UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ANALYSE DES FLUX MÉTABOLIQUES DANS LA CELLULE 293 PENDANT LA CROISSANCE ET L'INFECTION AVEC UN VECTEUR ADÉNOVIRUS

ISABELLE NADEAU

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph. D.)

(GÉNIE CHIMIQUE)

MAI 2000

© Isabelle Nadeau, 2000.

National Library of Canada
Acquisitions and Bibliographic Services
395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale du Canada
Acquisitions et services bibliographiques
395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

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

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

0-612-60945-6

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

ANALYSE DES FLUX MÉTABOLIQUES DANS LA CELLULE 293 PENDANT LA CROISSANCE ET L'INFECTION AVEC UN VECTEUR ADÉNOVIRUS

présentée par: NADEAU Isabelle

en vue de l'obtention du diplôme de: Philosophiae Doctor

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

M. SAMSON Réjean, Ph.D., président

M. PERRIER Michel, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. KAMEN Amine, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre

M. BUTLER Michael, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mes directeurs, Amine Kamen, qui m'a fait confiance et a toujours répondu à mes questionnements scientifiques ou autres, ainsi que Michel Perrier, qui a été encourageant dans les moments difficiles et toujours de très bon conseil. Je ne voudrais pas oublier, mon superviseur à Transgène, Jean Sabatié, qui m'a permis de vivre une expérience extraordinaire à Strasbourg, ainsi que Peter Vanrolleghem, qui m'a conseillée lors de son passage à Montréal. J'aimerais également remercier les gens d'un peu partout avec qui j'ai pu discuter et qui m'ont aidée à faire avancer ma réflexion. Finalement, j'aurais un mot spécial pour Claude Chavarie qui depuis le début de mes études m'encourage, ainsi que pour les autres professeurs du département qui m'ont donné le goût de me lancer dans cette aventure, longue d'onze années à l'École Polytechnique.

Je réserve pour la fin un mot plein de reconnaissance pour mes parents qui m'ont soutenue tout au long de ma thèse. Ma mère qui a toujours été là, qui a essayé de comprendre mon sujet et de trouver un titre original, mais sans succès. Mon père, qui je pense, était un peu découragé de mes longues études et avait peur que je me retrouve sans le sou. Rassurre-toi j'ai trouvé un emploi. Dominique

également, qui m'a aussi toujours écoutée, mon frère Charles et ma sœur Marie-Ève, qui par leur présence plus silencieuse m'ont également réconfortée. Mes amis ont joué un rôle de soutien important: Nalini, Philippe, Christiane, Louis, Louis, mes plus que collègues Sylvie et Greg, mes copains français Anne-Céline, Daniel, Patricia, Anne, Mireille et Jean ainsi que mes collègues de l'IRB : Danielle, PAG, Rosanne, Diane, Agnès, Sylvain, Alain, Bernard, Linda, Lucie ainsi que la gang de gars.

J'aimerais également remercier le Conseil de Recherche en Science Naturelle et Génie (CRSNG), le Fond pour l'Avancement de la Recherche (FCAR), le Conseil National de Recherche du Canada (CNRC), le département de génie chimique de l'École Polytechnique de Montréal pour m'avoir financée tout au long de mes études. Je puis vous assurrer que je ne ferai pas partie du « Brain Drain » et comme dans la chanson de Charlebois : je reviendrai à Montréal.

RÉSUMÉ

L'objectif principal de ce travail était d'observer le métabolisme de la cellule 293 pendant la croissance et l'infection avec un vecteur adénovirus et d'en déduire la meilleure stratégie d'alimentation au cours du procédé, afin d'améliorer la production de vecteurs. Pour ce faire nous avons construit un modèle métabolique comprenant les principales réactions biochimiques du métabolisme. A l'aide de ce modèle, il nous a été permis de calculer les flux métaboliques dans la cellule dans différentes conditions.

Dans la première partie de ce travail, nous avons évalué une stratégie d'alimentation sur des cellules 293 de deuxième génération afin d'obtenir de plus hautes concentrations cellulaires. Cette cellule en particulier, consomme beaucoup de glutamine mais produit beaucoup d'ammoniac tout en consommant peu de glucose. Plusieurs stratégies d'alimentation ont été essayées et celle donnant les meilleurs résultats a été une alimentation pulsée en acides aminés avec très peu de glutamine. Cette stratégie a également réduit de beaucoup la quantité d'ammoniac produit. Dans la deuxième partie du travail, nous avons évalué le profil des flux métaboliques d'une cellule 293 de première génération pendant la croissance et durant l'infection avec différentes stratégies

d'alimentation, mode cuvée et cuvée alimentée, dans un milieu sans sérum (LC-SFM). Cependant, le titre viral obtenu dans ce type de milieu n'étant pas aussi élevé que dans un milieu conventionnel avec sérum, un nouveau milieu a été développé contenant très peu de protéines et permettant de nouveau une excellente production de vecteurs (1500 pfu/ml). La troisième partie de ce travail s'est donc attardée à une comparaison de l'énergie produite sous forme d'ATP dans les deux types de milieux.

L'analyse des flux métaboliques a permis d'observer plusieurs phénomènes et une nouvelle stratégie d'alimentation a été développée. On a pu observer notamment une corrélation entre la glycolyse et la glutaminolyse. Également on a remarqué qu'un cycle de Krebs stable démontrait une bonne croissance cellulaire tandis qu'une activité élevée de ce cycle n'était pas représentatif d'une meilleure croissance mais démontrait plutôt une inefficacité au niveau du métabolisme. Il est donc important de vérifier ce cycle avant de procéder à l'infection. Au cours de l'infection, plusieurs phénomènes ont été observés. On remarque une augmentation des flux métaboliques autour de 10 hpi ainsi qu'un maximum au niveau de la production d'ATP, dans le cas où la production virale est très élevée. Ce moment correspond en fait à celui où il y a début de production de protéines virales. Également, entre 20 et 30 hpi, la majorité des

flux métaboliques atteignent un maximum et il en va de même au niveau de la production d'ATP.

Des différences ont été observées entre les phases de croissance et d'infection. En général, au cours de l'infection, on remarque une activité oxidative accrue du glucose, tandis que la glutamine est cependant moins oxydée. Ces études nous ont également démontré qu'il valait mieux débuter le fed-batch très tôt lors de la croissance afin de garder des concentrations de nutriments élevées, un métabolisme élevé et une production virale également maximale. Cette stratégie s'est particulièrement avérée efficace dans un milieu à faible teneur en protéines (NSFM13) où l'utilisation du glucose se fait plus efficacement. Ces travaux permettront dans le futur de développer un modèle en temps réel où il sera possible de suivre les paramètres-clés telle la production d'ATP.

ABSTRACT

The main goal of this work was to evaluate the 293 cell metabolism during growth and infection with an adenoviral vector and to design the best fed-batch strategy in order to improve the vector production. A metabolic model was built, comprising the main metabolic pathways, which permitted the metabolic flux analysis in different conditions.

In the first part of this work, a fed-batch strategy with amino acids and low glutamine was designed for a 293 second generation cell line. This cell line consumed glutamine and produced lactate to a great extent while glucose consumption was low. Therefore this fed-batch strategy helped reducing the amount of ammonia produced and resulted in high growth. The second part of this work studied the metabolic flux profile for a 293 first generation cell line during growth and infection in batch and fed-batch mode, in a serum-free medium (LC-SFM). While this medium gave poorer titers, a novel low-protein medium was developed and maximal viral titers were regained (1500 pfu/ml). Therefore, the final part of this work makes an energy level comparison, namely ATP production, between the two media.

With the metabolic flux analysis, many singularities could be observed and a novel fed-batch strategy was designed. A strong relationship was observed between glycolysis and glutaminolysis. Furthermore, a stable Krebs cycle activity was related to a sustained growth while a high activity of the latter was not related to high growth but demonstrated an unefficient metabolism. Consequently, it is important to verify the state of this cycle before infection, in order to optimize the vector production. During infection, a raise in most fluxes was observed around 10 hpi while in the case where maximal viral titers are obtained, a peak in ATP production is also observed. In fact, this time corresponds to the onset of viral protein production. Maximal fluxes are also observed between 20 and 30 hpi, as well as maximal ATP production in most cases.

Also, differences were observed between the growth and infection phase. In general, there is an increase in glucose oxidation while glutamine oxidation is reduced in most cases. These studies also demonstrated that the fed-batch should be started earlier during the growth phase, in order to keep higher nutrient concentration, a higher metabolic activity and an higher vector production. This was proven especially true in the low-protein medium (NSFM13) where glucose utilization is more efficient. This work will initiates future development of an on-

line metabolic model that will permit to follow in real time the evolution of key parameters such as ATP production.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS IV

RÉSUMÉ VI

ABSTRACT IX

TABLE DES MATIÈRES XII

LISTE DES TABLEAUX XVI

LISTE DES FIGURES XVIII

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS. XXI

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE. 5

1.1 VUE D'ENSEMBLE DU MÉTABOLISME 5

1.1.1 Influence du glucose et de la glutamine 5

1.1.2 Produit du métabolisme du glucose et de la glutamine. 7

1.1.3 Résumé 10

1.2 PRINCIPAUX FLUX 12

1.2.1 Glycolyse et PP 13

1.2.2 Pyruvate 15

1.2.3 Glutaminolyse 16

1.2.4 Cycle de Krebs 20

1.2.5 Résumé 21

1.3 MODÉLISATION 22

1.4 ANALYSE DES FLUX MÉTABOLIQUES 28

1.4.1 Méthodes mathématiques 28

1.4.2 A la recherche de contraintes. 30

1.5 ÉVALUATION DU MODÈLE 34

1.5.1 Rang de la matrice stœchiométrique. 34

1.5.2 Conditionnement de la matrice.....35
1.5.3 Réconciliation et rectification de l'erreur sur les mesures de taux.....36
1.6 ÉVALUATION DU qCO_2.....40

CHAPITRE II : RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES.....43

2.1 MÉTHODOLOGIE.....43
2.1.1 Cellules et milieu.....43
2.1.2 Dosages des métabolites intracellulaires.....44
2.1.3 Préparation de l'échantillon pour analyse des acides aminés.....45
2.1.4 Préparation des échantillons pour analyses de l'ammoniac, du lactate et du glucose...45
2.1.5 Analyse de l'ADN et de l'ARN.....46
2.1.6 Autre méthode d'analyse de l'ADN.....48
2.1.7 Analyse du poids sec.....49
2.1.8 Analyse des protéines totales.....49
2.1.9 Analyse des carbohydrates totaux.....51
2.1.10 Analyse des lipides totaux.....52
2.1.11 Analyse de la composition en acides aminés.....53
2.2 HYPOTHÈSE DE RÉGIME PSEUDO-STATIONNAIRE (PSS).....53
2.3 COMPOSITION DE LA CELLULE.....57
2.4 VARIATION DU CO_2 DISSOUS.....63

CHAPITRE III : MODÈLE MÉTABOLIQUE A.....65

3.1 ÉLABORATION DU MODÈLE.....65
3.1.1 Principales voies métaboliques.....65
3.1.2 Résolution des flux négatifs.....69
3.1.3 Voies de synthèse de la sérine.....71
3.1.4 Apport de la cystéine.....72
3.1.5 Modèle A final.....73
3.2 MÉTABOLISME DE LA CELLULE HUMAINE 293 EN MILIEU À FAIBLE CONCENTRATION DE GLUTAMINE : INTERPRÉTATION DES CHANGEMENTS MÉTABOLIQUE À L'AIDE DU CALCUL DES FLUX MÉTABOLIQUES.....75
Human 293 Cell Metabolism in low Glutamine-Supplied Culture : Interpretation of Metabolic Changes through Metabolic Flux Analysis.....77

Introduction 79
Material and Methods 82
Results 94
Discussion 108
Conclusion 121
References 123
3.3 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES 133

CHAPITRE IV : MODÈLE MÉTABOLIQUE B 136

4.1 ÉLABORATION DU MODÈLE. 136
4.1.1 Matrice d'infection 136
4.1.2 Internalisation de protéines. 139
4.1.3 QCO_2 et bilan sur le NADH et NADPH. 143
4.1.4 Analyse de sensibilité 143
4.2 ANALYSE DES FLUX MÉTABOLIQUES DANS LA CELLULE 293 SF PENDANT LA CROISSANCE ET L'INFECTION AVEC UN VECTEUR ADÉNOVIRUS. 147
293 SF Metabolic Flux Analysis during Cell Growth and Infection with an Adenoviral Vector 149
Introduction 151
Material and methods 153
Cell culture conditions and infection 155
Result 171
Discussion 195
Conclusion 204
References 206

CHAPITRE V : MODÈLE MÉTABOLIQUE C 215

5.1 ÉLABORATION DU MODÈLE. 215
5.1.1 Ajout de la voie des pentoses phosphates. 215
5.1.2 Compartimentation 216
5.1.3 Analyse de sensibilité. 218
5.2 EFFET D'UN MILIEU PAUVRE EN PROTÉINES SUR LE MÉTABOLISME CENTRAL DE LA CELLULE 293SF PENDANT LA CROISSANCE ET L'INFECTION AVEC UN ADÉNOVIRUS. 220

Low-Protein Medium Affects the 293SF Central Metabolism during Growth and Infection with Adenovirus. 221
Introduction 223
Material and Methods 225
Results and Discussion 239
Conclusion 267
References 269

CONCLUSION 273

RÉFÉRENCES 283

ANNEXE 301

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Concentration intracellulaire et taux de variations intracellulaires. ..56
Tableau 2.2 Données sur la composition de la cellule. ..58
Tableau 2.3 Composition massique en acides aminés. ..61
Tableau 2.4 Absorption du CO_2 ..64
Tableau 2.5 Liste des réactions biochimiques. ..66
Table 3.1 Pulse additions for the three fed-batches ..84
Table 3.2 Biochemical Reactions ..93
Table 3.3 Cultivation Kinetics ..96
Tableau 3.4 Flux d'acides aminés calculés avec le modèle et indépendamment.133
Tableau 3.5 Bilan sur l'azote. ..134
Tableau 4.1 Pourcentage massique de la composition en acides aminés des protéines cellulaires et de l'albumine ..142
Tableau 4.2 Erreur relative moyenne maximale sur les flux métaboliques lors d'une variation de 10% sur une mesure. ..145
Table 4.3 Biochemical reactions ..165
Table 4.4 Maximum mean relative error over time on metabolic flux when a 10% variation is processed on a measure. ..172
Table 4.5 Intracellular concentration and intracellular nutrient variation. ..174
Table 4.6 Cell composition ..175
Table 4.7 Rate of CO_2 desorption. ..178
Tableau 5.1 Erreur relative moyenne maximale sur les flux métaboliques lors d'une variation de 10% sur une mesure. ..218
Table 5.2 Growth and infection experiment conditions ..228
Table 5.3 Biochemical reactions ..234
Table 5.4 Maximum mean relative error over time on metabolic flux calculations when a 10% variation is processed on a measure. ..239

Table 5.5 CO_2 evolution rate from labelled glucose and glutamine.....243
Tableau 6.1 Débit et composition de l'alimentation.....280

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Métabolisme général du glucose et de la glutamine 7
Figure 1.2 Navette malate-aspartate 11
Figure 1.3 Cycle cellulaire. 23
Figure 2.1 Évolution de l'ADN et des protéines totales au cours de l'infection. 59
Figure 3.1 Modèle métabolique. 74
Figure 3.2 Mammalian cell metabolism network. 89
Figure 3.3 Cell Growth. 94
Figure 3.4 Glucose consumption 97
Figure 3.5 Total glutamine consumption 98
Figure 3.6 Lactate production 98
Figure 3.7 Ammonia production 99
Figure 3.8 Effect of ammonia concentration on maximal cell density 100
Figure 3.9 Metabolic fluxes during batch cultivation 104
Figure 3.10 Metabolic fluxes during fed-batch with glutamine 105
Figure 3.11 Metabolic fluxes during fed-batch with amino acids 106
Figure 3.12 Comparison of metabolic fluxes for FB/AA and FB/EAA 107
Figure 3.13 Batch before 100 h. Thick lines represent the main fluxes 119
Figure 3.14 Fed-Batch with amino acids. The thick lines represent the main fluxes 120
Figure 4.1 Variation du K_La dans l'eau en fonction du volume à 100 rpm. 147
Figure 4.2 Metabolic network 166
Figure 4.3 Dry weight (DW), Total proteins (TP), and DNA content of 293 SF cells during infection. 176
Figure 4.4 Amino acid composition of total proteins in 293SF cells during infection. 177
Figure 4.5 Calculated qCO_2 with the model versus measured qCO_2. 179

Figure 4.6 Cell growth (a), Total glucose consumption (b), Total glutamine consumption (c), Lactate production (d), Ammonia production (e), Virus titer (f) 182

Figure 4.7 Glycolytic fluxes Batch 1 (a), Batch 2 (b), Fed-Batch LG (c).....187

Figure 4.8 Glycolytic fluxes. Inf B (a), Inf FB (b).....188

Figure 4.9 Glutaminolytic fluxes. Batch 1 (a), Batch 2 (b), Fed-Batch LG (c).....189

Figure 4.10 Glutaminolytic fluxes. Inf B (a), Inf FB (b).....190

Figure 4.11 Amino acid fluxes. Batch 1 (a), Batch 2 (b), Fed-Batch LG (c).....191

Figure 4.12 Amino acid fluxes. Inf B (a), Inf FB (b).....192

Figure 4.13 TCA cycle fluxes. Batch 1 (a), Batch 2 (b), Fed-Batch LG (c).....193

Figure 4.14 TCA cycle fluxes. Inf B (a), Inf FB (b).....194

Figure 5.1 Flux de compartimentation.....217

Figure 5.2 Metabolic network.....232

Figure 5.3 Metabolic network in mitochondria.....233

Figure 5.4 a) criteria h b) Calculated CO_2 versus measured CO_2 with the model 241

Figure 5.5 a) $^{14}CO_2$ evolution from 1-^{14}C-glucose, 6-^{14}C-glucose during growth and infection ; b) $^{14}CO_2$ evolution from U-^{14}C glutamine during growth and infection.....245

Figure 5.6 Growth phase A : $0.5x10^6$ cells/ml ; B :$1x10^6$ cells/ml. a) Glycolytic fluxes b) Glutaminolytic fluxes c) TCA cycle fluxes 247

Figure 5.7 ATP fluxes during the growth experiments.....251

Figure 5.8 a) Titers ; b) Relative protein synthesis rate.....254

Figure 5.9 Infection phase A : 20 hpi ; B :45 hpi a) Glycolytic fluxes b) Glutaminolytic fluxes c) TCA cycle fluxes 259

Figure 5.10 ATP fluxes during the infection experiments.....263

Figure 5.11 Compartmentalization fluxes a) Growth experiments : A :0.5x10^6 cells/ml, B : 1x10^6 cells/ml b) Infection experiments : A : 20 hpi, B : 45 hpi.....266

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.

A	matrice de la composition élémentaire de chacun des composants du modèle
Ac-Coa	Acétyl-Coa
Ac OLE	Acide oléique
ALA	Alanine
AlT	*Alanine transaminase*
AT	*Aspartate transaminase*
ATP	Adénosine triphosphate
ala	Alanine
arg	Arginine
asg	Asparagine
asp	Aspartate
B	Cuvée (Batch)
C	Carbone
C_{CO2}	Concentration du CO_2 dans la phase liquide
C^*_{CO2}	Concentration du CO_2 dans le film
cell.	Cellules
CER	Carbon Evolution Rate
CFTR	Régulateur de conductance transmembrannaire de la fibrose kystique
Cit	Citrate
CTE	Cystéine
CTP	Cytosine triphosphate
CYS	Cystine

D	variation du volume des cellules
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium (milieu Eagle modifié par Dulbecco)
DO	Oxygène dissous
dTMP	Déoxyribothymidine monophosphate
dUMP	Déoxyribouracyl monophosphate
EDTA	Éthylène diamine triacétique acide
FADH	Flavine adénine dinucléotide
FB	Cuvée alimentée (Fed-Batch)
Fg	débit volumique de gas
FRUC6P	Fructose-6-Phosphate
FUM	Fumarate
G	*glutaminase*
GAP	Glycéraldéhydephosphate
GD	*glutamine déshydrogénase*
gln	Glutamine
glu	Glutamate
glc	Glucose
GLY	Glycine
GTP	Guanosine triphophate
his	Histidine
h	heures
hnARN	heterogeneous RNA
hpi	Heures post-infection
HSFM	Hybridoma serum-free medium
HIS	Histidine
ILE	Isoleucine

IMP	Inosine monophosphate
Inf	Infection
K	matrice stœchiométrique
k	rang de la matrice
k_1/k_{-1}	constante de dissociation du H_2CO_3
kD	KiloDalton
Kéto	α-cétoglutarate
k_La	Résistance au transfert d'oxygène à l'interface gaz-liquide [h^{-1}]
K_m	Constante dans la cinétique enzymatique de Michaelis-Menten
LAC	Lactate
LC-SFM	Low-calcium serum-free medium
LD	*lactate déshydrogénase*
LEU	Leucine
LYS	Lysine
MAb	Anticorps monoclonaux
Mal	Malate
mARN	ARN messager
ME	*Enzyme malique*
MET	Méthionine
mM	Millimolaire
MOI	Multiplicity of infection (nombre de particules virales par cellule)
N	Azote
n	nombre de métabolites impliqués
NADH	Nicotinamide adénine nucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine nucléotide phosphate
NEAA	Acides aminés non-essentiels
OUR	Oxygen uptake rate (Taux de consommation d'oxygène) [mM/h]

Oxa	Oxaloacétate
P	Pression [kPa]
P	taux de production des métabolites
PBS	Phosphate buffer saline
PC	*Pyruvate carboxylase*
P_{CO2}	Pression partielle de dioxyde de carbone
PD	*Pyruvate déshydrogénase*
PEP	Phosphoénolpyruvate
PEPC	*Phosphoénolpyruvate carboxykinase*
PFU	Plaque forming units (nombre de particules virales infectieuses)
PHE	Phénylalanine
P_{O2}	Pression partielle d'oxygène
PRO	Proline
P_{tot}	Pression dans la tête du bioréacteur
PYR	Pyruvate
Q-P	matrice des taux de consommation et de production
q_{amm}	Taux spécifique de consommation d'ammoniac [mmole/10^6 cell. viv./h]
q_{glc}	Taux spécifique de consommation de glucose [mmole/10^6 cell. viv./h]
q_{lac}	Taux spécifique de production de lactate [mmole/10^6 cell. viv./h]
q_{O2}	Taux spécifique de consommation d'oxygène [mmole/10^6 cell. viv./h]
RIB-5-P	Ribose-5-Phosphate
rARN	ARN ribosomal
S	matrice de la concentration des métabolites intracellulaires
SDS	Sodium dodecyl sulfate

SSC	Citrate de sodium
ser	Sérine
SUCCoA	Succinyl-CoA
tARN	ARN de transfert
TEA	Triéthanolamine
TRP	Tryptophane
TYR	Tyrosine
UTP	Uracyl triphosphate
Vg	Volume de gaz
V_L	Volume de liquide
x	vraie valeur
$\bar{x}$	valeur mesurée
$\hat{x}$ |	valeur estimée
x^E_{CO2}	fraction molaire de CO_2 à l'entrée
x_{CO2}	fraction molaire de CO_2
Xu5P	Xylulose-5-Phosphate
$Y_{lac/glc}$	Rendement molaire de lactate produit par glucose consommé
$Y_{amm/gln}$	Rendement molaire d'ammoniac produit par glutamine consommé
α-KETO	α-cétoglutarate
δ	Erreur
$\hat{\delta}$	Erreur estimée
ε	Résidu
φ	Matrice de la variance-covariance
μ	Taux de croissance cellulaire [heures^{-1}]

INTRODUCTION

L'année 1999 fût l'année d'une plus grande conscientisation du public à l'égard des biotechnologies. Il y eut d'abord le clonage de Dolly, la thérapie génique et les OGM. Malheureusement, le public reste prisonnier des battages médiatiques autour de ces termes et leur opinion est souvent biaisée. Il ne faut surtout pas minimiser l'impact de ces technologies car elles restent importantes pour améliorer la qualité de vie non seulement des occidentaux, comme on est porté à le croire, mais également du tiers monde. En effet les OGM pourraient bien être une solution à la faim dans le monde et la thérapie génique pourrait sauver bien des vies d'un cancer ou du sida.

Ce travail a porté plus particulièrement sur un aspect des thérapies géniques. En effet, nous avons travaillé avec le système d'expression adénovirus et les cellules 293. Le vecteur adénovirus est utilisé dans 18% des essais cliniques avec vecteurs, notamment pour des thérapies contre le cancer, avec la protéine p53 ou la thymidine kinase (TK), ou encore dans le but de corriger certaines maladies monogéniques telles la dystrophie de Duchenne ou les myopathies.

Les méthodes classiques d'évaluation de cultures cellulaires s'attardent en particulier à l'analyse des taux de consommation et de production des principaux nutriments tels les acides aminés, le glucose, le lactate et l'ammoniac, ces deux derniers composés s'étant avérés toxiques pour la cellule. Cependant, on s'aperçoit de plus en plus que certains cofacteurs tels vitamines, hormones de croissance, peptides et autres composés qu'on retrouve en petite quantité dans les milieux de culture, peuvent jouer des rôles importants dans les cultures cellulaires. Le métabolisme cellulaire est très complexe et divers facteurs peuvent être des agents promoteurs ou inhibiteurs, le rétrocontrôle étant pour la cellule un moyen efficace de réguler son métabolisme.

Le but principal de ce travail est donc de mieux comprendre le métabolisme cellulaire de la cellule 293 autant en croissance qu'en infection avec un vecteur adénovirus. Nous avons donc développé un modèle métabolique qui à l'aide des données classiques de production et de consommation de divers métabolites, permet de calculer les flux métaboliques à l'intérieur de la cellule. Ces flux métaboliques sont en fait un reflet des taux de réactions biochimiques à l'intérieur de celle-ci et permettent d'évaluer l'état physiologique des cellules à tout moment. Cette analyse permettra de cerner les principales voies métaboliques que la cellule emploie au cours de la période de croissance et

d'infection et ainsi d'en déduire les meilleures stratégies d'alimentation afin de maximiser la croissance et la production de vecteurs adénoviraux.

Ce travail se divise en cinq parties. Une première partie porte sur la revue de la littérature concernant le métabolisme cellulaire, les modèles métaboliques et les méthodes d'analyse des flux métaboliques dans la cellule. Une seconde partie rapporte les résultats préliminaires qui ont permis la validation des hypothèses utilisées pour le calcul des flux métaboliques. Au chapitre 3 nous rapportons le développement d'un premier modèle métabolique avec lequel nous avons pu évaluer les changements métaboliques observés lors d'une alimentation pulsée en glutamine et une alimentation pulsée en acides aminés à faible concentration de glutamine. Ce travail a fait l'objet d'un premier article : *Human 293 Cell Metabolism in Low-Glutamine Supplied Culture : Interpretation of Metabolic Changes through Metabolic Flux Analysis* publiée dans la revue *Metabolic Engineering*. Au chapitre 4 sont rapportés certaines améliorations qui ont été apportées au modèle en plus de son adaptation au processus d'infection. Ce modèle a permis d'évaluer les flux métaboliques de la cellule 293SF dans un milieu sans sérum sous différentes conditions d'alimentation pendant la phase de croissance et d'infection. Ces résultats sont rapportés dans un article intitulé : *293SF Metabolic Flux Analysis during Cell Growth and Infection with an Adenoviral Vector.* Cet article a été soumis pour publication à la revue *Biotechnology Progress*. Le dernier

chapitre porte sur l'élaboration d'un modèle très complet comprenant le cycle du pentose-phosphate, mesuré à l'aide d'expérimentations au carbone 14, et comprenant également le processus d'internalisation dans la mitochondrie de certains composés. Ce modèle a permis de comparer les flux métaboliques dans un milieu sans sérum avec ceux dans un milieu avec peu de protéines sous différentes conditions d'alimentation. Les résultats sont rapportés dans l'article intitulé : *Low-Protein Medium Affects the 293SF Central Metabolism during Growth and Infection with Adenovirus* et soumis pour publication dans la revue *Biotechnology and Bioengineering*.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE.

1.1 Vue d'ensemble du métabolisme

1.1.1 Influence du glucose et de la glutamine

Le glucose et la glutamine sont les deux principaux nutriments pour la croissance des cellules de mammifères. Lorsque ces nutriments sont alimentés de façon excédentaire, les flux de la glycolyse et de la glutaminolyse sont augmentés résultant en l'accumulation de certains produits (Doverskog et col., 1997). On pense souvent que le glucose est le principal nutriment utilisé par la cellule mais dans plusieurs études, on rapporte que les cellules de mammifères tirent la majeure partie de leur énergie par l'oxydation de la glutamine (Fitzpatrick et col., 1993; Petch et Butler, 1994; Sharfstein et col., 1994). Portais et col. (1996) ainsi que Schmid et Keller (1992) ont démontré que la glutamine avait un effet stimulateur sur la glycolyse mais d'autres études démontrent que le glucose stimule la consommation de glutamine (Sharfstein et col., 1994). Hu et col. (1987) ainsi que Miller et col. (1989) ont par ailleurs démontré, contrairement aux études précédentes, qu'à plus forte concentration en glutamine, on inhibe l'oxydation du glucose. Cependant, Ljunggren and Haggstrom (1994) ont trouvé que la consommation de glutamine était augmentée pour une lignée d'hybridomes en

restriction de glucose. Jenkins et col. (1992) ont aussi remarqué que la baisse de consommation de glucose et le début de la phase de déclin coïncidait avec la disparition de la glutamine du milieu dans une lignée d'hybridomes. Ils ont cependant postulé que l'arrêt de l'utilisation du glucose était plutôt dû à la baisse du pH. De même, Vriezen et col. (1997) ne rapportent pas d'augmentation de la consommation de glucose lorsqu'il y a limitation en glutamine. Ils ont également remarqué que peu importe la quantité de glutamine alimentée, le rapport q_{glc}/q_{gln} varie entre 2.5 et 7. D'ailleurs, dans Zeng et col. (1998), on rappporte que le rapport q_{gln}/q_{glc} est fonction de la concentration résiduelle de glucose. Par ces études, on peut conclure que le métabolisme du glucose et de la glutamine sont intimement liés. Il n'est cependant pas clair si la glutamine stimule ou inhibe la glycolyse ou si c'est le glucose qui influence la glutaminolyse.

La figure 1.1 détaillée suivante présente les principales voies métaboliques du glucose et de la glutamine.

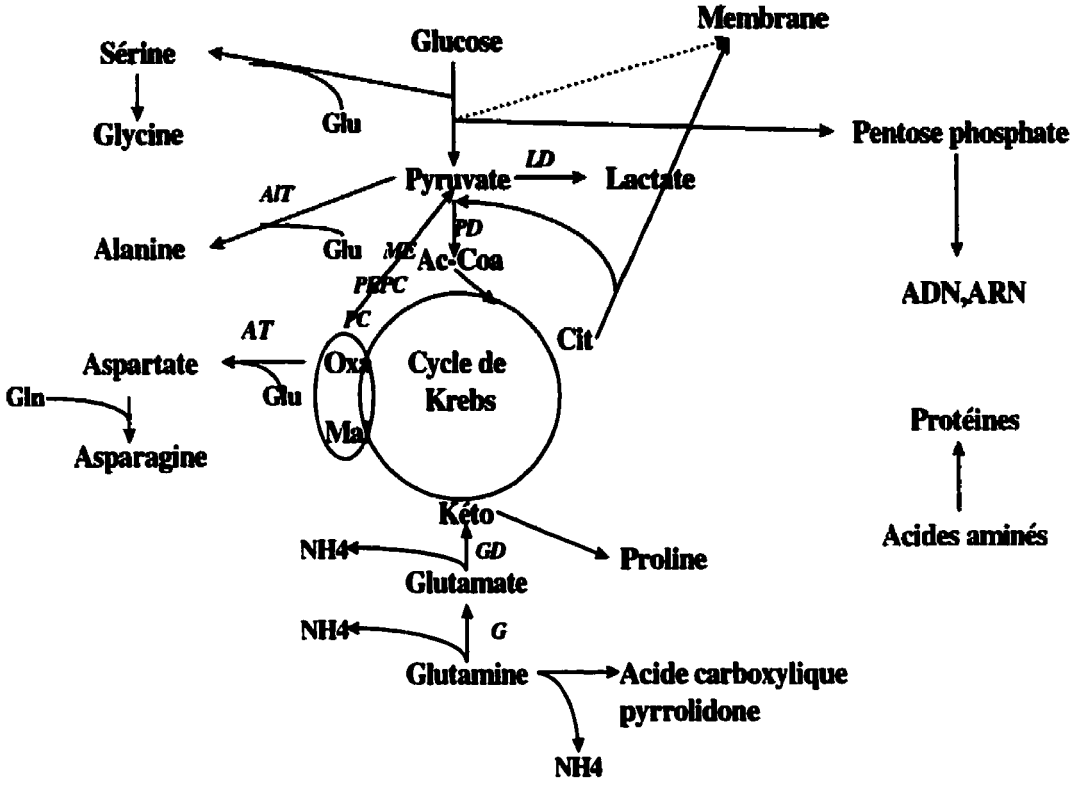


Figure 1.1 Métabolisme général du glucose et de la glutamine

1.1.2 Produit du métabolisme du glucose et de la glutamine.

En général, les principaux métabolites de la glutamine sont l'aspartate et le citrate, si la concentration de pyruvate provenant du glucose est suffisante. Tandis que pour le glucose, il est reconnu que le principal métabolite est le lactate. Lanks and Li (1988) ont démontré par une étude sur différentes lignées cellulaires qu'elles produisent en majorité du glutamate, de l'alanine, de la proline et de l'aspartate en concentration 100 fois plus grande qu'à l'intérieur de

la cellule. En fait l'alanine et l'aspartate serviraient de réservoir à ammonium, enlevé de la glutamine et du glutamate (Sharfstein et col., 1994). Dans une culture cuvée (batch), en plus des 4 produits précédents, la sérine est également considérablement produite selon Ljunggren et Haggstrom (1994). Petch et Butler (1994) rapportent une étude sur des hybridomes dans laquelle la glutamine produit en effet du CO_2, du NH_4, de l'alanine, de l'aspartate et du lactate, mais également du citrate, du malate et du pyruvate.

Pour une lignée mutante CHO (Chinese Hamster Ovary cells) n'effectuant pas la glycolyse, Lanks et Li (1988) ont démontré que les productions de pyruvate, de lactate et de citrate habituellement dérivée du glucose étaient de beaucoup réduites. Tandis que les productions d'aspartate et de CO_2 étaient augmentées dans ce cas démontrant qu'en l'absence de pyruvate dérivé du glucose, la cellule oxyde la glutamine et produit surtout de l'aspartate au lieu du citrate. Ils n'ont pu conclure sur l'origine de l'alanine, s'il venait de la glutamine ou était favorablement produit lorsque le pyruvate était limitant. Ljunggren et Haggstrom (1994) ont montré que la production de lactate est réduite autant en limitation de glucose ($Y_{lac/glc}=1$) que de glutamine. Hu et col. (1987) ont observé également une réduction de la production de lactate à basse concentration de glucose, tandis que la consommation d'oxygène et de glutamine est augmentée. La réduction de la production de lactate à bas niveau de glucose est en général

reconnu (Glacken et col., 1986; Hu et Oberg, 1990; Kurokawa et col., 1994; Nadeau et col., 1996; Xie et Wang, 1994; Zhou et col., 1995). Dans la même étude, Hu et col. (1987) rapportent que la production d'ammoniac et d'alanine est de beaucoup réduite en limitation de glutamine, ainsi que la production d'asparagine et de proline. La formation de sérine et de glycine est favorisée en limitation de glucose. Ils suggèrent que la formation de sérine est due à l'alanine se convertissant en pyruvate. De la même façon, Sharfstein et col. (1994) ont démontré que la consommation de glutamine et la production d'alanine diminuaient à la suite d'une baisse de concentration en glutamine, suivie d'une augmentation de production de lactate. Ljunggren and Haggstrom (1992) ont effectué une culture en cuvée alimentée à basse concentration de glutamine. Ils ont constaté une diminution de la formation d'ammoniac. Ils ont relié cet effet au K_m , soit la constante de vitesse pour la glutaminase, qui est de l'ordre de 2.2-4.5 mM de glutamine. Dès lors, une baisse de la concentration de glutamine affecte considérablement le taux de réaction, sans pour autant affecter les taux de réactions biosynthétiques qui ont des K_m beaucoup plus bas. Une autre conséquence est la réduction de la glutaminolyse et la formation d'alanine. Pour une lignée d'hybridomes, Schmid et Keller (1992) ont fait une variation échelon de la concentration en glutamine à l'entrée. Quand la concentration en glutamine augmente, la consommation augmente aussi. Il semble qu'il y ait plus d'alanine, de proline, de lactate et d'ammoniac produits, tandis que le glutamate, l'aspartate

et l'asparagine ne sont pas affectés. Intracellulairement, la glutamine, le glutamate, la proline et l'alanine sont plus élevés, mais également le lactate, le pyruvate, le fumarate et le malate.

Savinell et Palsson (1992) rapportent également une autre étude qui démontre que la production de lactate est due à une accumulation des équivalents redox (NADH) dans le cytoplasme à cause d'une limitation au niveau de l'activité de la navette malate-aspartate pour le transport du NADH dans la mitochondrie. Dès lors ceci peut expliquer la préférence des cellules pour la glutamine dans certaines conditions de culture.

1.1.3 Résumé

Le métabolisme des cellules de mammifères peut se résumer ainsi. La cellule génère des sous-produits, principalement le lactate, l'ammoniac et l'alanine. Ce phénomène s'explique par la faible efficacité de la navette malate-aspartate (Figure 1.2) pour le transport des équivalents réducteurs (NADH) dans la mitochondrie. Dès lors, il y a une accumulation de NADH produit par la glycolyse dans la cellule et celui-ci doit être régénéré à partir du pyruvate en se convertissant en lactate. Par cette étude, il semble évident que le NADH produit par la glycolyse doit être régénéré par la formation de lactate ou alors il en

résulte une baisse de la viabilité. La quantité de pyruvate qui entre dans le cycle de Krebs est donc faible par rapport à l'entrée de glutamate qui se fait par la glutaminolyse. L'azote libéré par la glutaminolyse doit également être éliminé et cela se fait principalement par les voies de transamination, dont le pyruvate en alanine, ou encore par la formation d'aspartate à partir d'oxaloacétate, réduisant d'autant plus la quantité de pyruvate accessible pour le cycle de Krebs. Ces deux réactions sont accompagnées de la dégradation du glutamate en α-cétoglutarate. Cependant ces réactions sont réversibles et ces composés pourront éventuellement être réutilisés. Sanfeliu et col. (1997) ont mis l'oxamate un inhibiteur du *lactate déshydrogénase*. A 40 mM de cet inhibiteur on observe une réduction de la viabilité, de la consommation de glucose et de la production de lactate.

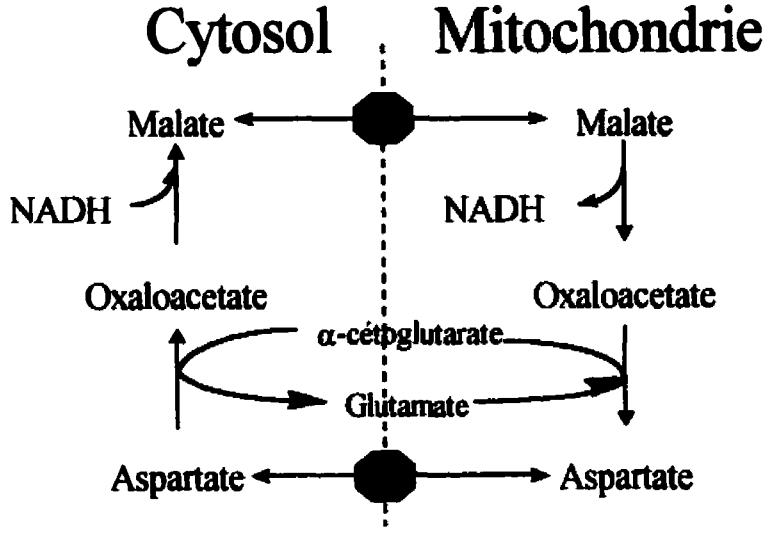


Figure 1.2 Navette malate-aspartate

Une étude précédente sur les cellules 293 démontre qu'à l'instar des ces études, il y a consommation principalement de la glutamine, de la sérine, de l'aspartate, mais également production de glutamate, d'alanine et d'asparagine (Nadeau, 1995). En alimentation semi-continue de glucose, on a cependant observé une consommation du glutamate et de l'aspartate.

On constate qu'en réduisant le taux d'alimentation de la glutamine, on réduit la production de certains sous-produits tel l'ammoniac et le lactate, potentiellement toxique, mais également l'alanine, la proline, l'asparagine et éventuellement l'aspartate. Mais également la réduction du taux d'alimentation de glucose semble diminuer la production de lactate, tout en favorisant la production de sérine, de glycine et d'aspartate. Cependant la réserve de pyruvate accessible au cycle de Krebs diminuerait également.

1.2 Principaux flux

Bonarius et col. (1995) ont fait une analyse des flux dans des hybridomes selon une méthode qui sera explicitée plus loin. Ils en sont arrivés à plusieurs conclusions :

- Plus de 90% du flux de carbone passe par la voie du pentose phosphate, mais est retourné par la suite dans la glycolyse;
- Dans un milieu non-optimal, on observe la formation d'alanine, de lactate et de proline et une activité plus grande des aminotransférases ;
- L'oxydation du pyruvate est faible ;
- La majorité du citrate est converti en acides gras ;
- Le flux de glutamate vers l'∝-cétoglutarate par le glutamate déshydrogénase est faible et même négatif ;
- La transhydrogénation est active (conversion du NADH en NADPH);
- La majorité du CO_2 produit provient du pentose phosphate et de l'enzyme malique.

Voyons plus en détail les principales voies métaboliques.

1.2.1 Glycolyse et PP

Une revue de Newland et col. (1990) rapporte que les cellules transformées ont de hauts taux de glycolyse à forte concentration de glucose mais peuvent s'adapter en conséquence à de plus faibles concentrations pour maintenir les mêmes taux de croissance. Fitzpatrick et col. (1993) ont fait une étude très

poussée du métabolisme du glucose et de la glutamine dans une lignée d'hybridomes. Ils ont trouvé entre autres que le glucose était surtout glycosylé à 96%. Similairement Sharfstein et col. (1994) et Paredes et col. (1998) ont trouvé une valeur de 92%. Sharfstein et col. (1994) ont trouvé que le taux de transport du glucose est non-limitant par rapport à son métabolisme. L'étape limitante serait en fait catalysée par l'*hexokinase*.

De même, Petch et Butler (1994) affirment que le glucose passe surtout par la glycolyse, et un peu par la voie du pentose phosphate et le cycle de Krebs. Fitzpatrick et col. (1993) observent également un faible taux de passage dans la voie des pentoses phosphates (environ 3,4%). Selon Mancuso et col. (1994), l'activité du *pyruvate déshydrogénase*, pyruvate en acétyl-CoA, devrait être plus élevée, puisque cette voie génère plus d'ATP, que celle du *pyruvate carboxylase*, pyruvate en oxaloacétate, mais en général, ce n'est pas le cas. Neermann et Wagner (1996), Paredes et col. (1998) et Sharfstein et col. (1994) observent, quant à eux un plus haut passage dans la voie des PP soit 8% ainsi qu'une activité conséquente de la *pyruvate déshydrogénase*. Paredes et col. (1998) expliquent cela par le fait que lorsque la cellule consomme beaucoup de glutamine l'activité de cet enzyme diminue. Une étude avec le carbone 13 sur les cellules de gliome C6 a été faite par Portais et col. (1996). Cette étude démontre que le glucose joue un faible rôle dans le cycle de Krebs puisqu'on observe une faible activité du

pyruvate carboxylase.

L'étude de Lazo (1981) avec des cellules de carcinome confirme les précédents résultats. En effet, ils rapportent que 93% du glucose est transformé en lactate, que 0,7% est utilisé dans la voie des pentoses phosphates, 1,5% dans le cycle de Krebs et 2% pour la synthèse de lipides. Le glucose fournit également 78% de l'ATP lorsqu'il est converti en lactate. L'ajout d'acides aminés n'a pas d'effet sur l'utilisation du glucose, par contre l'ajout d'un inhibiteur spécifique au *lactate déshydrogénase*, l'oxamate, a pour effet de diminuer la consommation de glucose et la production de lactate, mais la concentration d'ATP est fortement diminuée dans la cellule.

1.2.2 Pyruvate

Selon Mancuso et col. (1994), les sources de pyruvate sont les suivantes: soit la glycolyse, le cycle du pentose phosphate, la voie du malate et celle de la synthèse de lipides par le citrate. Paredes et col. (1998) ajoutent également que le pyruvate provient de la dégradation de la cystéine (1,5%) et de la sérine (0,2%). Par des études de glucose et glutamine marquées, Mancuso et col. (1994) ont trouvé que 76% du pyruvate provient directement de la glycolyse. Le flux du pentose

phosphate au pyruvate est de 4% seulement. Sharfstein et col. (1994) ont trouvé que le rapport lactate/glucose était à 2.05 mol/mol. Ceci indique que le lactate provient d'autres sources tel le glutamate par la voie du malate (*malate décarboxykinase*).

Le pyruvate se dégrade surtout en lactate à cause d'une forte activité de l'enzyme *lactate déshydrogénase,* qui catalyse cette réaction. Tandis que son entrée dans le cycle de Krebs n'est pas très élevée à cause d'une faible activité des enzymes *pyruvate carboxylase* et *pyruvate déshydrogénase.*

1.2.3 Glutaminolyse

Newland et col. (1990) rapportent que la glutamine dans les fibroblastes et les cellules HeLa est surtout oxidée et produit 40% de l'énergie de la cellule. Leur groupe stipule que l'entrée du glutamate dans le cycle de Krebs se fait surtout par *l'alanine aminotransférase,* tandis que d'autres groupes donnent plus d'importance à l'*aspartate déshydrogénase.* Tandis que le pyruvate, transformé par la suite en alanine, est formé par le malate sous l'action de l'enzyme malique (*malate décarboxykinase).* Jenkins et col. (1992) ont montré que la déamination de la glutamine par la *glutaminase* est la première étape. L'activité de cet enzyme

diminue énormément lorsqu'il n'y a plus de glutamine dans le milieu. Ils ont remarqué que le *glutamate transaminase* était plus élevé que le *glutamate déshydrogénase*. Certains auteurs ont également trouvé que l'*aspartate transaminase* était plus élevé que l'*alanine transaminase*, d'où une formation accrue d'aspartate, ces deux enzymes étant pourtant plus élevés que l'*aspartate déshydrogénase* (Fitzpatrick et col., 1993). Selon les mêmes auteurs, jusqu'à 36% serait complètement oxydé par le cycle de Krebs. Selon eux, l'étape limitante serait le transport de la glutamine, ce mécanisme de transport pourrait cependant être stimulé à plus faible concentration en glutamine. Ils suggèrent également eux aussi que la voie de transamination en alanine ou aspartate (*aspartate et alanine transaminase*) est préférée à la voie du *glutamate déshydrogénase*. La glutamine contribuerait pour 30 à 98% de l'énergie selon la lignée cellulaire. Sharfstein et col. (1994) ont observé peu de glutaminolyse, c'est-à-dire de production de glutamine en pyruvate. Ils stipulent donc que le rôle de la glutamine est anabolique et que celui du glucose est à la fois catabolique et anabolique. Collins et col. (1998) ont fait des études sur la consommation de la glutamine. Selon eux la glutamine, servirait à alimenter le pool de glutamate nécessaire pour l'incorporation de cystine et la formation de glutathione. Ils n'ont pas déterminé de corrélation entre une incorporation accrue de glutamine et une activité oxydante accrue ou encore une activité de la *glutaminase* accrue. Par contre, ils observent une corrélation entre l'influx de glutamine et l'efflux de glutamate.

Petch et Butler (1994) stipulent que la glutamine entre au niveau de l'α-cétoglutarate et sort de la mitochondrie sous forme de malate qui sera ensuite transformé en aspartate tout en produisant un NADH. Ce procédé augmente le ratio NADH/NAD^+ ce qui fait que le pyruvate se transforme en lactate. Ceci est consistant avec le fait que la consommation de glucose cesse lorsque la glutamine est épuisée du milieu, puisqu'il n'y a plus de production de NADH par la glutaminolyse.

La glutamine est normalement la principale source d'ammoniac, mais lorsqu'on réduit la quantité de glutamine, il semble que la cellule utilise d'autres acides aminés qui produisent aussi de l'ammoniac en particulier l'asparagine, l'aspartate, l'isoleucine, la lysine, la valine, la phénylalanine, la thréonine et la tyrosine (Mancuso et col., 1998). La même étude montre qu'une réduction de la glutaminolyse affecte la consommation d'oxygène et la production d'ATP sans affecter la consommation de glucose. De même Vriezen (1997) montre que d'autres acides aminés peuvent être utilisés lorsqu'il y a limitation en glutamine. Lazo (1981) rapporte que la glutamine est oxydée 20 fois plus que le glucose mais ne peut remplacer ce dernier complètement, car cet acide aminé ne produit pas autant d'ATP. D'autres acides aminés sont cependant oxydé comme la leucine à cause de la forte production de lipides et de protéines dans les cellules

transformées.

Doverskog et col. (1997) rapportent que la capacité de synthétiser la glutamine dépend de la souche de la cellule, certaines cellules possèdent la *glutamine synthétase* tandis que d'autres non. Il en va de même pour d'autres acides aminés tel la glycine. Ils rapportent que le *glutamate déshydrogénase* semble être absent des cellules animales en culture. Mais cet enzyme pourrait être activé lorsqu'il y a nécessité d'acides aminés pour un apport énergétique. Paredes et col. (1999) ont introduit dans un hybridome, le gène de la *glutamine synthétase*, ils réussissent ainsi à éliminer complètement la formation d'ammoniac, ils réduisent aussi la formation de lactate ainsi que la consommation de glucose. Cependant le ratio lactate/glucose reste invarié, car suite à une réduction de la consommation de glucose, on réduit également la formation de lactate.

Dans Zeng et col. (1998), on rapporte que le rapport NH_3/gln varie beaucoup d'une cellule à l'autre et n'est pas fonction de la glutamine résiduelle. Tandis que le rapport des acides aminés totaux (TAA) consommés sur la glutamine (TAA/gln) ainsi que le ratio $NH4^+$/gln est fonction de la glutamine résiduelle.

1.2.4 Cycle de Krebs

Les sources d'acétyl-CoA sont le pyruvate, et la dégradation de la tyrosine, lysine, leucine et isoleucine, dans une proportion de 26,6 à 29,9% (Paredes et col., 1998; Sharfstein et col., 1994). L'acétyl-CoA se combine avec l'oxaloacétate pour former du citrate. Ils rapportent que 38% à 48% va vers la formation de l'α-cétoglutarate tandis que le reste va vers la formation de lipides. Tout dépend en fait du taux de croissance et de la composition en lipides de celles-ci. Mancuso et col. (1994) stipulent que 47% de l'α-cétoglutarate proviendrait de la glutamine et du glutamate et 53% du citrate. Paredes et col. (1998) rapportent quant à eux des valeurs de 57% et 43% respectivement. Tandis que Sharfstein et col. (1994) rapportent des valeurs de 27% et 70%.

Paredes et col. (1998) et Sharfstein et col. (1994) rapportent que 10% du succinyl-CoA provient des acides aminés isoleucine, valine, méthionine et thréonine. Tandis que 3% à 6% du succinate proviendrait de la dégradation de la tyrosine et de l'isoleucine.

Mancuso et col. (1994) négligent complètement l'apport des acides aminés dans

le cycle de Krebs dans leur modèle métabolique en démontrant que les deux tiers des acides aminés sont utilisés dans les voies anaboliques.

Pour éviter l'accumulation d'intermédiaire du cycle de Krebs, il y a trois sorties possible: le malate en pyruvate par le *malate décarboxykinase* ou enzyme malique, l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate (*PEP carboxykinase*) et le citrate vers la formation de lipides. Sharfstein et col. (1994) ont trouvé que la glutamine qui entrait dans le TCA sortait surtout par la voie du citrate. Ils rapportent cependant que 31% du malate est exporté par la voie de l'enzyme malique. Ceci est corroboré par Paredes et col. (1998) qui rapportent une valeur de 25%.

1.2.5 Résumé

En résumé, on peut dire que le glucose se transforme surtout en lactate à cause d'une forte activité du *lactate déshydrogénase* et une faible activité du *pyruvate déshydrogénase* bloquant l'entrée de celui-ci dans le cycle de Krebs. Certains auteurs expliquent le phénomène par une accumulation du NADH dans le cytoplasme à cause d'une faible activité de la navette malate-aspartate. La glutamine est convertie en glutamate par la *glutaminase* et donne une molécule d'ammoniac. Par la suite le glutamate fait son entrée dans le cycle de Krebs grâce

à des transaminases et le relargage d'une molécule d'ammoniac est moins probable à ce niveau. Les deux réactions les plus plausibles sont celles de l'*alanine aminotransférase*, qui transforme le pyruvate en alanine, et celle de l'*aspartate déshydrogénase*, qui transforme l'oxaloacétate en aspartate, d'où l'accumulation de ces composés dans les milieux de culture. Le cycle de Krebs doit être balancé entre un apport d'acétyl-CoA et d'α-cétoglutarate. L'acétyl-CoA provient du pyruvate et/ou de certains acides aminés tandis que l'α-cétoglutarate provient soit du citrate ou du glutamate. Le pyruvate quant à lui, provient principalement du glucose mais peut également provenir de la glutamine qui est évacuée du cycle de Krebs par la voie de l'enzyme malique.

1.3 Modélisation

On peut classer les modèles selon différentes catégories: ségrégatifs vs non-ségrégatifs, structurés vs non-structurés et probabilistes vs non-probabilistes. Un modèle ségrégatif considère une population de cellules hétérogènes. Par exemple, il peut tenir compte de la phase du cycle dans laquelle se trouve la cellule. Un modèle non-structuré considère la cellule comme une boîte noire et un modèle structuré incorpore des concepts biologiques en incluant des bilans de masse et d'énergie et certains taux de réactions et de transport. Un modèle

probabiliste est basé sur une distribution statistique de la population. Par exemple, on peut modéliser l'entrée d'une cellule de la phase G1 à la phase S par une loi de probabilité. Nous allons en particulier discuter des modèles structurés puisque c'est ce type de modèle qui fera l'objet de ce travail.

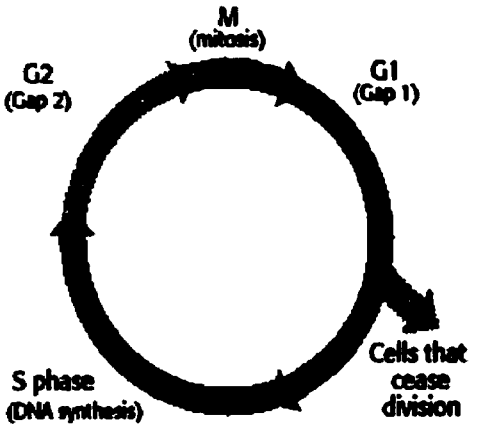


Figure 1.3 Cycle cellulaire.

Un des premier modèle structuré proposé pour les cellules eucaryotes, fût celui de Batt et Kompala (1989). Ils proposent un modèle qui sépare les nutriments en quatre sous-groupes: les acides aminés, les nucléotides, les protéines, et les lipides et en trois produits: l'ammoniac, le lactate et l'anticorps. Ces constituants forment ainsi 7 équations différentielles composées de termes de saturation et de rétro-contrôle. Le modèle montre entre autres que le glucose forme principalement les lipides, les acides aminés et les nucléotides et au niveau énergétique, il fermente en lactate ou emprunte le cycle de Krebs ou le cycle du

pentose phosphate pour former certains carbohydrates dont ceux inclus dans les nucléotides. La glutamine produit surtout des acides aminés, des nucléotides et des lipides mais fournit également une part substantielle de l'énergie (30-65%) et produit surtout le lactate et l'ammoniac. Ce modèle ne comprend cependant pas de bilans au niveau énergétique. Hansen et col. (1993) ont utilisé ce modèle pour des cellules de mammifères afin de simuler l'effet de variation de concentration au niveau de l'alimentation pour les acides aminés, la glutamine, le glucose et de simuler l'effet de l'intervalle de contrôle en mode d'alimentation semi-fermée.

Wu et col. (1992) proposent un modèle beaucoup plus structuré avec 18 composants: les acides aminés essentiels, les acides aminés non-essentiels, la glutamine, le glucose, les composants de la membrane, l'ADN, l'ARN ribosomal, l'ARN de transfert, l'ARN messager, les protéines, l'ammoniac, la membrane, le lactate, l'ion hydrogène, l'ATP et l'énergie. Comme précédemment, une forte proportion de glucose consommé forme du lactate à haute concentration de glucose. A basse concentration de glucose, une plus forte proportion de glucose forme des nucléotides, par la voie du pentose-phosphate, des acides aminés et des membranes (lipides). Les équations différentielles, décrivant la variation de concentration dans le temps des composants énumérés ci-haut, comportent un terme maximal, un terme de saturation, un terme de rétrocontrôle, un terme de transport, et un terme de dégradation dans certains cas. Une originalité du

modèle est qu'il possède un paramètre de dominance pour l'utilisation du glucose ou de la glutamine. Le modèle possède également un bilan d'énergie sur les réactions anaboliques, cataboliques et sur le maintien du potentiel membranaire.

Barford et col. (1992) proposent également un modèle très structuré. Le modèle identifie les principales voies métaboliques comme étant: la glycolyse, la fermentation en lactate, le cycle de TCA, la respiration et la glutaminolyse. Ces voies sont sources d'énergie et celle-ci est utilisée pour la formation d'anticorps, de membranes biologiques, d'ARN et d'ADN ainsi que de protéines. Tous ces produits peuvent être subdivisés en protéines, lipides ou carbohydrates. Les acides aminés ont été séparés en 6 familles : glutamate (glutamate, glutamine, proline et arginine), aspartate (aspartate, asparagine, méthionine, lysine, thréonine et isoleucine), sérine (sérine, cystéine et glycine), pyruvate (pyruvate, alanine, valine et isoleucine), phénylalanine (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) et histidine. De plus comme autres nutriments, on considère les sucres, les lipides et l'oxygène. Comme produit, on a le lactate, le pyruvate, les anticorps, le dioxyde de carbone et l'ammoniac. Ils ont également établi certains branchements importants comme étant le glucose, le fructose-6-phosphate, le ribose-5-phosphate, le pyruvate, l'α-cétoglutarate et l'oxaloacétate. Le modèle inclut également des équations de taux de transport des nutriments, de taux de

conversion des nutriments, de la production d'énergie, et de la croissance cellulaire basée sur un rendement par rapport à l'ATP produit. Les taux de production sont également dérivés de cette manière en utilisant des rendements par rapport à la biomasse.

Savinell and Palsson (1992) ont développé une matrice stoechiométrique des principales voies métaboliques, afin de modéliser les besoins cellulaires en carbone, azote et énergie lors de la croissance sur différents substrats. Ils ont différencié les réactions biochimiques qui avaient lieu dans la cellule et dans la mitochondrie. Leur modèle a permis de tirer des conclusions intéressantes mais théoriques tel le fait que la croissance sur les intermédiaires du glutamate donne les plus hauts taux de croissance soit l'arginine, la proline, le glutamate et la glutamine. Également, ils ont remarqué qu'à consommation normale d'oxygène, le rapport q_{gluc}/q_{gln} varie entre 2 et 5, cela a d'ailleurs déjà été démontré expérimentalement. Lorsque l'oxygène disponible est illimité, le ratio optimum est de 1 à 2 démontrant que la valeur énergétique du glucose est égale à celle de la glutamine. Paredes et col. (1998) ont développé un modèle similaire tout en réduisant le nombre de flux existants.

A partir de ces modèles très structurés du métabolisme, on a pu développer un outil soit l'analyse des flux métaboliques. Le but est de connaître la distribution

des flux dans le métabolisme afin de pouvoir diriger ces flux soit par modification génétique ou par contrôle du milieu environnant. Les méthodes suivantes sont utilisées dans l'estimation de flux :

- Bilan de matière et d'énergie
- Études par marquage avec des isotopes du carbone. Beaucoup de ces études sont rapportées dans la première partie de ce document, dans le métabolisme du glucose et de la glutamine.

Varner and Ramkrishna (1999) rapportent que l'analyse des flux métaboliques peut être subdivisé en trois parties : bilan de masse ; NMR ; GC/MS (chromatographie et spectrométrie de masse) et finalement une dernière méthode qui permet de combiner les deux premières. Normalement l'analyse des flux métaboliques doit se faire dans des conditions de chemostat mais on rapporte qu'il est possible d'effectuer ce genre de calcul en cuvée alimentée en assumant qu'on a un régime pseudo-stationnaire. Dans notre cas, comme il s'agit d'études sur la cellule 293 qui sera par la suite infectée en transitoire, il faut donc vérifier la validité de ce régime ce qui sera fait un peu plus loin. Les méthodes d'analyse au NMR ou GC/MS permettent d'aller chercher des contraintes supplémentaires, par exemple dans les nœuds critiques du modèle. Varner and Ramkrishna (1999) soulignent que ce type de calcul ne permet pas de décrire

l'évolution dynamique du système. Pour cela il faudrait ajouter des termes de cinétique au modèle, tels rendements spécifiques, termes de régulation ou encore taux de croissance.

1.4 Analyse des flux métaboliques

La première étape afin de pouvoir calculer les flux métaboliques de la cellule, qui sont en fait le reflet des taux de réaction biochimique à l'intérieur de celle-ci, est de rassembler les principales réactions biochimiques. Le modèle métabolique ainsi développé sera élaboré un peu plus loin. A ces réactions biochimiques sont associés des nutriments ou des produits de la croissance, soit métabolites, qu'il faut être capable de mesurer, afin d'en évaluer les taux de consommation et de production. Pour calculer les flux, la méthode suivante est proposée dans la littérature.

1.4.1 Méthodes mathématiques

Si on effectue un bilan autour des cellules du bioréacteur, on a :

$$\frac{dS_i}{dt} = K_{ij}F_j - DS_i + Q_i - P_i$$

où n: nombre de métabolites impliqués, m: nombre de réactions biochimiques impliquées, S : matrice de la concentration des métabolites intracellulaires (n X 1); K : matrice stœchiométrique (n X m); F : matrice des flux métaboliques (m X 1); D : variation du volume des cellules; Q-P : matrice des taux de consommation et de production (n X 1).

Si on suppose que la concentration des métabolites ne varie pas à l'intérieur des cellules, et que la variation du volume de la cellule est faible par rapport aux taux de réaction. On a :

$$K_{ij}F_j = -Q_i + P_i$$

Si on exprime en taux spécifiques on a :

$$K_{ij}f_j = -q_i + p_i$$

1.4.2 A la recherche de contraintes.

Le problème avec le calcul de flux métaboliques est la présence de voies métaboliques cycliques, qui rendent le système d'équation sous-déterminé, dès lors on privilégie souvent l'approche du carbone marqué. Schmid et Keller (1992) ont comparé les deux approches de calcul ci-haut mentionnées. Ils ont observé des différences notables entre les deux méthodes. Pour les bilans de matières, ils ont utilisé des bilans séparés pour le NADH et NADPH car ils ne considèrent pas la réaction de transhydrogénation entre le NADPH et le NADH. Ils observent une grande différence, jusqu'à 2 fois, entre les mesures avec carbone marqué et celles avec bilans de matière. Il est donc avantageux d'utiliser l'estimation de flux par carbone 13, cependant le système est surdéterminé et ne peut se résoudre analytiquement. Bonarius et col. (1997) ont également comparé différentes approches de calcul. Leur système d'équations contient 18 flux et il est possible de visualiser l'espace de solutions en posant les conditions limites suivantes sur les flux qui ne sont pas réversibles tels la voie du pentose phosphate, le pyruvate décarboxylase (pyruvate vers acétyl-CoA) ainsi que le pyruvate carboxylase (pyruvate vers oxaloacétate).

Ceci a pour effet de réduire le système à deux singularités. En ajoutant des bilans sur l'ATP et le NAD(P)H on peut résoudre le système d'équation. Ils stipulent que l'ajout d'un bilan sur l'ATP produit et consommé peut améliorer l'observation du système d'équations. Cependant il s'agit toujours d'une

approximation puisque l'énergie pour la maintenance et le rapport P/O ne peuvent être que sommairement estimés. En ce qui concerne le NADPH, on constate avec l'analyse du carbone marqué que plus de 65% de ce métabolite passe par la voie d'oxydation phosphorylative. Bonarius et col. (1997) préfèrent utiliser l'optimisation linéaire en maximisant l'ATP et en minimisant la production de NADH. Ils trouvent des solutions à peu près équivalentes à l'analyse de flux par carbone marqué. Savinell and Palsson (1992) préfèrent minimiser la production de NADH ainsi que celle de l'ATP. Dans un article précédent, Bonarius et col. (1996) utilisent le CO_2, le NH_3 et le NAD(P)H comme seuls cométabolites utilisables pour l'estimation de flux. Afin d'estimer convenablement les flux, il faut coupler le bilan de NADH à la mesure de l'OUR, afin de connaître plus exactement la quantité d'ATP produit.

En résumé, afin que le modèle soit observable, on peut donc utiliser la mesure de certains cofacteurs: le CO_2, qui ne permet pas cependant d'augmenter le rang de la matrice, l'ATP, mais il faut connaître le rapport P/O, finalement, on peut utiliser un bilan de masse sur le NADH et NADPH couplés ensemble afin d'éviter le problème de la transhydrogénation. Également les réactions irréversibles peuvent servir de contrainte et on peut aussi choisir de maximiser le NADH, minimiser l'ATP ou la somme des carrés des flux, quoique ces solutions restent des solutions optimales (Bonarius et col., 1997).

Xie and Wang (1996) ont effectué un bilan de matière, en simplifiant le métabolisme cellulaire en 26 flux principaux. A l'aide de données expérimentales et des hypothèses suivantes, ils ont réussi à résoudre ce système:

- Les acides aminés sont utilisés pour la formation de protéines seulement car ils contribuent peu à fournir de l'énergie, excepté pour la glutamine;
- Le flux du glycérol-3-phosphate vers la formation de lipides est omis puisque celui-ci contribue peu par rapport aux acides gras dérivés de l'acétyl-CoA;
- Ils ont regroupé ensemble toutes les voies possibles de la conversion de l'oxaloacétate vers le pyruvate en un seul flux;
- Ils considèrent également, qu'il y a juste assez de NADPH produit pour les besoins de la cellule et ne considèrent pas les réactions de transhydrogénation.

Les résultats démontrent que seul l'isoleucine, la leucine et la lysine pourraient contribuer à fournir de l'énergie à la cellule. Ils montrent également que le glutamate subit surtout une transamination, comme déjà décrit par d'autres auteurs. De plus, un surplus de glutamine dans le milieu stimule la cellule à former des acides aminés non-essentiels (NEAA). Une stratégie d'alimentation effective serait donc d'alimenter plus de NEAA afin de réduire la demande en

glutamine et la production d'ammoniac. Xie and Wang (1996) confirment d'autres résultats observés précédemment, soit que 3-8% du glucose se retrouve dans la voie du pentose phosphate, 7-10% pour la production d'alanine et de sérine et de 60-82% pour la production de lactate et la production d'énergie. La production d'énergie via le cycle de Krebs est maximisée en présence d'une faible concentration de glucose, puisque dans ces conditions, une plus forte proportion de glucose passe dans cette voie.

Ils ont terminé leur étude par un article utilisant un bilan d'énergie. Ils ont pu ainsi déterminer la quantité d'ATP produit. L'ATP provient principalement du cycle de Krebs via la phosphorylation oxydative. Également une importante fraction est produite par la glycolyse surtout en mode cuvée où il y a une importante production de lactate. Dès lors, l'OUR ne serait pas le paramètre adéquat pour l'estimation de la croissance, puisque l'OUR est un paramètre de la production de l'ATP à partir du NADH et que dans des conditions de hauts taux de glycolyse, beaucoup d'ATP est produit directement et pourra aussi servir .

Lors de la construction du modèle, il faut faire attention à plusieurs choses. Comme le proposent Vanrolleghem et Heijnen (1998) à partir de plusieurs modèles plausibles, on doit s'assurer que celui-ci n'est pas singulier i.e. qu'il est possible de calculer tous les flux, on doit ensuite mesurer les paramètres

inconnus tels coefficients stœchiométriques et rendements énergétiques s'il y a lieu et vérifier que les réactions irréversibles donnent des résultats qui vont dans le bon sens au point de vue thermodynamique. Il est toujours préférable par la suite de vérifier avec d'autres données, le modèle ainsi évalué.

En résumé, en combinant des modèles structurés du métabolisme cellulaire avec des bilans de masse et d'énergie, on arrive facilement à caractériser les principaux flux du métabolisme. On peut obtenir également des informations supplémentaires en procédant à des analyses au carbone marqué. Dernièrement Takiguchi et col. (1997) ont utilisé un modèle simplifié qu'ils ont pu utiliser en temps réel afin de voir la production de lysine, simplement avec quatre mesures soit le nombre de cellules, le glucose, l'oxygène et le dioxyde de carbone.

1.5 Évaluation du modèle

1.5.1 Rang de la matrice stœchiométrique.

Le rang d'une matrice (k) donne une mesure du nombre d'équations redondantes par k-m où m est le nombre d'équations du système. Un nombre k-m positif définit le système comme redondant et k-m négatif définit le système

comme sous-déterminé, tous les flux ne pourront être calculés. van der Heijden et col. (1994) définissent une matrice redondante lorsque deux taux ou plus pourront être balancés indépendamment. Un système déterminé signifie que tous les flux pourront être calculés, tandis que sous-déterminé signifie qu'au moins un flux ne pourra pas être calculé. Un système peut être à la fois redondant et sous-déterminé.

1.5.2 Conditionnement de la matrice.

Le conditionnement de la matrice donne une idée de la propagation de l'erreur lorsqu'on mesure les taux de consommation ou de production. Un conditionnement inférieur à 100 signifie habituellement que la matrice est bien conditionnée (Zupke et Stephanopoulos (1995) et Bonarius et col. (1997)). On utilise habituellement le nombre de conditionnement 2-norme. Il représente la somme de toutes les erreurs normalisées sur la somme de tous les flux. Le nombre de conditionnement donne une idée de l'erreur maximale qu'on peut obtenir dans un système d'équations linéaires (Savinell and Palsson, 1992). Également, la même étude montre que l'erreur était généralement de l'ordre de 1/4 à 1/10 plus petite que celle exprimée par le conditionnement.

1.5.3 Réconciliation et rectification de l'erreur sur les mesures de taux.

Afin de cerner les sources d'erreurs, trois choix s'offrent donc à nous (Romagnoli and Stephanopoulos, 1981) :

1. Faire une analyse théorique de tous les effets sur les mesures (analyse de sensibilité) ;
2. Faire les mesures avec différentes méthodes comportant différentes précisions ;
3. Utiliser un test statistique à l'aide d'équations redondantes du système.

Par test statistique nous signifions celui qui a été développé par Wang and Stephanopoulos (1983). Ils se servent des bilans sur le carbone, l'hydrogène, l'oxygène et l'azote. Il est aussi possible d'utiliser les équations redondantes du système (Nyberg et col., 1999). On a :

$$Ax = b$$

$$b = 0$$

x : matrice des taux de consommation et de production mesurés (dimension nX1);

A : matrice de la composition élémentaire de chacun des composants du modèle (dimension nXm).

$x - \bar{x} = \delta$

x :: vraie valeur;

$\bar{x}$: valeur mesurée;

δ : erreur, suit une distribution normale avec :

$E[\delta] = 0$;

$E[\delta\delta^T] = \varphi$; soit la matrice diagonale de la covariance;

$\varepsilon = A\delta = -A\bar{x}$, soit le résidu

$E[\varepsilon] = AE[\delta] = 0$;

$\phi = E[\varepsilon\varepsilon^T] = A\varphi A^T$

En général, on suppose que φ est une matrice diagonale puisqu'il n'y a pas de corrélation entre les différentes mesures. En réalité, il peut y en avoir, lorsqu'un utilise une méthode d'HPLC pour les acides aminés où toutes les mesures d'acides aminés seront corrélées entre elles. La matrice de la covariance des résidus, ϕ, n'est pas diagonale puisque les résidus sont corrélés entre eux par les équations du modèle métabolique.

En minimisant l'erreur sur le système on arrive à une estimation de celle-ci :

Minimiser $J = \delta^T \varphi^{-1} \delta$ avec $A\delta = \varepsilon$

On obtient:

$\hat{\delta} = \varphi A^T \phi^{-1} \varepsilon$;

$\hat{x} = \overline{x} + \hat{\delta}$;

$\hat{x}$ et $\hat{\delta}$ représente les valeurs estimés proche des vraies valeurs.

Avant de procéder à la rectification des mesures, il faut s'assurer que les mesures ne contiennent pas d'erreurs grossières. Comme première approximation on utilise le critère suivant :

$h = \varepsilon^T \phi^{-1} \varepsilon$ qui suit une distribution χ^2 avec m degrés de liberté.

Cependant ϕ doit être une matrice diagonale. Or ce n'est habituellement pas le cas et le critère suivant s'avérera plus exact :

$h = \hat{\delta}^T \varphi^{-1} \hat{\delta}$ qui suit une distribution χ^2 avec m degrés de liberté.

Dans ce cas le nombre de degrés de liberté est m et non n puisque les valeurs estimées ne sont pas toutes indépendantes entre elles.

Pour un système à deux équations (mesure de C et N, par exemple) et un intervalle de confiance de 90%, h doit être plus petit ou égal à 4.61.

Il existe plusieurs types d'erreurs selon van der Heijden et col. (1994) :

- Erreur dans la mesure d'un ou plusieurs taux: Afin de cerner ce type d'erreur, on peut enlever une ou plusieurs mesures et recalculer h à chaque fois afin de voir si le critère h diminue.
- Erreur dans le modèle: un composé n'est pas inclut ainsi que sa voie biochimique ou sa composition en carbone, hydrogène, oxygène ou azote est mal évaluée ;
- Les variances sont trop faibles, ou le test statistique est trop sensible.

Bonarius et col. (1998) ont utilisé cette méthode afin de cerner les erreurs grossières. Ils ont utilisé les bilans de matière sur le carbone et l'azote. Ils ont utilisé la méthode suivante :

1. Calcul de ε ;
2. Évaluation de φ, la matrice de variance-covariance des mesures.
3. Calcul de $h(\varepsilon)$.

Ils ont pu ainsi évaluer certaines lacunes du modèle notamment au niveau des équations biochimiques concernant la production d'ammoniac.

1.6 Évaluation du qCO_2

Le CO_2 est un cométabolite important dans la culture de cellules animales. Comme il ajoute un degré de liberté au système et permet d'en améliorer l'observation. Il sera d'ailleurs utilisé pour vérifier la validité du modèle proposé. Cependant, il est difficile à mesurer dans les milieux tamponnés au bicarbonate. La méthode suivante est donc proposée afin de faire ces mesures.

Bilan sur le CO_2 dans la phase liquide:

$$V_L \frac{dC_{CO_2}}{dt} = k_L{}^{CO_2} a(C^*_{CO_2} - C_{CO_2})V_L + X_v q_{CO_2} V_L - k_1 C_{CO_2} + k_{-1} C_{HCO_3} C_{H^+}$$

V_L: Volume du liquide

C_{CO_2}: Concentration du CO_2 dans la phase liquide

$C^*_{CO_2}$: Concentration du CO_2 dans le film

$k_L{}^{CO_2} a$: Taux de transfert dans le liquide = 0,89 $k_L{}^{O_2} a$

$X_v q_{CO_2}$:CER (Carbon evolution rate)

$\frac{k_1}{k_{-1}} = K$: Constante de dissociation du H_2CO_3

Aux pH d'opération, le H_2CO_3 est présent sous forme déshydraté soit H_2O + CO_2. Également, le HCO_3^- ne se décompose pratiquement pas en H^+ et CO_3^{--}. C'est pourquoi on ne considère que cette partie de l'équilibre du bicarbonate dans l'évaluation du CER. Lorsque le pH varie peu, on peut dire que l'équilibre est rapidement atteint concernant la dissociation du H_2CO_3. Dès lors :

$$k_1 C_{CO_2} = k_{-1} C_{HCO_3} C_{H^+}$$

Bilan sur la phase gazeuse :

$$\frac{PV_g}{RT}\frac{dx_{CO_2}}{dt} = (x^E_{CO_2} - x_{CO_2})F_g - k_L^{CO_2} a(C^*_{CO_2} - C_{CO_2})V_L$$

$x^E_{CO_2}$: fraction molaire de CO_2 à l'entrée

x_{CO_2} : fraction molaire de CO_2 dans le gaz

V_g : volume du gaz

F_g : débit volumique de gaz

En combinant les deux bilans :

$$V_L \frac{dC_{CO_2}}{dt} = X_v q_{CO_2} V_L + \left((x^E_{CO_2} - x_{CO_2})F_g - V_g \frac{dx_{CO_2}}{dt} \right)\frac{P}{RT}$$

$$\text{mais } V_g \frac{dx_{CO_2}}{dt} \cong 0$$

$$\text{et } V_L \frac{dC_{CO_2}}{dt} << X_v q_{CO_2} V_L \text{ et } \left((x^E_{CO_2} - x_{CO_2})F_g - V_g \frac{dx_{CO_2}}{dt} \right)\frac{P}{RT}$$

Une bonne approximation est donc :

$$X_v q_{CO_2} V_L = -\left((x^E_{CO_2} - x_{CO_2}) F_g\right) \frac{P}{RT}$$

Gray et col. (1996) et Nyberg et col. (1999) utilisent cette approximation, quoique leur culture soit en continu. Ils ajoutent alors un terme pour le CO_2 qui entre avec le milieu frais et le CO_2 qui sort avec le milieu usé. Une étude sur la variation du CO_2 dissous en milieu tamponné avec le bicarbonate, permettra de valider l'hypothèse utilisée ci-haut.

CHAPITRE II : RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

2.1 Méthodologie

Dans cette section, on rapporte les méthodes qui ont été utilisées afin de générer les résultats préliminaires. Ces résultats ont permis de vérifier l'hypothèse de régime pseudo-stationnaire, d'évaluer la composition de la cellule en lipides, carbohydrates, protéines et acides aminés et de valider la méthode de calcul concernant la production spécifique de CO_2.

2.1.1 Cellules et milieu.

Afin d'évaluer l'hypothèse de régime pseudo-stationnaire, on utilise la cellule 293 de deuxième génération (LCA2). Cette cellule exprime en continu les régions E1A, E1B et les ORF 6 et 7 de la région E4 de l'adénovirus de type 5 et permet ainsi la réplication et l'amplification d'un virus délété des régions E1, E3 et E4. Le clone utilisé est plus précisément la 293-5646-5.19 et a été préalablement adapté à la culture en suspension.

Pour les passages on utilise le milieu McClure05, soit un mélange 3 :1 de milieu F12 :DMEM. Le glucose est à 3 g/l et il ne contient pas de glutamine. De plus il est tamponné avec 3,7 g/l de $NaHCO_3$. On y ajoute 2,5% de sérum de veau γ irradié (Sigma réf. C-5155) et des antibiotiques, soit de la puromycine (1 µg/ml) et de la tétracycline (5 µg/l). La quantité de glutamine ajoutée est normalement de 2 mM.

Pour la composition de la cellule, en plus de la cellule décrite précédemment, on utilise également une cellule de première génération, soit la 293SF. Cette cellule exprime en continu les protéines E1A et E1B de l'adénovirus de type 5. Elle a été adaptée à la culture en milieu sans sérum à partir de la 293S. Le clone utilisé est le 293SF-3F6.

Pour les passages, on utilise le LC-SFM préparé à partir du H-SFM (Gibco, Grand Island, NY) et 0,1% (v/v) de lipides (Gibco), 0,1% (v/v) BSA (Intergen Company, Purchase, NY) et 0,1% (v/v) Pluronic F-68 (Gibco).

2.1.2 Dosages des métabolites intracellulaires.

- Récolte d'environ $1x10^7$ cellules dans tube de 1.5ml (Eppendorf) ;

- Centrifugation à 14 000 tours pendant 1 min.;
- Rinçage 2x au PBS glacial (4°C);
- Congélation du culot dans la glace carbonique;
- Congélation à -80°C ;

2.1.3 Préparation de l'échantillon pour analyse des acides aminés

- Décongélation sur glace ;
- Ajout de 0,5 ml à 1 ml d'acide perchlorique glacial 0,5 M ;
- Vortexer et laisser agir 5 minutes sur glace ;
- Analyse au laboratoire sur une colonne de type Beckman.

2.1.4 Préparation des échantillons pour analyses de l'ammoniac, du lactate et du glucose.

- Préparation des culots comme ci-haut mais avec $5x10^7$ cellules ;
- Décongélation;
- Ajout de 0.4 ml d'acide perchlorique glacial 1M ;
- Vortexer immédiatement et laisser agir 5 minutes;

- Ajout de 0.125 ml de K_2CO_3 2M ;
- Ajout de 0.05 ml de TEA 0.5M/EDTA 5mM pH 7.6 ;
- Filtration de l'échantillon, 0,2 µm ou centrifugation ;
- Analyse avec Biolyzer (Kodak).

2.1.5 Analyse de l'ADN et de l'ARN

- Récolte d'environ 2 à $5x10^6$ cellules dans tube de 10 ml (Eppendorf) ;
- Centrifugation ;
- Rinçage 2 fois au PBS glacial ;
- Congélation à -80 si désiré ;
- Ajout d'une solution tris/EDTA (20 mM tris/10 mM EDTA) : 250 µl à 1000 µl;
- Répartition de 250 µl dans des tubes eppendorfs de 2 ml;
- Lyse 0,5% SDS final (solution stock à 10 %) :12,5 µl;
- Incuber 10 min. à 20-37 degrés;
- Ajout de *RNAse* (Transgène) s'il y a lieu à 2 mg/ml final (solution stock à 10 mg/ml) : *65* µl;
- Ajout de protéinase K (Transgène) à 2mg/ml final (solution stock à 50 mg/ml) : 12,5 µl ;
- Incuber à 37°C de quelques heures à une nuit ;

- Précipitation à l'éthanol 100% 2 vol. :0,55 ml avec 0,2 M NaCl final (solution stock à 2 mM) : 90 µl;
- Centrifugation à 16 000 rpm pendant 20 min. ;
- Laver de 2-3 fois avec 1 ml d'éthanol glacial et après chaque lavage, centrifuger 5 min.;
- Laisser sécher le culot complètement ;
- Resuspendre dans du TEA (0.5 à 1ml);

La vaisselle doit être laissée 2hres à 200°C ou dans l'eau/DEPC. La vaisselle neuve est considérée sans RNAse.

La lecture se fait à 260 nm avec un rapport 260/280 de 1.85. À 300 nm la ligne doit être à 0 sinon il y a encore des protéines. Le tube contenant la RNAse sert à mesurer l'ADN total tandis que dans l'autre, on dose l'ADN et l'ARN ensemble. Par soustraction, on obtient la concentration d'ARN.

2.1.6 Autre méthode d'analyse de l'ADN

Cette autre méthode, avec colorant fluorescent, a été utilisée pour l'analyse de l'ADN dans la 293SF car elle semble donner plus de précisions que la méthode précédente :

- Préparation d'un tampon de citrate de sodium (SSC 20X) avec 175,3 g/l de NaCl et 88,2 g/L de citrate de trisodium. Le pH est ajusté à 7.0 ;
- $1x10^6$ cellules sont lysées dans le tampon SSC 1X/0,4% v/v pour 10 min. à 37°C ;
- 5ml de SSC 1X est ajouté et les échantillons sont soniqués légèrement ;
- 10 µl des échantillons sont ajoutés en tripliquat dans une plaque 96 puits, avec 90 µl de SSC 1X et 100 µl de Hoescht 33258 1 mg/ml ;
- La plaque est lue dans un fluoromètre à 360 nm en absorbance et 460 nm d'émission ;
- La courbe-étalon est faite à partir d'une solution-mère d'ADN (Sigma) à 1 mg/ml diluée de 50 à 3.12 µg/ml. 10 µl d'un échantillon est ajouté au standard afin de recréer les mêmes conditions que dans l'échantillon.

2.1.7 Analyse du poids sec.

- Récolte de $1x10^8$ cell./ml dans un tube de 50 ml ;
- Centrifuger ;
- Laver deux fois au PBS glacial et transférer dans un tube Eppendorf pré-pesé de 1,5 ml;
- La densité cellulaire doit être estimée avec au moins trois échantillons;
- Faire sécher à 100°C jusqu'à un poids constant.

2.1.8 Analyse des protéines totales.

Pour la cellule 293 5-19S, nous avons utilisé la méthode suivante:

- Récolte de $1x10^6$ cell. dans un tube Eppendorf de 1,5 ml ;
- Ajout de 0,5 ml de tampon de lyse à 4 degrés pendant 40 min.;
    - 0,5% Triton X-100 ;
    - 1mM EDTA ;
    - 0,2 mM phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF) ;
- Dilution 1/2 ,1/4, 1/8, 1/16 dans eau milli-Q ;
- Utilisation du kit micro-BCA en 96 puits :
    - Préparation de la gamme à partir du standard de protéines à 2 mg/ml

- Dilution 2 en 2 , 8 fois (2 mg/ml à 0.0078 mg/ml)

- Mettre 100 µl par puits, 2 fois pour chaque échantillon et chaque standard
- Mettre 100 µl de réactif (50 :48 :2 des solutions A, B et C du kit)
- Laisser incuber de 2 à 4 heures à 37°C
- Faire la lecture d'absorbance à 550 nm.

Pour la cellule 293SF, la procédure suivante a été utilisée:

- Récolte de $1x10^6$ cell. dans un tube Eppendorf de 1,5 ml ;
- Ajout de 0,5 ml de tampon de lyse à 4 degrés pendant 40 min.;
  - 0,5% Triton X-100 ;
  - 1mM EDTA ;
- Utilisation du kit BCA en 96 puits :
  - Préparation de la gamme à partir du standard de protéines à 2 mg/ml de 1,2 mg/ml à 0 mg/ml
  - Mettre 20 µl par puits, 2 fois pour chaque échantillon et chaque standard
  - Mettre 180 µl de réactif (50 : 1 des solutions A et B du kit)
  - Laisser incuber 30 min. à 37°C
  - Faire la lecture d'absorbance à 540 nm.

2.1.9 Analyse des carbohydrates totaux.

Cette méthode a été adaptée à partir de Xie and Wang (1994).

- Récolte de $1x10^7$ cell. dans un tube à centrifuger de 15 ml ;
- Ajout de 0,5 ml de tampon de lyse (cf. protéines totales) à 4 degrés pendant 40 min. ;
- Mettre dans un cylindre gradué de 50 ml ;
- Rincer le tube à centrifuger avec un autre 0,5 ml de tampon de lyse;
- Mettre avec le reste du liquide ;
- Ajouter 1 ml de solution de phénol saturée (AMRESCO réf. 0945-100ml) ;
- Ajouter 5 ml d'acide sulphurique concentré et mélanger rapidement ;
- Laisser incuber 30 min.
- Préparer une série de standards de glucose et utiliser les mêmes étapes de préparation (10,25,50,100 et 120 µg/ml) ;
- Mesurer l'absorbance à 488 nm.

2.1.10 Analyse des lipides totaux.

Cette méthode a été adaptée à partir de Xie and Wang (1994)

- Récolte de $3x10^8$ cell. lavées 2 fois au PBS ;
- Ajout de 0,5 ml d'eau milli-Q ;
- Ajout de 10 ml de méthanol (SDS réf. 0930516) en deux fois (faire attention pour ne pas mouiller les parois, il vaut mieux pipetter) ;
- Transfert dans un cylindre gradué de 50 ml ;
- Ajout de 20 ml de chloroforme ;
- Extraction pendant 40 min. ;
- Filtré à 0,8 micron (Whatman no. 1) ;
- Le filtre est lavé avec 5 ml de méthanol et 10 ml de chloroforme ;
- Ajout de 8 ml de NaCl 0,9% aq. au filtrat ;
- On enlève la phase supérieure (méthanol et eau) ;
- On ajoute 13 ml de chloroforme/méthanol/NaCl 0,9% aq. (3 :48 :47) ;
- On enlève la phase supérieure ;
- On répète ces deux dernières étapes ;
- La phase inférieure contient les lipides et est séchée sous hotte chimique 24 heures et plus ou jusqu'à obtention d'un poids stable.

2.1.11 Analyse de la composition en acides aminés.

- Récolte de $1x10^6$ cell. lavées 2 fois au PBS ;
- Hydrolyse dans HCl 2M 24 heures à 100 degrés ;
- Séchage préalable du culot sous vide;
- Analyse identique aux acides aminés ;
- Lors de l'hydrolyse acide, la glutamine et l'asparagine sont convertie en aspartate et glutamate respectivement. Dès lors, on assume une séparation de ces composés basés sur le pourcentage qu'on retrouve dans la littérature (Voet and Voet, 1990; Xie and Wang, 1994).

2.2 Hypothèse de Régime Pseudo-Stationnaire (PSS)

L'hypothèse de régime pseudo-stationnaire est utilisée dans le calcul des flux métaboliques. Cette hypothèse est très importante puisqu'elle facilite grandement les calculs, évitant d'avoir à mesurer les variations internes des métabolites. Dans beaucoup de travaux, les calculs de flux métaboliques se font dans des conditions de chemostat, offrant ainsi à la cellule un milieu stable, favorisant ainsi l'hypothèse de PSS. Dans notre cas, comme les cellules sont infectées en transitoire, il est impossible de travailler en chemostat et il s'agit

plutôt d'une cuvée alimentée. Il est alors d'autant plus important de vérifier cette hypothèse.

Certaines études (Eagle et col., 1961) sur les concentrations d'acides aminés intracellulaires démontrent que celles-ci ne changent pas tellement dans le temps car la cellule essaie de conserver une certaine homéostasie. Il semble cependant que la concentration intracellulaire joue un rôle sur la croissance cellulaire. En effet, Eagle et col. (1961) démontre que la croissance cellulaire passe de 10% à 80% du taux de croissance maximum lorsque la concentration intracellulaire de certains acides aminés varie de 0,005 à 0,05 mM, tandis que pour une autre lignée cellulaire la concentration passe de 0,03 à 0,15 mM. De la même manière, Hansen et Emborg (1994) ainsi que Schmid et Keller (1992) rapportent des concentrations intracellulaires pour différentes conditions de culture, les concentrations intracellulaires changent mais de façon peu significative.

En effet, lors du calcul des flux métaboliques, les variations intracellulaires ne semblent pas affecter les calculs comme le démontre le tableau 2.1. Dans la première colonne, on y récapitule les concentrations d'acides aminés mesurées par Schmid and Keller (1992). Dans les deuxième et troisième colonnes sont rapportées ce qui a été mesuré dans cette étude. Plusieurs mesures ont été faites à 72 heures d'intervalle. Par la suite on a calculé le taux de variation spécifique par

rapport au milieu extracellulaire en considérant qu'une cellule possède un volume de l'ordre de $17,7x10^{-10}$ ml (Schmid and Keller, 1992). Dans la dernière colonne sont rapportés les taux de production et de consommation (q et p) observés en pleine phase de croissance pour les mêmes cellules.

Tableau 2.1 Concentration intracellulaire et taux de variations intracellulaires.

	Schmid (1992)			Taux interne	Equivalent au taux externe :	Taux spéc.	Taux spéc. externe (q) (35 heures)
Temps		0	72	mM/hre	mM/hre	mmole/h *10^9 cell.	mmole/h *10^9 cell.
glc		70,49	73,69	$-4{,}45\times10^{-02}$	$-1{,}02\times10^{-05}$	$-8{,}53\times10^{-06}$	$-2{,}68\times10^{-01}$
lac		51,91	51,91	1×10^{-03}	1×10^{-03}	1×10^{-03}	$5{,}79\times10^{-01}$
amm		4,90	4,96	$-8{,}01\times10^{-04}$	$-1{,}84\times10^{-07}$	$-1{,}54\times10^{-07}$	$4{,}51\times10^{-04}$
asp	2,98	3,91	1,68	$3{,}10\times10^{-02}$	$7{,}13\times10^{-06}$	$5{,}48\times10^{-06}$	0,00
glu	10,91	14,49	6,57	$1{,}10\times10^{-01}$	$2{,}53\times10^{-05}$	$1{,}95\times10^{-05}$	$-5{,}67\times10^{-03}$
asn	1,22	0,65	0,34	$4{,}38\times10^{-03}$	$1{,}01\times10^{-06}$	$7{,}76\times10^{-07}$	$-6{,}14\times10^{-03}$
ser	1,92	1,78	0,54	$1{,}72\times10^{-02}$	$3{,}96\times10^{-06}$	$3{,}05\times10^{-06}$	$-1{,}07\times10^{-02}$
gln	2,67	4,04	1,74	$3{,}20\times10^{-02}$	$7{,}37\times10^{-06}$	$5{,}67\times10^{-06}$	$-3{,}61\times10^{-02}$
his	0,82	1,13	0,32	$1{,}13\times10^{-02}$	$2{,}60\times10^{-06}$	$2{,}00\times10^{-06}$	$-2{,}31\times10^{-03}$
pro	4,12	3,28	1,33	$2{,}72\times10^{-02}$	$6{,}25\times10^{-06}$	$4{,}81\times10^{-06}$	N/D
thr	4,47	5,52	2,39	$4{,}35\times10^{-02}$	$1{,}00\times10^{-05}$	$7{,}69\times10^{-06}$	$-3{,}55\times10^{-03}$
arg	0,63	1,20	0,49	$9{,}85\times10^{-03}$	$2{,}27\times10^{-06}$	$1{,}74\times10^{-06}$	$-5{,}02\times10^{-03}$
ala	16,16	7,30	2,73	$6{,}35\times10^{-02}$	$1{,}46\times10^{-05}$	$1{,}12\times10^{-05}$	$1{,}04\times10^{-02}$
tyr	0,78	0,02	0,26	$-3{,}33\times10^{-03}$	$-7{,}66\times10^{-07}$	$-5{,}89\times10^{-07}$	$-3{,}31\times10^{-03}$
gly	8,24	12,62	3,64	$1{,}25\times10^{-01}$	$2{,}87\times10^{-05}$	$2{,}21\times10^{-05}$	$3{,}70\times10^{-03}$
met	0,11	0,02	0,13	$-1{,}51\times10^{-03}$	$-3{,}48\times10^{-07}$	$-2{,}68\times10^{-07}$	$-2{,}46\times10^{-03}$
val	0,75	1,63	0,64	$1{,}38\times10^{-02}$	$3{,}18\times10^{-06}$	$2{,}45\times10^{-06}$	$-7{,}54\times10^{-03}$
phe	0,55	0,26	0,26	$-9{,}98\times10^{-06}$	$-2{,}30\times10^{-09}$	$-1{,}77\times10^{-09}$	$-3{,}10\times10^{-03}$
ile	0,63	0,93	0,43	$7{,}01\times10^{-03}$	$1{,}61\times10^{-06}$	$1{,}24\times10^{-06}$	$-5{,}65\times10^{-03}$
leu	0,43	0,98	0,43	$7{,}61\times10^{-03}$	$1{,}75\times10^{-06}$	$1{,}35\times10^{-06}$	$-7{,}72\times10^{-03}$
lys	0,78	1,67	0,34	$1{,}86\times10^{-02}$	$4{,}27\times10^{-06}$	$3{,}29\times10^{-06}$	$-1{,}04\times10^{-02}$

En comparant q et p aux taux spécifiques externes dus à une variation interne, on voit que cette variation est beaucoup plus faible que les taux de consommation, beaucoup moins que 1%. D'après ces calculs, on peut stipuler que l'hypothèse de régime pseudo-stationnaire est adéquate. Dans certains cas extrêmes cependant, lorsque la cellule augmente beaucoup de volume, comme pendant la période

d'infection par exemple, les variations internes des concentrations pourraient doubler, mais même dans ce cas ces variations restent très faibles par rapport aux variations externes. (Zupke and Stephanopoulos, 1995) rapportent par ailleurs qu'une variation inférieure à 10 mM par heure est adéquate pour poser l'hypothèse de régime pseudo-stationnaire.

2.3 Composition de la cellule.

Dans le tableau 2.2 sont répertoriées les données de poids sec, de protéines totales et d'ADN. On possède également quelques données sur les contenus en lipides totaux, carbohydrates totaux et ARN. La dernière colonne rapporte des données de la littérature (Xie and Wang, 1994). Les données compilées ici sont en fait des moyennes d'échantillons pris pendant la phase de croissance (2 à 3 échantillons). Il semblerait que le poids sec tend cependant à augmenter légèrement au cours de la croissance tandis que les protéines totales et l'ADN restent à peu près constants. Cependant on ne peut rien affirmer à ce stade car l'erreur sur le poids sec peut être assez grande à cause d'une erreur de la numération cellulaire variant de 5 à 10%.

Tableau 2.2 Données sur la composition de la cellule.

	5-19S		293SF/1		293SF/2		293SF/3		293SF/4		Xie (1994)	
	Moyenne	%	Moyenne	%	Moyenne	%	Moyenne	%	Moyenne	%	Moyenne	%
Poids sec	279.00		288.00		302.50		340.04		289.9		250	
Protéines totales	178.83	64.10	161.00	55.90	179.70	59.40	201.11	59.14	141.7	48.88	183	73.20
Carbohydrates totaux	7.70	2.76									8.75	3.50
Lipides totaux	69.00	24.73									33.75	13.50
ADN	11.09	3.97	15.80	5.49	5.80	1.92	13.7	4.03	13.3	4.59	3.5	1.40
ARN	36.81	13.19									9.5	3.80

En général, nos données sont consistantes avec ce que l'on trouve dans la littérature. Dans notre cas, on peut affirmer que la concentration de protéines totales se trouve autour de 60% pour la cellule 293, tandis que la concentration en ADN varie de 1% à 5%. Il est à noter que les méthodes d'analyse de l'ADN et de l'ARN pour la 5-19S et pour la 293SF ne sont pas les mêmes. Il est à remarquer que dans certains cas, la somme de nos composants donne un résultat plus élevé que 100%, en effet les valeurs mesurées peuvent être affectées par certaines erreurs expérimentales, comme discuté plus haut pour le poids sec.

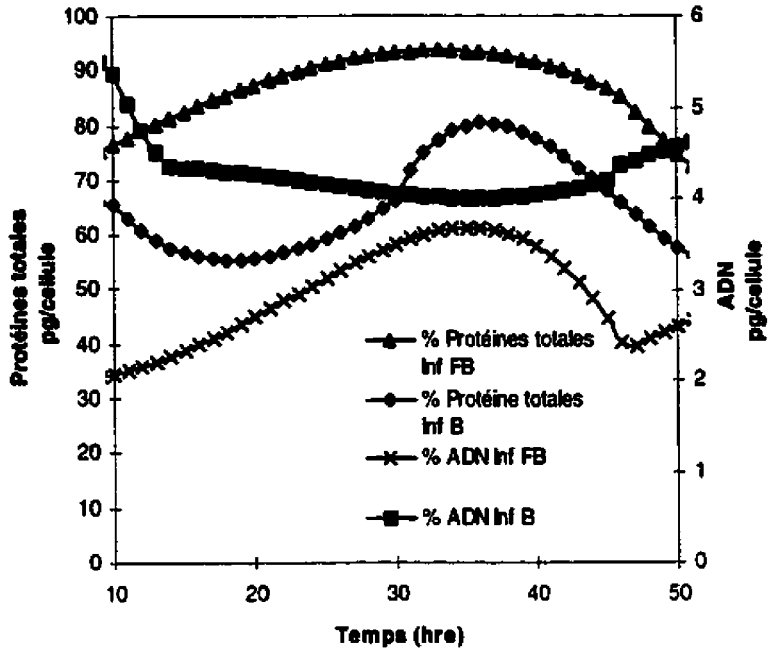


Figure 2.1 Évolution de l'ADN et des protéines totales au cours de l'infection. Inf B : Infection en mode cuvée ; Inf FB : Infection avec alimentation continue de nutriments.

On voit très clairement qu'au cours de l'infection le pourcentage de protéines change ainsi que le pourcentage d'ADN. On obtient un maximum autour de 36 heures, ce temps correspond habituellement au titre viral maximal. En fait, on a à la fois le poids sec, les protéines totales et l'ADN qui augmentent dans la cellule. Les protéines totales augmentent jusqu'à 90% du poids sec. Ce sont donc les protéines totales qui augmentent le plus dans la cellule. Il s'agit probablement de

protéines virales. Il faut tenir compte de ces variations dans le modèle, importantes pour le calcul des flux métaboliques durant l'infection.

Le tableau 2.3 suivant montre le pourcentage massique de chacun des acides aminés contenus dans les protéines. Cette mesure est obtenue en effectuant l'hydrolyse des protéines sur les acides aminés. La glutamine est degradée lors de l'hydrolyse en glutamate et l'asparagine en aspartate. C'est pourquoi on prend une distribution 50/50 entre gln/glu et asp/asn. Les deux premières colonnes montrent la composition de la 293SF, ces mesures ont été prises lors de deux expérimentations distinctes (PC1 et PC2). La troisième représente la composition de la 293 5-19S et les deux dernières colonnes montrent des résultats de la littérature (Voet et Voet, 1990; Xie et Wang, 1994) .

Tableau 2.3 Composition massique en acides aminés.

	PC1 % massique	PC2 % massique	% massique	Voet et Voet	Xie et Wang
asp	2,86	2,67	4,38	5,50	4,39
glu	8,12	8,34	6,78	6,20	5,14
asn	2,87	2,84	4,38	4,40	4,65
ser	6,10	5,40	4,58	7,10	5,00
gln	8,12	8,04	6,78	3,90	6,34
his	2,83	2,62	2,14	2,10	3,20
thr	4,33	4,59	4,57	5,26	4,26
arg	7,65	7,94	8,41	6,00	4,80
ala	4,97	5,00	3,09	4,70	8,80
tyr	2,55	2,56	10,95	9,00	5,18
gly	6,80	5,99	1,19	3,50	4,76
met	1,16	1,16	9,10	7,50	4,51
val	2,92	3,13	0,05	1,70	2,28
phe	4,53	5,05	5,75	6,90	5,00
ile	2,45	2,66	2,92	3,50	3,71
leu	8,40	8,57	3,13	4,60	3,90
lys	10,89	11,20	8,43	7,50	7,50
trp	2,90	2,78	11,24	7,00	8,73
cys	N/D	N/D	1,10	0,00	6,18
pro	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

Les pourcentages sont les moyennes sur plusieurs jours. En effet, nous n'observons pas de variations de la composition sur plusieurs jours et même pendant la phase d'infection (résultats non-montrés). Les résultats exprimés sont consistants avec la littérature (dernière colonne). On observe une certaine variabilité d'une mesure à l'autre attribuable aux conditions de culture, à la composition du milieu, à la nature de la cellule et surtout au volume cellulaire

qui varie au cours de la culture. Ces données pourront donc être incorporées dans la matrice des coefficients stœchiométriques.

Il est intéressant de comparer ces résultats avec la composition de l'albumine bovine, protéine servant à faire la courbe étalon pour le dosage des protéines totales. En effet, le dosage des protéines totales est basé sur l'oxydation des acides aminés aromatiques contenus dans les protéines, majoritairement la tyrosine et le tryptophane. Dès lors ces acides aminés peuvent interférer dans la mesure, d'une part par leur composition différente dans les protéines totales par rapport à l'albumine bovine. Le pourcentage total tyr+trp dans le BSA est de 4 tandis que dans les protéines cellulaires, il est de 3,4. Ceci peut engendrer une erreur de 15% sur les protéines totales. On pourrait également penser que les acides aminés intracellulaires peuvent interférer dans la mesure de la composition en acides aminés de la cellule. Par exemple, la tyrosine ayant une concentration interne de 0,78 mM, contribue à une quantité de 0.2 pg aux protéines totales, ce qui est vraiment négligeable.

2.4 Variation du CO_2 dissous.

Afin de vérifier l'hypothèse suivante, qui est utilisée pour l'évaluation de la production de CO_2 dans les cultures de cellules animales tamponnées au bicarbonate:

$$V_L \frac{dC_{CO_2}}{dt} << X_v q_{CO_2} V_L \text{ et } \left((x^E_{CO_2} - x_{CO_2}) F_g - V_g \frac{dx_{CO_2}}{dt} \right) \frac{P}{RT}$$

on procède à une étude sur la variation du CO_2 dissous. En simplifiant l'équation précédente, on obtient :

$$V_L \frac{dC_{CO_2}}{dt} = \left((x^E_{CO_2} - x_{CO_2}) F_g - V_g \frac{dx_{CO_2}}{dt} \right) \frac{P}{RT}$$

$$\text{mais } V_g \frac{dx_{CO_2}}{dt} = 0$$

Le tableau 2.4 suivant montre la variation de la concentration de CO_2 dans le milieu. Afin de simuler le milieu de culture, on a utilisé de l'eau contenant 2.45 g/l de $NaHCO_3$ avec un pH de départ de 6.88, conditions retrouvées pour le milieu de culture LC-SFM. L'analyse de désorption s'est faite avec un débit d'air de 300 ml/min, $\%O_2$ de 21 et un % de CO_2 variant de 0 à 10%. Il ne faut pas

oublier (voir la section 1.6) que l'évaluation de la variation de CO_2 est valable à pH constant puisque dans ces conditions l'équilibre chimique du bicarbonate ne change pas à fraction molaire de CO_2 constante. On remarque qu'une valeur négative signifie qu'il y a absorption de CO_2 dans le milieu.

Tableau 2.4 Absorption du CO_2

%CO2	Absorption (mole/min)	pH
0.61	-8.03E-06	7.83
0.85	-8.24E-06	7.83
5.02	-5.82E-05	7.28
5.02	-5.71E-05	7.29
10	-4.28E-05	7.00

On voit que l'absorption du CO_2 est plus élevée à 5% de CO_2 qu'à 10%, quoique la différence soit peu significative. Tandis qu'à faible concentration de CO_2 l'absorption est très faible. Il faut donc vérifier que ces valeurs sont plus faibles que les mêmes valeurs obtenues en conditions de culture. Ces valeurs représentent de 1 à 10 % des valeurs mesurées pendant une fermentation. Dans certains cas, il peut être délicat de négliger ce terme, mais comme on le verra lors de l'analyse de sensibilité, l'erreur sur les flux engendrées par une erreur sur la mesure du CO_2 est très faible et cette mesure n'a pas besoin d'une très grande précision.

CHAPITRE III : MODÈLE MÉTABOLIQUE A.

3.1 Élaboration du modèle.

3.1.1 Principales voies métaboliques

La liste ci-dessous présente les réactions biochimiques détaillées du métabolisme des cellules animales. Dans certains cas la réaction inverse n'est pas toujours identique à la réaction directe. Dans la matrice des coefficients stœchiométrique, on utilise toujours les réactions directes.

Tableau 2.5 Liste des réactions biochimiques.

F_{1a} $GLC + ATP \Rightarrow FRUC\,6P$

F_{1b} $FRUCT\,6P + ATP \Rightarrow 2GAP$

F_{1c} $GAP \Leftrightarrow PEP + ATP + NADH + H^+$

F_{1d} $PEP \Rightarrow PYR + ATP$

F_2 $PYR + NADH + H^+ \Leftrightarrow LAC$

F_3 $PYR + CoA \Rightarrow ACCoA + NADH + CO_2 + H^+$

F_4 $PYR + GLU \Leftrightarrow ALA + \alpha - KETO$

F_5 $GLU \Leftrightarrow \alpha - KETO + NADH + NH_4$

F_6 $OXA + GLU \Leftrightarrow ASP + \alpha - KETO$

F_7 $GAP + GLU \Rightarrow SER + \alpha - KETO + NADH$

F_8 $GLN + H_2O \Rightarrow GLU + NH_4^+$ ou $GLU + NH_4^+ + ATP \Rightarrow GLN$

F_9 $2GLN + \frac{5}{4} ASP + RIB5P + \frac{1}{2} GLY + 6\frac{5}{8} ATP + \frac{5}{8} NADPH \Rightarrow$
$ADN\ /\ ARN + \frac{3}{4} NADH + \frac{3}{4} FUM + 2GLU$

Moyenne de (Zubay, Voet & Voet) :

$RIB5P + 5ATP + 2GLN + GLY + ASP + CO_2 \Rightarrow IMP + 2GLU + FUM$

$IMP + ASP + 3ATP \Rightarrow ATP + FUM$

$IMP + GLN + 3ATP \Rightarrow GTP + GLU + NADH$

$RIB5P + 5ATP + GLN + ASP \Rightarrow UTP + CO_2 + GLU + NADH$

$RIB5P + 6ATP + 2GLN + ASP \Rightarrow CTP + CO_2 + 2GLU + NADH$

$Ribonucleo\ tide + NADPH \Rightarrow Deoxyribon\ ucleotide$

$dUMP + NADPH \Rightarrow dTMP$

F_{10a} $MAL \Rightarrow PYR + CO_2 + NADPH + H^+$

F_{10b} $OXA + ATP \Rightarrow PEP + CO_2 + H^+$

F_{10c} $PYR + ATP + CO_2 \Rightarrow OXA + H^+$

F_{11} $ASP + GLN + ATP \Leftrightarrow ASN + GLU$ ou $ASP \Rightarrow ASP + NH_4^+$

F_{12} $GLU + ATP + 2NADPH + 2H^+ \Rightarrow PRO$ ou $PRO \Rightarrow GLU + FADH_2 + NADH$

F_{13} $SER \Leftrightarrow GLY$

F_{14a} $GLC\,6P + ATP \Rightarrow \frac{1}{3} Rib5P + \frac{2}{3} Xu5P + 2NADPH + H^+ + CO_2$

F_{14b} $R5P + 2Xu5P \Leftrightarrow 2F6P + GAP$

F_{15} $GLN \Rightarrow ACIDE\ CARBOXYLIQ\ UE\ PYRROLIDON\ E + NH_4$

F_{16} $2\times(9CIT + 17ATP + 9CoA + 16NADPH) \Rightarrow AcOLE + 18OXA$

vient de :

$9CIT + 9CoA + 9ATP \Leftrightarrow 9AcCoA + 9OXA$

$2x(9AcCoA + 8ATP + 16NADPH) \rightarrow AcOLE + 18OXA$

$F_{17}\ SER \Rightarrow PYR + NH_3$

$F_{18a}\ THR \Rightarrow GLY + Ac - CoA$

$F_{18b}\ THR \Rightarrow CO_2 + 2NADH + 2H^+ + FADH_2 + NH_4 + PYR$

$F_{18c}\ THR + ATP \Rightarrow SUCCoA + NADH + H^+ + NH_3$

$F_{19}\ GLY \Leftrightarrow CO_2 + NH_4 + NADH + H^+$ avec THF - methyle

$F_{20}\ CTE + O_2 + \alpha - KETO \Rightarrow PYR + GLU$

$F_{20p}\ CYS \Leftrightarrow 2CTE$

$F_{21}\ TRP + 3O_2 + NADPH \Rightarrow ALA + 3CO_2 + 2ACCoA + NH_3 + 2NADH + FADH_2 + H^+$

$F_{22a}\ LYS + 2\alpha - KETO + NADPH \Rightarrow 2ACCoA + 2CO_2 + 4NADH + 3H^+ + FADH_2 + 2GLU$

$F_{22b}\ LEU + \alpha - KETO + ATP \Rightarrow 3ACCoA + GLU + CO_2 + NADH + H^+ + FADH_2$

$F_{23}\ ILE + \alpha - KETO + ATP \Rightarrow SUCCoA + ACCoA + CO_2 + 2NADH + 2H^+ + FADH_2 + GLU$

$F_{24}\ VAL + \alpha - KETO + ATP \Rightarrow SUCCoA + 3NADH + H^+ + FADH_2 + 2CO_2 + GLU$

$F_{25}\ MET + SER + 2ATP \Rightarrow CTE + SUCCoA + NADH + H^+ + CO_2 + NH_3$

$F_{26}\ PHE + O_2 + NADPH + H^+ \Rightarrow TYR$

$F_{27}\ TYR + \alpha - KETO + 2O_2 \Rightarrow FUM + 2ACCoA + GLU$

$F_{28}\ ARG + \alpha - CETO \Rightarrow 2GLU + NADH + H^+ + urée$

$F_{29}\ HIS \Rightarrow GLU + NH_3$

Réaction du cycle de Krebs

$F_{30}\ OXA + ACCoA \Rightarrow CIT$

$F_{31}\ CIT \Rightarrow \alpha - CETO + CO_2 + NADPH + H^+$

$F_{32}\ \alpha - CETO \Rightarrow SUCCoA + NADH + H^+ + CO_2$

$F_{33}\ SUCCoA \Rightarrow FUM + ATP + FADH_2$

$F_{34}\ FUM \Leftrightarrow MAL$

$F_{35}\ MAL \Leftrightarrow OXA + NADH + H^+$

Respiration

$F_{37a}\ FADH_2 + 0.5O_2 \Rightarrow 2ATP + H_2O$

$F_{37b}\ NADH + H^+ + 0.5O_2 \Rightarrow 3ATP + H_2O$

Dans ce premier modèle, élaboré dans ce chapitre, nous avons procédé à certaines simplifications. Les flux de glycosylation F_{1a} à F_{1d} sont scindés en une réaction. F_{10a} à F_{10c} sont couplés en une seule réaction, ainsi que F_{37a} et F_{37b}. Pour la respiration, on utilise un rapport P/O de 2 (Xie and Wang, 1996). La glycosylation est un flux de faible importance par rapport aux autres flux et n'est pas incluse. En effet, le pourcentage de carbohydrate dans la cellule est de l'ordre de 2 à 3 % (voir la section *Composition de la cellule*), ce qui fait que le flux de glucose vers la formation de carbohydrate est de beaucoup inférieur aux flux de glycolyse et donc négligeable. On suppose de plus que $F_5=0$, puisque selon certains auteurs (Bonarius et col., 1996), cette voie est inexistante dans les cellules transformées. F_{18a} et F_{18c} sont également posés à 0. En effet, pour la thréonine, il existe plusieurs voies métaboliques possibles et les auteurs ne sont pas tous d'accord. Lehninger (1982) ainsi que Voet and Voet (1990) préconise la réaction F_{18a} tandis que Salway (1994) dit qu'il s'agit plutôt de F_{18b}. On ajoute également un bilan sur le NADH/NADPH comme contrainte supplémentaire.

Il faut considérer certains flux biosynthétiques dans la cellule tel la formation de nouvelles protéines (F36), d'ADN et d'ARN (F9) et de lipides (F16). En effet, ces molécules sont les principales composantes formant une cellule et ces flux sont évalués à partir de plusieurs mesures faites sur les cellules et de données tirées de la littérature et sont donc incorporées dans la matrice -Q+P. On considère que

lors de la croissance la composition reste constante. Les résultats sont compilées dans la section *Compositon de la cellule.*

3.1.2 Résolution des flux négatifs

Ce modèle comporte cependant *a priori* certains flux négatifs. Plusieurs options s'offrent à nous pour régler le problème des flux négatifs et ont été essayées afin d'améliorer la validité des flux métaboliques. Les principaux résultats sont explicités dans les paragraphes suivants.

- En posant F21=0, soit la dégradation du tryptophane, on remarque que la validité des flux métaboliques est améliorée. En fait, il est fort probable que le flux biosynthétique du tryptophane sera égal à zéro puisque selon certains auteurs (Brown, 1996), le tryptophane est surtout utilisé pour la fabrication des précurseurs de NAD^+ et $NADP^+$.

- Paredes et col. (1998) proposent d'ajouter des flux de compartimentation entre le cytoplasme et la mitochondrie. Mais ces changements à la matrice stœchiométriques ne résolvent pas les problèmes de flux négatifs. La compartimentation sera discutée dans le modèle C au chapitre 5.

- L'ajout du cycle des pentoses phosphates peut régler le problème de flux négatifs. On obtient cependant une matrice très mal conditionnée. C'est souvent le cas lorsqu'on ajoute une boucle à un modèle. On peut se demander la pertinence d'ajouter un tel cycle car le cycle des pentoses phosphates semblent être très faible comparé à la glycolyse. Une étude au C_{14} permettra de démontrer cette hypothèse et sera discutée au chapitre 5.

- Une accumulation de métabolites internes pourrait expliquer certains flux négatifs. Cependant, l'hypothèse de régime pseudo-stationnaire a été démontrée. Mais lorsqu'on simule une accumulation de sérine, d'alanine ou de glycine, principaux acides aminés produits par la cellule, certains flux redeviennent positifs mais d'autres sont négatifs.

- Il y a une possibilité d'apport de protéines extracellulaires qui ne sont pas comptabilisée dans le modèle. En effet, si on augmente le flux de protéine F36, certains flux redeviennent positifs. Cette option sera discutée à la section 3.3.

Afin d'améliorer la validité de notre modèle, l'option la plus plausible est donc d'omettre du modèle la dégradation du tryptophane. Le modèle est maintenant

de 37x36. Également, on enlève le bilan sur le NADH, FADH et NADPH car cette option pourrait idéaliser les flux métaboliques, comme cela a été discuté dans la revue de la littérature. On a maintenant un modèle 36x36.

3.1.3 Voies de synthèse de la sérine

En ce qui concerne la synthèse de la sérine, il existe plusieurs voies métaboliques : 1) La voie du SHMT (serine hydroxyméthyltransférase) qui transforme la glycine en sérine, à l'aide d'un groupement méthyl provenant d'un autre donneur que la glycine, 2) Par le couplage du GCE (Glycine cleavage system) et le SHMT qui résulte dans la dégradation de deux glycines pour former une molécule de sérine, 3) Par une voie plus indirecte qui implique la déamination de la glycine et la formation de THF-méthylé, utile pour la conversion de glycine en sérine. Thureen et col. (1995) suggère qu'il s'agit de la voie 2 qui est préconisé dans des études de foie fétal *in vivo*. Dès lors, les flux F13, soit la formation de la sérine à partir de glycine et F19, la dégradation de la glycine et formation de THF-méthylé, sont intimement liés et doivent être couplés ensemble. On a donc maintenant, un modèle 35x35.

3.1.4 Apport de la cystéine.

Osman et col. (1997) rapportent que la cystéine peut subir une auto-oxydation et se transformer en cystine, qui est en fait composée de deux cystéines. Dès lors, la disparition de la cystéine dans le milieu de culture peut être attribuable à cette auto-oxydation et non à l'entrée dans la cellule. Cette réaction se fait principalement dans le milieu de culture externe, dès lors, cette réaction biochimique peut être éliminée du modèle (F20p=0). Cependant, la cystine peut, quant à elle, entrer dans la cellule par un échangeur cystine-glutamate : l'échangeur x_c^-, Na^+ indépendant. Un pool interne de glutamate important est donc nécessaire afin de permettre l'entrée de cet acide aminé (Bannai, 1986; Bannai et Ishii, 1988). On rapporte de plus que la glutamine a comme rôle d'alimenter ce pool de glutamate. En effet, on observe un efflux de cystéine sous l'effet du gradient de concentration, comme la concentration de cystéine est presque nulle à l'extérieur de la cellule. La cystéine se transforme en cystine à l'extérieur de la cellule et la cystine devra donc réentrer dans la cellule afin de fournir de la cystéine, essentielle pour la formation de glutathione. Ce cycle requière donc un pool de glutamate afin de permettre l'influx de cystine, et indirectement, un apport de glutamine dans le milieu extracellulaire.

Les voies de dégradation de la cystéine sont donc éliminées du modèle (F20 =0), puisque la cystéine sert surtout à la formation de glutathione. F25, la formation de cystéine à partir de méthionine, devient alors la seule voie de synthèse de la cystéine. Osman et col. (1997) rapporte en fait que la cystéine est le principal métabolite de la dégradation de la méthionine d'où l'importance de cette voie par rapport à F20. On obtient donc un modèle 35x34.

3.1.5 Modèle A final

Le résultat de toutes ces modifications donne le modèle A qui sera utilisé pour le calcul des flux métaboliques. Il s'agit d'un modèle à 35 mesures et 34 flux. Il possède un rang de 34 et le conditionnement est de 116. Ce modèle sera utilisé pour traiter les données de la cellule 5-19S dans l'article intitulé : "*Human 293 Cell Metabolism in low Glutamine-Supplied Culture : Interpretation of metabolic Changes through Metabolic Flux Analysis.*"

Voici le schéma des principales voies métaboliques des cellules animales utilisées dans le modèle A.

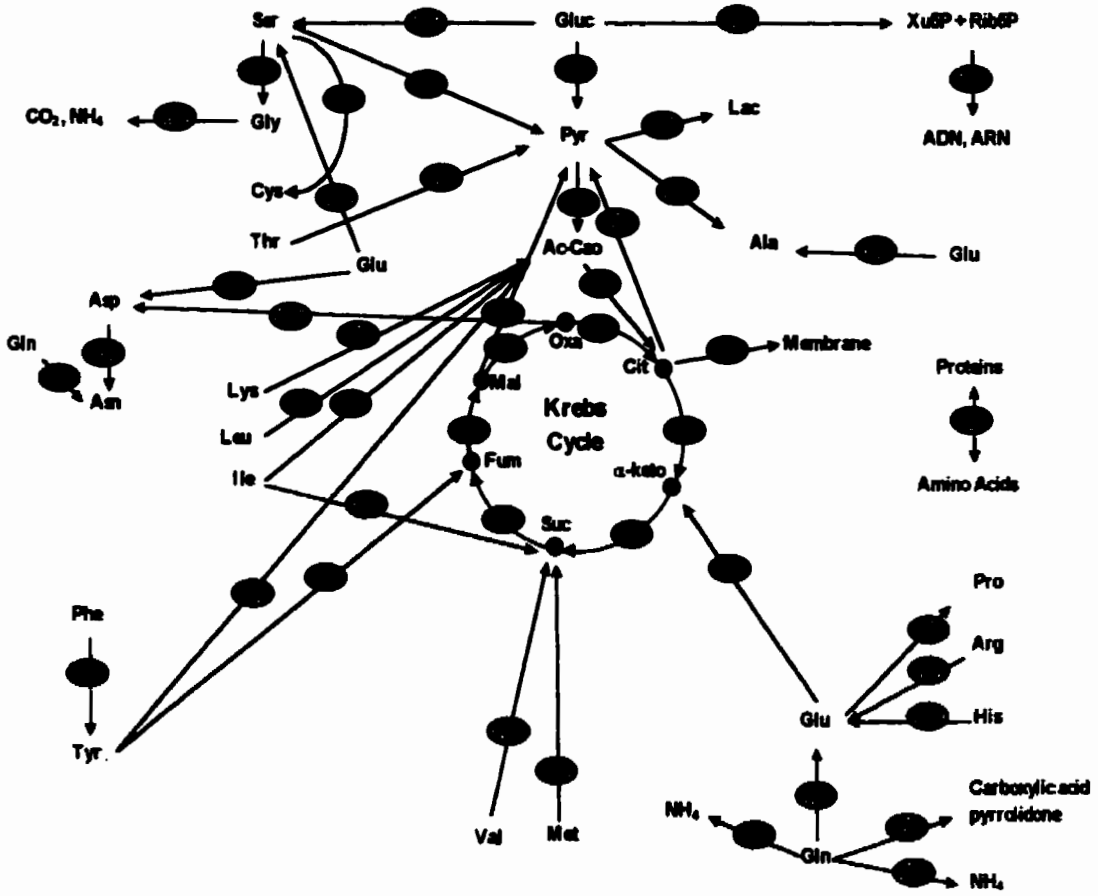


Figure 3.1 Modèle métabolique.

3.2 Métabolisme de la cellule humaine 293 en milieu à faible concentration de glutamine : Interprétation des changements métabolique à l'aide du calcul des flux métaboliques.

Cette section présente l'article intitulé ***Human 293 Cell Metabolism in low Glutamine-Supplied Culture : Interpretation of Metabolic Changes through Metabolic Flux Analysis.*** Cet article a été soumis à la revue ***Metabolic Engineering.*** Il fait suite au travail effectué à la compagnie Transgene à Strasbourg. Le but de ces études était d'optimiser la croissance des cellules 293 dans le milieu de culture DMEM/F12. Il a été constaté que ces cellules produisaient beaucoup d'ammoniac et ce composé s'avère toxique pour les cellules à partir d'une certaine concentration, soit 1 mM. Dès lors différentes stratégies d'alimentation ont été essayées, notamment, une alimentation contrôlée en glutamine et une alimentation contrôlée en acides aminés essentiels avec une très faible concentration de glutamine. Cette dernière stratégie donne la meilleure croissance cellulaire, soit $2.4x10^6$ cellules/ml et la production d'ammoniac est de beaucoup réduite. L'ajout d'acides aminés non-essentiels n'améliore pas la croissance cellulaire et au contraire, ils ont plutôt tendance à s'accumuler dans le milieu

A l'aide de l'analyse des flux métaboliques, il a été démontré que lors de l'alimentation pulsée avec glutamine, la majorité des flux d'acides aminés ainsi que ceux du cycle de Krebs sont réduits par rapport à une culture en mode cuvée. Lors d'une alimentation pulsée avec acides aminés mais réduite en glutamine, on observe le contraire puisque les flux d'acides aminés sont augmentés, afin de conserver une activité adéquate du cycle de Krebs.

Human 293 Cell Metabolism in low Glutamine-Supplied Culture: Interpretation of Metabolic Changes through Metabolic Flux Analysis.

I. Nadeau,[1,3] J. Sabatié,[2] M. Koehl,[2] M. Perrier,[3] A. Kamen[1]

[1]Institut de recherche en biotechnologie, CNRC, 6100 avenue Royalmount, Montréal, Québec H4P 2R2, Canada; [2]Transgène SA, 11 rue de Molsheim, 67086 Strasbourg, France; [3]École polytechnique de Montréal, Campus de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Metabolic flux analysis is a useful tool to analyze the cell metabolism. In this study, we report the use of a metabolic model with 34 fluxes to study the 293 cell, in order to improve its growth capacity in a DMEM/F12 medium. A batch, fed-batch with glutamine feeding, fed-batch with essential amino acids and finally a fed-batch experiment with both essential and non-essential amino acids were compared. The fed-batch with glutamine led to a maximum cell density of $2.4x10^6$ cells/ml as compared to $1.8x10^6$ cells/ml achieved in a batch mode. In this fed-batch with glutamine, it was also found that 2.5 mM ammonia was produced as compared to the batch which had a final ammonia concentration of 1 mM. Ammonia was found to be growth inhibiting for this cell line at a concentration starting at 1 mM. During the fed-batch with glutamine, the fluxes

analysis shows that a majority of amino acids fluxes and Krebs cycle fluxes, except for glutamine flux, are decreased. This observation led to the conclusion that the main nutrient used is glutamine and that during the batch there is an overflow in the Krebs cycle. Thus a fed-batch with glutamine permits a better utilization of this nutrient. A fed-batch with essential amino acid without glutamine was also assayed in order to reduce ammonia production. The maximum cell density was increased furthermore to $3x10^6$ cells/ml and ammonia production was reduced below 1 mM. The flux analysis shows that the cells could adapt to a medium with low glutamine by increasing the amino acids fluxes towards the Krebs cycle. Adding non-essential amino acids during this feeding strategy did not improve growth further and the non-essential amino acids accumulated in the medium.

Metabolic flux analysis in low-glutamine medium. A. Kamen; Institut de recherche en biotechnologie, 6100 Royalmount, Montréal, Québec, H4P 2R2, Canada, phone : (514) 496-2264; fax : (514) 496-6785; Amine.kamen@nrc.ca

Introduction

Recombinant adenovirus is now an established tool for gene delivery and a promising viral vector for gene therapy (Kay and Woo, 1994; Trapnell, 1993; Trapnell and Gorziglia, 1994). The 293-Human Embryo Kidney cells (293), preferably adapted to suspension, are the complementary cells mainly used for the production of recombinant adenoviruses. Originally, the first generation recombinant adenoviruses are engineered as defective vectors since they can not replicate in normal cells but only in 293 cells containing the E1 replicative-essential region of adenovirus. A second generation adenovirus has been developed in order to minimize its inflammatory response in clinical trials (Boucher and Knowles, 1994; Crystal et al., 1994) and the possibility of replication competent adenovirus (RCA) formation. This second generation adenovirus has part of its genome deleted in the region E1 and E3, as in the first generation, but also in E4, which is assumed to play a role in the immune response. The 293 complementing cell line, that already contains the E1 region, was adapted for this second generation by inserting part of the E4 gene, therefore permitting replication of the virus but limiting the RCA generation (Lusky et al., 1998).

In order to improve the production of these adenoviruses, a simple process must be developed to operate high density suspension cultures of 293 cells. A fed-

batch process is the rational way for proceeding towards this objective. Previous studies with first generation 293 cells in suspension have demonstrated that addition of glucose and amino acids permitted infection at a cell density of $3x10^6$ cells/ml without compromising the specific production of the recombinant protein expressed (Garnier et al., 1994; Nadeau et al., 1996). Also, a low-concentration fed-batch culture contributes to limit lactate accumulation in the cultures and associated toxic effects on cell growth and adenovirus expression.

However, the second generation 293 cells, used in this study, have a different glucose metabolism than the first generation, as it consumes 5 fold less glucose and accumulates up to 10 fold less lactate. However, it is important to underline that the original 293 clone from which it was transformed is not the same as the one used for the previous studies of Nadeau et al. (1996) and Garnier et al. (1994). Therefore these differences may also be attributed to clonal deviations.

This work was initiated to study the cell metabolism of this second generation 293 cell. The study evaluated glutamine fed-batch, since glutamine was identified as the main limiting nutrient during batch cultures. Also, ammonia toxicity was investigated. This metabolite has been widely studied and has been proven to have a toxic effect (>50% inhibition in cell growth) for different cell lines such as MDCK, McCoy, Hela and BHK at 2 mM (Hassel et al., 1990). While in the same

study, this concentration had no or little effect on cell yield for HDF, Vero and 293 cells. A growth inhibition was also observed on hybridoma cultures at 4 mM ammonia (Ozturk et al., 1992), while the CHO cells demonstrated no inhibition even at 8 mM ammonia concentration (Hansen and Emborg, 1994). For a review on the effect of ammonia, see Schneider et al. (1996). Fed-batch with amino acids but without glutamine was also investigated in order to reduce the production of ammonia and increase cell yield. Sanfeliu et al. (1997) have demonstrated that a reduced supply of glutamine may lead to reduced production of lactate, alanine, ammonium and proline.

Metabolic flux analysis was used to study the metabolism. Metabolic flux analysis is a powerful tool that permits the evaluation of biochemical reaction rates inside the cell on the basis of simple measurements and mass-balancing techniques. It is increasingly used to evaluate cultures and optimize processes. In this report we used a metabolic model of 34 fluxes which include the catabolism pathways of glucose, glutamine and 17 amino acids. The main goal of this analysis is to evaluate the effect of different culture conditions on the central metabolism of the cell, the Krebs cycle and identify which nutrients are used to fulfill the energy requirement of the cell in order to develop the best feeding strategy for these cells.

Material and Methods

Cells and medium

The second generation 293 (293-2) cell line was derived from the original ATCC 293A cell line (Rockville, MD). This cell line, originally obtained from human kidney fibroblast, was transformed with Ad5 DNA to express the E 1A and E1B proteins constitutively. The 293-2 was obtained by transforming the cells with ORF 6 and 7 of the E4 region of Ad5 to constitutively express these proteins (Lusky et al., 1998).

This 293-2 cell line was thereafter adapted to grow in suspension. Cells are maintained in 100ml spinner flasks (Bellco, Vineland, New Jersey) and subcultured twice a week in the F12/DMEM 3 :1 medium (Gibco, Grand Island, New York) supplemented with 2.5% γ irradiated calf serum from Sigma (St-Louis, Missouri). This formulation contained 15 mM glucose and 1mM glutamine. Puromycine at 1 µg/ml (Sigma) and tetracycline at 5ug/ml (Sigma) were also added. For all the experiments, F12/DMEM was used without glutamine and different solutions were added according to the experimental plan. Solutions of glutamine at 200mM, glucose at 200g/L, 50X MEM essential

amino acids (Sigma) and 100X MEM non-essential amino acids (Gibco), were used as additives.

Bioreactor

A CSTR bioreactor of 1L working volume (Biolafitte, France) was used. The temperature was maintained at 37 °C. Two marine impellers were used to ensure proper mixing and oxygen transfer with a measured k_La of 1.65 hr^{-1}. The agitation speed was at 50 rpm. pH and dissolved oxygen (DO) were maintained at 7.1 and 30% of air saturation respectively. pH was regulated by CO_2 addition while DO was maintained by oxygen addition through surface aeration.

The bioreactors were systematically inoculated as described herein. Four days before inoculation a 400 ml spinner was started at $0.2x10^6$ cells/ml. At the time of bioreactor inoculation, cells were at 0.8 $x10^6$ cells/ml. The bioreactor was inoculated at an initial cell density of $0.3x10^6$ cells/ml.

Cell culture conditions

Four different conditions were evaluated. A batch (B), a fed-batch with glutamine (FB/gln), a fed-batch with essential amino acids without glutamine and non-essential amino acids (FB/AA) and finally a fed-batch with essential

amino acids only without glutamine (FB/EAA). For the fed-batch with glutamine, up to 3.2 mM of glutamine (200mM solution) was added throughout the cultivation. The glutamine concentration was kept around 1 mM based on the off-line analysis of ammonia accumulation. For each mole of ammonia produced approximately 1 mole of glutamine was consumed. For the fed-batch with EAA and NEAA, up to 20 ml of EAA 50X (Sigma), 10 ml NEAA 100X (Gibco) and 0.4 mM of glutamine were added. For the fed-batch with EAA, up to 25 ml EAA 50X and 0.4 mM glutamine were added. For FB/AA and FB/EAA, glutamine was added at a low concentration in order to fulfill the cellullar biosynthetic requirement for proteins.

Table 3.1 summarizes the additions for the different experimental conditions.

Table 3.1 Pulse additions for the three fed-batches.

Time (hrs)	FB/gln	FB/EAA		FB/AA		
	gln (mM)	gln (mM)	AAE 50X (ml)	gln (mM)	AAE 50X (ml)	NEAA 100X (ml)
0				0.1		
24						
48	0.8				2.5	1.25
72		0.1	5		2.5	1.25
96	0.8		5		2.5	1.25
120	0.8	0.2	5	0.1	2.5	1.25
144	0.8		5		5	2.5
168		0.1	5	0.2	5	2.5
192			5			
Total	3.2	0.4	30	0.4	20	10

Spinners of 100 ml (Bellco) were also used to investigate the effect of ammonia, by adding a solution of 100 mM NH_4Cl leading to medium concentrations ranging between 250 µM and 3000 µM.

Cell counting

Viable and total cells were counted using a Malassez heamacytometer. Viability was assessed by dye exclusion method using Trypan blue.

Dry cell weight

$1x10^8$ cells were pelleted in a pre-weighted tube of 1.5 ml. The pellet was dried in an oven at 60°C for about 48 hours or until the weight remained constant (Xie and Wang, 1994).

Lipid composition

The lipid composition was assayed using the method described in Xie and Wang (1994). Briefly, to a cell pellet of approximatly $3x10^8$ cells, 0.5ml milli-Q water with 10 ml methanol and 20 ml chloroform were added. The lipids are solubilized 40 minutes and filtered through a 0.8 micron filter paper. which is

rinsed with 5ml methanol and 10 ml chloroform. 8 ml NaCl 0,9% are added and two phases are formed. The water/methanol phase above is discarded. This procedure is repeated twice with 13 ml chloroform/methanol/NaCl 0.9% aq. solution, (3:48:47). The heavy phase is dried 24 hours under a hood and lipids are weighted.

Total protein

Total protein was assayed using the micro-BCA kit (Pierce, Rockford, Illinois). Prior to the analysis the $1x10^6$ cells pellet was disrupted using the following buffer : 0.5% Triton X-100, 1mM EDTA, 0.2mM Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) (Xie and Wang, 1994).

Amino acids analysis

For analysis of metabolites in the supernatant, an HPLC column (column type, Beckman) was used. For determination of cells' amino acid content, a $1x10^6$ cell pellet, washed twice with PBS, was hydrolysed in a 2M HCl solution for 24 hrs at 100°C. The pellet was then vacuum dried and resuspended in PBS prior to HPLC analysis. During acid hydrolysis glutamine is converted to glutamate and asparagine is converted to aspartate. It is assumed that 47.5% of glutamate and

aspartate were derived from glutamine and asparagine respectively. These ratios were based on previous report (Voet and Voet, 1990; Xie and Wang, 1994).

Glucose, lactate and ammonia analysis in the supernatant

The Biolyzer (Kodak, New Haven, Connecticut) was used for the analysis of glucose, lactate and ammonia.

Consumption rate and flux calculations

The metabolic model used in this study involves 34 fluxes which are the backbone of the animal cell metabolism (Figure 3.2). Some fluxes were set to zero, according to what is found in the literature for the metabolism of animal cells, and more specifically for human fibroblasts. Many authors (Bonarius et al., 1996) have reported that the *glutamate dehydrogenase* activity is very low in animal cells, therefore we can set the flux F5 to zero. Cysteine contributes mainly to the formation of glutathione, which is not included in the model, therefore F20=0 (Bannai, 1986; Bannai and Ishii, 1988). Tryptophan is an intermediate to NAD+ and NADP+ component and therefore F21=0, (Brown, 1996). Threonine can undergo several pathways, but as suggested by Salway (1994), the degradation to pyruvate may be the main pathway. F13 and F19 were coupled together as two glycines give one serine via the glycine cleavage system (Thureen, 1995). We

also did not consider the pentose-phosphate cycle in our analysis, assuming that all the ribose-5-phosphate (Rib5P) goes for the formation of nucleotides. For the 293 cells the pentose-phosphate cycle was found to be 1 to 2% of the glucose consumption (Results not shown). Oxaloacetate (Oxa) and Malate (Mal) were pooled so F10 comprises all of the anaplerotic reaction. F9, F16 and F36 are the fluxes to the nucleotides, membrane and proteins, respectively, and are based on the cell composition. F15, the degradation of carboxylic acid pyrrolidone, was evaluated from a model of Ozturk and Palsson (1990).

Table 3.2 presents the biochemical reactions that were used in this model.

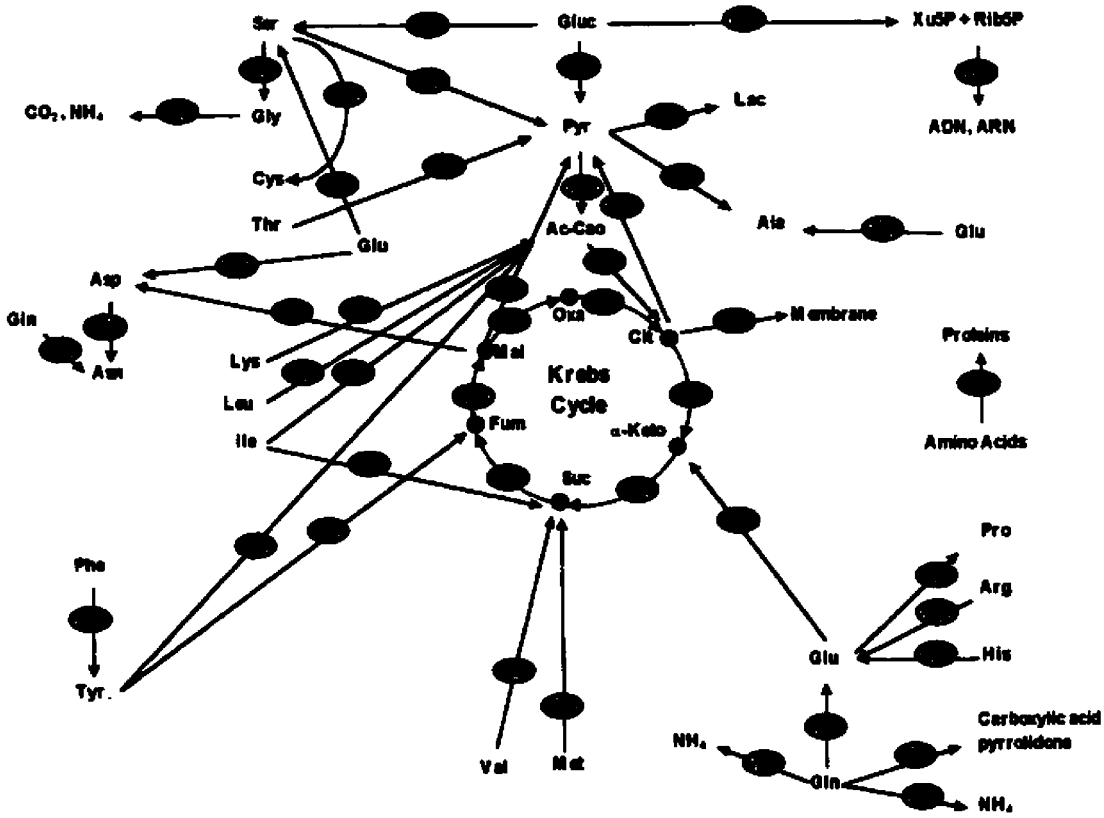


Figure 3.2 Mammalian cell metabolism network. α-Keto, α-Ketoglutarate; Ac-CoA, Acetyl-CoA; AcOle, Oleic acid; Arg, arginine; Asn, asparagine; Asp, aspartate; Cit, citrate; Cte, cysteine; Fum, fumarate; Gluc, glucose; Gln, glutamine; Glu, glutamate; Gly, glycine; His, histidine; Ile, isoleucine; Lac, lactate; Leu, leucine; Lys, lysine; Mal, malate; Met, methionine; Oxa, oxaloacetate; Phe, phenylalanine; Pro, proline; Pyr, pyruvate; Rib5P, ribose-5-P; Ser, serine; SucCoA, succinyl-CoA; Thr, threonine; Tyr, tyrosine; Val, valine; Xu5P, xilulose-5-P.

The consumption and production rate of the following metabolites were used in the model for flux calculation: glucose, lactate, ammonia, oxygen and all the amino acids except for tryptophan, cysteine and cystine. The specific production and consumption rates were calculated by dividing the quantity of the 35 metabolites produced or consumed by the corresponding time interval (24 hrs) and mean cell concentration during that interval. This time interval is suited for this cell line since it has a slow doubling time of 40 hrs during exponential growth. Therefore, the fluxes calculated are mean values over time.

We then have a 35x34 matrix of stoichiometric coefficients with a rank of 34 and a condition number of 116. Usually a condition number around 100 is recommended for flux calculations (Bonarius et al., 1997; Zupke and Stephanopoulos, 1995). The condition number is an indication of the maximum error that can occur in a linear system. Savinell and Palsson (1992) have demonstrated, that usually the real error is 1/4 to 1/10 of the condition number, so a condition number of 100 would give errors ranging from 10% to 25%.

If we apply a mass balance around the biomass, we have :

$$\frac{dS}{dt} = KF - DS - Q + P \qquad (1)$$

where S is the internal cellular concentration of metabolites, K the 35X34 matrix of stoichiometric coefficients, F the vector of 34 fluxes, DS, represent the dilution due to volume variation of the cells and $-Q+P$ represents the vector of the specific consumption and production rate of metabolites. We assume that the cell volume does not change and that the internal metabolite concentration does not vary over short period of time, also called the pseudo steady-state assumption (PSS assumption). These assumptions are used by many authors for flux calculations. (Bonarius et al., 1997; Pissarra and Henriksen, 1998; Savinell and Palsson, 1992; Takiguchi et al., 1997). This simplifies the equation to an algebraic system of linear equation :

$$KF = Q - P \qquad (2)$$

And F can be resolved :

$$F = pseudo - inverse(K) \bullet (Q - P) \qquad (3)$$

The fluxes can be divided in three main groups, i.e. (i) the main fluxes of glycolysis and glutaminolysis, (ii) amino acid fluxes and (iii) the Krebs cycle fluxes. The glycolysis and glutaminolysis fluxes are composed of F1, glucose to pyruvate, F2, pyruvate to lactate, F3, pyruvate to Krebs cycle, $F5_{tot}$, the net flux of glutamate to α-ketoglurate which comprises all transamination reactions and finally $F8_{tot}$, the net flux of glutamine to glutamate which also includes the transamination process of aspartate to asparagine. The amino acid fluxes represent the fluxes of different essential amino acids to the Krebs cycle or the glutamate pool. The Krebs cycle fluxes are also shown : F30 and F31 are the fluxes from Acetyl-CoA to α-ketoglutarate and the fluxes F32, F33, F34 and F35 are the fluxes on the left side of the cycle. F10 represents the anaplerotic pathways in which components such as malate and oxaloacetate are recycled in the glycolysis pathway as pyruvate or oxaloacetate. This pathway is a manner of recycling excess components of the Krebs cycle.

Table 3.2 Biochemical Reactions

F_1 $GLUC \Leftrightarrow PYR + 2ATP + 2NADH$

F_2 $PYR + NADH + H^+ \Leftrightarrow LAC$

F_3 $PYR + CoA \Rightarrow ACCoA + NADH + CO_2 + H^+$

F_4 $PYR + GLU \Leftrightarrow ALA + \alpha - KETO$

F_5 $GLU \Leftrightarrow \alpha - KETO + NADH + NH_4$

F_6 $OXA + GLU \Leftrightarrow ASP + \alpha - KETO$

F_7 $GAP + GLU \Rightarrow SER + \alpha - KETO + NADH$

F_8 $GLN + H_2O \Rightarrow GLU + NH_4^+$

F_9 $2GLN + \frac{1}{4} ASP + RIB5P + \frac{1}{2} GLY + 6\frac{1}{4} ATP + \frac{1}{4} NADPH \Rightarrow$
$ADN / ARN + \frac{1}{4} NADH + \frac{1}{4} FUM + 2GLU$

F_{10a} $MAL \Rightarrow PYR + CO_2 + NADPH + H^+$

F_{10c} $PYR + ATP + CO_2 \Rightarrow OXA + H^+$

F_{11} $ASP + GLN + ATP \Leftrightarrow ASN + GLU$

F_{12} $GLU + ATP + 2NADPH + 2H^+ \Rightarrow PRO$

F_{13} $SER \Leftrightarrow GLY$

F_{14a} $GLC\ 6P + ATP \Rightarrow Rib5P + 2NADPH + H^+ + CO_2$

F_{15} $GLN \Rightarrow Carboxylic\ Acid\ Pyrolidone + NH_4$

F_{16} $2 \times (9CIT + 17ATP + 9CoA + 16NADPH) \Rightarrow AcOLE + 18OXA$

F_{17} $SER \Rightarrow PYR + NH_3$

F_{18a} $THR \Rightarrow CO_2 + 2NADH + 2H^+ + FADH_2 + NH_4 + PYR$

F_{19} $GLY \Leftrightarrow CO_2 + NH_4 + NADH + H^+$

F_{22a} $LYS + 2\alpha - KETO + NADPH \Rightarrow 2ACCoA + 2CO_2 + 4NADH + 3H^+ + FADH_2 + 2GLU$

F_{22b} $LEU + \alpha - KETO + ATP \Rightarrow 3ACCoA + GLU + CO_2 + NADH + H^+ + FADH_2$

F_{23} $ILE + \alpha - KETO + ATP \Rightarrow SUCCoA + ACCoA + CO_2 + 2NADH + 2H^+ + FADH_2 + GLU$

F_{24} $VAL + \alpha - KETO + ATP \Rightarrow SUCCoA + 3NADH + H^+ + FADH_2 + 2CO_2 + GLU$

F_{25} $MET + SER + 2ATP \Rightarrow CTE + SUCCoA + NADH + H^+ + CO_2 + NH_3$

F_{26} $PHE + O_2 + NADPH + H^+ \Rightarrow TYR$

F_{27} $TYR + \alpha - KETO + 2O_2 \Rightarrow FUM + 2ACCoA + GLU$

F_{28} $ARG + \alpha - CETO \Rightarrow 2GLU + NADH + H^+ + urea$

F_{29} $HIS \Rightarrow GLU + NH_3$

F_{30} $OXA + ACCoA \Rightarrow CIT$

F_{31} $CIT \Rightarrow \alpha - CETO + CO_2 + NADPH + H^+$

F_{32} $\alpha - CETO \Rightarrow SUCCoA + NADH + H^+ + CO_2$

F_{33} $SUCCoA \Rightarrow FUM + ATP + FADH_2$

F_{34} $FUM \Leftrightarrow MAL$

F_{35} $MAL \Leftrightarrow OXA + NADH + H^+$

Results

Cell growth

During the batch culture, cells grow to a maximum concentration of $1.75x10^6$ cells/ml. Addition of glutamine during growth improved the maximum cell density to $2.2x10^6$ cells/ml. The highest cell concentration ($3.0x10^6$ cells/ml) was reached in the FB/EAA condition. The FB/AA condition did not improve growth any further (Figure 3.3).

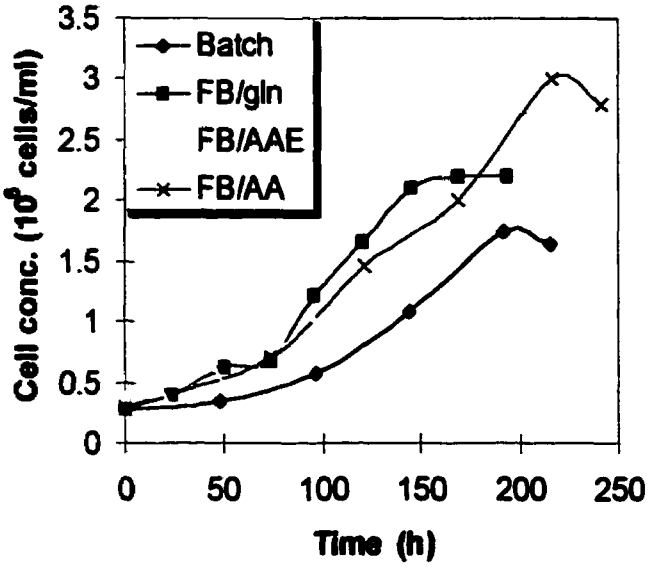


Figure 3.3 Cell Growth.

Glucose and glutamine consumptions and lactate and ammonia productions.

During FB/gln, q_{gluc} at 73 hrs was four-fold lower than what was measured in the batch culture (table 3.1). Even though, the overall glucose consumption is about the same at the end of the culture (Figure 3.4). In fact, q_{gluc} during the batch culture drops after 100 hrs cultivation to 0.02 (data not shown). The molar ratio of lactate produced to glucose consumed was around one during the batch as lactate production seemed inhibited in the FB/gln experiment ($q_{lac}/q_{gluc} = 0$ as shown in table 3.3). In fact, the overall lactate production for FB/gln was about half compared to that in the batch culture (Figure 3.5). The glutamine consumption was the same in the FB/gln culture as compared to the the batch culture, although, glutamine was completely depleted in the batch at 100 hrs. The ratio of ammonia production to glutamine consumption is slightly higher (0.75 and 0.88 respectively). During FB/gln, ammonia production led to a concentration of 2.5 mM. On the other hand, in the batch culture, the accumulation reached a maximum of 0.8 mM (Figure 3.6).

Table 3.3 Cultivation Kinetics

	Batch	FB/gln	FB/EAA	FB/AA
time (hrs)	72	73	81	97
q_{gluc} (mmol/hrs/10^9cells)	0.113	0.028	0.014	0.021
$Y_{lac/glc}$	1.11	0	0	0
q_{gln} (mmol/hrs/10^9cells)	0.019	0.019	---	---
$Y_{NH3/gln}$	0.73	0.88	---	---
X (10^6 cells/ml)	0.46	0.92	0.82	1.08
p_{ser} (mmol/hrs/10^9cells)	-5.05E-03	2.39E-04	1.85E-04	-3.86E-04
p_{gly}	4.86E-03	9.08E-04	-2.15E-03	7.72E-04
p_{ala}	3.38E-03	2.82E-03	7.65E-04	-8.49E-04
p_{asp}	-4.50E-05	2.39E-05	2.32E-05	-4.82E-04
p_{asn}	-1.13E-03	-1.19E-04	-1.39E-04	-4.82E-04
p_{gln}	-1.86E-02	-1.87E-02	-1.81E-03	-5.79E-05
p_{glu}	-4.05E-04	-2.39E-05	6.95E-05	-4.44E-04
p_{pro}	2.25E-04	-3.11E-04	5.56E-04	-5.59E-04
p_{thr}	-2.70E-03	-1.31E-03	-2.09E-04	-9.82E-04
p_{phe}	-1.53E-03	-6.93E-04	-2.78E-04	-3.65E-04
p_{tyr}	-1.31E-03	-6.69E-04	1.62E-04	-6.75E-05
p_{val}	-5.45E-03	-1.94E-03	-2.15E-03	-2.89E-03
p_{met}	-1.40E-03	-7.64E-04	-4.17E-04	-6.42E-04
p_{arg}	-4.37E-03	-2.63E-03	-1.23E-03	-2.20E-03
p_{his}	-9.91E-04	-4.30E-04	-2.32E-04	-3.09E-04
p_{lys}	-3.60E-03	-1.89E-03	-1.18E-03	-2.45E-03
p_{leu}	-7.07E-03	-2.17E-03	-2.41E-03	-2.84E-03
p_{ile}	-6.22E-03	-1.67E-03	-2.27E-03	-2.84E-03
q_{O2}	1.31E-01	1.31E-01	1.96E-02	1.22E-01

q_{gluc} for the two fed-batches with amino acids (FB/AA and FB/EAA) was very low and similar to q_{gluc} in FB/gln (table 3.3). Lactate was produced at an early stage during growth but was rapidly consumed (Figure 3.6). Lactate accumulation was normal compared to the two other experiments, but there was more lactate produced for FB/EAA. Still, a high lactate production at the end of

these two fed-batch cultures was observed (Figure 3.6). Under these feeding strategies, ammonia accumulation was at the lowest levels observed in the different cultures (Figure 3.7) especially in the case of FB/AA experiment.

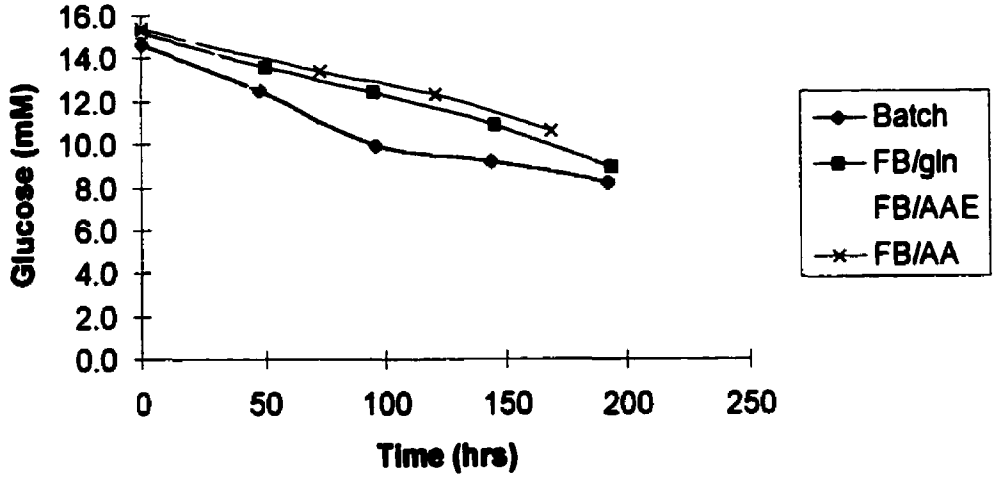


Figure 3.4 Glucose consumption

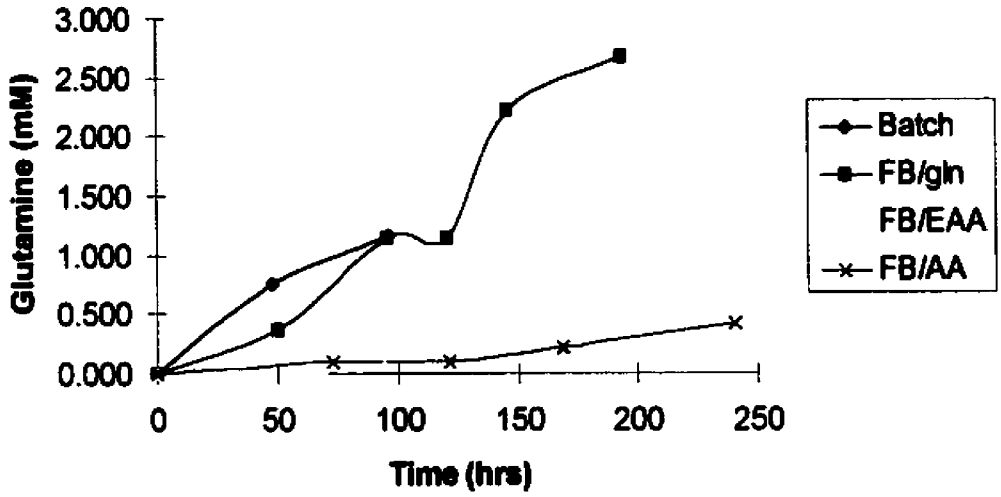


Figure 3.5 Total glutamine consumption

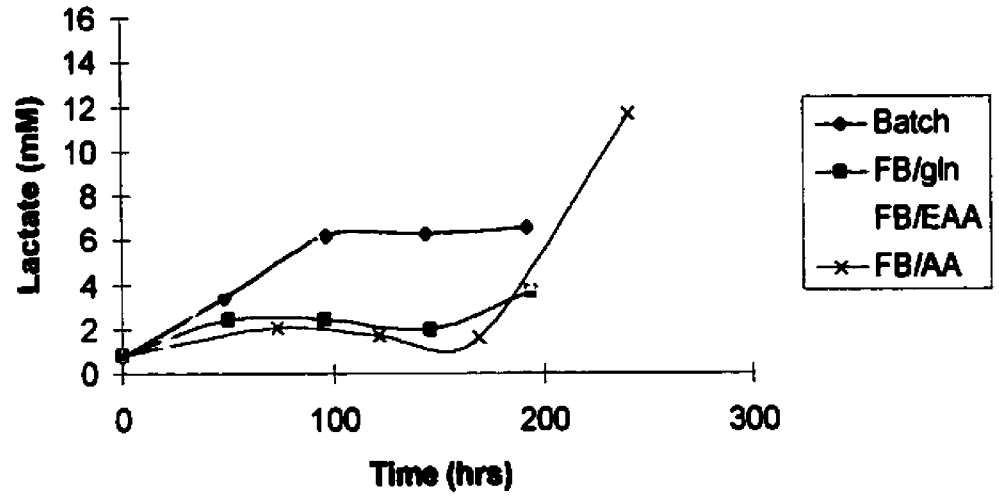


Figure 3.6 Lactate production

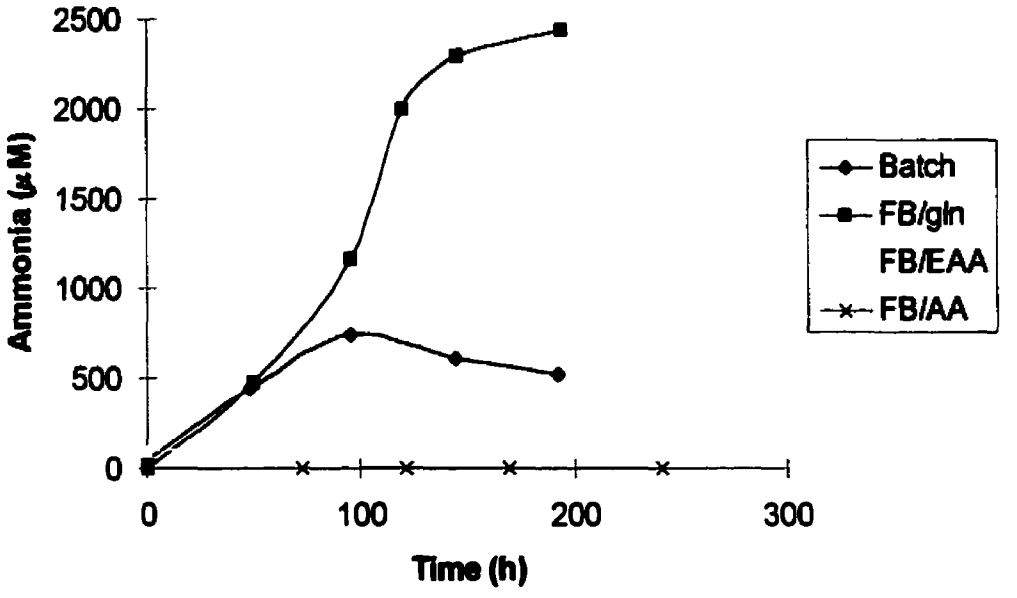


Figure 3.7Ammonia production

Ammonia inhibition

In figure 3.8, we see that a concentration of up to 1 mM NH_4^+ at the beginning of the cultivation inhibited cell growth, considering an error of 5% in cell count measurements. The inhibition was however not very significant, since the final cell concentration only dropped from $2x10^6$ cells/ml in the control at 0 mM ammonia to $1.5x10^6$ cells/mL at 1 mM ammonia.

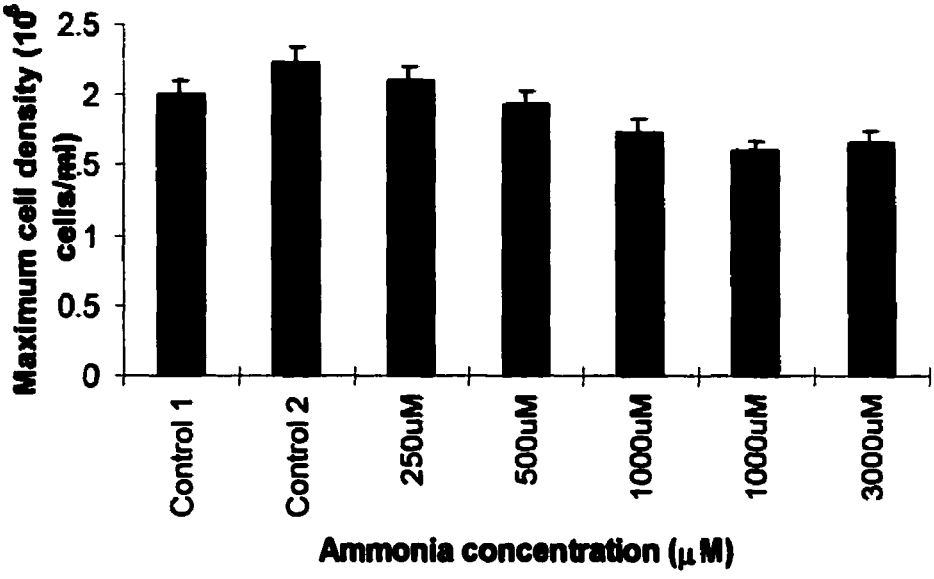


Figure 3.8 Effect of ammonia concentration on maximal cell density

Cell composition

For the composition of the cell, the following percentages were measured on a total protein basis: asp, 4.94 ; glu, 7.52 ; asn, 4.47; ser, 5.09 ; gln, 6.81 ;his, 3.01 ; pro, 4.79 ; thr, 5.87 ; arg, 8.43 ; ala, 5.51 ; tyr, 5.00 ; gly, 4.80 ; met, 0.06 ; phe, 3.92 ; ile, 3.34 ; leu, 7.89 ; lys, 10.15 ; cys, 3.07 ; trp, 1.1 . Total proteins were measured to be 73.0% w/w. These measurements showed standard deviation less than 4%. Also, we measured lipids at 10.0% w/w. DNA and RNA were taken as 1.4% w/w and 3.8% w/w as previously measured in Xie and Wang (1994) .

Metabolic fluxes

To further tune-up the amino acids feeding strategies, metabolic flux analysis was used with the model described in the Material and Methods. As mentioned earlier, fluxes are divided into three groups. Furthermore for every group, the fluxes were calculated for two phases during growth and are shown in figure 3.9, figure 3.10, figure 3.11 and figure 3.12. The first phase being the exponential phase and the second one the late exponential phase.

During the batch culture, glycolytic and glutaminolytic activities showed a decrease throughout cultivation. The same observation is valid for the Krebs cycle fluxes (F30 to F35, including F10) which drastically decreased in the late exponential phase. Most of the amino acid fluxes were high during the exponential phase, especially those for leucine (F22b), isoleucine (F23), valine (F24), methionine (F25) and arginine (F28). We also observed a few negative fluxes at the end of the exponential phase, especially for tyrosine (F27), histidine (F29) and threonine (F18).

Glycolytic fluxes (F1 and F3) were lower than in the batch during exponential growth phase for FB/gln, but the glutaminolytic fluxes are higher (F5tot and F8tot). As mentionned before, F2, which represents the production of lactate was

greatly reduced during exponential growth, but F4, representing the production of alanine, remained approximately in the same order of magnitude as in the batch. The amino acid fluxes, however, were drastically reduced compared to the batch. Also, a lot of negative fluxes are observed for amino acid fluxes. The Krebs cycle fluxes (F30 to F35) were maintained throughout cultivation time at a lower level compared to batch culture. The flux through the anaplerotic route (F10) was as high as in the batch at the exponential phase of the cultivation, but was also decreased afterwards.

For FB/AA, it seems that the glycolytic fluxes (F1 and F3) are similar to those of FB/gln. But, the alanine flux (F4) was reduced and the lactate flux (F2) was even reversed. Interestingly, glutaminolytic fluxes were inversed compared to the two previously mentioned experiments. The amino acid fluxes were higher than in the two previous experiments. We also observed less negative fluxes. The Krebs cycle fluxes were slightly higher in FB/AA than in FB/gln, but it is important to note that F10 was nearly null during this experiment.

Figure 3.12 shows a flux comparison between FB/EAA and FB/AA. All the fluxes shown were slightly higher for FB/AA. But, if we compare the NEAA fluxes F6, which is production of aspartate, and F11, the production of asparagine, these were reversed in the FB/EAA while F7, the production of

serine and F12, the production of proline, were higher in the FB/EAA compared to FB/AA.

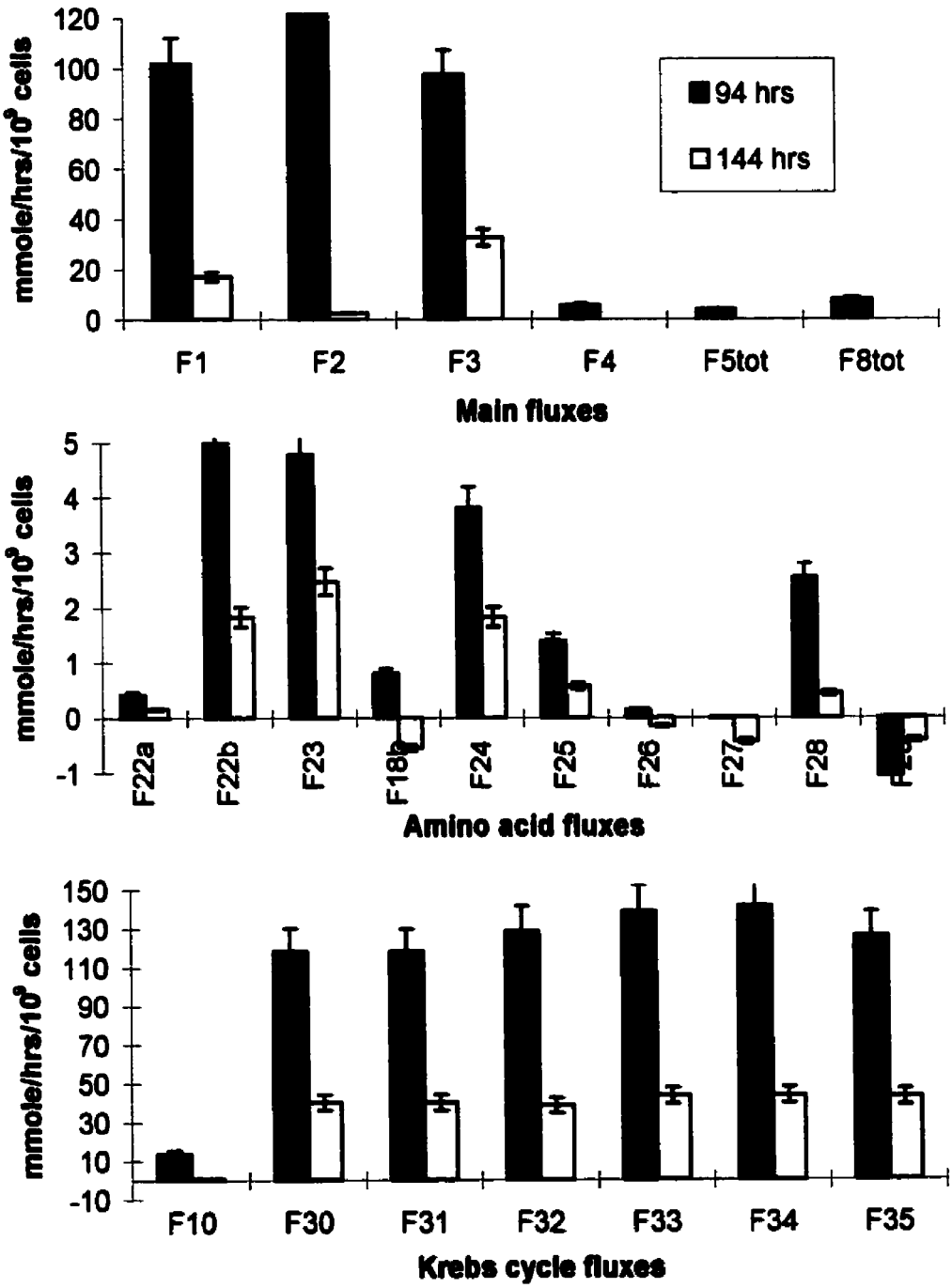


Figure 3.9 Metabolic fluxes during batch cultivation

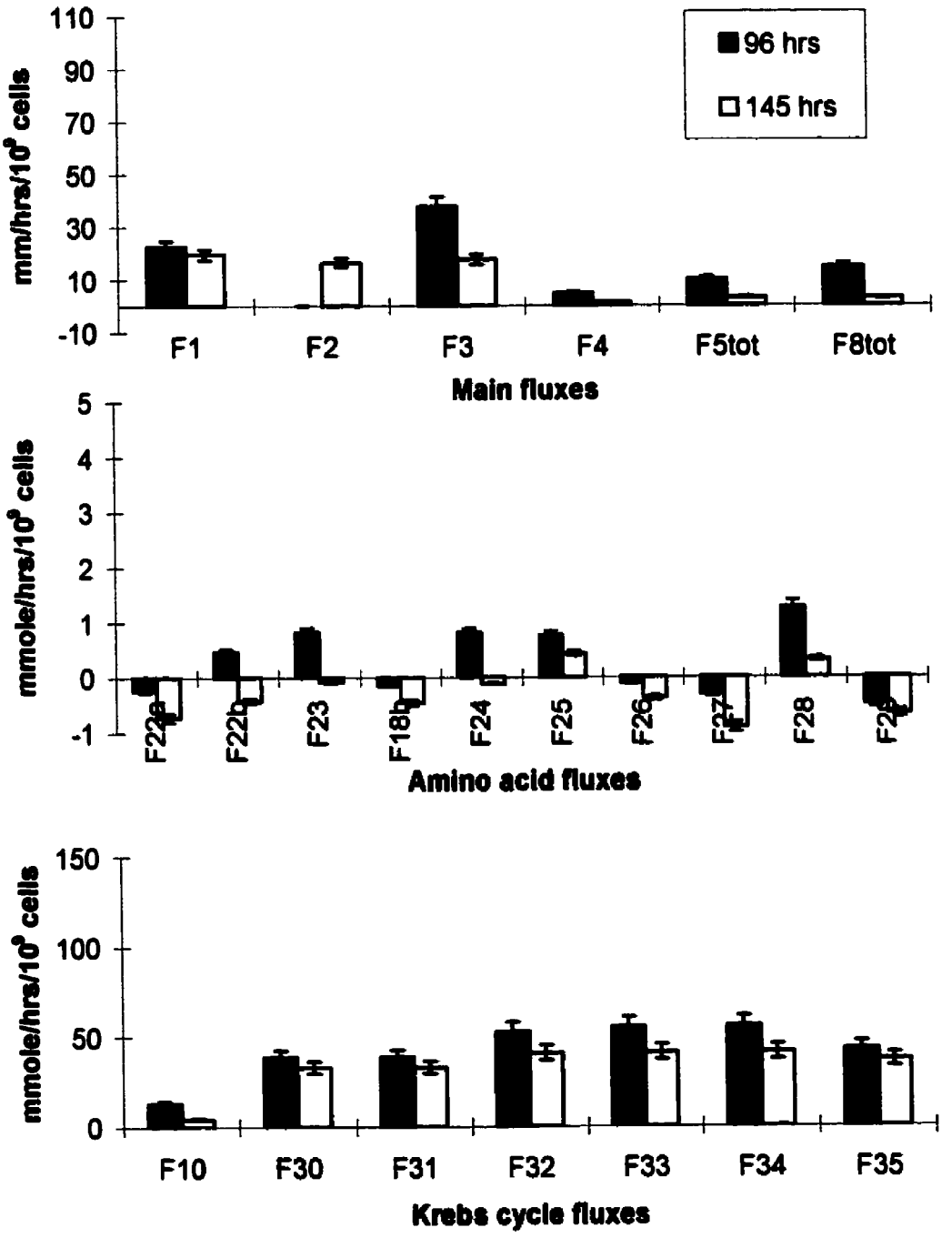


Figure 3.10 Metabolic fluxes during fed-batch with glutamine

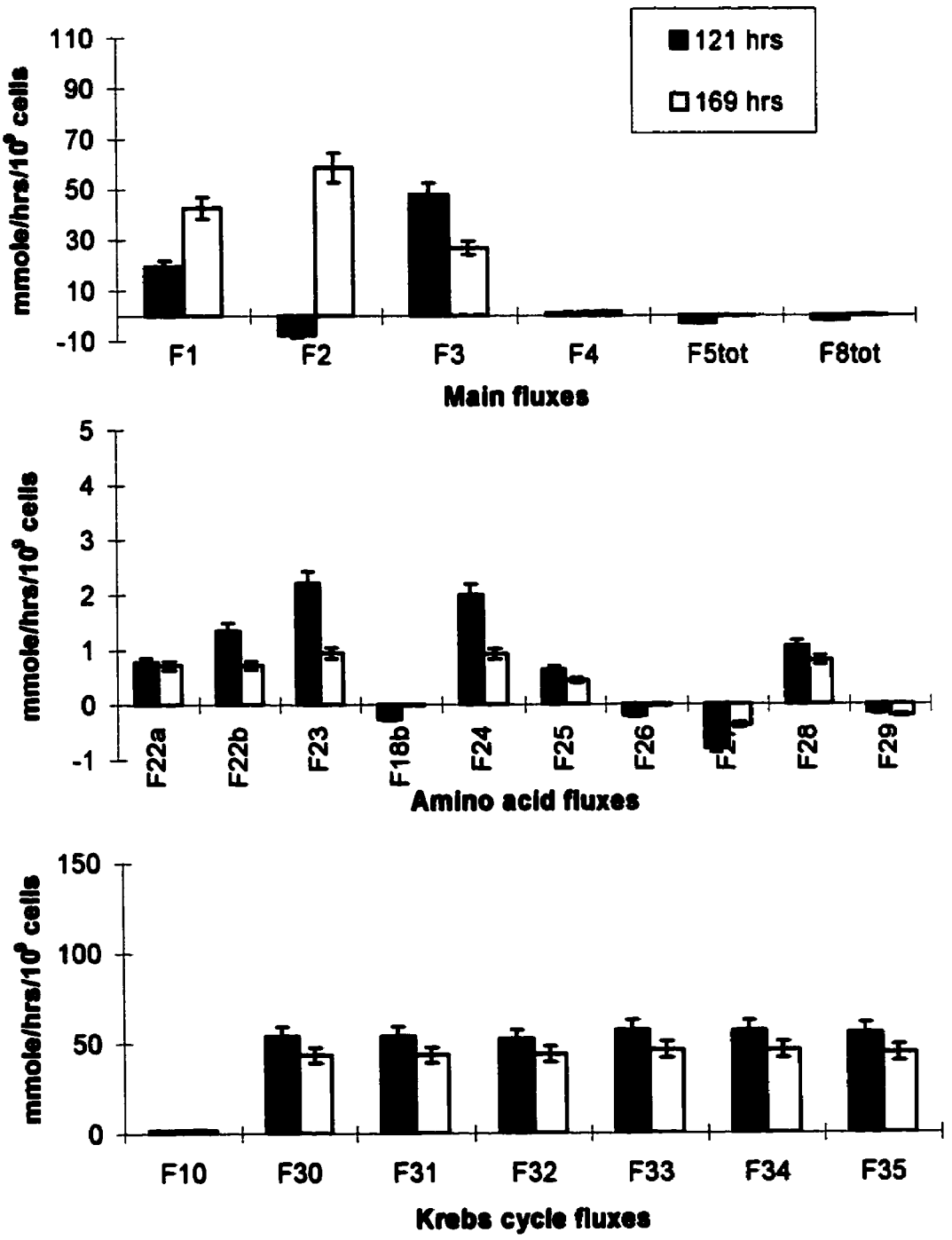


Figure 3.11 Metabolic fluxes during fed-batch with amino acids

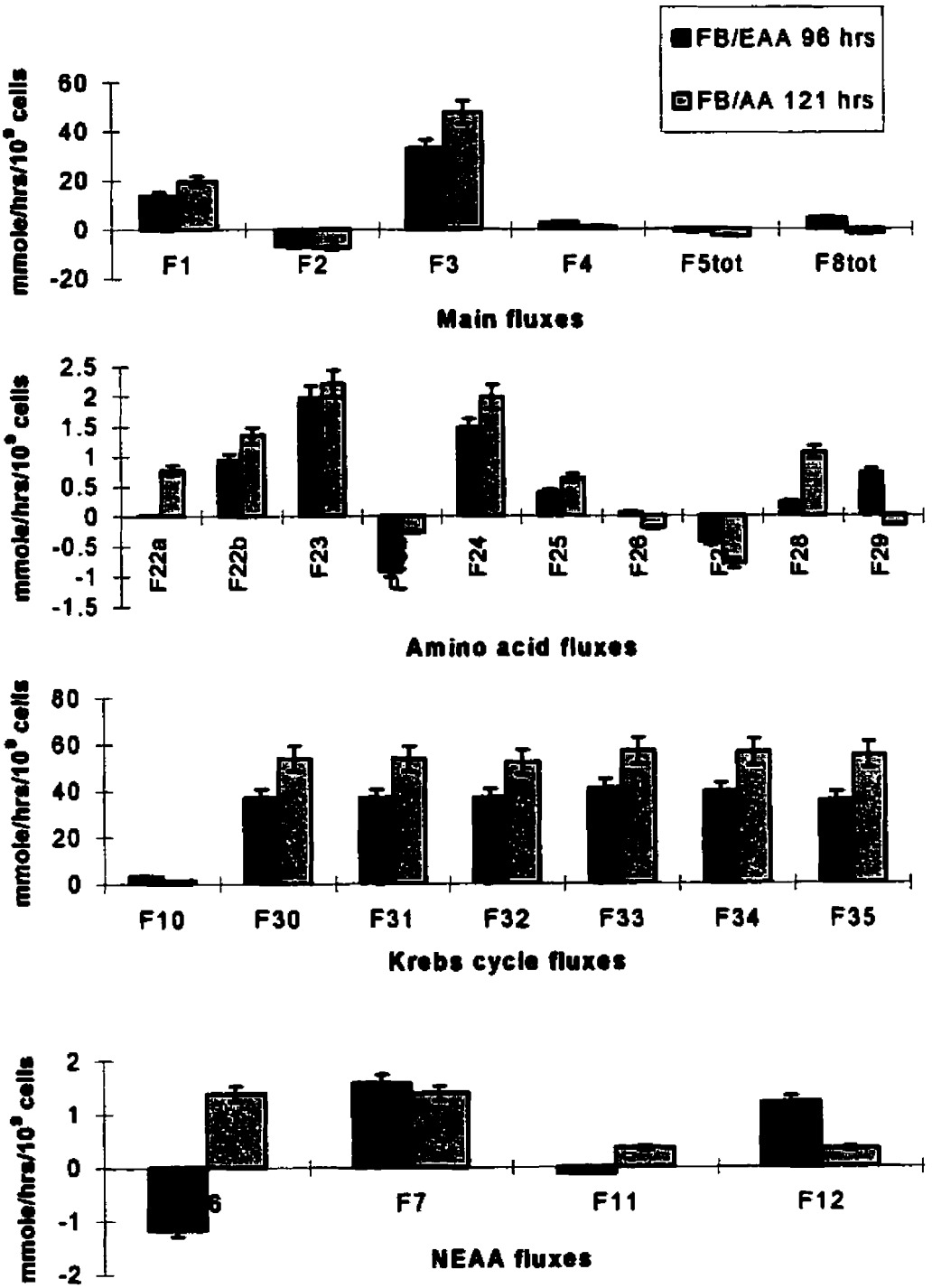


Figure 3.12 Comparison of metabolic fluxes for FB/AA and FB/EAA

Discussion

Batch

Glutamine was rapidly depleted in the batch experiment and, as a consequence, the growth rate decreased. Glutamine is a major energy source for this specific cell line. This is often the case for many cell lines and glutamine is usually completely depleted before glucose (Fitzpatrick et al., 1993; Petch and Butler, 1994; Sharfstein et al., 1994). Glucose was not intensively consumed compared to 293-1 cell line glucose consumption (Garnier et al., 1994; Nadeau et al., 1996). In these studies, we reported specific glucose consumption rates, q_{gluc}, ranging from 0.2 to 0.8 mmol/10^9 cells/h as compared to 0.12 mmol/10^9 cells/h, in this one. However, the rate measured for 293-2 is comparable to the rate of other cell lines such as BHK and hybridomas as reported by others (Neermann and Wagner, 1996). But, when glutamine became limiting at 100 hours, the glucose consumption dropped as well. Noteworthy, at this time, the cells were not in the plateau phase and this indicates that a low glutamine level may indirectly inhibit glycolysis, while cell growth is not immediately affected. The ratio of lactate produced to glucose consumed was not very high (approximately 1). For 293-1 cells, q_{lac}/q_{gluc} usually lies between 1.5 and 2 (Garnier et al., 1994; Nadeau et al., 1996). As previously mentioned, this cell line differs from the previous one, in that it contains two sections of the Ad5 E4 regions, ORF 6 and 7. These are under

the control of an inducible CMV promoter with the tet operator (tetO). The tTA gene, also regulated by tetO, was inserted such that when tetracycline is added the E4 genes would be shut-off. In fact, it was shown that there was a loss of tetracycline regulation in this cell line and E4 was expressed even in the presence of tetracycline (Lusky et al., 1998). Krougliak and Graham (1995) reported that a 293 cell line, expressing E4 with a leaky inducible promoter, showed slightly lower growth rate compared to the original 293 cells. Among the effects of these ORFs, it is reported (Leppard, 1997; Wang and Finer, 1996) that E4 ORF 6 complexes with the E1B gene to increase the export of viral mRNAs from the nucleus and thus inhibits most cellular mRNAs transport. This phenomenon has probably an inhibiting effect on protein and enzyme production, thus reducing the metabolism and growth of 293-2 cells. In the same review (Leppard, 1997), the author also reports that ORF6 binds to p53, thus blocking the p53-induced apoptosis and enhancing transformation of the cell.

The cells continued to grow after glutamine depletion (>100 hrs), presumably after a metabolic shift toward the use of other sources of amino acids for growth, as it is discussed below. Some authors (Ljunggren and Haggstrom, 1994; Vriezen et al., 1997) made similar observations with limiting glutamine concentrations. Cell growth probably stopped when one or the other essential amino acids were depleted or became limiting. Glutamate, asparagine and serine concentrations

decreased to below 10% of their initial concentration at the end of cultivation (results not shown). These are known as non-essential amino acids that can be produced by cells. The most important amino acid fluxes that feed the Krebs cycle were leucine, isoleucine, methionine, valine and arginine. Xie and Wang (1996) reported that probably only leucine and isoleucine are metabolized for energy production. We observed the same trend but valine and methionine seem to contribute also. Arginine does not directly enter the Krebs cycle but contributes to the glutamate pool, thus replacing the glutamine source. It is important to realize that for the amino acid fluxes, negative fluxes are impossible due to the irreversibility of these reactions. These results might be explained by the assumption that the cells use other sources of amino acids such as proteins found in the serum (Nyberg et al., 1999).

However, this metabolic change as a consequence of the limiting glutamine concentration was not sufficient to sustain cell growth as high as that observed in the fed-batches, since Krebs cycle fluxes were reduced largely during exponential growth. It seems that the flow of amino acids to the Krebs cycle is not sufficient to fulfill the cells' energetic needs.

Figure 3.13 shows the main metabolic pathways (solid lines) involved in the batch at the beginning of cultivation and during exponential growth. During

exponential growth, glucose and glutamine are consumed, feeding the Krebs cycle in order to produce energy. Usually the rate of glycolysis is high compared to glucose incorporation in the Krebs cycle, the surplus going to lactate (F2) (Butler and Jenkins, 1989; Fitzpatrick et al., 1993; Lanks and Li, 1988; Lazo, 1981; Neermann and Wagner, 1996; Petch and Butler, 1994; Portais et al., 1996; Portner et al., 1994; Zeng and Deckwer, 1995). Glutaminolysis is high and the overflow of glutamate goes to proline (F12, not shown). The overflow of the Krebs cycle exit by the anaplerotic pathway (F10) leading to alanine that is excreted.

Fed-batch with glutamine

Since the supply of amino acids appears insufficient to feed the Krebs cycle, a fed-batch with glutamine was suggested to avoid depletion. The growth rate was indeed much higher and a higher concentration was reached in this fed-batch cultivation. q_{gluc} was reduced and q_{gln} was comparable to the batch culture. It seems that q_{gluc} remained low, because glutamine was not limiting. Some authors (Hu et al., 1987; Jenkins et al., 1992; Ljunggren and Haggstrom, 1994) reported that glutaminolysis inhibits glycolysis whereas other authors (Portais et al., 1996; Sharfstein et al., 1994) on the contrary, have reported that the glutamine consumption stimulates glycolysis. Therefore in these experiments, two trends are observable: during the batch culture, q_{gluc} is high while glutamine is

consumed until 100 hrs, then q_{gluc} drops. In FB/gln, glutamine concentration is kept constant and relatively low and q_{gluc} remained also lower during the whole growth. Then q_{gluc} may be a function of glutamine concentration rather than a function of glutamine consumption rate.

As glutamine is consumed, ammonia is produced up to a concentration of 2.5 mM. As it was demonstrated in shake-flask experiments, ammonia inhibits cell growth but not to a severe extent because only a slight reduction of $2x10^6$ cells/ml to $1.5x10^6$ cells/ml was found when 1, 2 or 3 mM NH_3 were added at the beginning of the culture. Such concentrations can inhibit growth for certain cell lines. However, growth inhibition may increase in bioreactor systems when pH is being controlled at a higher value than observed in flasks. In fact at higher pH unionized ammonia is favored and diffuses more easily through the inner membranes of the cell (Doyle and Butler, 1990). Ammonia possibly affects intracellular pH (Ozturk et al., 1992) or it may affect the carbohydrate side chain structure of proteins (Ryll et al., 1994). Hence, high ammonia levels may be responsible for cessation of growth. However, Schneider et al. (1996) reported that the physiological consequences when ammonia is added in the medium are opposite to those resulting from ammonia produced intracellularly. The intracellular pH tends to increase when NH_4^+ is added in the medium while it is decreased when produced intracellularly. Thus, one has to be careful when

interpreting the effect of added ammonia in the medium. However, methionine and serine were also found to be low at the end of the cultivation (below 10% of their initial concentration). Therefore, a combination of ammonia inhibition and nutrient limitation is suggested to explain growth arrest.

The metabolic flux analysis for the fed-batch cultivation with glutamine shows that the main fluxes are decreased compared to batch, but maintained quite constant until the end of the growth. The only reactions that were decreased, were the production of alanine (F4) and lactate (F2). This reflects the fact that cells are more efficient in using pyruvate for oxidation in the Krebs cycle. Some authors (Xie and Wang, 1996) have suggested that excess glutamine and glucose results in excess alanine production. It was also reported that excess ammonium production may be the cause of excess alanine excretion as transamination pathways are activated (Bonarius et al., 1998; Hansen and Emborg, 1994; Ozturk et al., 1992). Furthermore, some authors have shown (Ljunggren and Haggstrom, 1994; Ljunggren and Haggstrom, 1992) that limiting glutamine resulted in less alanine and lactate formation, although in our case glutamine was not limiting (between 0.8 and 1.6 mM) but fed constantly, we observed the same trend, showing that nutrients were used more efficiently. It is possible that glutamine was nearly depleted between feedings, but it was not seen as no analyses were done during that time. The amino acid fluxes are largely decreased during

exponential growth compared to batch cultivation, indicating that glutamine is sufficient to fulfill the energetic needs and there is no need for essential amino acids as Krebs cycle intermediates. Interestingly, F30 to F35 (Krebs cycle) are lower than in the batch culture but still the cells have the same growth rate, indicating that in the batch culture, there was a surplus in these fluxes. This fact was also reflected in the production of lactate and alanine for the batch culture.

Fed-batch with amino acids.

Feeding amino acids is suggested to replace glutamine, reduce ammonia production and ensure that no amino acid limitation will occur. Other authors (Vriezen et al., 1997) have demonstrated in chemostat cultures of hybridoma that the specific consumption rate of nearly all essential amino acids increased when the glutamine feed was decreased, showing that EAA can partially replace glutamine. Some authors (Hassell and Butler, 1990) have successfully adapted cells to grow without glutamine, resulting in less ammonia production. They reached a higher cell density by replacing glutamine with glutamate or α-ketoglutarate.

In the FB/AA reported here, a higher cell concentration was also reached as cell cultivation time was extended. Interestingly, glutamate and serine were still

limiting and consumed rapidly as they were fed to the bioreactor (results not shown). One would expect that the glucose consumption rate would rise as glutamine became limiting, but q_{gluc} remained very low. The same trend was observed during the batch culture as glutamine became limiting after 100 hrs and also during FB/gln. Vriezen et al. (1997) showed that when glutamine is limiting glucose consumption was not enhanced, suggesting a better utilization of this nutrient instead.

The metabolic fluxes related to glutaminolysis were reversed since glutamine is present in the medium at a very low concentration, just to maintain protein production. The cells seem to produce glutamate and glutamine, altough the glutamine synthetase enzyme has been reported to be very low in transformed cell lines (Bebbington et al., 1992; Mc Dermott and Butler, 1993; Paredes et al., 1996). The glycolytic fluxes and the Krebs cycle fluxes are similar to those in FB/gln. In this case lactate production (F2) is reversed, this fact indicates that the cells lack a source of pyruvate. Usually glutamine can account for a source of pyruvate via the anaplerotic pathway (Mancuso et al., 1994). Figure 3.9, figure 3.10 and figure 3.11 revealed that, the exit from the Krebs cycle via the anaplerotic route (F10) is important in the cases of batch and FB/gln but is null in the case of fed-batch with amino acids. Furthermore, the amino acid fluxes are higher, providing an energy source to the cells thus replacing the role of

glutamine. When glutamine is absent, a shift in metabolism occurs (figure 3.2). Glucose still feeds the Krebs cycle but its flux is reduced, while amino acids fluxes are increased.

Both fed-batches with amino acids have the same growth rate, but they differ in their metabolic patterns. Both seem to have the same energy level as their Krebs cycle fluxes are the same. The only difference between the two cultivations, is that in one case more NEAA is present in the medium. Since these can be produced by the cells, we do not see the necessity to add them, but some authors (Xie and Wang, 1996) have suggested that adding NEAA suppresses their formation and thus reduces glutamine needs. Therefore, it is suprising to see that in FB/AA, non-essential amino acids are still produced (F6, F7, F11, F12 positive) while in FB/EAA aspartate (F6) and asparagine (F11) are consumed. The difference with the work of Xie and Wang, (1996) is that their media contained glutamine. Thus feeding only EAA may not be sufficient to replace the lack of glutamine and therefore the cell consumes non-essential amino acids.

The catabolism of essential amino acids is often accompanied by the reverse reaction of α-ketoglutarate to glutamate. Hence, the excess glutamate must somehow be consumed and α-ketoglutarate must be replenished, which results in a high activity in F6 (production of aspartate), F7 (production of serine) and

F11 (production of asparagine). These reactions involve a transamination step from glutamate to α-ketoglutarate. The flux of proline production F12 is found to be lower in the FB/AA, although it consumes glutamate it does not produce α-ketoglutarate. Also, the consumption of histidine (F29) producing glutamate is inhibited while on the contrary arginine (F28) is still consumed producing glutamate but also an energetic compound, NADH, at the same time. In all of these reactions, ammonia is not involved, and the net production is null as evidenced in figure 3.9.

In FB/EAA, we did not observe the same trend. In contrast, we observed a net consumption of aspartate and asparagine (negative F6 and F11) providing intermediates to the Krebs cycle, glutamate is then accumulated and consumed via the production of proline (F12) and serine (F7). Bonarius et al. (1996) have reported that a high proline production is a consequence of high glutaminolytic activity resulting in a high glutamate concentration or a high NADPH/$NADP^+$ ratio.

Both feeding strategies are equivalent from an energetic point of view, since the Krebs cycle fluxes are equivalent. Although in FB/AA, a net production of NEAA is observed, as a consequence of glutamate accumulation, FB/EAA may be more appropriate since it leads to less amino acid accumulation. In the latter

case, one has to be careful as aspartate and asparagine may eventually become limiting as they are more consumed.

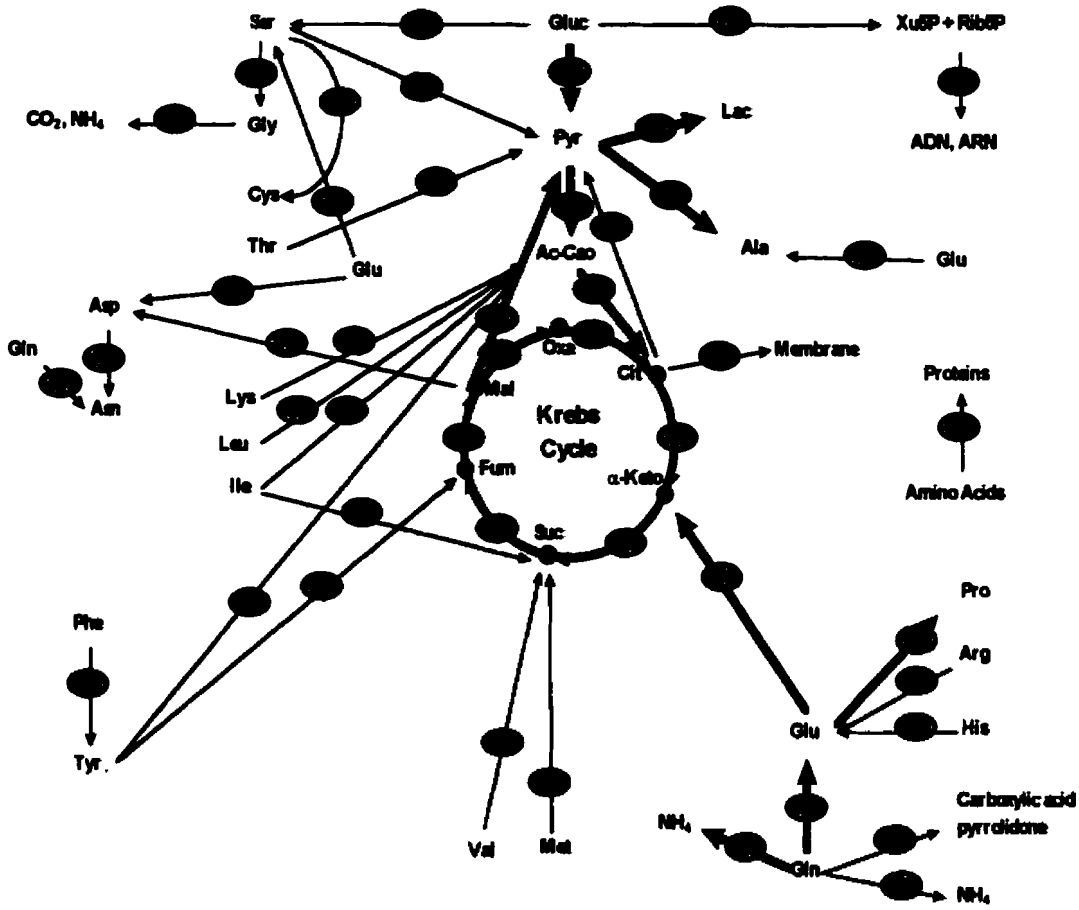


Figure 3.13 Batch before 100 h. Thick lines represent the main fluxes

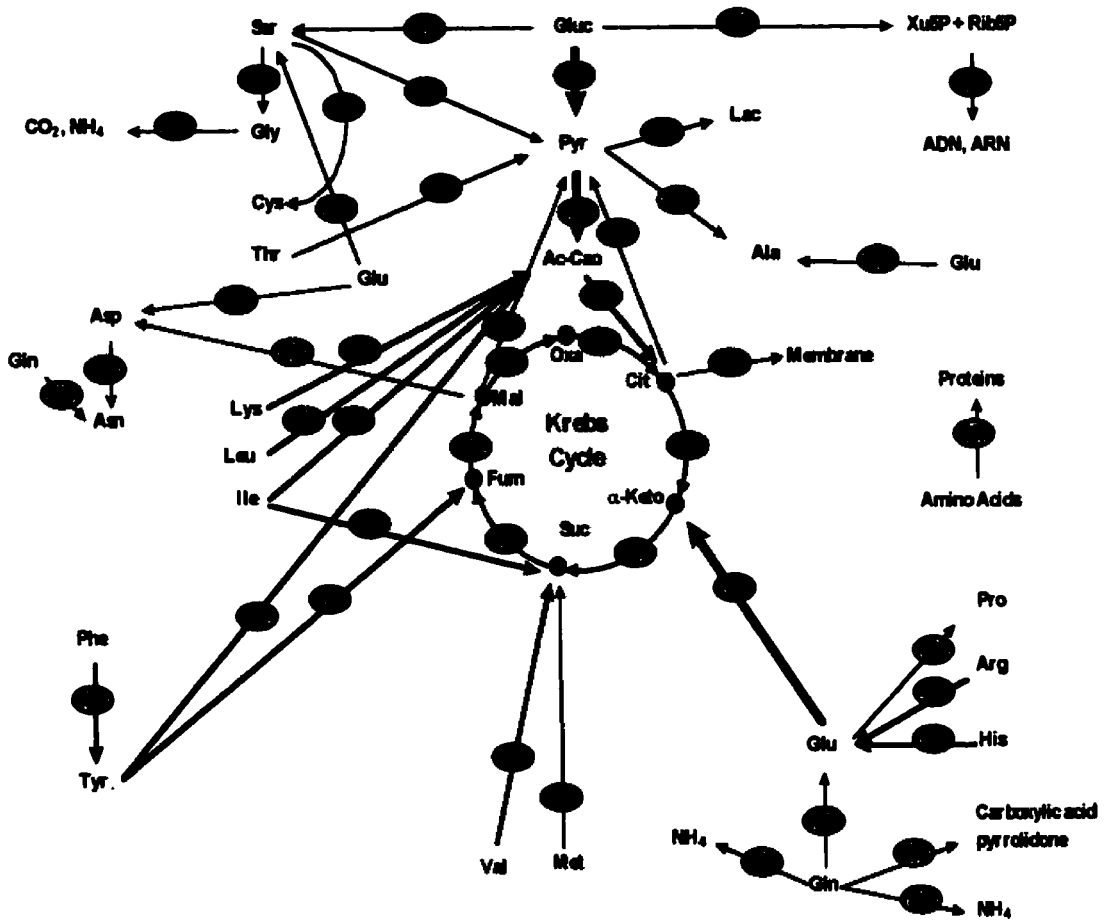


Figure 3.14 Fed-Batch with amino acids. The thick lines represent the main fluxes

Conclusion

Some key conclusions could be drawn from the results presented and discussed in the previous sections. This cell line predominantly consumes glutamine and produces large amounts of ammonia. This metabolic trend differs significantly from the 293 parental cell line which, predominantly, consumes glucose and produces lactate. It should be noted that this cell line has been transformed by addition of the adenovirus E4 gene.

The experiments with glutamine supplementation have demonstrated:

- Lower q_{gluc} and glutaminolytic fluxes showing that low glutamine can inhibit glycolysis ;
- Higher accumulation of ammonia, resulting in possible growth inhibition ;
- Reduced fluxes to lactate, and consequently a better utilization of pyruvate;
- Reduced fluxes of amino acids catabolism, proving that glutamine can partially replace these amino acids.
- Reduced but maintained Krebs cycle fluxes, leading to a high cell growth.

Although this cell line rapidly incorporates glutamine, it can grow in media with low glutamine concentration environment, reducing ammonia accumulation. Furthermore, supplying amino acids with a low initial amount of glutamine has demonstrated the following :

- Very low q_{gluc} and q_{gln}, showing furthermore the relationship between glycolysis and glutaminolysis ;
- Very low accumulation of ammonia, resulting in high growth ;
- Reduced or inversed fluxes to lactate and alanine, showing that there is no excess in glycolysis and glutaminolysis;
- Enhanced amino acids fluxes, proving that these can replace glutamine by providing intermediates to the Krebs cycle.
- Reduced but maintained Krebs cycle fluxes, leading to a high cell growth

Furthermore the flux analysis has shown that adding NEAA, *a priori*, is not necessary since the Krebs cycle fluxes are the same for both feeding strategies, and may even lead to accumulation in the medium. But one has to be careful so that no limitations occur with these non-essential amino acids. Flux calculations can be further used to follow the state of the culture in order to insure that Krebs

cycle fluxes are maintained as well as amino acids fluxes during fed-batches with amino acids.

References

BANNAI, S. (1986). Exchange of Cystine and Glutamate across Plasma Membrane of Human Fibroblasts. J. Biol. Chem., 261, 2256-2263.

BANNAI, S., and ISHII, T. (1988). A Novel Function of Glutamine in Cell Culture: Utilization of Glutamine for the Uptake of Cystine in Human Fibroblasts. J. Cellul. Physiol., 137, 360-366.

BEBBINGTON, C. R., RENNER, G., THOMPSON, S., KING, D., ABRAMS, D., and YARRANTON, G. T. (1992). High-Level Expression of a Recombinant Antibody from Myeloma Cells Using a Glutamine Synthetase Gene as an Amplifiable Selectable Marker. Bio/Technology ,10, 169-175.

BONARIUS, H. P. J., HATZIMANIKATIS, V., MEESTERS, K. P. H., DE GOOIJER, C. D., GEORG, S., and TRAMPER, J. (1996). Metabolic Flux Analysis of Hybridoma Cells in Different Culture Media Using Mass Balance. Biotechnol. Bioeng., 50, 299-318.

BONARIUS, H. P. J., HOUTMAN, J. H. M., DE GOOIJER, C. D., TRAMPER, J., and SCHMID, G. (1998). Activity of Glutamate Dehydrogenase is Increased in Ammonia-Stressed Hybridoma Cells. Biotechnol. Bioeng., 57, 447-453.

BONARIUS, H. P. J., SCHMID, G., and TRAMPER, J. (1997). Flux Analysis of Underdetermined Metabolic Networks: The Quest for the Missing Constraints. Trends Biotechnol., 15, 307-315.

BOUCHER, R. C., and KNOWLES, M. R. (1994). Gene Therapy for Cystic Fibrosis Using E1-Deleted Adenovirus: a Phase 1 Trial in the Nasal Cavity. Hum. Gene Ther., 5, 615-634.

BRIAND, P., and KAHN, A. (1993). Intérêts et limites des vecteurs adénoviraux pour le transfert de gènes in vivo. Pathol. Biol., 41, 663-671.

BROWN, R. R. (1996). Metabolism and Biology of Tryptophan. Recent Advances in Tryptophan Research, Plenum Press, New York, 15-25.

BUTLER, M., and JENKINS, H. (1989). Nutritional Aspects of the Growth of Animal Cells in Culture. J. Biotechnol., 12, 97-110.

CRYSTAL, R. G., MCELVANEY, N. G., ROSENFELD, M. A., CHU, C. S., MASTRANGELI, A., HAY, J. G., BRODY, S. L., JAFFE, H. A., EISSA, N. T., and DANEL, C. (1994). Administration of an Adenovirus Containing the Human CFTR cDNA to the Respiratory Tract of Individuals with Cystic Fibrosis. Nat. Genet., 8, 42-51.

DOYLE, C., and BUTLER, M. (1990). The Effect on the Toxicity of Ammonia to a Murine Hybridoma. J. Biotechnol., 15, 91-100.

FITZPATRICK, L., JENKINS, A., and BUTLER, M. (1993). Glucose and Glutamine Metabolism of a Murine B-Lymphocyte Hybridoma Grown in Batch Culture. Appl. Biochem. Biotechnol., 43, 93-116.

GARNIER, A., COTÉ, J., NADEAU, I., KAMEN, A., and MASSIE, B. (1994). Scale-Up of the Adenovirus Expression System for the Production of Recombinant Protein in Human 293S Cells. Cytotechnology,15, 145-155.

HANSEN, H. A., and EMBORG, C. (1994). Influence of Ammonium on Growth, Metabolism, and Productivity of a Continuous Suspension Chinese Hamster Ovary Cell Culture. Biotechnol. Prog., 10, 121-124.

HASSEL, T., GLEAVE, S., and BUTLER, M. (1990). Growth Inhibition in Animal Cell Culture. Appl. Biochem. Biotechnol,. 30, 29-40.

HASSELL, T., and BUTLER, M. (1990). Adaptation to Non-Ammoniagenic Medium and Selective Substrate Feeding Lead to Enhanced Yields in Animal Cell Cultures. J. Cell Sci., 96, 501-508.

HU, W. S., DODGE, T. C., FRAME, K. K., and HIMES, V. B. (1987). Effect of Glucose on the Cultivation of Mammalian Cells. Dev. Biol. Stand. 66, 279-290.

JENKINS, H. A., BUTLER, M., and DICKSON, A. J. (1992). Characterization of Glutamine Metabolism in Two Related Murine Hybridomas. J. Biotechnol., 23, 167-182.

KAY, M. A., and WOO, S. L. C. (1994). Gene Therapy for Metabolic Disorders. Trends Genet.,10, 253-257.

KROUGLIAK, V., and GRAHAM, F. L. (1995). Development of Cell Lines Capable of Complementing E1, E4, and Protein IX Defective Adenovirus Type 5 Mutants. Hum. Gene Ther., 6, 1575-1586.

LANKS, K. W., and LI, P.-W. (1988). End Products of Glucose and Glutamine Metabolism by Cultured Cell Lines. J. Cellul. Physiol., 135, 151-155.

LAZO, P. A. (1981). Amino Acids and Glucose Utilization by Different Metabolic Pathways In Ascites-Tumour Cells. Eur. J. Biochem., 117, 19-25.

LEPPARD, K. N. (1997). E4 Gene Function in Adenovirus, Adenovirus Vector and Adeno-Associated Virus Infections. J. Gen. Virol., 78, 2131-2138.

LJUNGGREN, J., and HAGGSTROM, L. (1994). Catabolic Control of Hybridoma Cells by Glucose and Glutamine Limited Fed-Batch Cultures. Biotechnol. Bioeng., 44, 808-818.

LJUNGGREN, J., and HAGGSTROM, L. (1992). Glutamine Limited Fed-batch Culture reduces the Overflow Metabolism of Amino Acids in Myeloma Cells. Cytotechnology , 8, 45-56.

LUSKY, M., CHRIST, M., RITTNER, K., DIETERLE, A., DREYER, D., MOUROT, B., SCHULTZ, H., STOECKEL, F., PAVIRANI, A., and MEHTALI, M. (1998). In

Vitro and In Vivo Biology of Recombinant Adenovirus Vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 Deleted. J. Virol., 72, 2022-2032.

MCDERMOTT, R. H., and BUTLER, M. (1993). Uptake of Glutamate, not Glutamine Synthetase, Regulates Adaptation of Mammalian Cells to Glutamine-Free Medium. J. Cell Sci., 104, 51-58.

NADEAU, I., GARNIER, A., CÔTÉ, J., MASSIE, B., CHAVARIE, C., and KAMEN, A. (1996). Improvement of Recombinant Protein Production with the Human Adenovirus/293S Expression System Using Fed-Batch Strategies. Biotechnol. Bioeng., 51, 613-623.

NEERMANN, J., and WAGNER, R. (1996). Comparative Analysis of Glucose and Glutamine Metabolism in Transformed Mammalian Cell Lines, Insect and Primary Liver Cells. J. Cellul. Physiol., 166, 152-169.

OZTURK, S. S., RILEY, M. R., and PALSSON, B. O. (1992). Effects of Ammonia and Lactate on Hybridoma Growth, Metabolism, and Antibody Production. Biotechnol. Bioeng., 39, 418-431.

PAREDES, C., PRATS, E., CAIRO, J. J., AZORIN, F., and GODIA, F. (1999). Modification of Glucose and Glutamine Metabolism in Hybridoma Cells through Metabolic Engineering. Cytotechnology, 30, 85-95..

PETCH, D., and BUTLER, M. (1994). Profile of Energy metabolism in a Murine Hybridoma: Glucose ad Glutamine Utilization. J. Cellul. Physiol., 161, 71-76.

PISSARRA, P. D. N., and HENRIKSEN, C. M. (1998). Fluxmap. A Visual Environment for Metabolic Flux Analysis of Biochemical Pathways. Computer Applications in Biotechnology, T. Yoshida and S. Shioya, Osaka, Japan.

PORTAIS, J., VOISIN, P., MERLE, M., and CANIONI, P. (1996). Glucose and Glutamine Metabolism in C6 Glioma Cells Studied by Carbon 13 NMR. Biochimie, 78, 155-164.

PORTNER, R., BOHMANN, A., LUDEMANN, I., and MARKL, H. (1994). Estimation of Specific Glucose Uptake Rates in Cultures of Hybridoma Cells. J. Biotechnol., 34, 237-246.

RYLL, T., VALLEY, U., and WAGNER, R. (1994). Biochemistry of Growth Inhibition by Ammonium Ions in Mammalian Cells. Biotechnol. Bioeng., 44, 184-193.

SALWAY, J. G. (1994). Metabolism at a Glance, Blackwell Scientific Publications, Oxford, MA.

SANFELIU, A., PAREDES, C., JORDI, J. C., and FRANCESC, G. (1997). Identification of Key Patterns in the Metabolism of Hybridoma Cells in Culture. Enzyme Microb. Technol., 21, 421-428.

SAVINELL, J. M., and PALSSON, B. O. (1992). Optimal Selection of Metabolic Fluxes for in vivo Measurements. 1. Development of Mathematical Methods. J. Theor. Biol., 155, 201-214.

SCHNEIDER, M., MARISON, I. W., and VON STOCKAR, U. (1996). The Importance of Ammonia in Mammalian Cell Culture. J. Biotechnol., 46, 161-185.

SHARFSTEIN, S. T., TUCKER, S. N., MANCUSO, A., BLANCH, H. W., and CLARK, D. S. (1994). Quantitative In Vivo Nuclear Magnetic Resonance Studies of Hybridoma Metabolism. Biotechnol. Bioeng., 43, 1059-1074.

TAKIGUCHI, N., SHIMIZU, H., and SHIOYA, S. (1997). An On-Line Physiological State Recognition System for the Lysine Fermentation Process Based On a Metabolic Reaction Model. Biotechnol. Bioeng., 55, 170-181.

TRAPNELL, B. C. (1993). Adenoviral Vectors for Gene Transfer. Adv. Drug Deliv. Rev., 12, 185-199.

TRAPNELL, B. C., and GORZIGLIA, M. (1994). Gene Therapy using Adenoviral Vectors. Curr. Opin. Biotechnol., 5, 617-625.

VRIEZEN, N., ROMEIN, B., LUYBEN, K. C. A. M., and VAN DIJKEN, J. P. (1997). Effects of Glutamine Supply on Growth and Metabolism of Mammalian Cells in Chemostat Culture. Biotechnol. Bioeng., 54, 272-286.

WANG, Q., and FINER, M. H. (1996). Second-Generation Adenovirus Vectors. Nat. Med., 2, 714-716.

XIE, L., and WANG, D. I. C. (1994). Applications of Improved Stoechiometric Model in Medium Design and Fed-Batch Cultivation of Animal Cells in Bioreactor. Cytotechnology , 15, 17-29.

XIE, L., and WANG, D. I. C. (1996). Material Balance Studies on Animal Cell Metabolism Using a Stoichiometrically Based Reaction Network. Biotechnol. Bioeng., 52, 579-590.

ZENG, A.-P., and DECKWER, W.-D. (1995). Mathematical Modeling and Analysis of Glucose and Glutamine Utilization and regulation In Cultures of Continuous Mammalian Cells. Biotechnol. Bioeng., 47, 334-346.

3.3 Résultats complémentaires

Afin de vérifier la validité du calcul des flux métaboliques, certains flux ont été calculés de façon indépendante et comparés aux flux calculés à l'aide de la matrice stœchiométrique. Le tableau 3.4 montre la valeur de certains flux qui ont pu être calculés indépendamment comparée à ceux calculés par le modèle.

Tableau 3.4 Flux d'acides aminés calculés avec le modèle et indépendamment.

µmole/10^9 cell./heure	Calculé ind.	Modèle
Alanine (F4)	0.812	0.809
Proline (F12)	0.331	0.328
Thréonine (F18)	-0.260	-0.257
Phénylalaline (F26)	-0.207	-0.205
Valine(F24)	1.985	1.988
Arginine (F28)	1.052	1.055
Histidine (F29)	-0.162	-0.157
Lysine (F22a)	0.766	0.772
Leucine (F22b)	1.342	1.345
Isoleucine (F23)	2.204	2.207

Le tableau 3.5 montre clairement que le modèle n'amplifie pas les erreurs de calcul. Donc, les flux négatifs qui sont montrés ici sont dus à d'autres facteurs. Il semblerait plutôt que la cellule utilise d'autres sources d'azote qui ne sont pas compilées dans le modèle. Ceci sera démontré en utilisant un bilan sur l'azote. On a préalablement mesuré la quantité d'azote que contient la cellule 293, soit

13,4% p/p. On a utilisé les données de FB/gln qui présentait le plus de flux négatifs. Le tableau 3.5 suivant montre le bilan sur l'azote, qui a été effectué à différents temps.

Tableau 3.5 Bilan sur l'azote.

FB/gln (mg d'azote/10^9cells/hrs)	96 heures	145 heures
Sérine	$3,34x10^{-03}$	$4,39x10^{-03}$
Glycine	$1,27x10^{-02}$	$1,33x10^{-02}$
Alanine	$3,95x10^{-02}$	$1,30x10^{-02}$
Aspartate	$3,34x10^{-04}$	$1,69x10^{-04}$
Asparagine	$-1,67x10^{-03}$	$1,69x10^{-03}$
Glutamine	$-2,62x10^{-01}$	$-1,82x10^{-01}$
Glutamate	$-3,34x10^{-04}$	$1,18x10^{-03}$
ADN/ARN	$2,60x10^{-02}$	$1,93x10^{-02}$
Protéines cellulaires	$5,58x10^{-01}$	$4,08x10^{-01}$
Thréonine	$-1,84x10^{-02}$	$-1,03x10^{-02}$
Phénylalaline	$-9,70x10^{-03}$	$-4,55x10^{-03}$
Tyrosine	$-9,36x10^{-03}$	$-3,37x10^{-03}$
Valine	$-2,71x10^{-02}$	$-1,18x10^{-02}$
Méthionine	$-1,07x10^{-02}$	$-6,07x10^{-03}$
Arginine	$-1,47x10^{-01}$	$-8,10x10^{-02}$
Histidine	$-1,81x10^{-02}$	$-1,06x10^{-02}$
Lysine	$-5,28x10^{-02}$	$-3,04x10^{-02}$
Leucine	$-3,04x10^{-02}$	$-1,35x10^{-02}$
Isoleucine	$-2,34x10^{-02}$	$-9,28x10^{-03}$
NH_3	$2,30x10^{-01}$	$2,16x10^{-02}$
Cystine	$-2,04x10^{-02}$	$-6,07x10^{-03}$
Proline	$-4,35x10^{-03}$	$-2,02x10^{-03}$
Somme	$2,34x10^{-01}$	$1,11x10^{-01}$
%Erreur	15,40	12,93

L'erreur maximale a été calculée en considérant une variation de 5% sur chacune des mesures et le % d'erreur a été calculé sur cette base. Une déviation de 12 à 15% n'est pas très élevée mais reflète tout de même qu'il manque un composé au modèle. Un bilan positif signifie en fait que la cellule a besoin de plus d'azote que ce qui lui est proposé par le modèle. Alors la cellule utilise d'autres sources d'azote. Nous pensons que ces autres sources sont probablement les acides aminés et les protéines que contiennent le sérum. C'est pourquoi au chapitre suivant nous tiendrons compte de cet apport dans le modèle. D'ailleurs comme il a été mentionné à la section 3.1, l'apport de protéines extracellulaires améliore la validité des flux métaboliques.

CHAPITRE IV : MODÈLE MÉTABOLIQUE B

4.1 Élaboration du modèle.

On utilisera ce modèle pour la cellule 293SF dans le HSFM autant pour la croissance que pour l'infection. A partir du modèle A, on veut tout d'abord éliminer la mesure de la proline, puisque non-mesurée dans ces expériences. Ceci nous ramène à une matrice 34x34 à partir du modèle A précédent.

4.1.1 Matrice d'infection

Le modèle métabolique des cellules en infection est le même que celui en croissance en ce qui a trait aux voies biochimiques. Il existe cependant quelques différences par rapport à la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines. En général, la quantité d'ADN et de protéines peut doubler pendant l'infection. On observe d'ailleurs un grossissement des cellules, qui passe de 15 microns environ jusqu'à 17 microns au maximum, ce qui fait une augmentation de 50% du volume de la cellule.

On rapporte que la réplication de l'ADN cellulaire est complètement inhibée après l'infection. Hodge and Scharff (1969); Pina et Green (1969) ont démontré que peu importe la phase dans laquelle on infecte les cellules, la réplication de l'ADN viral commence environ 9 heures après l'infection. Si les cellules sont infectées en phase G1, les cellules ne doubleront pas, puisque la réplication de l'ADN viral commencera en milieu de la phase S et la réplication de l'ADN de l'hôte s'en trouvera fortement inhibée (voir la figure 1.3). Tandis que les cellules infectées au milieu de la phase S, vont avoir un doublement normal puisque la réplication de l'ADN viral ne va commencer qu'en G1. On peut donc supposer qu'après l'infection, 50-75% de la population cellulaire qui n'est pas en phase G1 va quand même doubler, c'est-à-dire toutes les cellules qui ne sont pas déjà en G1. A 24 hpi, on voit apparaître dans la cellule jusqu'à 10^6 nouveaux génomes viraux (Green, 1967; Green, 1970).

En ce qui a trait à la réplication de l'ARN, on rapporte que le taux de transcription de l'ARNm reste inchangé au niveau du noyau. Les études de Babich et col. (1983) et Philipson et col. (1975) confirment d'autant plus que la quantité d'ARNm reste inchangée pendant l'infection. On ne voit pas de nouvel ARNm cellulaire apparaître dans le cytoplasme mais rapidement on a jusqu'à 20% d'ARNm viral. Lindberg et col. (1972) rapporte jusqu'à 95% d'ARNm viral

dans la dernière phase d'infection. Il est à noter que l'ARNm viral est capé et polyadénylé, ce qui ne permet pas de le différencier de l'ARNm cellulaire.

Pour la transcription des protéines cellulaires, Lindberg et col. (1972) démontrent que la transcription des protéines cellulaires est arrêtée très tôt dans le processus d'infection, démontrant que le virus possède la propriété d'inhiber la transcription de ces protéines en faveur des protéines virales. White et col. (1969) rapportent de plus que la synthèse des protéines de l'hôte est fortement inhibée (plus de 50%) à 24 heures après l'infection, au profit de la synthèse de protéines virales.

Les flux biosynthétiques sont donc différents dans le cas de l'infection. En effet, à partir de 24 heures, il y a arrêt de la croissance et les flux biosynthétiques de la cellule deviennent nuls. Cependant, on doit considérer le changement de concentration à l'intérieur de la cellule dû à un grossissement de celle-ci qui peut aller jusqu'à doubler en poids et volume, donc la cellule continue de produire ces composés. En ce qui concerne les autres nutriments, les acides aminés par exemple, on peut affirmer que le changement de concentration dû au changement de volume est négligeable. En effet 7mM d'alanine intracellulaire correspond à 0,87pg/cell ce qui est négligeable par rapport aux autres constituants de la cellule soit protéines, ADN et ARN. Il est donc important lors

de l'infection de mesurer ces derniers paramètres et de ne pas les considérer constants lors de la croissance. De plus, en fin de cycle infectieux on aperçoit une perte de ces composés, notamment au niveau des protéines totales car celles-ci sont alors recyclées en acides aminés dans la cellule, d'où la possibilité de flux négatifs dans ce cas. L'ADN est cependant beaucoup plus stable et les pertes doivent être attribuées à une perte d'intégrité de la cellule et donc un relargage dans le milieu extracellulaire.

A la lumière de ces informations, il apparaît donc important de mesurer l'augmentation du poids sec et de la quantité de protéines dans les cellules au cours de l'infection. Quant à la composition en acides aminés des protéines, nous verrons plus loin que celle-ci ne change pas significativement au cours de l'infection. La quantité d'ADN augmente cependant. D'après la littérature on constate que la quantité d'ARN reste plus ou moins inchangée. L'analyse de sensibilité nous aidera à définir si une précision plus importante est requise au niveau de ces flux.

4.1.2 Internalisation de protéines.

Un facteur n'ayant pas été considéré jusqu'à maintenant, est l'internalisation de protéines provenant du milieu de culture et du sérum en particulier. Il ne fait pas de doute que les cellules de mammifères font ce qu'on appelle de la pinocytose et de l'endocytose, incorporant ainsi du milieu et des macromolécules par le fait même. Kooistra et Lloyd (1986) rapportent un rapport des compartiments lysosomaux sur le volume total de 0,044. Dans le milieu sans sérum, il existe deux principales sources de protéines soit la transferrine (0,01 g/l) et l'insuline (0,01 g/l) également. Ces deux protéines sont en faible quantité par rapport à l'albumine bovine qu'on ajoute à 1 g/l. Kooistra et Lloyd (1986) rapportent des taux d'internalisation pour l'albumine dans des fibroblastes de l'ordre de 0,41 à 0,44 µl/µg de protéines/h. Également, Kooistra and Lloyd (1985) rapportent que l'albumine subit une dégradation intra-lysosomale tandis que ce n'est pas le cas pour toutes les protéines. L'insuline, par exemple peut soit être dégradée à l'intérieur de la cellule mais également à la surface.

Nyberg et col. (1999) ont étudié l'effet d'ajouter la dégradation des peptides contenus dans le Primatone RL dans le calcul des flux métaboliques. Ils ont démontré qu'une quantité importante d'acides aminés provient de ces peptides. Dès lors on peut considérer qu'une source importante de protéines, telle l'albumine peut aussi contribuer à un apport en acides aminés important.

On ajoute dans le modèle, un flux d'internalisation de protéines. Ce flux d'internalisation des protéines est en fait celui de l'albumine, dès lors on tient compte de la composition en acides aminés de l'albumine. La composition est en effet importante puisque l'analyse de sensibilité nous révélera que le calcul des flux métaboliques est très sensible à la mesure des protéines autant intracellulaires qu'extracellulaires. De plus, lorsqu'on change la composition des acides aminés de l'albumine pour celle des protéines cellulaires, on obtient des résultats de flux métaboliques passablement différents. En effet, les flux ont tendance à être beaucoup plus négatifs, et expliquerait en majeures partie les flux négatifs obtenus avec le modèle A au chapitre précédent. Le tableau 4.1 montre la différence dans la composition des protéines cellulaires par rapport à l'albumine.

Tableau 4.1 Pourcentage massique de la composition en acides aminés des protéines cellulaires et de l'albumine.

% massique	Protéines cellulaires	Albumine
aspartate	2,75	6,6
glutamate	6,95	9,7
asparagine	2,75	6,6
sérine	7,69	5,3
glutamine	6,95	3,3
histidine	2,26	2,8
thréonine	4,69	5,8
arginine	5,34	4,3
alanine	7,68	7,7
tyrosine	1,71	3,5
glycine	13,08	2,8
méthionine	0,97	0,8
valine	3,23	6,2
phénylalanine	3,38	4,9
isoleucine	2,37	2,5
leucine	8,14	10,7
lysine	9,25	9,9
tryptophane	1,71	0,5

On voit des différences importantes notamment au niveau de la glycine. On ne peut donc pas mettre un seul flux de consommation et production de protéines puisque les compositions en acides aminés sont différentes. Le flux biosynthétique de protéines et celui d'internalisation des protéines sont donc séparés dans le modèle.

4.1.3 QCO_2 et bilan sur le NADH et NADPH.

Le modèle est maintenant de 35x35. Avec ce modèle, on obtient un conditionnement un peu élevé soit de 147. Lorsqu'on ajoute un bilan sur le NADH, NADPH, le conditionnement de la matrice diminue à 94. Cependant en comparant les valeurs de CO_2 mesuré versus les valeurs de CO_2 calculé, on s'aperçoit que le modèle avec bilan sur le NADH prédit mieux les données. C'est donc ce dernier qui sera utilisé dans l'article intitulé: *Metabolic Flux Analysis in 293SF Cells during Growth and Infection with an Adenoviral Vector* . Dans tous les cas, le rang de la matrice reste à 35 et cela ne nous permet donc pas d'obtenir la mesure d'un autre flux.

4.1.4 Analyse de sensibilité

L'analyse de sensibilité permet d'aller cerner les variables dont la précision est très importante. Pour cette analyse, on a fait varier une à une les mesures de 10% de leur valeur initiale, et on a compilé l'erreur relative moyenne sur tous les flux, engendrée par cette variation. Le tableau 4.2 suivant montre les résultats. Dans la première colonne, on a le composé sur lequel la mesure a été variée de 10%. Dans les colonnes subséquentes, on a pour chaque modèle pendant la croissance

et l'infection, l'erreur relative moyenne et maximale sur toute la durée de l'expérimentation. La dernière ligne donne la somme de toutes les erreurs. Nous avons effectué cette analyse sur une culture en mode cuvée pendant la croissance et l'infection (Batch 1 et Inf B), qui seront explicités à la section suivante.

Tableau 4.2 Erreur relative moyenne maximale sur les flux métaboliques lors d'une variation de 10% sur une mesure.

	Modèle 35x35		Modèle 36x35 Bilan NADH/NADPH	
Variation sur :	Croissance	Infection	Croissance	Infection
Glucose	91,67	306,43	1995,94	714,71
Lactate	95,01	336,02	1880,57	660,53
Sérine	3,97	1,74	36,68	10,68
Glycine	1,58	3,66	4,79	4,92
Alanine	3,02	4,18	32,29	11,11
Aspartate	0,25	0,37	1,65	3,48
Asparagine	49,39	11,00	150,14	64,39
Glutamine	48,32	35,28	270,31	107,72
Glutamate	0,42	0,32	7,92	2,82
Membrane	0,94	0,95	62,45	7,43
ADN/ARN	14,33	11,17	186,80	43,35
Protéines	141,68	32,59	76,11	87,57
Protéines extracellulaires	1084,47	133,83	181,50	118,04
Thréonine	4,16	9,90	8,21	21,64
Phénylalaline	14,27	62,61	26,05	34,27
Tyrosine	3,33	5,61	23,07	5,59
Valine	941,14	6,55	39,33	5,31
Méthionine	1,43	5,97	6,11	8,04
Arginine	2,84	7,06	50,91	26,72
Histidine	3,07	5,77	23,49	7,74
Lysine	3,92	4,24	123,58	15,16
Leucine	2,72	8,39	81,44	20,28
Isoleucine	4,71	65,53	23,14	7,25
NH3	34,13	50,53	122,58	127,25
O2	0,58	0,74	479,90	216,34
CO2				
Somme des erreurs	2551,35	1110,44	5894,97	2332,33

Les mesures engendrant des erreurs de plus de 100% sont le glucose, le lactate, et dans certains cas, la glutamine, l'asparagine, les protéines, l'ADN, la valine, la lysine, l'ammoniac, l'oxygène et le CO_2. Les mesures engendrant des erreurs de moins de 10% dans tous les cas sont le glutamate et l'aspartate. Les mesures ont été effectuées soit par HPLC ou encore par le Biolyzer et nous avons une bonne confiance sur ces mesures. Il en va de même pour la mesure de l'oxygène, mesuré par une sonde dans le milieu. Une des erreurs possibles avec la mesure de qO_2 provient du k_La qui varie avec le volume de milieu. Comme, on doit effectuer beaucoup de prélèvements pour les analyses, le k_La va donc varier (voir figure 4.1). Pour la mesure de protéines, il est plausible que la méthode d'analyse utilisée engendre des erreurs. En effet, la méthode utilise une courbe-étalon avec l'albumine et est basée sur l'oxydation de certains acides aminés aromatiques. Or la composition en acides aminés diffère entre les protéines cellulaires et l'albumine et une erreur de l'ordre de 10% peut être engendrée. Pour ce qui est de l'ADN, on observe une sensibilité accrue pour la croissance avec le modèle NADH /NADPH, la sensibilité varie d'un cas de figure à l'autre. Pendant la croissance on sait que le pourcentage d'ADN ne varie pas tellement, il faut cependant être prudent pendant l'infection. Une évaluation inadéquate pourrait entraîner des erreurs sur l'évaluation de ces flux.

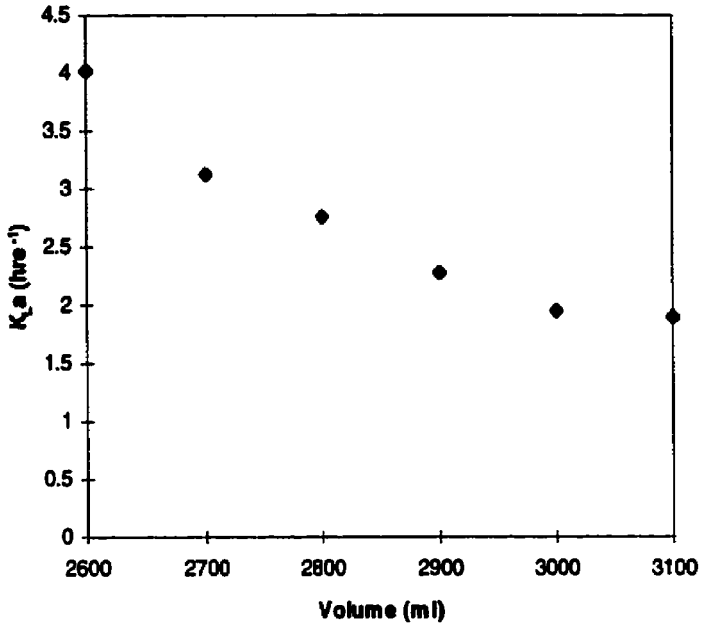


Figure 4.1 Variation du K_La dans l'eau en fonction du volume à 100 rpm.

En regardant les deux modèles utilisés, on voit que le modèle le plus simple est celui qui engendre le moins d'erreurs. Cependant nous préférons utiliser le modèle incluant un bilan sur le NADH/NADPH puisqu'il semble être plus descriptif de l'état physiologique des cellules comme il est démontré dans l'article : *293SF Metabolic Flux Analysis during Growth and Infection with an Adenovirus.*

4.2 Analyse des flux métaboliques dans la cellule 293 SF pendant la croissance et l'infection avec un vecteur adénovirus.

Cette section présente l'article intitulé ***293SF Metabolic Flux Analysis during Cell Growth and Infection with an Adenoviral Vector.*** Cet article a été soumis à la revue ***Biotechnology Progress.*** Le but de cette étude est donc d'évaluer les flux métaboliques de la cellule 293SF en milieu LC-SFM pendant la croissance et l'infection avec un adénovirus codant pour une protéine fluorescente verte (GFP). On a utilisé différentes conditions de culture dans cette étude. Deux cultures en croissance ont été faites en cuvée et une autre en alimentation continue de glucose à faible concentration (1mM). Les infections ont été faites soit en mode cuvée avec changement de milieu au moment de l'infection et ajout d'acides aminés, stratégie donnant lieu aux meilleurs résultats, ou encore en mode cuvée alimenté avec acides aminés, glucose et glutamine concentrés sans changement de milieu au moment de l'infection, stratégie plus simple à utiliser mais donnant pour l'instant de moins bons résultats.

Des différences au niveau du métabolisme ont été observées entre la croissance et l'infection ainsi qu'entre les différentes stratégies d'alimentation. Ceci améliore donc notre connaissance du métabolisme cellulaire et permettra d'en déduire de nouvelles stratégies de production.

293 SF Metabolic Flux Analysis during Cell Growth and Infection with an Adenoviral Vector.

I. Nadeau,[1,2] D. Jacob, [1] M. Perrier,[2] A. Kamen[1]

[1]Institut de recherche en biotechnologie, CNRC, 6100 avenue Royalmount, Montréal, Québec H4P 2R2, Canada; [2]École polytechnique de Montréal, Campus de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Metabolic flux quantification of cell culture is becoming a crucial means to improve cell growth as well as protein and vector productions. The technique allows rapid determination of cell culture status, thus providing a tool for further feeding improvements. Herein, we report on key results of a metabolic investigation using 293 cells adapted to suspension and serum-free medium (293SF), during growth and infection with an adenoviral vector encoding the Green Fluorescence Protein (GFP).

The model developed contains 35 fluxes, which include the main fluxes of glycolysis, glutaminolysis and amino acids pathways. It requires specific consumption and production rate measurements of amino acids, glucose, lactate, NH_3 and O_2, as well as DNA and total proteins biosynthesis rate measurements.

Also, it was found that extracellular protein concentration measurement is important for flux calculation accuracy.

With this model, we are able to describe the 293SF cell metabolism, grown under different culture conditions in a 3-L controlled bioreactor for batch and fed-batch with low-glucose. The metabolism is also investigated during infection under two different feeding strategies: a fed-batch starting at the end of the growth phase and extending during infection without medium change and a fed-batch after infection following medium renewal.

Differences in metabolism are observed between growth and infection, as well as between the different feeding strategies thus providing a better understanding of the general metabolism.

Metabolic flux analysis during infection with adenovirus. A. Kamen; Institut de recherche en biotechnologie, 6100 Royalmount, Montréal, Québec, H4P 2R2, Canada, phone : (514) 496-2264; fax : (514) 496-6785; Amine.kamen@nrc.ca

Introduction

Recombinant adenovirus is now an established tool for gene delivery and a promising viral vector for gene therapy (Kay and Woo, 1994; Trapnell, 1993; Trapnell and Gorziglia, 1994). The 293-Human Embryo Kidney cells, preferably adapted to suspension, are the complementary cells mainly used for the production of recombinant adenoviruses. However, three major limitations are still to be overcome before the technology is fully established. These limitations are safety, immunogenicity and eventually gene packaging capacity (Briand and Kahn, 1993). This is addressed by the re-engineering of adenovirus vectors as well as associated complementary cell lines. Originally, the recombinant adenoviruses are engineered as defective vectors since they can not replicate in normal cells but only in 293 cells containing the E1 replicative-essential region of adenovirus. These recombinant adenoviruses are used in 18% of the gene therapy clinical trials, which implicate mainly the CFTR gene transfer (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Boucher and Knowles, 1994; Crystal et al., 1994), but also the TK gene (thymidine kynase) and the p53 gene both for the treatment of certain cancers. It may also be used for other monogenic or chronic diseases.

In order to produce clinical grade viral vector stocks, large volume and high-density cell culture are required. The freshly produced adenoviral vector must be purified from residual cell debris, serum proteins, etc. before application in clinical trials. In order to facilitate the purification process, serum-free medium is now increasingly used. Therefore, a 293 cell line was adapted to grow in serum-free medium (293SF) (Côté et al., 1998). However, to improve the production of adenoviruses with this cell line and medium, a robust process must be developed to operate high-density suspension cultures of 293 cells. A fed-batch process is the rational way for proceeding towards this objective. Previous studies with 293S cells in suspension, in conventional medium with 5% serum, have demonstrated that addition of glucose and amino acids permitted infection at a cell density of $3x10^6$ cells/ml without compromising the specific production of the recombinant protein expressed (Garnier et al., 1994; Nadeau et al., 1996). The titers reached are in the range of 2000 pfu/ml. Also it was proven that a low-glucose fed-batch culture contributes to limit lactate accumulation in the cultures and associated toxic effects on cell growth and adenovirus expression.

Metabolic flux analysis is a powerful tool that permits the evaluation of biochemical rates inside the cell on the basis of simple measurements and mass-balancing techniques. It is increasingly used to evaluate cultures and optimise processes. In this report we used a metabolic model of 35 fluxes, dedicated to

study the 293 cell metabolism during growth and infection by an adenovirus vector, which include the catabolism pathways of glucose, glutamine and 17 amino acids.

This work was initiated to study the 293SF cell metabolism in the same conditions as the original cell line with serum supplementation. It was first shown that the titers in SFM were lower than those obtained in the original process, reaching levels of 500 pfu/ml. This metabolic flux study evaluates the effect of different culture conditions on the cell's central metabolism, and identifies metabolic patterns during growth and infection. The analysis will also permit to identify which pathways are used to fulfil the energy requirement of the cell in order to design in the future the best feeding strategy for these cells. To our knowledge, this is the first metabolic flux analysis with the 293 cells during growth and infection.

Material and methods.

Cells, medium and virus

The 293SF cells were derived from human kidney fibroblasts transformed with Ad5 DNA and express the E1A and E1B proteins constitutively (Graham et al.,

1977). The 293SF were obtained by adapting 293S cells in serum-free medium (Côté et al., 1998). The 293SF cells were maintained in a 50 ml shake flask at 37°C, 7% CO_2, by diluting twice weekly to cell densities of 1 to $2x10^5$ cells/ml with the medium described herein. After 3 months of sub-culturing, the cells are discarded and a new aliquot is thawed.

Low calcium serum-free medium (LC-SFM) was prepared from H-SFM (Gibco, Grand Island, NY). The medium was completed with 0,1% (v/v) lipids (Gibco), 0,1% (v/v) BSA (Intergen Company, Purchase, NY) and 0,1% (v/v) Pluronic F-68 (Gibco, Grand Island, NY). For the low glucose fed-batch, the process is described elsewhere (Siegwart et al., 1999). For the fed-batches, a mixture of glutamine 400 mM (Sigma, St-Louis, MO), glucose 300 g/L (Sigma) and MEM Amino acids (Gibco) is used.

The adenovirus used for infection, was an adenovirus type 5 containing the Green Fluorescence Protein (GFP), under the control of the CMV promoter (Ad5 GFPq). The viral stock titer was $7.5x10^{12}$ pfu/ml.

Bioreactor

The cultures were done in a Chemap CF2000 (Mannedorf, Switzerland) 3.5 L bioreactor and 20 L bioreactor for the low-glucose fed-batch. The 20L culture conditions with low glucose fed-batch are described elsewhere (Siegwart et al., 1999). For the 3.5 L, the vessel was equipped with four surface baffles and two marine impellers. The temperature was maintained at 37°C with a water jacket. Dissolved oxygen and pH probes were mounted for monitoring and control purposes. The pH was controlled at 7.1 by intermittent addition of 1 M NaOH. DO was not controlled at the beginning of cell growth and the vessel was supplied with air having 10% CO_2 but as soon as it dropped to 30% air saturation it was controlled at this level. The control was operated with a PI and mass flow controller programmed on FIX MMI software (Intellution, Norwood MA). On-line data acquisition was also performed with the same software.

Cell culture conditions and infection

Cells were inoculated at around $0.3x10^6$ cells/ml from two 500 ml shake flasks in which the cell density was around $1x10^6$ cells/ml. The cells were centrifuged and resuspended in fresh LC-SFM before inoculation of the bioreactor. Samples were

taken every 6 to 9 hours. The cells were infected when the cell density reached $1x10^6$ cells/ml (Batches 1 and 2).

For the batch infection (Inf B) experiment, the cells were harvested and centrifuged to replace the medium with fresh LC-SFM. The virus was added at the same time. At 24 hrs after infection a mixture of 1X MEM amino acid, 4mM glutamine and 25 mM of glucose was supplemented.

For the fed-batch infection (Inf FB) experiment, the virus was added to the culture in 100 ml fresh LC-SFM medium. Fed-batch was started right after with a flow rate of 0.01 ml/min increasing to a final flow rate of 0.06 ml/min. This feeding was based on previous experiments. The mixture was composed of 150 ml MEM amino acids, 25 ml glucose 300 g/L and 50 ml glutamine 400 mM.

Analytical method.

Viable and total cells were counted using a heamacytometer (Hausser Scientific, Horshaw, PA). Viability was assessed by dye exclusion method using erythrosine B. For DNA analysis, the procedure was as follows. First a sodium citrate buffer was prepared (SSC 20X) with 175.3 g/L NaCl and 88.2 g/L trisodium citrate. The pH was adjusted to 7.0. Approximately $1x10^6$ cells were

disrupted in SSC 1X/0,4% v/v SDS (Sodium dodecyl sulfate) for 10 min. at 37°C. Thereafter, 5ml SSC 1X was added. The samples were also sonicated lightly. 10 µL of samples were then distributed in triplicates in a 96 well plate, 90 µL of SSC 1X was added as well as 100 µL of 1 mg/ml Hoescht 33258. The plaque was read in a fluorometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT) at absorbing and emitting wavelenght of 360 nm and 460 nm, respectively. The standard curve was made from a stock solution of herring sperm DNA at 1 mg/ml (Sigma) and diluted in SSC 1X ranging from 50 to 3.12 µg/ml. 10 µL of one sample was added to the standards in order to mimic the sample conditions. For the dry weight estimation, approximately $1x10^8$ cells were pelleted in a pre-weighted tube of 1.5 ml. The pellet was dried in an oven at 60°C for about 48 hours or until the weight remained constant (Xie and Wang, 1994). Total protein and extracellular proteins were assayed using the Dc Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA). Prior to the analysis the $1x10^6$ cells pellet was disrupted using the following buffer: 0.5% Triton X-100, 1mM EDTA, 0.2mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) (Xie and Wang, 1994). For analysis of amino acids in the supernatant, an HPLC column was used as described elsewhere (Kamen et al., 1991). For determination of cells' amino acid content, a $1x10^6$ cells pellet, washed twice with PBS, was hydrolysed in a 2M HCl solution for 24 hrs at 100°C. The pellet was then neutralised and filtered prior to HPLC analysis. The Biolyzer (Kodak, New Haven, Connecticut) was used for the analysis of glucose, lactate and ammonia.

The virus titer was assayed as follows: $1x10^6$ 293S cells were distributed in a 6 wells plate, with 1 ml fresh DMEM without calcium, 5% BCS (Hyclone, Logan, UT). The virus was released with three freeze-thaw cycle and diluted in fresh medium. 25 µl of the dilutions was added to the wells. Incubation was held 20 hours with agitation. The cell pellet was fixed with 500 µl PBS and 500 µl 4% formaldehyde at 4°C for 30 min. Percentage of fluorescent cells was done with Flow Cytometry (FACS). One fluorescent cell corresponds to one infectious particle (IVP) when less than 30% cells were fluorescent.

Metabolic model

The metabolic model used in this study involves 35 fluxes. The model is derived from a previous version detailed in Nadeau et al. (2000). Glycolysis, glutaminolysis, amino acid degradation, TCA cycle, protein production and internalisation are considered.

As previously mentioned, some fluxes were set to zero. Many authors (Bonarius et al., 1996) have reported that the glutamate dehydrogenase activity is very low in animal cells. Cysteine contributes mainly to the formation of glutathione and therefore, is not included in the model (Bannai, 1986; Bannai and Ishii, 1988). Tryptophan is an intermediate to NAD+ and NADP+ component and therefore,

is also not included (Brown, 1996). Threonine can undergo several pathways, but as suggested by Salway (1994), the degradation to pyruvate may be the main pathway. We also did not consider the pentose-phosphate cycle in our analysis, assuming that all the ribose-5-phosphate (Rib5P) goes for the formation of nucleotides. Also the three main anaplerotic reactions were pooled in one reaction. We also considered that the cell tends to maintain a constant pool of NADH and NADPH as well as other intracellular nutrients. This assumption is called pseudo steady state (Bonarius et al., 1996; Bonarius et al., 1997; Schmidt et al., 1998) and will be discussed later.

In this model, a flux for the protein internalisation was added. Cells proceed to pynocitosis and endocytosis, to incorporate directly extracellular medium and some macromolecules. In our serum-free medium the main source of protein is Bovine Albumin Serum (BSA) at 1 g/l, followed by transferrin (0,01 g/l) and insulin (0,01 g/l). Therefore, we can consider BSA as the only source of protein and as it was reported by Kooistra and Lloyd (1986) albumin can be internalized quite rapidly. Also they (Kooistra and Lloyd, 1985) reported that albumin is degraded predominantly inside lysosomes in the cell. Some authors (Nyberg et al., 1999) have already considered the internalisation of small peptides in their flux calculation and they have reported better modelling over results obtained neglecting protein internalisation.

Also we adapted the metabolic model to infection. It is important to consider the DNA replication due to an adenoviral infection. It was already demonstrated that cellular DNA is completely inhibited after infection (Pina and Green, 1969). Hodge and Scharff (1969) have demonstrated that the cellular DNA shut-off starts after 9 hrs of infection, no matter in which phase the cells are upon infection. Cells in G1 phase will stop to grow and therefore, will not double but cells in S phase will stop only in G1 phase and therefore, cells will double once again. Thus it is not surprising to see 50-75% of cell growth after infection. At 24 hrs after infection, 10^6 new viral genomes are formed per cell (Green, 1967; Green, 1970; Pina and Green, 1969). After infection, no new cellular messenger RNA (mRNA) is formed and it is reported that at the last phase of infection up to 95% is viral mRNA (Lindberg et al., 1972). Thus RNA measurement is less important since messenger RNA quantity remains unchanged in steady state (Babich et al., 1983; Philipson et al., 1975). It is also reported that the host protein synthesis is inhibited early after infection and relayed by the viral protein synthesis (White et al., 1969).

From this information, the cells dry weight, as well as its protein and DNA content appears important to be measured. It is assumed that RNA synthesis remains unchanged. Also we have measured amino acids composition of the

protein, as described, in order to identify potential variation between growth and infection.

Rate and flux calculation.

The consumption and production rates of the following metabolites were used in the model for flux calculation: glucose, lactate, ammonia, O_2, CO_2, all of the amino acids except for tryptophan, cysteine and cystine, total intracellular and extracellular protein and finally DNA, The consumption and production rates were calculated as follow. Samples were taken every 6 to 9 hrs except for O_2 and CO_2, which were monitored, on-line. Intermediate points were interpolated every hour using polynomes. Then the slope was evaluated in order to estimate the rates.

$$r = \frac{s_2 - s_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

$$q = r/X \quad (2)$$

Where X is the cellular concentration.

We then have a 35x35 matrix of stoechiometric coefficient with a rank of 35 and a condition number of 147. Usually a condition number around 100 is recommended for flux calculations. We added an extra steady-state hypothesis on NADH and NADPH, thus providing a matrix of size 36x35, with a rank of 35, while this new measurement does not permit an extra flux calculation. Also the condition number reduces to 94 which is now acceptable.

If we apply a mass balance around the biomass, we have:

$$\frac{dS}{dt} = KF - DS - Q + P \qquad (3)$$

Where S is the internal cellular concentration of metabolites, K the 36X35 matrix of stoechiometric coefficients, F the vector of 35 fluxes, DS, represent the dilution due to volume variation of the cells and $-Q+P$ represents the vector of the specific consumption and production rate of metabolites. We assume that the cell volume does not change and that the internal metabolite concentration does not vary over a short period of time. This assumption is referred to as pseudo steady-state assumption (PSS assumption). These assumptions are used for flux calculations by many authors (Bonarius et al., 1997; Pissarra and Henriksen, 1998; Savinell

and Palsson, 1992; Takiguchi et al., 1997). This simplifies the equation to an algebraic system of linear equation:

$$KF = Q - P \tag{4}$$

And F can be resolved:

$$F = pseudoinverse(K) \bullet (Q - P) \tag{5}$$

The fluxes shown were divided in four main groups, i.e. (i) the main fluxes of glycolysis, (ii) the main fluxes of glutaminolysis, (iii) amino acid fluxes and (iv) the Krebs cycle fluxes. The glycolysis fluxes are composed of F1, glucose to pyruvate; F2, pyruvate to lactate; F3, pyruvate to Krebs cycle. The glutaminolysis fluxes are $F5_{tot}$, the net flux of glutamate to alpha-ketoglurate, which comprises all transamination reactions; $F8_{tot}$, the net flux of glutamine to glutamate, which also includes the transamination process of aspartate to asparagine; and finally F4 the production of alanine. The amino acid fluxes represent the fluxes of different essential amino acids to the Krebs cycle or the glutamate pool. The Krebs cycle fluxes are also shown: F30 and F31 are the fluxes from Acetyl-CoA to

alpha-ketoglutarate and the fluxes F32, F33, F34 and F35 are the fluxes on the left side of the cycle. F10 represents the anaplerotic pathways in which components such as malate and oxaloacetate are recycled in the glycolysis pathway as pyruvate or oxaloacetate. See figure 4.2 and table 4.3 for more details on the biochemical reactions.

Table 4.3 Biochemical reactions

F_1 $GLUC \Leftrightarrow PYR + 2ATP + 2NADH$

F_2 $PYR + NADH + H^+ \Leftrightarrow LAC$

F_3 $PYR + CoA \Rightarrow ACCoA + NADH + CO_2 + H^+$

F_4 $PYR + GLU \Leftrightarrow ALA + \alpha - KETO$

F_5 $GLU \Leftrightarrow \alpha - KETO + NADH + NH_4$

F_6 $OXA + GLU \Leftrightarrow ASP + \alpha - KETO$

F_7 $GAP + GLU \Rightarrow SER + \alpha - KETO + NADH$

F_8 $GLN + H_2O \Rightarrow GLU + NH_4^+$

F_9 $2GLN + \frac{3}{4} ASP + RIB\,5P + \frac{1}{2} GLY + 6\frac{1}{4} ATP + \frac{3}{4} NADPH \Rightarrow$
$ADN\ /\ ARN + \frac{1}{4} NADH + \frac{1}{4} FUM + 2GLU$

F_{10a} $MAL \Rightarrow PYR + CO_2 + NADPH + H^+$

F_{10c} $PYR + ATP + CO_2 \Rightarrow OXA + H^+$

F_{11} $ASP + GLN + ATP \Leftrightarrow ASN + GLU$

F_{12} $GLU + ATP + 2NADPH + 2H^+ \Rightarrow PRO$

F_{13} $SER \Leftrightarrow GLY$

F_{14a} $GLC\,6P + ATP \Rightarrow Rib\,5P + 2NADPH + H^+ + CO_2$

F_{15} $GLN \Rightarrow Carboxylic\ \ Acid\ \ Pyrolidone + NH_4$

F_{16} $2 \times (9CIT + 17\,ATP + 9CoA + 16\,NADPH) \Rightarrow AcOLE + 18\,OXA$

F_{17} $SER \Rightarrow PYR + NH_3$

F_{18} $THR \Rightarrow CO_2 + 2NADH + 2H^+ + FADH_2 + NH_4 + PYR$

F_{19} $GLY \Leftrightarrow CO_2 + NH_4 + NADH + H^+$

F_{20} $CTE + O_2 + \alpha - KETO \Rightarrow PYR + GLU$

F_{22a} $LYS + 2\alpha - KETO + NADPH \Rightarrow 2ACCoA + 2CO_2 + 4NADH + 3H^+ + FADH_2 + 2GLU$

F_{22b} $LEU + \alpha - KETO + ATP \Rightarrow 3ACCoA + GLU + CO_2 + NADH + H^+ + FADH_2$

F_{23} $ILE + \alpha - KETO + ATP \Rightarrow SUCCoA + ACCoA + CO_2 + 2NADH + 2H^+ + FADH_2 + GLU$

F_{24} $VAL + \alpha - KETO + ATP \Rightarrow SUCCoA + 3NADH + H^+ + FADH_2 + 2CO_2 + GLU$

F_{25} $MET + SER + 2ATP \Rightarrow CTE + SUCCoA + NADH + H^+ + CO_2 + NH_3$

F_{26} $PHE + O_2 + NADPH + H^+ \Rightarrow TYR$

F_{27} $TYR + \alpha - KETO + 2O_2 \Rightarrow FUM + 2ACCoA + GLU$

F_{28} $ARG + \alpha - CETO \Rightarrow 2GLU + NADH + H^+ + urea$

F_{29} $HIS \Rightarrow GLU + NH_3$

F_{30} $OXA + ACCoA \Rightarrow CIT$

F_{31} $CIT \Rightarrow \alpha - CETO + CO_2 + NADPH + H^+$

F_{32} $\alpha - CETO \Rightarrow SUCCoA + NADH + H^+ + CO_2$

F_{33} $SUCCoA \Rightarrow FUM + ATP + FADH_2$

F_{34} $FUM \Leftrightarrow MAL$

F_{35} $MAL \Leftrightarrow OXA + NADH + H^+$

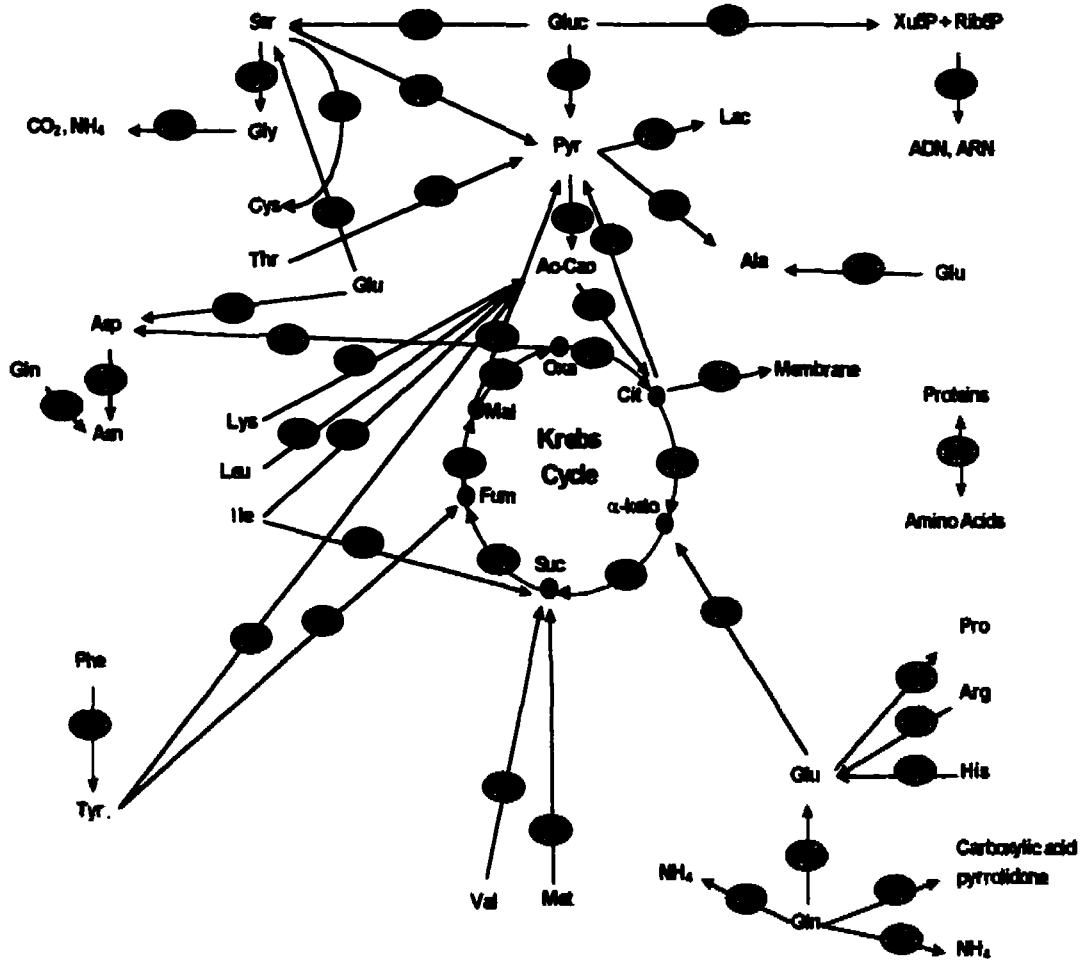


Figure 4.2 Metabolic network. α-Keto, α-Ketoglutarate; Ac-CoA, Acetyl-CoA; AcOle, Oleic acid; Arg, arginine; Asn, asparagine; Asp, aspartate; Cit, citrate; Cte, cysteine; Fum, fumarate; Gluc, glucose; Gln, glutamine; Glu, glutamate; Gly, glycine; His, histidine; Ile, isoleucine; Lac, lactate; Leu, leucine; Lys, lysine; Mal, malate; Met, methionine; Oxa, oxaloacetate; Phe, phenylalanine; Pro, proline; Pyr, pyruvate; Rib5P, ribose-5-P; Ser, serine; SucCoA, succinyl-CoA; Thr, threonine; Tyr, tyrosine; Val, valine; Xu5P, xilulose-5-P.

pCO_2 measurement.

pCO_2 measurements were used to verify if the model was predictive. We could compare the pCO_2 calculated with the model to the pCO_2 measured in the culture. If we apply a CO_2 mass balance in the liquid phase, we have:

$$V_L \frac{dC_{CO_2}}{dt} = k_L{}^{CO_2} a(C^*_{CO_2} - C_{CO_2})V_L + X_v p_{CO_2} V_L - k_1 C_{CO_2} + k_{-1} C_{HCO_3} C_{H^+} \qquad (6)$$

Where V_L is the liquid volume, C the concentration, $k_L{}^{CO2}a$ the CO_2 liquid transfer rate and k_1 and k_{-1} are the direct and reverse rate constant for H_2CO_3 dissociation. At the operating pH (around 7.0), H_2CO_3 is solely in a dehydrated form: $H_2O + CO_2$. Furthermore HCO_3^- is not decomposed to H^+ and CO_3^{--}. Therefore, this equilibrium reaction is not considered in the evaluation of CER. Concerning the equilibrium reaction between HCO_3^- and H_2CO_3 (present in the form of CO_2), we consider that when a small pH variation occurs in the medium, the equilibrium is rapidly attained. These assumptions lead to the following equality:

$$k_1 C_{CO_2} = k_{-1} C_{HCO_3} C_{H^+} \qquad (7)$$

If we apply a CO_2 mass balance in the gas phase, we have:

$$\frac{PV_g}{RT}\frac{dx_{CO_2}}{dt} = (x^E_{CO_2} - x_{CO_2})F_g - k_L^{CO_2} a(C^*_{CO_2} - C_{CO_2})V_L \quad (8)$$

Where P is the pressure, V_g is the gas volume in the headspace, R the gas constant, T the temperature, x^E_{CO2} and x_{CO2} the CO_2 gas molar fraction at the entrance and exit respectively and F_g is the gas flow rate. Combining the two mass balances, we have:

$$V_L\frac{dC_{CO_2}}{dt} = X_v q_{CO_2} V_L + \left((x^E_{CO_2} - x_{CO_2})F_g - V_g\frac{dx_{CO_2}}{dt}\right)\frac{P}{RT}$$
$$\text{but } V_g\frac{dx_{CO_2}}{dt} \equiv 0 \text{ and } V_L\frac{dC_{CO_2}}{dt} << X_v q_{CO_2} V_L \text{ and} \left((x^E_{CO_2} - x_{CO_2})F_g - V_g\frac{dx_{CO_2}}{dt}\right)\frac{P}{RT} \quad (9)$$

The last assumption will be verified in a desorption analysis, in order to verify if the CO_2 concentration varies in the medium. If there is no cells in the medium, the preceding equation simplifies to:

$$V_L\frac{dC_{CO_2}}{dt} = \left((x^E_{CO_2} - x_{CO_2})F_g - V_g\frac{dx_{CO_2}}{dt}\right)\frac{P}{RT} \quad (10)$$
$$\text{but } V_g\frac{dx_{CO_2}}{dt} = 0$$

And therefore, it is possible to study the CO_2 desorption in different cases of incoming CO_2. Here we studied the desorption in water with 2.45 g/l of $NaHCO_3$ and an adjusted pH of 6.88 in order to mimic the conditions of LC-SFM. The incoming air was at 300 ml/min, with 21% O_2 and %CO_2 varying from 0 to

10%. The pH remained constant during the experiment therefore, it is valid to neglect the equilibrium reactions. If the desorption term is negligible, then a good approximation is then:

$$X_v q_{CO_2} V_L = -\left((x^E_{CO_2} - x_{CO_2}) F_g\right) \frac{P}{RT} \qquad (11)$$

Some authors (Gray et al., 1996; Nyberg et al., 1999) used this approximation, but they had a term of incoming and outcoming medium because they were in perfusion. Here, no fresh medium was added, instead fed-batches were operated and nutrients were added at low rates.

Sensitivity analysis

Sensitivity analysis is used to investigate which are the measurements that require a good precision. We simulated a 10% variation on each measurement, we calculated the fluxes and sorted the mean relative error overall the fluxes, this for every time point. Then the maximum relative error was sorted overall the time points and compiled in the result section.

Intracellular concentration.

The intracellular concentration was also investigated in order to verify the validity of the pseudo steady-state assumption. The samples were prepared as follows. $1x10^7$ cells was pooled in a 1.5 ml vials and centrifuged at 14 000 rpm for 1 min. The pellet was then rinsed twice with cold PBS and freezed immediately on carbonic ice. If not used immediately, it was frozen at -80°C. For glucose, lactate and ammonia analysis, the samples were thawed on ice and 0.4 ml of perchloric acid at 1M was added. Tubes were immediately vortexed and allowed standing 5 minutes. Then, 0.125 ml K_2CO_3 2M was added and a precipitate appeared. 0.05 ml triethanolamine 0.5M/EDTA 5 mM pH 7.6 was added to neutralize the pH. The sample was then filtered on a 0.2 microns membrane and the supernatant was ready to use.

For amino acid analysis, we added 0.5 to 1 ml of 0,5M perchloric acid, the cell pellet was then vortexed and allowed standing for 5 minutes on ice before it was sent for amino acid analysis.

The internal variation rate was then calculated and converted to an external variation i.e. the variation was considered on the external volume basis as follow:

$$r = \frac{s_2 - s_1}{t_2 - t_1} * \frac{V_{int}}{V_{ext}} \qquad (12)$$

The cell volume was taken as 17.7×10^{-10} ml as reported by (Schmid and Keller, 1992).

Result

Sensitivity analysis

Table 4.4 presents the sensitivity analysis that was performed on the model with the data of Batch 1 and Inf B. Measurements that are very sensitive are glucose, lactate, glutamine, asparagine, DNA, extracellular proteins, lysine, ammonia and oxygen. Measurements that do not lead to significant errors are glycine, aspartate, glutamate and methionine measurements. For the other measurements, the errors are case dependant. All the methods presented good reproducibilities and were done with standard curves. The only measurement that may present an error higher than 10% is the cells' total protein content, which was done with a standard curve using albumin. Since the albumin and cell composition in amino acids are not identical, we can misestimate the total protein content. Fortunately, this measurement is not the most sensitive.

Table 4.4 Maximum mean relative error over time on metabolic flux when a 10% variation is processed on a measure.

Variation on :	Growth (Batch 1)	Infection (Inf B)
Glucose	1995.94	714.71
Lactate	1880.57	660.53
Serine	36.68	10.68
Glycine	4.79	4.92
Alanine	32.29	11.11
Aspartate	1.65	3.48
Asparagine	150.14	64.39
Glutamine	270.31	107.72
Glutamate	7.92	2.82
Membrane	62.45	7.43
ADN/ARN	186.80	43.35
Proteins	76.11	87.57
Extracellular proteins	181.50	118.04
Threonine	8.21	21.64
Phenylalaline	26.05	34.27
Tyrosine	23.07	5.59
Valine	39.33	5.31
Methionine	6.11	8.04
Arginine	50.91	26.72
Histidine	23.49	7.74
Lysine	123.58	15.16
Leucine	81.44	20.28
Isoleucine	23.14	7.25
NH_3	122.58	127.25
O_2	479.90	216.34

Pseudo steady-state assumption.

Most of the previous analysis (Bonarius et al., 1997; Pissarra and Henriksen, 1998; Savinell and Palsson, 1992; Takiguchi et al., 1997) were done in chemostat in order to maintain homeostasis in the cells. But in this study, the experiments were done in the same conditions as in the process, which consists in a fed-batch followed by a lytic infection. Therefore, the PSS assumption had to be verified. In table 4.5, we report the variation in the concentration that occurred over 72 hrs in cells. The first column gives the results obtained by Schmid and Keller (1992). Columns 2 and 3 give the actual concentrations that were measured at the beginning of growth and after 72 hrs. The fourth column gives the variation over time. The fifth column gives the variation reported to the external volume. The sixth column is reported on the number of cells and is to be compared to the actual specific rate of consumption and production of the last column.

Table 4.5 Intracellular concentration and intracellular nutrient variation.

	Schmid (1992) (1)	(2)	(3)	Internal Rate (4)	Equivalent external rate (5)	Equivalent specific rate (6)	specific rate consumption (35hrs) (7)
Time		0	72	mM/hrs	mM/hrs	mmole/h* $x10^9$ cells	mmole/h* $x10^9$ cells
lactate		51.91	51.91	0.00	0.00	0.00	$5.79x10^{-1}$
ammonia		4.90	4.96	$-8.01x10^{-4}$	$-1.84x10^{-7}$	$-1.54x10^{-7}$	$4.51x10^{-4}$
asp	2.98	3.91	1.68	$3.10x10^{-2}$	$7.13x10^{-6}$	$5.48x10^{-6}$	0.00
glu	10.91	14.49	6.57	$1.10x10^{-1}$	$2.53x10^{-5}$	$1.95x10^{-5}$	$-5.67x10^{-3}$
asn	1.22	0.65	0.34	$4.38x10^{-3}$	$1.01x10^{-6}$	$7.76x10^{-7}$	$-6.14x10^{-3}$
ser	1.92	1.78	0.54	$1.72x10^{-2}$	$3.96x10^{-6}$	$3.05x10^{-6}$	$-1.07x10^{-2}$
gln	2.67	4.04	1.74	$3.20x10^{-2}$	$7.37x10^{-6}$	$5.67x10^{-6}$	$-3.61x10^{-2}$
his	0.82	1.13	0.32	$1.13x10^{-2}$	$2.60x10^{-6}$	$2.00x10^{-6}$	$-2.31x10^{-3}$
pro	4.12	3.28	1.33	$2.72x10^{-2}$	$6.25x10^{-6}$	$4.81x10^{-6}$	N/D
thr	4.47	5.52	2.39	$4.35x10^{-2}$	$1.00x10^{-5}$	$7.69x10^{-6}$	$-3.55x10^{-3}$
arg	0.63	1.20	0.49	$9.85x10^{-3}$	$2.27x10^{-6}$	$1.74x10^{-6}$	$-5.02x10^{-3}$
ala	16.16	7.30	2.73	$6.35x10^{-2}$	$1.46x10^{-5}$	$1.12x10^{-5}$	$1.04x10^{-2}$
tyr	0.78	0.02	0.26	$-3.33x10^{-3}$	$-7.66x10^{-7}$	$-5.89x10^{-7}$	$-3.31x10^{-3}$
gly	8.24	12.62	3.64	$1.25x10^{-1}$	$2.87x10^{-5}$	$2.21x10^{-5}$	$3.70x10^{-3}$
met	0.11	0.02	0.13	$-1.51x10^{-3}$	$-3.48x10^{-7}$	$-2.68x10^{-7}$	$-2.46x10^{-3}$
val	0.75	1.63	0.64	$1.38x10^{-2}$	$3.18x10^{-6}$	$2.45x10^{-6}$	$-7.54x10^{-3}$
phe	0.55	0.26	0.26	$-9.98x10^{-6}$	$-2.30x10^{-9}$	$-1.77x10^{-9}$	$-3.10x10^{-3}$
ile	0.63	0.93	0.43	$7.01x10^{-3}$	$1.61x10^{-6}$	$1.24x10^{-6}$	$-5.65x10^{-3}$
leu	0.43	0.98	0.43	$7.61x10^{-3}$	$1.75x10^{-6}$	$1.35x10^{-6}$	$-7.72x10^{-3}$
lys	0.78	1.67	0.34	$1.86x10^{-2}$	$4.27x10^{-6}$	$3.29x10^{-6}$	$-1.04x10^{-2}$

We see in table 4.5 that the internal concentration variation is at least 100 times lower than the actual specific rate of consumption and production in the medium, it represents in the worst case 1% of the external rate. Therefore, from

these observations we can conclude that the pseudo steady-state assumption is valid.

Cell Composition

In table 4.6 are compiled results on the cell composition for cell growth. We report data on total protein, DNA and RNA as well as dry weight. The values represent mean values over 2 to 3 samples taken during cell growth.

Table 4.6 Cell composition

	293 5-19S Nadeau (2000)		293SF/Batch 1		293SF/Batch 2		Xie (1994)	
	Mean (pg/cell)	% w/w	Mean (pg/cell)	% w/w	Mean (pg/cell)	% w/w	Mean (pg/cell)	% w/w
Dry weight	279.00		288.00		302.50		250	
Total Proteins	178.83	64.10	161.00	55.90	179.70	59.40	183	73.2
Total Lipids	69.00	24.73					33.75	13.5
DNA	11.09	3.97	15.80	5.49	5.80	1.92	3.5	1.4
RNA							9.5	3.8

In general, data seem consistant with what is reported in literature (Xie and Wang, 1994). Total protein represents approximately 60% of dry weight for the 293 cell, but DNA varies from 1% to 5%. These values in pg/cell are used in the model.

Figure 4.3 presents the dry weight, total protein and DNA content of the cells. We see that this content varies during infection. For Inf B the dry weight, amount of DNA and total protein increased after infection reaching maximum values between 35 and 40 hours. While the DNA content increased throughout infection and continues to increase after 35 hours, in Inf FB, the DNA content decreased after a certain time.

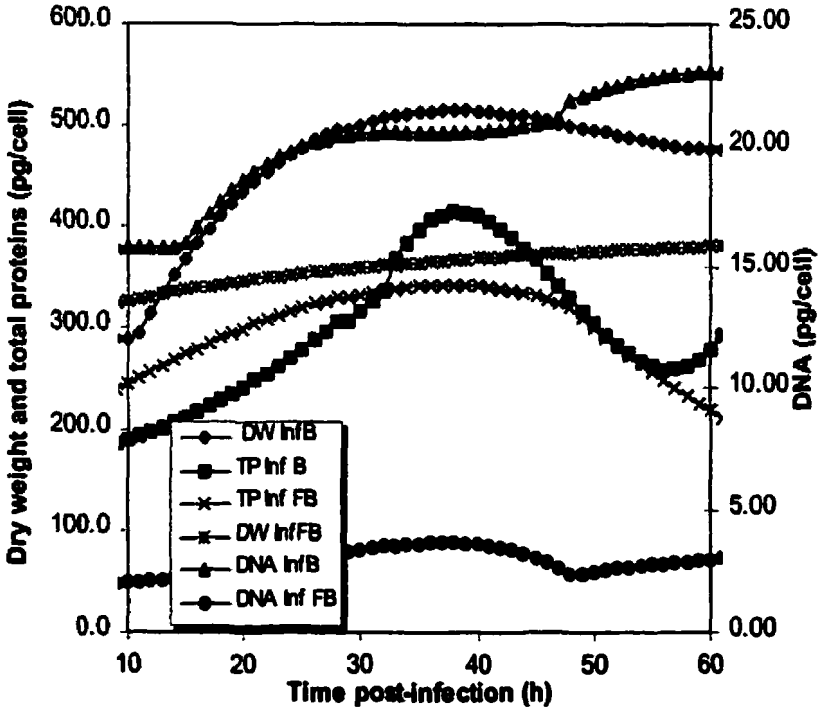


Figure 4.3 Dry weight (DW), Total proteins (TP), and DNA content of 293 SF cells during infection.

The next graph (figure 4.4) shows the percentage of amino acids in total protein during growth and infection. The variations are not significant therefore, we used a mean value over time to include in the matrix of stoechiometric coefficient. It was shown that these variations did not affect the flux calculation significantly (results not shown).

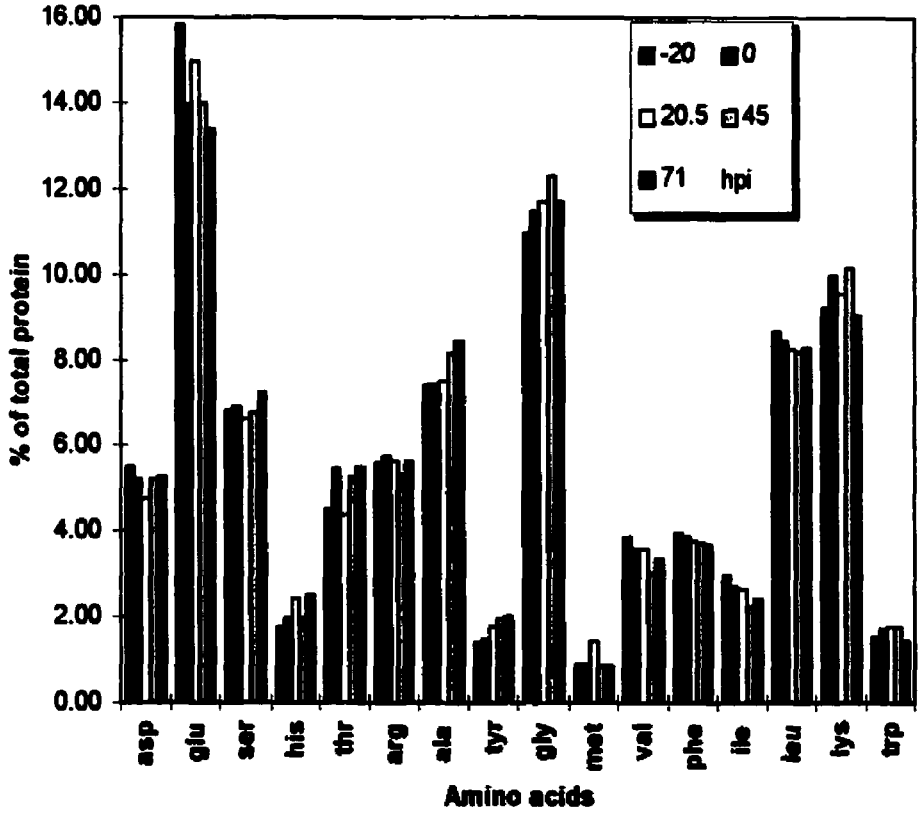


Figure 4.4 Amino acid composition of total proteins in 293SF cells during infection. hpi : hours post-infection.

CO_2 desorption.

Table 4.7 shows the desorption of CO_2 as it was measured according to the procedure described in Material and Method.

Table 4.7 Rate of CO_2 desorption.

%CO2	Desorption (mole/min)	pH
0.61	-8.03×10^{-6}	7.83
0.85	-8.24×10^{-6}	7.83
5.02	-5.82×10^{-5}	7.28
5.02	-5.71×10^{-5}	7.29
10	-4.28×10^{-5}	7.00

From these results, we see that at higher CO_2 concentration, the desorption rate was also higher as the pH decreased. We also concluded that these values were 100 times lower (data not shown)than the CER, and therefore, the CO_2 desorption due to HCO_3^- can be neglected for the calculation of pCO_2.

Figure 4.5 presents the calculated and measured pCO_2 for the model, which includes a balance on NADH and NADPH. We see clearly that in figure 4.5 both series followed the same trend. Adding the NADH/NADPH balance to the model is more appropriate as it was also shown previously by other authors (Bonarius et al., 1996; Bonarius et al., 1997; Schmidt et al., 1998).

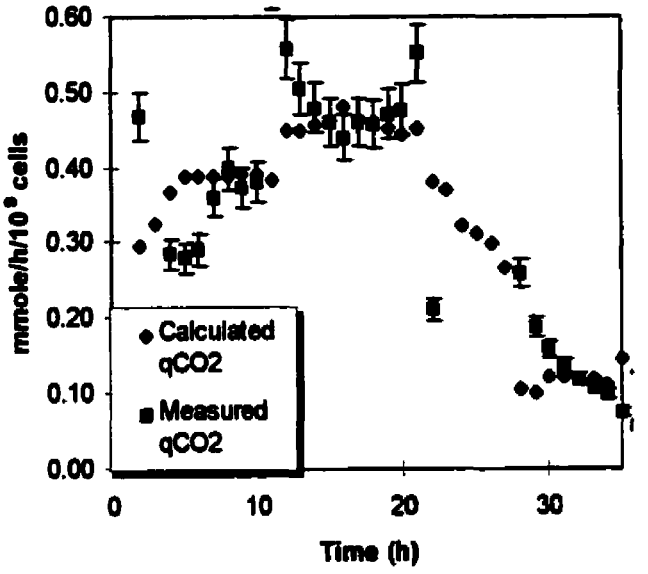


Figure 4.5 Calculated qCO_2 with the model versus measured qCO_2.

Cell Growth, glucose and glutamine consumption and lactate and ammonia production.

Prior to any metabolic flux calculation and in order to allow the reader to get a sense of the raw data obtained for the five experiments, consumption and production rates of the main metabolites are presented in figure 4.6-a to e.

In figure 4.6a, the cell concentrations are shown for all the experiments. During the batch cultures, cells had similar growth curves. However, the cell concentrations at 60 h were respectively $1.7x10^6$ cells/ml and $1.2x10^6$ cells/ml.

Batch 2 reached a plateau phase much earlier than Batch 1, right after 40 hours of growth. In the fed-batch with low-glucose (fed-batch LG) the cells reached a plateau at around 45 hrs. The viability during growth phase was always above 90% in all cases (not shown). For the infection phase, we observed 50% growth for Inf B in the first 12 hours but for the Inf FB we observed up to 100% growth after 24 hours. After the cell densities reached a maximum, the viable cell count decreased in both infections.

In figure 4.6b, we see that the total glucose consumption for the fed-batch with low glucose concentration was also very low. The two batches followed the same glucose consumption. For Inf B with medium replacement the glucose consumption was slightly higher than Inf FB without medium replacement, 23 mM versus 20 mM. Figure 4.6c presents the total glutamine consumption. The fed-batch with low glucose and batch 1 had the same glutamine consumption. The batch 2 had a slightly higher total glutamine consumption, 1.9 mM versus 1.2 mM for the other growth experiments. The glutamine consumption diminished at around 30 hours. During infection, the glutamine consumptions were higher, 2.9mM for Inf B and 8.2 mM for Inf FB . Figure 4.6d presents lactate production. As expected, the fed-batch with low glucose showed the lowest lactate production, 8.4 mM. The two batches followed the same trend, with 18 mM and 16 mM for Batch 1 and 2 respectively. The infection experiments both

showed a higher lactate production, 48.5 mM for Inf B and 37.1 for Inf FB. Noteworthy, Inf FB which had no medium replacement had a lower production even though it started with lactate at 15 mM. Finally, figure 4.6e shows the ammonia production. The production of ammonia was not constant and a lot of singularities were observed. Batch 1 experiment had a starting ammonia concentration of 0.7 mM showing that glutamine was already degraded in the medium. However, no more ammonia was produced than in the batch 2 and fed-batch LG. The three runs produced approximately 1.5 mM. During batch 1, the production was not very high at the beginning but increased between 20 and 30 hours and decreased afterwhile. The infections showed a high ammonia level especially for the fed-batch, which produced approximatly 3.5 mM compared to the batch which had produced 2.5 mM. An inflexion point was also observed for Inf B at 20 hours and at 28 hours for Inf FB.

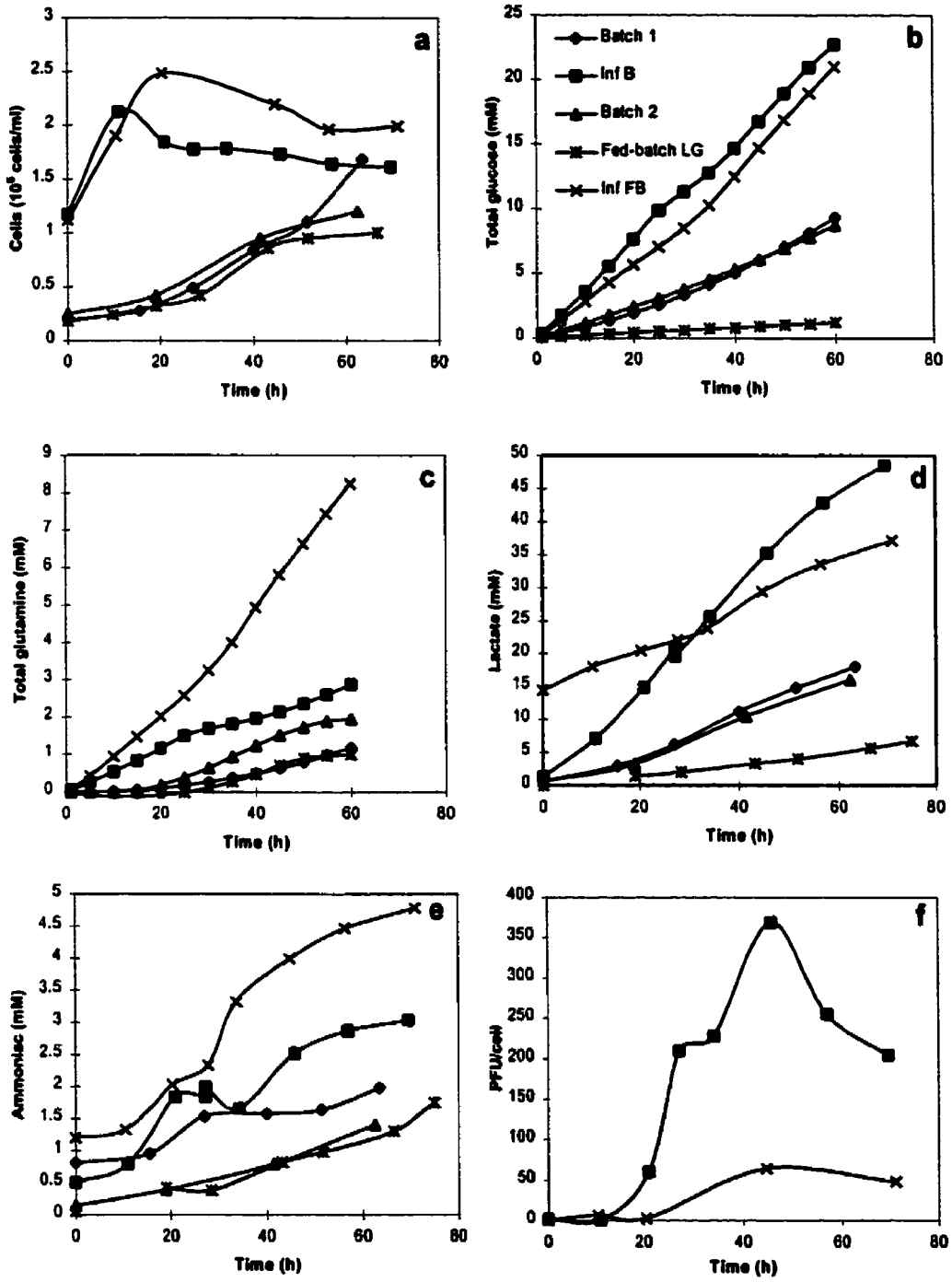


Figure 4.6 Cell growth (a), Total glucose consumption (b), Total glutamine consumption (c), Lactate production (d), Ammonia production (e), Virus titer (f) during growth and infection for each experiment.

Virus titer.

We see in figure 4.6f that in the two infections experiments, the maximum titer was attained around 45 h after infection. During Inf B, up to 400 pfu/ml was measured but for Inf FB, the virus titer was reduced to 75 pfu/ml, showing that this experiment did not produce as expected, suggesting that limiting nutrient conditions or inhibitory metabolite levels were reached.

Flux calculation

In order to analyze the data further and to understand differences in metabolism, a flux analysis was completed integrating key nutrient measurements. Fluxes were segregated in four groups as explained in Material and Methods. Flux computations were started at 20 h post-inoculation for Batch 1, Batch 2 and Fed-Batch LG to avoid lag phases and transitory regimes and were started at 10 h post-infection for Inf B and Inf FB. Figure 4.7 shows the main glycolytic fluxes, the flux from glucose to pyruvate (F1), the flux to lactate (F2) and the flux to Acetyl-CoA (F3). The first two graphs (figure 4.7a and figure 4.7b) show the glycolytic fluxes for both batches 1 and 2. Noteworthy, the flux to acetyl-CoA (F3) are negative until 50 h of growth. For the fed-batch with low glucose (figure 4.7c), the fluxes F1 and F3 were 3 times lower compared to the batches and F3

was always slightly negative. For the two infections (figure 4.8), the glucose fluxes were approximately constant. The lactate flux (F2) reached a peak at around 40 h for the batch (Inf B) and 50 h for the fed-batch (Inf FB). F2 in Inf FB was approximately half-time lower compared to Inf B. The glycolytic fluxes (F1) are similar to those in the growth phase while F3 was mostly positive during the two infection experiments.

Figure 4.9 shows the main glutaminolysis fluxes which comprises $F8_{tot}$, the sum of all the fluxes from glutamine to glutamate, $F5_{tot}$, the sum of all the fluxes from glutamate to α-ketoglutarate and finally F4, the flux to alanine, one important product during cell cultures. The trends were very different from one experiment to the other. In Batch 1, the flux F8tot decreased rapidly at 29 h, becoming negative. For $F5_{tot}$ a maximum was observable for both batches, one at 22 h, the other at 29 h for Batch 1 and Batch 2 respectively. F4 was constant in the first batch but became negative at 50 h in the second batch. The fluxes $F8_{tot}$ and $F5_{tot}$ were 2 to 10 times lower for the fed-batch with low glucose (Figure 4.9c), while F8tot became negative at around 58 hours.

For the infection phases (Figure 4.10), $F8_{tot}$ was mostly positive but two times higher in Inf FB. F5tot was mostly negative in both cases, but we observed a high peak between 28 and 34 hours for Inf B. These fluxes were in the same order of

magnitude as in the batch growth phase. F4 was mostly positive and low in all cases as in the growth phases.

Figure 4.11 shows the amino acids fluxes. During the late exponential phase both batches fluxes reached similar level (Figure 4.11a and b). For Batch 1, we observed a perturbation in the fluxes around 27 hours, especially for phenylalanine (F26) and tyrosine (F27), which increased, and arginine (F28) and histidine (F29), which decreased. For Batch 2, we also observed a perturbation in the threonine flux (F18b) and histidine flux (F29) later on at 37 hours, while some amino acids fluxes increased. For the low-glucose fed-batch, fluxes were approximately 2 times higher during growth but perturbations for most of the amino acids appeared between 50 and on. The fluxes of lysine (F22a), leucine (F22b), isoleucine (F23), tyrosine (F27) and valine (F24) were the highest fluxes for the growth experiments.

In figure 4.12, for Inf B a drastic increase at around 10 hours after infection was observed and these fluxes remained higher than in growth phase. Up to 80% of the amino acids fluxes were negative between 21 and 35 hours after infection for both experiments. After 28 hours most of the fluxes increased again, reaching values as high as 0.04 mmole/10^9 cells/h for Inf FB.

Figure 4.13 represents the Krebs cycle fluxes. During the exponential growth phase the fluxes were in the same order of magnitude for both batches but F32, F33 and F34 decreased at the end of the growth phase for Batch 2. For both batches, F10 became negative at approximately 45 hours. The fluxes were up to two time higher for the low-glucose fed-batch (Figure 4.13c) during the first 50 hours of growth. Interestingly F10 was mostly positive at the beginning.

For the infection phase (figure 4.14), the trends were also very different. For Inf B, we observed up to two times increase or decrease around 10 hours and variations between 24 and 36 hours after infection. The fluxes were approximately two times higher than in the growth phase. For Inf FB, some perturbations also occurred between 21 and 36 hours. For both experiments, F10 is mostly negative.

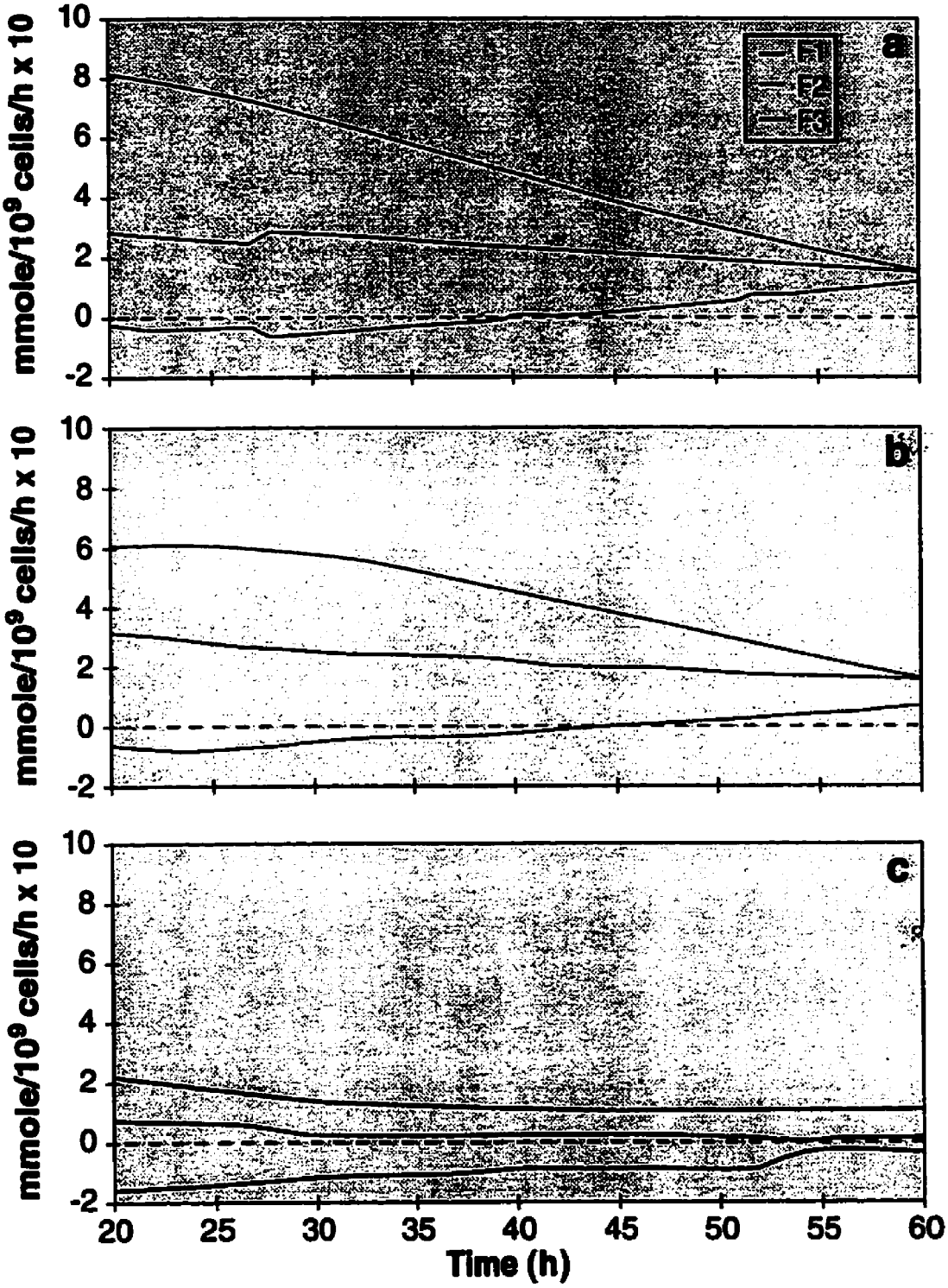


Figure 4.7 Glycolytic fluxes Batch 1 (a), Batch 2 (b), Fed-Batch LG (c).

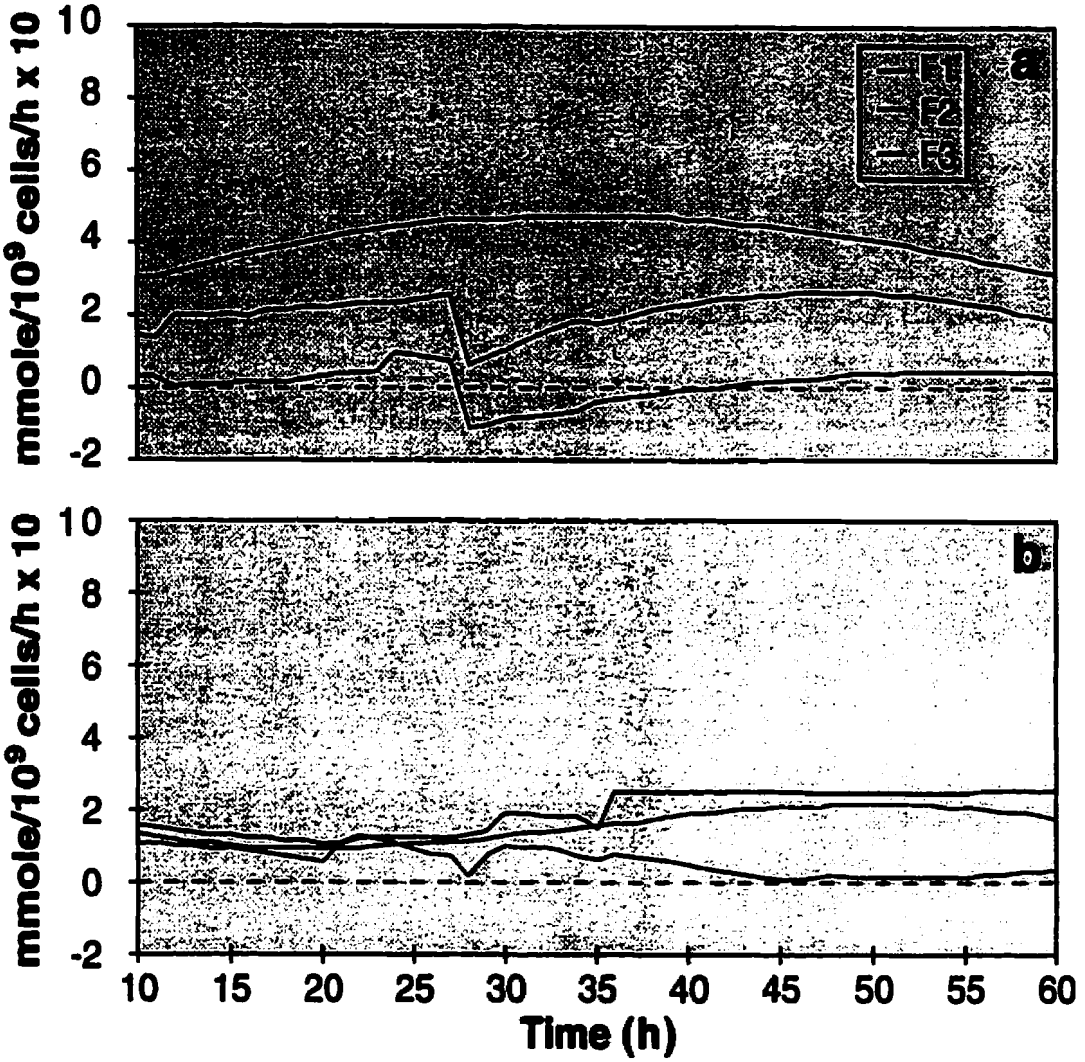


Figure 4.8 Glycolytic fluxes. Inf B (a), Inf FB (b).

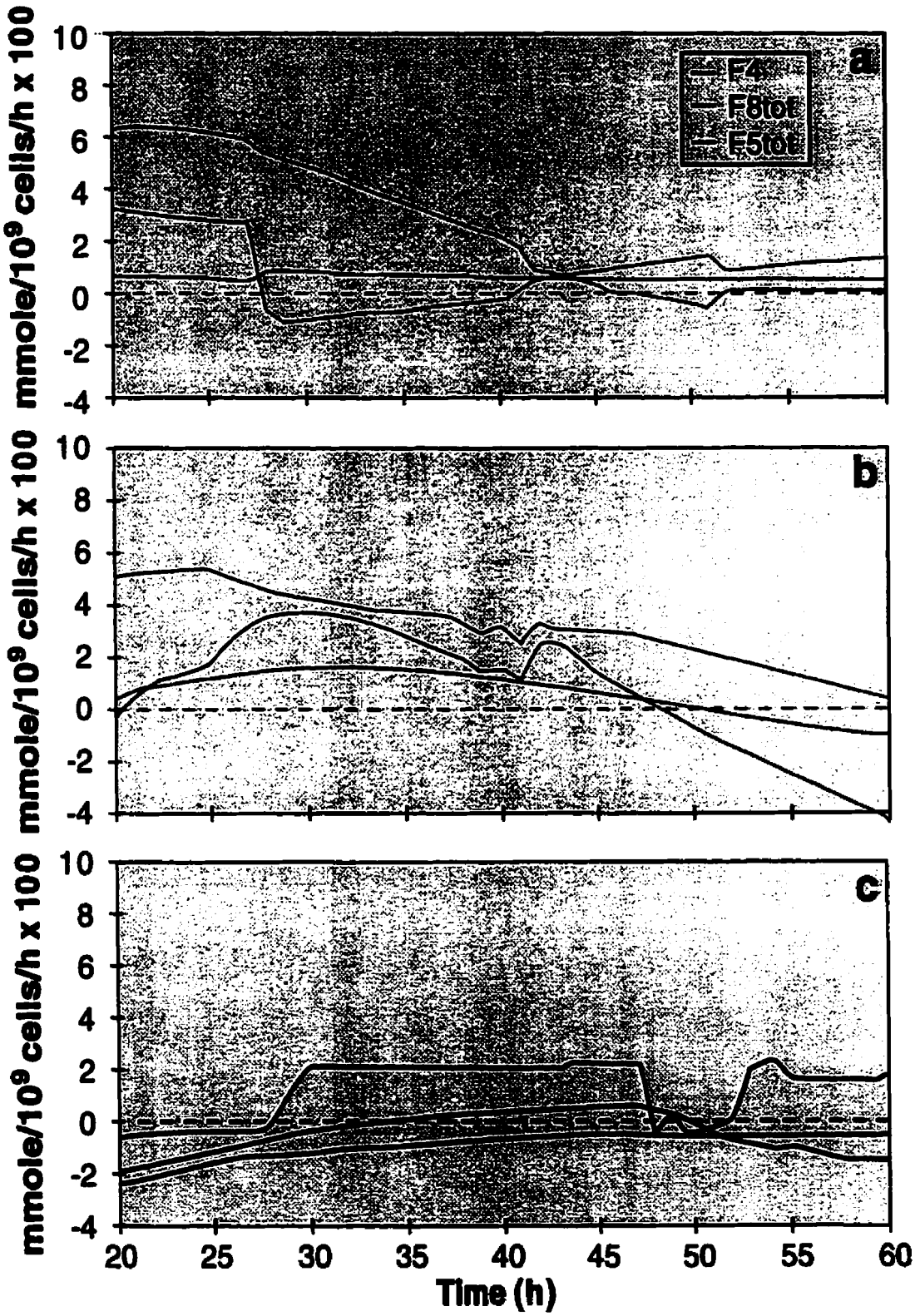


Figure 4.9 Glutaminolytic fluxes. Batch 1 (a), Batch 2 (b), Fed-Batch LG (c).

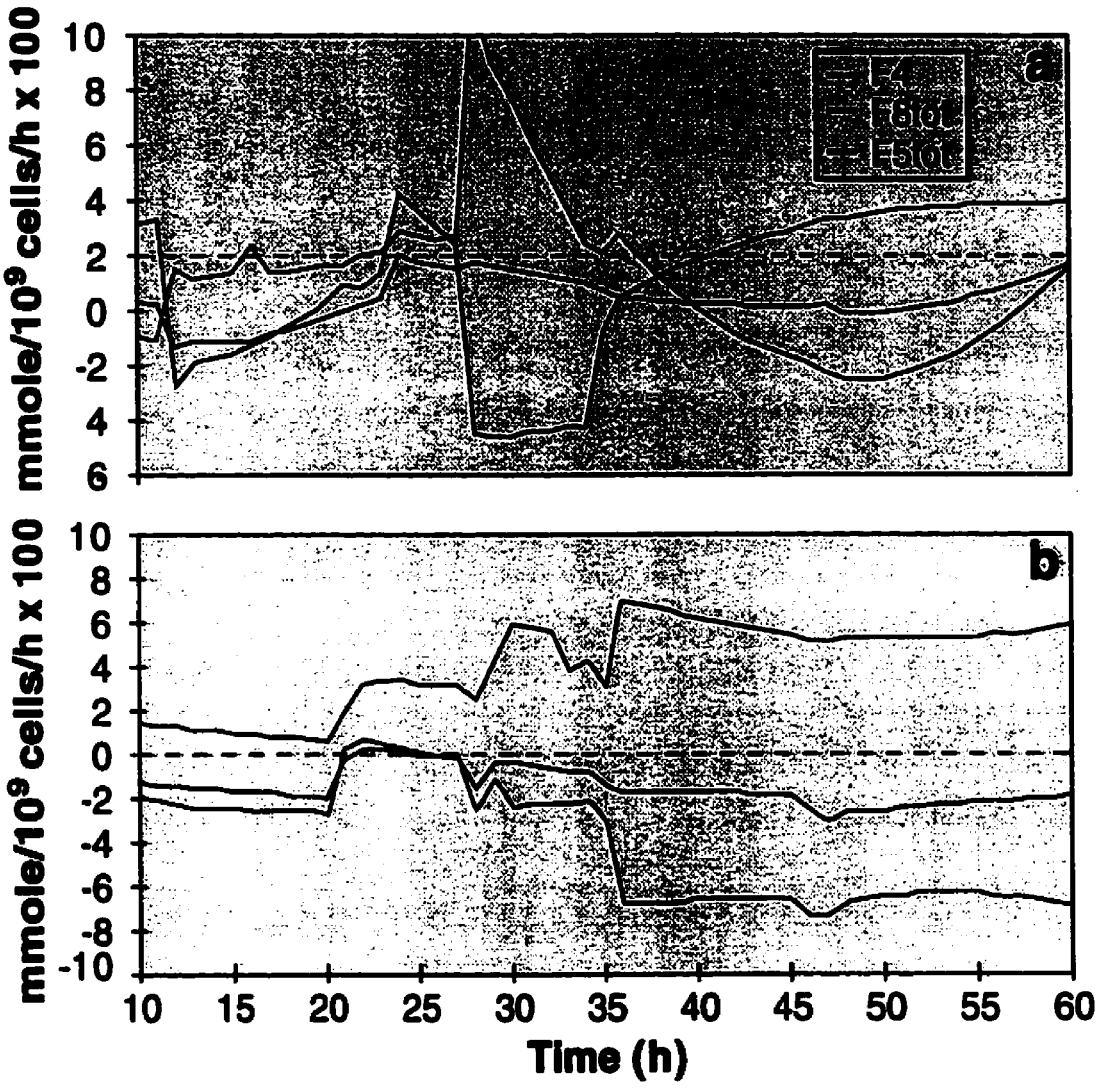


Figure 4.10 Glutaminolytic fluxes. Inf B (a), Inf FB (b).

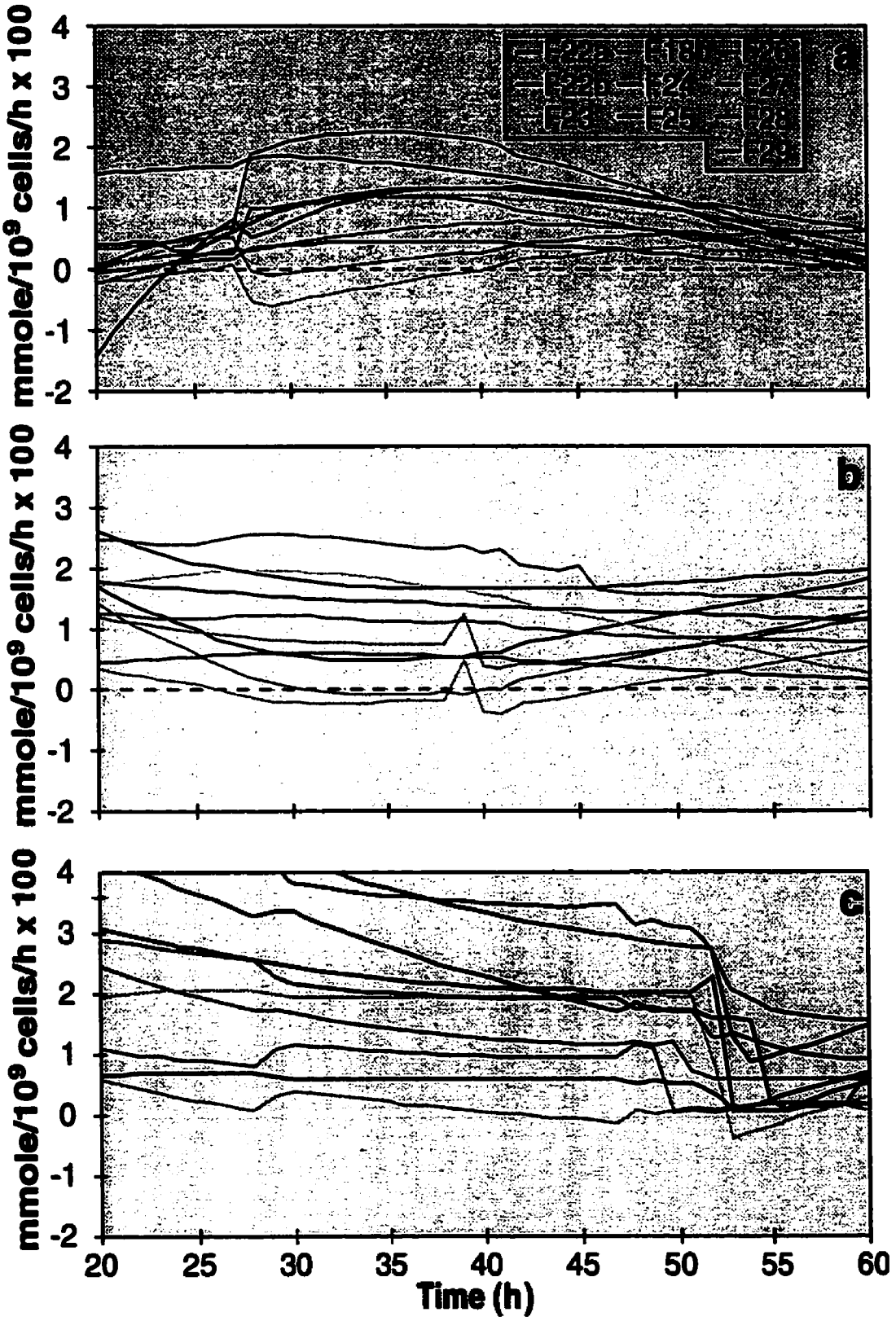


Figure 4.11 Amino acid fluxes. Batch 1 (a), Batch 2 (b), Fed-Batch LG (c).

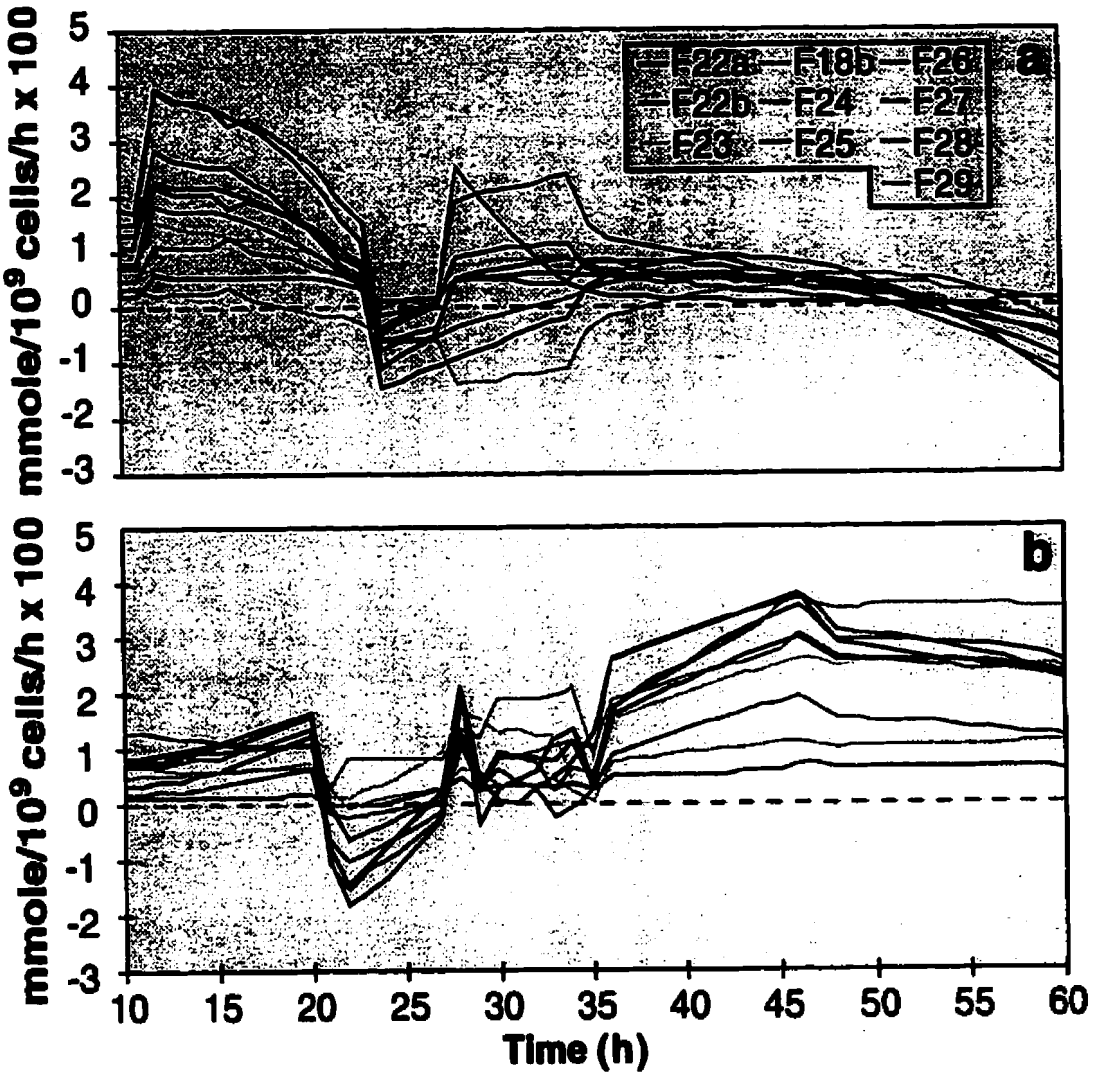


Figure 4.12 Amino acid fluxes. Inf B (a), Inf FB (b).

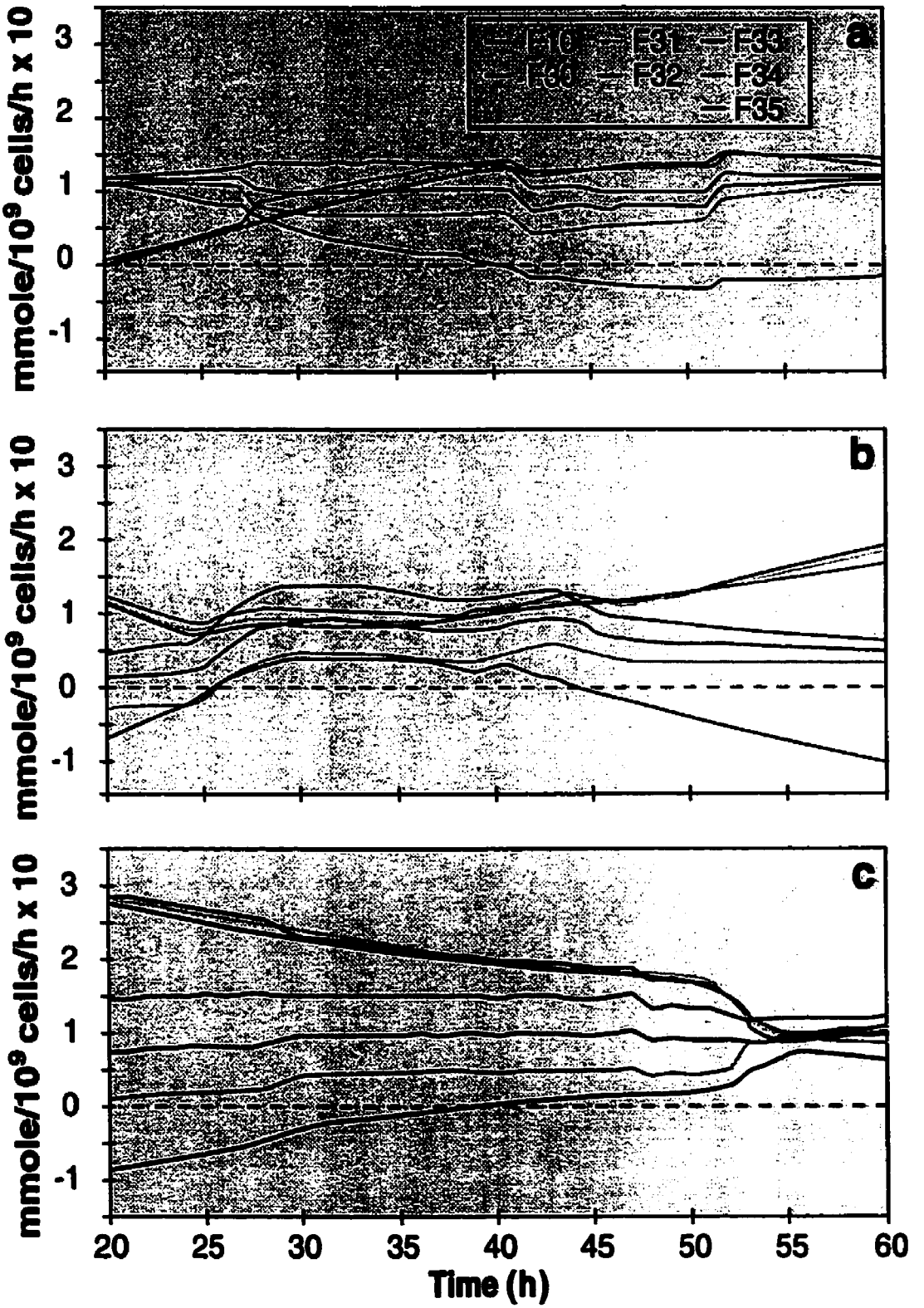


Figure 4.13 TCA cycle fluxes. Batch 1 (a), Batch 2 (b), Fed-Batch LG (c).

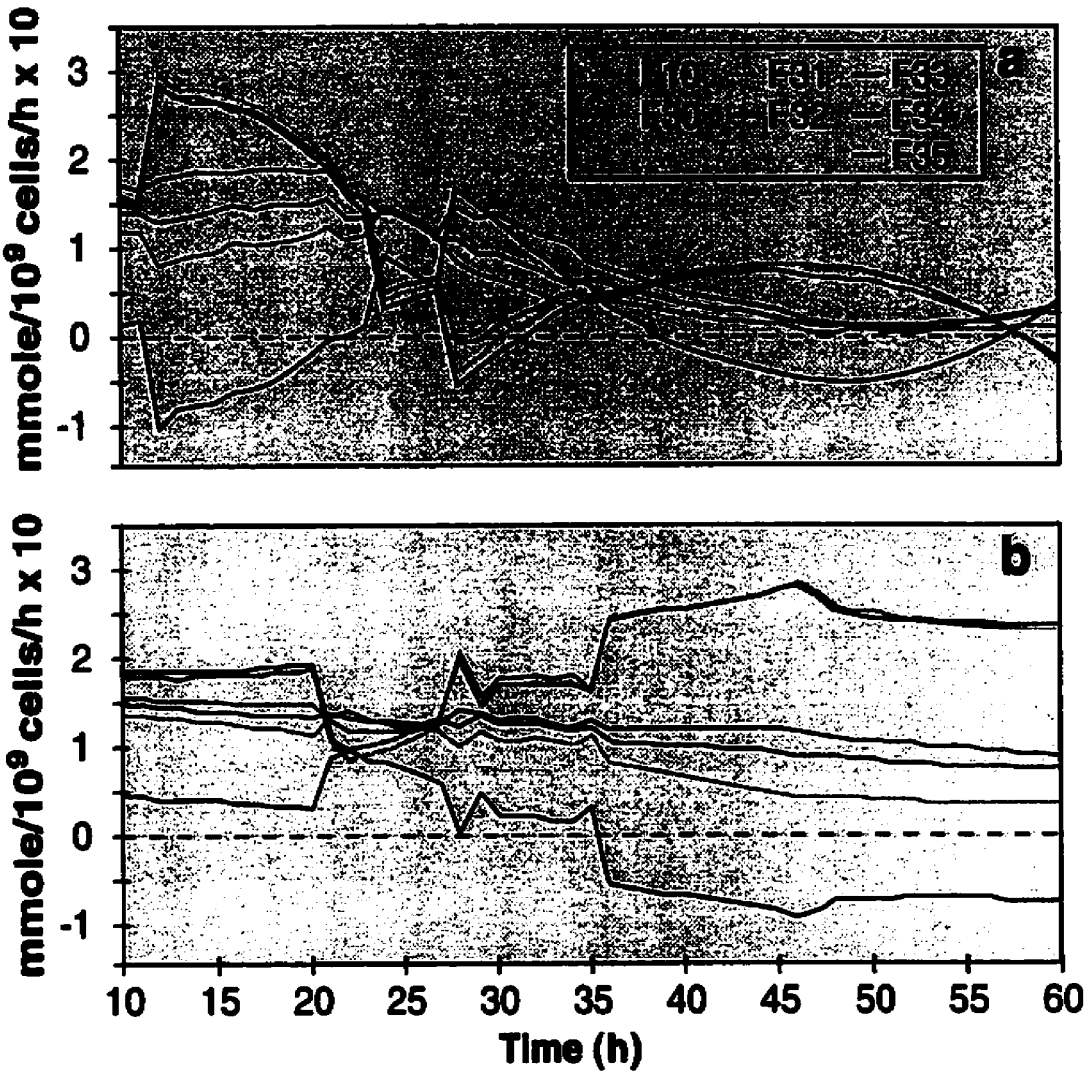


Figure 4.14 TCA cycle fluxes. Inf B (a), Inf FB (b).

Discussion

Batch growth

The two batch growths were operated in the same conditions and consequently they had the same growth profile. Consumption and production profiles of glucose and lactate were similar and the main glycolytic fluxes were also similar for both batches. Interestingly F3 was negative during the exponential phase of both batches, showing that there must be an excess in acetyl-CoA and pyruvate might not have entered the Krebs cycle. Flux F3 is driven by the *pyruvate dehydrogenase* and this enzyme was shown to be inactive in a lot of transformed cell, therefore, it is not surprising to see low positive fluxes or even reversed fluxes (Mancuso et al., 1994; Petch and Butler, 1994).

The consumption and production of glutamine and ammonium were different in the two batches. In Batch 1, at around 15 hours, ammonia production increased and consequently F8tot (net flux of glutamine to glutamate) dropped drastically at 29 h, even tough glutamine was still at 2mM and ammonium at 1.5 mM. We have shown previously that this ammonia concentration is not yet inhibitory to growth (Nadeau et al., 2000). It seemed that a high ammonia production initiated a metabolic shift towards less glutamine consumption. By this mean, the cells

might prevent the formation of more ammonia caused by glutamine consumption.

But the source of glutamate had to be replenished by another pathway. Arginine and histidine were a good source of glutamate, but produced ammonia too, so these fluxes (F28 and F29) decreased at 29 hours, while phenylalanine and tyrosine degradation (F26 and F27) increased, thus producing glutamate without ammonia via transamination pathways. Therefore, we see a shift in the metabolism from arginine and histidine to phenylalanine and tyrosine in order to prevent ammonia accumulation while replenishing the glutamate pool. Interestingly, these changes did not seem to inhibit growth in any way.

In Batch 1, we see that the Krebs cycle fluxes reach steady state rapidly, this can explain the constant growth rate for Batch 1. Batch 2 had Krebs cycle fluxes constant between 25 and 45 h but some of the fluxes decreased afterwards, resulting in an earlier plateau phase for these cells. $F5_{tot}$ was lower than $F8_{tot}$, showing that there is more glutamine consumption than glutamate consumption. Therefore, small perturbations were observed at 37 h, when the glutamine consumption drop. At that time, some amino acids fluxes increased such as arginine (F28) and histidine (F29), thus replacing the glutamate source. But also threonine (F18b), lysine (F22a) and leucine (F22b), which feed the pyruvate and

acetyl-CoA, pool. Then, the upper part of the Krebs cycle is fed and F35, F30, and F31 increased. But the Krebs cycle bottom part fluxes started decreasing at that time. This is mainly due to the fact that glutamine is less fed to the Krebs cycle and other amino acids metabolism such as phenylalanine, tyrosine, valine or methionine are not increased leading to an unbalanced Krebs cycle. All or part of the above events may explain the earlier plateau phase observed in batch 2.

The growth arrest in Batch 2 was not due to any observable limitations. The differences between the two batches may be attributed only to the high glutamine consumption and ammonia production compared to Batch 1. Noteworthy, Batch 1 had already some ammonia present in the medium, therefore, the cell had to regulate its glutamine consumption and ammonia production earlier in culture process.

Negative fluxes that were observed for F28 and F29 during exponential growth need to be discussed. The associated reactions are irreversible, so negative fluxes mean that the consumption rate did not meet the requirement for protein synthesis that was assumed in the model. This implies that, either the cell metabolism was too low to meet this requirement or that there was an overestimation of protein synthesis mainly due to the measurement method for total proteins (see Material and Methods).

Fed-batch with low-glucose

For the fed-batch with low glucose at 1mM, there is clearly a plateau phase observed at 45 hours (figure 4.6). Compared to the batches most of the glycolytic fluxes and glutaminolysis fluxes were lower while the amino acids and Krebs cycle fluxes were higher. Also, the net alanine flux (F4) is reversed. As previously reported, when glutamine or glucose consumption is reduced mammalian cells tend to use more amino acids (Cruz et al, 1999; Nadeau et al., 2000). It is interesting to note that during growth phase, F10 (the anaplerotic pathway) was very negative, meaning that most of the pyruvate enters Krebs cycle by this way. The cells use the glucose in a more efficient way, by directing pyruvate to the Krebs cycle instead of metabolizing it to lactate.

But at around 45-50 hours, a metabolic change occurred as all the fluxes decreased while the cell growth rate diminished (figure 4.6). The only flux that stayed high was $F5_{tot}$, the flux of glutamate to Krebs cycle. This also corresponded to the point were glutamine consumption decreased (figure 4.6) even though its concentration was still at 4mM. Since ammonia concentration was at 1 mM and continued to be produced (figure 4.6), therefore, ammonia accumulation might not be responsible for the metabolic change. As a matter of

fact, some non-essential amino acids became limiting at 50-60 hours: aspartate, glutamate and serine, although glutamate was produced shortly afterwards (results not shown). These limitations could explain the metabolic changes. Siegwart et al. (1999) reported in the same manner that most of the specific consumption and production parameter dropped at $1x10^6$ cells/ml during fed-batch with low-glucose, except for q_{O2} and the growth rate. In fact, in the first growth part, the cell utilized non-essential amino acids as well as essential amino acids but it seems that when the non-essential amino acids became limiting the cell shifted to a more efficient metabolism reducing the amino acid fluxes as well as the Krebs cycle fluxes. But this shift also led to a poorer growth rate.

Here again, we observed negative amino acids and Krebs cycle fluxes at certain times. These artefacts may be attributed to similar reasons as exposed in the preceding section.

Infection phase

From figure 4.6, we clearly see that the titer was much higher in the case of Inf B. This experiment had a normal infection process as it can be shown by various parameters. First, we saw in figure 4.3, an increase in the dry weight and total protein for Inf B. We know that this increase was due to accumulation of viral

proteins, as the maximum in virus titer was also obtained at this time. After the peak was attained, it seems that proteins were degraded as the total protein decreased. A decrease was also observed with the viral titer. However, DNA synthesis in Inf B is still active after the peak in viral titer. Similarly, Wigand and Kumel (1978) saw a maximum in DNA production at around 20 hours post-infection, which then dropped drastically. Usually DNA is stable and a drop in content may indicate that the cell integrity is affected. Therefore, for Inf B, it is not clear whether the loss in titer was due to an intracellular process which affected the virion as well as the total proteins, but not DNA, or if the cell integrity was affected as the viability started to decrease and proteins were released in the extracellular medium (results not shown) or a combination of both phenomenons.

For Inf B, the growth stopped very early. Furthermore, we saw that at 10 hours, there was an increase of most fluxes. This point corresponds to the onset of virion production, which clearly begins at 10 hours after infection. The glycolytic fluxes increased during the infection phase reaching a maximum at 33 hours. This observation has been reported before for 293S cells (Nadeau et al., 1996). Although, the glycolytic fluxes and glutaminolytic remained similar to those in the growth phase, the amino acids fluxes and Krebs cycle fluxes are globally higher at the beginning of the infection. All of these events were not observed in

Inf FB. In both infection experiments, F3 was slightly higher showing that pyruvate was processed to acetyl-CoA which entered the Krebs cycle through F35. F10 was also very negative at some points showing the entrance of pyruvate through the anaplerotic pathway. From all these observations, it seemed that the cell became more oxidative and used additional carbon sources other than glucose at the beginning of infection.

Also, for both infection experiments, at around 20 hours, a decrease in the amino acid fluxes is observed. At around 27 hours, a peak is observed for most of the amino acid fluxes. Although, the peak observed in Inf B may be caused by two phenomenons: infection and pulse addition. It was demonstrated that the fluxes were directly correlated to their corresponding nutrient concentrations in the medium (results not shown), showing that higher nutrient feeding and concentration stimulates the metabolism. However, the peak observed in Inf FB was not due to pulse feeding. From the observation of metabolic fluxes profile, it may have been more suitable to feed the cells earlier in order to counteract the negative amino acids fluxes observed at 20 hours. As high amino acid fluxes were observed, we also saw a high glutamate flux (F5tot), accompanied by a decreased glutamine flux (F8 tot), and at the same time the cells produced less ammonia. Even tough glutamine was fed, its flux did not increase. However, tyrosine and phenylalanine fluxes (F26 and F27) became higher, providing

glutamate but no ammonia. The cells preferred amino acids to glutamine as an energetic source during infection. On the contrary, the ammonia production was very high for Inf FB. It slowed around 20 hours as in Inf B, but the production restarted afterwards. The cells did not regulate its production tightly as in Inf B and F8tot, the glutamine consumption, remained very high.

Another interesting point was that the highest amino acid flux is the arginine flux for both infection processes. This is normal if we consider that the feedings were done with MEM amino acids in which the higher amino acid concentration is arginine. Noteworthy, arginine had been demonstrated as absolutely necessary for adenovirus production (Bonifas, 1967; Clark Rouse and Schlesinger, 1967; Heilman and Rouse, 1980; Kumel and J., 1979 ; Wigand and Kumel, 1978). Clark Rouse and Schlesinger (1967) had proposed earlier that arginine played a specific role in a late synthetic step for virion maturation. Without arginine, there was no virion production, but if arginine was added at 28 to 32 hours after infection, the virion production was restored. As a matter of fact, in Inf B, a peak is observed at around 29 h, which is 15 hours before the peak for adenovirus production.

As mentioned earlier, Inf B had a normal maximum titer compared to Inf FB. Regardless of the infection process (batch with medium renewal vs. fed-batch without medium removal), this could also be due to the state of the cells before

infection. Inf B was done with Batch 1, while Inf FB was done with Batch 2. As observed previously the Krebs cycle fluxes for Batch 2 were no more in steady state at infection time.

Furthermore, if we investigate for limitations during the infections (results not shown), in Inf FB, aspartate was always null, serine dropped to zero at 20 hours and glycine at 35 hours while glutamate was produced afterwards. In Inf B, glutamate and aspartate dropped to zero at 20 hours, but glutamate was produced shortly afterwards. Serine became limiting at 35 hours. So limitations are observed earlier in the process for Inf FB, probably due to the higher cell concentration in bioreactor combined to an insufficient fed-batch rate and no medium renewal.

The observations for Inf FB indicate that the cells may not have been entirely infected by adenovirus, which is shown by the high growth and increased fluxes during infection or, to a lesser extent, that the fed-batch rate in spent medium was not enough to sustain the infection and expression at such a cell concentration.

Conclusion.

The flux analysis permitted to extract more information from the data and allowed better understanding of the metabolism. Although all the singularities could not and should not be explained due to the sensitivity of the method, some relevant trends could be underlined and comparisons from run to run could point out the role of key nutrients.

- Ammonia seemed to be a major regulator, the cells produced no more than a certain amount during growth (1.5 mM). Therefore, the metabolism was adapted in order to meet this condition, shifting to the degradation of less ammoniagenic amino acids such as tyrosine and phenylalanine ;
- Deviation from steady-state in Krebs cycle fluxes may explain the earlier plateau phase for Batch 2 ;
- Although the glycolytic and glutaminolytic fluxes were lower for the fed-batch with low-glucose, the amino acids fluxes, as well as the Krebs cycle fluxes were higher at the beginning of the run.

Metabolic flux analysis was also used to study the infection phase and some trends could be pointed out during a normal infection process:

- Increase in dry weight, total protein and DNA content ;
- Increase in glycolytic fluxes up to a maximum ;
- More pyruvate enter the Krebs cycle via acetyl-CoA and the anaplerotic pathway (F3 and F10) ;
- Increase in amino acids fluxes at 10 hours and near 30 hours;
- Preference for amino acid instead of glutamine ;
- From these observations it is clear that Inf FB was not optimized as we could observe some but not all of the above indicators.

Metabolic flux patterns are then useful to evaluate the culture state during growth and infection and will further help to develop feeding strategies:

- Stability evaluation of the Krebs cycle fluxes before infection ;
- Earlier pulse addition during the batch process for infection, to prevent negative fluxes ;
- Higher fed-batch rates to prevent negative fluxes but also limitations in non-essential amino acids.

References

BABICH, A., FELDMAN, L. T., NEVINS, J. R., DARNELL, J. E., and WEINBERGER, C. (1983). Effect of Adenovirus on Metabolism of Specific Host mRNAs: Transport Control and Specific Translational Discrimination. Molecular and cellular biology, 3, 1212-1221.

BANNAI, S. (1986). Exchange of Cystine and Glutamate across Plasma Membrane of Human Fibroblasts. The Journal of Biological Chemistry, 261, 2256-2263.

BANNAI, S., and ISHII, T. (1988). A Novel Function of Glutamine in Cell Culture: Utilization of Glutamine for the Uptake of Cystine in Human Fibroblasts. Journal of Cellular Physiology, 137, 360-366.

BONARIUS, H. P. J., HATZIMANIKATIS, V., MEESTERS, K. P. H., DE GOOIJER, C. D., GEORG, S., and TRAMPER, J. (1996). Metabolic Flux Analysis of Hybridoma Cells in Different Culture Media Using Mass Balance. Biotechnology and Bioengineering, 50, 299-318.

BONARIUS, H. P. J., SCHMID, G., and TRAMPER, J.(1997). Flux Analysis of Underdetermined Metabolic Networks: The Quest for the Missing Constraints. Trends in Biotechnology , 15, 307-315.

BONIFAS, V. H. (1967). Time-Course and specificity of the Arginine Requirement for Adenovirus Biosynthesis. Archiv fur die gesamte Virusforschung, 20, 20-28.

BOUCHER, R. C., and KNOWLES, M. R. (1994). Gene Therapy for Cystic Fibrosis Using E1-Deleted Adenovirus: a Phase 1 Trial in the Nasal Cavity. Human Gene Therapy, 5, 615-634.

BRIAND, P., and KAHN, A. (1993). Interets et limites des vecteurs adénoviraux pour le transfert de gènes in vivo. Pathologie Biologie, 41, 663-671.

BROWN, R. R. (1996). Metabolism and Biology of Tryptophan. Recent Advances in Tryptophan Research, Plenum Press, New York, 15-25.

CLARK ROUSE, H., and SCHLESINGER, R. W. (1967). An Arginine-Dependant Step in the Maturation of Type 2 Adenovirus. Virology, 33, 513-522.

CÔTÉ, J., GARNIER, A., MASSIE, B., and KAMEN, A. (1998). A Serum-Free Production of Recombinant Proteins and Adenoviral Vectors by 293SF-3F6 Cells. Biotechnology and Bioengineering, 50, 567-575.

CRYSTAL, R. G., MCELVANEY, N. G., ROSENFELD, M. A., CHU, C. S., MASTRANGELI, A., HAY, J. G., BRODY, S. L., JAFFE, H. A., EISSA, N. T., and DANEL, C. (1994). Administration of an Adenovirus Containing the Human CFTR cDNA to the Respiratory Tract of Individuals with Cystic Fibrosis. Nature Genetics, 8, 42-51.

GARNIER, A., COTÉ, J., NADEAU, I., KAMEN, A., and MASSIE, B. (1994). Scale-Up of the Adenovirus Expression System for the Production of Recombinant Protein in Human 293S Cells. Cytotechnology, 15, 145-155.

GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSEL, W. C., and NAIRN, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. Journal of General Virology, 36, 59-74.

GRAY, D. R., CHEN, S., HOWARTH, W., INLOW, D., and MAIORELLA, B. L. (1996). CO_2 in Large-Scale and High-Density CHO Cell Perfusion Culture. Cytotechnology, 22, 65-78.

GREEN, M. (1967) . Biochemical Studies on Adenovirus Multiplication. Xll. Plaquing Efficiencies of Purified Human Adenovirus. Virology, 31, 562-565.

GREEN, M. (1970). Effect of Oncogenic DNA Viruses on Regulatory Mechanisms of Cells. Federation Proceedings, 29, 1265-1275.

HEILMAN, C. A., and ROUSE, H. (1980). Adenovirus Type 2 Polypeptide Synthesis in Arginine-Deprived Cells. Virology, 105, 159-170.

HODGE, L. D., and SCHARFF, M. D. (1969). Effect of Adenovirus on Host Cell DNA Synthesis in Synchronized Cells. Virology, 37, 554-564.

KAMEN, A., TOM, R., CARON, A., CHAVARIE, C., MASSIE, B., and ARCHAMBAULT, J. (1991). Culture of Insect Cells in a Helical Ribbon Impeller Bioreactor. Biotechnology and Bioengineering, 38, 619-628.

KAY, M. A., and WOO, S. L. C. (1994). Gene Therapy for Metabolic Disorders. Trends in Genetics, 10, 253-257.

KOOISTRA, T., and LLOYD, J. B. (1985). Degradation of Insulin by Human Fibroblasts: Effects of Inhibitors of Pinocytosis and Lysosomal Activity. Journal of Biochemistry, 17, 805-811.

KOOISTRA, T., and LLOYD, J. B. (1986). Pinocytosis and Degradation of Exogenous Proteins by Cystinotic Fibroblasts. Biochimica et Biophysica Acta, 887, 182-186.

KUMEL, G., and J., H. H. (1979). The Influence of Arginine Starvation on the Synthesis of Virus High Molecular Weight DNA in Hela Cells Productively Infected by Adenovirus Type 5. Journal of General Virology, 45, 599-610.

LINDBERG, U., PERSSON, T., and PHILIPSON, L. (1972). Isolation and Characterization of Adenovirus Messenger Ribonucleic Acid in Productive Infection. Journal of Virology, 10, 909-919.

MANCUSO, A., SHARFSTEIN, S. T., TUCKER, S. N., CLARK, D. S., and BLANCH, H. W.1994. Examination of Primary Metabolic Pathways in a Murine Hybridoma with Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Biotechnology and Bioengineering, 44, 563-585.

NADEAU, I., GARNIER, A., CÔTÉ, J., MASSIE, B., CHAVARIE, C., and KAMEN, A. (1996). Improvement of Recombinant Protein Production with the Human Adenovirus/293S Expression System Using Fed-Batch Strategies. Biotechnology and Bioengineering, 51, 613-623.

NADEAU, I., SABATIÉ, J., KOEHL, M., PERRIER, M., and KAMEN, A. (2000). Human 293 Cell Metabolism in Low Glutamine-Supplied Culture: Interpretation of Metabolic Changes through Metabolic Flux Analysis. Metabolic Engineering, in press.

NYBERG, G. B., BALCARCEL, R. R., FOLLSTAD, B. D., STEPHANOPOULOS, G., and WANG, D. I. C. (1999). Metabolism of Peptide Amino Acids by Chinese Hamster Ovary Cells Grown in a Complex Medium. Biotechnology and Bioengineering, 62, 324-335.

PETCH, D., and BUTLER, M. (1994). Profile of Energy Metabolism in a Murine Hybridoma: Glucose ad Glutamine Utilization. Journal of Cellular Physiology, 161, 71-76.

PHILIPSON, L., PETTERSSON, U., LINDBERG, U., TIBBETTS, C., VENNSTROM, B., and PERSSON, T. (1975). RNA Synthesis and Processing in

adenovirus infected cells. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 39, 447-456.

PINA, M., and GREEN, M. (1969). Biochemical Studies on Adenovirus Multiplication. XLV . Macromolecule and Enzyme Synthesis in Cells Replicating Oncogenic and Nononcogenic Human Adenovirus. Virology, 38, 573-586.

PISSARRA, P. D. N., and HENRIKSEN, C. M. (1998). Fluxmap. A Visual Environment for Metabolic Flux Analysis of Biochemical Pathways. Computer Applications in Biotechnology, T. Yoshida and S. Shioya, Osaka, Japan.

SALWAY, J. G. (1994). Metabolism at a Glance, 1st Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

SAVINELL, J. M., and PALSSON, B. O. (1992). Optimal Selection of Metabolic Fluxes for in vivo Measurements. 1. Development of Mathematical Methods. Journal of Theoretical Biology, 155, 201-214.

SCHMID, G., and KELLER, T. (1992). Monitoring Hybridoma Metabolism in Continuous Suspension Culture at the Intracellular Level. Cytotechnology, 9, 217-229.

SCHMIDT, K., MARX, A., DE GRAAF, A. A., WIECHER, W., SAHM, H., NIELSON, J., and VILLADSEN, J. (1998). ^{13}C Tracer Experiments and Metabolite Balancing for Metabolic Flux Analysis: Comparing Two Approaches. Biotechnology and Bioengineering, 58, 254-257.

SIEGWART, P., MALE, K., CÔTÉ, J., LUONG, J. H. T., PERRIER, M., and KAMEN, A. (1999). Adaptative Control at Low-Level Glucose Concentration to Study HEK-293 Cell Metabolism in Serum-Free Cultures. Biotechnology Progress, 15, 608-615 .

TAKIGUCHI, N., SHIMIZU, H., and SHIOYA, S. (1997). An On-Line Physiological State Recognition System for the Lysine Fermentation Process Based On a Metabolic Reaction Model. Biotechnology and Bioengineering, 55, 170-181.

TRAPNELL, B. C. (1993). Adenoviral Vectors for Gene Transfer. Advanced Drug Delivery Reviews, 12, 185-199.

TRAPNELL, B. C., and GORZIGLIA, M. (1994). Gene Therapy Using Adenoviral Vectors. Current Opinion in Biotechnology, 5, 617-625.

WHITE, D. O., SCHARF, M. D., and MAIZEL, J. V. (1969). The Polypeptides of Adenovirus III. Synthesis in Infected Cells. Virology, 3, 395-406.

WIGAND, R., and KUMEL, G. (1978). Amino acid Requirement of Adenovirus Multiplication. Journal of General Virology, 39, 281-292.

XIE, L., and WANG, D. I. C. (1994). Applications of Improved Stoichiometric Model in Medium Design and Fed-Batch Cultivation of Animal Cells in Bioreactor. Cytotechnology,15, 17-29.

XIE, L. Z., and WANG, D. I. C.1994. Stoechiometric Analysis of Animal Cell Growth and Its Application in Medium Design. Biotechnology and Bioengineering, 43, 1164-1174.

CHAPITRE V : MODÈLE MÉTABOLIQUE C

5.1 Élaboration du modèle.

5.1.1 Ajout de la voie des pentoses phosphates.

Plusieurs auteurs estiment que la voie des pentoses phosphates (PP) est importante dans l'élaboration d'un modèle métabolique. En effet, ce cycle génère beaucoup de NADPH, un composant énergétique important. Dès lors, lorsqu'on utilise un bilan de matière sur le NADH et le NADPH, il est important de considérer ce cycle. Certains auteurs (Nyberg et col., 1999) ne considèrent pas cette voie métabolique, car ils obtiennent une matrice très mal conditionnée (cond=535) tandis que lorsque cette voie circulaire est omise, ils obtiennent alors un conditionnement de 69.

En effet, dans ce cas aussi, lorsqu'on ajoute la voie des pentoses phosphates au modèle, on obtient une matrice très mal conditionnée. Afin de réduire le conditionnement de la matrice, il faut donc mesurer certains flux directement. Pour cette nouvelle matrice, on a scindé F1, le flux de la glycolyse, en F1a, F1b et F1cd et F14, la voie vers le rib-5-P en F14a et F14b, complétant ainsi le cycle des

pentoses-phosphates. On ajoute également trois composés soit le fructose-6-P, le glycéraldéhyde-P et le xylulose-5-P.

5.1.2 Compartimentation.

Afin d'avoir le modèle le plus complet, plusieurs auteurs suggèrent qu'il faut inclure la compartimentation entre la mitochondrie et le cytoplasme dans les modèles métaboliques. On a donc considéré l'incorporation de certains composés dans la mitochondrie, soit le pyruvate (F3tr), le malate (F10tr), l'α-cétoglutarate (F10tr), la glutamine (F8tr), le glutamate (F6tr) et l'aspartate (F6tr). Également, on considère que pour chaque malate qui entre dans la mitochondrie, on a un α-cétoglutarate qui sort et pour chaque glutamate qui entre, on a un aspartate qui sort. Également, on considère que les réactions F3, F8, F30 à F35 ont lieu à l'intérieur de la mitochondrie. Finalement, on considère un flux réactionnel de plus faisant partie de la navette malate-aspartate, il s'agit de la réaction de l'oxaloacétate mitochondrial en aspartate mithocondrial (F6mit). La figure 5.1 montre le détail des modifications effectuées sur le modèle.

On obtient maintenant une matrice de dimension 46X43 avec un conditionnement de 623 à cause du cycle des pentoses phosphates. Si on mesure

le cycle des pentoses phosphates, soit F14a, on réduit considérablement le conditionnement de la matrice à 68.

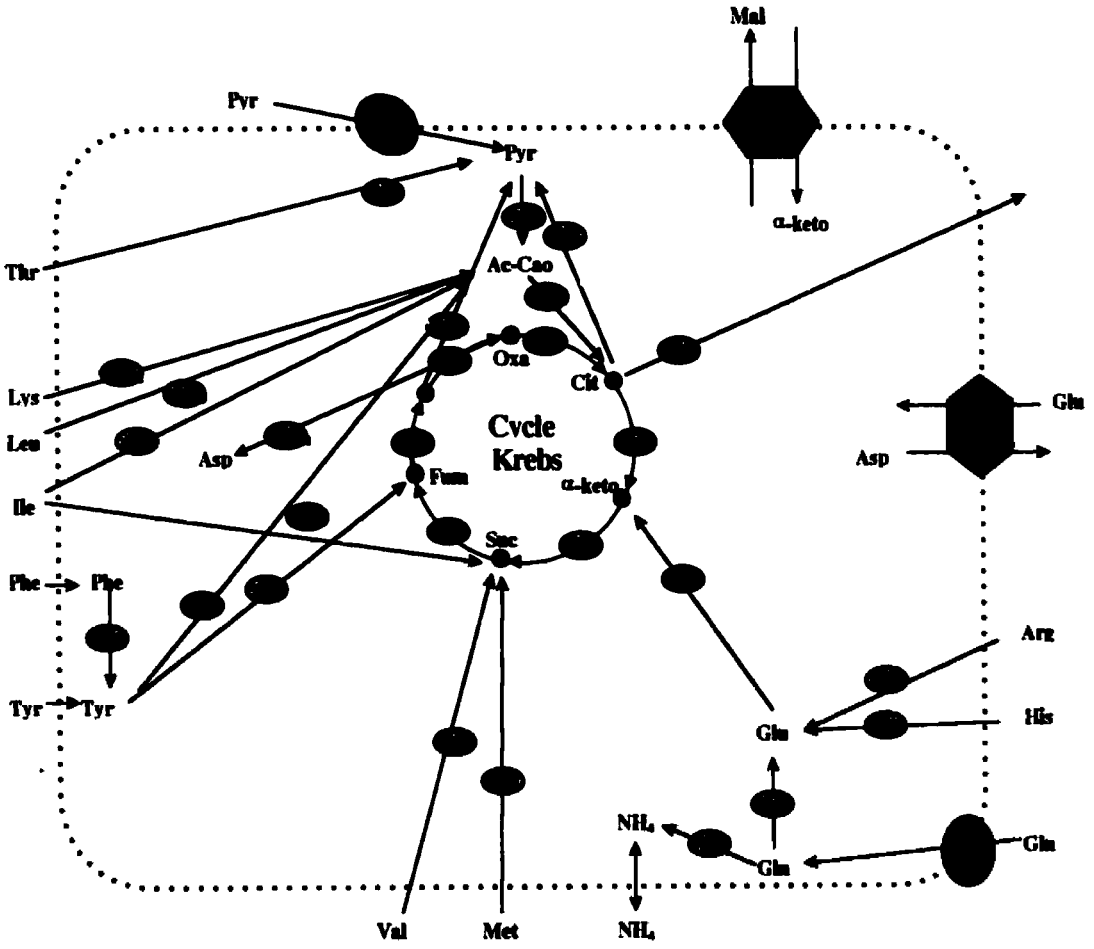


Figure 5.1 Flux de compartimentation

5.1.3 Analyse de sensibilité.

Tableau 5.1 Erreur relative moyenne maximale sur les flux métaboliques lors d'une variation de 10% sur une mesure.

	Modèle avec cycle des pentoses-phosphates et compartimentation.	
	Croissance	Infection
Glucose	1,638,70	2,716,69
Lactate	1,470,74	2,202,44
Sérine	144,76	22,43
Glycine	21,78	3,82
Alanine	205,85	54,21
Aspartate	3,30	0,40
Asparagine	246,13	120,61
Glutamine	908,92	309,40
Glutamate	10,20	6,12
Membrane	154,04	204,55
ADN/ARN	145,56	37,94
Protéines	374,24	231,58
Protéines extracellulaires	663,99	302,22
Thréonine	62,60	21,34
Phénylalaline	17,95	10,73
Tyrosine	20,72	10,72
Valine	59,14	20,77
Méthionine	5,72	77,53
Arginine	145,68	96,42
Histidine	94,76	34,28
Lysine	235,30	228,26
Leucine	60,91	38,85
Isoleucine	61,43	31,45
NH3	180,04	91,51
O2	463,92	272,84
F14a	13,22	6,27

Pour les modèles avec le cycle des pentoses-phosphates, l'analyse démontre une sensibilité semblable aux modèles précédents. Il n'y a presque pas d'erreurs sur les mesures de la de la glycine, de l'aspartate, du glutamate, de la phénylalanine, de la tyrosine, mais on retrouve possibilité d'erreurs plus grande sur le glucose, le lactate, la glutamine, les protéines, la lysine et l'oxygène. Le flux F_{14a} n'est pas mesuré à chaque fois, mais constitue une moyenne sur plusieurs mesures effectuées avec le glucose marqué. Également, il n'est pas possible d'aller chercher avec précision la valeur de ce flux mais nous avons une fenêtre de validité (voir la section suivante pour plus de détail). Cependant l'analyse de sensibilité démontre qu'une erreur de 10% sur l'estimation du flux F_{14a} peut engendrer une erreur moyenne de 6 à 13% au maximum, ce qui reste raisonnable. Dès lors on pourra se fier à l'estimation de ce flux par la mesure au ^{14}C-glucose, explicitée dans la section suivante. Il s'agit là du modèle le plus complet développé dans le cadre de ce travail et servira de base pour le calcul des flux métaboliques dans la prochaine section.

5.2 Effet d'un milieu pauvre en protéines sur le métabolisme central de la cellule 293SF pendant la croissance et l'infection avec un adénovirus.

Cette section présente l'article intitulé ***Low-Protein Medium Affects the 293SF Central Metabolism during Growth and Infection with Adenovirus***. Cet article a été soumis à la revue ***Biotechnology and Bioengineering***. Dans cet article, nous étudions le métabolisme de la cellule 293SF en milieu sans sérum ainsi que dans un milieu pauvre en protéines. Différentes stratégies d'alimentation ont été évaluées telles une croissance et infection en mode cuvée avec ajouts de nutriments ainsi qu'une croissance et infection en mode cuvée alimentée. Avec le modèle développé à la section précédente, nous avons été en mesure de calculer la production d'ATP théorique. Des différences notables ont été observées entre les différents milieux au niveau du métabolisme cellulaire. La consommation de glucose s'est avérée plus optimale dans le milieu pauvre en protéines, et on observe une plus grande entrée dans le cycle de Krebs. Également, on observe une plus faible consommation de glutamine et d'acides aminés, ainsi qu'une plus faible production de lactate. Conséquemment, nous observons un titre viral jusqu'à trois fois plus grand dans le milieu faible en protéines comparé au milieu sans sérum.

Low-Protein Medium Affects the 293SF Central Metabolism during Growth and Infection with Adenovirus.

I. Nadeau,[1,2] P.A. Gilbert,[1] D. Jacob, [1] M. Perrier,[2] A. Kamen[1]

[1]Institut de recherche en biotechnologie, CNRC, 6100 avenue Royalmount, Montréal, Québec H4P 2R2, Canada; [2]École polytechnique de Montréal, Campus de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

In this study, the metabolism of the 293SF cells grown in serum-free and low-protein medium was analyzed. This cell line is known for its ability to replicate recombinant adenovirus, mainly used in gene therapy applications. A complete model composed of the main glycolytic, glutaminolytic, amino acids pathways, as well as the internalization fluxes of certain compounds into the mitochondria is used for metabolic flux calculations. The pentose-phosphate cycle is also added to the biochemical reactions set and was measured externally with labelled ^{14}C-glucose. Different feeding strategies in two different media, were analyzed with the model and the theoretical ATP production was also calculated. The two media were similar in their glucose and amino acids–composition, but one contained BSA at 1g/l while the other one had a very low protein content.

In the low-protein medium, glucose utilization was more efficient, as it enters the TCA cycle more efficiently. Also, lower glutamine and amino acids consumption were observed as well as lower lactate and ammonia production. This increased TCA activity led to a twofold more ATP production in the low-protein medium, which resulted in up to threefold higher adenoviral vector production.

However at cell densities in the range of $2x10^6$ cells/ml, limitations and/or inhibitions occur during growth as can be seen by the impaired ATP level at infection time. Therefore, fed-batch started early during the growth phase is suggested in order to keep a high metabolic activity during growth and infection.

Low-protein medium effect on 293SF metabolism. A. Kamen; Biotechnology Research Institute, 6100 Royalmount, Montréal, Québec, H4P 2R2, Canada, phone: (514) 496-2264; fax: (514) 496-6785; Amine.kamen@nrc.ca

Introduction

The 293 cell line adapted to suspension, is the complementary cell line mainly used for the production of recombinant adenoviruses. First generation recombinant adenoviruses cannot replicate in normal cells but only in 293 cells containing the adenovirus E1 replicative-essential region. These recombinant adenoviruses are used in 18% of the gene therapy clinical trials. Twelve different genes are being transferred with this vector for the treatment of certain cancers, while, currently, only two are used for the treatment of monogenic diseases.

This 293 cell line was adapted to growth in serum-free medium and the 293SF-3F6 clone was isolated. The serum-free medium simplifies purification processes and reduces batch to batch variations. Also, it circumvents immunogenicity associated with the use of serum supplemented media (Côté et al., 1998). In order to improve the adenovirus production with this cell line, a fed-batch process must be developed to operate high cell density cultures while minimizing operational complexity. Previous studies with 293S cells in suspension, with medium containing 5% serum, have demonstrated that addition of glucose and amino acids permitted infection up to $3x10^6$ cells/ml cell density. The maximum titer reached in that medium was in the range of 2000 pfu/ml (Garnier et al., 1994; Nadeau et al., 1996). In a serum-free medium (LC-SFM), it was first shown

that the titers were lower than with the previous media, reaching levels in the range of 500 pfu/ml in batch cultures (Nadeau et al., 2000). These low titers were associated with an early decrease in infected cell viability. Here we present results obtained in a proprietary formulation low-protein medium (NSFM13) in which recombinant adenovirus titers reach 1500-2000 pfu/ml, using a fed-batch process started during growth and extended during the infection phase.

Metabolic flux analysis is a useful tool that permits the evaluation of biochemical rates inside the cell on the basis of mass-balancing techniques and ^{14}C experiments. The metabolic model involves 43 fluxes, which include the catabolism pathways of glucose, glutamine and 17 amino acids as well as the pentose-phosphate cycle and compartmentalization between the mitochondria and the cytosol. In this report, metabolic flux analysis is used to evaluate the effect of different media (LC-SFM versus NSFM13) and different culture conditions, batch versus fed-batch, low ($1x10^6$ cells/ml) versus high ($2x10^6$ cells/ml) cell density at infection, on the cell's central metabolism and energy level during growth but most importantly during the infection phase.

Material and Methods

Cells and Virus

The 293SF-3F6 (293SF) cells were derived from human kidney fibroblasts transformed with Ad5 DNA and expressing the E1A and E1B proteins constitutively (Graham et al., 1977). The 293SF cells were obtained by adapting 293S cells in serum-free medium (Côté et al., 1998). The 293SF cells were maintained in a 50 ml shake flask at 37°C and 7% CO_2, by diluting twice weekly to cell densities of 1 to $2x10^5$ cells/ml with the medium described herein. After 3 months of sub-culturing, the cells are discarded and a new aliquot is thawed.

The adenovirus used for infection, was an adenovirus type 5 containing the Green Fluorescence Protein (GFP), under the control of the CMV promoter (Ad5 GFPq). The viral stock titer was $7.5x10^{12}$ pfu/ml.

Bioreactor

The cultures were performed in a Chemap CF2000 (Mannedorf, Switzerland) 3.5 L bioreactor and 20 L bioreactor for the low-glucose fed-batch. The 20 L culture conditions with low glucose fed-batch are described elsewhere (Siegwart et al., 1999). For the 3.5 L, the vessel is equipped with four surface baffles and two

marine impellers. The temperature is maintained at 37°C with a water jacket. Dissolved oxygen, pH and fluorescence probes were mounted for monitoring and control purposes. The pH was controlled at 7.1 by intermittent addition of 1 M NaOH or $NaHCO_3$. DO was controlled at 30% air saturation and the vessel was fed with air and 10% CO_2 . The fluorescence probe is described elsewhere (Gilbert et al., 2000). The control was operated with a PI and mass flow controller programmed on FIX MMI software (Intellution, Norwood MA). On-line data acquisition was also performed with the same software for O_2, CO_2 out, pH and fluorescence signal.

Medium and cell culture conditions

Low calcium serum-free medium (LC-SFM) was prepared from H-SFM (Gibco, Grand Island, NY). The medium was completed with 0.1% (v/v) lipids (Gibco), 0.1% (v/v) BSA (Intergen Company, Purchase, NY) and 0.1% (v/v) Pluronic F-68 (Gibco, Grand Island, NY). Low-protein NSFM13 is a serum-free proprietary formulation.

Table 5.2 describes the different culture and infection conditions analyzed in this paper. For the pulse addition at 24 hrs after infection a mixture of 1X MEM amino acids, 4 mM glutamine and 25 mM of glucose was supplemented. For the

fed-batches in LC-SFM, a mixture of 50 ml glutamine at 400 mM (Sigma, St-Louis, MO), 25 ml glucose at 300 g/L (Sigma) and 150 ml MEM amino acids (Gibco) was used. For the fed-batches in NSFM13, a mixture of 45 ml glutamine at 300 mM (Sigma, St-Louis, MO), 23 ml glucose at 600 g/L (Sigma) and 135 ml MEM amino acids (Gibco) was used. The rate of addition is set constant to 0.03-0.04 ml/min. For the low glucose fed-batch, the process is described elsewhere (Siegwart et al., 1999).

Cells were inoculated at around $0.3x10^6$ cells/ml from two 500 ml shake flasks in which the cell density was around $1x10^6$ cells/ml. The cells were centrifuged and resuspended in fresh medium before inoculation of the bioreactor. Samples were taken every 6 to 9 hours.

For the batch infection (LC-SFM/Batch), the cells were harvested and centrifuged to replace the medium with fresh LC-SFM and the virus was added at the same time. For the fed-batch infection experiments, the virus was added to the culture in 100 ml fresh LC-SFM or NSFM13 medium. The MOI used was 10 in all the experiments.

Table 5.2 Growth and infection experiment conditions

	Growth experiment			
	LC-SFM/Batch	LC-SFM/Batch2	LC-SFM/Fed-Batch LG	NSFM13/ Batch
Medium	LC-SFM	LC-SFM	LC-SFM	NSFM13
Operation	Batch	Batch	Fed-batch	Batch/Fed-Batch
Addition	None	None	Glucose 1mM	AA/glc/gln at 25 h
	Infection experiment			
Name	LC-SFM/BR (Batch recovery)	LC-SFM/Fed-Batch	NSFM13/Fed-Batch	NSFM13/Fed-Batch HD
Medium	LC-SFM	LC-SFM	NSFM13	NSFM13
Operation	Medium renewal at infection	Fed-batch	Fed-batch	Fed-batch
Additions	Pulse AA/glc/gln at 24hrs	AA/glc/gln	AA/glc/gln	AA/glc/gln
Cell density at infection	$1x10^6$ cells/ml	$1x10^6$ cells/ml	$1x10^6$ cells/ml	$2x10^6$ cells/ml

Analytical methods

Viable and total cells were counted using a haemacytometer (Hausser Scientific, Horshaw, PA). Viability was assessed by the dye exclusion method using erythrosine B. For DNA analysis, the procedure was as follows. First a sodium citrate buffer was prepared (SSC 20X) with 175.3 g/L NaCl and 88.2 g/L trisodium citrate. The pH was adjusted to 7.0. Approximately $1x10^6$ cells were disrupted in SSC 1X/0.4% v/v Sodium dodecyl sulfate (SDS) for 10 min at 37°C.

Thereafter, 5ml SSC 1X was added. The samples were also sonicated lightly. 10 µL of each sample were then distributed in triplicates in a 96 well plate, 90 µL of SSC 1X was added as well as 100 µL of 1 mg/ml Hoescht 33258. The plaque was read in a fluorometer at absorbing and emitting wavelenghts of 360 nm and 460 nm respectively. The standard curve was made from a stock solution of herring sperm DNA at 1 mg/ml (Sigma) and diluted in SSC 1X ranging from 50 to 3.12 µg/ml. 10 µL of one sample was added to the standards in order to mimic the sample conditions. For the dry weight estimation, approximately $1x10^8$ cells were pelleted in a pre-weighted 1.5 ml tube. The pellet was dried in an oven at 60°C for about 48 hours or until the weight remained constant (Xie and Wang, 1994). Extracellular proteins were assayed using the DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA). Total proteins were analyzed using the BCA kit (Pierce, Rockford, IL). Prior to the analysis the pellet containing $1x10^6$ cells was disrupted using the following buffer: 0.5% Triton X-100 and 1 mM EDTA. The Biolyzer (Kodak, New Haven, Connecticut) was used for the analysis of glucose, lactate and ammonia. The virus titer was assayed as follows: $1x10^6$ 293S cells were distributed in each well of the 6 well plate, with 1 ml fresh DMEM without calcium and 5% BCS (Hyclone, Logan, UT). The virus was released with three freeze-thaw cycles and diluted in fresh medium. 25 µl of the dilutions were added to the wells. Incubation was held 20 hours with agitation. The cell pellet was resuspended in 500 µl PBS and fixed by adding 500 µl 4% formaldehyde at 4°C for 30 min.

Percentage of fluorescent cells was counted with Flow Cytometry (FACS). One fluorescent cell corresponds to one infectious particle (IVP) when less than 30% of cells were fluorescent (Côté et al., 1997).

Metabolic model

The metabolic model used in this study involves 43 fluxes. The model was developed from a model discussed in a previous article (Nadeau et al., 2000a; Nadeau et al., 2000b). Glycolysis, glutaminolysis, amino acid degradation, TCA cycle, protein production and internalization were considered as well as the pentose-phosphate cycle and compartmentalization of certain nutrients. Table 5.2 shows the biochemical reactions used in the model and figure 5.3 shows the reactions that occur in the mitochondria. It is assumed that the amino acids enter the mitochondria and react there. Some components can be transported in and out of the mitochondria and are involved in biochemical reactions in the cytosol and mitochondria. These transport fluxes were incorporated in the model and are for these nutrients: pyruvate (F3tr), glutamine (F8tr), glutamate and aspartate (F6tr), α-ketoglutarate and malate (F10tr). These two last sets are actually reversibly co-transported into the mitochondria. F6 was also considered to be both a cytosolic and mitochondrial reaction.

In order to obtain a complete model, the pentose-phophate cycle was added. This cycle leads to a poorly conditioned matrix : 623. Therefore, one measurement must be added, F14a, the pathway of glucose to Rib-5-P. We then obtain a matrix of 68, which is acceptable for flux calculation. This measurement was obtained with ^{14}C-glucose measurement and is further explained in the section : ^{14}C experiments. Therefore glycolysis was separated in three reactions: F1a, F1b and F1cd and the pentose-phosphate cycle is composed of two reactions F14a and F14b. The biochemical reactions set considered are listed in table 5.3.

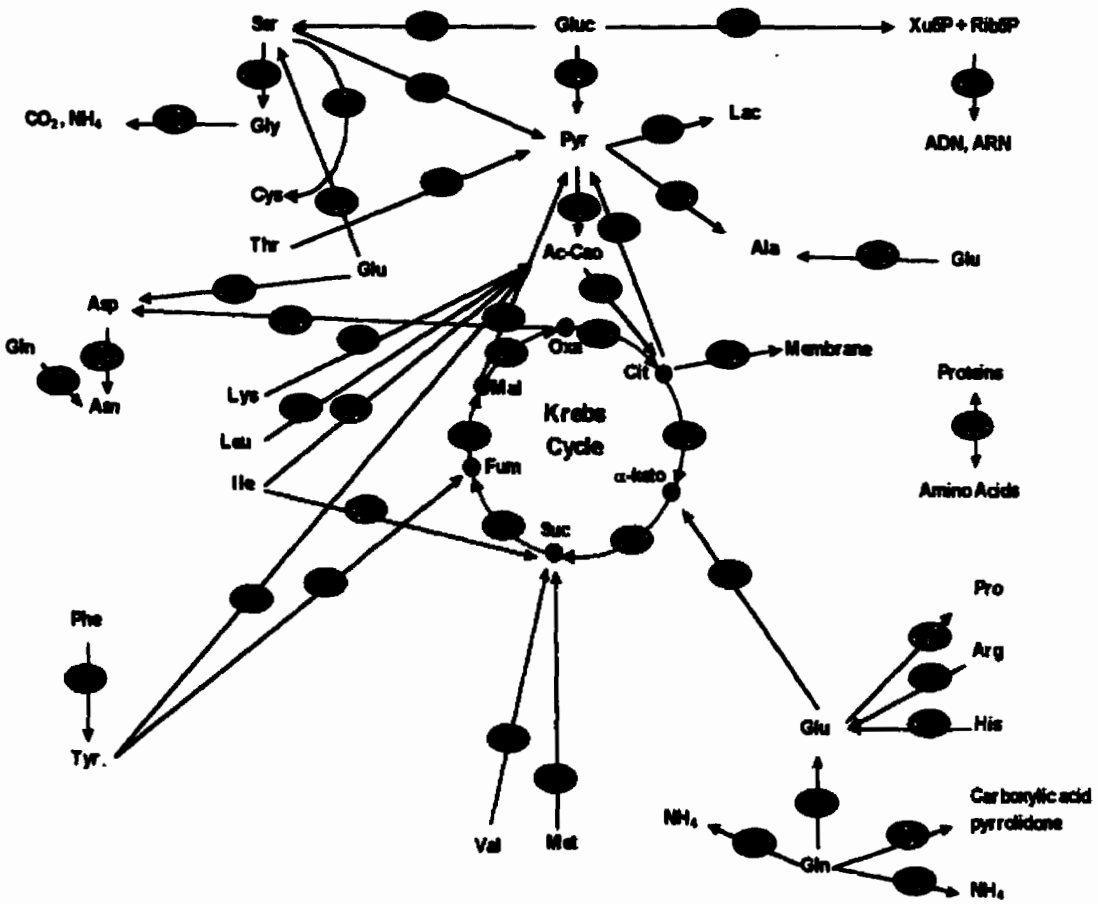


Figure 5.2 Metabolic network. α-Keto, α-Ketoglutarate; Ac-CoA, Acetyl-CoA; AcOle, Oleic acid; Arg, arginine; Asn, asparagine; Asp, aspartate; Cit, citrate; Cte, cysteine; Fum, fumarate; Gluc, glucose; Gln, glutamine; Glu, glutamate; Gly, glycine; His, histidine; Ile, isoleucine; Lac, lactate; Leu, leucine; Lys, lysine; Mal, malate; Met, methionine; Oxa, oxaloacetate; Phe, phenylalanine; Pro, proline; Pyr, pyruvate; Rib5P, ribose-5-P; Ser, serine; SucCoA, succinyl-CoA; Thr, threonine; Tyr, tyrosine; Val, valine; Xu5P, xilulose-5-P.

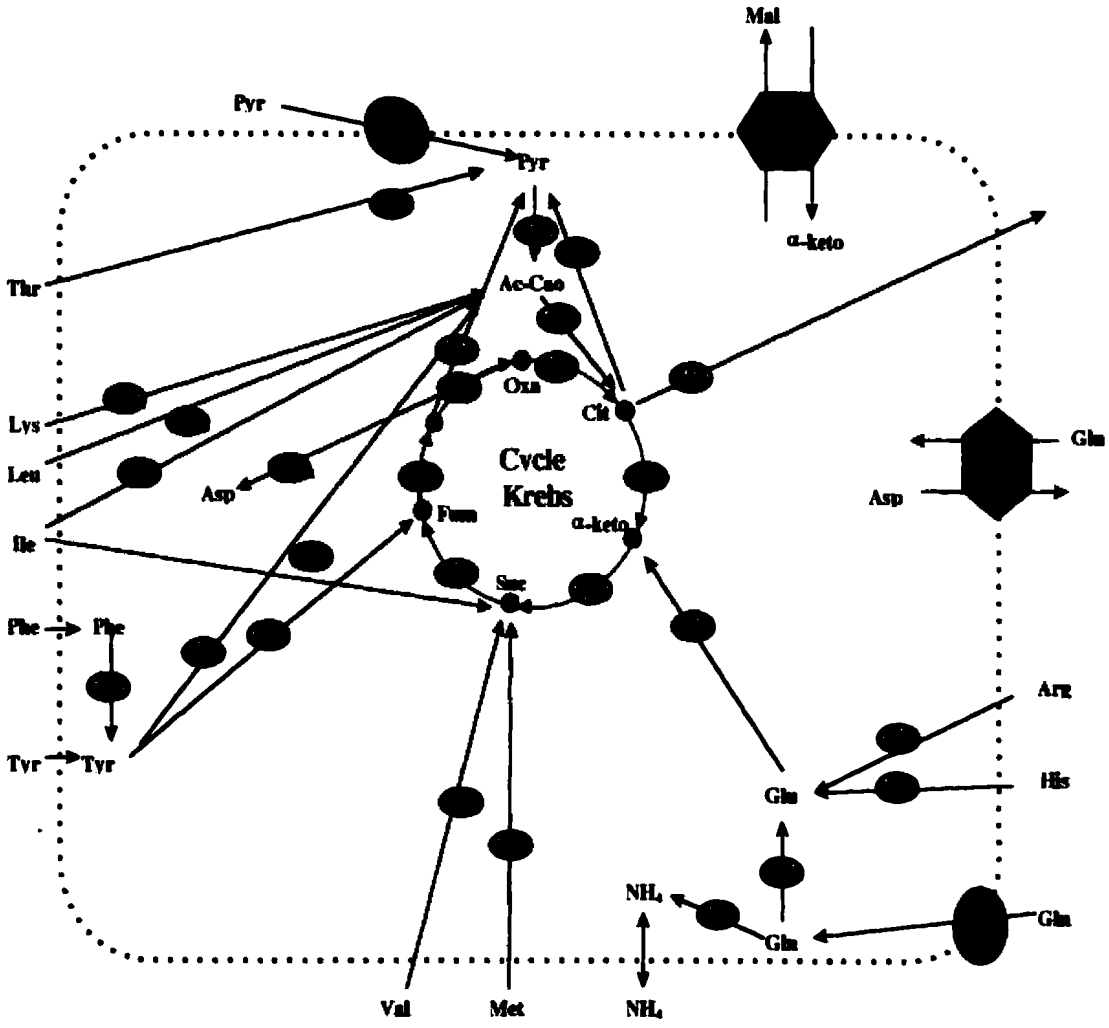


Figure 5.3 Metabolic network in mitochondria.

Table 5.3 Biochemical reactions

F_{1a} $GLC + ATP \Rightarrow FRUC\ 6P$

F_{1b} $FRUCT\ 6P + ATP \Rightarrow 2GAP$

F_{1c} $GAP \Leftrightarrow PYR + 2ATP + NADH + H^{+}$

F_{2} $PYR + NADH + H^{+} \Leftrightarrow LAC$

F_{3} $PYR + CoA \Rightarrow ACCoA + NADH + CO_2 + H^{+}$

F_{4} $PYR + GLU \Leftrightarrow ALA + \alpha - KETO$

F_{5} $GLU \Leftrightarrow \alpha - KETO + NADH + NH_4$

F_{6} $OXA + GLU \Leftrightarrow ASP + \alpha - KETO$

F_{7} $GAP + GLU \Rightarrow SER + \alpha - KETO + NADH$

F_{8} $GLN + H_2O \Rightarrow GLU + NH_4^{+}$

F_{9} $2GLN + \frac{1}{4} ASP + RIB\ 5P + \frac{1}{2} GLY + 6\frac{1}{4} ATP + \frac{1}{4} NADPH \Rightarrow$
$ADN\ /\ ARN + \frac{1}{4} NADH + \frac{1}{4} FUM + 2GLU$

F_{10a} $MAL \Rightarrow PYR + CO_2 + NADPH + H^{+}$

F_{10c} $PYR + ATP + CO_2 \Rightarrow OXA + H^{+}$

F_{11} $ASP + GLN + ATP \Leftrightarrow ASN + GLU$

F_{12} $GLU + ATP + 2NADPH + 2H^{+} \Rightarrow PRO$

F_{13} $SER \Leftrightarrow GLY$

F_{14a} $GLC\ 6P + ATP \Rightarrow \frac{1}{3} Rib\ 5P + \frac{1}{3} Xu\ 5P + 2NADPH + H^{+} + CO_2$

F_{14b} $R5P + 2Xu\ 5P \Leftrightarrow 2F6P + GAP$

F_{16} $2 \times (9CIT + 17ATP + 9CoA + 16NADPH) \Rightarrow AcOLE + 18OXA$

F_{17} $SER \Rightarrow PYR + NH_3$

F_{18b} $THR \Rightarrow CO_2 + 2NADH + 2H^{+} + FADH_2 + NH_4 + PYR$

F_{19} $GLY \Leftrightarrow CO_2 + NH_4 + NADH + H^{+}$

F_{22a} $LYS + 2\alpha - KETO + NADPH \Rightarrow 2ACCoA + 2CO_2 + 4NADH + 3H^{+} + FADH_2 + 2GLU$

F_{22b} $LEU + \alpha - KETO + ATP \Rightarrow 3ACCoA + GLU + CO_2 + NADH + H^{+} + FADH_2$

F_{23} $ILE + \alpha - KETO + ATP \Rightarrow SUCCoA + ACCoA + CO_2 + 2NADH + 2H^{+} + FADH_2 + GLU$

F_{24} $VAL + \alpha - KETO + ATP \Rightarrow SUCCoA + 3NADH + H^{+} + FADH_2 + 2CO_2 + GLU$

F_{25} $MET + SER + 2ATP \Rightarrow CTE + SUCCoA + NADH + H^{+} + CO_2 + NH_3$

F_{26} $PHE + O_2 + NADPH + H^{+} \Rightarrow TYR$

F_{27} $TYR + \alpha - KETO + 2O_2 \Rightarrow FUM + 2ACCoA + GLU$

F_{28} $ARG + \alpha - CETO \Rightarrow 2GLU + NADH + H^{+} + urea$

F_{29} $HIS \Rightarrow GLU + NH_3$

F_{30} $OXA + ACCoA \Rightarrow CIT$

F_{31} $CIT \Rightarrow \alpha - CETO + CO_2 + NADPH + H^{+}$

F_{32} $\alpha - CETO \Rightarrow SUCCoA + NADH + H^{+} + CO_2$

F_{33} $SUCCoA \Rightarrow FUM + ATP + FADH_2$

F_{34} $FUM \Leftrightarrow MAL$

F_{35} $MAL \Leftrightarrow OXA + NADH + H^{+}$

F_{37} $NADH + 0.5O_2 \Rightarrow 3ATP$

Cellular composition in amino acids, lipids and RNA are constant over the percentage dry weight and were taken respectively as : serine : 7.2 ; glycine : 12.2 ; alanine : 7.6 ; aspartate :2.6 ; asparagine : 2.7 ; glutamine : 6.9 ; glutamate : 7.0 ; threonine : 4.8 ; phenylalanine : 3.5 ; tyrosine : 1.7 ; valine : 3.3 ; methionine : 1.0 ; arginine : 5.4 ; histidine : 2.2 ; lysine : 9.3 ; leucine : 8.2 ; isoleucine : 2.5 ; lipids : 24.7 ; RNA : 13.2. The dry weight and DNA were measured in each experiment according to the method described above. qCO_2 was also evaluated according to the method described in a previous article (Nadeau et al., 2000a). Metabolic flux calculations were detailed in a previous paper (Nadeau et al., 2000a) and are summarized below :

$$F = pseudoinverse(K) \bullet (Q - P) \qquad (1)$$

where K is the 47X43 matrix of stoichiometry coefficients, F the vector of 43 fluxes, and $-Q+P$ represents the vector of the specific consumption and production rate of metabolites as well as the biosynthetic reactions.

This complete model allowed for the calculation of the ATP flux. It is calculated according to the following equation:

ATP=3xF37+F33+2xF1cd+ (2)

(2xF25+F24+F23+F22b+34xF16+F12+0.33xF10+6.75xF9+F1a+F1b)

We consider that $FADH_2$ oxidation produces 2ATP while NADH/NADPH produces 3ATP.

Sensitivity analysis and estimation of gross error

Sensitivity analysis is used to investigate which are the measurements that require a good precision. For each 10% variation on a measurement, the mean relative error over all the fluxes, and this for every time point, was calculated. Then, the maximum relative error was sorted over all the time points and compiled in the result section.

In order to see if the measured data did not contain any flaws, a mass balance on nitrogen was used to evaluate if there was no gross error that could lead to flux miscalculations. We then used the method describes in Wang and Stephanopoulos (1983) and Bonarius et al. (1998)

$$h = \varepsilon^T \phi^{-1} \varepsilon \qquad (3)$$

where ϕ is a square matrix of the measurement errors and h follows a χ^2 distribution with 1 degree of liberty. In order to obtain a 90% probability that there is no gross error in the measurements, h must be inferior or equal to 2.71.

^{14}C measurements.

We consider that the 6-^{14}C from 6-^{14}C-glucose is metabolized through glycolysis or via the pentose-phosphate pathway and then enters the TCA cycle where it is converted to $^{14}CO_2$, therefore giving a direct measurement of this cycle. On the other hand, the 1-^{14}C in the 1-^{14}C-glucose can be metabolized to $^{14}CO_2$ immediately in the pentose-phosphate cycle or it can go through glycolysis and be evacuated in the TCA cycle. Then, $^{14}CO_2$ is rapidly formed from 1-^{14}C-glucose going through the pentose-phosphate cycle. Afterwards, 6-^{14}C passing through the pentose-phosphate cycle will be evacuated in the form of $^{14}CO_2$ in the TCA cycle as well as 1-^{14}C coming from glycolysis. Therefore Larrabee (1989) suggests these two expressions as the maximal and minimum rates of metabolization through the pentose-phophate cycle (PP).

$$PP \leq (1)CO_2 \text{ and } PP \geq (1)CO_2 - (6)CO_2 \qquad (4)$$

The method used here was adapted from Fitzpatrick et al. (1993). Non-infected and infected cell suspensions at approximately $1x10^6$ cells/ml were used. Cells for the growth experiments had medium renewal 12 hours before spiking with the labelled substrate while cells for the infection experiments had medium renewal and infection at an MOI of 10, also 12 hours before spiking. A 20 ml suspension is distributed in 100 ml vials (Supelco, Bellefonte, PA), 10 vials maximum per essay. Each vial contains a 5ml essay tube with 1 ml KOH 1N. Vials are sealed with a mininert valve with a septum (Supelco). The radioactive substrate is then added. For the glucose labelling experiments 5 vials are supplemented with 1-^{14}C-glucose and the 5 others with 6-^{14}C-glucose with a 0.45 µCi dose in each vial. The vials are agitated at 100 rpm and incubated at 37°C. Every hour cell activity is stopped by adding 10% (w/v) tricarboxylic acid with a syringe. Then the vials are agitated for one hour to let the CO_2 completely absorb in the KOH solution. This solution is then counted for radioactivity and represents the amount of glucose, which was metabolized.

The same procedure was done with ^{14}U-glutamine, except that we had only one labelled species and that one mole of glutamine is a source of five $^{14}CO_2$ if fully metabolized in the TCA cycle.

Results and Discussion

Sensitivity analysis and estimation of gross error

Table 5.4 Maximum mean relative error over time on metabolic flux calculations when a 10% variation is processed on a measure.

	Model with compartimentalization	
	Growth	Infection
Glucose	1,638.70	2,716.69
Lactate	1,470.74	2,202.44
Serine	144.76	22.43
Glycine	21.78	3.82
Alanine	205.85	54.21
Aspartate	3.30	0.40
Asparagine	246.13	120.61
Glutamine	908.92	309.40
Glutamate	10.20	6.12
Membrane	154.04	204.55
DNA/RNA	145.56	37.94
Proteins	374.24	231.58
Extracellular proteins	663.99	302.22
Threonine	62.60	21.34
Phenylalaline	17.95	10.73
Tyrosine	20.72	10.72
Valine	59.14	20.77
Methionine	5.72	77.53
Arginine	145.68	96.42
Histidine	94.76	34.28
Lysine	235.30	228.26
Leucine	60.91	38.85
Isoleucine	61.43	31.45
NH_3	180.04	91.51
O_2	463.92	272.84
F14a	13.22	6.27

With this model, the highest sensitivities are seen with the measurements of glucose and lactate, but also asparagine, glutamine, lysine, lipids, proteins, oxygen and to a lesser extent serine, alanine, arginine, DNA/RNA and ammonia. An error in the pentose-phosphate estimation pathway does not lead to high error allowing the use of the values measured in the ^{14}C-glucose experiments. Estimation of gross error is presented to verify confidence in the measurements.

In figure 5.4a, the value of the criteria *h* that was used for the estimation of gross error is shown. As it is detailed in the Materials and Methods section, this criteria must be smaller or equal to 2.71 in order to assess that we do not have gross error in the measurements up to a probability of 90%. From this analysis, some of the fluxes might contain flaws such as the LC-SFM/Batch 2 until 15 hours, the LC-SFM/Fed-Batch LG until 24 hours and the NSFM13/Fed-Batch during growth between 30 and 40 hours. In fact, this time span corresponds to the point where the fed-batch was started; therefore sampling inaccuracies might have been encountered then. Therefore, the LC-SFM fed-batch with low-glucose flux calculation at 20 hours (figure 5.4) might be slightly inaccurate. Otherwise, flux calculations are accurate and this is further assessed in figure 5.4b where a comparison of calculated and measured CO_2 is shown for the NSFM13/Fed-Batch during growth and throughout infection. The two curves are well fitted,

especially during the infection process where the CO_2 measurement is more accurate as CO_2 is not fed anymore to the bioreactor's head-space.

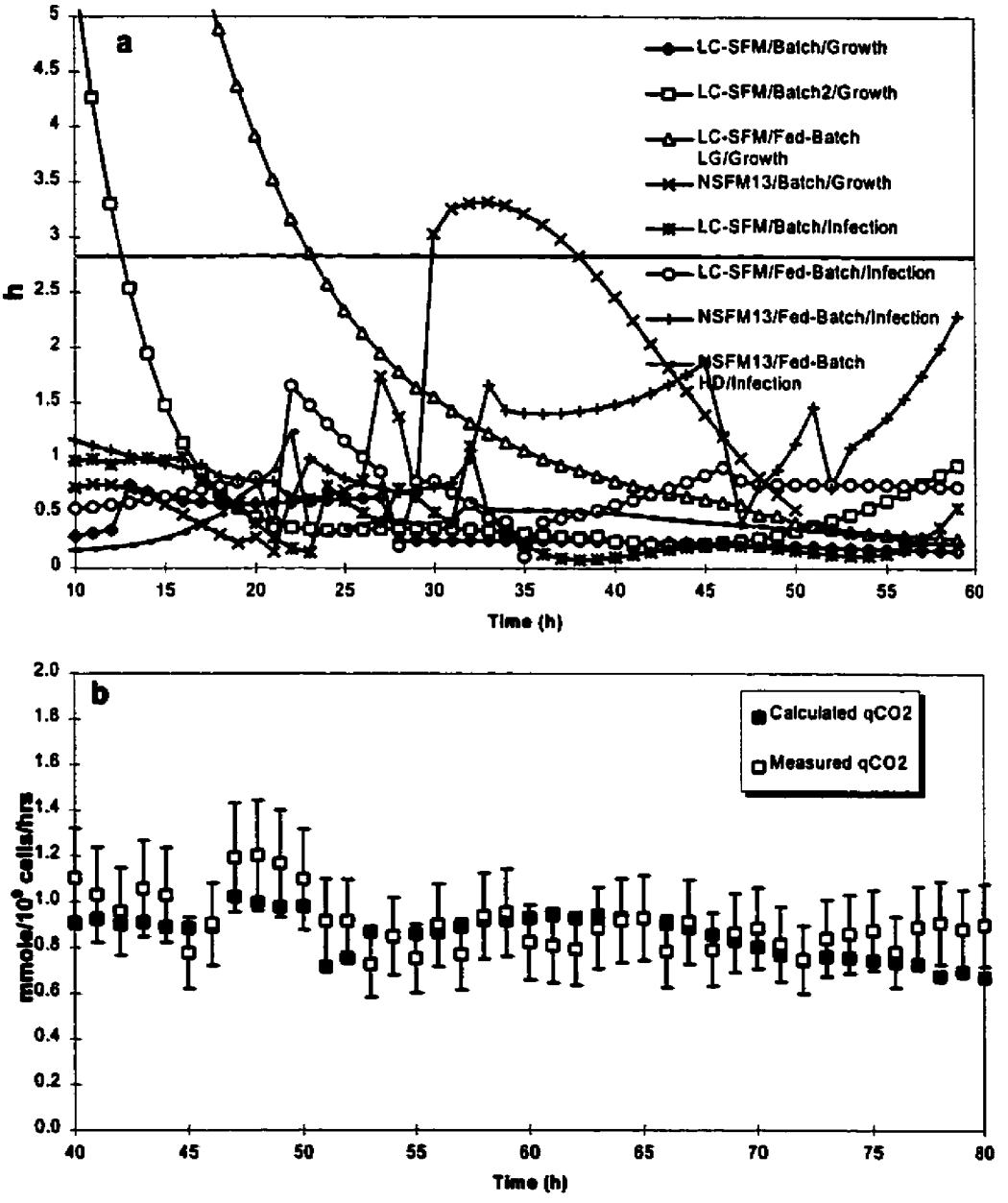


Figure 5.4 a) criteria h b) Calculated CO_2 versus measured CO_2 with the model

^{14}C experiments

Figure 5.5a presents the incorporation of labelled 1-^{14}C-glucose and 6-^{14}C-glucose into CO_2. Some samples were taken in duplicate and error bars are added to the data. Until 4 or 5 hours, after spiking with the labelled substrate, the slope remains linear. In table 5.5, we report the slopes in terms of specific rate of metabolization into CO_2 (nmole/10^6 cells/min) and also the percentage over the total glucose metabolized are reported. These data are compared to data from the literature.

Figure 5.5b presents the incorporation of labelled U-^{14}C-glutamine into CO_2. Here again samples were taken in duplicate and error bars were added. The incorporation is not as linear as with the glucose incorporation. This may be understandable since glutamine can release as much as 5 CO_2 as it undergoes several turns into the TCA cycle. Therefore, in table 5.5, we report the initial specific rate of metabolization at an incubation time of 100 min, assuming that glutamine had only time for one turn. Again here, it is reported in terms of specific rate of incorporation (nmole/10^6 cells/min) and also in terms of the percentage over the total glutamine metabolized.

Table 5.5 CO_2 evolution rate from labelled glucose and glutamine.

	293SF in LC-SFM				Hybridoma		Hybridoma	BHK serum/ serum-free
	Growth		Infection		Fitzpatrick (1993)		Petch (1993)	Neerman n (1996)
	%	nmole/10^6 cells/min	%	nmole/10^6 cells/min	%	nmole/10^6 cells/min	%	%
PPC-flux (max)	3.38	0.086	3.05	0.076	3.3	0.129	3.6	4.8/4.9
PPC-flux (min)	3.12	0.079	2.09	0.052				
Glc-TCA	0.26	0.007	0.95	0.024	0.21	0.008	0.6	<0.4/0.36
Gln-TCA	14.3	0.06	3.35	0.014	36.0	0.38	22.0	18/18.5

From these results, the pentose-phosphate flux during growth has an average of 3.25% of the total glucose metabolized. This result is consistent with what has been obtained by other authors, in particular for hybridoma. However during infection, the pentose-phosphate flux is reduced to an average of 2.57%. These two values are those used in the model for flux evaluation. The reduced PPC flux during infection is associated with a higher glucose entrance into the TCA cycle via glycolysis as the percentage through this way increases from 0.26% to 0.95%. The results for glucose incorporation into the TCA cycle during infection are also higher than other growth experiments reported in the literature. This suggests that during infection the oxidative metabolism is enhanced as more glucose is processed through the TCA cycle. This cycle is highly energetic to the cells; even

a slight increase can improve the cells energy level. This will be further assessed and discussed with the metabolic flux analysis in the following sections.

The glutamine oxidation seems to be lower than for the other cell lines, but we have to be careful when interpreting these results. In Fitzpatrick et al. (1993) the incorporation seemed to be linear from the beginning of the incubation up to 5 hours. In our case the evolution is a second-degree function and therefore the rate at 3 hours (app. 100 min) is lower than at 5 hours. From our results, there is a four- to fivefold decrease in the oxidation rate of glutamine from growth to infection. This might be explained by the highest glucose oxidation rate during infection and less glutamine is driven into the TCA cycle. This observation will also be further discussed with the metabolic flux analysis in the following sections.

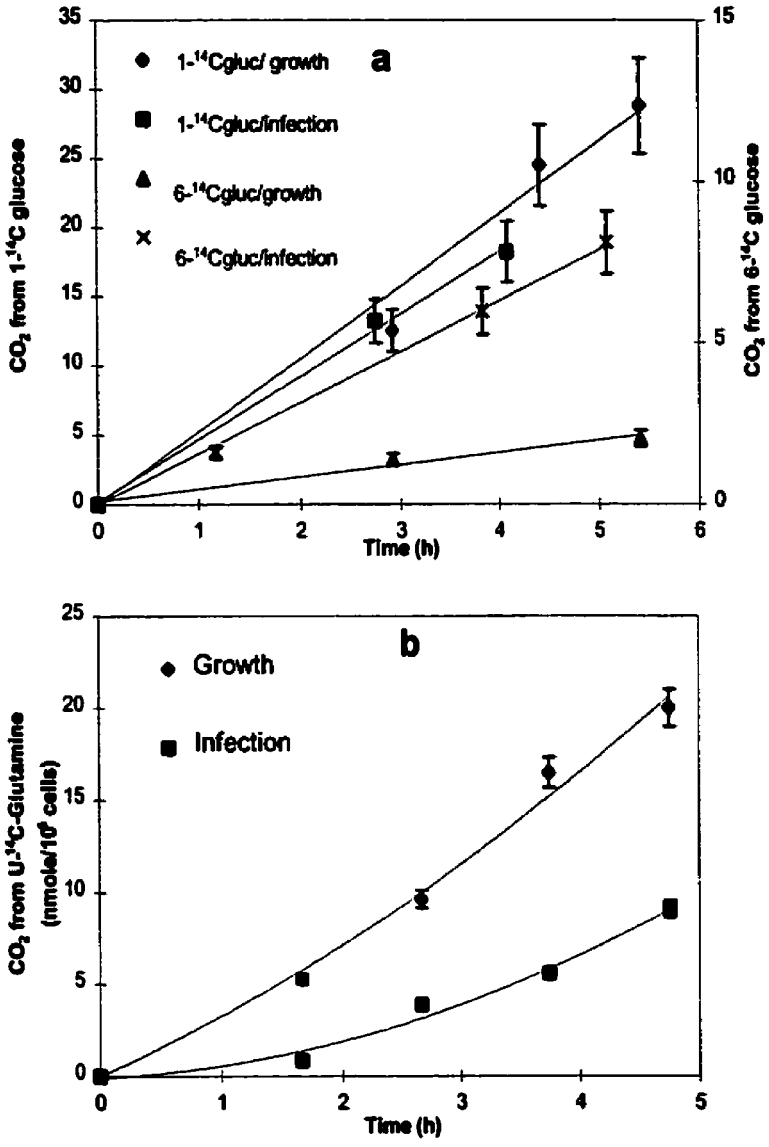


Figure 5.5 a) $^{14}CO_2$ evolution from 1-^{14}C-glucose, 6-^{14}C-glucose during growth and infection; b) $^{14}CO_2$ evolution from U-^{14}C glutamine during growth and infection. Cell densities are at $1x10^6$ cells/ml approximately.

Growth

In this section, metabolic profiles of different culture conditions during growth in a bioreactor are shown. Two batches in serum-free medium (LC-SFM) are compared in order to assess the calculations reproductibilities. A low-glucose fed-batch in LC-SFM is also shown; this feeding strategy was proven to lower lactate production. Finally a batch in a novel low-protein medium NSFM13 is also analyzed. The culture conditions are further explained in the Material and Method section in table 5.2.

Metabolic Fluxes

In figure 5.6, the metabolic fluxes during different stages of growth are shown. Fluxes at approximately $0.5x10^6$ cells/ml (A) are compared to those at $1x10^6$ cells/ml (B). Figure 5.6a shows the glycolytic fluxes, F1cd, Glyceradehyde-phosphate (GAP) to pyruvate, F3, pyruvate to acetyl-coA which then enters the Krebs cycle, and F2, pyruvate to lactate. Figure 5.6b shows the glutaminolytic fluxes F8tot, the net conversion of glutamine to glutamate, and F5tot, the net conversion of glutamate to α-ketoglutarate and the net conversion of all the amino acids. Figure 5.6c shows the TCA fluxes, F10, the anaplerotic pathway. A negative flux indicates that pyruvate enters the Krebs cycle through this way. The average TCA flux (TCA) over all the cycle is also shown.

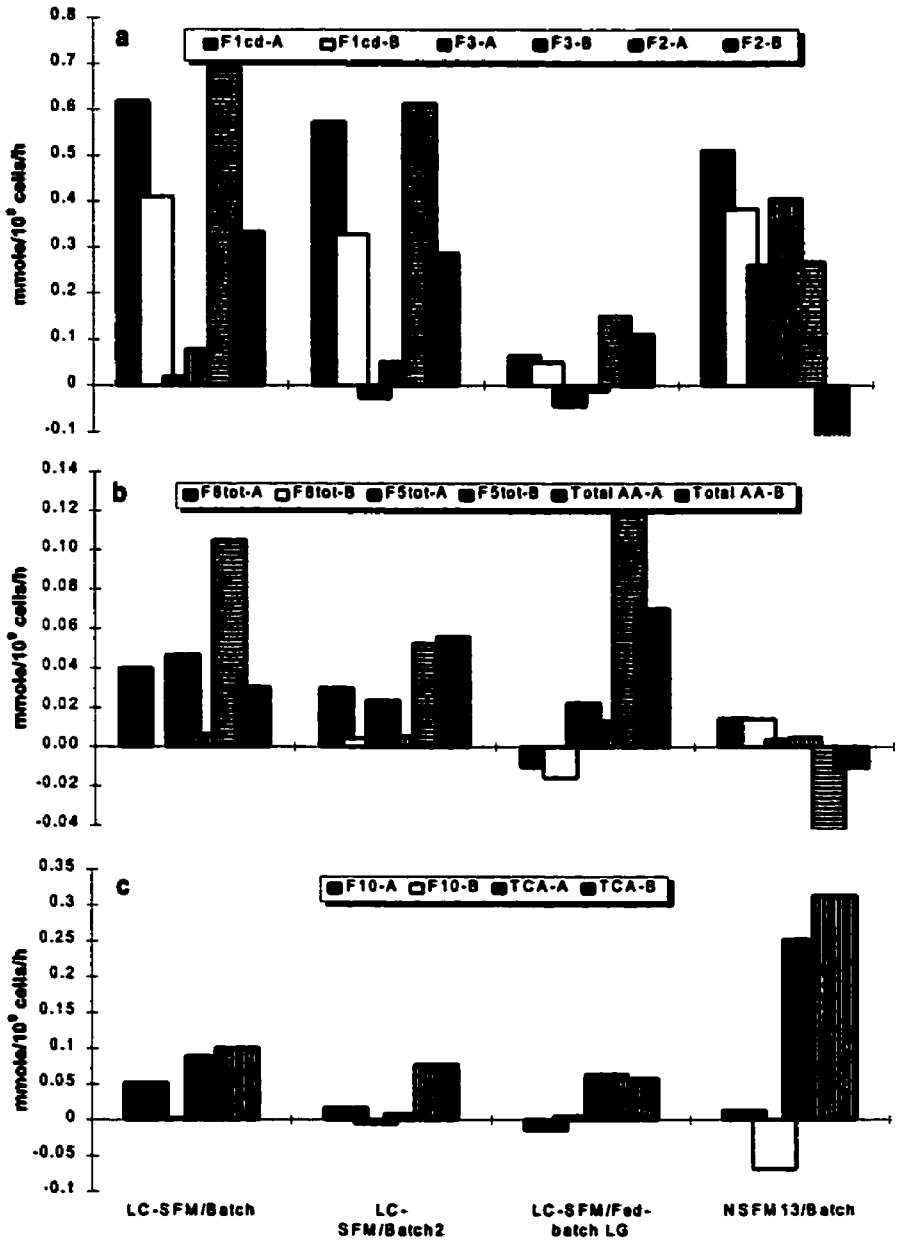


Figure 5.6 Growth phase A : $0.5x10^6$ cells/ml ; B :$1x10^6$ cells/ml. a) Glycolytic fluxes : F1, Glyceraldehyde-phosphate to Pyruvate ; F3, Pyruvate to Acetyl-CoA ; F2, Pyruvate to Lactate ; b) Glutaminolytic fluxes : F8tot, Glutamine to Glutamate, F5tot, Glutamate to α-ketoglurate ; c) TCA cycle fluxes ; F10 : anaplerotic pathways.

In figure 5.6a, F1cd, the flux to pyruvate is similar in the LC-SFM batch experiments but slightly lower in the NSFM13. However, it is approximately tenfold lower in the low glucose fed-batch. This flux is a function of the glucose concentration and as the glucose concentration gets lower, it decreases as well. Major differences are also observed concerning the other fluxes. The production of lactate, which is usually very high and in the same order of magnitude as F1cd was reduced by half in NSFM13 and even reversed. Therefore, F3 is up to fourfold higher in this medium but there is more pyruvate available for the Krebs cycle.

In figure 5.6b, F8tot is very high in the LC-SFM medium, approximately twofold higher than in NSFM13, showing high glutaminolytic activity. In the LC-SFM medium, this activity dropped rapidly with the glutamine concentration, while in the NSFM13, it stayed constant. The same trend is observable for F5tot, except that this flux is up to eight times higher in LC-SFM as compared to the NSFM13 experiments. In LC-SFM, F8tot and F5tot are approximately in the same order of magnitude showing that all the glutamine that is converted to glutamate goes to α-ketoglutarate, which is part of the TCA cycle. However, in NSFM13, F5tot is three times lower than F8tot, showing that the glutamine that is converted to glutamate does not all enter the Krebs cycle. For the fed-batch in low-glucose, F8tot is even reversed showing that there is increased glutamine synthetase

activity. For 293 cells, it was observed that this enzyme is active and that the cells can produce glutamine from glutamate (results not shown). We have previously shown in other papers that a low glucose concentration or glycolytic activity inhibits the glutaminolysis (Nadeau et al., 2000a). Though glycolysis is not reduced in NSFM13, glutaminolysis fluxes are reduced in this medium. This is probably due to the fact that the metabolized glucose enters more efficiently into the TCA cycle, providing enough energy so that less glutamine is required. Consequently, the cells produce less ammonia (2 mM in LC-SFM versus 1.5 mM in NSFM13 at $1x10^6$ cells/ml), but more significantly less lactate (18 mM lactate in LC-SFM versus 10 mM in NSFM13 at $1x10^6$ cells/ml).

In figure 5.6c, the TCA cycle activity was around 0.1 mmole/10^9 cells/h for all the experiments in LC-SFM. Noteworthy for the low-glucose fed-batch the TCA cycle remained nearly as high as in the batches showing that energy comes from other sources such as amino acids, as was already reported in a previous paper (Nadeau et al., 2000b). For NSFM13, the TCA cycle reached high values of 0.3 mmole/10^9cells/h, while F10, the anaplerotic pathway was negative showing that pyruvate is converted to oxaloacetate. Therefore this oxaloacetate can react with the acetyl-CoA coming from F3 in order to initiate the first turn of the Krebs cycle. Amino acids consumption profiles showed that in the NSFM13, amino acids were less consumed than in LC-SFM. Therefore the major source of energy

is glucose and to a lesser extent glutamine. The amino acids that are the most consumed are histidine and arginine providing glutamate which may not be very useful since it is not converted in the TCA cycle. But it also consumes threonine that is converted furthermore to pyruvate. In fact, the NSFM13 is richer in aspartate, glycine, serine, cysteine and isoleucine but real effects of these increased concentrations on the consumption profiles of these amino acids compared to LC-SFM were not seen.

ATP production

Figure 5.7 shows the net ATP flux for the different assays. The graph shows only flux calculations after 20 hours post-inoculation, in order to avoid the lag phase. It is a summing up of the ATP produced via the Krebs cycle and the ATP consumed through several reactions, as reported in Material and Methods. Consequently with a higher TCA activity, the total ATP produced was higher in the NSFM13 medium, reaching high values of 5 mmole/10^9 cells/h at around 50 hours. Also at 20 hours there was an increase in the ATP flux, which resulted from the fed-batch start-up. However, we have similar growth rates in both experiments. Therefore we cannot conclude that the ATP production level is correlated to the growth rate. Under these conditions, the cells might have a higher maintenance activity or futile cycling in order to expel this extra ATP.

The low-protein medium, namely NSFM13, might be responsible for this metabolic trends. Proteins, and in particular albumin, can be a source of amino acids (Kooistra and Lloyd, 1985; Kooistra and Lloyd, 1986; Nadeau et al., 2000a; Nyberg et al., 1999), therefore cells shift to a more efficient glucose metabolism in order to replace the missing proteins. When proteins are degraded, they can be a source of amino acids such as lysine, leucine and isoleucine, which convert to acetyl-CoA. Increased acetyl-CoA concentration can block the pathway from pyruvate to this compound (F3). Pyruvate, which then accumulates, is further converted to lactate.

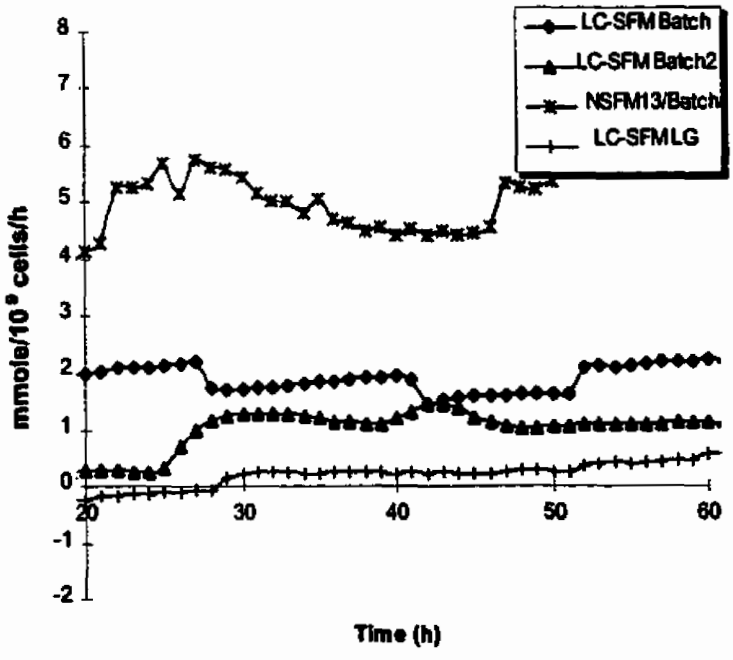


Figure 5.7 ATP fluxes during the growth experiments

Infection

In this section, metabolic profiles of different culture conditions during infection in a bioreactor are shown. A batch recovery with pulse addition in a serum-free medium (LC-SFM) and a fed-batch with no medium renewal in LC-SFM are shown. While the first process has proven to give the highest titers in LC-SFM, the fed-batch is the most scalable process, although it does not produce such high titers so far. The metabolic profiles as well as their ATP production are compared in the next section in order to improve the fed-batch process. Finally a fed-batch in a novel low-protein medium NSFM13 is also analyzed at different cell densities, $1x10^6$ cells/ml and $2x10^6$ cells/ml. The culture conditions are further explained in the Material and Method section in table 5.2.

Protein synthesis and titer

Figure 5.8a shows the titers obtained for the different experiments. Figure 5.8b shows the relative GFP synthesis rate for the two NSFM13 experiments. The GFP synthesis rate is directly correlated to the total viral proteins synthesis rate (Gilbert et al., 2000). In NSFM13, high titers were reached that are comparable to titers that were obtained previously in DMEM with 5% serum. However, when the cells were infected at densities up to $2x10^6$ cells/ml (NSFM13/HD), the productivity dropped drastically. In general, the maximal viral titers are

obtained at around 45 hpi. The corresponding protein rate synthesis is very low at this time. The onset of viral protein production is approximately at 5 hpi in the NSFM13 experiment, the maximal production rate is reached at around 18 hpi. At this time point, production of the virions starts. In the NSFM13/HD experiments, the viral protein synthesis occurs later in the process, while the maximum is also obtained at 18 hpi. The sharp singularity at 18 hpi in the production rate profile, strongly suggests a limitation that prevents viral protein accumulation. Furthermore, virions production starts at 20 hpi but not to the same extent as in the previous experiment. Many hypotheses might explain these observations and are further addressed in the next section.

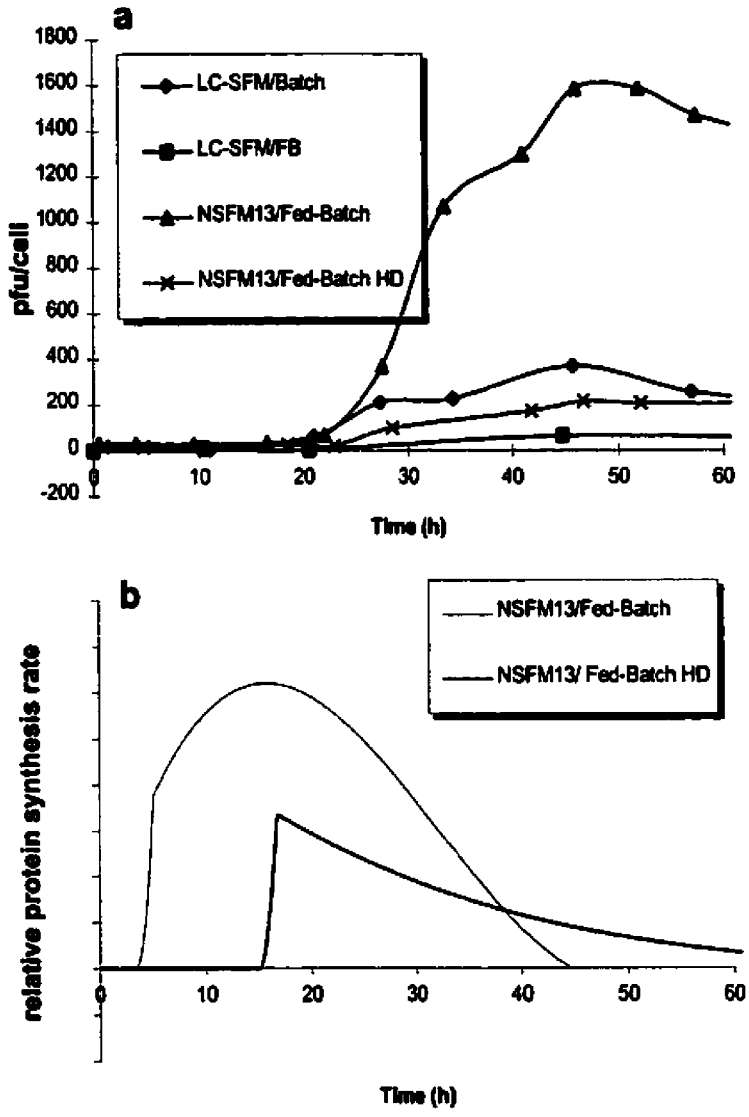


Figure 5.8 a) Titers ; b) Relative protein synthesis rate.

Metabolic fluxes

In figure 5.9, the metabolic fluxes at two different times during the infection process are shown. Fluxes at 20 hpi (A), near the maximum protein synthesis rate, are compared to those at 45 hpi (B), when maximal viral titers are reached. The different conditions are exposed in table 5.2. Panels a, b and c involve the same fluxes as presented in figure 5.6.

Figure 5.9a shows the main glycolytic fluxes. Twofold higher glycolytic fluxes (F1cd) are observed in the NSFM13 experiments at 20 hpi. However, these fluxes dropped by one third in the NSFM13 and two third in the NSFM13/HD at 45 hpi. This observation in NSFM13/HD could be a consequence of glucose concentration dropping to zero at 20 hpi in this experiment. Because of the higher cell density, the fed-batch rate was not sufficient to prevent glucose depletion. Noteworthy aspartate and serine were also limiting during this experiment at 20 hpi. This state corresponds to the time when the protein synthesis rate stopped increasing, and might explain why a high titer was not obtained. As also noted during the growth phase, the lactate fluxes (F2) are half reduced compared to glycolytic fluxes in the NSFM13 experiments and therefore, there is more pyruvate available for the TCA cycle. In the LC-SFM/BR, a twofold

higher lactate flux is observed, showing that pyruvate was coming from other sources than glucose.

If we compare to the growth experiments, higher glycolytic fluxes (F1cd) are observed at 20 hpi in NSFM13 during the infection process, decreasing afterwards at 45 hpi. The entrance into the TCA cycle remains stable in the case of NSFM13 and interestingly, is not enhanced during the infection experiments. On the contrary, in LC-SFM, glycolytic fluxes are similar or slightly reduced during the infection while compared to the growth process, however the entrance into the TCA cycle is approximately 4 times higher in LC-SFM/BR. This further confirms what was deduced from the ^{14}C-experiments, which showed that glucose oxidation was higher during infection. Therefore, we can conclude that there is a better glucose utilization in the LC-SFM during the infection process. In the NSFM13 experiments, glucose consumption is enhanced but not its entrance into the TCA cycle, however, it was already very high during the growth phase.

In figure 5.9b, the main glutaminolytic fluxes are shown. For the NSFM13 experiments, a different trend than during the growth phase is seen. Glutaminolytic fluxes are increased in the NSFM13 and reach values two to three times higher than those obtained in the LC-SFM experiments. These fluxes are

also two to three times higher than during the growth phase. F5tot is positive as compared to the growth phase, meaning that some glutamate in the NSFM13 enters the Krebs cycle, however, for the NSFM13/HD, glutamate is not processed into the TCA cycle. Although in the NSFM13, cells do use more glutamine and amino acids during the infection phase, the overall amino acid consumption remains always lower than what is measured in LC-SFM. In the LC-SFM, as the glutaminolytic fluxes are reduced, amino acid fluxes are increased. Again, this metabolic trend confirms what has been measured with the ^{14}C-glutamine, which has shown lower glutamine oxidation during the infection phase. Consequently, two opposite trends are seen for the two media. In the LC-SFM, amino acids are the preferred nutrients, while glucose and glutamine are the preferred nutrients in the NSFM13. This may be attributed to differences in medium composition. In LC-SFM, albumin is added, providing an extra amino acid source. Also, the fed-batch was started earlier in the NSFM13 experiments and higher glutamine concentrations are maintained throughout the infection process. Interestingly, only 3.5 mM ammonia was produced in NSFM13, while in NSFM13/HD the ammonia production was at 4.5 mM. In the LC-SFM, the ammonia production was 3 mM after a medium renewal. In fact, cells consume more amino acids and therefore ammonia accumulation might be related to this higher amino acid consumption rates in LC-SFM. In NSFM13, cells did not

extensively accumulate ammonia and glutaminolysis remains low during the growth phase (figure 5.9b).

In figure 5.9c, the TCA cycle fluxes are shown. Again here, the TCA cycle fluxes are higher in NSFM13 than in LC-SFM by approximately twofold at 20 hpi and 45 hpi. However, in the NSFM13/HD, the TCA cycle activity is even lower than in the LC-SFM experiments. Even if glycolysis is high up to 20 hpi in this experiment, glutaminolysis and amino acids utilization are low suggesting a shut-down of metabolic activity. If we compare to the growth experiments, the TCA cycle fluxes are slightly enhanced except for the NSFM13/HD. In all cases, F10 is very negative showing that pyruvate also enters through this pathway. We conclude that the cells become more oxidative during the infection process in all cases.

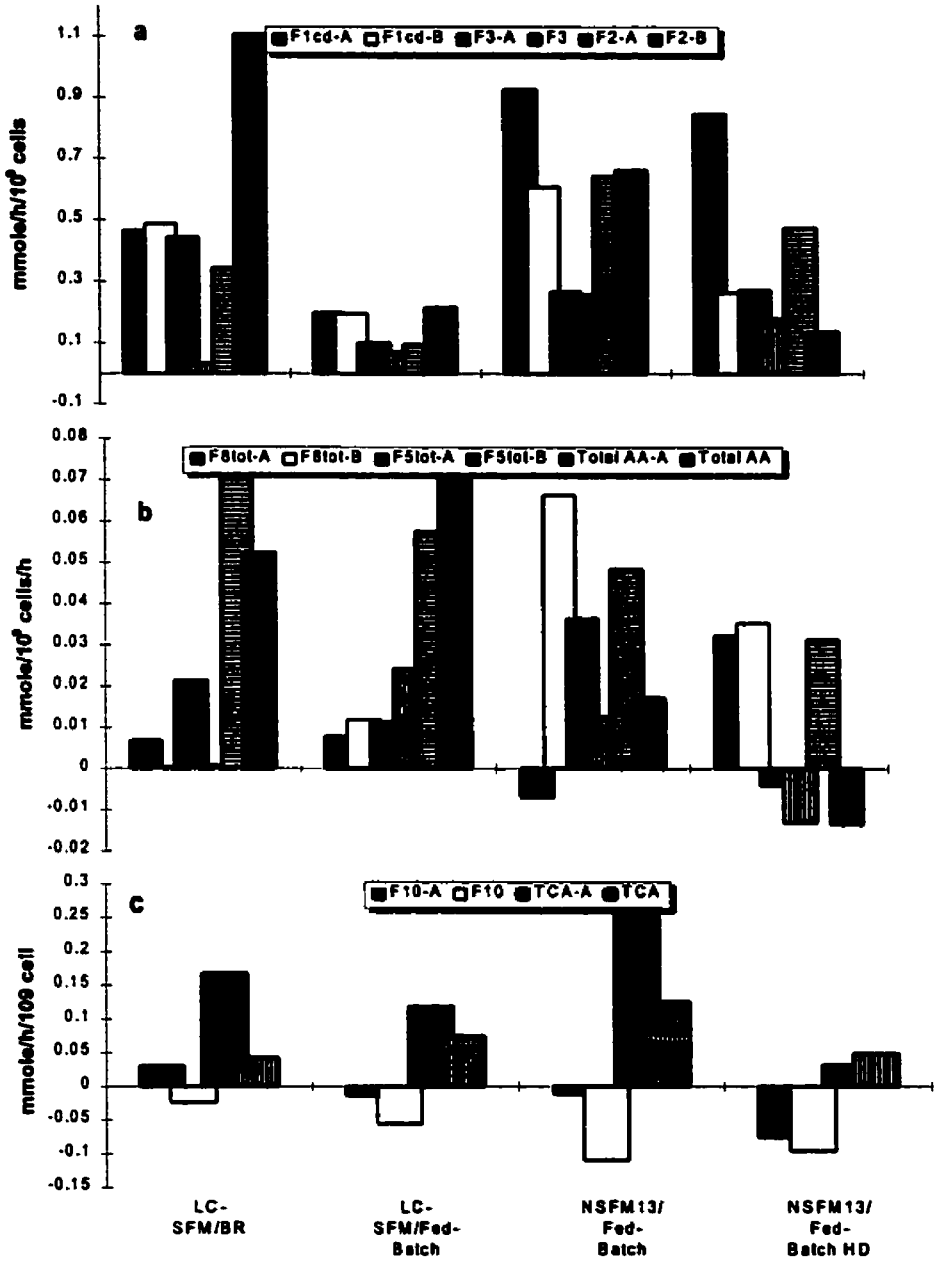


Figure 5.9 Infection phase A : 20 hpi ; B :45 hpi a) Glycolytic fluxes : F1, GAP to Pyruvate ; F3, Pyruvate to Acetyl-CoA ; F2, Pyruvate to Lactate ; b) Glutaminolytic fluxes : F8tot, Glutamine to Glutamate, F5tot, Glutamate to α-ketoglurate ; c) TCA cycle fluxes ; F10 : anaplerotic pathways

ATP production

In figure 5.10, the ATP flux throughout infection is shown. In the LC-SFM experiment, the ATP flux was approximately similar for both experiments. In the LC-SFM fed-batch experiment, no increase in this value after infection is observed, while in the LC-SFM batch, there is an increase up to 20 hpi. There is no singularity observed at 27 hpi due to the pulse addition, as it was usually observed for other fluxes (Nadeau et al., 2000a). In the NSFM13/HD, the ATP flux is very low at the beginning of the infection phase. This indicates that the metabolism was already impaired prior to infection, as discussed in the previous section. As seen before in NSFM13, ATP flux can be as high as 5 mmole/10^9 cells/h. This is further confirmed with the NSFM13 infection experiment which started with an ATP flux at around 4 mmole/10^9 cells/h at the beginning of infection. In this experiment, the ATP flux increases furthermore to a maximum of 5.5 mmole/10^9 cells/h at 10 hpi, decreasing afterwards. This maximum corresponds to the time when production of viral proteins starts. It is well known that the adenovirus early proteins can inhibit the host cell metabolism. Consequently, it is concluded that observation of a maximum ATP flux is an indication of an efficient infection process. This trend is also directly correlated to the qO_2 profile, and a maximum in this parameter can also be observed at the same time (results not shown). This is in accordance with what has been

previously shown for the baculovirus/Sf9 system (Kamen et al., 1996). We have to put in perspective that in NSFM13/HD, viral proteins were produced late and the infection process was retarded probably due to limitations encountered during growth. Interestingly, in NSFM13, an ATP production burst at around 20 hpi is also seen, in a similar fashion to the other LC-SFM experiments. From these observations, we can speculate that two mecanisms are taking place in the infection process. The host cell metabolism is first boosted due to the adenoviral charge but this increase is progressively counteracted by the metabolism shutdown due to viral proteins accumulation. In the other experiments, ATP production was increased until 20 hpi, while the host cell metabolism shutdown was not as sharp. This might be explained by a lower viral protein expression resulting in a lower vector production yield.

The loss in productivity in NSFM13/HD might not be due solely to glucose depletion, apparently limitations or inhibitions have affected the culture prior to glucose depletion leading to a low ATP production at the beginning of infection. Glutamine remains at 4.0 mM for the NSFM13 experiment at 20 hpi, while it is at 3.0 mM for the NSFM13/HD experiment, explaining partly the lower glutamine consumption in this experiment. Ammonia might also play a role in regulating glutamine consumption as already reported (Nadeau et al., 2000a). It was at 1.5 mM and 2 mM in the NSFM13 and NSFM13/HD experiments respectively.

Finally lactate, was at 10 mM and 30 mM respectively for both experiments. These high ammonia and lactate concentrations in the NSFM13/HD experiment might explain why both glycolytic and glutaminolytic activities are down regulated. The fed-batch for both NSFM13 experiments was started at around 24 hours during growth with the same rate. However, in the NSFM13/HD, cells were at $0.8x10^6$ cells/ml when fed-batch was started, while in the other experiment they were only at $0.4x10^6$ cells/ml. Therefore, in order to keep the closest as possible optimal metabolic state, the fed-batch should be started when cells are at around $0.4x10^6$ cells/ml and eventually increased when cells reach densities at around $1\text{-}2x10^6$ cells/ml. However, by keeping this high metabolic activity, undesirable by-products may accumulate such as lactate and ammonia. Fortunately, as reported in the preceeding sections, it seems that cells in NSFM13 have a more efficient metabolism therefore producing less of these by-products as compared to LC-SFM.

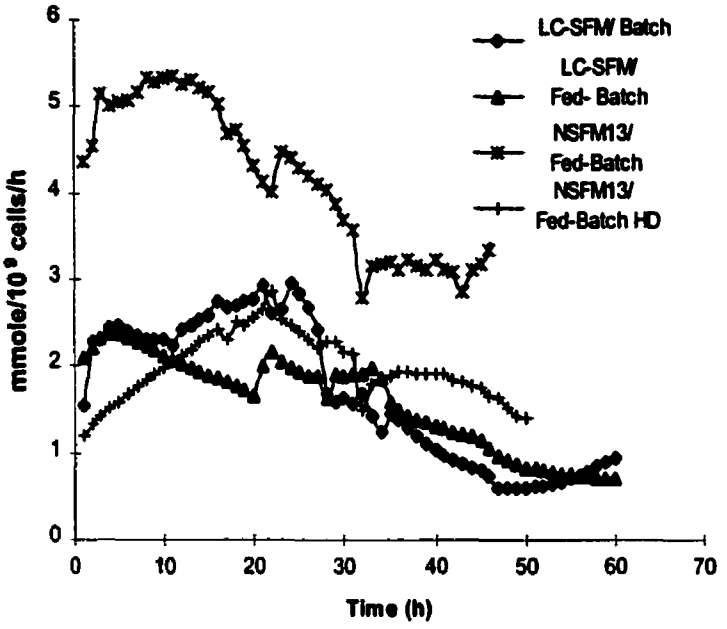


Figure 5.10 ATP fluxes during the infection experiments.

Effect of compartimentalization

In figure 5.11, the different fluxes that are involved in the mitochondrial internalization process are shown. The same conditions (A and B) are used as in figure 5.6 and figure 5.9. Flux F3tr is the pyruvate transport through the mitochondrial membrane; F8tr, the glutamine transport; F5tr, the glutamate entrance coupled to the aspartate exit and F10tr, the exit of malate coupled to the α-ketoglutarate entrance.

In figure 5.11a, the fluxes during growth are shown. First, F3tr is up to 5 times higher in the NSFM13 experiments further showing that there is a better glucose

utilization in this medium as pyruvate enters mitochondria where it is likely converted to acetyl-CoA or oxaloacetate. Interestingly F5tr is negative meaning that glutamate gets out of the mitochondria (F5tr negative) and may be involved in other reactions such as the formation of proline. This is also confirmed by what was reported earlier, that F5tot, the net conversion of glutamate into TCA was lower than F8tot, the net conversion of glutamine to glutamate, meaning that glutamate did not completely enter the TCA cycle. Interestingly the flux profiles for both LC-SFM Batch experiments are similar even though fluxes in the cytosol are different (figure 5.11). This means that fluxes in the mitochondria are kept constant in the cell regardless of the cytosolic biochemical rates. In the fed-batch with low-glucose, pyruvate leaves of the mitochondria. The low-glucose feeding strategy is usually applied in order to have a better glucose utilization, but, unexpectedly, the pyruvate left the mitochondria. In fact, the pyruvate pool in the cytosol might not be sustained because of the low glucose consumption. This strategy produced, of course, low level of lactate but may have impaired the energy level of the cell, as seen with the ATP flux. However as observed previously, the TCA cycle fluxes are approximately similar to the batch experiments while amino acids are the main components feeding the cycle.

Finally, a net exit of the malate compound (F10tr) is observed in most cases. In order to obtain an effective malate-aspartate shuttle, malate must enter the

mitochondria, in order to deliver an NADH compound, which provides ATP to the cells when oxidized. However, this is not what is observed, and malate came mainly from the TCA cycle instead of the cytosol.

In figure 5.11b, the same fluxes analyzed in the infection experiments, are presented. Again here, higher entrance of pyruvate into mitochondria is observed for the NSFM13 experiments. This is due to the fact that more pyruvate is converted to acetyl-CoA in this medium (higher F3). When compared to figure 5.11a, 30% more entrance during infection phase is observed in LC-SFM, while in the NSFM13 experiments there is no significant change. Glutamine and glutamate also enter the mitochondria slightly less than during the growth experiments for LC-SFM. This is in accordance with what has been shown previously, that the cells utilized less glutamine in LC-SFM during infection at the expense of amino acids. In NSFM13 experiments, up to 5 fold more entrance of glutamine into mitochondria is observed. Glutamate enters also slightly but a net exit is observed in the NSFM13/HD. This is also in accordance with what has been shown in figure 5.11b, that cells do consume more glutamine but glutamate does not proceed into the TCA cycle. Again here, low malate fluxes are observed, in fact they are almost null as compared to other fluxes, meaning that the malate-aspartate shuttle is impaired.

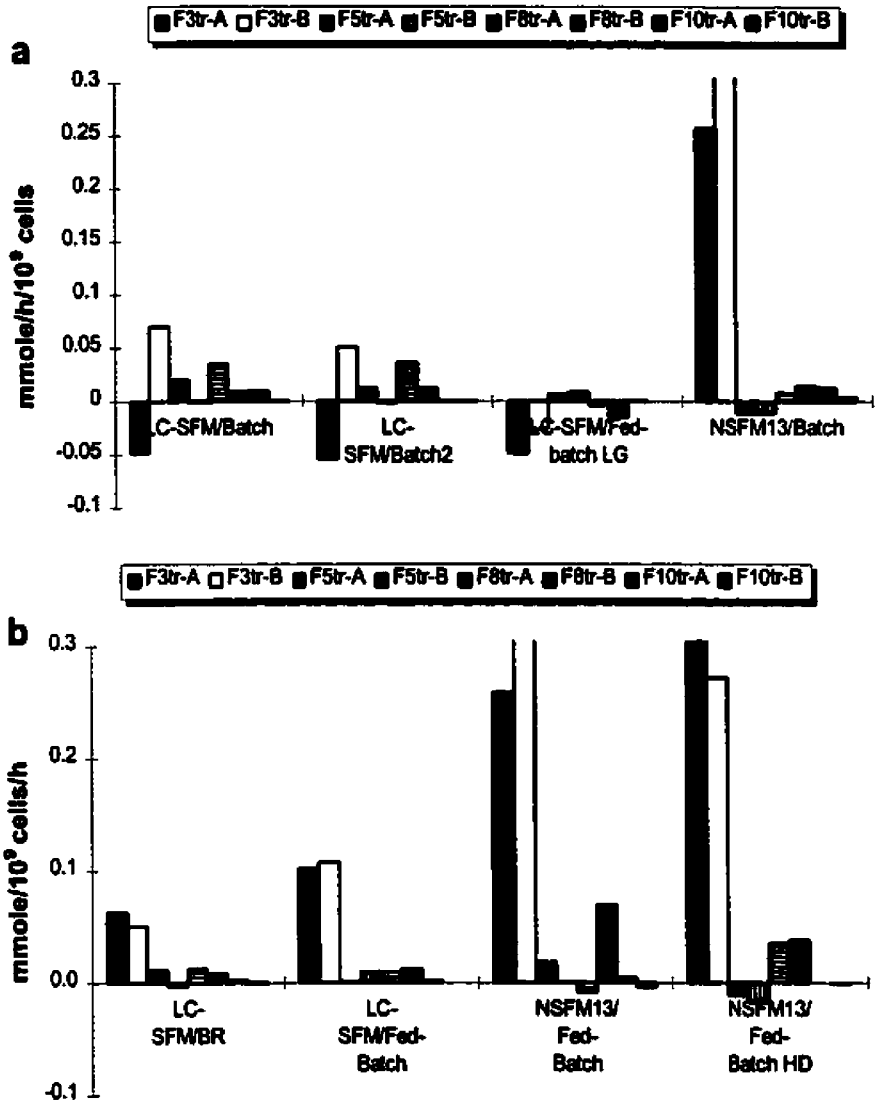


Figure 5.11 Compartmentalization fluxes: F3tr: Pyruvate transport; F5tr: Glutamate transport; F8tr: Glutamine transport, F10tr: Malate transport. a) Growth experiments: A :0.5x10^6 cells/ml, B: 1x10^6 cells/ml b) Infection experiments: A: 20 hpi, B: 45 hpi.

Conclusion

By using a comprehensive metabolic model for metabolic flux calculations, we were able to describe the metabolism and the theoretical ATP production in different medium and feeding strategies during growth but more importantly during the infection process. Major points that demonstrate the superiority of the low-protein medium (NSFM13) over the LC-SFM could be outlined:

- Entrance into the TCA cycle is increased, while less lactate is produced and entrance through anaplerotic pathway is enhanced ;
- Glutaminolysis and amino acids consumption are low during growth, while glutaminolysis is increased during infection ;
- With a higher TCA activity, higher ATP production occurs in this medium up to twofold more. This results is correlated with an increased vector production, up to three times more than in LC-SFM.

This metabolic improvement in NSFM13 might be due to the lower protein content of this medium, therefore forcing the cells to have more efficient glucose utilization through the TCA cycle.

Compartmentalization flux calculations further helped to draw the following conclusions for the NSFM13 medium:

- There is higher pyruvate entrance into the mitochondria.
- Glutamate is not always processed into the TCA cycle.
- Malate exits the mitochondria showing that the malate-aspartate shuttle is impaired.

Finally this analysis has permitted to propose further improvement of the fed-batch feeding strategy in order to infect at higher cell densities. The fed-batch should be started at $0.4x10^6$ cells/ml and increased at the time of infection in order to keep the metabolism high while avoiding nutrient depletion.

From these studies, we can conclude that metabolic flux analysis is a useful tool that helps to rationally improve medium composition as well as feeding strategies even in the case of peudo-stationary conditions. In fact, this approach was sufficient in the case of growth but was absolutely necessary to study the infection process because of its transient nature. We also believe that this tool has the potential to be developed on-line in order to follow in real time the ATP production. Fed-batch rates could then be deduced in order to maximize the ATP production.

References

BONARIUS, H. P. J., HOUTMAN, J. H. M., SCHMID, G., DE GOOIJER, C. D., AND TRAMPER, J. (1998). Error Analysis of Metabolic-Rate Measurements in Mammalian-Cell Culture by Carbon and Nitrogen Balances. Metabolic-Flux Analysis of Mammalian-Cell Culture. Wageningen Agricultural University. The Netherlands.

CÔTÉ, J., BOURGET, L., GARNIER, A., and KAMEN, A. (1997). Study of Adenovirus Production in Serum-Free 293SF Suspension Culture by GFP-Expression Monitoring. Biotechnol. Prog., 13, 709-714.

CÔTÉ, J., GARNIER, A., MASSIE, B., and KAMEN, A. (1998). A Serum-Free Production of Recombinant Proteins and Adenoviral Vectors by 293SF-3F6 Cells. Biotechnol. Bioeng., 59, 567-575.

FITZPATRICK, L., JENKINS, A., and BUTLER, M. (1993). Glucose and Glutamine Metabolism of a Murine B-Lymphocyte Hybridoma Grown in Batch Culture. Appl. Biochem. Biotechnol., 43, 93-116.

GARNIER, A., COTÉ, J., NADEAU, I., KAMEN, A., and MASSIE, B. (1994). Scale-Up of the Adenovirus Expression System for the Production of Recombinant Protein in Human 293S cells. Cytotechnol., 15, 145-155.

GILBERT, P.-A., GARNIER, A., JACOB, D., and KAMEN, A. (2000). On-Line Measurement of Green Fluorescent Protein (GFP) Fluorescence for the Monitoring of Recombinant Adenovirus Production. Biotechnol. Lett., In press.

GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSEL, W. C., and NAIRN, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. J. Gen.Virol., 36, 59-74.

KAMEN, A. A., BÉDARD, C., TOM, R., PERRET, S., and JARDIN, B. (1996). On-Line Monitoring of Respiration in Recombinant-Baculovirus Infected and Uninfected Insect Cell Bioreactor Culture. Biotechnol. Bioeng., 50, 36-48.

KOOISTRA, T., and LLOYD, J. B. (1985). Degradation of Insulin by Human Fibroblasts: Effects of Inhibitors of Pinocytosis and Lysosomal Activity. Int. J. Biochem., 17, 805-811.

KOOISTRA, T., and LLOYD, J. B. (1986). Pinocytosis and Degradation of Exogenous Proteins by Cystinotic Fibroblasts. Biochim Biophys Acta, 887, 182-186.

LARRABEE, M. G. (1989). The Pentose Cycle (Hexose Monophosphate Shunt). J. Biol. Chem., 264, 15875-15879.

NADEAU, I., GARNIER, A., CÔTÉ, J., MASSIE, B., CHAVARIE, C., and KAMEN, A. (1996). Improvement of Recombinant Protein Production with the Human Adenovirus/293S Expression System Using Fed-Batch Strategies. Biotechnol. Bioeng., 51, 613-623.

NADEAU, I., JACOB, D., PERRIER, M., and KAMEN, A. (2000a). 293SF Metabolic Flux Analysis during Cell Growth and Infection with an Adenoviral Vector. Biotechnol. Prog. Submitted.

NADEAU, I., SABATIÉ, J., KOEHL, M., PERRIER, M., and KAMEN, A. (2000b). Human 293 Cell Metabolism in low Glutamine-Supplied Culture: Interpretation of Metabolic Changes through Metabolic Flux Analysis. Metabol. Eng. In Press.

NYBERG, G. B., BALCARCEL, R. R., FOLLSTAD, B. D., STEPHANOPOULOS, G., and WANG, D. I. C. (1999). Metabolism of Peptide Amino Acids by Chinese Hamster Ovary Cells Grown in a Complex Medium. Biotechnol.and Bioeng., 62, 324-335.

SIEGWART, P., MALE, K., CÔTÉ, J., LUONG, J. H. T., PERRIER, M., and KAMEN, A. (1999). Adaptative control at low-level glucose concentration to study HEK-293 cell metabolism in serum free cultures. Biotechnol. Prog., 15, 608-616.

WANG, N. S., and STEPHANOPOULOS, G. (1983). Application of Macroscopic Balances to the Identification of Gross Measurements Errors. Biotechnol. Bioeng., 25, 2177-2208.

XIE, L., and WANG, D. I. C. (1994). Applications of improved stoichiometric model in medium design and fed-batch cultivation of animal cells in bioreactor. Cytotechnol., 15, 17-29.

CONCLUSION

La lignée 293 est la lignée cellulaire privilégiée pour la réplication d'un vecteur adénovirus. Ce vecteur a été préalablement modifié afin qu'il ne puisse se répliquer que dans cette lignée de cellules. Ainsi le vecteur de première génération est délété dans les régions E1 et E3, ce qui l'empêche de se répliquer dans une cellule normale et permet l'incorporation d'un nouveau gène. Ce vecteur contient le gène de la GFP, une protéine fluorescente, facile à suivre et dont la production reflète directement la production de protéines virales. Afin de répliquer ce virus, la cellule 293 adaptée à du milieu sans sérum (293-3F6) a été utilisée soit dans du milieu LC-SFM, ne contenant que de l'albumine, ou un milieu faible en protéines, soit le NSFM13.

Une autre partie de ce travail a été faite avec un vecteur de deuxième génération délété en E1, E3 et E4. On peut alors y insérer un gène plus grand et il y a moins de probabilités de recombinaisons, qui pourraient générer des vecteurs capables de se répliquer dans n'importe quelle cellule humaine (Recombinant Competant Adenovirus), ce qui est indésirable pour des fins de thérapie génique. Ce vecteur ne peut cependant que se répliquer dans une cellule de deuxième génération qui contient E1 et certains ORF (Open Reading Frames) de E4.

Avec ces outils en main, le but principal est de produire le plus de vecteurs infectieux possibles dans les cellules 293. Afin d'optimiser la réplication de ce vecteur, il est important de pouvoir comprendre en détail le métabolisme de la cellule et son comportement en croissance et pendant l'infection. Le but final étant d'en arriver à une stratégie d'alimentation adéquate afin que les cellules possèdent un métabolisme capable de mener à terme le processus d'infection et de réplication le plus efficace possible.

En culture cellulaire, on s'attarde *a priori* à la mesure des taux de consommation et de production des principaux nutriments. Mais ces taux donnent-ils toute l'information sur l'état intrinsèque des cellules ? C'est pourquoi dans ce travail, nous nous concentrons en particulier sur le calcul des flux métaboliques ou taux de réactions biochimiques à l'intérieur des cellules, qui permettent d'évaluer l'état physiologique des cellules à tout moment. Tout au long de ce travail, nous avons donc développé un modèle métabolique afin d'en arriver à un modèle très complet, qui permette le calcul de ces flux métaboliques.

Afin de pouvoir faire ces calculs et s'assurer qu'ils reflètent correctement l'état physiologique des cellules, il faut poser certaines hypothèses de base, la plus importante étant l'hypothèse du régime pseudo-stationnaire. Dans ce travail,

nous avons vérifié cette hypothèse par des mesures intracellulaires. En effet, les concentrations des métabolites intracellulaires varient surtout lorsque les concentrations extracellulaires varient, tels que dans des conditions en cuvée ou en cuvée alimentée. Cependant ces variations se sont avérées minimes par rapport aux variations externes des nutriments. C'est pourquoi l'hypothèse de régime pseudo-stationnaire reste valable. Le taux de production de CO_2 mesuré a été également trouvé à peu près équivalent au taux prédit par le modèle, démontrant ainsi la validité des calculs.

D'autres outils ont été utilisés afin de valider le modèle. Il s'agit de bilan sur l'azote et du calcul d'un critère probabiliste h basé sur le même bilan sur l'azote mais pondéré par la covariance sur les mesures. Ces calculs ont permis de vérifier que les mesures étaient justes à une probabilité de 90%. Cette affirmation est importante puisque nous observons par l'analyse de sensibilité qu'une erreur sur certaines mesures peut amplifier l'erreur sur le calcul des flux. Cela nous indique qu'il faut faire preuve de beaucoup de précisions sur les mesures afin d'obtenir des valeurs réalistes.

L'analyse des flux métaboliques a démontré plusieurs choses sur le métabolisme des cellules. On a vu clairement que dans le cas des cellules 293, on a une relation très proche entre le métabolisme du glucose et de la glutamine. En effet dans le

cas d'une alimentation très basse et d'une concentration basse en glutamine, on observe une diminution de la glycolyse. On observe un phénomène similaire lorsqu'on réduit la concentration de glucose, c'est-à-dire que la glutaminolyse diminue également. En effet, il est important pour la cellule que le cycle de Krebs reste balancé et lorsque l'apport d'un nutriment tel que le glucose ou la glutamine diminue, il y a également diminution de la consommation de l'autre nutriment. Dans ces deux cas cependant on remarque une augmentation des flux d'acides aminés vers le cycle de Krebs, la cellule ayant alors tendance à aller chercher son énergie ailleurs.

Un cycle de Krebs balancé et constant semble être un prérequis afin d'avoir une croissance cellulaire élevée et soutenue. En effet, il a été observé que lorsque les flux métaboliques de la cellule restent constants et stables dans le temps la croissance cellulaire en est améliorée. En mode cuvée, on a observé des flux métaboliques très élevés au niveau du cycle de Krebs sans pour autant que la croissance cellulaire en soit améliorée. Dès lors, l'analyse des flux métaboliques permet d'aller chercher cette information et permet de juger si les cellules sont dans un état physiologique stable afin de permettre le meilleur cycle infectieux possible.

On a également observé un effet régulateur de l'ammoniac dans certains cas et la cellule semble s'adapter vers la consommation d'acides aminés moins producteurs d'ammoniac lorsqu'il y a accumulation de ce composé, telles la tyrosine ou la phénylalanine.

L'analyse des flux métaboliques pendant l'infection a également permis de cerner les événements importants au cours de cette phase. Deux moments différents semblent marquer le processus d'infection. Autour de 10 hpi, au moment où la synthèse de protéine commence et au cours d'une infection normale en mode cuvée ou cuvée alimentée, produisant de 500 à 1500 pfu/cellule, on observe en général une augmentation des flux métaboliques à ce moment. De plus, dans le cas du milieu à faible teneur en protéines, on observe un maximum au niveau de l'ATP. Dans la majorité des cas, on observe également un maximum entre 20 et 30 heures en ce qui concerne la plupart des flux ainsi que la production d'ATP. Ce temps correspond en fait au moment où le métabolisme de la cellule est le plus actif, son poids est au maximum ainsi que la quantité d'ADN et de protéines. Le maximum au niveau du titre viral est obtenu entre 36 et 48 heures selon le type milieu. En général on observe un titre plus élevé lorsque le maximum est atteint autour de 48 heures au lieu de 36 heures, on soupçonne ainsi que le processus d'assemblage des virions a été contrecarré par un processus de dégradation et de mortalité cellulaire. Ce phénomène est plus

prononcé dans le milieu LC-SFM, où le maximum du titre viral est généralement obtenu autour de 36 heures. Ceci pourrait donc expliquer les faibles titres exprimés. On voit d'ailleurs la différence au niveau de l'ATP généré dans les deux différents milieux. On a jusqu'à deux fois plus d'ATP produit dans le milieu sans protéines (NSFM13) démontrant ainsi que la cellule possède dans ce cas une meilleure activité métabolique, résultant en une viabilité prolongée et un meilleur titre viral.

Il est également intéressant de comparer le métabolisme pendant la croissance et l'infection. Les études au ^{14}C ont démontré que dans le milieu LC-SFM, la cellule oxydait plus le glucose et moins la glutamine pendant l'infection, ce phénomène a également été démontré par l'analyse des flux métaboliques. Cependant dans le milieux NSFM13, on observe une meilleure oxydation du glucose en infection mais la glutaminolyse est également augmentée dans ce milieu. Ceci s'explique par le fait que la cellule utilise également moins d'acides aminés dans ce milieu et la glutamine est donc préférablement consommée. Pourtant la cellule ne génère pas tellement d'ammoniac puisque pendant la croissance la consommation de la glutamine reste normale. D'après l'analyse des flux, le glutamate généré n'est pas complètement utilisé dans le cycle de Krebs mais a plutôt tendance à sortir de la mitochondrie. La glutamine ne serait pas réellement oxidée mais servirait plutôt

a générer le glutamate, qui peut servir à d'autres fonctions telles que dans les cotransporteurs d'acides aminés à travers la membrane cellulaire.

Finalement l'analyse des flux métaboliques a permis de déterminer une stratégie d'alimentation plus appropriée. En effet, pendant la période d'infection, on a remarqué plusieurs flux négatifs autour de 20 heures post-infection. Même si la majorité des acides aminés ne sont pas limitants des flux négatifs signifient que la demande biosynthétique pour certains acides aminés est plus grande que la dégradation de ceux-ci. Ces flux négatifs concernent en général la thréonine, la valine, la phénylalanine, la tyrosine, la lysine et la leucine. Dès lors, afin d'éviter ces flux négatifs, il faut commencer l'alimentation pendant la période de croissance et augmenter le taux au moment de l'infection afin de conserver des concentrations plus élevées de nutriments en tout temps dans le milieu. Cette stratégie a donné de bons titres viraux concernant le NSFM13 lors d'une infection à $1x10^6$ cellules/ml mais le taux d'alimentation s'est avéré insuffisant lorsqu'on passait à une infection à $2x10^6$ cellules/ml. En effet, il semble que le métabolisme de la cellule soit corrélé avec la concentration des nutriments puisqu'il a été observé que lorsqu'on fait une addition à 24 heures après l'infection, les flux augmentent quelques temps après. Donc, afin de conserver un métabolisme élevé il est préférable de garder les concentrations de nutriments élevées. Cependant, l'oxydation du glucose dans le cycle de Krebs se fait peu et la cellule produit

beaucoup de lactate. Cependant le milieu NSFM13, pauvre en protéines, s'est avéré plus efficace à ce niveau, probablement parce qu'il possède une source plus faible en acides aminés due à une déficience en protéines. Dès lors, on peut se permettre dans ce milieu de garder des concentrations de nutriments plus élevés afin de garder un métabolisme plus actif et une meilleure production d'ATP. Le tableau suivant montre le profil suggéré pendant la croissance et l'infection. Ce nouveau profil a été basé sur celui préalablement utilisé. Il s'agissait en fait d'un mélange de glucose, de glutamine et d'acides aminés essentiels comme décrit à la page 83.

Tableau 6.1 Débit et composition de l'alimentation.

	Avant	Suggéré pour $2x10^6$cell/ml
débit[ml/h]	2.45-3.6	2.45-7
glc [mM]	166.7-377.7	377.7
gln	67-90	67.0
his	13.3	13.3
thr	26.7	50.0
arg	40.0	40.0
tyr	13.3	26.0
gly	9.1	9.1
met	6.7	6.7
val	26.0	52.0
phe	12.7	26.0
ile	26.7	52.0
leu	26.7	52.0
lys	26.7	52.0

L'alimentation devrait être commencée au début de la croissance lorsque la concentration cellulaire atteint $0.4x10^6$ cell./ml. Cette alimentation devrait être augmentée graduellement jusqu'à un débit de 7 ml/h lorsque la concentration cellulaire atteint $2x10^6$ cell./ml au début de l'infection, afin de subvenir aux besoins en glucose de la cellule. On remarque également que la concentration de certains acides aminés est doublée. Il s'agit en fait, des acides aminés les plus susceptibles de présenter des flux négatifs.

De plus, à la lumière des résultats dans un milieu faible en protéines (NSFM13), on pense qu'une concentration de départ plus faible en acides aminés couplée à une alimentation comme celle suggérée ci-haut, mériterait d'être expérimentée car elle pourrait peut-être permettre une meilleure utilisation du glucose et une moins grande production de lactate tout en favorisant un métabolisme actif.

Afin de comprendre le métabolime de la cellule, nous nous devions de développer un modèle complet du métabolisme qui nous permettent *a posteriori* d'évaluer l'état physiologique des cellules. Cependant le but serait de pouvoir analyser ce métabolisme en temps réel à l'aide de quelques paramètres-clés. L'analyse des flux métaboliques a démontré que certains de ces flux sont négligeables et pourraient être réduit à zéro sans pour autant affecter la validité des résultats. Le modèle s'en trouverait simplifié et à l'aide de mesures sur l'O_2,

le CO_2, le pH, le glucose et la glutamine, on pourrait développer un modèle en temps réel qui permettrait de suivre l'ATP produit, paramètre qui permet d'évaluer l'état métabolique global des cellules pendant la croissance et l'infection. Ceci permettrait en même temps d'ajuster en temps réel les taux d'alimentation des nutriments et ainsi d'optimiser la production d'ATP et de vecteurs viraux.

RÉFÉRENCES

BABICH, A., FELDMAN, L. T., NEVINS, J. R., DARNELL, J. E., et WEINBERGER, C. (1983). Effect of Adenovirus on Metabolism of Specific Host mRNAs: Transport Control and Specific Translational Discrimination. Molecular and cellular biology, 3, 1212-1221.

BANNAI, S. (1986). Exchange of Cystine and Glutamate across Plasma Membrane of Human Fibroblasts. Journal of Biological Chemistry, 261, 2256-2263.

BANNAI, S., et ISHII, T. (1988). A Novel Function of Glutamine in Cell Culture: Utilization of Glutamine for the Uptake of Cystine in Human Fibroblasts. Journal of Cellulular Physiology, 137, 360-366.

BANNAI, S., et ISHII, T. (1988). A Novel Function of Glutamine in Cell Culture: Utilization of Glutamine for the Uptake of Cystine in Human Fibroblasts. Journal of Cellular Physiology, 137, 360-366.

BARFORD, J. P., PHILLIPS, P. J., et HARBOUR, C. (1992). Simulation of Animal Cell Metabolism. Cytotechnology, 10, 63-74.

BATT, B. C., et KOMPALA, D. (1989). A Structured Kinetic Modeling Framework for the Dynamics of Hybridoma Growth and Monoclonal Antibody Production in Continuous Suspension Cultures. Biotechnology and Bioengineering, 34, 515-531.

BEBBINGTON, C. R., RENNER, G., THOMPSON, S., KING, D., ABRAMS, D., et YARRANTON, G. T. (1992). High-Level Expression of a Recombinant Antibody from Myeloma Cells Using a Glutamine Synthetase Gene as an Amplifiable Selectable Marker. Bio/Technology ,10, 1

BONARIUS, H. P. J., DE GOOIJER, C. D., TRAMPER, J., et SCHMID, G. (1995). Determination of the Respiratory Quotient in Mammalian Cell Culture in Bicarbonate Buffered Media. Biotechnology and Bioengineering, 45, 524-535.

BONARIUS, H. P. J., HATZIMANIKATIS, V., MEESTERS, K. P. H., DE GOOIJER, C. D., GEORG, S., et TRAMPER, J. (1996). Metabolic Flux Analysis of Hybridoma Cells in Different Culture Media Using Mass Balance. Biotechnology and Bioengengineering, 50, 299-318.

BONARIUS, H. P. J., HOUTMAN, J. H. M., DE GOOIJER, C. D., TRAMPER, J., et SCHMID, G. (1998). Activity of Glutamate Dehydrogenase is Increased in Ammonia-Stressed Hybridoma Cells. Biotechnology and Bioengengineering, 57, 447-453.

BONARIUS, H. P. J., HOUTMAN, J. H. M., SCHMID, G., DE GOOIJER, C. D., et TRAMPER, J. (1998). Error Analysis of Metabolic-Rate Measurements in Mammalian-Cell Culture by Carbon and Nitrogen Balances. Metabolic-Flux Analysis of Mammalian-Cell Culture. Wageningen Agricultural University. The Netherlands.

BONARIUS, H. P. J., SCHMID, G., et TRAMPER, J. (1997). Flux Analysis of Underdetermined Metabolic Networks: The Quest for the Missing Constraints. Trends in Biotechnology, 15, 307-315.

BONIFAS, V. H. (1967). Time-Course and specificity of the Arginine Requirement for Adenovirus Biosynthesis. Archiv fur die gesamte Virusforschung, 20, 20-28.

BOUCHER, R. C., et KNOWLES, M. R. (1994). Gene Therapy for Cystic Fibrosis Using E1-Deleted Adenovirus: a Phase 1 Trial in the Nasal Cavity. Human Gene Therapy, 5, 615-634.

BRIAND, P., et KAHN, A. (1993). Intérêts et limites des vecteurs adénoviraux pour le transfert de gènes in vivo. Pathologie Biologie, 41, 663-671.

BROWN, R. R. (1996). Metabolism and Biology of Tryptophan. Recent Advances in Tryptophan Research, Plenum Press, New York, 15-25.

BUTLER, M., et JENKINS, H. (1989). Nutritional Aspects of the Growth of Animal Cells in Culture. Journal of Biotechnology, 12, 97-110.

CLARK ROUSE, H., ET SCHLESINGER, R. W. (1967). An arginine-dependant step in the maturation of type 2 adenovirus. virology, 33, 513-522.

COLLINS, C. L., WASA, M., SOUBA, W. W., et ABCOUWER, S. F. (1998). Determinants of Glutamine Dependance and Utilization by Normal and Tumor-Derived Breast Cell Lines. Journal of Cellular Physiology, 176, 166-178.

CÔTÉ, J., BOURGET, L., GARNIER, A., et KAMEN, A. (1997). Study of Adenovirus Production in Serum-Free 293SF Suspension Culture by GFP-Expression Monitoring. Biotechnology Progress, 13, 709-714.

CÔTÉ, J., GARNIER, A., MASSIE, B., et KAMEN, A. (1998). A Serum-Free Production of Recombinant Proteins and Adenoviral Vectors by 293SF-3F6 Cells. Biotechnology and Bioengineering, 59, 567-575.

CRYSTAL, R. G., MCELVANEY, N. G., ROSENFELD, M. A., CHU, C. S., MASTRANGELI, A., HAY, J. G., BRODY, S. L., JAFFE, H. A., EISSA, N. T., et DANEL, C. (1994). Administration of an Adenovirus Containing the Human CFTR cDNA to the Respiratory Tract of Individuals with Cystic Fibrosis. Nature Genetics, 8, 42-51.

DOVERSKOG, M., LJUNGRENN, J., OHMAN, L., et HAGGSTROM, L. (1997). Physiology of cultured animal cells. Journal of Biotechnology, 59, 103-115.

DOYLE, C., et BUTLER, M. (1990). The Effect on the Toxicity of Ammonia to a Murine Hybridoma. Journal of Biotechnology, 15, 91-100.

EAGLE, H., PIEZ, K. A., et LEVY, M. (1961). The Intracellular Amino Acid Concentrations Required for Protein Synthesis in Cultured Human Cells. The Journal of Biological Chemistry, 236, 2039-3042.

EUROPA, A. F., GAMBHIR, A., FU, P.-C., et HU, W.-S. (2000). Multiple Steady States with Distinct Cellular Metabolism in Continuous Culture of Mammalian Cells. Bioechnology and Bioengineering, 67, 25-34.

FITZPATRICK, L., JENKINS, A., et BUTLER, M. (1993). Glucose and Glutamine Metabolism of a Murine B-Lymphocyte Hybridoma Grown in Batch Culture. Applied Biochemistry and Biotechnology, 43, 93-116.

GARNIER, A., COTÉ, J., NADEAU, I., KAMEN, A., et MASSIE, B. (1994). Scale-Up of the Adenovirus Expression System for the Production of Recombinant Protein in Human 293S cells. Cytotechnology, 15, 145-155.

GILBERT, P.-A., GARNIER, A., JACOB, D., et KAMEN, A. (2000). On-Line Measurement of Green Fluorescent Protein (GFP) Fluorescence for the Monitoring of Recombinant Adenovirus Production. Biotechnology Letters, In press.

GLACKEN, M. W., FLEISCHAKER, R. J., et SINSKEY, A. J. (1986). Reduction of Waste Product Excretion via Nutrient Control: Possible Strategies for Maximizing Product and Cell Yiels on Serum in Cultures of Mammalian Cells. Biotechnology and Bioengineering, 28, 1376-1389.

GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSEL, W. C., et NAIRN, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. Journal of General Virology, 36, 59-74.

GRAY, D. R., CHEN, S., HOWARTH, W., INLOW, D., et MAIORELLA, B. L. (1996). CO2 in Large-Scale and High-Density CHO Cell Perfusion Culture. Cytotechnology, 22, 65-78.

GREEN, M. (1967) . Biochemical Studies on Adenovirus Multiplication. Xll. Plaquing Efficiencies of Purified Human Adenovirus. Virology, 31, 562-565.

GREEN, M. (1970). Effect of Oncogenic DNA Viruses on Regulatory Mechanisms of Cells. Federation Proceedings, 29, 1265-1275.

HANSEN, H. A., et EMBORG, C. (1994). Extra and intracellular amino acid concentrations in continuous Chinese hamster ovary cell culture. Applied Microbiology and Biotechnology, 41, 560-564.

HANSEN, H. A., et EMBORG, C. (1994). Influence of Ammonium on Growth, Metabolism, and Productivity of a Continuous Suspension Chinese Hamster Ovary Cell Culture. Biotechnology Progress, 10, 121-124.

HANSEN, H. A., MADSEN, N. M., et EMBORG, C. (1993). An Evaluation of Fed-Batch Cultivation Methods for Mammalian Cells Based on Model Simulations. Bioprocess Engineering, 9, 205-213.

HASSEL, T., GLEAVE, S., et BUTLER, M. (1990). Growth Inhibition in Animal Cell Culture. Applied Biochemistry and Biotechnology ,30, 29-40.

HASSELL, T., et BUTLER, M. (1990). Adaptation to Non-Ammoniagenic Medium and Selective Substrate Feeding Lead to Enhanced Yields in Animal Cell Cultures. Journal of Cell Sciience, 96, 501-508.

HEILMAN, C. A., et ROUSE, H. (1980). Adenovirus Type 2 Polypeptide Synthesis in Arginine-Deprived Cells. Virology, 105, 159-170.

HODGE, L. D., et SCHARFF, M. D. (1969). Effect of Adenovirus on Host Cell DNA Synthesis in Synchronized Cells. Virology, 37, 554-564.

HU, W.-S., et OBERG, M. G. (1990). Monitoring and Control of Animal Cell Bioreactors: Biochemical Engineering Considerations. Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology, A. S. Lubiniecki, Marcel Dekker inc., New York, 452-481.

HU, W. S., DODGE, T. C., FRAME, K. K., et HIMES, V. B. (1987). Effect of Glucose on the Cultivation of Mammalian Cells. Development in Biology Standard, 66, 279-290.

JENKINS, H. A., BUTLER, M., et DICKSON, A. J. (1992). Characterization of Glutamine Metabolism in Two Related Murine Hybridomas. Journal of Biotechnology, 23, 167-182.

KAMEN, A. A., BÉDARD, C., TOM, R., PERRET, S., et JARDIN, B. (1996). On-Line Monitoring of Respiration in Recombinant-Baculovirus Infected and Uninfected Insect Cell Bioreactor Culture. Biotechnology and Bioengineering, 50, 36-48.

KAMEN, A., TOM, R., CARON, A., CHAVARIE, C., MASSIE, B., et ARCHAMBAULT, J. (1991). Culture of Insect Cells in a Helical Ribbon Impeller Bioreactor. Biotechnology and Bioengineering, 38, 619-628.

KAY, M. A., et WOO, S. L. C. (1994). Gene Therapy for Metabolic Disorders. Trends in Genetics, 10, 253-257.

KOOISTRA, T., et LLOYD, J. B. (1985). Degradation of Insulin by Human Fibroblasts: Effects of Inhibitors of Pinocytosis and Lysosomal Activity. International Journal of Biochememistry, 17, 805-811.

KOOISTRA, T., et LLOYD, J. B. (1986). Pinocytosis and Degradation of Exogenous Proteins by Cystinotic Fibroblasts. Biochimica Biophysica Acta, 887, 182-186.

KROUGLIAK, V., et GRAHAM, F. L. (1995). Development of Cell Lines Capable of Complementing E1, E4, and Protein IX Defective Adenovirus Type 5 Mutants. Human Gene Therapy, 6, 1575-1586.

KUMEL, G., et J., H. H. (1979). The Influence of Arginine Starvation on the Synthesis of Virus High Molecular Weight DNA in Hela Cells Productively Infected by Adenovirus Type 5. Journal of General Virology, 45, 599-610.

KUROKAWA, H., PARK, Y. S., LIJIMA, S., et KOBAYASHI, T. (1994). Growth characteristics in Fed-Batch Culture of Hybridoma Cells with control ogf Glucose and Glutamine Concentrations. Biotechnology and Bioengineering, 44, 95-103.

LANKS, K. W., et LI, P.-W. (1988). End Products of Glucose and Glutamine Metabolism by Cultured Cell Lines. Journal of Cellular Physiology, 135, 151-155.

LARRABEE, M. G. (1989). The Pentose Cycle (Hexose Monophosphate Shunt). Journal of Biological Chemistry, 264, 15875-15879.

LAZO, P. A. (1981). Amino Acids and Glucose Utilization by Different Metabolic Pathways In Ascites-Tumour Cells. European Journal of Biochemistry, 117, 19-25.

LEHNINGER, A. L. (1982). Principles of Biochemistry, 1st Edition, Worth Publishers, New York, 1011 pages.

LEPPARD, K. N. (1997). E4 Gene Function in Adenovirus, Adenovirus Vector and Adeno-Associated Virus Infections. Journal of General Virology, 78, 2131-2138.

LINDBERG, U., PERSSON, T., et PHILIPSON, L. (1972). Isolation and Characterization of Adenovirus Messenger Ribonucleic Acid in Productive Infection. Journal of Virology, 10, 909-919.

LJUNGGREN, J., et HAGGSTROM, L. (1992). Glutamine Limited Fed-batch Culture reduces the Overflow Metabolism of Amino Acids in Myeloma Cells. Cytotechnology , 8, 45-56.

LJUNGGREN, J., et HAGGSTROM, L. (1994). Catabolic Control of Hybridoma Cells by Glucose and Glutamine Limited Fed-Batch Cultures. Biotechnology and Bioengineering, 44, 808-818.

LUSKY, M., CHRIST, M., RITTNER, K., DIETERLE, A., DREYER, D., MOUROT, B., SCHULTZ, H., STOECKEL, F., PAVIRANI, A., et MEHTALI, M. (1998). In Vitro and In Vivo Biology of Recombinant Adenovirus Vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 Deleted. Journal of Virology, 72, 202.

MANCUSO, A., SHARFSTEIN, S. T., FERNANDEZ, E. J., CLARK, D. S., et BLANCH, H. W. (1998). Effect of Extracellular Glutamine Concentration on Primary and Secondary Metabolism of a Murine Hybridoma: An In Vivo Nuclear Magnetic Resonance Study. Biotechnology and Bioengineering, 57, 172-187.

MANCUSO, A., SHARFSTEIN, S. T., TUCKER, S. N., CLARK, D. S., et BLANCH, H. W.1994. Examination of Primary Metabolic Pathways in a Murine Hybridoma with Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Biotechnology and Bioengineering, 44, 563-585.

MCDERMOTT, R. H., et BUTLER, M. (1993). Uptake of Glutamate, not Glutamine Synthetase, Regulates Adaptation of Mammalian Cells to Glutamine-Free Medium. Journal of Cell Science, 104, 51-58.

MILLER, W. M., WILKE, C. R., et BLANCH, H. W. (1989). Transiant Responses of Hybridoma Cells to Nutrient Additions in Continuous Culture: 2. Glutamine Pulse and Step Changes. Biotechnology and Bioengineering, 33, 487-499.

NADEAU, I. (1995). Mise à l'échelle du procédé de production de protéines recombinantes avec le système d'expression adénovirus et cellules 293S. Mémoire de maîtrise, École polytechnique de Montréal, Canada.

NADEAU, I., GARNIER, A., CÔTÉ, J., MASSIE, B., CHAVARIE, C., et KAMEN, A. (1996). Improvement of Recombinant Protein Production with the Human Adenovirus/293S Expression System Using Fed-Batch Strategies. Biotechnology and Bioengineering, 51, 613-623.

NADEAU, I., JACOB, D., PERRIER, M., et KAMEN, A. (2000a). 293SF Metabolic Flux Analysis during Cell Growth and Infection with an Adenoviral Vector. Biotechnology Progress, Submitted.

NADEAU, I., SABATIÉ, J., KOEHL, M., PERRIER, M., et KAMEN, A. (2000b). Human 293 Cell Metabolism in low Glutamine-Supplied Culture: Interpretation of Metabolic Changes through Metabolic Flux Analysis. Metabolic Engineering, In Press.

NEERMANN, J., et WAGNER, R. (1996). Comparative Analysis of Glucose and Glutamine Metabolism in Transformed Mammalian Cell Lines, Insect and Primary Liver Cells. Journal of Cellular Physiology, 166, 152-169.

NEWLAND, M., GREENFIELD, P. F., et REID, S. (1990). Hybridoma growth limitations: the roles of energy metabolism and ammonia production. Cytotechnology, 3, 215-229.

NYBERG, G. B., BALCARCEL, R. R., FOLLSTAD, B. D., STEPHANOPOULOS, G., et WANG, D. I. C. (1999). Metabolism of Peptide Amino Acids by Chinese Hamster Ovary Cells Grown in a Complex Medium. Biotechnology and Bioengineering, 62, 324-335.

OSMAN, L. P., MITCHELL, S. C., et WARING, R. H. (1997). Cysteine, its metabolism and toxicity. Sulfur Reports, 20, 155-172.

OZTURK, S. S., RILEY, M. R., et PALSSON, B. O. (1992). Effects of Ammonia and Lactate on Hybridoma Growth, Metabolism, and Antibody Production. Biotechnology and Bioengineering, 39, 418-431.

PAREDES, C., PRATS, E., CAIRO, J. J., AZORIN, F., et GODIA, F. (1999). Modification of Glucose and Glutamine Metabolism in Hybridoma Cells through Metabolic Engineering. Cytotechnology, 30, 85-95.

PAREDES, C., SANFELIU, A., CARDENAS, F., CAIRO, J. J., et GODIA, F. (1998). Estimation of the intracellular fluxes for a hybridoma cell line by material balances. Enzyme and Microbial Technology, 23, 187-198.

PETCH, D., et BUTLER, M. (1994). Profile of Energy metabolism in a Murine Hybridoma: Glucose ad Glutamine Utilization. Journal of Cellular Physiology, 161, 71-76.

PHILIPSON, L., PETTERSSON, U., LINDBERG, U., TIBBETTS, C., VENNSTROM, B., et PERSSON, T. (1975). RNA Synthesis and Processing in adenovirus infected cells. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 39, 447-456.

PINA, M., et GREEN, M. (1969). Biochemical Studies on Adenovirus Multiplication. XLV . Macromolecule and Enzyme Synthesis in Cells Replicating Oncogenic and Nononcogenic Human Adenovirus. Virology, 38, 573-586.

PISSARRA, P. D. N., et HENRIKSEN, C. M. (1998). Fluxmap. A Visual Environment for Metabolic Flux Analysis of Biochemical Pathways. Computer Applications in Biotechnology, T. Yoshida and S. Shioya, Osaka, Japan.

PORTAIS, J., VOISIN, P., MERLE, M., et CANIONI, P. (1996). Glucose and Glutamine Metabolism in C6 Glioma Cells Studied by Carbon 13 NMR. Biochimie, 78, 155-164.

PORTNER, R., BOHMANN, A., LUDEMANN, I., et MARKL, H. (1994). Estimation of Specific Glucose Uptake Rates in Cultures of Hybridoma Cells. Journal of Biotechnology, 34, 237-246.

ROMAGNOLI, J. A., et STEPHANOPOULOS, G. (1981). Rectification of Process Measurement Data in the Presence of Gross Errors. Chemical Engineering Science, 36, 1849-1863.

RYLL, T., VALLEY, U., et WAGNER, R. (1994). Biochemistry of Growth Inhibition by Ammonium Ions in Mammalian Cells. Biotechnology and Bioengineering, 44, 184-193.

SALWAY, J. G. (1994). Metabolism at a Glance, 1st Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

SANFELIU, A., PAREDES, C., JORDI, J. C., et FRANCESC, G. (1997). Identification of Key Patterns in the Metabolism of Hybridoma Cells in Culture. Enzyme Microbial Technology , 21, 421-428.

SAVINELL, J. M., et PALSSON, B. O. (1992). Network Analysis of Intermediary Metabolism using Linear Optimization. 1. Development of Mathematical Formalism. Journal of Theoretical Biology, 154, 421-454.

SAVINELL, J. M., et PALSSON, B. O. (1992). Optimal Selection of Metabolic Fluxes for in vivo Measurement: 11. Application to E. Coli and Hybridoma Cell Metabolism. Journal of Theoretical Biology, 155, 215-242.

SAVINELL, J. M., et PALSSON, B. O. (1992). Optimal Selection of Metabolic Fluxes for in vivo Measurements. 1. Development of Mathematical Methods. Journal of Theoretical Biology, 155, 201-214.

SCHMID, G., et KELLER, T. (1992). Monitoring Hybridoma Metabolism in Continuous Suspension Culture at the Intracellular Level. Cytotechnology, 9, 217-229.

SCHMIDT, K., MARX, A., DE GRAAF, A. A., WIECHER, W., SAHM, H., NIELSON, J., et VILLADSEN, J. (1998). 13C Tracer Experiments and Metabolite Balancing for Metabolic Flux Analysis: Comparing Two Approaches. Biotechnology and Bioengineering, 58, 254-257.

SCHNEIDER, M., MARISON, I. W., et VON STOCKAR, U. (1996). The Importance of Ammonia in Mammalian Cell Culture. Journal of Biotechnology, 46, 161-185.

SHARFSTEIN, S. T., TUCKER, S. N., MANCUSO, A., BLANCH, H. W., et CLARK, D. S. (1994). Quantitative In Vivo Nuclear Magnetic Resonance Studies of Hybridoma Metabolism. Biotechnology and Bioengineering, 43, 1059-1074.

SIEGWART, P., MALE, K., CÔTÉ, J., LUONG, J. H. T., PERRIER, M., et KAMEN, A. (1999). Adaptative Control at Low-Level Glucose Concentration to Study HEK-293 Cell Metabolism in Serum-Free Cultures. Biotechnology Progress, 15, 608-615 .

TAKIGUCHI, N., SHIMIZU, H., et SHIOYA, S. (1997). An On-Line Physiological State Recognition System for the Lysine Fermentation Process Based On a Metabolic Reaction Model. Biotechnology and Bioengineering, 55, 170-181.

THUREEN, P. J., NARKEWICZ, M. R., BATTAGLIA, F. C., TJOA, S., et FENNESSEY, P. V. (1995). Pathways of Serine and Glycine Metabolism in Primary Culture of Ovine Fetal Hepatocytes. Pediatric Research, 38.

TRAPNELL, B. C. (1993). Adenoviral Vectors for Gene Transfer. Advanced Drug Delivery Reviews, 12, 185-199.

TRAPNELL, B. C., et GORZIGLIA, M. (1994). Gene Therapy using Adenoviral Vectors. Current Opinion in Biotechnology, 5, 617-625.

VAN DER HEIJDEN, R. T. J. M., ROMEIN, B., HEIJNEN, J. J., HELLINGA, C., et LUYBEN, K. C. A. M. (1994). Linear Constraint Relations in Biochemical Reaction Systems: I. Classification of the Calculability and the Balanceability of Conversion Rates. Biotechnology and Bioengineering, 43, 3-10.

VANROLLEGHEM, P. A., et HEIJNEN, J. J. (1998). A Structured Approach for Selection Among Candidate Metabolic Network Models and Estimation of Unknown Stoechiometric Coefficients. Biotechnology and Bioengineering, 58, 133-138.

VARNER, J., et RAMKRISHNA, D. (1999). Mathematical models of metabolic pathways. Current Opinion in Biotechnology, 10, 146-150.

VOET, D., et VOET, J. G. (1990). Biochemistry, 1st Edition, John Wiley and Sons, New York, 1223 pages.

VRIEZEN, N., ROMEIN, B., LUYBEN, K. C. A. M., et VAN DIJKEN, J. P. (1997). Effects of Glutamine Supply on Growth and Metabolism of Mammalian Cells in Chemostat Culture. Biotechnology and Bioengineering, 54, 272-286.

WANG, N. S., et STEPHANOPOULOS, G. (1983). Application of Macroscopic Balances to the Identification of Gross Measurements Errors. Biotechnology and Bioengineering, 25, 2177-2208.

WANG, Q., et FINER, M. H. (1996). Second-Generation Adenovirus Vectors. Nature Medicine, 2, 714-716.

WHITE, D. O., SCHARF, M. D., et MAIZEL, J. V. (1969). The Polypeptides of Adenovirus III. Synthesis in Infected Cells. Virology, 3, 395-406.

WIGAND, R., et KUMEL, G. (1978). Amino acid Requirement of Adenovirus Multiplication. Journal of General Virology, 39, 281-292.

XIE, L. Z., et WANG, D. I. C.1994. Stoechiometric Analysis of Animal Cell Growth and Its Application in Medium Design. Biotechnology and Bioengineering, 43, 1164-1174.

XIE, L., et WANG, D. I. C. (1994). Applications of Improved Stoechiometric Model in Medium Design and Fed-Batch Cultivation of Animal Cells in Bioreactor. Cytotechnology , 15, 17-29.

XIE, L., et WANG, D. I. C. (1994). Fed-Batch Cultivation of Animal Cells Using Different Medium Design Concepts and Feeding Stategies. Biotechnology and Bioengineering, 43, 1175-1189.

XIE, L., et WANG, D. I. C. (1996). Energy metabolism and ATP balance in Animal Cell Cultivation Using A Stoichiometrically Based Reaction Network. Biotechnology and Bioengineering, 52, 591-604.

XIE, L., et WANG, D. I. C. (1996). Material Balance Studies on Animal Cell Metabolism Using a Stoichiometrically Based Reaction Network. Biotechnology and Bioengineering , 52, 579-590.

ZENG, A.-P., et DECKWER, W.-D. (1995). Mathematical Modeling and Analysis of Glucose and Glutamine Utilization and regulation In Cultures of Continuous Mammalian Cells. Biotechnology and Bioengineering, 47, 334-346.

ZENG, A.-P., HU, W.-S., et DECKWER, W.-D. (1998). Variation of Stoechiometric Ratios and Their Correlation for Monitoring and Control of Animal Cell Cultures. Biotechnology Progress, 14, 434-441.

ZHOU, W., REHM, J., et HU, W.-S. (1995). High Viable Cell Concentration Fed-Batch Culture of Hybridoma Cells Through On-Line nutrient Feeding. Biotechnology and Bioengineering, 46, 579-587.

ZUPKE, C., et STEPHANOPOULOS, G. (1995). Intracellular Flux Analysis in Hybridomas Using Mass Balances and In Vitro 13C NMR. Biotechnology and Bioengineering, 45, 292-303.

ANNEXE I : ORGANISATION DES DONNÉES SUR DISQUE.

Les annexes ont été enregistrées sur CD-ROM. Les fichiers PC001.xls à PC007.xls représentent les différentes expérimentations qui ont été faites en bioréacteur. Chaque fichier est subdivisé en différentes parties soit les résultats bruts, où les conditions expérimentales sont explicitées, le lissage, où la matrice des taux de production et de consommation est construite, l'analyse des protéines totales, la composition en acides aminés, l'analyse des protéines extracellulaires ainsi que l'analyse de l'ADN. Le fichier Matrice.xls comprend les matrices stoechiométriques utilisées pour les modèles A, B et C. On a également répertorié les fichiers textes, utilisable dans Matlab, pour le calcul des flux, l'analyse de sensibilité, la réconciliation de données et le calcul des flux à mesurer pour faire baisser le conditionnement de la matrice stoechiométrique.