

Produire de grandes quantités de cellules : guide de scale-up des cultures cellulaires en faible volume - 1ère Partie



John A. Ryan, Ph.D.
Corning Incorporated Life Sciences 900 Chelmsford St. Lowell, MA 01851

Table des matières

Introduction	1
Choix du système	2
Sélection du meilleur système	13
Références	17

Introduction:

Besoin de plus de cellules ... les chercheurs en sciences de la vie sont constamment mis au défi de produire plus de cellules pour les essais cellulaires, ou pour la production de protéines recombinantes, d'anticorps et de vecteurs viraux. Les chercheurs peuvent choisir parmi une grande variété de flaconage et de récipients pour la culture cellulaire, de systèmes et de méthodes pour répondre à leurs besoins. Ce guide Corning est conçu pour aider les chercheurs à sélectionner les systèmes et les méthodes les mieux adaptés à leurs objectifs pour produire de grandes quantités de cellules ou de produits cellulaires. Il se concentrera sur les systèmes de base adaptés à la production d'au moins 1×10^9 cellules (environ un gramme). Ce guide n'est pas conçu pour les chercheurs qui ont besoin de produire des quantités beaucoup plus importantes de cellules ou pour la production visant des applications cliniques ou industrielles, bien que la plupart des informations présentées ici soient également applicables à ces situations.

Un objectif de ce guide est de décrire des procédures aussi simples que possible pour augmenter les chances de succès. Un deuxième objectif est de maintenir les coûts aussi bas que possible pour que le protocole de scale-up soit le plus abordable possible pour les laboratoires de recherche qui doivent gérer des budgets réduits. En conséquence, les systèmes de culture en fibres creuses, en réacteurs à lit fixe et fluidisé, et en bioréacteurs agités, ainsi que d'autres systèmes nécessitant des investissements importants ne sont pas décrits ici. Les références en fin de document fourniront un point de départ utile pour des informations supplémentaires sur ces systèmes et les stratégies plus complexes.

Choix du système

La première étape dans ce guide de choix d'un système de scale-up sera de passer en revue les systèmes que Corning recommande pour une utilisation dans les laboratoires de recherche. Chaque système doit être évalué en fonction de vos propres besoins et situation.

Corning propose six systèmes pour le scale-up de culture de cellules adhérentes:

- Les flacons à large surface de culture
- Les boîtes de culture carrés de 245 mm
- Les rollers
- Les chambres de culture CellSTACK® multi-couches
- Les HYPER Flask™
- Les bioréacteurs E-Cube™

pour les cultures de cellules en suspension Corning propose:

- Les flacons *spinner* en plastique à usage unique ou en verre réutilisable
- Les flacons Erlenmeyer en plastique à usage unique ou en verre réutilisable

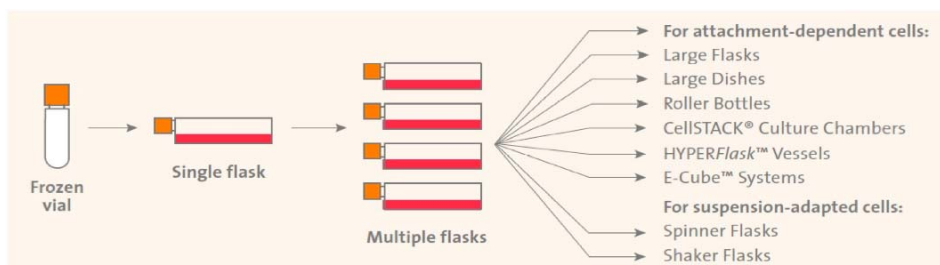


Figure 2. Corning propose divers systèmes pour le scale-up des cultures de cellules adhérentes ou en suspension

Flacons

Les premières fioles pour la culture cellulaire ont été développées par Alexis Carrel en 1923. Ces flacons de section circulaire à fond plat ont été fabriqués en verre PYREX® et présentaient un col droit ou incliné. On les appelait «flacons D» où le «D» faisait référence à leur diamètre: ainsi, un flacon D-3,5 présente un diamètre de 3,5 cm. William Earle introduit les flacons «T» en verre en 1947 qui présentent une section hexagonale ou rectangulaire. Le «T» désigne dans ce cas la surface totale disponible pour la croissance cellulaire: ainsi, un flacon T-25 présente une surface de croissance de 25 cm². Dans les années 1960, des flacons T à col droit sont disponibles à partir de polystyrène moulé qui a été traité pour améliorer la fixation des cellules. Corning a développé le premier flacon T à col incliné en polystyrène en 1974 pour permettre un meilleur accès de la pipette à la monocouche cellulaire. Corning propose cinq tailles allant de 25 cm² à 225 cm² en surface de culture (tableau 1). La plupart de ces flacons sont disponibles soit avec la surface de culture standard ou la surface CellBIND® Corning® Surface pour améliorer l'adhérence cellulaire. Les flacons Corning sont disponibles avec plusieurs types de cols. Pour réduire les problèmes de contamination dans les incubateurs à CO₂ l'utilisation de bouchons ventilés est fortement recommandée.

Avantages des flacons

- standardisés et faciles à utiliser;
- facilité du pipetage pour l'entretien et la récolte des cellules;
- la croissance cellulaire peut être rapidement déterminée au microscope;
- réduction des risques de déversements du milieu et de contamination de la culture;
- aucun matériel supplémentaire requis.

Inconvénients des flacons

- grand nombre de flacons à manipuler pour produire de grandes quantités de cellules: il faut 44 flacons T225 pour obtenir 1×10^9 cellules (Figure 3)
- encombrement des incubateurs

Table1. rendements cellulaires et volumes de milieu recommandés avec les flacons Corning

Flacons Corning	Rendement moyen des cellules *	Volume moyen
25 cm ²	$2,5 \times 10^6$	5 à 7,5 mL
75 cm ²	$7,5 \times 10^6$	15 à 22,5 mL
150 cm ²	$1,5 \times 10^7$	30 à 45 mL
175 cm ²	$1,75 \times 10^7$	35 à 52,5 mL
225 cm ²	$2,25 \times 10^7$	45 à 67,5 mL

* En supposant un rendement moyen de 1×10^5 cellules / cm² à partir de 100% culture confluente.



Figure 3. Flacon Corning ® T-225

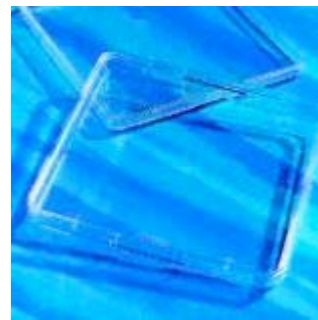


Figure 4. Boîte de culture carrée 245mm

Boîtes de culture

Les boîtes de culture circulaires en verre ont été mises au point par Richard Petri en 1877 quand il était assistant au laboratoire de microbiologie de Robert Koch. La simple boîte de Pétri en verre a été largement utilisée dans les premiers temps de la culture cellulaire comme un contenant stérile pour la conservation de cultures en attente. Les boîtes de Petri en polystyrène dont la surface est traitée pour la culture cellulaire sont disponibles depuis les années 1960. Corning propose des boîtes circulaires en quatre tailles, de 35 mm à 150 mm de diamètre (tableau 2). La plus grosse boîte de 150 mm de diamètre présente une surface de culture d'environ 148 cm². Toutefois, pour la production de plus grandes quantités de cellules Corning propose la boîte carrée de 245 mm de côté qui présente une surface de culture élargie de 500 cm² (Figure 4).

Avantages des boîtes de culture

- une alternative économiques aux flacons;
- accès direct à la surface cellulaire ce qui facilite la récolte (en particulier par grattage);
- moins encombrantes que les flacons en incubateur
- la croissance cellulaire peut être rapidement déterminée avec un microscope
- Aucun matériel supplémentaire requis

Inconvénients

- grand nombre de boîtes à manipuler pour produire des grosses quantités de cellules: il faut une surface totale en boîte de 20 500 cm² pour obtenir 1x10⁹ cellules (Figure 3)
- risques accrus de déversements accidentels du milieu et de contaminations

Tableau 2. rendements cellulaires et volumes de milieu recommandés avec les boîtes Corning

Plats Corning	Zone de croissance	rendement cellulaire moyen *	Volume moyen
35 mm	8 cm ²	8,0 x 10 ⁵	1,6 à 2,4 mL
60 mm	21 cm ²	2,1 x 10 ⁶	4,2 à 6,3 mL
100 mm	55 cm ²	5,5 x 10 ⁶	10 à 15 mL
150 mm	148 cm ²	1,48 x 10 ⁷	30 à 45 mL
245 mm (carré)	500 cm ²	5,0 x 10 ⁷	100 à 150 mL

* En supposant un rendement moyen de 1x10⁵ cellules / cm² à partir de 100% culture confluente.

Flacons Roller

Le concept de culture cellulaire en rotation a été développé par George Gey (1933) à la Johns Hopkins University comme un moyen pour produire de plus grandes quantités de cellules adhérentes. Les premiers travaux ont été réalisés avec des tubes de verre. À la fin des années 1950, les rollers en verre étaient couramment utilisés pour cultiver de grandes quantités de cellules, en particulier pour la production de vaccins viraux (Whittle et Kruse, 1973; Mather, 1998b). Corning propose des rollers en polystyrène de quatre tailles, de 490 cm² à 1750 cm² en surface de croissance (figure 5 et tableau 3). Ces rollers sont disponibles soit avec la surface de culture standard ou la surface CellBIND® Corning® Surface pour améliorer l'adhérence cellulaire. Corning propose également des rollers réutilisables en verre PYREX® pour ses caractéristiques de clarté optique et de résistance mécanique. Les rollers Corning réutilisables en verre PYREX® sont conçus pour résister aux stérilisations humides ou sèches et sont disponibles en surface de culture de 670 à 1330 cm².



Figure 5. Roller Corning en polystyrène

Avantages des rollers

- évitent la formation de gradients au sein du milieu qui peuvent affecter négativement la croissance;
- échanges gazeux améliorés;
- très économiques pour cultiver de grandes quantités de cellules adhérentes: mêmes techniques de culture qu'avec les flacons, mais moins de manipulation
- la croissance cellulaire peut être déterminée en utilisant un microscope inversé

Inconvénients des rollers

- Exigent plus de place en incubateur en comparaison des flacons et des boîtes;
- Difficulté de manipulation modérée pour produire un grand nombre de cellules: 12 850 cm² en roller pour 1x10⁹ cellules;
- Investissements nécessaires en équipement (approx. 1000 € pour traiter 12 rollers);
- Risque de décrochement des cellules à cause de la rotation constante des rollers, qui peut être aggravé en milieu sans sérum ou avec de faibles concentrations de sérum. La surface CellBIND® Corning® a été développée pour résoudre ces problèmes.

Tableau 3. rendements cellulaires et volumes de milieu recommandés avec les rollers Corning

Bouteilles Roller Corning	Rendement moyen des cellules *	Volume moyen
Flacon Roller 490 cm ²	4,9 x 10 ⁷	100 à 150 mL
Flacon Roller 850 cm ²	8,5 x 10 ⁷	170 à 255 mL
Flacon Roller 1700 cm ²	1,7 x 10 ⁸	340 à 510 mL
Flacon Roller 1750 cm ²	1,75 x 10 ⁸	350 à 525 mL

* En supposant un rendement moyen de 1×10^5 cellules / cm² à partir de 100% culture confluente.

Chambres de culture CellSTACK® Corning®

Les chambres de culture CellSTACK Corning sont des chambres multi-couches qui assurent une surface de culture élargie et une diminution de la charge de travail adaptées à la production de grandes quantités de cellules adhérentes (figure 6). Les chambres CellSTACK sont disponibles en quatre tailles qui conviennent à une utilisation dans un laboratoire de recherche. La couche unique 1-STACK avec 636 cm² de surface de croissance cellulaire, 2-STACK avec 1.272 cm² de surface de culture, 5-STACK avec 3.180 cm² de surface de culture et les 10-STACK avec 6.360 cm² de surface de culture (tableau 4). Il existe également la chambre de culture CellSTACK - 40 avec une surface de culture de 25 440 cm² qui peut facilement produire plus de $2,5 \times 10^9$ cellules. Toutefois, en raison de sa grande taille, elle nécessite un équipement spécial et n'est pas recommandée pour une utilisation en laboratoire de recherche. Les chambres de culture CellSTACK sont disponibles soit avec la surface de culture standard ou la surface CellBIND® Corning® pour améliorer l'adhérence cellulaire. Les chambres CellSTACK sont munies de deux ouvertures de 26 mm de diamètre qui permettent un accès direct au fond de la chambre et offrent une plus grande flexibilité pour la manipulation aseptique des milieux dans les chambres. Il existe en option, des bouchons et tubes de remplissage pour le transfert aseptique direct des milieux avec pompe péristaltique ou par gravité qui sont recommandés pour les grandes chambres CellSTACK (figure 7).

Pour aider les chercheurs peu familiers avec la manipulation des chambres de culture CellSTACK, Corning propose un guide technique en vidéo disponible sur [www.corning.com / Lifesciences](http://www.corning.com/Lifesciences).

Avantages des CellSTACK

- moins de manipulation pour produire des cellules en grande quantité: seulement 2 CellSTACK-10 sont nécessaires pour obtenir 1×10^9 cellules
- scale-up facilité en ajoutant simplement plusieurs couches ou plusieurs chambres
- gain de place en incubateur;
- aucun matériel supplémentaire requis



Figure 6. chambre CellSTACK10 Corning



Figure 7. bouchons optionnels de remplissage pour le transfert aseptique direct des milieux

Inconvénients

- Les grandes chambres CellSTACK sont lourdes après remplissage, et plus difficiles à manipuler;
- Les volumes importants de milieu utilisés dans les grandes chambres CellSTACK® rendent la manipulation moins aisée que pour les flacons ou les boîtes : le pipetage n'est pas possible.
- La vérification de la croissance des cellules par microscopie est impossible en CellSTACK-10 en raison de leur hauteur. Cependant une culture témoin peut être réalisée en parallèle en CellSTACK-1 dans les mêmes conditions.

Tableau 4. rendements cellulaires et volumes de milieu recommandés avec les CellSTACK Culture Chambers Corning

Corning Vessel	Growth area	Average cell yield*	Media volume
1-Stack	636 cm ²	6.36 x 10 ⁷	130 to 190 mL
2-Stack	1,272 cm ²	1.27 x 10 ⁸	260 to 380 mL
5-Stack	3,180 cm ²	3.18 x 10 ⁸	650 to 900 mL
10-Stack	6,360 cm ²	6.36 x 10 ⁸	1,300 to 1,900 mL
40-Stack	25,440 cm ²	2.54 x 10 ⁹	5,200 to 7,200 mL

* En supposant un rendement moyen de 1x10⁵ cellules / cm² à partir de 100% culture confluente.

Corning HYPERFlask™ Vessels

Les Corning HYPERFlask™ Vessels utilisent un film de polystyrène perméable au gaz pour permettre les échanges gazeux entre les cellules, le milieu de culture et l'environnement atmosphérique. Cela permet d'obtenir une surface de croissance des cellules plus grande que dans les flacons traditionnels (175 cm²) avec le même encombrement. Les Corning HYPERFlask™ vessels sont conçues pour être entièrement remplies et fermées avec un bouchon standard. Il n'est pas nécessaire d'utiliser un bouchon à dégazage en raison de l'échange de gaz à travers la couche ultra mince. Chaque Corning HYPERFlask™ vessel présente une surface de culture totale de 1720 cm² soit 10 fois la surface d'un flacon T175 standard.

Avantages

- Les dix films interconnectés en polystyrène permettent l'échange de gaz directement dans le milieu ;
- aucun matériel supplémentaire requis;
- l'amélioration des rendements cellulaires par rapport aux flacons des 175 cm² avec le même encombrement permet d'augmenter la productivité tout en simplifiant les manipulations;
- nécessite bien moins d'espace en incubateur qu'avec les rollers, les flacons, les boîtes et les chambres CellSTACK .

Inconvénients

- Chaque Corning HYPERFlask™ Vessels nécessite 565 mL de milieu, volume difficilement pipetable;
- seulement 4 des 10 couches peuvent être observées directement par microscopie.

E - Cube™ System Corning

Le système E-Cube est un bioréacteur à perfusion de petite dimension (25,4 cm x 35,6 cm) qui utilise en parallèle le module breveté 10-Stack CellCube Corning représentant une surface de culture de 8500 cm². Les modules CellCube présentent une surface de culture en polystyrène traitée pour la fixation des cellules et sont continuellement perfusés avec du milieu pour une productivité accrue de cellules. Corning a développé le module CellCube comme une chambre de croissance parallèle qui est intégrée dans un système de bioréacteur pour la culture de masse. Le système est idéal pour produire de grandes quantités de cellules, ou des protéines recombinantes, des vaccins et des vecteurs viraux pour la thérapie génique (Kotani, et al., 1994). Contrairement aux bioréacteurs à fibres creuses, les cellules peuvent être directement récoltées à partir des systèmes E-Cube.

Le système E-Cube comprend un oxygénateur, un réservoir intermédiaire, les ports d'accès avec tous les tubes et les raccords nécessaires ainsi qu'un module 10-Stack CellCube à usage unique. Le système nécessite une pompe péristaltique (Figure 9) et il s'intègre dans la plupart des incubateurs à CO₂. Le volume de milieu recommandé avec un module 10-Stack CellCube est de 1700 à 2550 mL de milieu.



Figure 9. Système E-Cube Corning

Pour aider les chercheurs peu familiers avec l'E-Cube™, Corning fournit un manuel d'instructions sur www.corning.com/lifesciences qui montre l'installation et l'utilisation de ce produit.

Avantages

- Nécessite moins de manipulation que les cultures en boîtes, flacons ou roller pour produire de grandes quantités de cellules: un seul module 10-Stack CellCube permet de cultiver environ 1×10^9 cellules;
- rendements cellulaires accrus en raison de perfusion de milieu en continu
- scale-up rapide par un passage possible sur des modules 25-Stack CellCube comportant 21250 cm^2 de surface de croissance
- nécessite moins d'espace en incubateur.

Inconvénients

- pas d'observation directe des cellules en microscopie;
- nécessite une expertise spécifique;
- investissement nécessaire en matériel au départ;
- nécessite une pompe péristaltique

Flacons Spinner

En 1956, W. Cherry et R.N. Hull ont utilisé un agitateur magnétique suspendu pour cultiver des cellules en suspension dans des flacons à fond rond. En 1957, McLimans et ses collègues ont mis au point le flacon spinner en verre tel qu'on le connaît aujourd'hui et en 1958 ils ont réalisé sur ce modèle des fermenteurs de 20 litres. Pour les lignées qui peuvent être cultivées en suspension, les spinners offrent un moyen simple et très économique pour produire un grand nombre de cellules. De nombreuses lignées de cellules adaptées peuvent atteindre des densités de 1 à 2×10^6 cellules/mL ou plus dans ces flacons (Mather, 1998b, Iyer et al., 1999). Corning propose des spinners de 125 mL à 36 l en verre, réutilisables avec des systèmes d'ouverture variés (Figure 10 et tableau 5). Des spinners à usage unique en polystyrène sont également disponibles en 125 mL, 500 mL, 1L et 3L (Figure 11). Ces flacons spinner jetables sont prêts à l'emploi et ne nécessitent aucun nettoyage, assemblage et stérilisation.

Avantages

- économique et compact;
- les cellules se récoltent facilement;
- manipulation aisée par rapport aux autres systèmes;
- scale-up possible.

Inconvénients

- Uniquement pour les cellules en suspension
- difficile de nourrir les cultures
- exige l'utilisation d'un agitateur magnétique, qui occupe plus d'espace en incubateur
- charge de travail significative pour décontaminer, nettoyer et stériliser les spinners en verre.

Tableau 5. Rendements cellulaires et volumes de milieu recommandés avec les spinners Corning

Corning Spinner Flasks	Average Cell Yield*	Working Volume
125 mL Spinner Flask	1.25×10^8	100 to 125 mL
250 mL Spinner Flask†	2.5×10^8	125 to 250 mL
500 mL Spinner Flask	5.0×10^8	250 to 500 mL
1L Spinner Flask	1.0×10^9	0.5 to 1L
3L Spinner Flask	3.0×10^9	1.5 to 3L
6L Spinner Flask†	6.0×10^9	3.0 to 6.0L
15L Spinner Flask†	1.5×10^{10}	7.5 to 15L
36L Spinner Flask†	3.6×10^{10}	18 to 36L

* En supposant un rendement moyen de 1×10^5 cellules / cm^2 à partir de 100% culture confluente.



Figure 10. Spinners en verre réutilisables



Figure11. Spinners en polystyrène à usage unique

Erlenmeyers avec agitation

En 1954, W.R. Earle utilisait des Erlenmeyers pour cultiver des cellules L929 en suspension. Aujourd'hui, ils sont largement utilisés sur des agitateurs à plateaux pour faire croître des bactéries, des champignons et des cellules végétales ou animales en suspension. Ils sont particulièrement utiles pour la culture de lignées de cellules d'insectes qui nécessitent une forte oxygénation. Corning propose des Erlenmeyers en plastique jetables ou en verre réutilisables dans une variété de tailles (50 mL à 6l) et de formes (figures 12, 13, et le tableau 6). Les flacons en plastique Erlenmeyer sont disponibles avec des **défecteurs** pour améliorer le mélange et des bouchons ventilés pour accroître les échanges gazeux.

Avantages

- économique et compact
- échantillonnage et récolte facilités
- optimisation des échanges gazeux par rapport aux flacons spinner
- demandent moins de manipulation
- scale-up jusqu'à 1L de milieu en un flacon de 3L

Inconvénients

- système réservé aux cellules en suspension
- nécessite des agitateurs



Figure12.Erlenmeyer en verre Pyrex®



Figure13. Flacon Fernbach de 3L en plastique Corning®

Tableau 6. Rendements cellulaires et volumes de milieu recommandés avec les Erlenmeyers Corning

Flacons Shaker Corning	Rendement moyen des cellules *	Volume de travail
mLErlenmeyer 50 mL	$2,0 \times 10^7$	15 à 20 mL
Erlenmeyer 125 mLmL	$5,0 \times 10^7$	37,5 à 50 mL
Erlenmeyer 50 mL	$1,0 \times 10^8$	75 à 100 mL
Erlenmeyer 500 mLmL	$2,0 \times 10^8$	150 à 200 mL
Erlenmeyer 1L	$4,0 \times 10^8$	300 à 400 mL
Erlenmeyer 2L	$8,0 \times 10^8$	600 à 800 mL
Flacon Fernbach 3L	$1,2 \times 10^9$	1,0 à 1,2 L
Erlenmeyer 4L †	$1,6 \times 10^9$	1,2 à 1,6 L
Erlenmeyer 6L †	$2,4 \times 10^9$	2,0 à 2,4 L

* En supposant un rendement moyen de 1×10^6 cellules / mL d'une culture utilisée au volume de travail maximal. † Uniquement disponible en verre.

Sélection du meilleur système

La démarche de sélection du système le mieux adapté à vos besoins nécessite de répondre de manière approfondie à ces 5 questions :

- adhésion cellulaire ou culture en suspension
- rendements désirés en cellules ou en produits cellulaires
- besoins en matériel et en espace
- charge de travail requise
- investissements nécessaires et niveau d'expertise.

Une fois que chacun de ces cinq domaines aura été soigneusement évalué et compris, le choix du système qui répond le mieux à vos besoins sera beaucoup plus facile.

Adhésion cellulaire

La première étape, et le plus important est de déterminer les exigences en terme d'attachement de vos cellules. Certaines lignées de cellules sont adhérentes, c'est à dire qu'elles ne peuvent croître que si elles adhèrent à un substrat approprié, tel que la paroi d'un flacon ou d'un roller. D'autres lignées cellulaires, en particulier les lignées cellulaires transformées, sont capables de se développer, soit attachées à un substrat ou en suspension : elles ne sont pas dépendante d'un accrochage à un substrat.

En général, si les cellules le permettent, il est toujours plus facile de cultiver de grandes quantités de cellules animales en suspension plutôt qu'en adhésion. Certaines lignées cellulaires génétiquement modifiées pour la production de protéines recombinantes auront aussi des rendements plus élevés lorsqu'elles seront cultivées en suspension. Si les cellules sont adhérentes, il peut être possible dans certains cas de les adapter à une croissance en suspension. Toutefois, même si cette adaptation est possible, les cellules peuvent ne pas maintenir leurs caractéristiques ou ne pas produire les mêmes quantités de produit (Iyer et al., 1999). Il peut également être nécessaire de sélectionner après adaptation les cellules sur leurs caractéristiques ou sur les rendements observés.

Pour les projets à court terme, il est inutile d'essayer d'adapter les lignées. Pour les projets à plus long terme, il est généralement envisageable d'essayer d'adapter les lignées adhérentes pour une culture en suspension.

Les avantages de la croissance des cellules dans les systèmes en suspension sont les suivants:

- Les cellules en suspension sont plus facile à échantillonner, mais plus difficile à nourrir
- Plus économique pour de grandes quantités de cellules
- Moins de manipulation
- Optimisation des échanges gazeux
- Moins de volume de culture nécessaire car les cellules se développent en trois dimensions au lieu de deux en culture monocouche

Une autre alternative pour la culture de cellules adhérentes en suspension est d'utiliser des micro-transporteurs dans des spinner modifiés (figure 14). Les micro-transporteurs sont des billes de verre ou de polystyrène de petite taille (100 à 300 µm) sur lesquelles les cellules s'attachent tandis que les billes sont maintenues en suspension par agitation. Ces micro-transporteurs ne fonctionnent pas de manière optimale avec tous les types de cellules. Nous ne traiterons pas de cette technique spécifique dans ce guide: pour de plus amples informations, voir les références McLimans; 1979, et Freshney; 2000.

La croissance des cellules attachées à des substrats, tels que la surface des flacons et des boîtes, offre également certains avantages puisque c'est la méthode utilisée pour la plupart des lignées de cellules.

Les avantages de la croissance des cellules dans les systèmes avec adhésion sont les suivants:

- plus facile à nourrir, mais sous-cultures plus difficiles à réaliser
- visualisation plus aisée pour vérifier l'état des cultures
- Evite les contraintes physiques sur les cellules en suspension causées par l'agitation et qui peuvent conduire à des rendements moins élevés.

Adaptation des rendements désirés en cellules ou en produits cellulaires avec le système de culture

L'étape suivante consiste à calculer la quantité de cellules nécessaires pour réaliser son projet.

En général, au moins 1×10^5 cellules/cm² peuvent généralement être produites en culture adhérente et 1×10^6 cellules/mL ou plus peuvent être produites en suspension (Tableau 8). Les rendements réels peuvent être plus élevés en fonction de la lignée cellulaire et des conditions de culture. Par exemple, en optimisant tous les aspects de la production de cellules, les entreprises biopharmaceutiques ont atteint des densités de 1×10^7 cellules/mL et plus (Wurm, 2004).

Tableau 8. Estimation des besoins pour produire 1×10^9 (~ 1g) de cellules de mammifères

Consommable plastique	Niveau d'expertise	Nb d'unité	Coût consommable	Coût équipement	Charge de travail
225 cm ² flacons	Simple	44	302 \$	Aucun	Elevée
Boîte de 245 mm	Simple	20	330 \$	Aucun	Elevée
Flacon Roller 850 cm ²	Basique	12	87 \$	1500 \$ +	Elevée
CellSTACK® -10	Moyen	2	390 \$	Aucun	Moyenne
<i>HYPERFlask Vessel 1720</i> cm ²	Moyen	6	450 \$	Aucun	Moyenne
Flacons Shaker 3L	Basique	1	48 \$	1000 \$ +	Faible
Flacons Spinner 1L	Basique	1	124 \$	1000 \$ +	Faible
Système ECube™	Elevé	1	296 \$	3000 \$ +	Faible

Données basées sur l'hypothèse de 1×10^5 cellules / cm² obtenues en culture adhérente et 1×10^6 cellules/mL en suspension. Les rendements des cellules réels peuvent être significativement plus élevés que cela en fonction de la lignée cellulaire et des conditions de culture.

Pour les productions de produits cellulaires, des mises au point préliminaires sont nécessaires pour déterminer les rendements des produits dans les conditions de culture. Obtenir des quantités de protéines de 10 mg/L est courant, cependant, comme avec les rendements en cellules, l'optimisation peut donner des rendements beaucoup plus élevés (Wurm, 2004). Sur la base de ces rendements, il est alors possible de calculer le nombre total de cellules nécessaires. De plus grandes quantités de cellules peuvent être produites soit en augmentant le nombre de flacons ou en multipliant le nombre de lots de production. Pour des laboratoires de recherche, la production de plusieurs lots peut être plus facile et plus pratique à long terme. Prendre le temps d'optimiser les milieux et les conditions de culture peut également augmenter de manière significative les rendements en cellules et en produits, en particulier pour les cultures en suspension.

Évaluer l'équipement et l'espace nécessaire

Il convient ensuite de déterminer la capacité en espace d'incubation et la disponibilité du matériel nécessaire au laboratoire. Certains systèmes de culture, tels que les spinners, sont beaucoup plus compacts que d'autres. Pensez à la possibilité d'emprunter de l'espace en incubateur à d'autres laboratoires en particulier si des pièces d'incubation sont disponibles à proximité. Certains systèmes de culture fonctionnent avec des équipements spécifiques comme les pompes, agitateurs classiques ou à plateaux. Considérez ici les budgets en équipement à prévoir.

Évaluer les besoins en charge de travail et disponibilité

Ensuite, déterminez qui sera en charge des manipulations. Les points à prendre en compte sont la disponibilité des personnes compétentes pour les protocoles de cultures cellulaires et la charge de travail pour mener le projet à son terme.

Évaluation de l'expertise requise pour exploiter le système de culture

Le système de culture est-il facile à mettre en œuvre ? Cela dépend souvent de l'expérience et de l'expertise des opérateurs. Les personnes disponibles ont-elles l'expertise et l'expérience nécessaires ?

La décision finale

En considérant les principales questions énumérées ci-dessus avec les avantages et les inconvénients de chacun des systèmes de culture résumés dans les tableaux 8 et 9, vous devriez maintenant être en mesure de choisir le ou les systèmes qui répondent le mieux à vos besoins. Gardez cependant à l'esprit les points suivants :

1. Il peut être plus facile et beaucoup plus pratique de produire la quantité de cellules requise en plusieurs lots plutôt qu'en un seul de grand volume.
2. *Plus grande est* la capacité individuelle des contenants, plus important est le risque de perte des cultures par contamination, mais les contenants de grand volume nécessitent moins de travail à mettre en œuvre, entretenir et récolter.
3. *Plus simple est* le processus et le système de culture cellulaire, plus la probabilité de succès est grande (Griffiths, 1990).
4. Surveiller l'état de la culture pour s'assurer que les cellules sont en bonne santé et produisent les rendements attendus. C'est beaucoup plus facile à faire dans des récipients de culture où les cellules peuvent être directement examinées au microscope .
5. Le temps nécessaire à *l'optimisation au démarrage* (les milieux, le sérum, les densités d'ensemencement, les fréquences d'alimentation) est profitable sur le long terme.

Tableau 9. Comparaison des système Corning pour le scale up des cultures en laboratoire de recherche

Corning Surface recommandée navire zone de travail Type (cm²) Volume (mL) Avantages Inconvénients

Type de consommable	Surface (cm ²)	Volume de travail	Avantages	Désavantages
Flacons de 225 cm ²	225	45-68	- Simple à utiliser et à récolter	- charge de travail - encombrement
Boîte carrée 245 mm	500	100-150	- Simple à utiliser et à récolter - moins d'encombrement en incubateur	- charge de travail - risques de renversement et de contamination
Roller de 850 cm ²	850	170-255	- Simple à utiliser et à récolter - économique	- charge de travail - encombrement - équipement spécifique
CellSTACK® 10 Chambres	6360	1300-1900	- charge de travail réduite - scale up facile - moins d'encombrement en incubateur	- observation des cellules difficile - manipulation des liquides
Flacon HYPERFlask™	1720	560-565	- Très compact - moins d'encombrement en incubateur - rendement 10x plus élevé qu'en flacon de 175 cm ² avec le même encombrement	- observation des cellules difficile limitée aux 4 première couches - manipulation des liquides
ECube™ System + 10-Stack CellCube Modules®	8500	1700-2550	- rendements plus élevés - charge de travail réduite - scale up facile	- requiert une expertise spécifique - observation des cellules impossible - équipement spécifique : pompe
Spinner 1L	NA	500-1000	- économique et compact - très simple d'utilisation, - échantillonnage et la récolte facilité - scale up facile	- ne fonctionne que sur les cellules en suspension - nettoyage et autoclavage nécessaire - nécessite un agitateur magnétique - encombrement
Erlenmeyer 3L	NA	500 -1000	- très simple d'utilisation, - échantillonnage et la récolte facilité - charge de travail réduite	- ne fonctionne que sur les cellules en suspension - nécessite un agitateur spécifique

Références

1. Acton, R.T., Barstad, P.A. and Zwerner, R.K. (1979). Propagation and Scaling-Up of Cultures. In Cell Culture, edited by W.B. Jakoby and I. H. Pastan, Methods in Enzymology, Vol. 58, Ch. 17, p. 211-221, Academic Press, New York, NY.
 2. Behie, L.A., Kallos, M.S. and Sen, A. (2004). Bioprocessing Aspects of Neural Stem Cell Production in Bioreactors. BioProcessing Journal 3:27-42.
 3. Clark, S.A., Griffiths, J.B. and Morris, C.B. (1990). Large-Scale Hybridoma Production. In Animal Cell Culture, edited by J.W. Pollard and J.M. Walker, Methods in Molecular Biology, Volume 5, Chapter 52, p. 631–645, Humana Press, Clifton, NJ.
 4. Freshney, R.I. (2000). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique – 4th edition. Wiley-Liss, Inc. New York, NY.
 5. Gey, G.O. (1933). An Improved Technic for Massive Tissue Culture. Am. J. Cancer 17:752-756.
 6. Griffiths, J.B. (1990). Scale-Up of Suspension and Anchorage-Dependent Animal Cells. In Animal Cell Culture, edited by J.W. Pollard and J.M. Walker, Methods in Molecular Biology, Vol. 5, Ch. 12, p. 49-63, Humana Press, Clifton, NJ.
 7. Iyer, P, Ostrove, J.M. and Vacante, D. (1999). Comparison of Manufacturing Techniques for Adenovirus Production. Cytotechnology, 30:169-172.
 8. Kotani, et al. (1994). Improved Methods of Retroviral Vector Transduction and Production for Gene Therapy. Human Gene Therapy, 5:19-29.
 9. Lincoln, C.K. and Gabridge, M.G. (1998). Cell Culture Contamination: Sources, Consequences, Prevention and Elimination. In Animal Cell Culture Methods, edited by J.P. Mather and D. Barnes, Methods in Cell Biology, Vol. 57, Ch. 4, p. 49-65, Academic Press, San Diego, CA.
 10. Mather, J.P. (1998a). Making Informed Choices: Medium, Serum, and Serum-Free Medium. In Animal Cell Culture Methods, edited by J. P. Mather and D. Barnes, Methods in Cell Biology, Vol. 57, Ch. 2, p. 19-30, Academic Press, San Diego, CA.
 11. Mather, J.P. (1998b). Laboratory Scaleup of Cell Cultures (0.5-50 Liters). In Animal Cell Culture Methods, edited by J.P. Mather and D. Barnes, Methods in Cell Biology, Vol. 57, Ch. 12, p. 219-227, Academic Press, San Diego, CA.
 12. McLimans, W.F. (1979). Mass Culture of Mammalian Cells. In Cell Culture, edited by W.B. Jakoby and I.H. Pastan, Methods in Enzymology, Vol. 58, Ch. 16, p. 194-211, Academic Press, New York, NY.
- Corning, CellBIND, CellSTACK, CellCube, and PYREX are registered trademarks of Corning, Incorporated, Corning, NY.
E-Cube and HYPERFlask are trademarks of Corning, Incorporated, Corning, NY.
All other trademarks in this document are the property of their respective owners.
Corning Incorporated, One Riverfront Plaza, Corning, NY 14831-0001
© 2008 Corning Incorporated Printed in USA 3/08 65 PW CLS-AN-064-REV1
For additional product or technical information, please visit www.corning.com/lifesciences or call 800.492.1110. Customers outside the United States, please call 978.442.2200 or contact your local Corning sales office listed below.
13. Smith, R.E. (1979). Large-Scale Growth of Rous Sarcoma Virus. In Methods in Enzymology: Cell Culture, Chapter 33, Vol. 58, edited by W.B. Jacoby and I.H. Pastan, Academic Press, New York, NY.
 14. Wang, R.J. (1976) Effect of Room Fluorescent Light on the Deterioration of Tissue Culture Medium. In Vitro 12:19-22.
 15. Wang, R.J. and Nixon, B.T. (1978). Identification of Hydrogen Peroxide as a Photoproduct Toxic to Human Cells in Tissue Culture Medium Irradiated with "Daylight" Fluorescent Light. In Vitro 14:715-722.
 16. Whittle, W.L. and Kruse, Jr., P.F. (1973). Replicate Roller Bottles. In Tissue Culture: Methods and Applications. Edited by P.F. Kruse, Jr. and M.K. Patterson, Jr., p. 327-331, Academic Press, New York, NY.
 17. Wurm, F.M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nat. Biotech. 22:1393-1398.