible d'identifier clairement les niveaux de toxicité et les effets inhibiteurs de l'acide lactique et de l'ammoniaque. Pour circonvenir cette limitation, des observations répétées pour diverses conditions initiales seraient souhaitables. La détermination des niveaux de toxicité de l'acide

Figure 29 Courbes de croissance simulées pour les cultures en bioréacteur DMEM 1%-A et 1%-B





lactique et de l'ammoniaque permettrait de cerner plus exactement les conditions dans lesquelles $\mu \sim 0$. Une telle série d'expérience permettrait de plus de s'assurer que $\mu \sim \bar{\mu}_v$ représente toujours bien la phase de croissance et de vérifier dans quelle mesure les taux de rendement sont reliés aux concentrations relatives de glucose et de glutamine dans le milieu. Cette vérification mettra en évidence la formulation la plus adéquate pour la culture en cuvée de la lignée cellulaire étudiée.

Dans la perspective d'un système de culture flexible permettant la mise en production rapide d'un anticorps donné parmi la collection disponible les cultures en cuvée et en mode "fed batch" sont les plus simples à implanter et à opérer. En cuvée, l'opération du bioréacteur devra être effectuée dans un milieu de culture et dans un environnement qui optimisent la production. A cet égard, on ne doit pas négliger le fait que la concentration d'oxygène dissous et le pH influencent le métabolisme cellulaire et, conséquemment, les taux de rendement. La concentration d'oxygène dissous devrait être optimisée après que la formulation ait été arrêtée en termes de concentration de glucose et de glutamine. La qualité de l'inoculum en termes de viabilité, d'âge, de résistance au stress mécanique a aussi des conséquences sur le déroule-

ment des cultures. Des protocoles stricts de maintenance des cellules et d'inoculation devraient être observés.

Chapitre V CONCLUSIONS

Les objectifs à court terme les plus importants lors de l'élaboration du projet de recherche dans lequel s'inscrit ce mémoire de maîtrise concernaient

- l'évaluation des besoins nutritionnels de la lignée CBM-P2
- le choix d'un milieu de base
- la formulation d'un milieu de culture chimiquement défini
- l'évaluation de la capacité de la lignée à être cultivée en bioréacteur
- la détermination de paramètres cinétiques de croissance et de production des cellules.

Les résultats rapportés ici auront permis de cerner la majorité d'entre eux.

Les milieux de base DMEM et RPMI 1640 ont été testés pour leur capacité à supporter la croissance et la production de la lignée CBM-P2. Les concentrations de glutamine sont de 4 mM pour le DMEM et de 1,8 mM pour le RPMI 1640. Pour les deux milieux, une concentration de glucose de 25 mM a été utilisée, ce qui constitue en fait une modification du ratio glucose/glutamine de la formulation originale du RPMI. Dans les cultures stationnaires

comme dans les cultures en flacon agité et en bioréacteur, le DMEM s'est avéré être un milieu de base plus adéquat que le RPMI pour cette lignée cellulaire. Ainsi la concentration maximale de cellules viables atteinte, le taux spécifique moyen de croissance et la concentration finale d'anticorps monoclonaux ont toujours été à l'avantage du DMEM. Comme la glutamine s'avère être un substrat limitant, il est possible que les faibles rendements observés soient attribuables à cette limitation. On peut aussi supposer qu'au-delà de la limitation stoechiométrique la concentration initiale de glutamine ou le ratio glucose/glutamine dans le milieu influence le taux spécifique de croissance. L'étude comparative menée par ChemBioMed entre les milieux DMEM et McCoy's 5A a aussi conclu en la supériorité du DMEM dans ce cas. Les quelques cultures effectuées dans l'IMDM n'ont pas permis d'observer un avantage à son utilisation.

La lignée cellulaire CBM-P2-A a été sevrée rapidement d'une concentration initiale de 10% v/v de sérum de foetus bovin à une concentration de 3%. Une relation entre le taux spécifique moyen de croissance et la concentration de sérum a été observée. Le taux de moitié est de 2,5% v/v FBS pour les cultures effectuées dans le DMEM. La lignée cellulaire CBM-P2-B a été sevrée

avec succès jusqu'à une concentration de 0,5% v/v FBS. Leur capacité d'adaptation a permis aux cellules ainsi sevrées d'atteindre après plusieurs passages des taux de croissance spécifiques comparables aux cultures effectuées à forte concentration de sérum encourageant la poursuite de travaux visant la mise au point d'un milieu sans sérum.

Les cellules ont été cultivées dans le bioréacteur Celligen_{md} de New-Brunswick Scientific Co. La concentration de cellules viables et totales, les concentrations de glucose, de glutamine, d'acide lactique et d'ammoniaque, l'oxygène dissous, le pH et la production d'anticorps monoclonaux ont été mesurés à divers moments de la culture. Ces cultures effectuées avec deux lignées cellulaires, CBM-P2-A et CBM-P2-B, ont permis de conclure que dans les conditions de culture

- la mortalité est nulle au cours de la période de croissance exponentielle et que μ est assimilable à

$$\frac{1}{X_v} \frac{dX_v}{dt}$$

ce qui implique que

$$\mu \sim \bar{\mu}_v = \frac{\Delta \ln X_v}{\Delta t} \quad (42)$$

- que pour les cultures dans le RPMI ([Gln] = 1,8 mM) comme dans le DMEM ([Gln] = 4,0 mM), la croissance

- cesse lorsque la glutamine est entièrement consommée;
- que cette limitation apparente de la croissance par la glutamine masque les effets inhibiteurs et/ou toxiques attendus de l'acide lactique et de l'ammoniaque;
 - que la concentration maximale d'anticorps monoclonaux produits est atteinte au cours de la vingtaine d'heures qui suit le moment où la glutamine est entièrement consommée;
 - que la production d'anticorps monoclonaux peut être bien représentée par un modèle de production non associée à la croissance

Pour la lignée cellulaire d'intérêt CBM-P2-B, les cultures en bioréacteur ont été effectuées dans le DMEM et dans l'IMDM supplémentés de 1% de sérum sans contrôle de DO et de pH. Les taux de rendement apparents ont été évalués. Ces équations ainsi que les observations faites au cours de toutes les cultures en cuvée ont permis de définir un modèle simplifié:

$$\mu_v = \bar{\mu}_v (1 - \exp(-t/t_L)) \quad (61)$$

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu_v X_v \quad (41)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_v X_v \quad (40)$$

$$\frac{dGlc}{dt} = \frac{\mu}{Y_{X/Glc}} X_v \quad (62)$$

$$\frac{dGln}{dt} = \frac{\mu}{Y_{X/Gln}} X_v \quad (63)$$

$$\frac{dLac}{dt} = Y_{Lac/Glc} \frac{dGlc}{dt} \quad (64)$$

$$\frac{dAmm}{dt} = Y_{Amm/Gln} \frac{dGln}{dt} \quad (65)$$

lorsque $[Gln] = 0$

$$\frac{dX_v}{dt} = -k_d X_v \quad (66)$$

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad (67)$$

$$\frac{dGlc}{dt} = \frac{dLac}{dt} = \frac{dGln}{dt} = \frac{dAmm}{dt} = 0 \quad (68)$$

lorsque $t_0 < t < \{t([Gln] = 0) + 20 \text{ heures}\}$

$$\frac{d_{Amc}}{dt} = k_{Amc} X_v \quad (45)$$

lorsque $t > \{t([Gln] = 0) + 20 \text{ heures}\}$

$$\frac{d_{Amc}}{dt} = 0 \quad (69)$$

avec

$$t_L = 12 \text{ h}$$

$$\bar{\mu} = 0,049 \text{ h}^{-1}$$

$$k_d \sim 0,05 \text{ h}^{-1}$$

$$Y_{X/Gln} = 2,7 \times 10^8 \text{ cellules viables/mmole}$$

$$Y_{X/Glc} = 0,55 \times 10^8 \text{ cellules viables/mmole}$$

$$Y_{Amm/Gln} = 0,93 \text{ mmole/mmole}$$

$$Y_{Lac/Glc} = 1,65 \text{ mmole/mmole}$$

La solution de ces équations dynamiques et des expressions cinétiques qui y sont associées représente adéquatement la progression des cultures.

BIBLIOGRAPHIE

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. et J. D. Watson, "Molecular Biology of the Cell", 1ière édition. Garland Publishing Inc., New-York (1983)

Altshuler, G.L. et G. Belfort, "Continuous Hybridoma Growth of Monoclonal Antibody Production in Hollow Fibre Reactors-Separators". Biotech. Bioeng., 28, pp. 646-658 (1986)

André, G; Johnson, M; Archambault, J. et C. Chavarie, "Oxygen Transfert Rates in a Mammalian Cell Culture Bioreactor Equipped with a Cell-Lift Impeller". Biotech. Bioeng., à paraître.

Bailey, J. E. et D. F. Ollis, "Biochemical Engineering Fundamentals", 2ième édition. McGraw-Hill Book Company, New-York (1986)

Baker, P et al., "A Serum Independent Medium Effective in All Aspects of Hybridoma Technology and Immunological Applications". Develop. Biol. Standard, 60, pp: 63-72 (1985)

Balin, A., D.B. Goodman, H. Rasmussen et V. Cristofalo, "The Effect of Oxygen Tension on the Growth and Metabolism of WI-38 Cells". J. Cell Phys., 89, pp: 235-250 (1976)

Baltzis, B.C. et A.G. Fredrickson, "Limitation of Growth Rate by Two Complementary Nutrients: Some Elementary but Neglected Considerations". Biotech. Bioeng., 31, pp: 75-86 (1988)

Barnes, D. et G. Sato, "Serum-Free Cell Culture: a Unifying Approach". Cell, 22, pp. 639-645 (1980a)

Barnes, D. et G. Sato, "Methods for Growth of Cultured in Serum Free Medium". Anal. Biochem., 102, pp. 255-270 (1980b)

Batt, B.C. et D.S. Compala, "Structured Kinetic Modelling of Hybridoma Growth and Monoclonal Antibody Production in Continuous Suspension Cultures. Paper presented at the ACS National Meeting, New Orleans, (1987)

Birch, J.R. et D.J. Edwards, "The Effect on pH on the Growth and Carbohydrate Metabolism of a Lymphoblastoid Cell Line". Dev. Biol. Standard, 46, pp. 58-63 (1980)

Birch, J.R., P.W. Thompson, K. Lambert et R. Boraston, "The Large Scale Cultivation of Hybridoma Cells Producing Monoclonal Antibodies". ACS National Meeting, Philadelphia (1984)

Blakebrough, N., éditeur, "Biochemecial et Biological Engineering Science", vol. 1. Academic Press, New-York (1967)

Boyle, W. C. et P.M. Berthouex, "Biological Wastewater Treatment Model Building Fits and Misfits". Biotechnol. Bioeng., 16, pp. 1139-1159 (1974)

Bree, M. A. et P. Dhurjati, "Kinetic Modelling of Hybridoma Cell Growth and Immunoglobulin Production in a Large-Scale Suspension Culture". Biotechnol. Bioeng., 32, pp. 1067-72 (1988)

Brown, B.L., "Reducing Costs Upfront: Two Methods for Adapting Hybridoma Cells to an Inexpensive, Chemically Defined, Serum-Free Medium" in: Commercial Production of Monoclonal Antibodies - A Guide for Scale-Up. Marcel Dekker, N.-Y., pp. 35-48 (1987)

Dalili, M. et D. Ollis, "Transient Kinetics of Hybridoma

Growth and Monoclonal Antibody Production in Serum-Limited Cultures". Amer. Chem. Soc., 194th Meeting (1988)

Eagle, H., "Nutriton Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture". Science, 122, no 3168, pp. 17-20 (1955)

Frame, K. et W.S. Hu, "Oxygen Uptake of Mammalian Cells in Microcarrier Culture - Response to Changes in Glucose Concentration". Biotech. Letters., 7, (3), pp. 147-152 (1985)

Freshney, R. Ian, "Culture of Animal Cells: A Manuel of Basic Technique". Alan R. Liss Inc., New-York (1986)

Freshney, R. Ian, éditeur, "Animal Cell Culture: a Practical Approach". IRL Press, Oxford (1986)

Glacken, M. W., "Developpement of Mathematical Description of Mammalian Cell Culture Kinetics for the Optimisation of Fed-batch Bioreactor". Thèse de doctorat, Massachusetts Institute of Technology (1987)

Glacken, M. W., "Catabolic Control of Mammalian Cell Culture". Bio/Technology, 6, pp. 1041-1050 (1988)

Glacken, M.W., R.J. Fleischaker and A.J. Sinskey, "Reduction of Waste Product Excretion via Nutrient Control: Possible Strategies for Maximizing Product and Cell Yields in Serum in Cultures of Mammalian Cells". *Biotech. Bioeng.*, 28, pp. 1376-1389 (1986).

Griffiths, J.B., "Serum and Growth Factors in Cell Culture Media - An Introductory Review". *Dev. Biol. Standard.*, 66, pp. 155-160 (1987)

Homberg, A., "On the Practical Identifiability of Microbial Growth Models Incorporating Michaelis-Memtem Type Non-Linearities". *Math. Biosciences*, 62, pp. 23-43 (1982)

Hu, W.S., T.C. Dodge, K.K. Frame et V.B. Himes, "Effect of Glucose on the Cultivation of Mammalian Cells". *Dev. Biol. Standard.*, 66, pp. 279-290 (1987)

Hyclone Publications, "Modern 'Magic Bullets' Made Possible by Monoclonal Antibodies". *Art to Science*, 5, 2 (1986)

Immamura, T., Crespi, C. L., Thilly, W. G. et H. Brunenbrader, "Fructose as a Carbohydrate Source Yields

Stable pH and Redox Parameters in Microcarrier Cell Culture". *Anal. Biochem.*, 124, pp. 353-358 (1982)

Johnson, D. et P. Berthouex, "Efficient Biokinetic Experimental Design". *Biotech. Bioeng.*, 17, pp. 581-583 (1985)

Kovar, J. et F. Frantizek, "Serum-Free Medium for Hybridoma and Parental Myeloma Cell Cultivation". *Methods Enzymol.*; 121; pp. 277-292 (1985)

Kohler, G. et C. Milstein, "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity". *Nature*, 256, pp. 495 (1975)

Lavery, M., M.J. Kearns, D.G. Price, A.N. Emery, R. Jefferies et A.W. Nienow, "Physical Conditions During Batch Culture of Hybridomas in Laboratory Scale Stirred Tank Reactors". *Dev. Biol. Standard.*, 60, pp. 199-206 (1985)

Linardos, T., Kalagorakis, N., Behie, L. A. et L. R. Lamontagne, "Kinetic Modelling of Hybridoma Cell Cultures Producing Monoclonal Antibodies". *Can. Chem. Eng. Soc. Meeting* (1988)

Low, K. et C. Harbour, "Growth Kinetics of Hybridoma Cells: (2) the Effects of Varying Energy Source Concentrations". Dev. Biol. Standard., 60, pp. 73-79 (1985)

Luan, Y.T., Mutharasan, R. et W. E. Magee, "Effect of Various Glucose/Glutamine Ratios on Hybridoma Growth, Viability and Monoclonal Antibody Formation". Biotech. Let., 9, 8, pp. 535-538 (1987)

Merten, D.W., T. Reiter, G. Himmler, G. Schreirer et H. Katinger, "Production Kinetics of Monoclonal Antibodies". Dev. Biol. Standard., 60, pp. 219-227 (1985)

Miller, W.M., C.R. Wilke et H.W. Blanch, "Hybridoma Response to Nutrient Pulse and Step Changes in Continuous Culture - Implications for Metabolic Regulation". Presented at the AIChE Meeting, New York, (1987a)

Miller, W.M., C.R. Wilke et H.W. Blanch, "Effects of Dissolved Oxygen Concentration on Hybridoma Growth and Metabolism in Continuous Culture". J. Cell Phys., 132, pp. 536-539, (1987b)

Moser, A., "Kinetics of Batch Fermentations" in Biotechnology, vol. 2: Fundamentals of Biochemical Engineering, H. Brauer vol. ed., VCH Publishers, Weinheim, Federal Republic of Germany (1985)

Nihtila, M. et J. Virkkunen; "Practical Identifiability of Growth and Substrate Consumption Models". Biotech. Bioeng., 19, pp. 1831-1850 (1977)

Reading, C.L., "Theory and Methods for Immunization in Culture and Monoclonal Antibody Production". J. Immunol. Meth., 53, pp. 261-291 (1982)

Reitzer, L.J., Wice, B. M. et D. Kennel, "Evidence that Glutamine, Not Sugar Is the Major Energy Source for Cultured HeLa Cells". J. Biol. Chem. 254, pp. 2669-2677 (1979)

Renard, J. M.; Spagnoli, R.; Mazier, C.; Salles, M. F. et E. Mandine, "Evidence that Monoclonal Antibody Production Kinetics is Related to the Integral of the Viable Cells Curve in Batch Systems". Biotech. Let., 10, no 2, pp. 91-96 (1988)

Reuveny, S., D. Velez, F. Riske, J.D. Macmillan et L.

Miller, "Production of Monoclonal Antibodies in Culture".
Dev. Biol. Standard., 60, pp. 185-197 (1985)

Reuveny, S., Velez, D., Macmillan, J.D. et L. Miller,
"Factors Affecting Cell Growth and Monoclonal Antibody
production in Stirred Reactors". J. Imm. Methods, 86, pp.
53-59 (1986)

Rothblat, G. H. et V. J. Christofalo, éditeurs, "Growth,
Nutrition and Metabolism of Cells in Culture", vol. I.
Academic Press, New-York (1972)

Thilly, W. G., éditeur, "Mammalian Cell Technology".
Butterworths, Boston (1985)

Tritsch, G. L. et G. E. Moore, "Spontaneous Decomposition
of Glutamine in Cell Culture Media". Exp. Cell. Research,
28, pp. 360-364 (1962).

Annexe A COURBES ÉVOLUTIVES DES CULTURES EN BIORÉACTEUR

Cette annexe regroupe les figures représentant les courbes d'évolution des variables mesurées lors des cultures dans un Celligen_{md} de 1,5L de New-Brunswick Scientific Co. Les concentrations de glucose [mM], de glutamine [mM], d'acide lactique [mM], d'ammoniaque [mM], d'oxygène dissous [% de saturation par rapport à l'air dans l'eau à 37°C], de pH, d'anticorps monoclonaux [g/L] et de cellules viables et totales [$\times 10^8$ cellules viables/L] y sont reproduites en fonction du temps. Les mêmes échelles ont été utilisées pour tous les graphiques. Les cultures ainsi représentées sont les suivantes:

- pour la lignée CBM-P2-A
 - RPMI 1640, 3% FBS, sans contrôle de pH et de DO
 - RPMI 1640, 5% FBS, sans contrôle de pH et de DO
 - RPMI 1640, 10% FBS, sans contrôle de pH et de DO
 - DMEM, 3% FBS, sans contrôle de pH et de DO
 - DMEM, 10% FBS, sans contrôle de pH et de DO
 - DMEM, 10% FBS, avec contrôle de pH et de DO
- pour la lignée CBM-P2-B
 - RPMI 1640, 1% FBS, sans contrôle de pH et de DO
 - DMEM, 1% FBS "A", sans contrôle de pH et de DO
 - DMEM, 1% FBS "B", sans contrôle de pH et de DO
 - DMEM, 1% FBS "C", sans contrôle de pH et de DO,

avec agitateur modifié et aération de surface
- IMDM, 1% FBS, sans contrôle de pH et de DO, avec
agitateur modifié et aération de surface

Les conditions expérimentales des cultures notées DMEM 1%A et DMEM 1%B sont identiques à l'exception de l'inoculum utilisé. Les cultures DMEM 1%C et IMDM 1% se distinguent des autres par l'utilisation d'un agitateur à hélice double, d'une turbine de type Rushton à l'interface gaz-liquide et une aération de surface. Pour toutes les autres conditions, l'agitateur et le système d'aération du Celligen ont été utilisées.

Les conditions expérimentales sont résumées au tableau 4 déjà introduit dans le texte. Les résultats expérimentaux ayant servi à bâtir ces courbes sont présentées à l'annexe B.

Figure A1 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le RPMI 1640 + 3%FBS

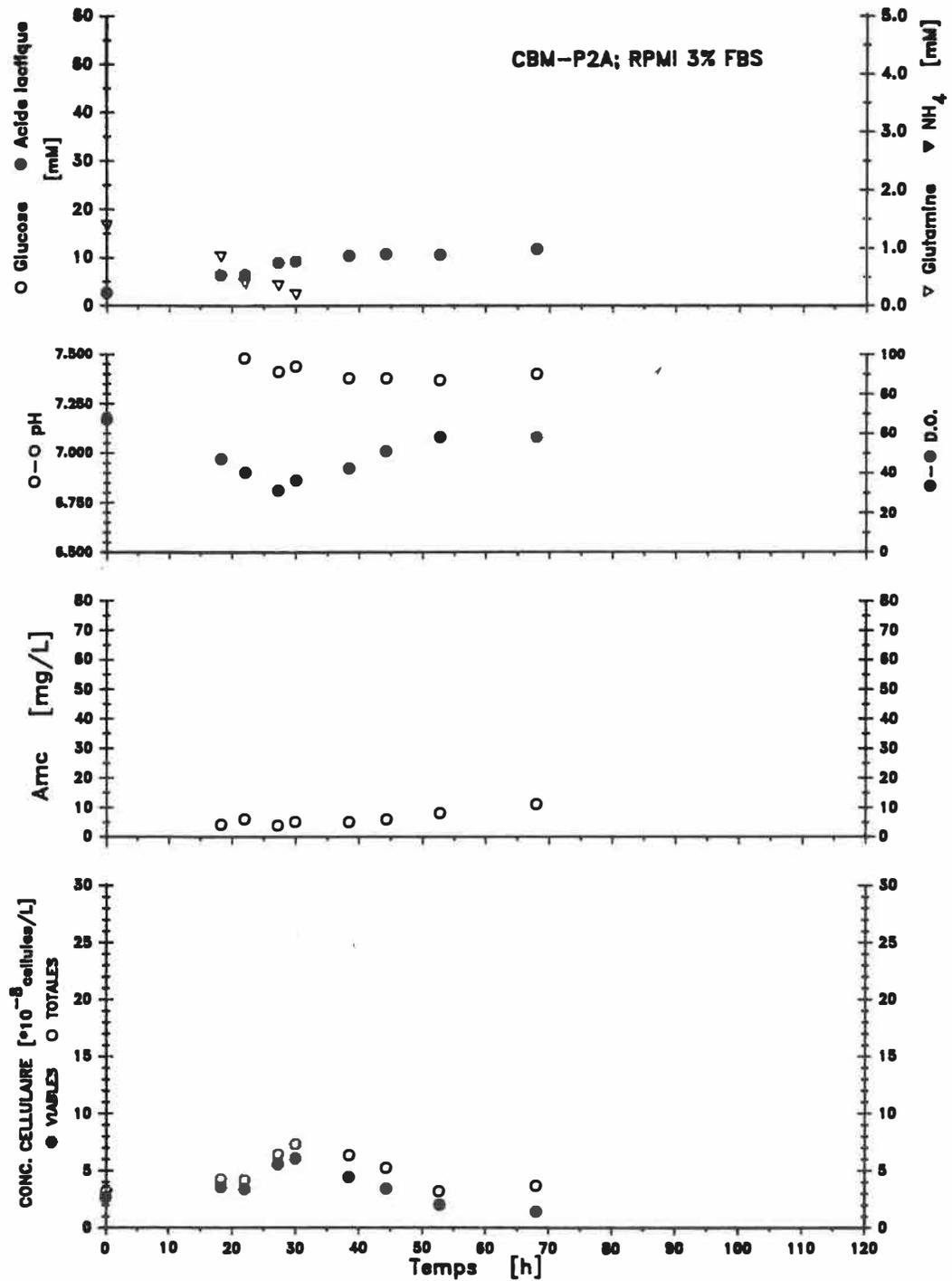


Figure A2 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le RPMI 1640 + 5%FBS

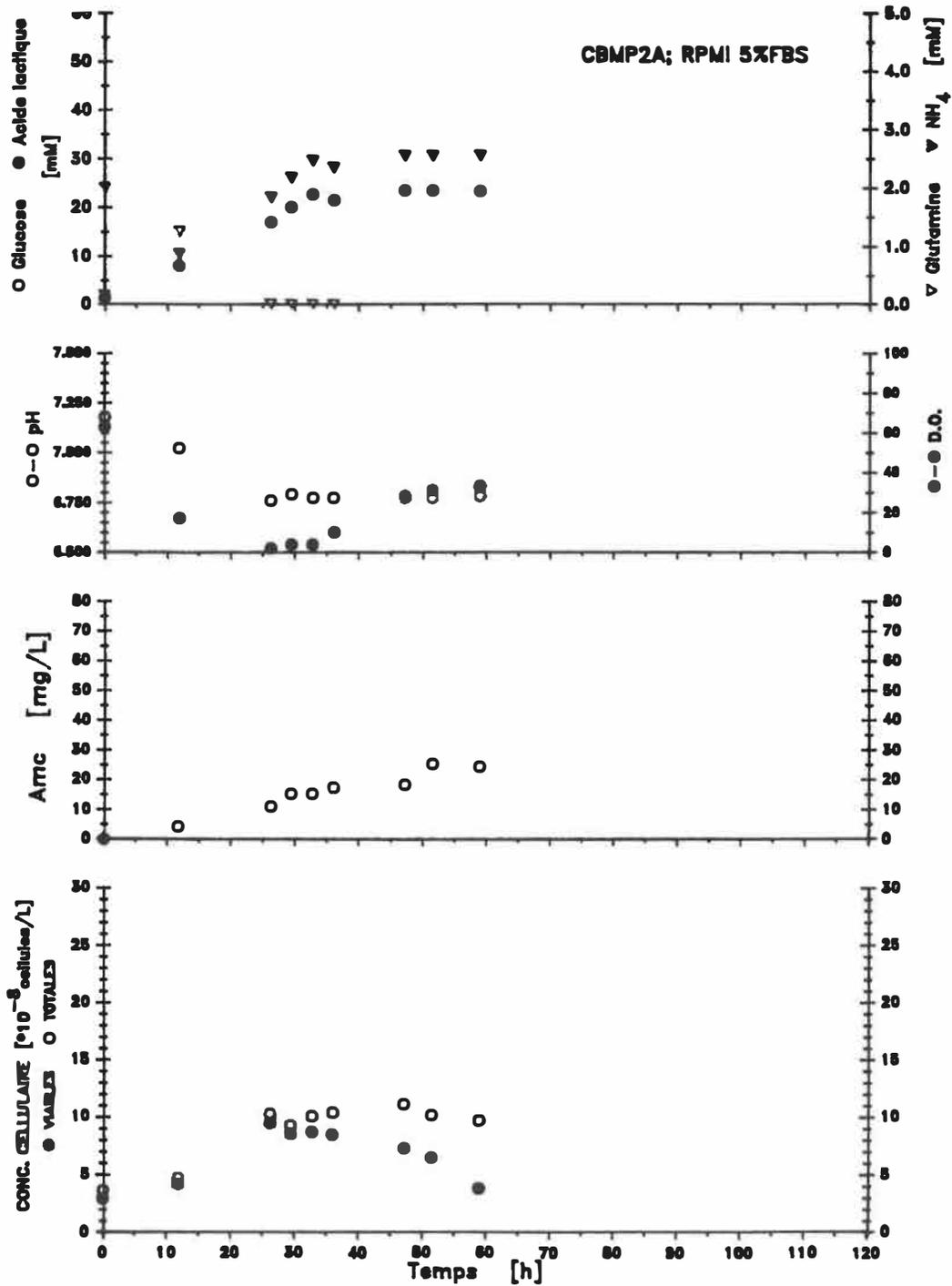


Figure A3 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le RPMI 1640 + 10%FBS

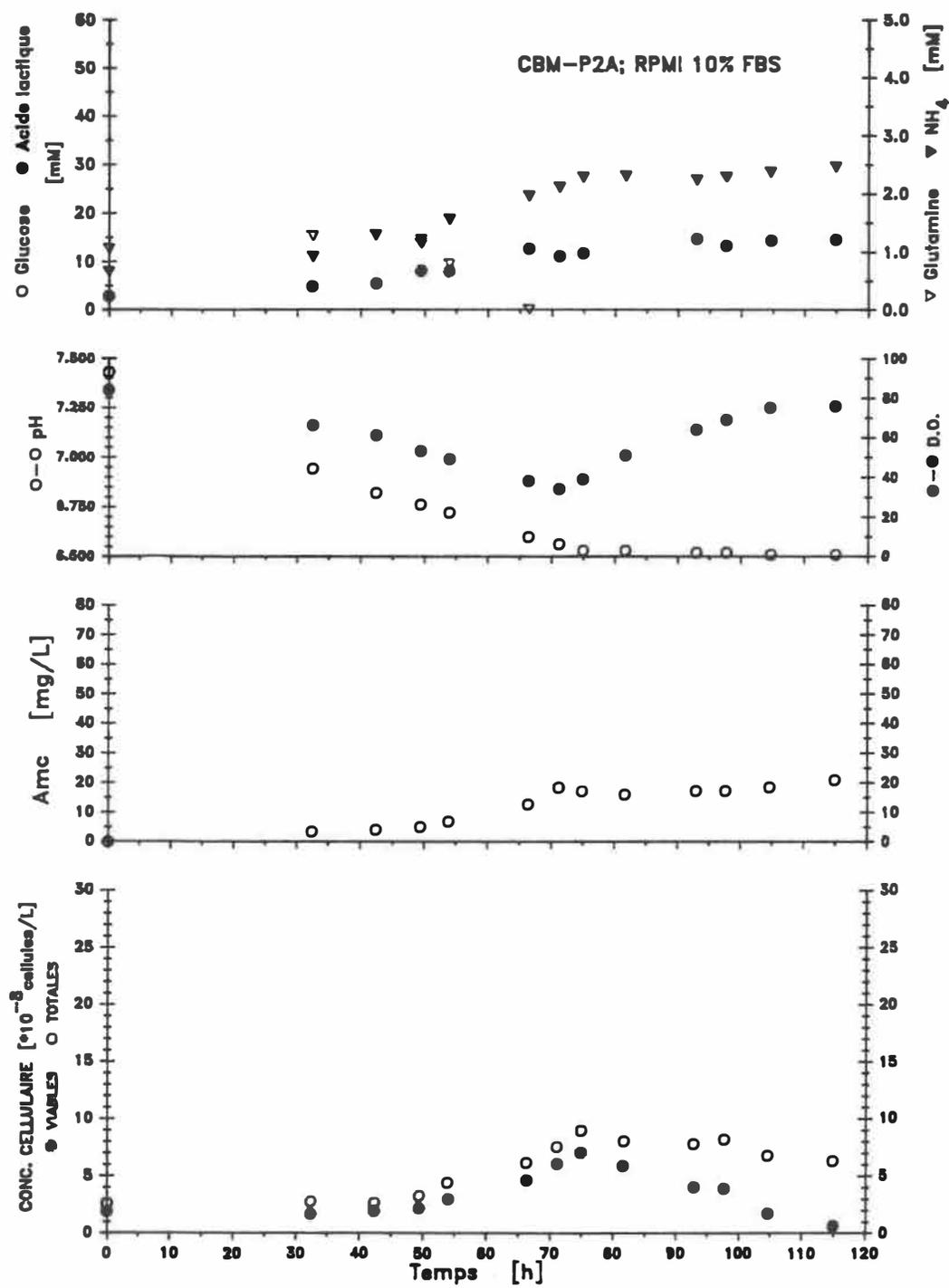


Figure A4 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le DMEM + 3%FBS

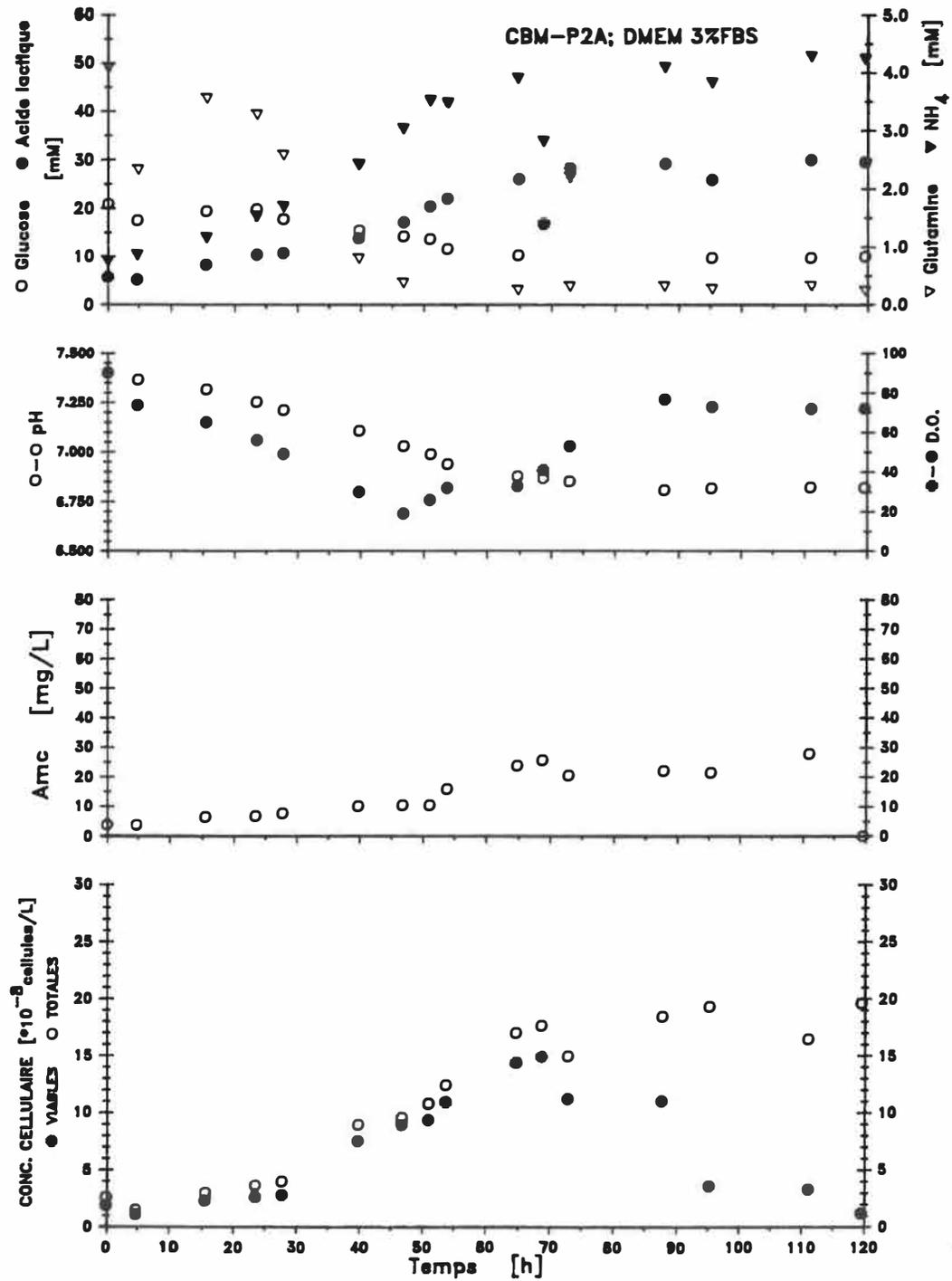


Figure A5 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CEM-P2-A, dans le Celligen, dans le DMEM + 10%FBS

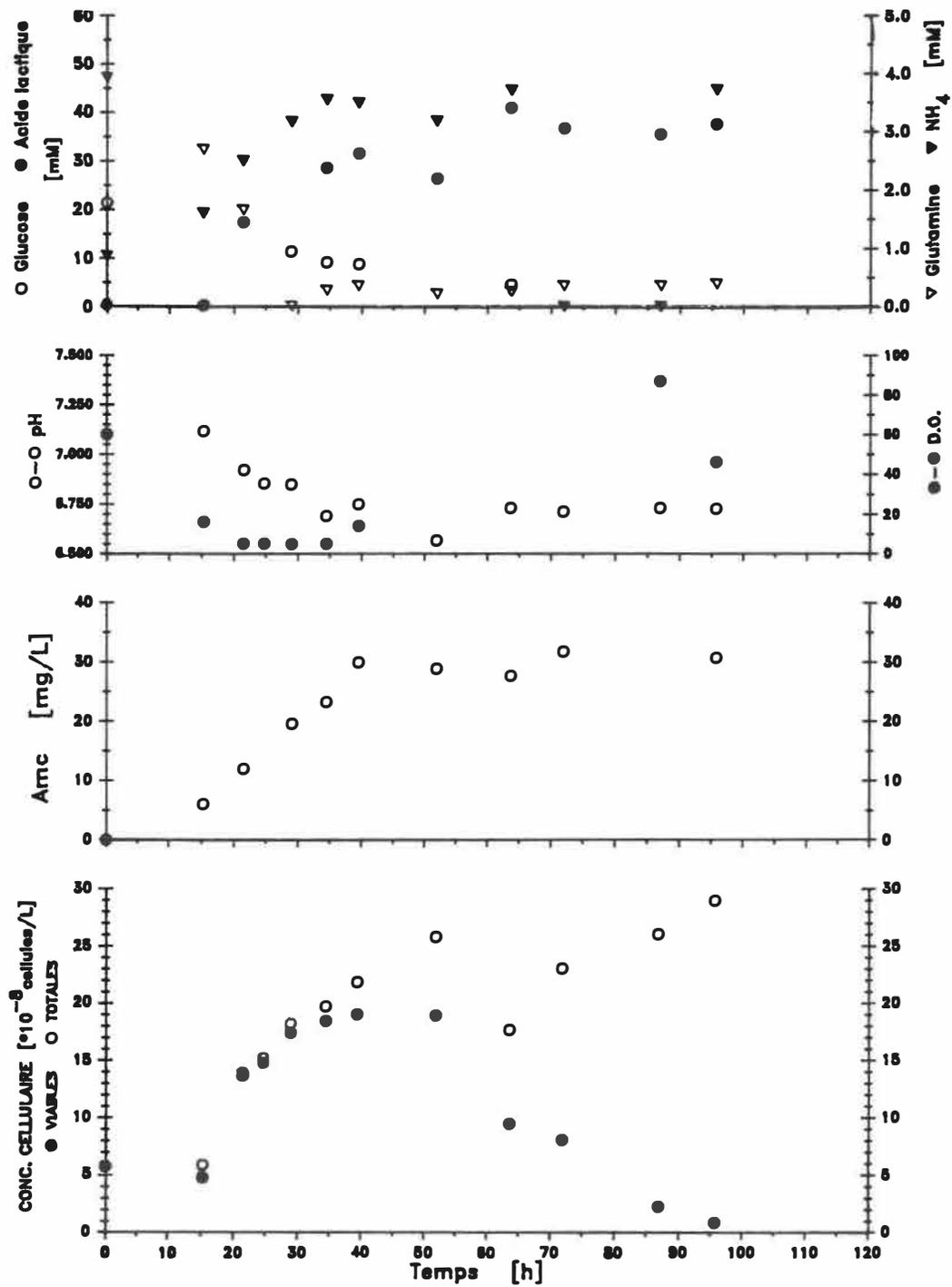


Figure A6 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le DMEM + 10%FBS, avec contrôle de pH à 7,2 et de la DO à 60%

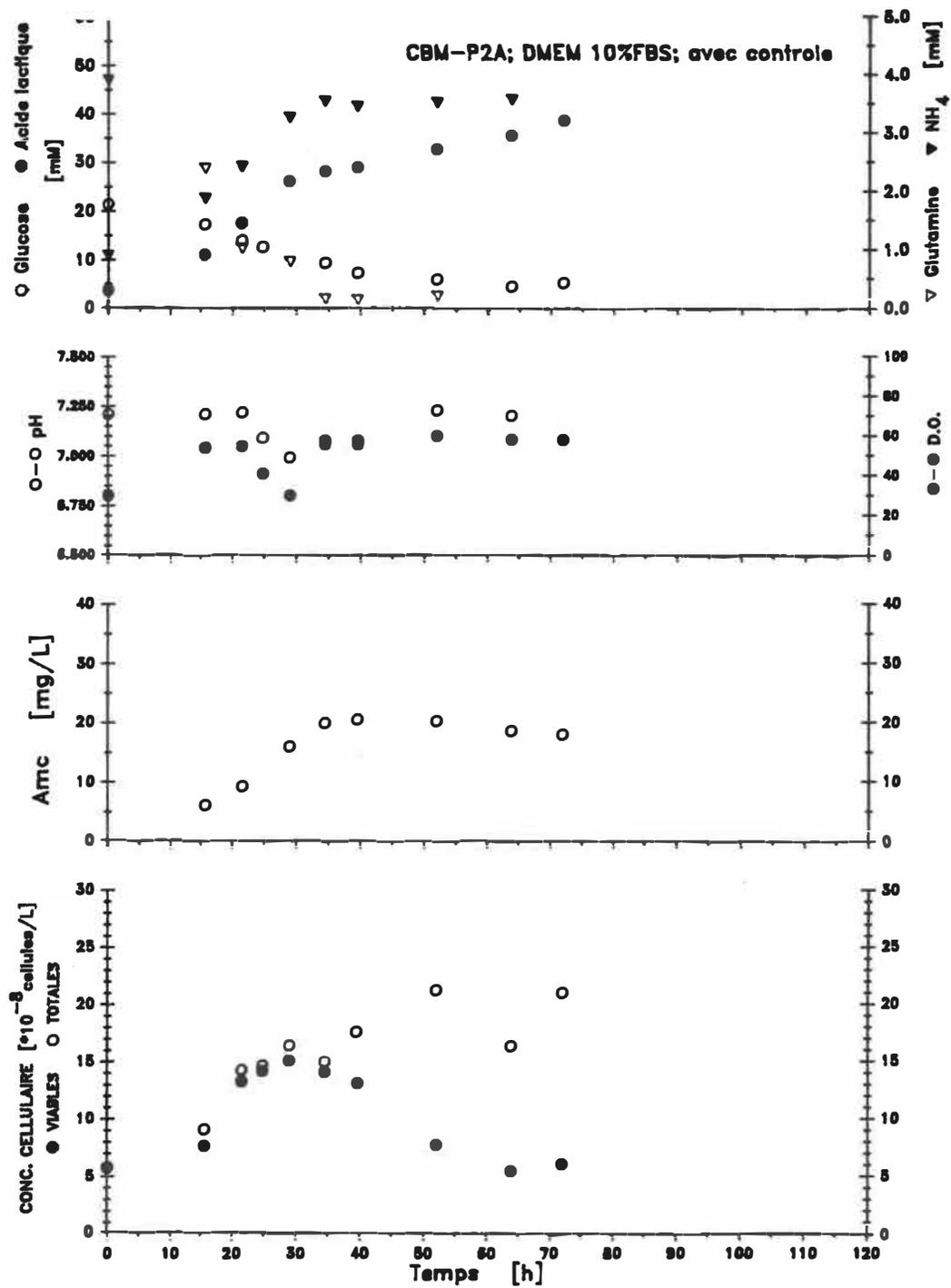


Figure A7 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-B, dans le Celligen, dans le RPMI 1640 + 1%FBS

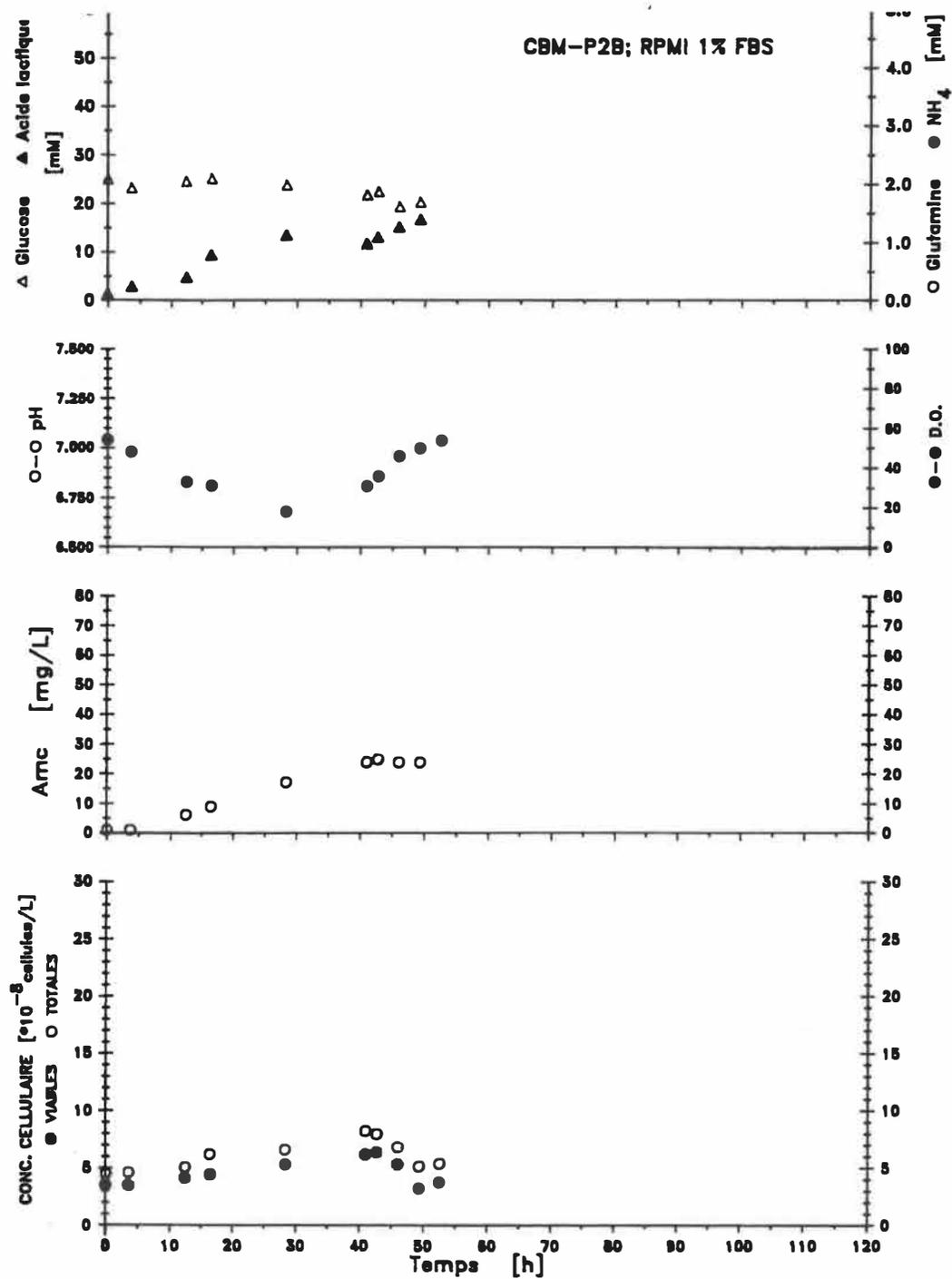


Figure A8 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée ~~CBM-P2-B~~ dans le Celligen, dans le DMEM + 1%FBS (expérience A)

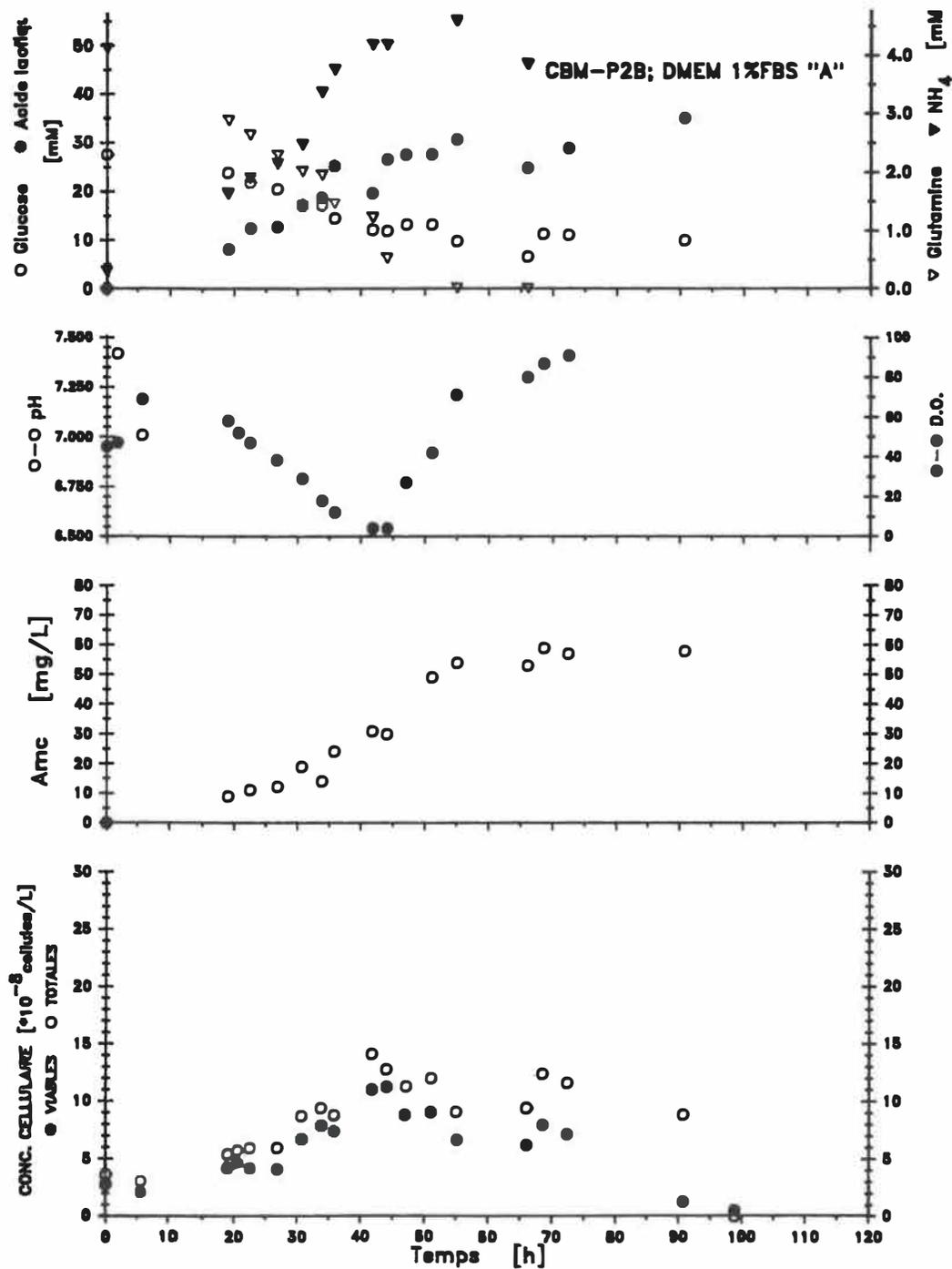


Figure A9 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-B, dans le Celligen, dans le DMEM + 1%FBS (expérience B)

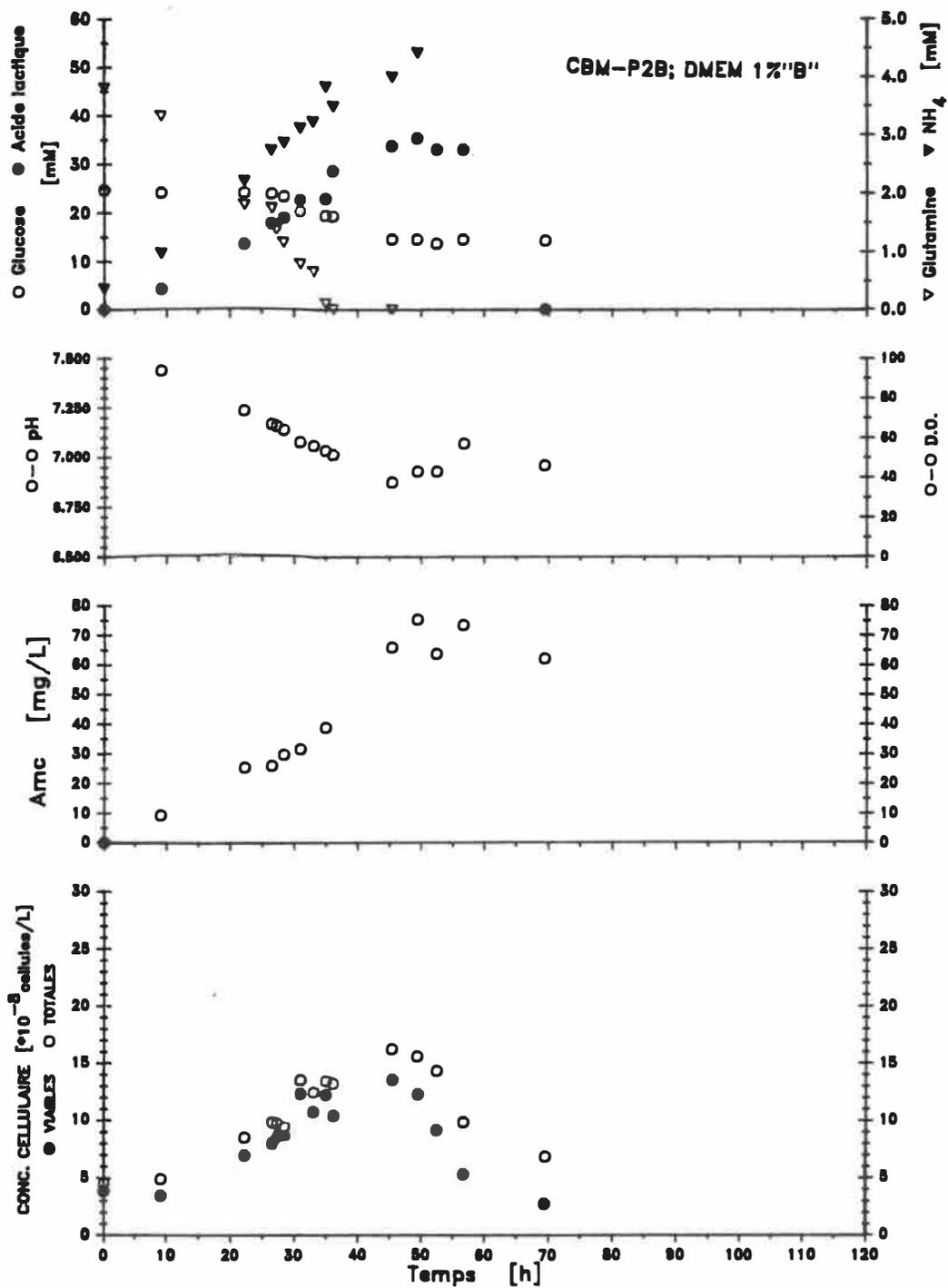


Figure A10 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-B, dans le Celligen, dans le DMEM + 1%FBS (expérience C), avec hélices et turbine

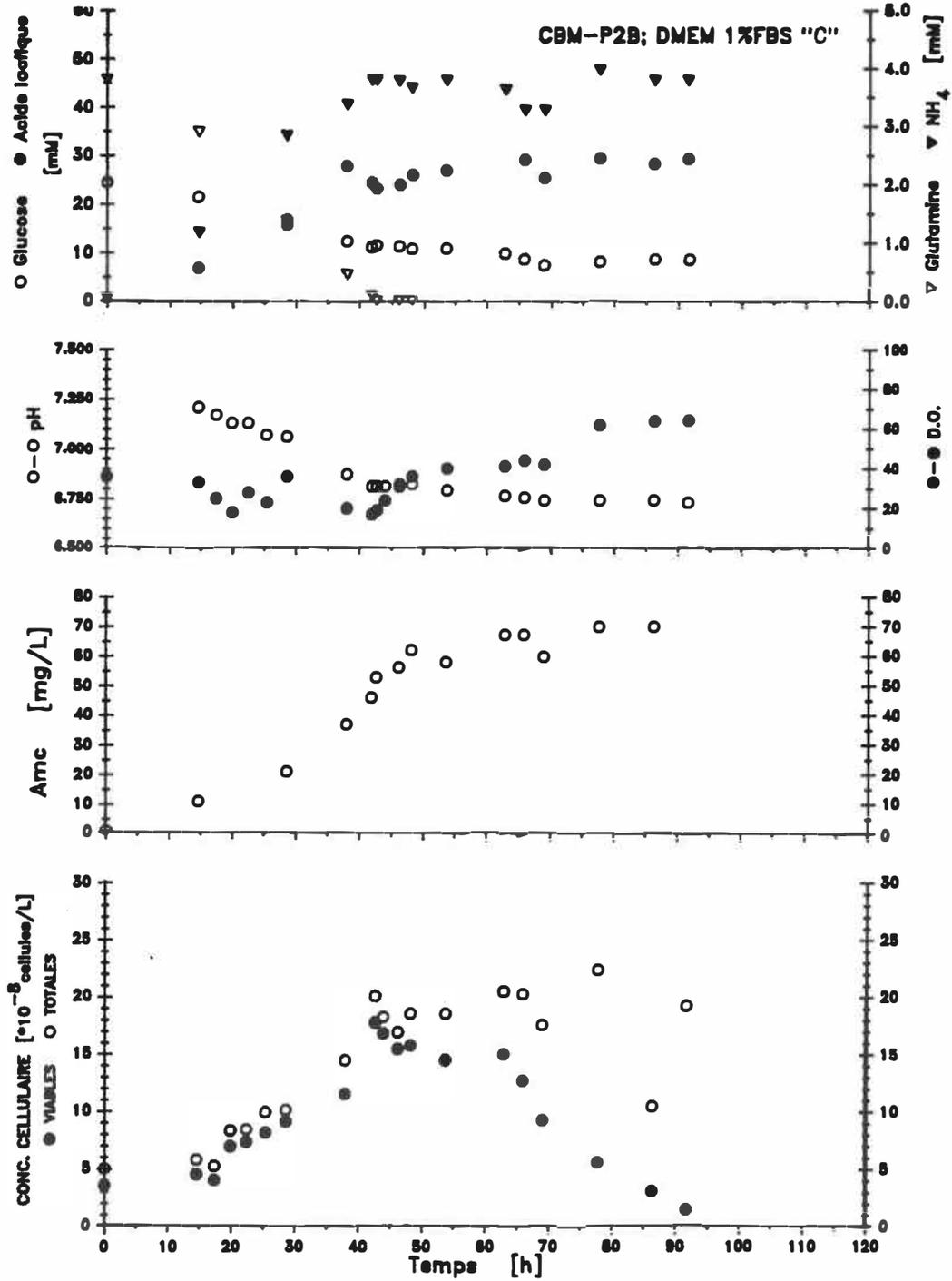
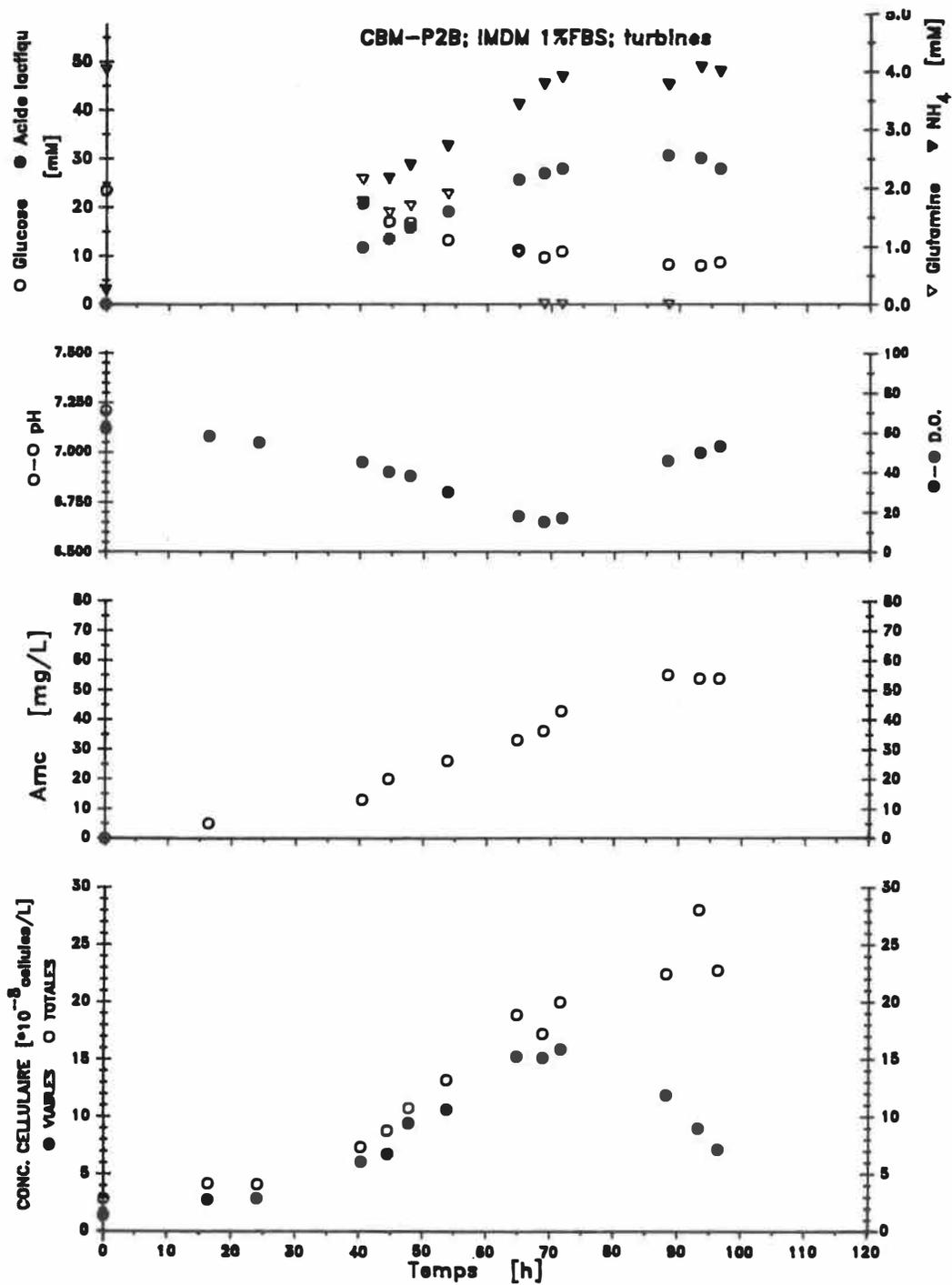


Figure A11 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-B, dans le Celligen, dans le IMDM + 1%FBS, avec hélices et turbine



**Annexe B DONNÉES EXPÉRIMENTALES DES CULTURES EN
BIORÉACTEUR**

Tableau B1 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le RPMI 1640 + 3%FBS

Temps [h]	X_v $\times 10^8$	X cellules/L	pH	DO %	[AMC] g/L	[Glc] mM	[Lac] mM	[Gln] mM	[Amn] mM
0.0	*2.7	3.3	7.7	67			2.7	1.4	
18.3	*3.6	4.3	7.5	47	4		6.4	0.8	
22.0	*3.4	4.2	7.5	40	6		6.4	0.4	
27.3	*5.6	6.4	7.4	31	4		8.9	0.3	
30.0	*6.1	7.3	7.4	36	5		9.2	0.2	
38.4	4.4	6.4	7.4	42	5		10.4		
44.3	3.4	5.2	7.4	51	6		10.7		
52.8	2.0	3.2	7.4	58	8		10.5		
68.0	1.4	3.7	7.4	58	11		11.7		

* Echantillons utilisés pour évaluer

Tableau B2 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le RPMI 1640 + 5%FBS

Temps [h]	X_v x 10 ⁸	X cellules/L	pH	DO %	[AMC] g/L	[Glc] mM	[Lac] mM	[Gln] mM	[Amm] mM
0.0	*2.9	3.6	7.2	63	0	23.9	1.1	2.0	0.2
11.8	*4.1	4.7	7.0	17	4	21.4	6.0	1.3	0.9
26.2	*9.5	10.2	6.8	2	11	20.8	12.7	0.0	1.8
29.5	8.4	9.1	6.8	4	15	20.8	15.0	0.0	2.2
32.8	8.8	10.1	6.8	4	15	20.0	17.1		2.5
36.1	8.5	10.3	6.8	10	17	17.8	16.1		2.3
47.3	7.3	11.1	6.8	28	18	19.1	17.6		2.6
51.5	6.5	10.2	6.8	31	25	21.2	17.6		2.6
59.0	3.8	9.7	6.8	33	24		17.6		2.6

* Echantillons utilisé pour évaluer

Tableau B3 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le RPMI 1640 + 10%FBS

Temps [h]	X_{ty} x 10 ⁸	X cellules/L	pH	DO %	[AMC] g/L	[Glc] mM	[Lac] mM	[Gln] mM	[Amm] mM
0.0	1.9	2.6	7.4	84	0		2.8	1.0	0.7
32.4	1.6	2.7	6.9	66	3		4.9	1.3	0.9
42.4	1.9	2.6	6.8	61	4		5.5	1.3	1.3
49.4	*2.2	3.3	6.8	53	5		8.1	1.1	1.2
53.9	*3.0	4.4	6.7	49	7		8.1	0.8	1.6
66.4	*4.6	6.1	6.6	38	13		12.8	0.0	2.0
71.2	*6.0	7.5	6.6	34	18		11.2		2.1
74.9	*7.0	8.9	6.5	39	17		11.8		2.3
81.7	5.8	8.0	6.5	51	16				2.3
92.9	4.0	7.8	6.5	64	17		14.8		2.2
97.7	3.9	8.2	6.5	69	17		13.3		2.3
104.7	1.7	6.8	6.5	75	18		14.5		2.4
114.9	0.7	6.3	6.5	76	21		14.6		2.5

* Echantillons utilisés pour évaluer

Tableau B4 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le Celligen, dans le DMEM + 3%FBS

Temps [h]	X_v x 10 ⁸	X cellules/L	pH	DO %	[AMC] g/L	[Glc] mM	[Lac] mM	[Gln] mM	[Amm] mM
0.0	1.9	2.6	7.6	90	4	20.8	5.7	4.1	0.8
4.8	*1.1	1.5	7.4	74	4	17.6	5.3	2.3	0.9
15.5	*2.3	3.0	7.3	65	6	19.3	8.4	3.6	1.2
23.5	*2.6	3.6	7.3	56	7	19.9	10.5	3.3	1.5
27.8	*2.8	4.0	7.2	49	8	17.8	10.8	2.6	1.7
39.8	*7.5	8.9	7.1	30	10	15.5	13.9	0.8	2.4
46.8	*8.9	9.6	7.0	19	10	14.3	17.1	0.4	3.1
51.0	*9.4	10.8	7.0	26	10	13.6	20.4		3.5
53.8	*10.9	12.4	6.9	32	16	11.5	22.0		3.5
64.8	*14.4	17.0	6.9	33	24	10.2	26.0	0.3	3.9
68.8	*14.9	17.6	6.9	41	26		16.7		2.8
72.9	*11.2	14.9	6.9	53	20		28.3	0.3	2.2
87.8	11.0	18.4	6.8	77	22		29.2	0.3	4.1
95.3	3.6	19.3	6.8	73	21	9.8	25.9	0.3	3.8
111.0	3.3	16.4	6.8	72	28	9.8	30.0	0.3	4.3
119.5	1.2	19.6	6.8	72		10.0	29.5	0.2	4.2

* Echantillons utilisés pour évaluer

Tableau B5 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CEM-P2-A, dans le Celligen, dans le DMEM + 10%FBS

Temps [h]	X_g $\times 10^8$	X cellules/L	pH	DO %	[AMC] g/L	[Glc] mM	[Lac] mM	[Gln] mM	[Amn] mM
0.0	5.8	5.8	7.5		0	21.4	0.4	3.9	0.9
15.3	*4.8	5.9	7.1		6		0.3	2.7	1.6
21.5	*13.7	13.9	6.9		12		17.4	1.7	2.5
24.8	*14.8	15.2	6.9						
29.0	*17.4	18.2	6.9		20	11.3		0.0	3.2
34.5	18.4	19.7	6.7		23	9.3	28.6	0.3	3.6
39.5	19.0	21.8	6.8		30	8.7	31.6	0.4	3.5
52.0	18.9	25.8	6.6		29		26.3	0.2	3.2
63.8	9.4	17.6	6.7		28	4.5	41.0	0.3	3.7
72.0	8.0	23.0	6.7		32		36.6	0.4	0.0
87.0	2.2	26.0	6.7		41		35.4	0.4	0.0
95.8	0.8	29.0	6.7		31		37.6	0.4	3.7

* Echantillons utilisés pour évaluer

Tableau B6 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-A, dans le DMEM + 10%FBS, avec contrôle de pH à 7,2 et de la DO à 60%

Temps [h]	X_v $\times 10^8$	X cellules/L	pH	DO %	[AMC] g/L	[Glc] mM	[Lac] mM	[Gln] mM	[Amm] mM
0.0	5.8	5.8	7.2	30		21.4	3.7	3.9	0.9
15.8	*7.6	9.0	7.2	54	6	17.3	11.2	2.4	1.9
21.5	*13.3	14.3	7.2	55	9	14.0	17.5	1.0	2.4
24.8	*14.2	14.7	7.1	41		12.7			
29.0	*15.1	16.4	7.0	30	16		26.3	0.8	3.3
34.5	14.1	15.0	7.1	58	20	9.3	28.3	0.2	3.6
39.5	13.1	17.6	7.1	58	21	7.2	29.0	0.1	3.5
52.0	7.7	21.2	7.2	60	20	6.0	32.7	0.2	3.5
63.8	5.4	16.3	7.2	58	19	4.4	35.6		3.6
72.0	6.0	21.0		58	18	5.1	38.6	0.4	

* Echantillons utilisés pour évaluer

Tableau B7 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CEM-P2-B, dans le Celligen, dans le RPMI 1640 + 1%FBS

Temps [h]	X_{tg} x 10 ⁸	X cellules/L	pH	DO %	[AMC] g/L	[Glc] mM	[Lac] mM	[Gln] mM	[Amm] mM
0.0	3.5	4.5	6.2	54	1	24.9	1.4	2.3	0.3
3.7	*3.5	4.6	6.0	48	1	23.1	3.0	1.3	0.6
12.4	*4.1	5.0	5.8	33	6	24.6	4.9	1.1	1.2
16.5	*4.4	6.2	5.8	31	9	25.2	9.4	0.7	1.4
28.3	*5.3	6.6	5.6	18	17	23.7	13.6		2.2
41.0	*6.2	8.2	5.6	31	24	21.8	11.8		2.6
42.8	6.4	7.9	5.6	36	25	22.5	13.2		2.8
46.0	5.3	6.8	5.6	46	24	19.4	15.3		3.3
49.3	3.2	5.2	5.6	50	24	20.3	16.8		3.3
52.6	3.7	5.4	5.6	54					2.7

* Echantillons utilisés pour évaluer

Tableau B8 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-B, dans le Celligen, dans le DMEM + 1%FBS (expérience A)

Temps [h]	X_y x 10 ⁸	X cellules/L	pH	DO %	[AMC] g/L	[Glc] mM	[Lac] mM	[Gln] mM	[Amm] mM
0.0	2.8	3.6	7.6	45	0	27.6	0.0	4.1	0.3
1.7			7.4	47					
5.7	*2.1	3.0	7.0	69					
19.1	*4.2	5.4	6.4	58	9	23.8	8.1	2.9	1.6
20.6	*4.6	5.7	6.3	52					
22.6	*4.1	5.9	6.3	47	11	21.8	12.5	2.6	1.9
26.8	*4.1	6.0	6.3	38	12	20.6	12.8	2.3	2.1
30.7	*6.7	8.7	6.2	29	19	17.2	17.4	2.0	2.5
33.8	*7.9	9.4	6.1	18	14	17.2	18.9	1.9	3.4
35.8	*7.4	8.8	6.1	12	24	14.5	25.2	1.5	3.8
41.8	*11.0	14.1	6.0	4	31	12.2	19.7	1.2	4.2
44.1	11.3	12.8	6.0	4	30	11.9	26.6	0.5	4.2
35.1	8.8	11.2	6.0	27	0	13.2	27.5		
51.1	9.0	12.1	6.0	42	49	13.3	27.8		
55.1	6.6	9.0	6.0	71	54	9.8	30.7	0.0	4.6
66.1	6.2	9.4	5.9	80	53	6.6	24.9	0.0	3.8
68.6	8.0	12.4	5.9	87	59	11.3			
72.4	7.2	11.6	5.9	91	57	11.1	28.9		
90.8	1.3	8.8	5.9	126	58	10.1	35.1		4.9
98.8	0.6	0.0	5.9	139	0				

* Echantillons utilisés pour évaluer

Tableau B9 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CEM-P2-B, dans le Celligen, dans le DMEM + 1%FBS (expérience B)

Temps [h]	X_y x 10 ⁸	X cellules/L	pH	DO %	[AMC] g/L	[Glc] mM	[Lac] mM	[Gln] mM	[Amm] mM
0.0	3.9	4.6	7.6	94	0	25.9	0.0	3.8	0.4
9.2	*3.4	4.8	7.4	31	9	24.7	4.4	3.3	1.0
22.3	*6.9	8.5	7.2	6	26	20.8	13.8	1.8	2.2
26.5	*8.0	9.8	7.2	2	26	17.9	18.1	1.8	2.8
27.3	*8.6	9.7	7.2	3				1.4	
28.4	*8.6	9.4	7.1	2	30	17.2	19.1	1.2	2.9
31.0	*12.3	13.5	7.1	2	32	15.3	22.7	0.8	3.1
33.1	10.7	12.4	7.1	2				0.7	3.2
35.0	12.2	13.4	7.0	2	39	12.9	22.9	0.1	3.8
36.2	10.4	13.2	7.0	2		12.7	28.6	0.0	3.5
45.4	13.5	16.2	6.9	3	66	8.9	33.8	0.0	4.0
49.4	12.2	15.6	6.9	49	75	8.9	35.3		4.4
52.5	9.1	14.3	6.9	71	64	7.9	32.9		
56.8	5.3	9.8	7.1	99	74	8.6	33.2		
69.5	2.7	6.8	7.0	98	62	7.5			

* Echantillons utilisés pour évaluer

Tableau B10 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CBM-P2-B, dans le DMEM + 1%FBS (expérience C), avec hélices et turbine

Temps [h]	X_v $\times 10^8$	X cellules/L	pH	DO %	[AMC] g/L	[Glc] mM	[Lac] mM	[Gln] mM	[Amm] mM
0.0	3.6	5.0	7.5	36	1				0.0
14.6	*4.5	5.8	7.2	33	11	21.6	6.8	2.9	1.2
17.3	*4.0	5.2	7.2	25	0				
19.8	*6.9	8.3	7.1	18	0				
22.3	*7.3	8.4	7.1	28	0				
25.3	*8.1	9.9	7.1	23	0				
28.5	*9.1	10.1	7.1	36	21	16.6	15.7	1.4	2.8
37.9	*11.6	14.5	6.9	20	37	12.3	27.8	0.5	3.4
41.8			6.8	17	46	11.2	24.4	0.1	3.8
42.6	17.8	20.0	6.8	19	53	11.6	23.2	0.0	3.8
43.8	16.8	18.2	6.8	24	0				
46.1	15.5	16.9	6.8	31	56	11.1	24.1	0.0	3.8
48.1	15.8	18.5	6.8	36	62	10.6	26.0	0.0	3.7
53.6	14.5	18.5	6.8	40	58	10.8	27.0		3.8
62.8	15.0	20.5	6.8	41	67	9.8			3.6
65.8	12.7	20.2	6.8	44	67	8.7	29.1		3.3
68.9	9.3	17.6	6.7	42	60	7.4	25.4		3.3
77.7	5.6	22.4	6.7	62	70	8.2	29.5		4.0
86.3	3.1	10.5	6.7	64	70	8.7	28.3		3.8
91.6	1.5	19.3	6.7	64	0	8.6	29.3		3.8

* Echantillons utilisés pour évaluer

Tableau B11 Evolution des concentrations d'une culture de cellules de la lignée CEM-P2-B, dans le Celligen, dans le IMDM + 1%FBS, avec hélices et turbine

Temps [h]	X_y $\times 10^8$	X cellules/L	pH	DO %	[AMC] g/L	[Glc] mM	[Lac] mM	[Gln] mM	[Amn] mM
0.0	1.4	2.8	7.2	62	0	23.5	0.0	4.0	0.2
16.3	2.7	4.1	6.4	58	5				
24.0	*2.8	4.1	6.2	55	0				
40.3	*6.0	7.4	6.0	45	13	20.8	11.8	2.1	1.8
44.5	*6.7	8.7	6.0	40	20	17.0	13.7	1.6	2.2
47.8	*9.4	10.7	5.9	38	0	16.9	15.9	1.7	2.4
53.8	*10.6	13.1	5.9	30	26	13.4	19.2	1.9	2.7
64.8	*15.2	18.8	5.7	18	33	11.2	25.7	0.9	3.4
68.8	15.1	17.3	5.7	15	36	9.7	27.1	0.0	3.8
71.7	15.9	20.0	5.7	17	43	11.1	28.0	0.0	3.9
88.3	11.8	22.4	5.6	46	55	8.2	30.7	0.0	3.8
93.3	8.9	28.0	5.6	50	54	7.9	30.2		4.1
96.3	7.1	22.7	5.6	53	54	8.7	27.9		4.0
140.1	1.7	22.4	5.6	63	0	10.4	30.8		3.9

* Echantillons utilisés pour évaluer

Annexe C ÉVALUATION DES TAUX SPÉCIFIQUES DE CROISSANCE,
D'ASSIMILATION ET DE PRODUCTION - Dérivation des
courbes de croissance et essai d'évaluation des
paramètres corrélant les taux spécifiques

L'évaluation des paramètres de modèles représentant les systèmes dynamiques que sont les procédés en cuvée requiert l'estimation des taux volumétriques de croissance d'assimilation et de production. Ces taux sont assimilables à la dérivée des courbes expérimentales.

Ces dérivées ont été estimées par l'évaluation de la pente d'une courbe lissée pour chacune des quatre cultures effectuées avec le DMEM et l'IMDM et par un lissage polynomial minimisant les carrés moyens. La figure C1 représente les concentrations cellulaires en fonction du temps pour deux expressions polynomiales ainsi que les données expérimentales. On y remarque que cette technique, en donnant un poids égal à chacune des données, ne permet pas de s'approcher de X_{\max} et de $X_{v,\max}$ de façon satisfaisante. De plus l'ordre de la dérivée est déterminée par l'ordre du polynôme qui est lui-même limité par le nombre de point expérimentaux. On remarquera à la figure C2 que les valeurs obtenues pour μ selon ces deux techniques diffèrent. En particulier, la période au cours

Figure C1 Approximation polynomiale des courbes de croissance de la culture DMEM 1%A

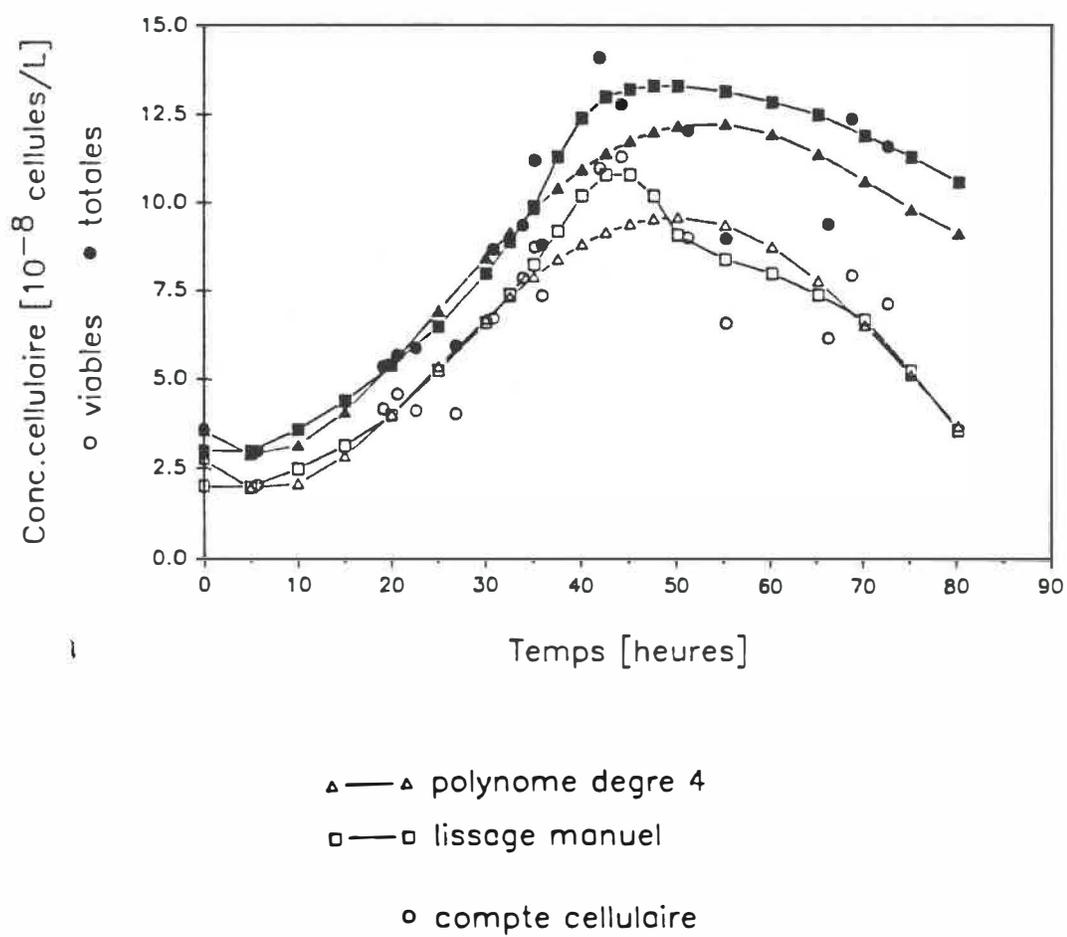
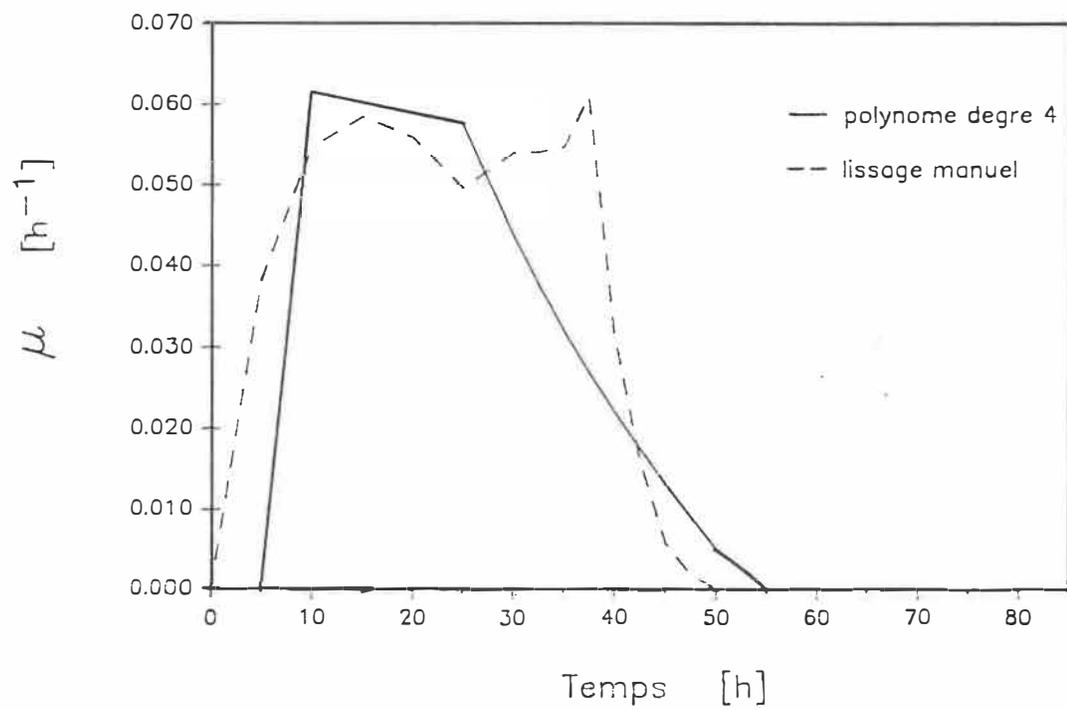


Figure C2 Comparaison des taux spécifiques de croissance obtenus selon la technique d'évaluation de la dérivée utilisée



de laquelle μ demeure élevée (entre 0,05 et 0,06 h⁻¹) dure une dizaine d'heures de plus lorsque l'estimé provient du lissage manuel. Comme le laissait aussi entrevoir la figure C1, la diminution de μ après μ_{\max} est moins radicale dans le cas du lissage polynomial. Les estimés obtenus par les techniques décrites plus haut permettent de tracer les courbes d'évolution des paramètres q_{Amc} , μ , q_{Glc} , q_{Lac} , q_{Gln} , q_{Amm} . Ces courbes permettent de catégoriser la production d'anticorps monoclonaux. L'analyse de la figure C3, bâtie à partir de pentes relevées sur des courbes lissées manuellement pour la culture DMEM 1%A, est typique d'une production non associée à la croissance. C'est aussi le cas des autres cultures, bien que le décalage d'une dizaine d'heures entre $q_{\text{Amc,max}}$ et μ_{\max} soit moins marqué dans le cas de la culture IMDM 1%. Par contre, les mêmes courbes obtenues suite à la dérivation des équations polynomiales représentant chacune des variables mesurées de la culture (figure B4) peuvent plutôt être assimilées aux courbes typiques de production associées à la croissance. Similairement, une représentation graphique de q_{Amc} en fonction de μ (figure C5) ne conduit pas à la même conclusion selon la technique d'évaluation utilisée. Bien qu'encore ici, la courbe basée sur l'approximation polynomiale soit typique des productions associées à la croissance représentées par

Figure C3 Évolution des taux spécifiques de croissance, d'assimilation et de production d'une culture en bioréacteur dans le DMEM 1%A et 1%B évalués d'après les pentes des courbes lissant les points expérimentaux

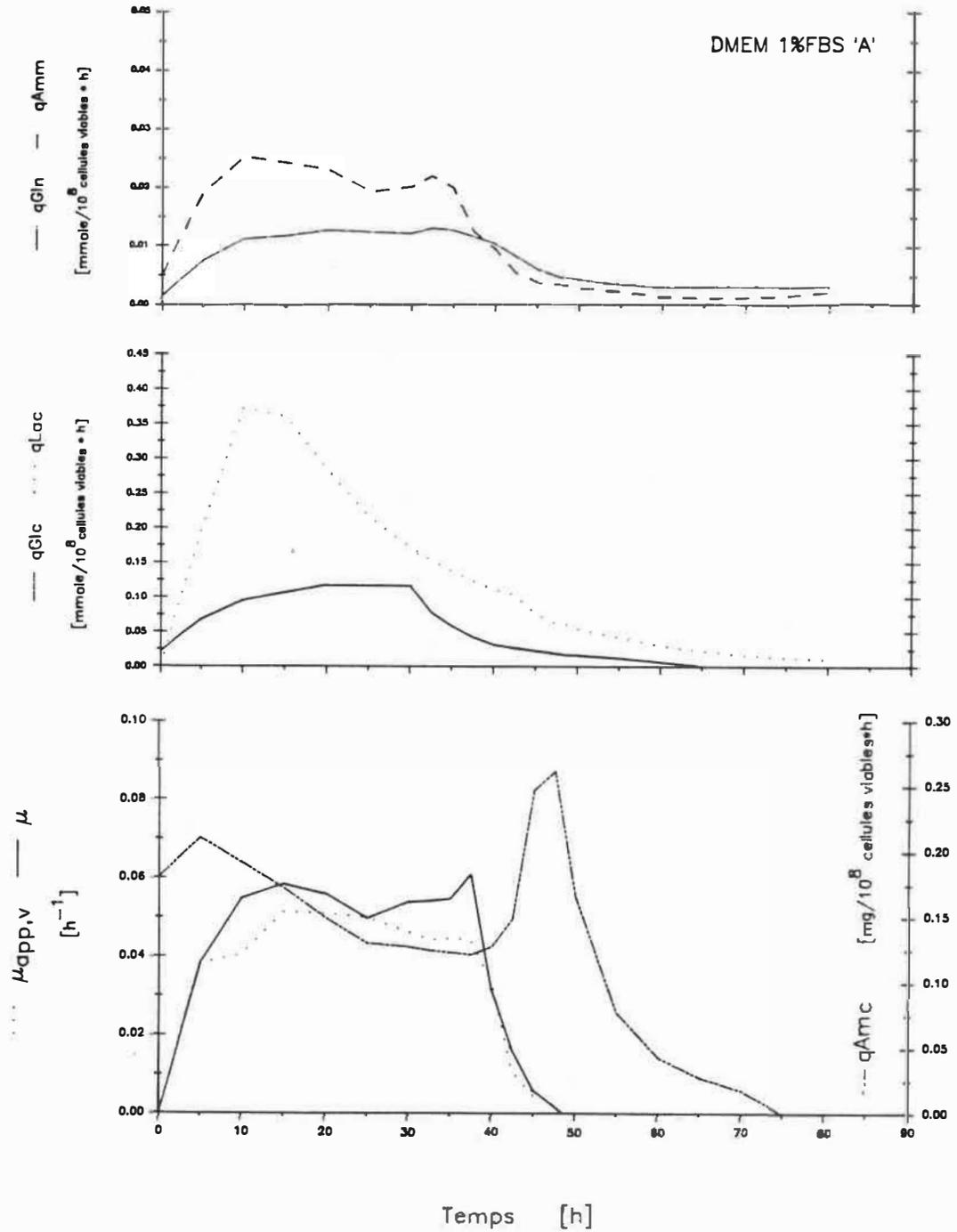


Figure C4 Évolution des taux spécifiques de croissance, d'assimilation et de production de la culture en bioréacteur DMEM 1%FBS 'A', évalués après dérivation d'une approximation polynomiale des courbes expérimentales

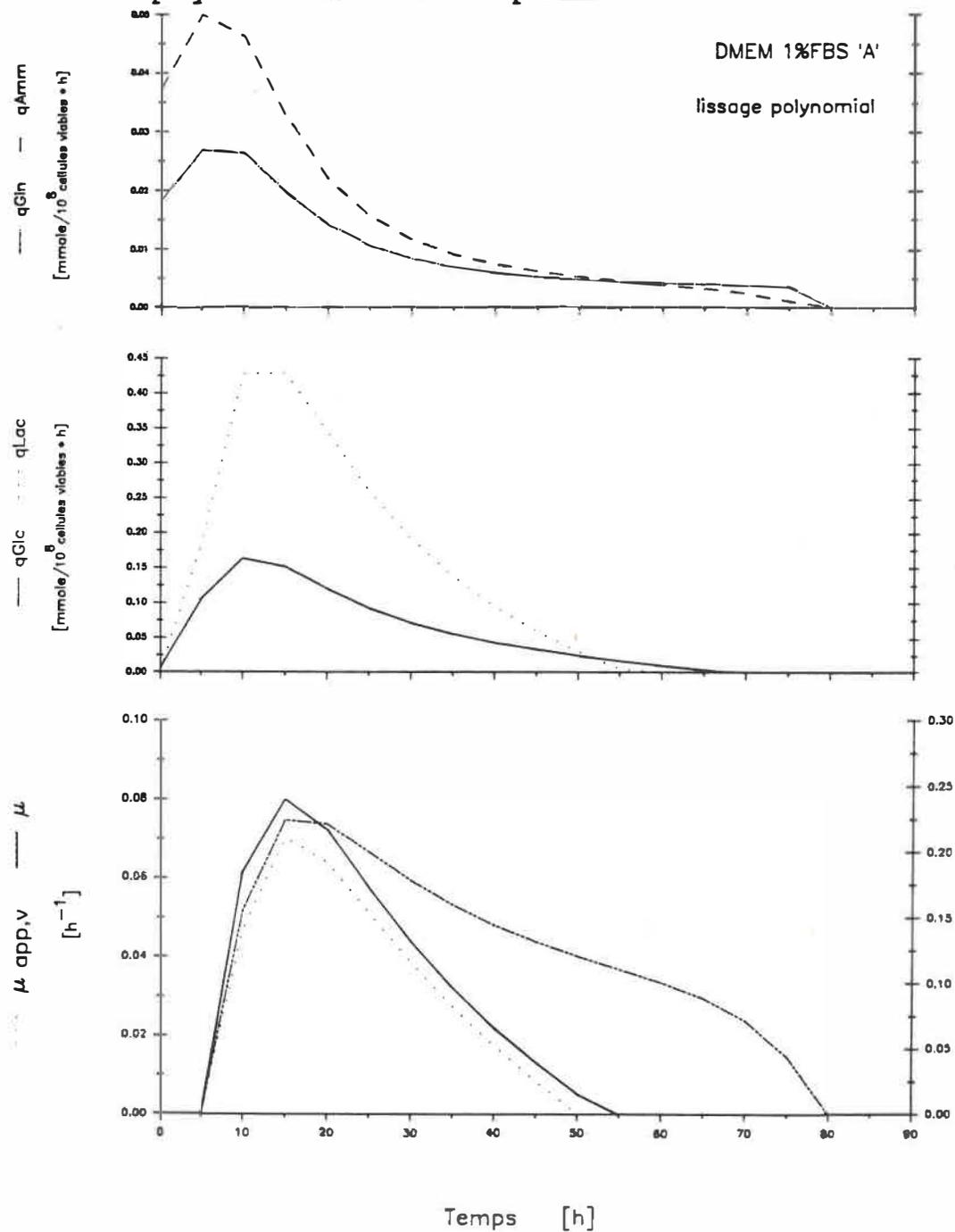
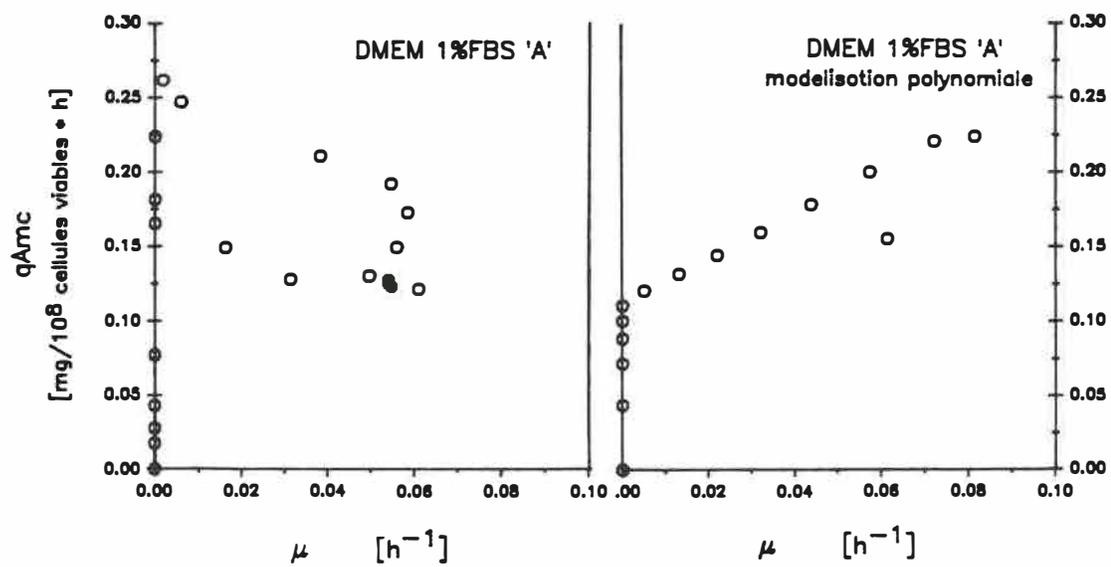


Figure C5 Relation entre q_{Amc} et selon deux techniques d'évaluation de $dAmc/dt$, de dX/dt et de X_v pour la culture DMEM 1%A



le modèle de Leudeking-Piret, il ne semble pas y avoir de relation entre q_{Amc} et μ pour l'autre courbe. La relation entre q_{max} et μ dépend donc largement de la technique de représentation utilisée pour les dérivées. Cette dépendance ne permet pas d'évaluer efficacement les paramètres des expressions cinétiques décrivant la culture.

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL



3 9334 00272277 3

PEPIN

1989

C
U
1